

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Faculté de Médecine

UMR CNRS 7276 – CRIBL –

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES**

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**PAULINE ROUAUD**

Le 29 novembre 2013

**ETUDE *IN VIVO* DU ROLE DE LA REGION REGULATRICE SITUEE EN 3' DU  
LOCUS DES CHAINES LOURDES D'IMMUNOGLOBULINES  
DANS LA LYMPHOPOÏESE B**

Directeur de thèse : Dr. Yves DENIZOT

**Jury**

Président :

**Michel Cogné** – Professeur des Universités, Université de Limoges

Rapporteurs :

**Pierre Dubus** – Professeur des Universités, Université Bordeaux 2

**Karin Tarte** – Professeur des Universités, Université de Rennes

Examineurs :

**Yves Denizot** – Directeur de Recherche INSERM, Université de Limoges



**UNIVERSITE DE LIMOGES**

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Faculté de Médecine

UMR CNRS 7276 – CRIBL –

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES**

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**PAULINE ROUAUD**

Le 29 novembre 2013

**ETUDE *IN VIVO* DU ROLE DE LA REGION REGULATRICE SITUEE EN 3' DU  
LOCUS DES CHAINES LOURDES D'IMMUNOGLOBULINES  
DANS LA LYMPHOPOÏESE B**

Directeur de thèse : Dr. Yves DENIZOT

**Jury**

Président :

**Michel Cogné** – Professeur des Universités, Université de Limoges

Rapporteurs :

**Pierre Dubus** – Professeur des Universités, Université Bordeaux 2

**Karin Tarte** – Professeur des Universités, Université de Rennes

Examineurs :

**Yves Denizot** – Directeur de Recherche INSERM, Université de Limoges





Durant ces trois années de thèse, j'ai été financée par une bourse de la région Limousin. J'ai par la suite obtenu une aide individuelle jeune chercheur de l'association ARC pour prolonger de six mois mon travail sur les projets entamés.



Laboratoire UMR CNRS 7276

« Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations »

Equipe « Contrôle de la Réponse B » dirigée par le Pr Cogné

Faculte de Medecine & de Pharmacie

2, rue du Docteur Marcland

87025 LIMOGES Cedex





## RESUME

Durant l'ontogénie B, le locus des chaînes lourdes d'immunoglobuline (IgH) subit trois évènements majeurs de réarrangements géniques. Lors de la phase précoce de l'ontogénie B, indépendamment de la rencontre avec l'antigène, les recombinaisons V(D)J donnent la diversité au répertoire antigénique. Lors de la phase tardive de la lymphopoïèse B, suite à la rencontre avec l'antigène, les hypermutations somatiques (SHM) permettent la maturation d'affinité des anticorps et la recombinaison de classe (CSR) permet à la cellule B d'acquérir de nouvelles fonctions effectrices. Tous ces évènements géniques sont finement régulés et sont sous le contrôle d'éléments *cis*-régulateurs. Dans la partie 3' du locus *IgH*, l'élément régulateur principal est la 3'RR qui s'étend sur environ 30 kb. Elle est constituée de quatre activateurs transcriptionnels formant une structure quasi-palindromique. Afin de clarifier son rôle dans le développement B, le laboratoire a créé un modèle murin délété pour cette région. Lors de ma thèse, l'étude des réarrangements VDJ dans ces animaux nous a permis de montrer que la 3'RR est dispensable à ce processus. A l'inverse, nous avons démontré son implication majeure lors de la SHM, confirmant son rôle lors des stades tardifs de la lymphopoïèse B. Enfin, bien que notre modèle murin présente un défaut de CSR, il nous a permis de mettre en évidence et caractériser un phénomène rare et encore méconnu, la CSR vers IgD, faisant de ces animaux un bon modèle d'étude de ce processus.

## MOTS CLES

Locus IgH /ontogénie B/3'RR /recombinaisons VDJ/hypermutations somatiques/  
recombinaison de classe



## **ABSTRACT**

During B-cell development, the immunoglobulin heavy chain locus (IgH) undergoes three major recombination events. During the early stages of B-cell development, before encountering the antigen, V(D)J recombination gives the diversity of the antigenic repertoire. During the late stages of B cell development, before encountering the antigen, somatic hypermutation (SHM) allows affinity maturation of antibodies and class switch recombination (CSR) allows B cells to acquire new effectors functions. All these genetic events are tightly regulated and are under the control of cis-regulatory elements. At 3' of the IgH locus, the major *cis*-regulatory element is the 3' regulatory region (3'RR) which extends for 30 kb. It contains 4 transcriptional enhancers which form a quasi-palindromic structure. In order to clarify the role of the 3'RR on the B-cell development, the laboratory has created a mouse model deleted for this region. During my PhD, the study of VDJ rearrangements in these mice allowed us to show that the 3'RR is dispensable in this process. In contrast, we have demonstrated a major involvement of the 3'RR during SHM, confirming its role in the late stages of B-cell development. Finally, although our mouse model is defective in CSR, it has allowed us to identify and characterize a rare and still unknown phenomenon, the CSR towards IgD, making these animals a good model to study this process.

## **KEY WORDS**

IgH locus /B cell development/3'RR /VDJ recombination/somatic hypermutation/class switch recombination



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à témoigner ma reconnaissance au Dr Yves Denizot pour son encadrement, son aide, ses conseils et sa disponibilité sans faille tout au long de ces trois années de thèse. Je vous remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir poussée à faire ce que je n'aurais jamais osé : un post-doc à Cambridge ?! La bonne humeur, les discussions et les blagues qui caractérisent tant la Denizot team me manqueront en Angleterre...*

*Je témoigne également ma gratitude au Pr Michel Cogné pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse passionnante. Je vous remercie pour vos conseils quant à ma recherche de post-doc et de financements ainsi que pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Je suis très reconnaissante envers les Pr Karin Tarte et Pierre Dubus qui m'ont fait l'honneur de prendre en considération mon travail en acceptant d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse.*

*J'en profite pour remercier le Pr Michael Neuberger et le Dr Crisitina Rada qui m'ont fait l'honneur de me recevoir dans leur laboratoire du MRC-LMB à Cambridge. Merci au Dr Alex Betz de m'offrir l'opportunité de réaliser mon post-doctorat dans son équipe afin de consolider mon dossier scientifique.*

*Je voudrais ensuite remercier tous les membres passés et présents de l'UMR CNRS 7276 pour ces trois années passées à vos côtés.*

*Merci à Eric pour tous ses conseils techniques et scientifiques (comment on analyse une jonction switch ?? Le vecteur LE97.1, il est où déjà ?!) mais aussi pour tous les dépannages et les petites réparations qui sont bien utiles ! Merci également à Krap, Lolo et Anne pour tous vos conseils, merci à Jeanne pour les leçons d'Anglais et pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner, Claire, ma collègue Berrichonne, pour la cyto, l'immunohisto et le confocal, Zéliha pour la transgénése, Sandrine pour les conseils concernant le Fellowship EMBO mais aussi Stéphanie, Cendrine, Sophie, Mylène et Aurore. Une pensée à l'équipe du second : Jean, Nath et Chantal ; à la partie CHU : Jean-Claude, Ahmed, François, Delphine, ... et aux anciens : Ibtissam, Aurélie, Magali, Guillaume, Abdel et Fabien (alias Nounours Leffus Gétoubus). Bon courage aux prochains : Amélie, Nicolas, Armand, Brice, Estelle, Mona et Nivine, toujours souriante. Merci à Cathy pour les nombreux tris. Merci aux animalier(e)s, Sylvie, Bernadette et David, qui prennent soin de nos précieuses souris, et désolée pour les cages surnuméraires. Merci à Makiadi et Laurent pour leur aide quotidienne avec notre matériel. Une pensée à l'équipe de B Cell Design, notamment Marie B, Cécile et Gaël, toujours enthousiastes en faisant le tour du labo pour venir dire bonjour.*

*Un grand merci à mes collègues de la Denizot team (les gens bizarres) pour la bonne ambiance quotidienne. Merci à Christelle pour m'avoir mis le pied à l'étrier quand je suis arrivée. Bon courage pour la suite et encore félicitations à Marc pour son poste ! Merci à Rémi (alias Réré) pour les conseils, les bons moments passés et les petites phrases qui resteront (une petite contrepètrie ? On n'est pas des portoirs, on n'est pas là pour s'empiler !). Je te dis à très vite à Cambridge et en attendant BBBB ! Merci à la relève, Faten et Alexis (alias Junior) pour les coups de main dans les manip. Merci Junior pour les dépannages d'ordi, les relectures de mon manuscrit (oui je sais l'épigénétique c'est passionnant, je devrais peut-être rajouter quelques réf..) et pour toutes les bonnes discussions. Une pensée pour les nombreux stagiaires qui sont passés par notre petit bureau, et plus spécialement pour Marion et Eva. Je vous souhaite de réussir dans vos études respectives.*



*Je tiens maintenant à remercier Christian (alias mon Cricri) sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Merci pour toutes les commandes, souvent de dernières minutes, mais surtout pour tout le reste : les discussions (toi passionné par le foot et Louis de Funès, moi adorant le shopping et Desperate housewives), les fous rires et coups de gueule partagés, le soutien et la compréhension quotidienne dont tu fais preuve, le WE au Compeix, le reflet de nos fesses contre les vitres de la blanchisserie qui porte chance pour l'après-midi et tant d'autres ... J'espère que notre amitié durera malgré la distance ! Pourtant, c'était mal parti (hum hum p'tite fiille !!!). Egalement un gros bisou à Sylvie.*

*Un grand merci à Sébastien (alias papa Seb) pour m'avoir donné goût à la recherche et m'avoir initiée à ce joli métier lors de mon stage de M1. Tu es toujours présent pour croire en moi et me remonter le moral dans les moments où je vois tout en noir, merci !*

*Merci également à toutes celles qui, au fil des années, sont devenues bien plus que des collègues de boulot. Marie (mon ancienne copine de bureau) pour tous les bons moments passés, les discussions girly, les sessions plaques de Peyer (le matin c'est pas terrible quand même) et les soirées avec Aurèl et Nico. Plein de bonheur à vous pour la suite ! Christelle (alias coupinette) pour ta patience à m'apprendre l'art du politiquement correct, pour les conseils Western Blot, pour les discussions girly (c'est récurrent ces discussions, on va finir par croire que je n'ai fait que papoter pendant trois ans !), les virées bordelaises, olonaises, ... et surtout les « petites » soirées sushi, bullito, cerdon, blue lagoon, marché des producteurs locaux et j'en passe. Prochaine étape : le Waga-Mama à Cambridge ! Et une petite ligne en plus pour l'aide fournie avec ma feuille de style et mon sommaire automatique ! Enfin Amandine (alias Didine) qui est toujours présente depuis le M2. D'abord collègue d'un job d'été, puis voisine de bureau en M2 et maintenant une vraie amie. Merci pour les après-midi shopping-discussions girly, les étés baignade, les soirées « Entracte » mais surtout pour ton soutien et tes encouragements. Tu possèdes une grande qualité qui devient très rare de nos jours, te réjouir de ce qui arrive de bien aux autres même quand tu as des problèmes. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite pour la suite ! Et surtout je t'attendrai de pied ferme en Angleterre pour une virée Zara-TopShop !*

*D'un point de vue plus personnel, j'aimerais remercier ma famille (Christine et Alain, Sylvie, Philippe et Malika, Céline, Mimi et « les enfants »), ma belle-famille et mes amies (par ordre d'ancienneté Alex, Anne-Laure, Marie D, Marvie et Béné, Fanny, Mélanie et Aurore et bien d'autres) pour avoir la gentillesse de toujours prendre cet air si intéressé et compréhensif quand je parle de ce que je fais dans la vie ! Pour répondre à vos principales questions : oui je suis étudiante, oui je suis également salariée, oui je travaille parfois le WE et les jours fériés, non je n'ai pas de RTT, non je ne suis pas médecin et malheureusement non je ne gagne pas 3000 euros par mois !*

*Une pensée à celui qui est parti trop tôt et qui veille sur moi de là-haut. Merci aussi à ma mamie qui m'a toujours répété de bien travailler à l'école et qui me demande encore tous les étés si je passe à l'année supérieure.*

*Surtout un immense merci à celle qui a toujours tout donné pour que j'arrive là où j'en suis maintenant. Maman, cette thèse est pour toi, gage de mon amour inconditionnel, de mon profond respect et de mon infinie gratitude.*

*Mes derniers remerciements vont à celui qui partage ma vie. Aurèl, je ne m'étalerai pas ici, tu sais déjà ce qu'il en ait. J'aimerais juste dire que cette thèse, très enrichissante sur le plan professionnel, l'a surtout été sur le plan personnel puisqu'elle m'a permis de te rencontrer !*



*« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas.  
C'est parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles. »  
Sénèque, Lettres à Lucilius, Livre XVII*

*« Tout choix est un renoncement »  
D'après André Gide (1869-1951),  
Revu par Yves Denizot durant ma thèse*



*A ma mère,*



## ABREVIATIONS

**3'RR:** *3' Regulatory Region*  
(région régulatrice située en 3'  
du locus IgH)

**3C:** *Chromosome Conformation  
Capture*

**κ:** kappa

**λ:** lambda

**μ:** mu

**δ:** delta

**γ:** gamma

**ε:** epsilon

**α:** alpha

**σ:** sigma (pseudo)

### A

**A-EJ:** *Alternative End Joining*  
(jonction d'extrémités  
alternative)

**Ag:** *Antigène*

**AID:** *Activation-Induced  
Deaminase* (cytidine désaminase  
induite par activation)

**ATM:** *Ataxia-Telangiectasia  
Mutated*

### B

**BAC:** *Bacterial Artificial  
Chromosome* (chromosome  
bactérien artificiel)

**BCR:** *B Cell Receptor* (récepteur  
des cellules B)

**BER:** *Base Excision Repair* (voie  
de réparation par excision d'une  
base)

**BIP:** *Binding Immunoglobulin  
Protein*

**BSAP:** *B-cell Specific Activation  
Protein* (protéine spécifique de  
l'activation B)

### C

**C:** région Constante et segment  
Constant

(C<sub>L</sub> : de chaînes légères/C<sub>H</sub> : de  
chaînes lourdes)

**CBE:** *CTCF-Binding Element*

**CD:** Cluster de Différenciation

**CDR:** *Complementarity  
Determining Region* (région  
déterminant la

complémentarité)

**cEμ:** *core Eμ*

**ChIP:** *Chromatine  
ImmunoPrecipitation* (technique  
d'immunoprécipitation de la  
chromatine)

**CLP:** *Common Lymphoid  
Precursors* (précurseurs  
lymphoïdes communs)

**CSH:** *Cellule Souche  
Hématopoïétique*

**CSR:** *Class Switch Recombination*  
(recombinaison de classe)

**CTCF:** *CCCTC-binding Factor*  
(facteur liant les motifs CCCTC)

### D

**D:** segment de Diversité

**dA:** désoxy-Adénosine  
monophosphate

**dC:** désoxy-Cytidine

**dG:** désoxy-Guanosine

**dT:** désoxy-Thymidine

**dU:** désoxy-Uridine

**DDR:** *DNA Damage Response*  
(voie de réponse aux dommages  
à l'ADN)

**DSB:** *Double Strand Break*  
(cassures doubles brins)

### E

**E2A:** *E box binding protein 2A*

**EBF1:** *Early B cell Factor-1*

**ES:** *Embryonic Stem cell* (cellules  
souche embryonnaire)

### F

**FDC:** *Follicular Dendritic Cell*  
(cellule dendritique folliculaire)

**FISH:** *Fluorescent In Situ  
Hybridization*

**FO:** *Follicular zone* (zone  
folliculaire de la rate)

### G

**GC:** *Germinal Center* (centre  
germinatif)

### H

**H:** *Heavy* (lourde)

**H3K4me3:** *tri-methylation de la  
lysine 4 de l'histone H3*

**HMG:** *High Mobility Group*

**hs:** *hypersensible à la DNase I*

### I

**Ig:** *Immunoglobuline*

**IGCR1:** *InterGenic Control  
Region 1*

**IgH:** *Immunoglobulin Heavy  
chain locus* (locus des chaînes  
lourdes d'immunoglobulines)  
**IgL:** *Immunoglobulin Light chain  
loci* (loci des chaînes légères  
d'immunoglobulines)

**IL:** *InterLeukine*

**IR:** *Inverted Repeat*

**ITAM:** *Immunoreceptor Tyrosine-  
based Activation Motif*

**ITIM:** *Immunoreceptor Tyrosine-  
based Inhibition Motif*

### J

**J:** segment de Jonction (J<sub>L</sub> : de  
chaînes légères/J<sub>H</sub> : de chaînes  
lourdes)



## K

**KO**: *Knock Out* (délétion de gène par recombinaison homologue)

## L

**L**: *Light* (légère) et *Leader* (exon leader)

**LB**: *Lymphocyte B*

**LCR**: *Locus Control Region* (région de contrôle du locus)

**Lig4**: *DNA Ligase IV*

**LM-PCR**: *Ligation-Mediated PCR*

**LMPP**: *Lymphoid-priMed*

*Pluripotent Progenitors*

(progéniteurs lymphoïdes pluripotents)

**LPS**: *LipoPolySaccharide* bactérien

**LS**: *Like-Switch*

**LSR**: *Locus Suicide*

*Recombination*

**LT**: *Lymphocyte T*

## M

**MALT**: *Mucosae Associated Lymphoid Tissue* (tissus lymphoïde associé aux muqueuses)

**MAPK**: *Mitogen-Activated Protein Kinase* (protéine kinase activée par des mitogènes)

**MAR**: *Matrix Attachment Region* (région d'ancrage à la matrice)

**MLN**: *Mesenteric Lymph Nodes*

**MMR**: *MisMatch Repair* (voie de réparation des mésappariements de l'ADN)

**MRN**: complexe *Mre11 Rad50 Nbs1*

**MZ**: *Marginal Zone* (zone marginale de la rate)

## N

**N**: *Non-germline nucleotide*

**neo<sup>R</sup>**: gène de Résistance à la néomycine

**NHEJ**: *Non Homologous End Joining* (jonction d'extrémités non homologues)

**NK**: *Natural Killer* (cellules tueuses naturelles)

## P

**P**: *Palindromic nucleotide*

**PALS**: *PeriArterial Lymphatic Sheaths* (manchons lymphoïdes péri-artériolaires)

**Pax5**: *Paired-box gene 5*

**PCNA**: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

**PDQ52**: *Promoteur-activateur DQ52*

**pI**: promoteur I

**PI3k**: *PI3 kinase*

**PKA**: *c-AMP-dependent Proteine Kinase A*

**PLCγ2**: *PhosphoLipase Cy2*

**PNA**: *PeaNut Agglutinin*

**PolyA**: site de *PolyAdénylation*

**PU1**: *PURine box factor 1*

**pVH**: promoteur des régions variables au locus *IgH*

## R

**Rag**: *Recombination Activating Gene* (gène activant la recombinaison VDJ)

**RE**: *Réticulum Endoplasmique*

**RPA**: *Replication Protein A*

**RNA Pol II**: *RNA Polymerase II*

**RSS**: *Recombination Signal Sequence* (séquence signal de recombinaison)

## S

**S**: région *Switch*

**SHM**: *Somatic Hypermutation* (hypermutation somatique)

**Spt5**: *Suppressor of Ty5 homolog*

**SSB**: *Single Strand Break* (cassure simple brin)

**ssDNA**: *Single Strand DNA* (ADN simple brin)

## T

**TdT**: *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*

**Tfh**: *T follicular helper* (lympocyte T folliculaire auxiliaire)

**TR**: *Tandem Repeat*

## U

**UNG**: *Uracile N-Glycosylase*

## V

**V**: région *V*ariable et segment de *V*ariabilité (*V<sub>L</sub>*: de chaînes légères/ *V<sub>H</sub>*: de chaînes lourdes)

## X

**XBP1**: *X-box Binding Protein 1*

**XRCC4**: *X-ray Repair Cross Complementing protein 4*



# SOMMAIRE

<b>PREAMBULE.....</b>	<b>1</b>
<b>CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
CHAPITRE 1 – LA LYMPHOPOÏÈSE B.....	6
1. <b>CONFIGURATION GERMINALE : ORGANISATION DES GENES D'IG .....</b>	<b>6</b>
1.1.    Les loci des chaînes légères .....	6
1.1.1.    Le locus kappa .....	6
1.1.2.    Le locus lambda .....	6
1.2.    Le locus des chaînes lourdes.....	7
1.3.    Une configuration germinale non fonctionnelle.....	7
2. <b>PHASE PRECOCE : CONSTITUTION D'UN REPERTOIRE B PRIMAIRE .....</b>	<b>9</b>
2.1.    Généralités sur l'hématopoïèse précoce .....	9
2.1.1.    Des cellules souches hématopoïétiques aux progéniteurs lymphoïdes communs .....	9
2.1.2.    Le rôle des niches stromales .....	9
2.1.3.    Classification des différents stades de la lymphopoïèse B précoce .....	10
2.2.    Le stade pré-pro-B et l'engagement dans la lignée B.....	11
2.2.1.    Le stade pré-pro-B .....	11
2.2.2.    L'environnement stromal et l'engagement dans la lignée B.....	11
2.3.    Le stade pro-B et les réarrangements VDJ au locus IgH.....	12
2.3.1.    Le stade pro-B.....	12
2.3.2.    Les réarrangements VDJ au locus IgH .....	13
2.4.    Le stade pré-B et les réarrangements VJ aux loci IgL.....	16
2.4.1.    Le stade pré-B.....	16
2.4.2.    Les réarrangements VJ aux loci des chaînes légères .....	18
2.5.    Le stade B immature et l'édition du BCR .....	18
2.5.1.    Le stade B immature.....	18
2.5.2.    L'édition du BCR.....	19
3. <b>PHASE TARDIVE : DIVERSIFICATION SECONDAIRE DU REPERTOIRE .....</b>	<b>20</b>
3.1.    Le stade B transitionnelle et le rôle de la signalisation du BCR.....	20
3.1.1.    Le stade B transitionnelle .....	20
3.1.2.    La signalisation du BCR .....	21
3.2.    Le stade B mature et l'augmentation de la spécificité antigénique <i>via</i> la SHM et la CSR.....	23
3.2.1.    Les sous-populations B matures .....	23
3.2.2.    La réponse immunitaire des cellules B.....	24
3.2.3.    La réaction du centre germinatif .....	25
3.2.4.    L'augmentation de la spécificité antigénique .....	26
3.3.    Le stade plasmocytaire et la sécrétion d'Ig.....	31
3.3.1.    Le stade plasmocytaire .....	31
3.3.2.    La sécrétion d'Ig.....	32
3.4.    Le stade B mémoire et la réponse secondaire.....	32
3.4.1.    Le stade B mémoire .....	32
3.4.2.    La réponse secondaire .....	33
CHAPITRE 2 – LA REGULATION DES EVENEMENTS GENIQUES AU LOCUS IGH .....	34
1. <b>ACCESSIBILITE DU LOCUS.....</b>	<b>34</b>
1.1.    Le positionnement nucléaire et l'organisation spatiale des loci .....	35
1.1.1.    La localisation nucléaire des allèles .....	35
1.1.2.    La structure tridimensionnelle du locus.....	36
1.2.    Les modifications de la chromatine et le recrutement des recombinaisons.....	36
1.2.1.    Les différents états de la chromatine .....	37
1.2.2.    Les modifications de la chromatine au cours de la lymphopoïèse B.....	37
1.3.    La transcription et le recrutement des recombinaisons .....	39
1.3.1.    Lors de la lymphopoïèse B précoce .....	39
1.3.2.    Lors de la lymphopoïèse B tardive .....	39
2. <b>ELEMENTS CIS-REGULATEURS .....</b>	<b>43</b>
2.1.    Les régions isolatrices.....	43
2.1.1.    La région 5' .....	44



2.1.2.	La région intergénique V <sub>H</sub> -D .....	44
2.1.3.	La région 3' .....	45
2.2.	Les promoteurs.....	46
2.2.1.	Les promoteurs V <sub>H</sub> .....	46
2.2.2.	Le promoteur-activateur DQ52.....	47
2.2.3.	Les promoteurs I.....	47
2.3.	Les activateurs transcriptionnels .....	49
2.3.1.	L'activateur intronique E <sub>μ</sub> et les régions d'attachement à la matrice .....	49
2.3.2.	La région régulatrice située en 3' du locus.....	52
<b>PROBLEMATIQUE &amp; OBJECTIFS .....</b>		<b>65</b>
<b>RESULTATS.....</b>		<b>68</b>
ARTICLE 1.....		70
ARTICLE 2.....		72
MANUSCRIT 3 .....		75
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>		<b>78</b>
1.	<i>La 3'RR : une région très étudiée.....</i>	79
1.1.	De sa découverte à son analyse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	79
1.2.	De la transgénèse à la délétion endogène.....	79
1.3.	Intérêts et limites de notre modèle murin 3'RR-déficient .....	81
1.4.	Toujours plus de modèles murins pour étudier la 3'RR .....	81
2.	<i>Le rôle de la 3'RR lors des stades précoces de l'ontogénie B .....</i>	83
2.1.	La 3'RR et le développement B médullaire.....	83
2.2.	La 3'RR et les réarrangements VDJ .....	83
2.3.	Une coopération E <sub>μ</sub> -3'RR ?.....	84
3.	<i>Le rôle de la 3'RR lors des stades tardifs de l'ontogénie B.....</i>	86
3.1.	La 3'RR et le développement B en périphérie.....	86
3.2.	La 3'RR et la SHM.....	88
3.3.	Une avancée dans le recrutement d'AID au locus IgH ? .....	88
3.4.	La 3'RR et la CSR .....	90
4.	<i>Conclusions générales .....</i>	94
<b>ANNEXES .....</b>		<b>95</b>
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION A LA LYMPHOMOGENESE .....		97
1.	<i>TRANSLOCATIONS ET EMMERGENCE DE LYMPHOMES.....</i>	97
1.1.	Les zones de translocation .....	97
1.2.	Les <i>enhancers</i> et l'émergence de lymphomes .....	97
2.	<i>PROLIFERATION TUMORALE .....</i>	99
2.1.	Les protéines du cycle cellulaire .....	99
2.2.	L'oncogène <i>c-myc</i> .....	99
2.3.	Le suppresseur de tumeur p53 .....	100
CHAPITRE 2 – RÉSULTATS .....		101
ARTICLE 1.....		102
ARTICLE 2.....		104
ARTICLE 3.....		106
CHAPITRE 3 – CONCLUSIONS & DISCUSSIONS .....		108
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>110</b>



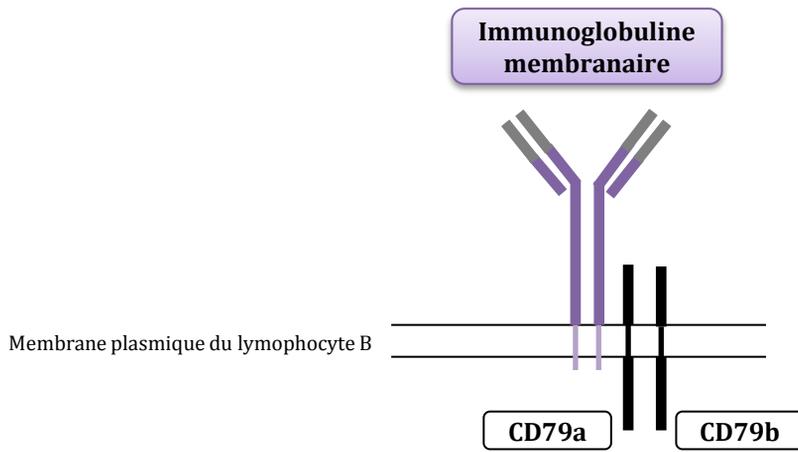
---

# ***Préambule***

---







**Figure 1 : Représentation schématique du récepteur des lymphocytes B.**

Le récepteur des lymphocytes B (BCR) est un complexe protéique composé d'une immunoglobuline (Ig) membranaire, associée à deux protéines transmembranaires appelées CD79a (Ig $\alpha$ ) et CD79b (Ig $\beta$ ).

## Généralités sur le système immunitaire

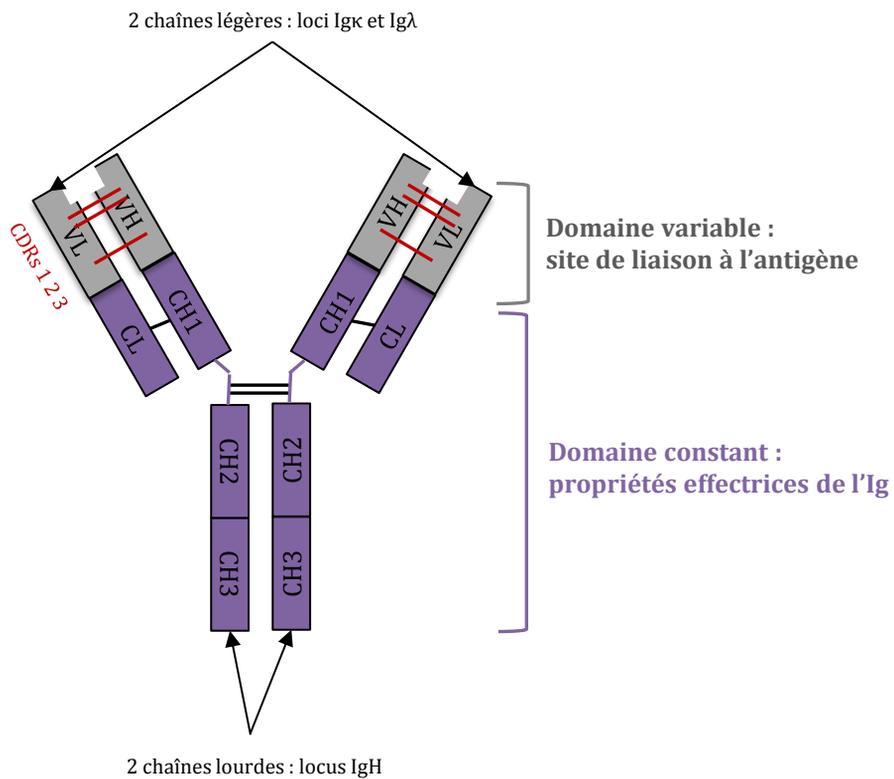
De la cellule B aux loci codant les gènes d'immunoglobulines...

Le système immunitaire des vertébrés a pour rôle de maintenir l'intégrité physiologique de l'organisme en le protégeant contre les pathogènes (virus, bactéries, parasites, ...) ou les cellules tumorales. Pour cela, il est capable de distinguer les composants génétiques de l'individu : « le soi », des éléments qui lui sont étrangers : « le non soi ». Il existe deux versants de la réponse immunitaire, la réponse innée et la réponse adaptative, capables de coopérer pour une protection optimale.

La réponse innée est naturelle, invariante et n'a pas de mémoire immunitaire. Elle repose sur la reconnaissance de motifs communs à tous les pathogènes, les PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*). Les principaux acteurs de cette immunité sont les barrières physiques quand elles sont intègres (peau, muqueuses, ...), les cellules phagocytaires (macrophages et polynucléaires), les cellules tueuses naturelles (NK pour *Natural Killer*) et certaines protéines circulantes (complément, chimiokines, ...).

A l'inverse, la réponse adaptative est plus tardive à se mettre en place car elle est spécifique de l'antigène (Ag). Elle possède une mémoire immunitaire et peut se diviser en réponse cellulaire, dont les principaux acteurs sont les lymphocytes T (LT) cytotoxiques, et en réponse humorale. Lors de cette dernière, le lymphocyte B (LB) reconnaît l'Ag sous sa forme naïve grâce à son récepteur membranaire (BCR pour *B Cell Receptor*), correspondant à une immunoglobuline (Ig) de surface associée à deux protéines transmembranaires appelées CD79a (ou Ig $\alpha$ ) et CD79b (ou Ig $\beta$ ) (**Figure 1**). Cette reconnaissance entraîne l'activation du LB et sa différenciation en plasmocyte. Ce dernier sécrète des Ig (ou anticorps) qui vont se lier spécifiquement à l'Ag afin de le neutraliser ou de l'éliminer. Le LB peut également se différencier en cellule B mémoire et assurer une défense continue de l'organisme.

Les molécules d'Ig, qu'elles soient sécrétées par les plasmocytes ou exprimées à la surface des lymphocytes B, sont constituées par la réunion de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H pour *Heavy*) identiques associées par des ponts disulfures à deux chaînes légères (L pour *Light*) également identiques. Le



**Figure 2 : Structure des immunoglobulines : exemple d'une IgG1 de souris.**

Le domaine variable de l'Ig est constitué des régions variables respectivement des chaînes lourdes et légères ( $V_H$  et  $V_L$ ). Le domaine constant de l'Ig est composé des régions constantes des chaînes lourdes et légères ( $C_H$  et  $C_L$ ). La région charnière est située entre les domaines  $C_H1$  et  $C_H2$ .

Les chaînes lourdes sont représentées en gris et violet foncé, les chaînes légères sont en clair, les ponts disulfures en noir et les CDRs en rouge.

tétramère ainsi obtenu correspond à une protéine d'environ 150 KDa (Edelman, 1970 ; Porter, 1973).

Il existe deux types de chaînes légères, appelées *kappa* ( $\kappa$ ) et *lambda* ( $\lambda$ ), pouvant s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes notées *mu* ( $\mu$ ), *delta* ( $\delta$ ), *epsilon* ( $\epsilon$ ), *alpha* ( $\alpha$ ) et *gamma* ( $\gamma$ ) donnant respectivement les IgM, IgD, IgE, IgA et IgG. Les IgM sont les premières Ig produites lors d'une réponse immunitaire et leur sécrétion se fait majoritairement sous forme pentamérique. Les IgD sont les deuxièmes Ig produites et sont principalement impliquées dans la réponse anti-bactérienne. Les IgA sont essentiellement sécrétées sous forme dimérique au niveau des muqueuses. Les IgE permettent la défense anti-parasitaire mais possèdent également un rôle dans les phénomènes d'hypersensibilité (*i.e.* allergies). Enfin, l'IgG est l'isotype majeur et peut être subdivisé en sous-classes qui diffèrent par leurs fonctions effectrices: IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 chez la souris. Ainsi, les IgG1 interviennent dans la réponse anti-virale et anti-parasitaire, les IgG2a et IgG2b ont également un rôle dans la réponse anti-virale et les IgG3 sont quant à elles engagées dans la réponse anti-bactérienne.

Chaque chaîne d'Ig est composée d'une région variable (V) et d'une région constante (C). L'association des domaines variables des chaînes légères ( $V_L$ ) et lourdes ( $V_H$ ) constitue le site de reconnaissance spécifique de l'Ag. Cette région contient trois domaines « hypervariables », autrement appelés CDRs (*Complementarity Determining Region*), séparés par quatre régions charpentes, nommées FR (*Framework Region*) et de variabilité moindre. Le domaine constant des chaînes lourdes ( $C_H$ ) porte la fonction effectrice de chaque classe d'Ig. Les régions  $V_H$ ,  $V_L$  et  $C_L$  sont constituées d'un seul domaine alors que la région  $C_H$  est constituée de trois à quatre domaines notés  $C_{H1}$  à  $C_{H4}$ . La forme membranaire des Ig de surface est permise grâce à deux exons supplémentaires codant respectivement les parties transmembranaires et intracytoplasmiques, alors que la sécrétion des Ig sous forme d'anticorps est due à l'exon de sécrétion. Exceptées les IgM et les IgE, toutes les classes et sous-classes d'Ig possèdent également une région dite charnière (H pour *Hinge*) entre leurs domaines  $C_{H1}$  et  $C_{H2}$  leur conférant leur flexibilité (**Figure 2**) (pour revue : Schroeder and Cavacini, 2010).



Trois complexes génétiques distincts sont impliqués dans la synthèse d'Ig : les loci  $Ig\kappa$  et  $Ig\lambda$  codant les chaînes légères et le locus  $IgH$  codant les chaînes lourdes. La singularité de ces loci est la structure morcelée des gènes, qui correspond à leur configuration germinale et non fonctionnelle. Lors de la différenciation lymphocytaire B, afin d'obtenir des chaînes d'Ig fonctionnelles, leurs loci sont soumis à de nombreux remaniements géniques (Tonegawa, 1983). Tous ces événements sont hautement contrôlés grâce aux éléments *cis*-régulateurs qui jalonnent les loci d'Ig et aux éléments *trans*-activateurs s'y fixant (pour revues : Perlot and Alt, 2008 ; Alt *et al.*, 2013).

Lors de ma thèse, j'ai principalement travaillé sur le locus  $IgH$  murin. C'est pourquoi le contexte bibliographique sera divisé en deux chapitres : le premier essentiellement consacré aux processus affectant ce locus et le second dédié aux éléments *cis*-régulateurs les contrôlant.



---

## ***Contexte bibliographique***

---

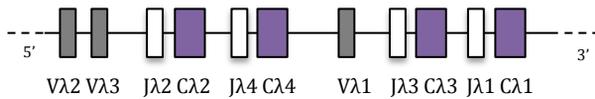




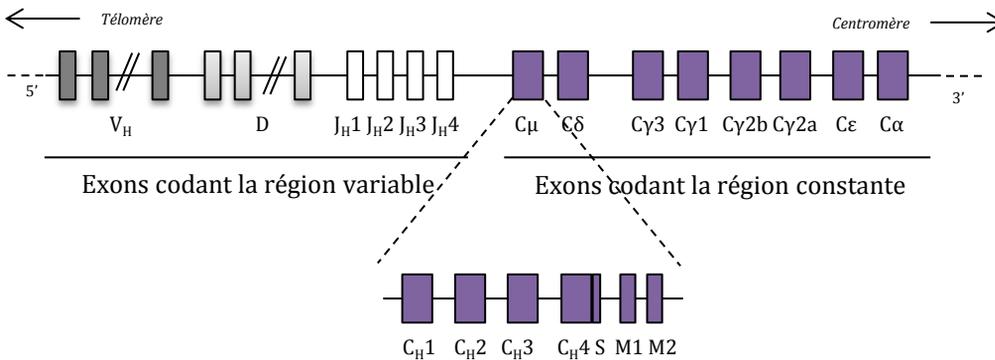
### A. Locus Igκ (chromosome 6)



### B. Locus Igλ (chromosome 16)



### C. Locus IgH (chromosome 12)



**Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation des loci des gènes d'immunoglobuline chez la souris.**

Les segments variables (V) sont représentés en gris foncé, les segments de jonction (J) en blanc, les segments constants (C) en violet et les segments de diversité (D) en gris clair.

A : Le locus Igκ. Situé sur le chromosome 6, il comprend plus de 174 segments Vκ et 5 segments Jκ codant la partie variable. Un seul segment Cκ code la partie constante de la chaîne κ.

B : Le locus Igλ. Situé sur le chromosome 16, il est organisé en 4 paires de segment Jλ-Cλ, et ne contient que 3 segments Vλ.

C : Le locus IgH. Situé sur le chromosome 12, il rassemble plus de 152 segments V<sub>H</sub>, une vingtaine de segments D et 4 segments J<sub>H</sub> codant la partie variable. Il comprend également 8 segments C<sub>H</sub> codant chacun un isotype différent.

La dernière ligne est un grossissement de C<sub>μ</sub> montrant ses quatre exons C<sub>H</sub> (avec le C<sub>H</sub>4 associé à l'exon de sécrétion) ainsi que ses deux exons de membrane. Tous les segments C<sub>H</sub> sont constitués de plusieurs exons dont le nombre varie suivant les isotypes.

M: exon de membrane; S: exon de sécrétion.

## Chapitre 1 – La lymphopoïèse B

De la configuration germinale des loci d'Ig à la diversité du répertoire antigénique...

### 1. CONFIGURATION GERMINALE : ORGANISATION DES GENES D'IG

Chez l'homme comme chez la souris, les gènes d'Ig sont regroupés en loci distincts localisés sur trois chromosomes différents. Dans leur configuration germinale, ces loci sont caractérisés par la succession de différents segments. En 5' des loci, les segments de variabilité (V), les segments de jonction (J) et, dans le cas du locus IgH, des segments de diversité (D) codent la région variable des Ig. En 3' des loci, les segments C codent les régions constantes des chaînes d'Ig (Giudicelli *et al.*, 2005 ; Lefranc *et al.*, 2005).

Ayant uniquement travaillé sur des modèles murins, je ne détaillerai que l'organisation des gènes d'Ig de souris, en gardant à l'esprit les variations entre les différentes souches murines. De plus, l'organisation du locus murin étant très similaire à l'humain, la souris est un excellent et relevant modèle de ce qu'il advient chez l'homme (pour revue : Rauta *et al.*, 2012).

#### 1.1. Les loci des chaînes légères

##### 1.1.1. Le locus kappa

Le locus kappa (Ig $\kappa$ ) est situé sur le chromosome 6. Il comporte 174 segments V $\kappa$  (dont 94 à 96 sont fonctionnels) et 5 segments J $\kappa$  (dont 4 sont fonctionnels). La région constante est codée par un seul segment C $\kappa$  (**Figure 3A**).

##### 1.1.2. Le locus lambda

Le locus lambda (Ig $\lambda$ ) est situé sur le chromosome 16. Il comporte 3 segments V $\lambda$ , 5 segments J $\lambda$  (dont 3 sont fonctionnels) et 4 segments C $\lambda$  (dont 2 à 3 sont fonctionnels). Les segments J $\lambda$  et C $\lambda$  sont organisés en 2 clusters : J $\lambda_2$ -C $\lambda_2$ -J $\lambda_4$ -C $\lambda_4$  (J $\lambda_4$  et C $\lambda_4$  étant défectifs) et J $\lambda_3$ -C $\lambda_3$ -J $\lambda_1$ -C $\lambda_1$ , précédés de V $\lambda_2$ -V $\lambda_3$  et V $\lambda_1$  respectivement (**Figure 3B**).



## 1.2. Le locus des chaînes lourdes

Le locus des chaînes lourdes (IgH) est situé sur le chromosome 12 et s'étend sur plus de trois mégabases. Du télomère vers le centromère, il comprend 152 segments  $V_H$  (dont 97 sont fonctionnels) regroupés en 15 familles, 17 à 20 segments D (dont 14 sont fonctionnels) regroupés en 4 familles (DFL16, DSP2, DST4 et DQ52) et 4 segments  $J_H$  tous fonctionnels. Notons que près de la moitié des segments  $V_H$  appartient à la famille J558 et que ceux situés en 5' sont qualifiés de « distaux » alors que les plus en 3' sont désignés comme « proximaux ». De plus, les exons V sont précédés d'une petite séquence de 60 à 90 pb qui représente l'exon L (*Leader*), codant la majeure partie du peptide signal de la protéine.

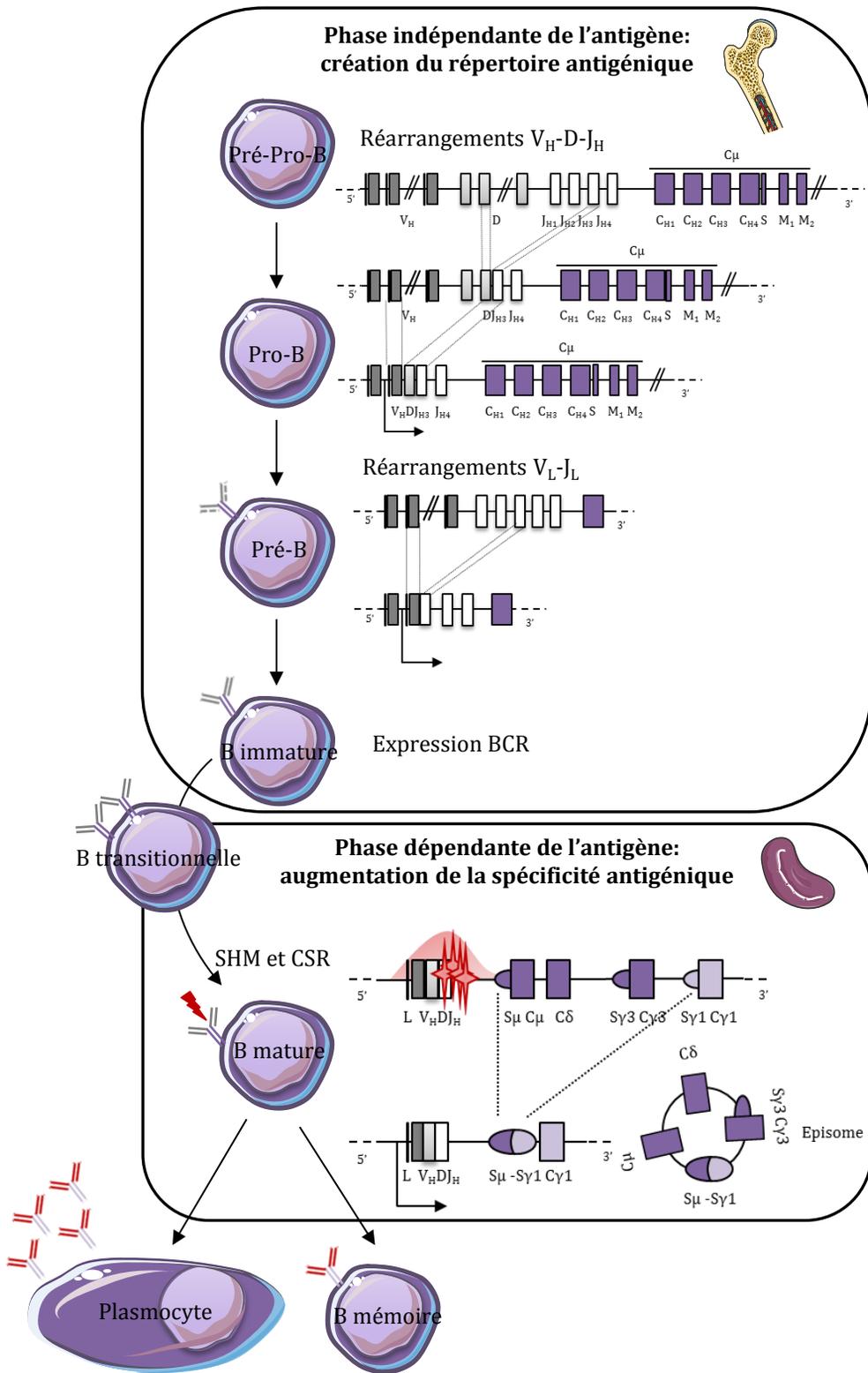
Au nombre de 8, les gènes  $C_H$  codent les régions constantes des différentes classes et sous-classes d'Ig. Notons que chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde ( $C_{H1}$  à  $C_{H4}$ ) ainsi que les régions charnières. Enfin, des exons indépendants codent les régions intracytoplasmiques et transmembranaires ainsi que l'exon de sécrétion de chaque isotype (**Figure 3C**).

Le locus IgH est également marqué par la présence de nombreux éléments *cis*-régulateurs, capables d'activer ou de réguler l'expression des gènes de chaînes lourdes d'Ig. Nous détaillerons ces éléments dans le chapitre 2.

## 1.3. Une configuration germinale non fonctionnelle

Dans leur configuration germinale, les gènes d'Ig sont non fonctionnels. Afin de constituer et diversifier le répertoire antigénique, les loci d'Ig sont soumis à trois événements majeurs de recombinaison génique.

Les segments codant la région variable des Ig doivent être réarrangés pour former des exons  $V_LJ_L$  et  $V_HD_J_H$  fonctionnels : ce sont les recombinaisons V(D)J. Survenant lors de la phase précoce du développement B dans la moelle osseuse, ces mécanismes permettent la création du répertoire antigénique. Nous parlerons de réarrangements V(D)J quand il s'agit des réarrangements aux loci de chaînes lourdes et



**Figure 4 : Représentation simplifiée de l'ontogénie B.**

Les recombinaisons V(D)J ont lieu dans la moelle osseuse de façon indépendante de l'antigène afin de produire un BCR fonctionnel. Les phénomènes d'SHM et CSR se produisent dans les organes lymphoïdes secondaires, après rencontre avec l'antigène, afin de créer des Ig plus adaptées à celui-ci.

légères. Les réarrangements VDJ s'adressent aux chaînes lourdes alors que les réarrangements VJ concernent les chaînes légères.

Lors de la phase tardive de l'ontogénie B, après rencontre avec l'Ag dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyer), la cellule B va diversifier son répertoire antigénique grâce à deux mécanismes. D'une part, la génération de mutations dans la séquence des exons variables précédemment obtenus augmente leur spécificité antigénique : c'est l'hypermutation somatique (SHM pour *Somatic HyperMutation*) ; d'autre part, l'expression des différentes classes d'Ig a lieu après remaniement des gènes constants du locus IgH : c'est la recombinaison de classe (CSR pour *Class Switch Recombination*) (pour revues : Perlot and Alt, 2008 ; Alt *et al.*, 2013) (**Figure 4**).



## 2. PHASE PRECOCE : CONSTITUTION D'UN REPERTOIRE B PRIMAIRE

### 2.1. Généralités sur l'hématopoïèse précoce

#### 2.1.1. Des cellules souches hématopoïétiques aux progéniteurs lymphoïdes communs

Les lymphocytes B prennent naissance dans la moelle osseuse, à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) (pour revues : Ye and Graf, 2007 ; Pieper *et al.*, 2013).

Sous l'action des facteurs de transcription PU1 (*PURine box factor 1*) et Ikaros, les CSH vont progressivement se différencier, passant par les stades de progéniteurs multipotents (LMPP, pour *Lymphoid-primed Pluripotent Progenitors*) puis de précurseurs lymphoïdes communs (CLP, pour *Common Lymphoid Precursors*).

L'expression des facteurs de transcription E2A (*E box binding protein 2A*), EBF1 (*Early B cell Factor-1*) et PU1 permet finalement l'engagement des CLP vers la lignée B (Ramírez *et al.*, 2010; Barneda-Zahonero *et al.*, 2012).

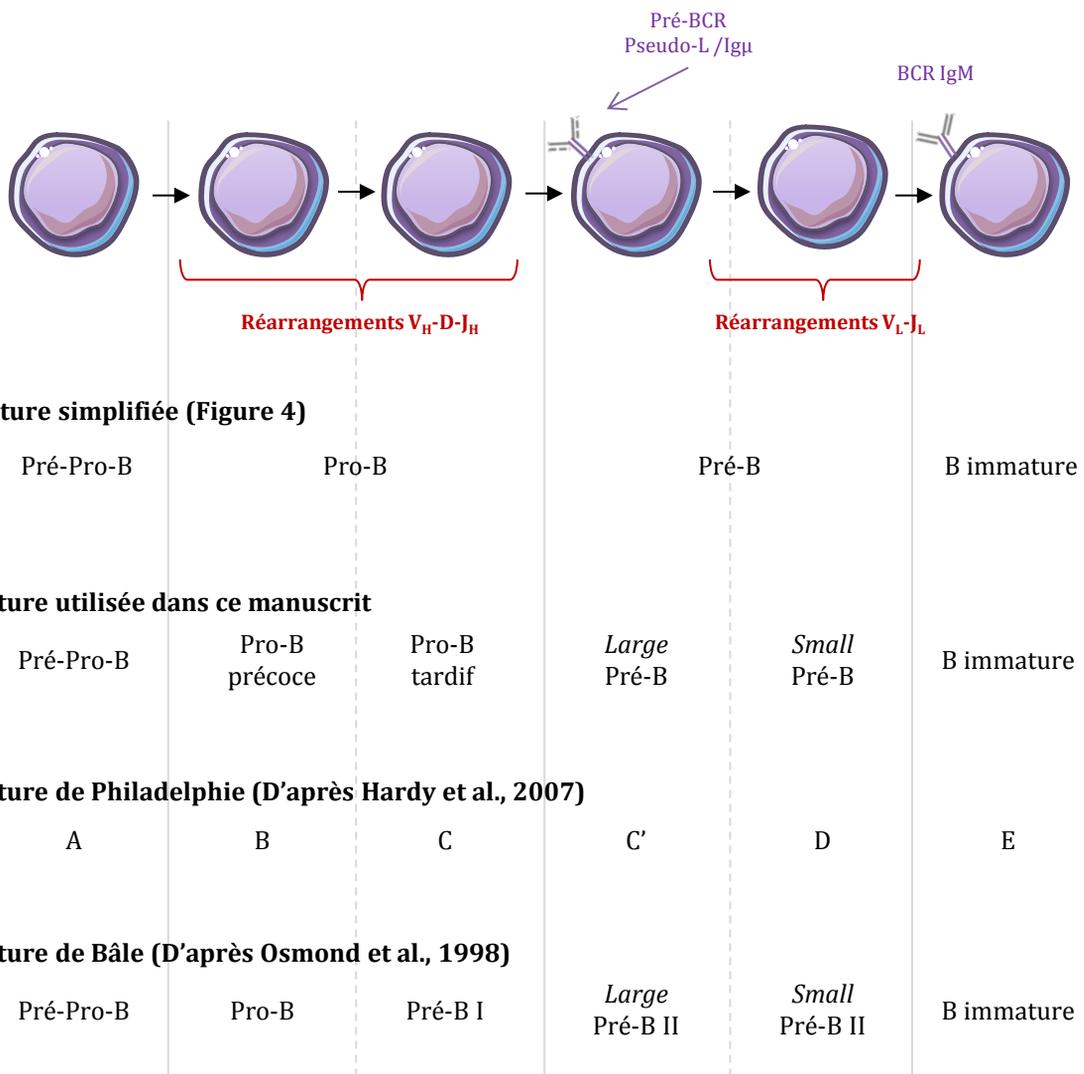
#### 2.1.2. Le rôle des niches stromales

Au cours de leur différenciation, les précurseurs hématopoïétiques se regroupent en îlots situés à proximité des vaisseaux et délimités par les cellules stromales médullaires et les travées osseuses. Cette organisation crée des microenvironnements particuliers, encore appelés niches, spécifiques à chaque étape de la différenciation.

Les niches riches en cellules stromales (*i.e.* niches stromales) fournissent une structure nécessaire au développement lymphocytaire B. En effet, les cellules stromales synthétisent des facteurs solubles (cytokines et chimiokines<sup>1</sup>) et expriment des molécules d'adhérence indispensables à l'initiation de voies de signalisation. Celles-ci convergent vers l'activation de facteurs de transcription capables d'induire ou de réprimer l'expression de différents gènes cibles modulant la survie des cellules B, leur

---

<sup>1</sup> Les cytokines sont des petites protéines solubles qui ont une fonction dans la régulation du système immunitaire et dans la maturation des progéniteurs. Les chimiokines sont une famille de petites protéines créant des gradients chimiotactiques à l'origine des mouvements des précurseurs hématopoïétiques pendant leur différenciation puis de la migration des cellules matures vers le sang.



**Figure 5 : Nomenclatures utilisées pour définir les différents stades de la lymphopoïèse B précoce.**

La première ligne schématise les différentes étapes du développement B précoce.

La deuxième ligne reprend la nomenclature simplifiée utilisée dans la figure précédente.

La troisième ligne correspond à la nomenclature utilisée dans ce manuscrit.

La quatrième ligne montre la nomenclature de Philadelphie.

La dernière ligne identifie la nomenclature de Bâle.

(D'après Osmond *et al.*, 1998; Hardy and Hayakawa, 2001)

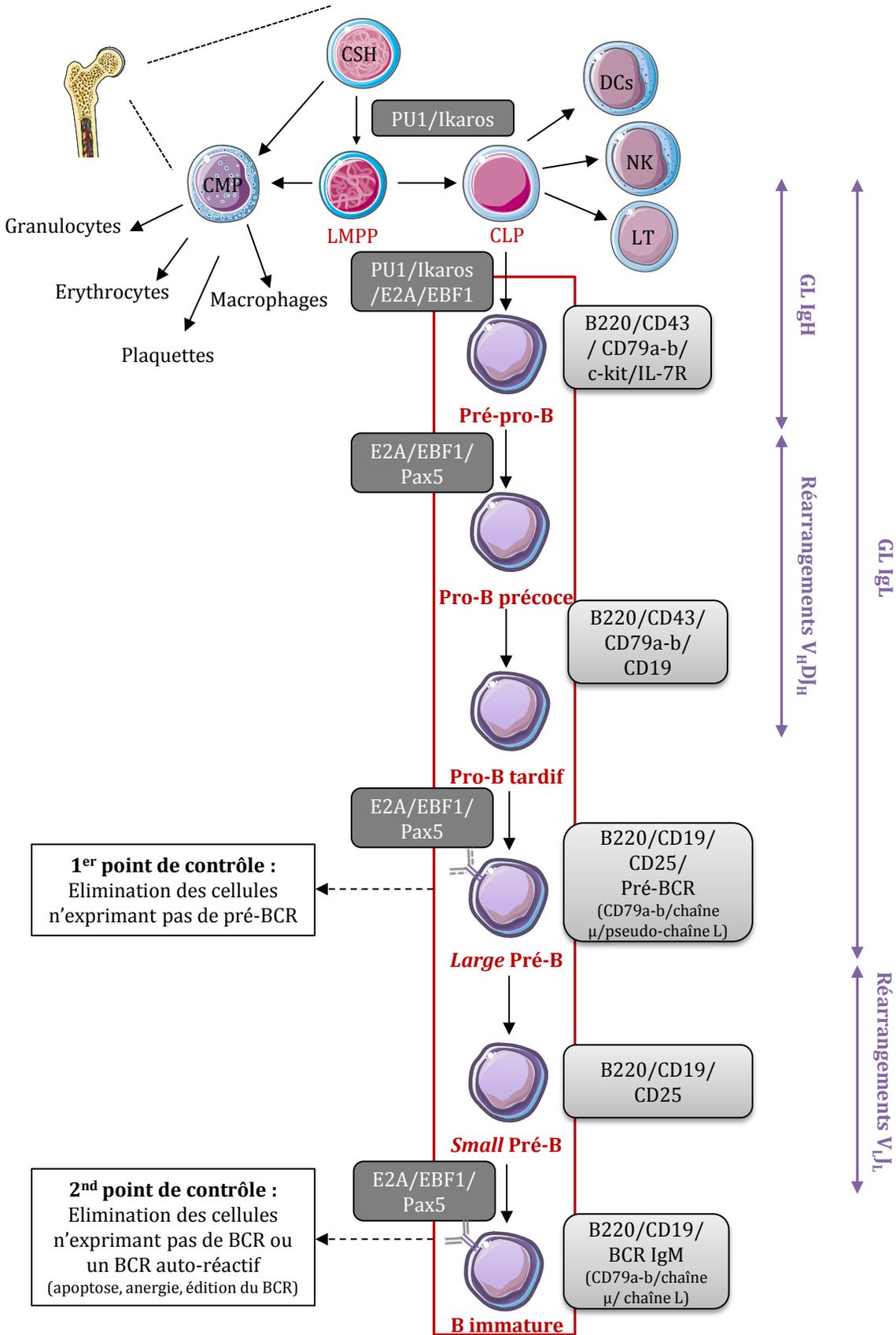
prolifération et leur différenciation. Ainsi, les interactions cellules B/cellules stromales assurent un équilibre constant entre l'auto-renouvellement des progéniteurs B et leur différenciation vers les cellules matures. Les cellules B en développement sont donc en perpétuel mouvement entre les différentes niches stromales afin de recevoir le signal optimal à chaque étape de la lymphopoïèse B (pour revues : Nagasawa, 2006 ; Corfe and Paige, 2012).

### 2.1.3. Classification des différents stades de la lymphopoïèse B précoce

Avant de devenir des cellules immatures (*i.e.* exprimant un BCR naïf) capables de quitter la moelle osseuse, les lymphocytes B passent par différents stades de développement, caractérisés par (1) l'activation d'un programme génétique spécifique et l'extinction du précédent ; (2) l'expression de diverses molécules de surface et de facteurs de transcription; (3) l'état de réarrangements des gènes IgH et IgL; (4) l'expression du BCR (pour revues : Meffre *et al.*, 2000 ; Hardy *et al.*, 2007).

En accord avec leurs caractéristiques phénotypiques, les différents stades définissant la lymphopoïèse B précoce ont fait l'objet de nombreuses nomenclatures, sans qu'une terminologie universelle n'ait été reconnue (pour revue : Hardy and Hayakawa, 2001). Il existe ainsi deux systèmes de nomenclature : la nomenclature de Philadelphie, qui repose sur les fractions définies par Hardy (Hardy *et al.*, 1991), et la nomenclature de Bâle, ou classification de Rolink/Melchers (Osmond *et al.*, 1998). Pour plus de clarté, ce manuscrit suivra une nomenclature simple : pré-pro-B (précurseur B le plus précoce), pro-B précoce (réarrangements D-J<sub>H</sub> sur les deux allèles), pro-B tardif (réarrangement V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub> sur un allèle), *large* pré-B (expression membranaire du pré-BCR), *small* pré-B (réarrangements des loci de chaînes légères) et B immature (expression d'un BCR de type IgM à la surface) (**Figure 5**).

Cette première phase du développement B se déroule de façon indépendante de l'Ag et aboutit à la création d'un répertoire antigénique primaire, grâce aux réarrangements V(D)J (**Figure 6**).



**Figure 6 : Schéma de l'hématopoïèse et de l'ontogénie B précoce.**

Les étapes spécifiques à la mise en place du lignage lymphocytaire B sont en rouge. Les principaux facteurs de transcription et molécules de surface exprimés sont en gris foncé et clair respectivement. Les flèches violettes représentent la configuration des loci (germinale ou en réarrangements). Les points de contrôle du développement B sont encadrés en noir.

CSH: cellule souche hématopoïétique; LMPP: lymphoid-primed pluripotent progenitors; CMP: common myeloid precursors; CLP: common lymphoid precursors; DC: dendritic cells; NK: natural killer; LT: lymphocyte T; GL : configuration germinale du locus.

## 2.2. Le stade pré-pro-B et l'engagement dans la lignée B

### 2.2.1. Le stade pré-pro-B

L'ontogénie B débute avec l'apparition des premiers précurseurs B : les cellules pré-pro-B. Dans ces cellules, les loci d'Ig sont en configuration germinale et seule l'expression de facteurs de transcription et de marqueurs de surface les distingue des autres précurseurs hématopoïétiques.

Parmi les facteurs de transcription exprimés, Pax5 (*Paired-box gene 5*), également appelé BSAP (*B-cell lineage specific activator protein*), est induit par EBF1 et E2A pour modeler le génome des progéniteurs aux besoins des lymphocytes B. Pour cela, Pax5 réprime des gènes dont l'expression est inappropriée dans les lymphocytes B et active les gènes spécifiques de la lignée, tels que CD79a ou les molécules costimulatrices CD19 et CD21 (Cobaleda *et al.*, 2007). L'analyse transcriptomique de progéniteurs B déficients pour Pax5 a révélé la présence de marqueurs associés aux autres lignages lymphocytaires (NK et LT). Ainsi, Pax5 est à la fois essentiel pour la mise en place de la différenciation B et pour le maintien des progéniteurs dans ce lignage (Zandi *et al.*, 2012).

A ce stade, les cellules expriment différents marqueurs de surface tels que le marqueur de la lignée B CD45R ou B220, les molécules CD43, CD79a et CD79b mais aussi la sous unité  $\alpha$  du récepteur à l'interleukine-7 (IL-7R $\alpha$  ou CD127) et les récepteurs à activité tyrosine-kinase Flt3, c-kit ou CD117 et CXCR4 (Rumfelt *et al.*, 2006).

### 2.2.2. L'environnement stromal et l'engagement dans la lignée B

Les marqueurs de surface exprimés par les cellules pré-pro-B permettent la fixation de molécules essentielles au développement B et sécrétées par le micro-environnement.

Ainsi, la liaison de la chimiokine CXCL12, premier facteur soluble décrit comme crucial pour le développement B précoce, à son récepteur CXCR4 permet de diriger les précurseurs B dans la niche appropriée (Egawa *et al.*, 2001). De même, l'expression du récepteur à activité tyrosine-kinase c-kit (ou CD117) permet la fixation du SCF (*Stem Cell*



*Factor* ou c-kit-ligand), cytokine sécrétée par le stroma médullaire et nécessaire à la distribution spatiale des cellules dans les niches stromales (Driessen *et al.*, 2003).

De plus, l'expression de l'IL-7R $\alpha$  est indispensable à la spécificité B (pour revue : Corfe and Paige, 2012). En effet, des souris délétées pour l'IL-7 ou l'IL-7R $\alpha$  présentent un blocage des cellules aux stades CLP et pré-pro-B corrélé à une diminution du taux d'EBF1, démontrant que la signalisation *via* l'IL-7 contrôle l'engagement dans la lignée B en régulant positivement EBF1 (Dias *et al.*, 2005 ; Kikuchi *et al.*, 2005).

La liaison de Flt3L à son récepteur Flt3 est également essentielle au développement des cellules pré-pro-B. En effet, dans des souris déficientes pour Flt3, le nombre de cellules pré-pro-B est diminué par deux alors que le compartiment B périphérique est normal. Notons que les CLP expriment de grandes quantités de Flt3 et de Flt3L à leurs surfaces, indiquant un rôle autocrine potentiel du Flt3L dans l'engagement des CSH vers les CLP (Sitnicka *et al.*, 2002 ; 2003).

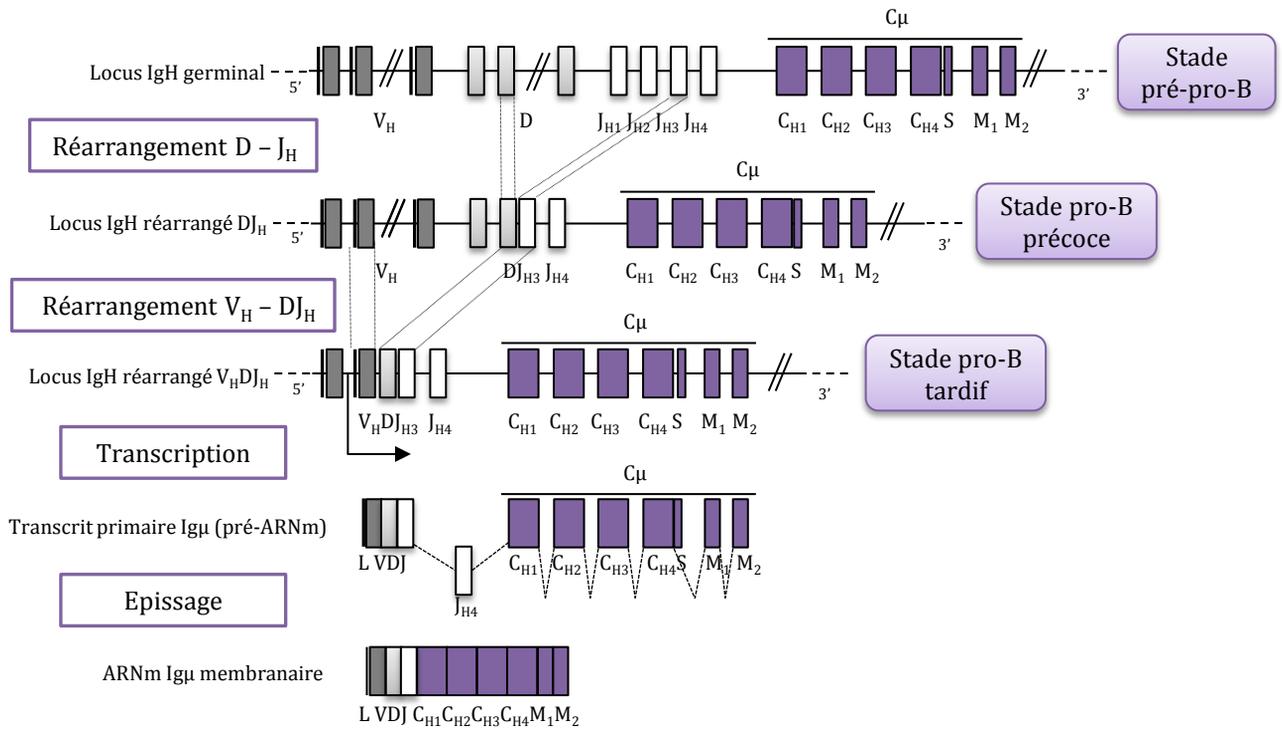
## **2.3. Le stade pro-B et les réarrangements VDJ au locus IgH**

### **2.3.1. Le stade pro-B**

Les cellules pro-B sont dispersées à travers la moelle osseuse et sont au contact des cellules stromales qui expriment la chimiokine CXCL12. Alors que les cellules pro-B précoces expriment fortement le récepteur CXCR4 et sont donc sensibles au chimitactisme induit de CXCL12, les cellules pro-B tardif expriment très faiblement ce récepteur et ne sont plus sensibles au chimiotactisme induit par CXCL12, expliquant leur libération vers une autre niche (pour revue : Nagasawa, 2006).

A l'inverse, ces cellules nécessitent l'IL-7 pour leur prolifération et leur survie. En effet, la signalisation *via* l'IL7R facilite les réarrangements VDJ au locus IgH (*cf* Chapitre 2, 1.2 Les modifications de la chromatine et le recrutement des recombinaisons). Ainsi, seules les cellules migrant vers des zones où l'IL7 est présente à forte concentration pourraient survivre et poursuivre leur différenciation (Corcoran *et al.*, 1998).

Le passage du stade pré-pro-B au stade pro-B précoce est d'ailleurs marqué par l'initiation des réarrangements VDJ au locus IgH, tandis que l'obtention d'un exon V<sub>H</sub>D<sub>J</sub>H



**Figure 7 : Représentation des réarrangements V(D)J au locus IgH.**

La première ligne correspond au locus IgH dans sa configuration germinale au stade pré-pro-B.

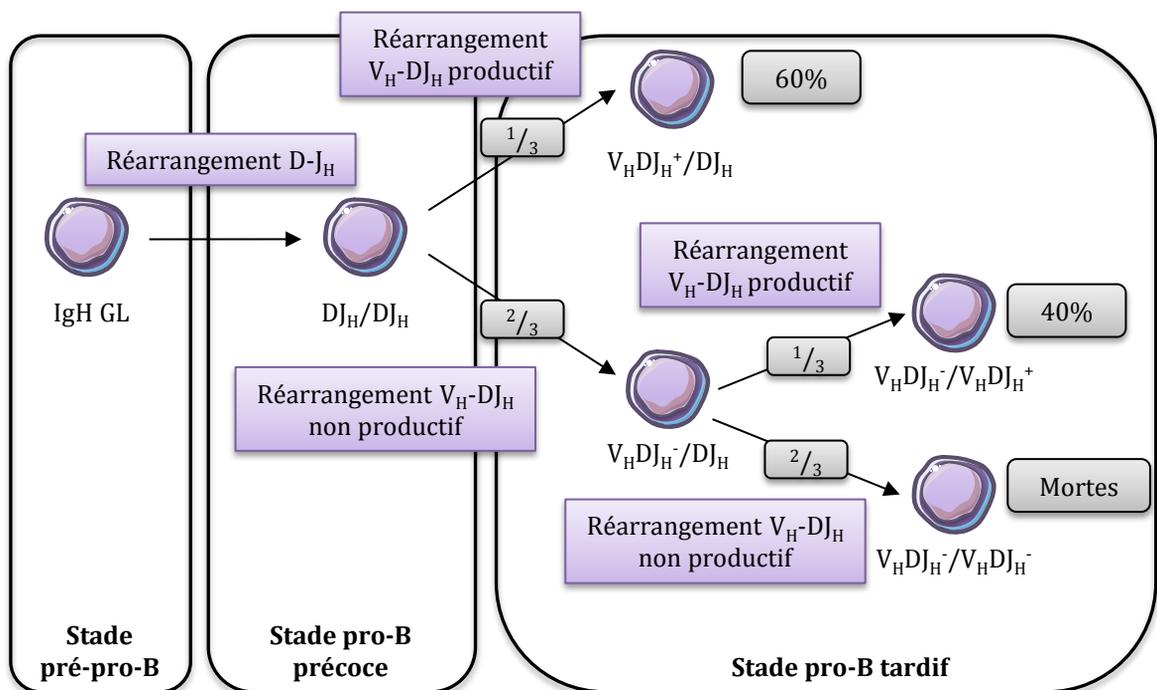
La deuxième ligne schématise le locus présentant un réarrangement  $DJ_H$  au stade pro-B précoce.

La troisième ligne montre un réarrangement  $V_HDJ_H$  au stade pro-B tardif.

La quatrième ligne correspond au transcrit primaire ou pré-ARNm synthétisé après transcription à partir de l'exon VDJ réarrangé.

La dernière ligne représente l'ARNm mature  $Ig\mu$  obtenu après épissage.

Le trait noir précédant chaque segment  $V_H$  correspond à l'exon leader (L).



**Figure 8 : Représentation de l'état des réarrangements V(D)J au locus IgH.**

Le statut de réarrangement de chaque allèle du locus IgH et leur fonctionnalité est indiquée sous les cellules correspondantes. Les fractions correspondent à la proportion de cellules présentant les réarrangements suivants. Les pourcentages indiquent la proportion finale de cellules avec un réarrangement productif (le statut des allèles étant différent).

GL: germlinal; + : fonctionnel; - : non-fonctionnel

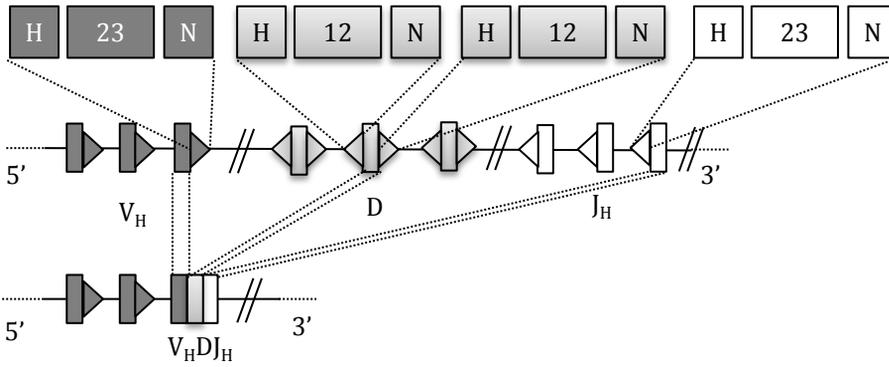
réarrangé, en association avec l'expression du marqueur CD19, caractérise le stade pro-B tardif (pour revue : Jung *et al.*, 2006).

### 2.3.2. Les réarrangements VDJ au locus IgH

#### 2.3.2.1. La création du répertoire antigénique

Selon le modèle proposé par Alt en 1984, le mécanisme des réarrangements VDJ se produit de manière ordonnée (réarrangement du locus IgH avant les loci IgL) et séquentielle (recombinaisons D-J<sub>H</sub> avant V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub>). Ainsi, un segment D s'associe aléatoirement à un segment J<sub>H</sub>, entraînant la délétion de l'ADN compris entre ces deux segments. Ce réarrangement D-J<sub>H</sub> se produit de façon bi allélique. L'obtention d'un ADN réarrangé DJ<sub>H</sub> caractérise le stade pro-B précoce. Puis un segment V<sub>H</sub> s'associe au segment DJ<sub>H</sub> précédemment formé sur un des deux allèles (Alt *et al.*, 1984) (**Figure 7**). Les segments V<sub>H</sub> proximaux sont préférentiellement réarrangés, comparés aux distaux. Cependant, la sélection antigénique qui se produit en périphérie altère le répertoire et masque cette différence (Yancopoulos *et al.*, 1984). Si le réarrangement V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> formé est productif (*i.e.* si le réarrangement est en phase), la cellule présente un réarrangement DJ<sub>H</sub> sur un allèle et V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> sur l'autre allèle. L'exon VDJ ainsi formé est transcrit puis épissé sur le premier exon C<sub>μ</sub>. L'obtention d'un réarrangement V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> productif marque le stade pro-B tardif et l'engagement définitif dans la lignée B (Rumfelt *et al.*, 2006).

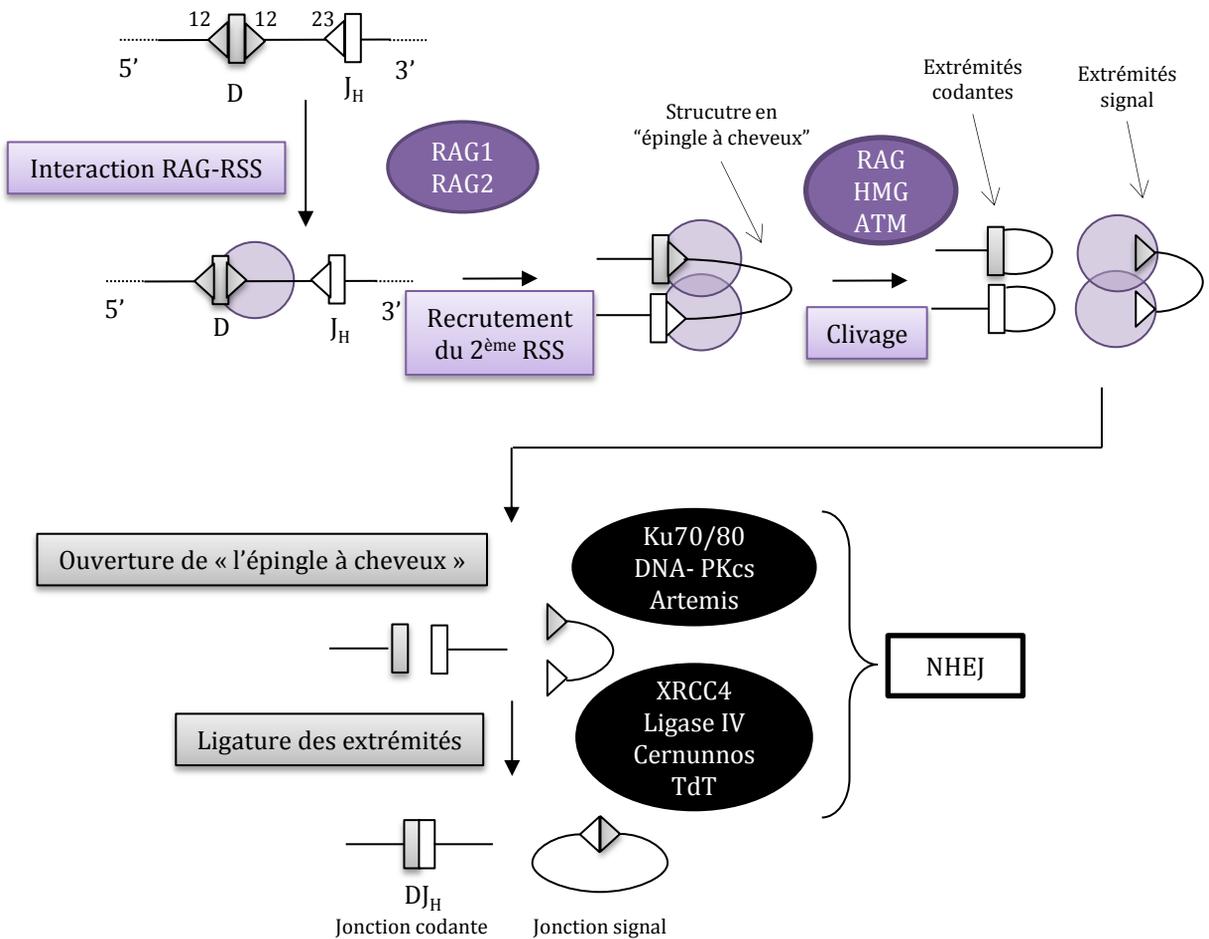
Cependant, lorsque le réarrangement V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> formé est non productif (*i.e.* si le réarrangement a entraîné un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré), un autre réarrangement V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub> s'opère sur le deuxième allèle, ouvrant deux possibilités pour la cellule : (1) le nouveau réarrangement V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> est fonctionnel et la cellule continue son développement; (2) le nouveau réarrangement obtenu est non productif, la cellule ne pourra pas produire de chaîne lourde fonctionnelle et mourra par apoptose. Statistiquement, seul un réarrangement sur trois est productif et conduit à la synthèse d'une chaîne lourde fonctionnelle (Mostoslavsky *et al.*, 2004) (**Figure 8**). En réalité, la proportion de réarrangements non productifs est plus élevée puisque des segments V<sub>H</sub> ou D non fonctionnels peuvent être utilisés. En 2007, l'équipe de Mårtensson a démontré que les deux allèles (productifs et non productifs) sont transcrits tout au long de développement B (Daly *et al.*, 2007). Une étude récente



**Figure 9 : RSS et règle des 12/23.**

Lors des réarrangements V(D)J, les recombinaisons s'effectuent entre deux RSS comportant des séparateurs (*spaceurs*) de taille différente, définissant l'ordre des réarrangements.

H: heptamère; N: nonamère; 12: *spacer* de 12 nucléotides; 23: *spacer* de 23 nucléotides



**Figure 10 : Complexes protéiques impliqués dans les cassures et la réparation lors des réarrangements V(D)J.**

Le complexe protéique RAG crée des DSBs, établissant ainsi des extrémités « codantes » en épingles à cheveux et des extrémités « signal » à bout franc. Les protéines de la voie du NHEJ ouvrent l'épingle à cheveux puis ligature les extrémités codantes et celle du signal.

Les étapes conduisant à la génération de DSB sont représentées en violet et les voies de réparation de la cassure sont en noir.

(D'après Schatz and Ji, 2011)

réalisée sur des souris présentant un allèle productif et un non productif (Reynaud *et al.*, 2005), a démontré que les transcrits issus de réarrangements non productifs sont pris en charge par les différents mécanismes de surveillance des ARN présents au sein de la cellule. Cela aboutit à leur dégradation afin d'inhiber la synthèse d'une chaîne lourde tronquée potentiellement délétère pour la cellule (Tinguely *et al.*, 2012).

### 2.3.2.2. Mécanisme des réarrangements VDJ

Les segments V, D et J sont flanqués de séquences spécifiques appelées RSS (*Recombination Sequence Signal* ou Séquences Signal de Recombinaison). Ces RSS sont constituées de séquences heptamérique (CACAGTG) et nonamérique (ACAAAAACC) hautement conservées et séparées par des régions non conservées de 12 ou 23 pb (dites *spacers* ou espaceurs). Les recombinaisons surviennent majoritairement entre deux segments présentant des RSS contenant des *spacers* différents : c'est la règle dite « 12/23 ». Or, les segments V<sub>H</sub> et J<sub>H</sub> sont systématiquement flanqués de RSS contenant des *spacers* de 23 pb, alors que les D sont encadrés par deux RSS présentant des *spacers* de 12 pb (**Figure 9**). Ainsi, cette règle dicte l'ordre des réarrangements au locus IgH afin d'éviter la formation d'exons V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> non productifs (Early *et al.*, 1980).

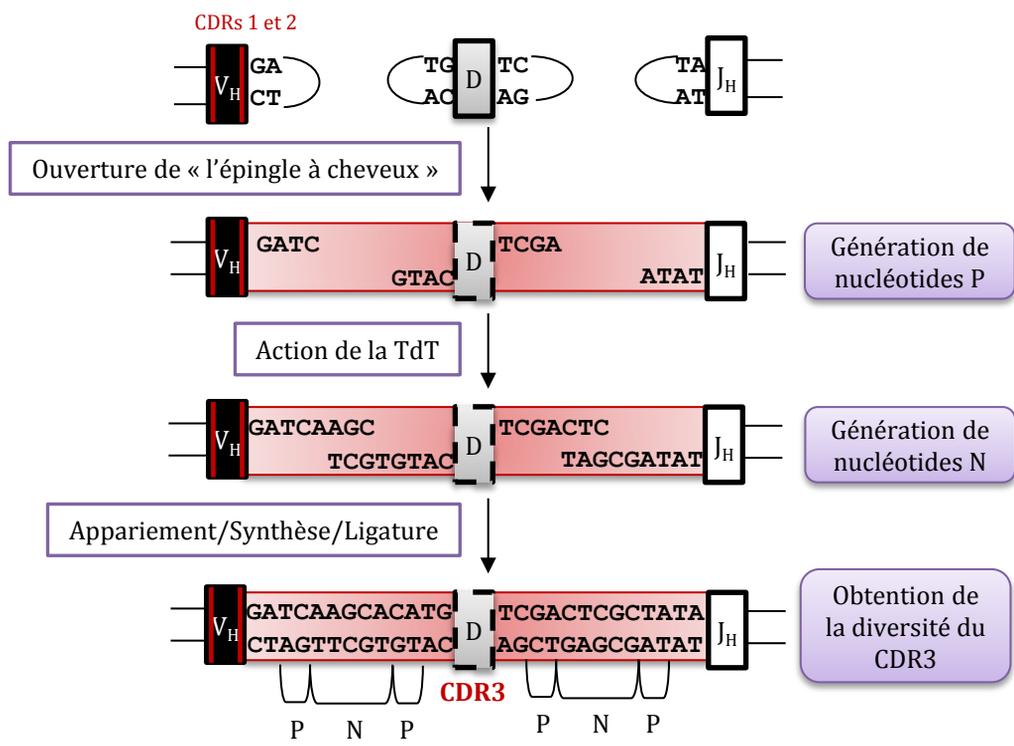
D'un point de vue mécanistique, les réarrangements V(D)J se déroulent en deux phases : d'abord la génération d'une cassure double brin (DSB pour *Double Strand Break*) puis la réparation de la cassure occasionnée (**Figure 10**) (pour revues: Fugmann *et al.*, 2000 ; Schlissel, 2003 ; Swanson, 2004 ; Schatz and Ji, 2011 ; Schatz and Swanson, 2011 ; Boboila *et al.*, 2012 ; Nishana and Raghavan, 2012 ; Jaeger *et al.*, 2013).

La première phase est initiée par l'endonucléase RAG (*Recombination Activating Gene*), formée par l'association des produits des gènes *Rag1* et *Rag2* (Oettinger *et al.*, 1990) et dont l'activité est retrouvée dès le stade CLP (Borghesi *et al.*, 2004). L'inactivation des gènes *Rag1* et *Rag2* chez la souris aboutit à un blocage du développement B aux stades précoces, corrélé à une incapacité à initier les réarrangements V(D)J (Mombaerts *et al.*, 1992 ; Shinkai *et al.*, 1992). RAG1 est d'abord recrutée au niveau de la séquence nonamérique d'un RSS, puis RAG2 s'y associe afin de maintenir l'ensemble au niveau de l'heptamère et de capturer le deuxième RSS (Fugmann and Schatz, 2001). Ceci génère une structure en « épingle à cheveux ». Des



expériences réalisées *in vitro* ont démontré que l'interaction avec les protéines HMG1 et HMG2 (*High Mobility Group*) augmenterait la stabilité de ce complexe et le clivage de l'ADN au niveau des RSS (Aidinis *et al.*, 1999). Cependant leur rôle *in vivo* n'a jamais été démontré. Les protéines RAG initient les coupures entre un élément codant et le RSS flanquant en introduisant une coupure simple brin en 5' de l'heptamère. Ceci génère un groupement 3'hodoxyl libre attaquant le second brin. Cette coupure engendre deux types d'extrémités : une structure en « épingle à cheveux » au niveau des extrémités codantes (*i.e.* les segments V, D ou J devant être réarrangés) et une structure à « bouts francs » au niveau des extrémités signal (*i.e.* région intergénique clivée). Après clivage, les protéines RAG restent fixées aux extrémités générées (Roth *et al.*, 1993 ; Schlissel *et al.*, 1993 ; McBlane *et al.*, 1995). Des études récentes montrent que les DSB ainsi générées sont détectées par des senseurs appartenant à la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour *DSB-Dependant Response*). Dans ce sens, l'association des RAG avec ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) stabilise les extrémités avant leur réparation (Bredemeyer *et al.*, 2006).

Lors de la deuxième phase, les DSB générées sont prises en charge par la voie de réparation du NHEJ (*Non Homologous End Joining*). L'hétérodimère Ku70/Ku80 reconnaît les extrémités codantes en « épingle à cheveux » et s'y lie afin de les protéger (Taccioli *et al.*, 1994 ; Nussenzweig *et al.*, 1996). Ces protéines recrutent alors la protéine kinase DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) pour former l'holoenzyme DNA-PK. Celle-ci, à son tour, recrute, phosphoryle et active l'endonucléase *Artemis* qui coupe la boucle de 5' en 3' pour ouvrir la structure en « épingle à cheveux » (Ma *et al.*, 2002). La ligature des extrémités est ensuite assurée par la Lig4 (*DNA ligase IV*) et XRCC4 (*X-ray repair cross complementing protein 4*), dont l'activité est stimulée par Cernunnos (autrement appelé *XRCC4-like factor*) (Calsou *et al.*, 2003 ; Hentges *et al.*, 2006). Contrairement aux extrémités codantes, celles à « bouts francs » sont directement liées, sans aucune modification préalable. Cela aboutit à la formation de jonctions signal qui seront ensuite éliminées par la cellule.



**Figure 11 : Génération de la diversité du CDR3.**

L'ouverture de la structure en «épingle à cheveux» par les protéines du NHEJ, conduit à la génération de nucléotides P (palindromiques). Puis la TdT rajoute aléatoirement des nucléotides N avant que la jonction soit appariée et ligaturée.

Les traits rouges représentent les CDRs 1 et 2. Le CDR3 est représenté par le carré rouge et il correspond à la totalité de la jonction du V<sub>H</sub> au J<sub>H</sub>.

Le schéma n'est pas à l'échelle du temps puisque les réarrangements V(D)J s'effectuent de manière séquentielle (D-J<sub>H</sub> puis V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub>).

(D'après Garland Science 2005)

### 2.3.2.3. La diversité du répertoire antigénique

Outre le choix entre de multiples segments V, D et J (*i.e.* diversité combinatoire), la diversité du répertoire antigénique est également due à des modifications se produisant au niveau de la jonction codante (*i.e.* diversité jonctionnelle) (**Figure 11**).

Une ouverture asymétrique de la structure en « épingle à cheveux » conduit à l'obtention de deux brins d'ADN de tailles différentes. Le brin le plus court est alors allongé par ajout de nucléotides complémentaires à l'autre brin, aboutissant à l'insertion de nucléotides palindromiques au niveau de la jonction des trois segments (notés nucléotides P pour *Palindromic nucleotide*). De plus, l'intervention de l'enzyme TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) diversifie encore la jonction en ajoutant des nucléotides de façon aléatoire (notés nucléotides N pour *Non-germline nucleotide*) aux extrémités des régions codantes (Desiderio *et al.*, 1984).

Ces processus se produisant de part et d'autre du segment D réarrangé, celui-ci peut subir des mécanismes exonucléasiques conduisant à des délétions plus ou moins importantes de sa séquence nucléotidique. Ainsi, alors que les segments V<sub>H</sub> codent les CDR1 et 2, le CDR3 provient de la jonction des trois segments V<sub>H</sub>,D et J<sub>H</sub> (Alt *et al.*, 1987).

## 2.4. Le stade pré-B et les réarrangements VJ aux loci IgL

### 2.4.1. Le stade pré-B

Le passage du stade pro-B tardif au stade *large* pré-B est marqué par l'expression d'une chaîne lourde  $\mu$ . Cette chaîne lourde  $\mu$  s'associe avec une pseudo-chaîne légère, constituée des protéines VpréB (CD179a) et  $\lambda 5$  (CD179b) (Karasuyama *et al.*, 1990 ; Tsubata and Reth, 1990). Le complexe ainsi formé, en association avec les molécules CD79a et CD79b, constitue le pré-BCR.

L'activation du pré-BCR répond à la liaison d'un ligand, de façon autonome ou en collaboration avec les cellules du microenvironnement (*i.e.* cellules stromales). Par exemple, la liaison de  $\lambda 5$  à la galectine-1, une lectine sécrétée par les cellules stromales médullaires, conduit à la formation d'une synapse déclenchant la signalisation dans la cellule (Gauthier *et al.*, 2002). Cette signalisation engendre des effets physiologiques



indispensables à la différenciation des cellules B ; faisant alors du pré-BCR le premier point de contrôle du développement B.

D'une part, l'expression du pré-BCR entraîne la prolifération cellulaire, permettant ainsi le passage du stade pro-B tardif au stade *large* pré-B. L'IL7 joue encore un rôle crucial dans cette expansion (pour revue : Corfe and Paige, 2012).

D'autre part, l'expression du pré-BCR inhibe les réarrangements  $V_H-DJ_H$  du deuxième allèle au locus IgH (*i.e.* cellule en configuration  $V_HDJ_H/DJ_H$ ). Cela n'autorise l'expression que d'un seul allèle afin d'assurer l'unicité des Ig produites par une cellule : c'est le phénomène d'exclusion allélique (pour revue : Corcoran, 2005).

L'expression du pré-BCR permet également une sélection positive et négative des cellules. En effet, seules les cellules dont la chaîne lourde  $\mu$  est capable de s'associer à une pseudo-chaîne légère sont sélectionnées pour poursuivre leur différenciation. A l'inverse, les cellules exprimant un pré-BCR auto-réactif (*i.e.* reconnaissant les molécules du soi comme du non soi) seraient éliminées par apoptose (pour revue : Mårtensson *et al.*, 2010).

Enfin, le pré-BCR contribue à l'inhibition de sa propre expression en exerçant un rétro-contrôle négatif sur la transcription des gènes codant la pseudo-chaîne légère. Ainsi, pour survivre en absence de pré-BCR, les cellules *large* pré-B doivent proliférer pour passer au stade *small* pré-B et réarranger leurs loci de chaînes légères. Pour cela, l'absence du pré-BCR au stade *small* pré-B conduit à la ré-expression des gènes *Rag*, induisant les réarrangements V-J aux loci des chaînes légères d'Ig. A ce stade, les cellules perdent également l'expression de la molécule de surface CD43 au profit du CD25 (pour revue : Mårtensson *et al.*, 2010). Notons qu'à ce stade des mécanismes supplémentaires entrent en jeu afin que la ré-expression des RAG n'entraîne pas de réarrangements sur l'allèle IgH précédemment exclu (*cf* Chapitre 2, 1.1 Le positionnement nucléaire et l'organisation spatiale des loci).



## 2.4.2. Les réarrangements VJ aux loci des chaînes légères

La règle des « 12/23 » s'applique également pour ces réarrangements puisque chaque segment  $V_L$  est suivi d'un RSS contenant un *spacers* de 12 pb alors que les segments  $J_L$  sont précédés de RSS présentant des *spacers* de 23 pb. Les mécanismes impliqués sont les mêmes que pour les réarrangements V(D)J au locus IgH, mis à part que le gène codant la TdT n'est plus exprimé à ce stade, éliminant la possibilité de N-diversité. Ainsi, les réarrangements s'effectuent également de manière séquentielle : d'abord au locus  $\kappa$  puis, s'ils sont non fonctionnels sur les deux allèles, ils ont lieu au locus  $\lambda$ . Si cette dernière étape est fonctionnelle, la chaîne légère produite remplacera la pseudo-chaîne légère pour permettre à la cellule d'exprimer un BCR de type IgM (pour revue : Mårtensson *et al.*, 2010). A l'instar du locus IgH, l'allèle non fonctionnel est transcrit puis éradiqué par les mécanismes de surveillance des ARN présents dans la cellule (Chemin *et al.*, 2010).

De la même façon que le pré-BCR, l'expression du BCR va induire un rétrocontrôle négatif bloquant les réarrangements sur les autres allèles de chaînes légères. On parlera ainsi d'exclusion allélique pour le second allèle  $Ig\kappa$  et d'exclusion isotypique pour les allèles  $Ig\lambda$ . Notons que chez la souris, la complexité du locus  $\kappa$  semble expliquer la forte proportion de LB exprimant cette chaîne légère (5% de B  $\lambda+$  contre 95% de B  $\kappa+$ ) (Arakawa *et al.*, 1996 ; Gorman *et al.*, 1996).

## 2.5. Le stade B immature et l'édition du BCR

### 2.5.1. Le stade B immature

A ce stade, les cellules expriment un BCR fonctionnel de type IgM et perdent l'expression du CD25. Néanmoins, l'expression d'un BCR fonctionnel à la surface de la cellule B lui permet de passer au stade B immature mais ne suffit pas à permettre sa migration en périphérie. En effet, la cellule B doit d'abord subir une sélection négative par apoptose afin d'éliminer les cellules présentant un BCR auto-réactif (*i.e.* reconnaissant les molécules du soi comme du non soi) : c'est le mécanisme de tolérance, constituant le deuxième point de contrôle de l'ontogénie B.



Cependant, afin de permettre au plus grand nombre de cellules de quitter la moelle osseuse, celles qui présentent un BCR auto-réactif peuvent être « sauvées » grâce au processus d'édition du BCR. Ce mécanisme est encore dépendant du microenvironnement médullaire. En effet, les cellules B immatures auto-réactives sont protégées de la mort cellulaire grâce à certaines cellules stromales qui induisent la ré-expression des gènes *Rag* et le réarrangement des gènes de chaînes légères au deuxième locus afin d'éviter l'apoptose (Sandel and Monroe, 1999).

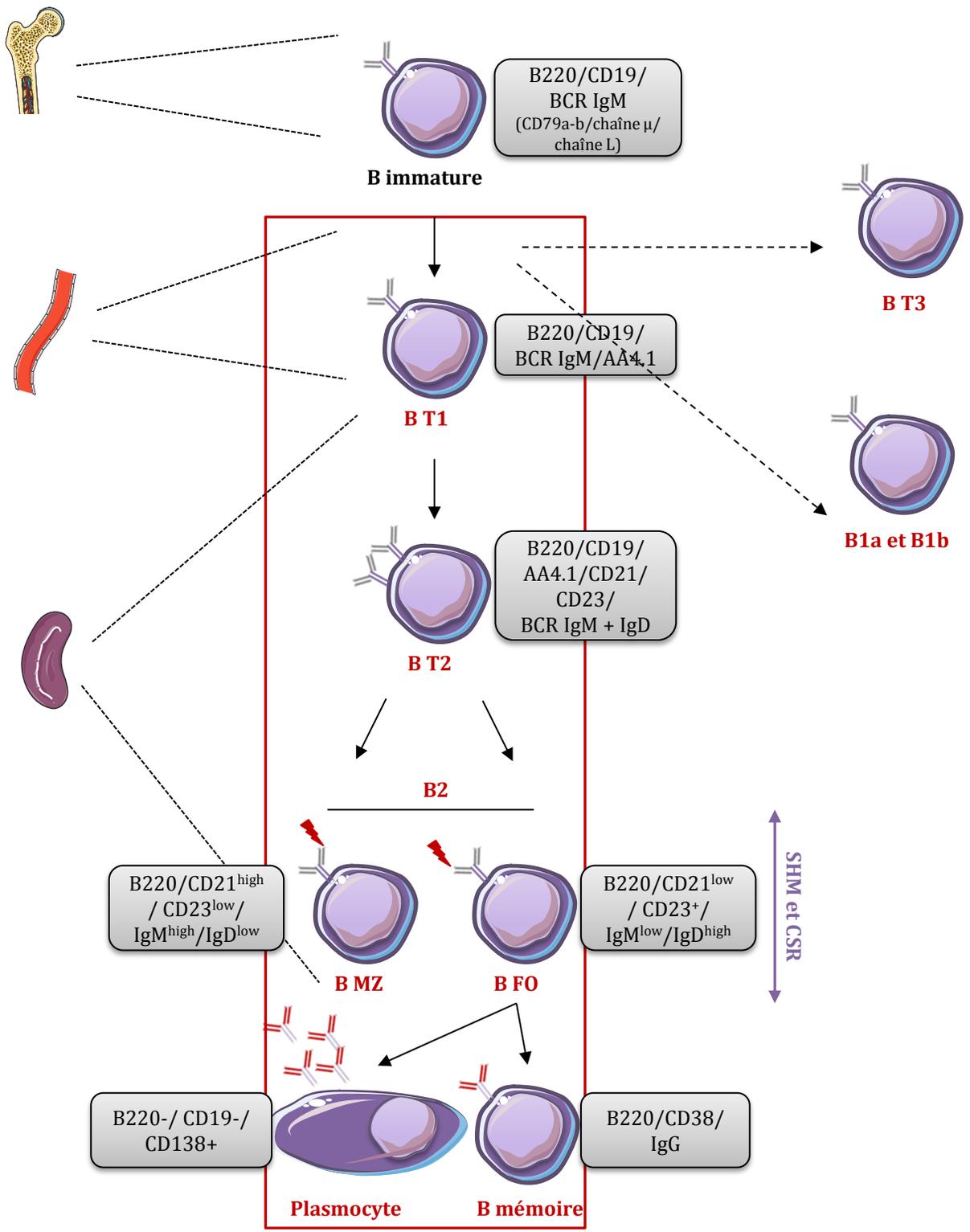
### 2.5.2. L'édition du BCR

Ainsi, un deuxième tour de recombinaisons des régions variables des chaînes légères permet le remplacement du BCR et donc la contre sélection des cellules auto-réactives (Tiegs *et al.*, 1993 ; Hertz and Nemazee, 1997).

De plus, les cellules présentant un réarrangement VDJ auto-réactif ou non fonctionnel sur les deux allèles du locus IgH peuvent échapper à l'apoptose grâce au mécanisme de remplacement du segment  $V_H$  utilisé (Chen *et al.*, 1995).

Si toutefois la cellule conserve son auto-réactivité, elle deviendra anergique (*i.e.* diminution de la prolifération, sous-expression du BCR) ou sera éliminée par apoptose (Pike *et al.*, 1982 ; Sandel and Monroe, 1999).

Les cellules B qui survivent quittent la moelle osseuse et se dirigent vers les organes lymphoïdes périphériques.



**Figure 12 : Schéma des principales voies de l'ontogénie B tardive.**

Les étapes spécifiques au développement B en périphérie sont en rouge. Les principales molécules de surface exprimées sont en noir. Les flèches en pointillés représentent des stades de développement dont l'origine n'a pas encore été clarifiée. La flèche violette représente les mécanismes de diversification secondaire du répertoire.

B T : lymphocyte B transitionnel; B MZ : lymphocyte B de la zone marginale; B FO : lymphocyte B de la zone folliculaire;  
 SHM : *Somatic HyperMutation*; CSR : *Class Switch Recombination*.

### 3. PHASE TARDIVE : DIVERSIFICATION SECONDAIRE DU REPERTOIRE

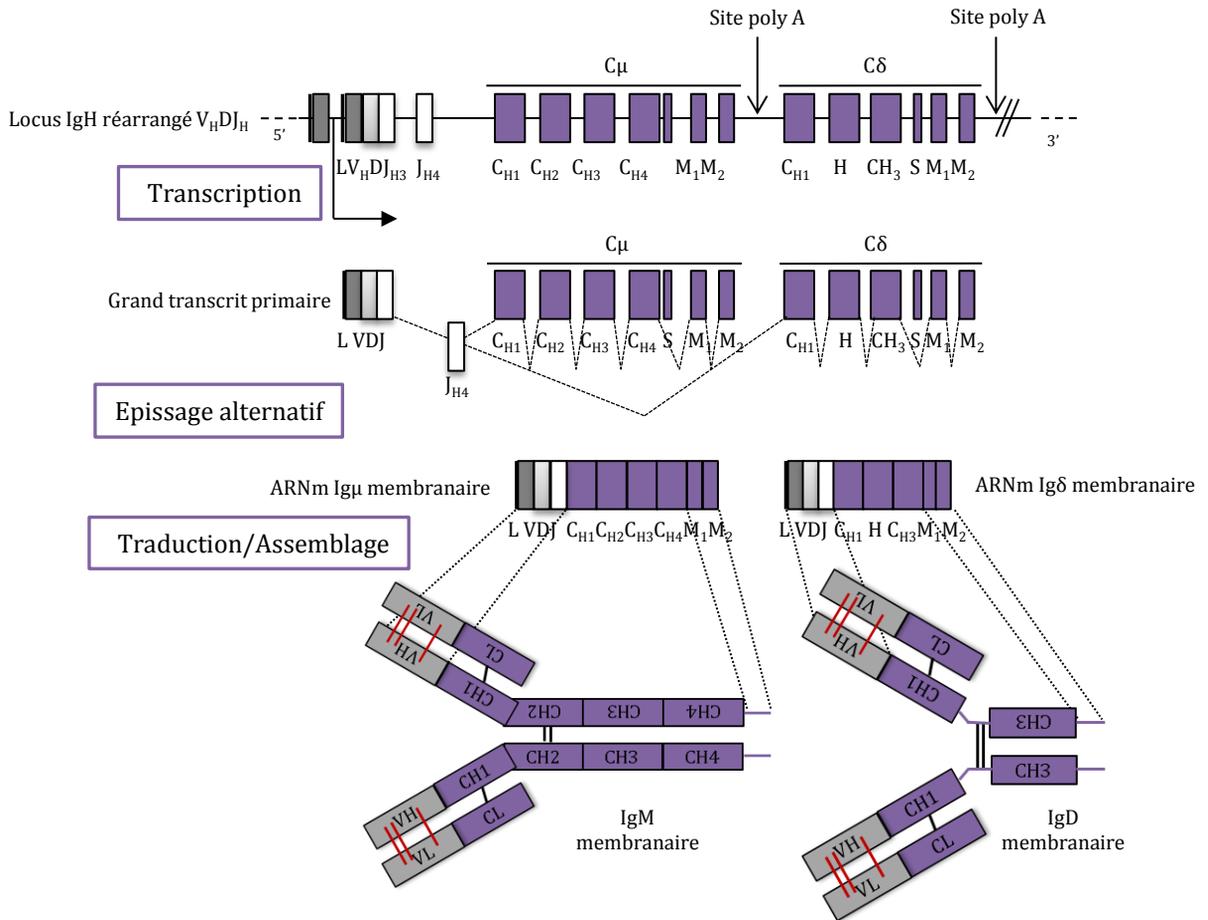
Après leur sortie de la moelle osseuse, les cellules B immatures empruntent la circulation sanguine pour arriver dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques et MALT pour *Mucosae Associated Lymphoid Tissue* ou tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) où elles rencontreront l'Ag. Avant de devenir des plasmocytes (*i.e.* stade terminal de différenciation B) capables de sécréter des Ig, les lymphocytes B passent encore par différents stades de développement. Cette seconde phase du développement B se déroule de façon dépendante de l'Ag. Elle aboutit à la création d'Ig plus affines et ayant une fonction plus adaptée à l'Ag, grâce aux mécanismes de SHM et de CSR respectivement (**Figure 12**).

#### 3.1. Le stade B transitionnelle et le rôle de la signalisation du BCR

##### 3.1.1. Le stade B transitionnelle

A la vue de leur stade intermédiaire de développement, les cellules B quittant la moelle osseuse sont appelées cellules transitionnelles. A ce stade, elles répriment les gènes *Rag* et expriment à leur surface le marqueur AA4.1 ou CD93 (Allman *et al.*, 1992). Cependant, les cellules B transitionnelles forment une population hétérogène. Elles peuvent ainsi être subdivisées en trois sous-populations suivant leurs caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles ainsi que leur localisation (pour revue : Chung *et al.*, 2003).

Les cellules T1 sont phénotypiquement proches des cellules B immatures de la moelle. Elles circulent dans le sang et se situent au niveau de la partie externe des manchons lymphoïdes péri-artériolaires (PALS pour *Periarterial Lymphatic Sheaths*), zone riche en LT où elles subiront encore une sélection négative. Les cellules T1 qui entrent dans les follicules de la rate deviennent des T2. Ces dernières sont uniquement retrouvées dans les follicules et commencent à exprimer les marqueurs CD21 et CD23 (Loder *et al.*, 1999). C'est également à ce stade que les cellules commencent à présenter, en association avec l'IgM de surface, une Ig de type *delta*. Cette co-expression est possible grâce à l'épissage alternatif d'un grand transcrypt primaire contenant l'exon VDJ réarrangé et les exons constants C $\mu$  et C $\delta$  (Moore *et al.*, 1981) Le transcrypt mature codant chaque isotype est obtenu par utilisation d'un site accepteur d'épissage différent,



**Figure 13 : Mécanisme d'épissage alternatif à l'origine de la co-expression IgM/IgD.**

La première ligne correspond au locus IgH réarrangé V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> d'une cellule B transitionnelle.

La deuxième ligne représente le grand transcript primaire contenant l'exon VDJ réarrangé et les exons codant C<sub>μ</sub> et C<sub>δ</sub>.

La troisième ligne schématise les deux types d'ARNm mature pouvant être obtenus grâce à un épissage alternatif du transcript primaire précédant. L'exon VDJ réarrangé s'épisse soit sur le premier exon C<sub>μ</sub>, soit sur le premier exon C<sub>δ</sub>, le site de polyadénylation utilisé variant alors.

La dernière ligne représente les Ig synthétisées à partir des deux ARNm matures et qui seront co-exprimées à la surface de la cellule B.

L'IgM contient trois domaines C<sub>H</sub> sans région charnière. Notons que l'IgD murine ne contient que deux domaines C<sub>H</sub> (le deuxième étant tout de même appelé C<sub>H3</sub>) séparés par une région charnière plus grande que les autres.

Poly A: site de polyadénylation

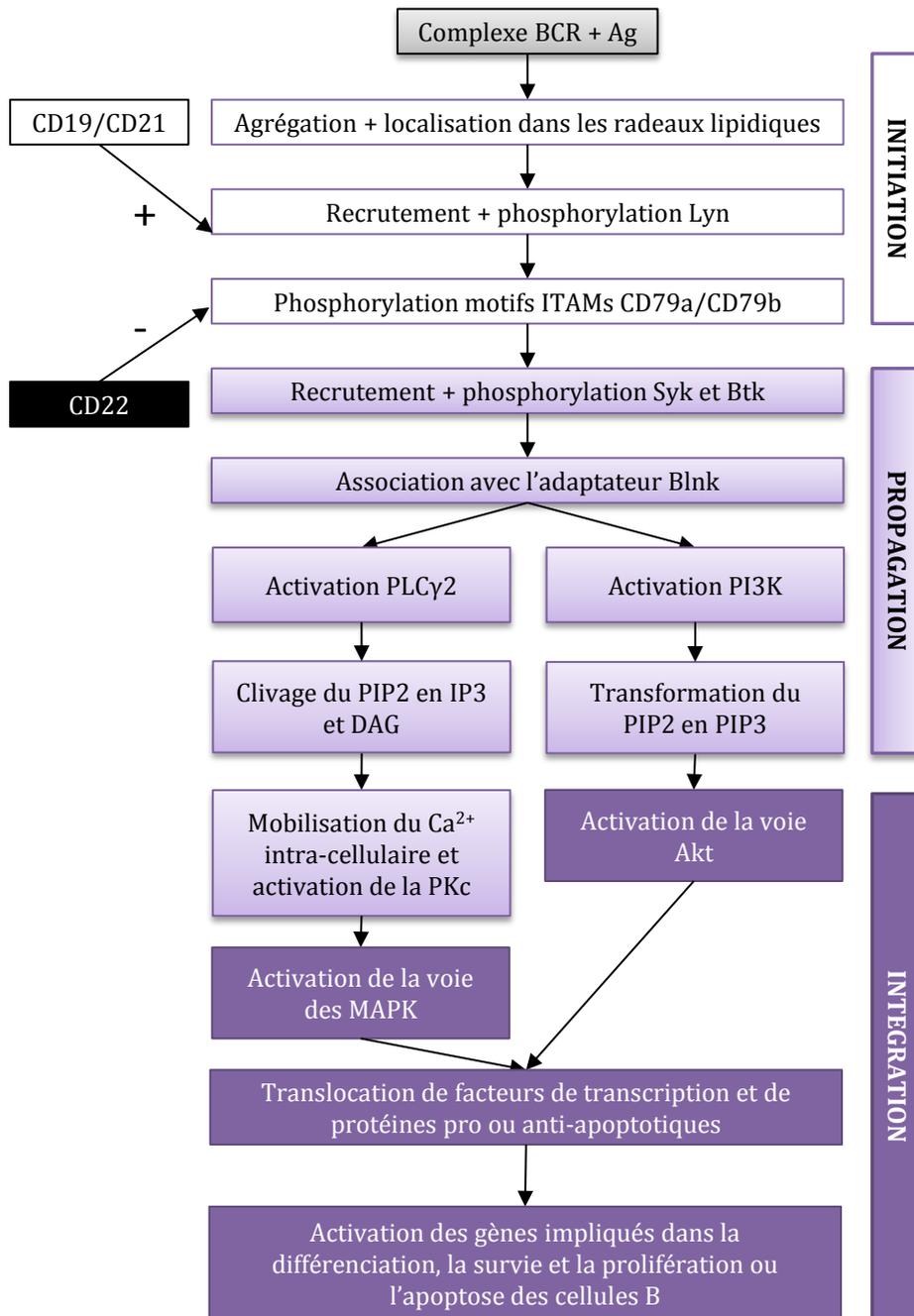
interne aux premiers exons constants C<sub>H</sub>. Ce transcrit se termine suite à la rencontre d'un site de polyadénylation situé en aval des exons membranaires (Lefranc *et al.*, 2005) (**Figure 13**). Un stade T3 a également été mis en évidence et correspondrait à des cellules anergiques (Merrell *et al.*, 2006).

Des études ont démontré qu'après engagement de leur BCR, les cellules T1 meurent par apoptose, alors que les cellules T2 prolifèrent et se différencient en B matures. Cela s'explique par le fait que les cellules T1 subissent une sélection négative par leur BCR alors que les cellules T2 subissent une sélection positive pour leur progression en cellules B matures (Petro *et al.*, 2002; Su and Rawlings, 2002). Des modèles de souris transgéniques où des mutations affectent les composants majeurs de la signalisation du BCR présentent un nombre réduit de cellules B matures de la rate. Ces expériences confirment donc le rôle de la nature du signal induit par le BCR (*i.e.* la force de la signalisation du BCR) dans le devenir des cellules B transitionnelles mais aussi dans le maintien des cellules B matures. En effet, le BCR possède deux rôles : transmettre les signaux de prolifération et de survie essentiels aux lymphocytes B mais aussi réguler la destinée de ces cellules (pour revues : Niino and Clark, 2002 ; Pillai and Cariappa, 2009).

### 3.1.2. La signalisation du BCR

La signalisation induite par le BCR se décompose en trois phases : (1) la liaison d'un Ag induit une phase d'initiation permettant au BCR de transmettre le signal au niveau intracellulaire ; (2) la phase de propagation permet la diffusion de ce signal via des seconds messagers activés par phosphorylation; (3) les facteurs de transcription impliqués dans la survie, l'apoptose et la différenciation des cellules B sont transloqués au noyau lors de la phase d'intégration (pour revues : Dal Porto *et al.*, 2004 ; Horejsí *et al.*, 2004 ; Monroe, 2006 ; Parsons and Parsons, 2004).

D'un point de vue moléculaire, après liaison d'un Ag, les complexes BCR se regroupent dans des compartiments membranaires appelés radeaux lipidiques. Ces régions riches en cholestérol structurent la bicouche lipidique afin d'inclure ou d'exclure les protéines intracellulaires nécessaires à la signalisation. Ainsi, la tyrosine kinase Lyn se retrouve associée aux motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)



**Figure 14 : Voies de transduction impliquées dans la signalisation du BCR.**

La signalisation du BCR se déroule en trois phases : l'initiation, la propagation puis l'intégration. Après liaison d'un antigène, les BCR d'une même cellule B s'agrègent et se localisent dans les radeaux lipidiques. Trois protéines kinases sont alors activées en cascade par phosphorylation: Lyn, Syk et Btk. Elles activent en retour la PI3K et la PLC $\gamma$ 2 qui sont d'importants seconds messagers. Les produits de ces enzymes activent les voies ubiquitaires Akt et MAPK. La translocation au noyau de facteurs de transcriptions détermine le devenir des cellules B. CD19 et CD22 sont respectivement des régulateurs positifs et négatifs de cette signalisation.

des protéines CD79a et CD79b. Cela entraîne leur activation par phosphorylation, générant ainsi des sites d'ancrage pour les tyrosines kinases Btk et Syk. Leur activation et leur association avec l'adaptateur Blnk, recrute et phosphoryle les enzymes phospholipase  $\text{C}\gamma 2$  ( $\text{PLC}\gamma 2$ ) et PI3 kinase (PI3K). La PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) pour produire du phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) qui à son tour recrute des composants de la signalisation du BCR et active la voie ubiquitaire Akt. La  $\text{PLC}\gamma 2$  utilise le même substrat que le PI3K mais produit de l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) et du diacylglycerol (DAG), qui induisent respectivement la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC), responsables de l'activation de la voie ubiquitaire MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase* pour protéine kinase activée par des mitogènes). Toutes ces cascades de phosphorylations conduisent principalement à la translocation de facteurs de transcriptions tels que NF- $\kappa$ B ou NFAT, et à l'activation de protéines pro et anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou la capase 9, responsables de la prolifération et de la survie des LB.

CD19 et CD21 sont des régulateurs positifs de cette signalisation, alors que CD22 est un régulateur négatif. L'activation par phosphorylation de motifs ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) dans sa partie intra-cytoplasmique conduit au recrutement de protéines atténuant la signalisation du BCR (**Figure 14**).

Notons qu'après liaison d'un Ag, les BCR peuvent également être endocytés par la cellule pour remplir trois fonctions. Ce mécanisme permet de compartimentaliser la signalisation et ainsi d'influer sur son issue. Il permet également la dégradation partielle de l'Ag. Ce mécanisme appelé apprêtement antigénique permet la présentation antigénique, processus nécessaire à l'activation optimale de la réponse immunitaire. Enfin, les BCR endocytés peuvent être dégradés, entraînant ainsi l'arrêt de la signalisation par rétro-contrôle négatif (Chaturvedi *et al.*, 2011).



### 3.2. Le stade B mature et l'augmentation de la spécificité antigénique *via* la SHM et la CSR

#### 3.2.1. Les sous-populations B matures

En fonction des signaux donnés par le BCR aux cellules T2, les cellules B matures sont divisées en deux grandes catégories : les B1 et les B2. Ces cellules diffèrent de par leur origine, leur localisation, leur phénotype, leur fonction et leur mode d'activation (dépendant ou non des cellules lymphocytaires T) (pour revue : Sagaert and De Wolf-Peeters, 2003 ; Pillai and Cariappa, 2009).

Situées majoritairement dans les cavités péritonéale et pleurale, les B1 peuvent être réparties en deux sous-populations : les B1a, exprimant le CD5 et les B1b, qui sont CD5-. L'origine de ces cellules reste sujette à controverse. Elles jouent un rôle dans la protection immédiate contre des pathogènes en sécrétant spontanément des anticorps naturels.

Les B2 sont également subdivisées en deux populations : les B de la zone marginale (B MZ pour *Marginal Zone B cells*) et les B de la zone folliculaire (B FO pour *Follicular B cells*). Les B MZ sont localisées entre la pulpe blanche et la pulpe rouge de la rate, en périphérie des follicules. Ces cellules expriment fortement le CD21, phénotype engendré suite à une faible signalisation du BCR (Cariappa *et al.*, 2001). Des expériences de délétion conditionnelle chez la souris ont également montrées que la signalisation par NOTCH2 est indispensable à la formation des B MZ (Saito *et al.*, 2003). Tout comme les B1, les B MZ participent à une réponse immunitaire précoce. En effet, suite à une activation indépendante des LT, les B MZ peuvent se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgM à courte durée de vie (Martin *et al.*, 2001). A l'inverse, les B FO constituent la majorité des cellules de la rate et sont localisées dans les follicules primaires. Contrairement aux B MZ, elles expriment fortement le CD23 et faiblement le CD21, et leur génération nécessite un plus fort signal du BCR (Cariappa *et al.*, 2001).



### 3.2.2. La réponse immunitaire des cellules B

En fonction des sous-populations B matures, du contexte de rencontre avec l'Ag et de la nature de celui-ci, trois types de réponse ont ainsi été définis : les réponses T-indépendantes (*i.e.* indépendantes des LT) de type I ou II et les réponses T-dépendantes (pour revue : Fairfax *et al.*, 2008).

Les réponses T-indépendantes de type I n'engagent pas la spécificité du BCR. Pour cela, des agents mitogènes sont capables d'induire la prolifération des LB ainsi que la sécrétion d'Ig, indépendamment de leur reconnaissance par le BCR. Ce type de réponse met alors en jeu la liaison de motifs communs à tous les pathogènes (*i.e.* les PAMP) à des récepteurs non spécifiques tels que les TLR (*Toll-Like Receptor*).

A l'inverse, les réponses T-indépendantes de type II sont déclenchées par des Ag contenant des épitopes répétés, présents notamment à la surface des bactéries encapsulées. Ces Ag entraînent l'aggrégation des BCR à la surface cellulaire, déclenchant l'activation et la prolifération de ces dernières. Les cellules B1 et MZ, majoritaires dans ce type de réponse, se différencient rapidement en plasmocytes sécrétant des IgM de faible affinité afin de former la première ligne de défense spécifique contre l'Ag. Expérimentalement, ce type de réponse est provoqué par des haptènes couplés au ficoll, au dextran ou à l'acrylamide.

Les réponses T-dépendantes, qui font principalement intervenir les cellules B FO, sont les seules à aboutir à la formation de B mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie. Dans ce cas les Ag sont de nature protéique et leur reconnaissance nécessite une coopération étroite avec les LT et les cellules dendritiques. Après avoir phagocyté l'antigène (*i.e.* mécanisme de l'immunité innée visant à internaliser l'antigène pour le lyser), les cellules dendritiques présentent des fragments antigéniques à leur surface, en association avec les molécules du CMH de classe II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; *i.e.* molécule du soi). Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT CD4<sup>+</sup> reconnaissent ce complexe CMH/peptides antigéniques *via* leur récepteur spécifique (TCR pour *T-Cell Receptor*). Cette reconnaissance ainsi que des signaux de co-stimulation entraînent leur activation et leur expansion au sein des follicules. Parallèlement, les LB entrent en contact avec l'Ag sous sa forme native. Après contact avec une partie des LT préalablement activés et avec l'environnement stromal, les LB



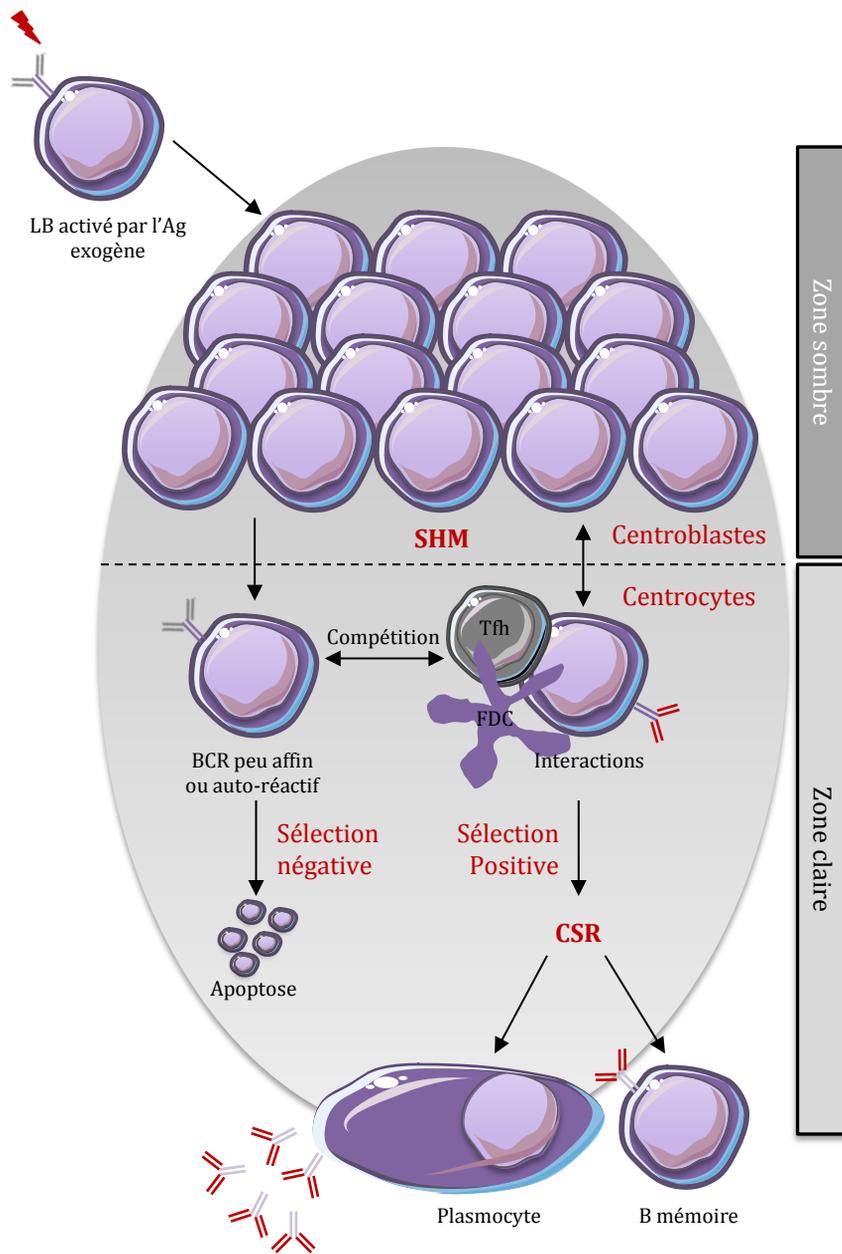
recevoient de nombreux signaux de co-stimulation leur permettant de s'activer et de se relocaliser vers le centre du follicule. En effet, la liaison du CD40 (*i.e.* molécule exprimée à la surface des cellules B) avec son ligand inductible CD40L (*i.e.* exprimé à la surface des lymphocytes T activés) agit comme un signal de co-stimulation induisant l'expansion des cellules B et leur différenciation clonale. En outre, des cytokines secrétées par les lymphocytes T activés favorisent la croissance et la différenciation lymphocytaire B. Ces cellules B activées peuvent alors (1) se différencier en plasmocytes extrafolliculaires sécrétant des anticorps de faible affinité qui sont importants pour la défense immédiate contre l'infection; (2) se différencier en cellules B mémoires précoces ou (3) se relocaliser à l'intérieur des follicules pour initier la réaction du centre germinatif (pour revues : Cyster, 2010 ; Good-Jacobson and Tarlinton, 2012 ; Malhotra *et al.*, 2013).

### 3.2.3. La réaction du centre germinatif

Les LB activés qui migrent au centre des follicules primaires initient la formation de centres germinatifs (GC pour *Germinal Center*), autrement appelés follicules secondaires, où ils entament une expansion rapide et clonale (pour revues : Klein and Dalla-Favera, 2008 ; Victora and Nussenzweig, 2012). Au sein de ces follicules, les LB sont dans un microenvironnement propice aux interactions avec une sous-population de LT (Tfh pour *T Follicular helper*) et avec les cellules dendritiques folliculaires (FDC pour *Follicular Dendritic Cell*) dont les signaux sont nécessaires aux LB pour leur développement (pour revues : Ramiscal and Vinuesa, 2013 ; Rezk *et al.*, 2013).

Histologiquement, les GC peuvent être divisés en deux zones : la zone sombre et la zone claire. Les LB de la zone sombre sont appelés centroblastes alors que ceux de la zone claire sont nommés centrocytes.

La zone sombre est essentiellement composée de LB en prolifération n'exprimant plus d'Ig de surface et subissant de nouvelles modifications des gènes codant les chaînes d'Ig : la SHM, ou maturation d'affinité, qui consiste en l'introduction de mutations ponctuelles dans la région variable des chaînes lourdes et légères d'Ig afin d'augmenter l'affinité pour l'Ag (pour revue : Di Noia and Neuberger, 2007).



**Figure 15 : Structure schématique d'un centre germinatif.**

Les LB activés par la rencontre avec l'Ag forment la population des centroblastes qui prolifèrent dans la zone sombre du GC et subissent la SHM. Ils migrent ensuite dans la zone claire pour former la population des centrocytes. Ces derniers sont testés pour leur affinité à l'Ag, avec l'aide des FDC et des Tfh. Les centrocytes sélectionnés subissent la CSR puis se différencient en B mémoires ou en plasmocytes.

Tfh : T follicular helper; FDC : Follicular Dendritic Cells; GC : Germinal Center; SHM: Somatic HyperMutation; CSR: Class Switch Recombination; LB : lymphocyte B

La zone claire contient des LB issus de SHM, réexprimant leur Ig de surface, en compétition pour la sélection clonale grâce aux interactions avec les FDC et les Tfh. En effet, les BCR peu affins pour l'Ag ou auto-réactifs (*i.e.* cellules dont le processus de SHM a diminué ou modifié l'affinité du BCR au lieu de l'augmenter) sont contre-sélectionnés (Rajewsky, 1996). Ainsi, lors de la sélection clonale, les LB n'interagissant pas correctement avec les FDC et les Tfh ne reçoivent pas les signaux de prolifération et de différenciation nécessaires à leur survie, entraînant leur mort par apoptose (**Figure 15**). Notons que le GC est une structure dynamique dans laquelle les centrocytes peuvent retourner dans la zone sombre. Bien que le but de ce retour dans la zone sombre n'ait jamais été clairement démontré, il est probable que les LB effectuent ce « recyclage » pour subir une SHM encore plus efficace (Oprea and Perelson, 1997). Après sélection positive des cellules les plus affines pour l'Ag, ces dernières subissent la CSR, ou recombinaison de classe, qui permet le passage d'une production d'IgM/IgD à celle d'Ig d'un autre isotype afin d'acquérir de nouvelles fonctions effectrices sans modifier l'affinité antigénique (pour revue : Chaudhuri and Alt, 2004). Enfin, les centrocytes vont soit se différencier en plasmocytes, soit former le compartiment B mémoire.

Suivant s'ils sont localisés dans les centrocytes ou les centroblastes, les LB du GC expriment différents marqueurs de surface que nous ne détaillerons pas ici. Cependant, dans l'ensemble, les LB du GC sont caractérisés par la perte de l'IgD de surface et une forte expression membranaire d'un glycané sialilé reconnu par l'anticorps monoclonale GL7 (*2,6-linked N-acetylneuraminic acid*). Les cellules activées peuvent également être identifiées par une augmentation de leur liaison à la PNA (*PeaNut Agglutinin*) et l'expression du récepteur FAS (ou CD95), impliqué dans l'apoptose (Naito *et al.*, 2007). La présence de ce récepteur, couplée à une diminution des protéines anti-apoptotiques, confirme la sensibilité accrue des B du GC à l'apoptose, en l'absence de signaux de survie et de prolifération fournis par les FDC et les Tfh. Le programme transcriptionnel des LB du GC est régulé par le facteur de transcription BCL6, indispensable à la formation de ces structures secondaires et à la maturation d'affinité. En effet, les souris présentant une délétion de BCL6 produisent des IgG1 après stimulation mais sont incapables de former des GC et de produire des Ig de haute affinité (Fukuda *et al.*, 1997). Enfin, les LB du GC expriment l'enzyme AID (*Activation-Induced Deaminase*).



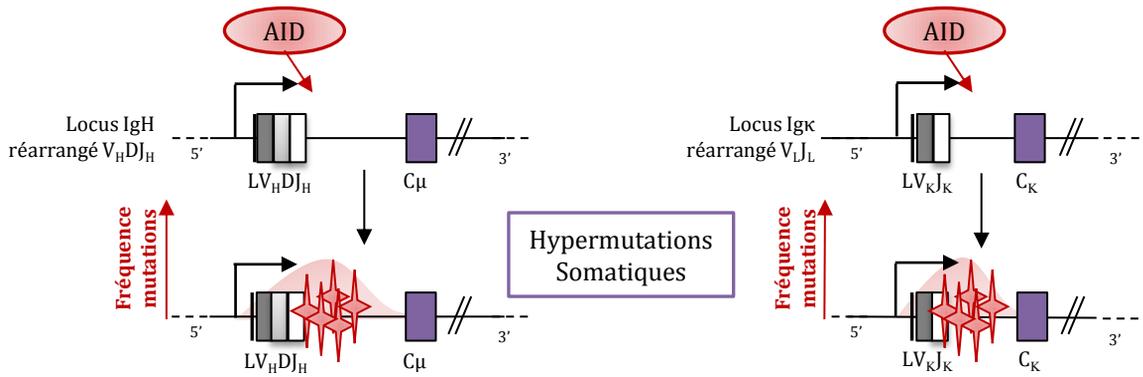
### 3.2.4. L'augmentation de la spécificité antigénique

#### 3.2.4.1. L'enzyme AID au centre des recombinaisons secondaires

Bien que la SHM et la CSR diffèrent par leurs fonctions, ces deux événements géniques sont initiés par la même enzyme : AID (pour revues : Maul and Gearhart, 2010 ; Pavri and Nussenzweig, 2011; Stavnezer, 2011 ; Larijani and Martin, 2012 ; Keim *et al.*, 2013 ; Wang, 2013). Découverte en 1999 par l'équipe de T. Honjo, l'enzyme AID est codée par le gène *Aicda* (Muramatsu *et al.*, 1999). Sa délétion chez la souris n'affecte pas le développement B mais entraîne un blocage des phénomènes de SHM et de CSR (Muramatsu *et al.*, 2000). Chez l'homme, des mutations du gène *Aicda* conduisent à l'apparition du syndrome d'hyper IgM (HIGM2), caractérisé par une élévation des taux d'IgM, l'absence d'isotypes issus de CSR, l'absence de SHM au niveau des régions variables d'Ig et la déstructuration des GC (Revy *et al.*, 2000).

AID appartient à la famille de déaminases APOBEC (*APOlipoprotein B mRNA-editing Enzyme-Catalytic*) dont certaines sont connues pour « l'édition d'ARNm » (*RNA editing ; i.e.* modifications post-transcriptionnelles). Cependant, des études ont démontré que le substrat d'AID est l'ADN simple brin (ssDNA pour *single strand DNA*) généré au cours de la transcription (Petersen-Mahrt *et al.*, 2002 ; Chaudhuri *et al.*, 2003). Il est ainsi admis qu'AID attaque seulement les régions transcrites, impliquant une corrélation entre transcription et recrutement d'AID, que ce soit aux loci d'Ig ou non-Ig (Fukita *et al.*, 1998 ; Ramiro *et al.*, 2003) (*cf* Chapitre 2, 1.3 La transcription et le recrutement des recombinaisons).

Bien qu'AID soit principalement localisée au niveau du cytoplasme (Rada *et al.*, 2002a; Schrader *et al.*, 2005), son activité de déamination est exercée sur l'ADN, dans le noyau des cellules B activées. Ainsi, la protéine est maintenue dans le cytoplasme grâce à un site d'ancrage présent dans sa partie C-terminale (Patenaude *et al.*, 2009) alors que son importation vers le noyau est due à une séquence signal d'exportation nucléaire, également située dans sa partie C-terminale (McBride *et al.*, 2004). Cependant, cette localisation nucléaire est temporaire car elle y est 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, sa phosphorylation régule son activité. Ainsi, AID est phosphorylée sur sa sérine 38 (P-S38) par la protéine PKA (*c-AMP-dependent Protein Kinase A*) (Basu *et al.*, 2005), uniquement dans les cellules B activées



**Figure 16 : Profil des hypermutations somatiques au niveau des exons V(D)J réarrangés.**

L'introduction des mutations débute environ à 150 pb en 3' du promoteur de l'exon V(D)J réarrangé et s'étend sur environ 1,5 Kb. La fréquence des mutations, d'une moyenne de  $10^{-3}$  par pb, décroît avec l'éloignement du site d'initiation.

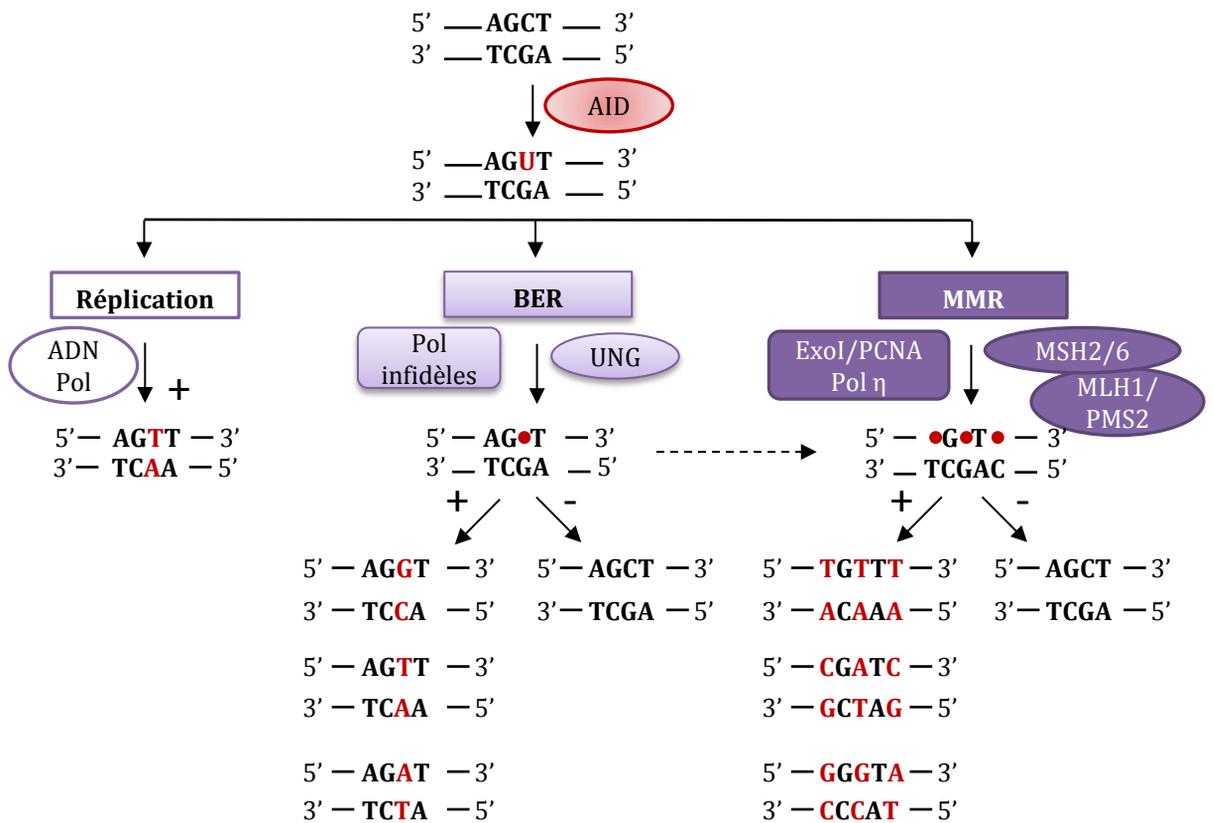
Les étoiles rouges symbolisent les SHM et la parabole rouge représente le spectre de ces mutations.

(McBride *et al.*, 2006). Il ressort également des études portant sur l'activité de mutants d'AID que l'intégrité de sa séquence N-terminale est indispensable au phénomène de SHM, tandis que son extrémité C-terminale serait importante pour la CSR (Barreto *et al.*, 2003; Ta *et al.*, 2003; Shinkura *et al.*, 2004). Jusque-là considérée comme une enzyme B spécifique, des études récentes s'intéressent au potentiel rôle d'AID au-delà de la lignée lymphocytaire B. Cependant, ces études restent sujettes à controverse puisque certaines démontrent un rôle d'AID dans la déméthylation de l'ADN de tissus pluripotents (Kumar *et al.*, 2013) alors que d'autres confirment que le seul rôle d'AID réside dans la diversification des anticorps (Fritz *et al.*, 2013).

D'un point de vue mécanistique, la SHM et la CSR se déroulent en deux étapes : (1) la déamination de l'ADN après recrutement d'AID respectivement aux régions V et C; (2) la prise en charge des lésions occasionnées par AID. Ainsi, AID initie les mécanismes de diversification secondaire en déaminant une cytosine (dC) en uracile (dU), préférentiellement lorsque les dC sont situées dans des points chauds (appelés *hotspot*) ayant pour séquences le motif WRCY (W = *weak* = dA/dT, R = purine = dA/dG, et Y = pyrimidine = dC/dT) (Betz *et al.*, 1993 ; Pham *et al.*, 2003). Le mésappariement dU:dG (guanine) qui en résulte peut être pris en charge par différentes voies de réparation de l'ADN pour produire des mutations (*i.e.* SHM) ou des DSB (*i.e.* CSR). Cette différence fondamentale entre SHM et CSR pourrait notamment être imputée à la fréquence des *hotspots*, présents en plus grande quantité dans les régions S qu'au niveau de la partie variable des Ig (pour revues : Di Noia and Neuberger, 2007 ; Alt *et al.*, 2013).

#### 3.2.4.2. La maturation d'affinité ou SHM

La SHM consiste en l'introduction de mutations ponctuelles au niveau de l'exon V(D)J réarrangé et de l'intron en aval (pour revue : Odegard and Schatz, 2006 ; Di Noia and Neuberger, 2007). Quel que soit le locus d'Ig ciblé, la fréquence moyenne de ces mutations est de  $10^{-3}$  par pb avec un profil s'étendant de 150 pb à 1,5 kb en aval du promoteur de l'exon V(D)J (Rada and Milstein, 2001) (**Figure 16**). Les mutations obtenues peuvent être de deux types : transitions (changement d'une base pyrimidine par une autre pyrimidine ou d'une purine par une autre purine, soit dC/dT ou dA/dG respectivement) et transversions (changement d'une base pyrimidine par une purine ou



**Figure 17 : Voies de réparation de l'ADN impliquées dans l'hypermutation somatique**

Le mésappariement dU/dG provoqué par AID peut être pris en charge par trois voies de réparation différentes. A gauche, la voie de réplication considère le dU comme un dT, générant alors une transition dC/dT et donc dG/dA sur le brin opposé.

Au milieu, UNG crée un site abasique, pris en charge par la voie du BER (Base Excision Repair). Des polymérases infidèles translésionnelles insèrent aléatoirement une des quatre bases à la place du dU, conduisant alors à des mutations de type transitions ou transversions aux anciennes bases dC:dG.

A droite, la voie du MMR (*Mismatch Repair*) permet l'élimination de l'uracile, créant une cassure simple brin. EXOI va également éliminer les nucléotides voisins de la cassure. Des polymérases infidèles conduisent à des mutations de type transitions ou transversions aux anciennes bases dA:dT.

ADN pol: ADN polymérase; UNG : Uracil-DNAGlycosylase; EXO1: exonucléase 1 ; MLH1: MutL homologue 1; PMS2 : PostMeiotic Segregation 2; PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; + : réparation provoquant des mutations; - : réparation n'engendrant aucune mutation. (D'après Peled et al., 2008)

fait que le mésappariement généré par AID peut être pris en charge par trois voies différentes (pour revue : Peled *et al.*, 2008) (**Figure 17**).

Dans le cas où l'ADN contenant le mésappariement est simplement répliqué, l'ADN polymérase considère le dU comme un dT, générant alors une transition dC/dT et donc dG/dA sur le brin opposé.

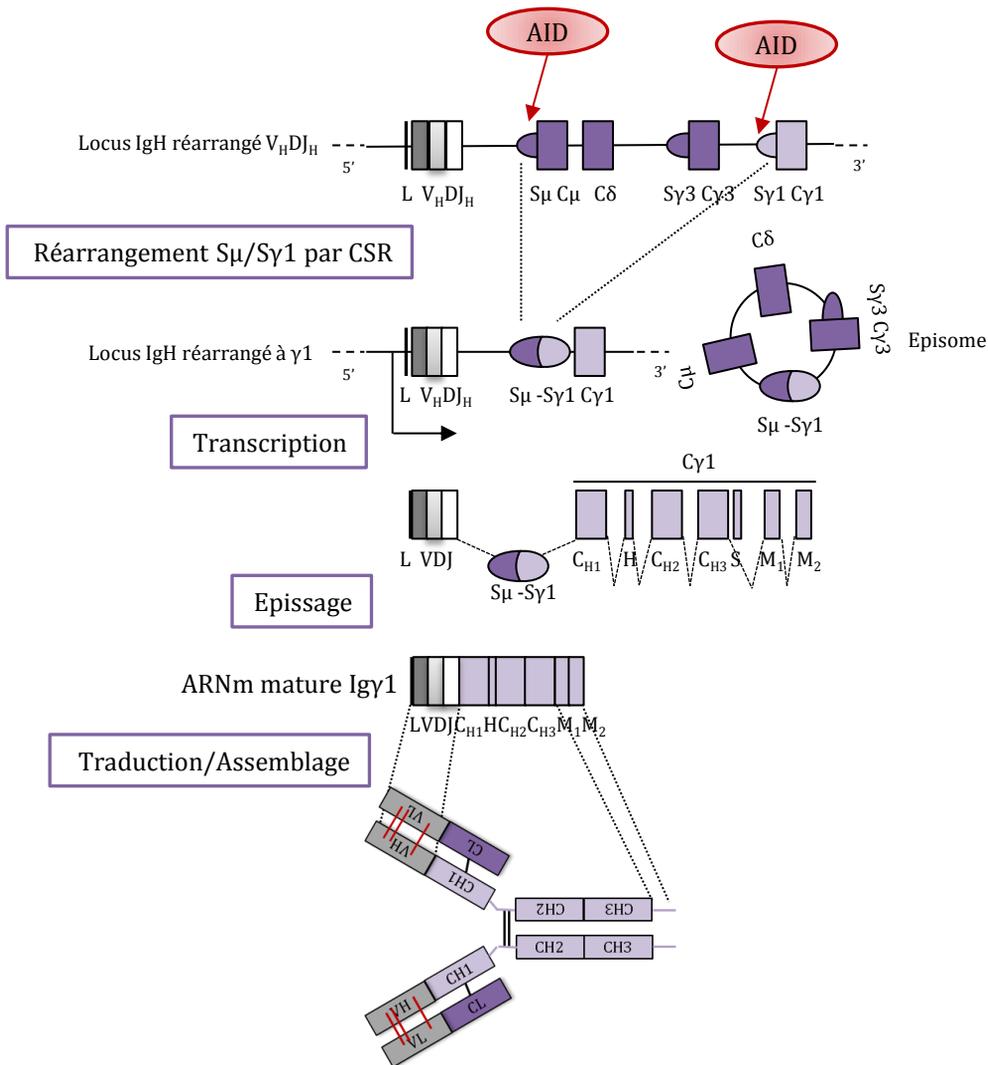
Dans un deuxième cas, l'ADN contenant le mésappariement est reconnu par UNG (*Uracil DNA-Glycosylase*). L'excision du dU par UNG conduit à l'apparition d'un site abasique, pris en charge par la voie du BER (*Base Excision Repair*). Des polymérases infidèles translésionnelles (REV1, Pol $\beta$ , Pol $\eta$  (*eta*), ...) insèrent aléatoirement une des quatre bases à la place du dU, conduisant alors à des mutations de type transitions ou transversions aux anciennes bases dC:dG (Rada *et al.*, 2002b ; Pérez-Durán *et al.*, 2012).

Enfin, le mésappariement peut également être reconnu par l'hétérodimère MSH2/MSH6 (*MutS Homolog*) appartenant à la voie du MMR (*MisMatch Repair*) (Rada *et al.*, 1998). Ce complexe recrute ensuite les protéines MLH1 (*MutL homologue 1*) et PMS2 (*PostMeiotic Segregation 2*), qui vont former un hétérodimère et permettre l'élimination de l'uracile, créant une cassure simple brin. L'hétérotétramère ainsi formé recrute l'exonucléase EXOI qui va également éliminer les nucléotides voisins de la cassure. Le facteur PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) interagit alors avec des polymérases infidèles, notamment Pol $\eta$ , conduisant à des mutations de type transitions ou transversions aux anciennes bases dA:dT (Delbos *et al.*, 2007).

### 3.2.4.3. La recombinaison de classe ou CSR

La CSR permet à la cellule B d'exprimer à sa surface un BCR d'un autre isotype qu'IgM. Cette nouvelle Ig diffère uniquement par la partie constante de sa chaîne lourde. La région variable ne subissant aucune modification, l'affinité pour l'Ag est conservée (pour revues : Chaudhuri and Alt, 2004 ; Chaudhuri *et al.*, 2007).

Ce mécanisme se produit entre deux régions *switch* (S), localisées en amont de chaque gène constant excepté C $\delta$ . Ces motifs correspondent à des séquences répétées, riche en dG/dC et dont la taille varie entre 1 kb et 12 kb (la plus longue étant Sy1). Plusieurs modèles de délétion, inversion ou remplacement de différentes régions S ont



**Figure 18 : Représentation de la commutation de classe: exemple de la CSR vers IgG1.**

La première ligne correspond au locus IgH avec un exon VDJ réarrangé. L'ellipse précédant chaque région constante excepté  $C_\delta$  correspond à la région S associée.

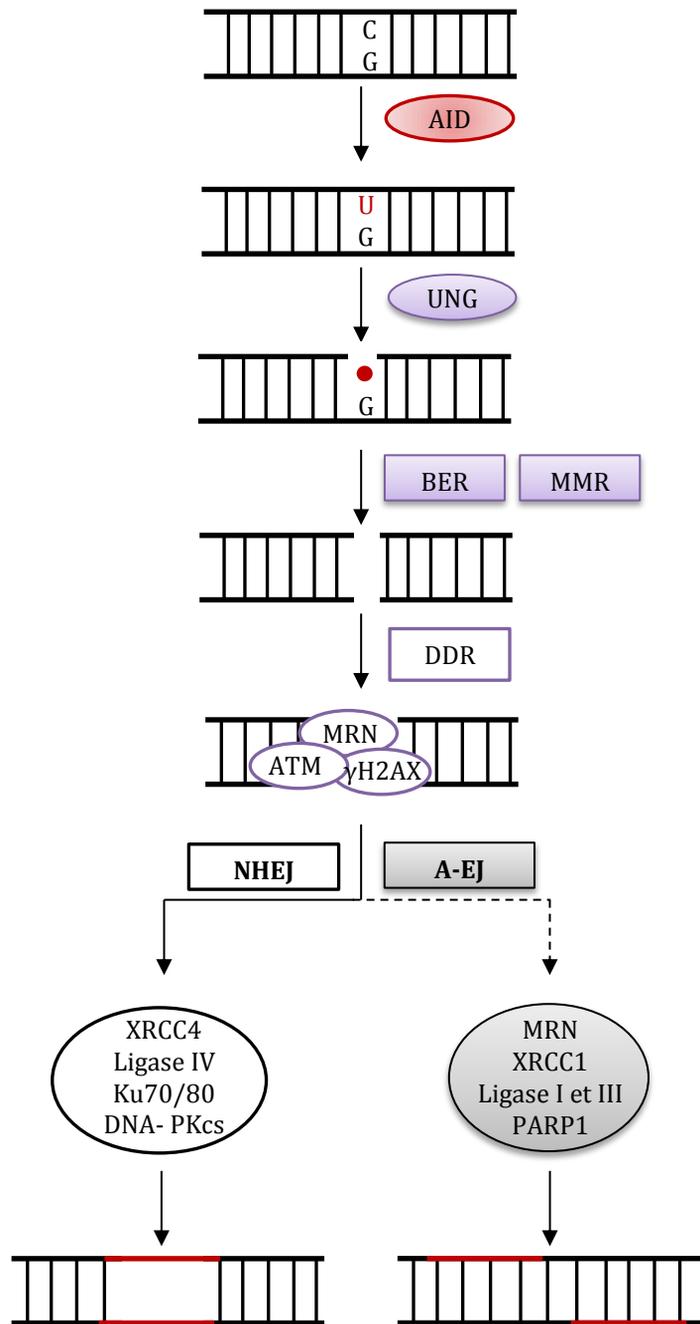
La deuxième ligne représente le locus IgH réarrangé à  $\gamma_1$  après CSR: après stimulation de la cellule B, AID cible les régions  $S_\mu$  (donneuse) et  $S\gamma_1$  (acceptrice) et conduit à l'excision de l'ADN situé entre ces deux régions. Celui-ci se circularise pour former un épisode alors que le locus IgH lie ses deux régions S, modifiant la classe isotypique.

La troisième ligne représente l'ARNm obtenu après transcription et épissage de l'exon VDJ réarrangé sur le premier exon constant  $C\gamma_1$ .

La dernière ligne schématise l'IgG1 synthétisée après CSR.

permis de mieux les caractériser. Ces études ont démontré que les régions S, de par leur orientation, leur longueur et leur caractère répétitif, contribuent à l'efficacité de la CSR, sans pour autant être indispensables à ce mécanisme (Luby *et al.*, 2001 ; Khamlichi *et al.*, 2004, Shinkura *et al.*, 2003 ; Zarrin *et al.*, 2005, 2008). La recombinaison s'effectue entre une région S donneuse ( $S_{\mu}$ ) et une région S acceptrice, variant suivant l'environnement cytokinique. Comme pour les recombinaisons V(D)J, l'ADN situé entre ces deux régions S est excisé et circularisé (*i.e.* épisomes) alors que les régions codantes sont liées entre elles afin de juxtaposer un nouvel exon  $C_H$  au segment VDJ réarrangé. La transcription et l'épissage de cette chaîne conduit à l'expression d'un nouvel isotype (**Figure 18**).

D'un point de vue moléculaire, le mésappariement dU:dG généré par AID dans les régions S est excisé par UNG qui crée un site abasique (Schrader *et al.*, 2005). Ce dernier est pris en charge par la voie du BER, et plus précisément par les endonucléases AP (*APurinic/APyrimidic*) qui incisent certains sites abasiques. Cela produit des cassures simple brin (SSB pour *Single Strand Break*) qui peuvent spontanément devenir un DSB si elles sont proches sur les deux brins d'ADN (Guikema *et al.*, 2007). De façon minoritaire et parallèlement à la SHM, lorsque les SSB sont trop éloignés, la voie du MMR intervient pour générer un DSB (Ehrenstein and Neuberger, 1999 ; Stavnezer and Schrader, 2006). La cassure est alors reconnue et prise en charge par la voie du DDR. Ainsi, le complexe MRN (*Mre11 Rad50 Nbs1*) reconnaît les DSB et active ATM qui phosphoryle l'histone H2AX (Petersen *et al.*, 2001 ; Dinkelmann *et al.*, 2009). L'histone  $\gamma$ H2AX résultant forme des foyers de réparation qui vont stabiliser les DSB et recruter les molécules de la voie de réparation classique du NHEJ (*cf* Chapitre 1, 2.2.2 Les réarrangements VDJ au locus IgH ; pour revue : Dudley *et al.*, 2005 ; Boboila *et al.*, 2012). Cependant, des souris déficientes pour Ku70, Ku80 ou Ku70 et LigIV peuvent effectuer la CSR à des taux pouvant aller jusqu'à 50% comparé à des animaux sauvages (Boboila *et al.*, 2010). Cela suggère qu'il existe une voie alternative (A-EJ pour *Alternative End Joining*) capable de suppléer la voie du c-NHEJ (Yan *et al.*, 2007). Cette voie utilise des microhomologies de séquences entre les régions S à recombinaison. A l'heure actuelle, les facteurs impliqués dans l'A-EJ sont encore mal connus. Il semblerait que le complexe MRN, PARP-1 (*poly ADP-ribose polymerase I*), XRCC1 ainsi que les ligases I et III interviennent dans cette voie alternative (Audebert *et al.*, 2004 ; Robert *et al.*, 2009 ; Saribasak *et al.*, 2011) (**Figure 19**).



**Figure 19 : Voies de réparation de l'ADN impliquées dans la commutation de classe.**

Le mésappariement généré par AID est excisé par UNG puis les voies du BER et plus rarement du MMR prennent en charge le site abasique pour générer des cassures doubles brins. La voie du DDR prend en charge les cassures : MRN active ATM qui reconnaît les cassures et s'y fixe. Il phosphoryle l'histone H2AX pour stabiliser les extrémités d'ADN et permettre le recrutement du NHEJ ou de l'A-EJ.

NHEJ : l'hétérodimère KU70/KU80 interagit avec les extrémités de l'ADN endommagé et favorise le recrutement de DNA/PKcs . La ligation est réalisée par le complexe ligase IV , XRCC4.

A-EJ : PARP-1 s'associe aux extrémités double brin de l'ADN. XRCCI et la ligase III réalisent la jonction. Le complexe MRN semble favoriser la voie alternative.

L'analyse de la jonction S $\mu$ -Sx générée permet de définir la voie de réparation impliquée (pour revue : Stavnezer *et al.*, 2010). Ainsi, la liaison franche des deux régions S (*i.e.* jonction directe) ou la présence de quelques bases (< 5pb) homologues aux deux régions S (*i.e.* jonction par micro-homologie) reflètent l'activité du NHEJ. A l'inverse, la présence de plusieurs bases homologues aux deux régions S (>5 pb) traduit l'activité de l'A-EJ. De manière occasionnelle, de longues insertions, clairement homologues à une des autres régions S, peuvent être présentes au niveau de la jonction. Cela correspond à des CSR intra-chromosomiques de type S $\mu$ -Sx-Sx2. Des mutations, conséquences directes des mécanismes de réparation, sont également présentes à proximité de la jonction. A l'inverse, des mutations éloignées de la jonction sont interprétées comme un stigmate du ciblage d'AID au niveau de ces régions.

Les dernières étapes de la lymphopoïèse B vont conduire à la génération de plasmocytes et de cellules B mémoires. Les cytokines sécrétées dans le GC seraient à l'origine du choix entre un destin plasmocytaire ou mémoire (pour revue : Shlomchik and Weisel, 2012). Cependant, n'ayant pas travaillé sur ces populations au cours de ma thèse, je ne décrirai que succinctement leurs phénotypes et leur rôles.

### **3.3. Le stade plasmocytaire et la sécrétion d'Ig**

#### **3.3.1. Le stade plasmocytaire**

Le but ultime du LB est de produire des anticorps, protéines effectrices de l'immunité humorale. Pour cela, il doit se différencier en « usine à produire des Ig » : le plasmocyte. Cette population peut être divisée en deux catégories : les plasmocytes à courte durée de vie sécrétant des IgM et issus de la différenciation des B MZ et ceux étant passés par le GC, dits à longue durée de vie, qui vont migrer dans la moelle osseuse et assurer la sécrétion d'Ig à long terme (pour revue : Calame, 2001). Encore une fois, la force du signal transmis par le BCR semblerait jouer un rôle dans cette différenciation terminale. En effet, la diminution de l'intensité du signal BCR dans les cellules B, par substitution du promoteur ou par inhibition chimique, permettrait d'augmenter leur différenciation plasmocytaire (Lechouane *et al.*, 2013).



A ce stade, les cellules présentent le marqueur CD138 (*syndecan 1*) mais n'expriment plus les marqueurs de la lignée B (B220, CD19) (Smith *et al.*, 1996). Cela est dû au facteur de transcription Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein*) qui réprime le programme transcriptionnel B, notamment en agissant sur Pax5 (Lin *et al.*, 2002). Ces cellules ont une morphologie ovale et une grande taille. En cela, le facteur XBP1 (*X-box binding protein 1*) joue un rôle important dans la différenciation plasmocytaire puisqu'il promeut l'expansion du réticulum endoplasmique, indispensable à la forte production d'Ig dans ces cellules (Shaffer *et al.*, 2004).

### 3.3.2. La sécrétion d'Ig

Comme pour la production d'une IgD, la sécrétion des Ig se fait par un épissage alternatif du transcrit de chaîne lourde. Le transcrit codant la forme membranaire est obtenu par utilisation d'un site donneur d'épissage interne au dernier exon constant C<sub>H</sub> qui va s'épisser sur le premier des deux exons de membrane. Ce transcrit se termine suite à la rencontre d'un site de polyadénylation situé en aval des exons membranaires. A l'inverse, le transcrit codant la forme sécrétée n'utilise pas ce site d'épissage et intègre donc la totalité du dernier exon C<sub>H</sub>. Sa terminaison a lieu au sein de l'intron entre le dernier exon C<sub>H</sub> et le premier exon de membrane car il contient aussi un site de polyadénylation (Lefranc *et al.*, 2005).

## 3.4. Le stade B mémoire et la réponse secondaire

### 3.4.1. Le stade B mémoire

Les cellules B mémoires, définies comme des LB quiescents ayant déjà rencontrés l'Ag, peuvent être générées en réponse à des Ag T-dépendants et T-indépendants. En fonction de leur origine, il existe plusieurs sous-populations de B mémoires phénotypiquement différentes. La voie canonique à l'origine des B mémoires résulte d'une réponse T-dépendante et correspond donc à des LB passés par le GC. Ainsi, ils sont hypermutés dans leur région variable, expriment une Ig de surface issues de CSR (le plus souvent IgG) et dont la signalisation intracellulaire permet leur survie, et présentent les marqueurs B220 et CD38. A l'inverse, les B mémoires issus d'une réponse T-



indépendante proviendraient des cellules B1b et présentent de forts taux d'IgM et de CD19 mais une faible expression de B220 et d'IgD (pour revues : Tarlinton, 2006 ; Good-Jacobson and Tarlinton, 2012).

### **3.4.2. La réponse secondaire**

Les cellules B mémoires sont générées lors d'une réponse immunitaire primaire (*i.e.* 1ère rencontre avec l'Ag) et vont jouer un rôle important lors de la réponse secondaire (*i.e.* 2ème rencontre avec le même Ag). En effet, les LB mémoires ont un faible seuil de réponse à une stimulation antigénique et peuvent entrer en cycle rapidement. Ainsi, suite à une nouvelle rencontre avec l'Ag, les cellules B mémoires vont se différencier en plasmocytes ou entrer à nouveau dans les GC où elles subiront des remaniements géniques secondaires pour améliorer leur affinité antigénique. Ces cellules permettent ainsi une réponse plus rapide et plus spécifique lors d'une nouvelle rencontre avec l'Ag (Dogan *et al.*, 2009).



## Chapitre 2 – La régulation des événements géniques au locus IgH

Le contrôle *via* l'accessibilité transcriptionnelle et les éléments *cis*-régulateurs...

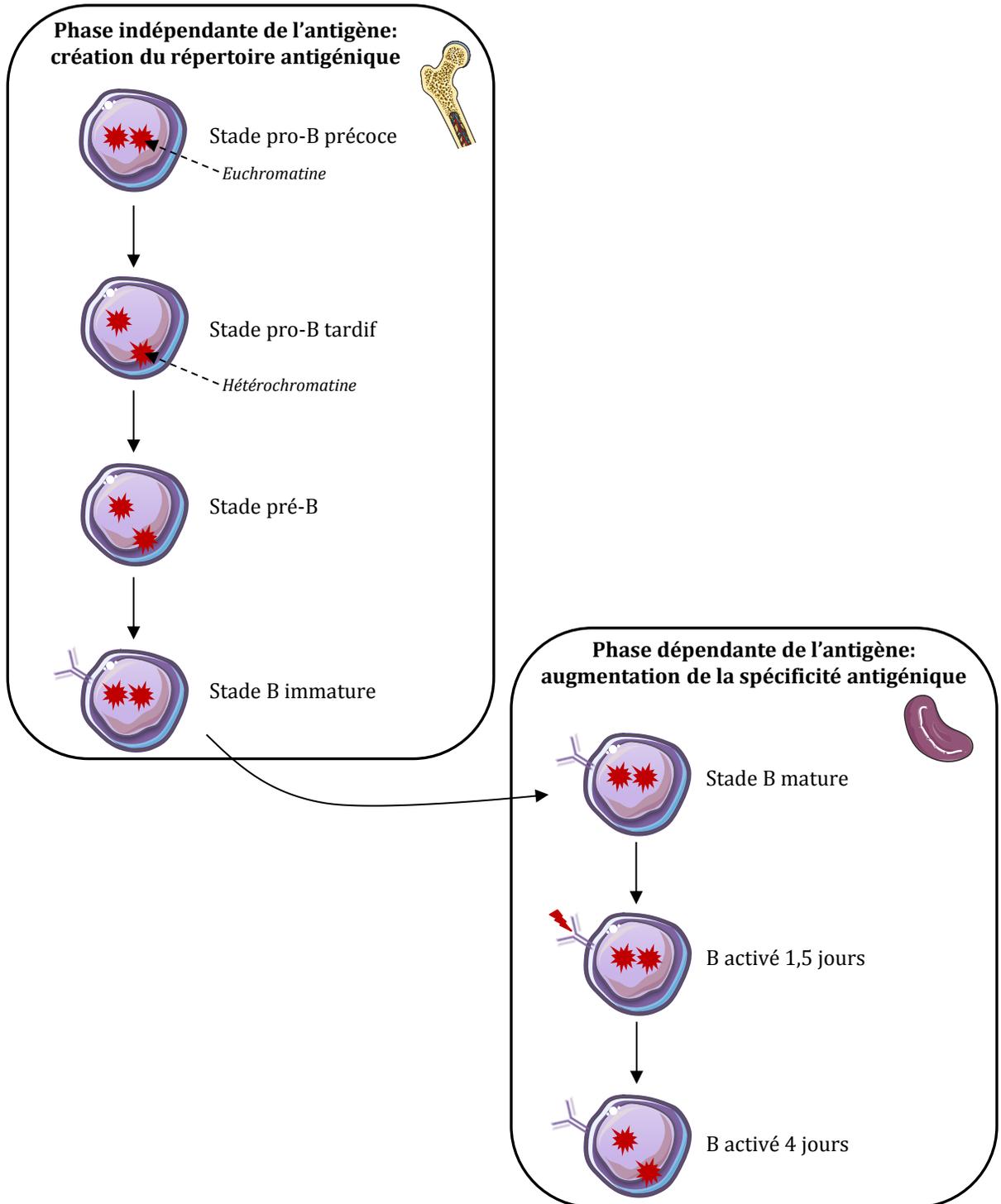
Afin d'assurer une expression ordonnée des gènes du locus IgH, les événements géniques suscités sont finement régulés au cours du développement B. Les éléments assurant cette régulation sont localisés dans des régions dites régulatrices, elles-mêmes situées à l'intérieur, en 5' ou en 3' du locus. Le maintien de réarrangements lignage-spécifique et stades-spécifiques est également expliqué par la théorie de l'accessibilité. (pour revue : Perlot and Alt, 2008).

Lors de ma thèse, j'ai uniquement travaillé sur la région régulatrice la plus en 3' du locus: la 3'RR (*3' Regulatory Region*). C'est pourquoi ce chapitre traitera succinctement de l'accessibilité du locus puis des différents éléments *cis*-régulateurs présents de 5' en 3' du locus avant de détailler plus précisément les connaissances actuelles sur la 3'RR.

### 1. ACCESSIBILITE DU LOCUS

Comme décrits dans le chapitre 1, les réarrangements V(D)J se produisent uniquement dans les LB, alors que les enzymes Rag sont exprimées dans les CLP, les LT et LB immatures. Afin d'expliquer la spécificité cellulaire et la régulation spatio-temporelle des réarrangements géniques aux loci d'Ig, Alt et Yancopoulos ont proposé le modèle de l'accessibilité. La découverte, au stade pro-B, de transcrits non codants dans les segments  $V_H$  non réarrangés (*i.e.* transcrits germinaux) est à l'origine de cette théorie. Ces transcrits créeraient, à un moment donné, une « fenêtre d'accessibilité » aux régions du locus devant être réarrangées (Yancopoulos and Alt, 1985).

Par la suite, de nombreuses études ont corroboré cette théorie en démontrant que de nombreux mécanismes épigénétiques gouvernent l'accessibilité des gènes d'Ig : la relocalisation nucléaire, le remodelage chromatinien, le changement de configuration tridimensionnelle du locus et la transcription non-codante (pour revue : Jaeger *et al.*, 2013).



**Figure 20 : Représentation simplifiée de la localisation nucléaire des allèles IgH au cours de l'ontogénie B.**

Les allèles IgH sont représentés par les étoiles rouges. Leur localisation nucléaire est corrélée à l'état de réarrangement des gènes du locus IgH: au stade pro-B précoce, les réarrangements  $D-J_H$  sont bialléliques donc les allèles sont positionnés dans l'euchromatine, au niveau central; au stade pro-B tardif, le phénomène d'exclusion allélique n'autorise les réarrangements  $V_H-DJ_H$  que sur un seul allèle, l'autre migrant dans l'hétérochromatine; les deux allèles sont à nouveau positionnés dans l'euchromatine du stade B immature jusqu'à 1,5 jours après activation.

## 1.1. Le positionnement nucléaire et l'organisation spatiale des loci

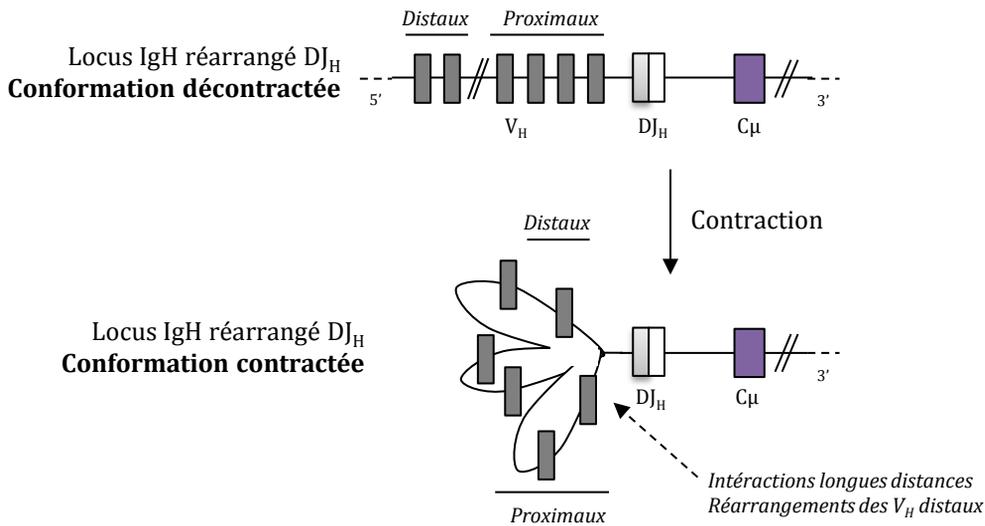
### 1.1.1. La localisation nucléaire des allèles

Le noyau des cellules eucaryotes contient des régions transcriptionnellement actives et inactives. Par conséquent le positionnement nucléaire d'un gène peut influencer son expression : la localisation au niveau de l'euchromatine, située au centre du noyau, est corrélée à une forte expression génique, tandis que le positionnement des gènes dans les régions hétérochromatiniennes, situées en périphérie et au niveau péricentromérique, contribue à leur « *silencing* » (pour revue : Kosak and Groudine, 2004).

Des expériences de fluorescence par hybridation *in situ* (FISH pour *Fluorescent In Situ Hybridization*) ont montré qu'avant de subir des réarrangements, le locus IgH se déplace de sa position initiale à la périphérie nucléaire, vers un compartiment plus central (Kosak *et al.*, 2002 ; Fuxa *et al.*, 2004). Ces observations sont corrélées au fait que la périphérie nucléaire a un effet répressif sur la transcription, rendant le locus IgH inaccessible aux facteurs de recombinaison (Reddy *et al.*, 2008) (**Figure 20**).

Ainsi, au stade pro-B, les deux allèles sont situés dans un compartiment central, autorisant les réarrangements D-J<sub>H</sub> de manière bi-allélique. Les segments V<sub>H</sub> distaux restent liés à la périphérie alors que les segments les plus proximaux sont dirigés vers le centre du noyau. Cette orientation facilite les réarrangements des segments proximaux (*i.e.* D-J<sub>H</sub>) puisqu'ils sont dans une région favorisant l'accès aux recombinases. Par la suite, les allèles sont situés de façon asymétrique, avec l'allèle subissant les réarrangements V-DJ<sub>H</sub> dans un compartiment central et l'autre allèle en périphérie. Cette localisation, maintenue lors des réarrangements de chaînes légères, est corrélée au phénomène d'exclusion allélique. Au stade B immature, les deux allèles sont à nouveau positionnés de manière équivalente, au niveau central (Skok *et al.*, 2001).

Au sein des cellules B matures, les deux allèles doivent de nouveau être accessibles aux réarrangements secondaires. En effet, les processus de SHM et CSR sont bi-alléliques. Ainsi, des études *in vitro* ont démontré que les deux allèles IgH sont maintenus dans l'euchromatine au moins 1,5 jours après activation du LB. En revanche, après 4 jours de stimulation un des allèles est recruté au niveau de l'hétérochromatine (Skok *et al.*, 2001).



**Figure 21 : Représentation schématique de la contraction du locus IgH lors des réarrangements V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub>.**

Après les réarrangements D-J<sub>H</sub> le locus IgH est décontracté. Lors des réarrangements V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub> il se contracte à nouveau pour permettre les interactions longues distances avec les segments V<sub>H</sub> distaux. Cette contraction conduit à une modification de la structure tridimensionnelle du locus et à l'apparition de boucles d'ADN rapprochant physiquement les segments devant être réarrangés et éloignant les autres.

(D'après Medvedovic et al., 2011)

### 1.1.2. La structure tridimensionnelle du locus

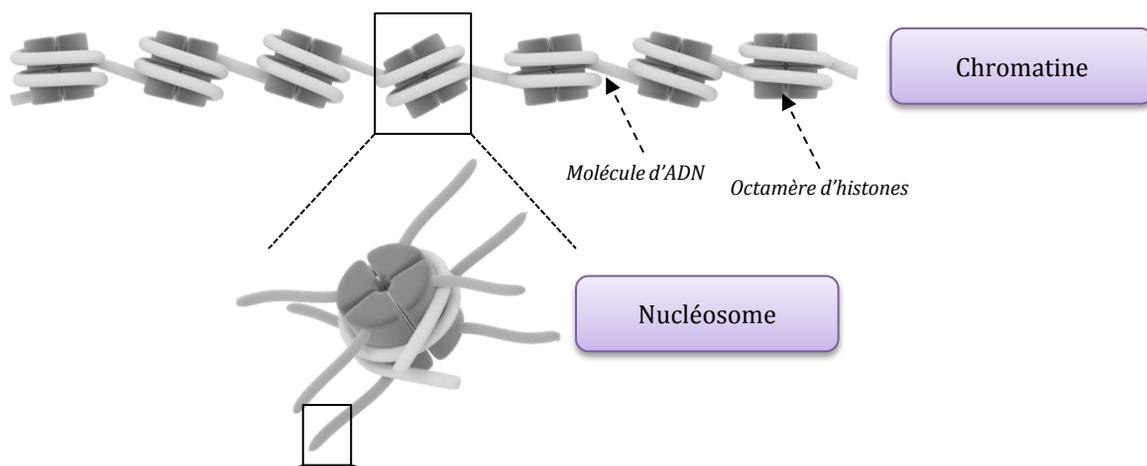
A cette modification de localisation des loci d'Ig, s'ajoute une modification de la structure tridimensionnelle du locus (Fuxa *et al.*, 2004 ; Roldán *et al.*, 2005). En effet, de nombreuses études des noyaux en interphase par FISH et des interactions entre régions d'ADN par 3C (*Chromosome Conformation Capture*) ont mis en évidence des modifications de topologie du locus IgH au cours de l'ontogénie B. Lorsque le locus se « contracte », les régions d'ADN à recombinaison se retrouvent dans une même boucle où elles sont physiquement plus proches. A l'inverse, les régions qui ne doivent pas être réarrangées se trouvent dans des boucles différentes, physiquement éloignées des précédentes (Guo *et al.*, 2011b). Ce mécanisme favorise les interactions longues distances et donc les réarrangements géniques entre des régions très éloignées (**Figure 21**).

Ainsi, dans les progéniteurs lymphoïdes, les deux allèles du locus IgH sont dans une conformation basale dite « décontractée ». Lors des réarrangements D-J<sub>H</sub>, le locus se contracte et forme des boucles au niveau des segments proximaux. Lors des réarrangements V<sub>H</sub>-D<sub>JH</sub> le locus se contracte à nouveau, juxtaposant l'ensemble des segments V<sub>H</sub> au segment D<sub>JH</sub> et favorisant ainsi les interactions longue distance (Jhunjhunwala *et al.*, 2008 ; Medvedovic *et al.*, 2013). La signalisation par le pré-BCR permet de revenir à un état décontracté. Cela empêche de futurs réarrangements et participe donc à l'exclusion allélique (Roldán *et al.*, 2005). Suite à une stimulation cytokinique, le locus se contracte à nouveau permettant ainsi le rapprochement entre S<sub>μ</sub> et la région S acceptrice concernée (Wuerffel *et al.*, 2007).

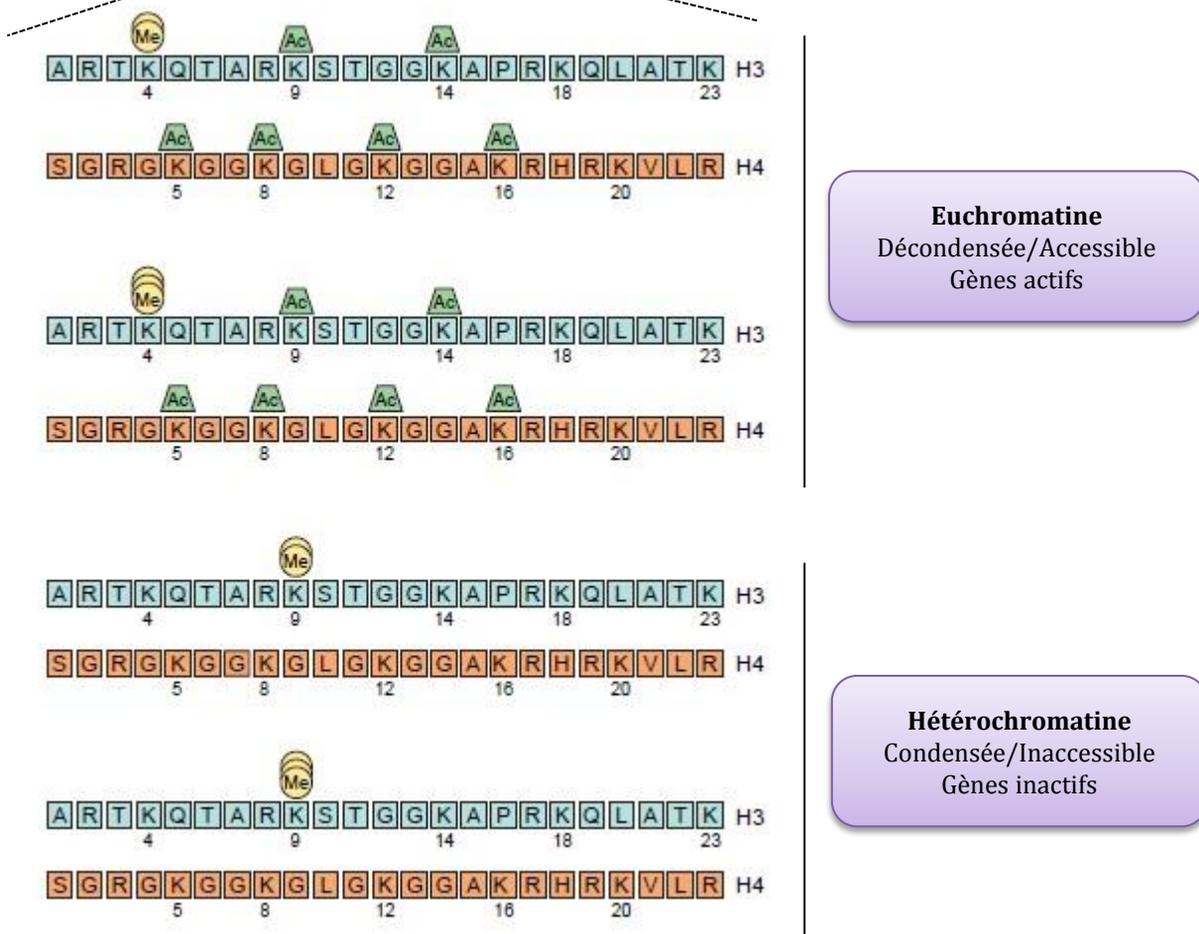
## 1.2. Les modifications de la chromatine et le recrutement des recombinaisons

L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome. Il se compose d'environ 165 pb d'ADN enroulés autour d'un octamère protéique, lui-même composé de deux copies de chaque histone : H2A, H2B, H3 et H4. Les extrémités amino-terminales des histones émergent du nucléosome, les rendant accessibles à des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation ou la phosphorylation. On parle alors de « code des histones » (pour revue : Felsenfeld and Groudine, 2003) (**Figure 22A**).

A



B



**Figure 22 : Le code des histones.**

A: L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il correspond à deux enroulements d'ADN autour d'un octamère d'histone.

B: La partie N-terminale de l'histone H3 est représentée en bleu, celle de l'H4 en orange. Les acétylations sont représentées par des trapèzes verts et les différentes méthylation sont indiquées par des cercles jaunes. Seules les principales marques d'histones sont indiquées.

H3ac, H4ac, H3K4me2 et H3K4me3 définissent l'euchromatine, caractérisée comme ouverte, accessible et donc riche en gènes actifs.

H3K9me2, H3K9me3 et l'hypoacétylation des histones définissent l'hétérochromatine, caractérisée comme fermée, inaccessible et donc riche en gènes inactifs.

(D'après Dunleavy et al., 2005)

### 1.2.1. Les différents états de la chromatine

Ces modifications d'histones constituent un niveau de régulation génique puisqu'elles sont à l'origine d'un remodelage chromatinien (*i.e.* modification de l'état de compaction de l'ADN). Ainsi, l'euchromatine, qui correspond à l'état le moins condensé, est dite ouverte et accessible aux protéines agissant sur l'ADN (*i.e.* polymérases, enzymes diverses et facteurs de transcription) : elle est donc riche en gènes transcriptionnellement actifs. Elle est caractérisée par l'acétylation des histones H3 et H4 (H3ac et H4ac) et par la di- ou tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2 et H3K4me3). A l'inverse, l'hétérochromatine qui correspond à l'état le plus condensé, est dite fermée et inaccessible : elle est donc riche en gènes non transcrits. Elle est caractérisée par une hypoacétylation, ainsi que par la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) et la tri-méthylation de la lysine 27 de cette même histone (H3K27me3) (pour revues : Jenuwein and Allis, 2001 ; Dunleavy *et al.*, 2005) (**Figure 22B**).

### 1.2.2. Les modifications de la chromatine au cours de la lymphopoïèse B

Les événements géniques se produisant au locus IgH sont corrélés à des changements dynamiques et ordonnés de la chromatine. Dans des cellules n'appartenant pas au lignage B, le locus IgH est inaccessible. Par défaut, il présente des marques hétérochromatiniennes typiques : hypoacétylation et H3K9me2. Ce statut répressif est levé progressivement au cours du développement B, permettant l'accessibilité progressive des différentes régions à recombinaison.

Ainsi, dans des précurseurs B non réarrangés, les segments D<sub>H</sub> localisés en 5' et en 3' (DFL16.1 et DQ52) et les segments J<sub>H</sub> présentent des marques caractéristiques d'une chromatine ouverte. Par contre, les segments DSP intermédiaires sont associés à des nucléosomes présentant des marques hétérochromatiniennes (Chakraborty *et al.*, 2007). En accord avec cette observation, il a été montré que les segments DFL16.1 et DQ52 sont préférentiellement utilisés lors des réarrangements (Tsukada *et al.*, 1990). Il a également été démontré que la protéine RAG2 possède un domaine PHD (*Plant Homeo Domain*) qui a la propriété de se fixer de manière spécifique sur les motifs H3K4me2/3, signes d'une chromatine accessible (Liu *et al.*, 2007b). Du fait de cette affinité, la

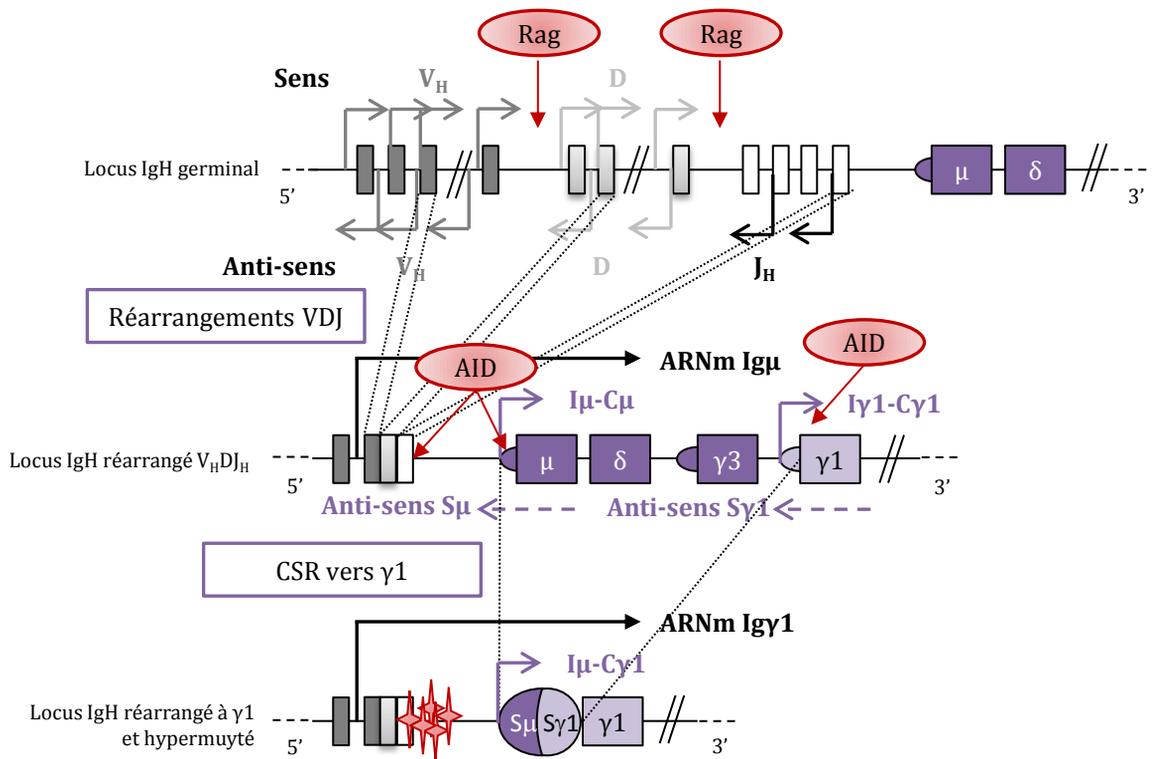


protéine Rag2 n'est pas spécifique des loci d'Ig. Cependant, la spécificité du complexe endonucléasique est obtenue grâce à Rag1, dont la fixation est restreinte aux seuls RSS destinées à recombiner (Ji *et al.*, 2010).

Une fois les recombinaisons DJ<sub>H</sub> effectuées, les segments V<sub>H</sub> proximaux acquièrent à leur tour un statut actif. Cependant, sous le contrôle de l'IL-7 et de Pax5, la régulation de la recombinaison est différente entre les segments V<sub>H</sub> proximaux et distaux. Alors que les segments distaux présentent les marques d'une chromatine active, la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) est une modification inhibitrice présente uniquement au niveau des V<sub>H</sub> proximaux. Cela permettraient une utilisation homogène de tous les segments V<sub>H</sub> (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 dans les segments V<sub>H</sub> deviennent hypoacétylées, rendant ainsi ces régions moins accessibles aux recombinaisons (Chowdhury and Sen, 2003).

Après stimulation cytokinique, seules les régions V et S respectivement visées par la SHM et la CSR présentent les marques H3K4me3 (*i.e.* caractéristiques de l'euchromatine) et H3K9me3 (*i.e.* caractéristiques de l'hétérochromatine) (Kuang *et al.*, 2009 ; Stanlie *et al.*, 2010). Ainsi, comme pour le recrutement de Rag2, celui d'AID est dépendant des marques chromatiniennes. En effet, Jeevan-Raj et collaborateurs ont mis en évidence l'importance de la marque H3K9me3 dans le recrutement d'AID au niveau de la région S<sub>μ</sub>. Cette marque, décrite comme répressive, permet en réalité le recrutement d'AID *via* une interaction avec les protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) et KAP1 (*KRAB domain Associated Protein 1*) (Jeevan-Raj *et al.*, 2011). De plus, une étude récente a démontré que Spt6 régule la marque de chromatine active H3K4me3, indispensable au recrutement d'AID (Begum *et al.*, 2012).



**Figure 23 : Localisation des différents transcrits se succédant au locus IgH au cours du développement B.**

Les transcrits sens sont indiqués par les flèches dirigées vers la droite alors que les anti-sens sont représentés par des flèches dirigées vers la gauche.

La première ligne correspond au locus IgH en configuration germinale. Les transcrits germinaux sens et anti-sens dans les régions V<sub>H</sub>, D et J<sub>H</sub> précèdent les réarrangements VDJ, rendant ces régions accessible aux recombineses Rag.

La deuxième ligne correspond au locus IgH réarrangé V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>. La cellule exprime un ARNm μ permettant le ciblage d'AID dans la région variable et donc les HMS. Les transcrits germinaux sens et anti-sens sont initiés dans les régions S<sub>μ</sub> et S acceptrices pour favoriser le ciblage d'AID et donc la cassure.

La troisième ligne correspond au locus IgH réarrangé à γ<sub>1</sub>. La cellule exprime un ARNm γ<sub>1</sub> permettant la synthèse d'une IgG1. La présence de transcrits hybrides Iμ-Cx est un stigmate du processus de CSR.

### 1.3. La transcription et le recrutement des recombinaisons

La transcription germinale correspond à la production de transcrits non codants dans les segments devant être réarrangés. La cinétique d'apparition de ces transcrits germinaux est corrélée à l'accessibilité aux recombinaisons des segments correspondants (Yancopoulos and Alt, 1985) (**Figure 23**). Les promoteurs à l'origine de la transcription au locus IgH (germinale ou non) seront présentés plus en détail dans la partie suivante (*cf* Chapitre 2, 2. Les éléments *cis*-régulateurs).

#### 1.3.1. Lors de la lymphopoïèse B précoce

D'une façon générale, les premiers transcrits non-codants détectés au locus IgH apparaissent avant les réarrangements D-J<sub>H</sub> et permettraient d'augmenter l'accessibilité de cette région au complexe Rag. Simultanément, l'apparition de transcrits anti-sens (orientation inversée par rapport aux gènes constants) est observée dans les régions D et J<sub>H</sub> (Bolland *et al.*, 2007; Chakraborty *et al.*, 2007; Perlot *et al.*, 2008). Suite aux recombinaisons D-J<sub>H</sub>, les segments réarrangés DJ<sub>H</sub> seraient également transcrits à partir d'un promoteur situé en 5' du segment D (Reth and Alt, 1984; Alessandrini and Desiderio, 1991).

Dans le même temps, des transcrits germinaux sens et anti-sens sont initiés dans la région V<sub>H</sub>. La fenêtre d'expression de ces transcrits étant précisément corrélée avec l'initiation des recombinaisons V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub>, cette transcription germinale est supposée ouvrir la chromatine au niveau de la région V<sub>H</sub>, favorisant ainsi les interactions à distance au sein du locus IgH et l'accessibilité des segments V<sub>H</sub> à la machinerie de recombinaison. Cette transcription germinale V<sub>H</sub> est inhibée suite à un réarrangement V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub> productif (pour revue: Stubbington and Corcoran, 2013).

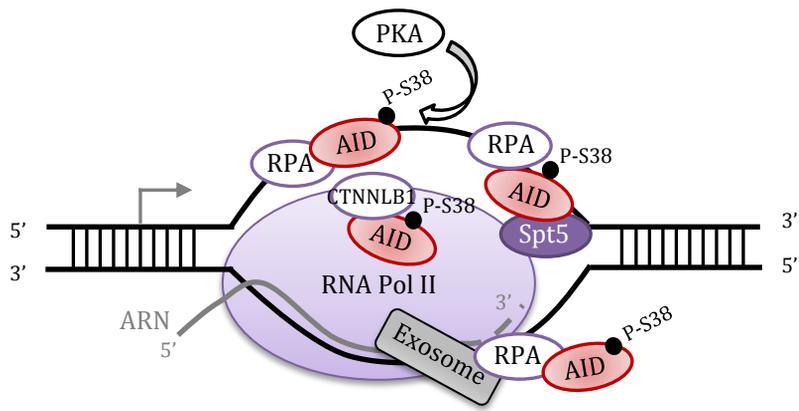
#### 1.3.2. Lors de la lymphopoïèse B tardive

Les mécanismes de diversification secondaire du répertoire sont également dépendants de la transcription. En effet, différentes études ont montré que le processus de SHM est couplé à la transcription des gènes d'Ig. Ainsi, lorsqu'un promoteur de région variable  $\kappa$  est dupliqué en amont de l'exon C $\kappa$ , seuls ce dernier et la région variable



(mais pas la région les séparant) deviennent hypermutés à la même fréquence. Ces résultats ont pour la première fois suggérés que le site d'initiation de la transcription marque la limite 5' des mutations (Peters and Storb, 1996). Ces observations ont été confirmées dans un transgène IgH où le déplacement du promoteur de 750 pb est associé à un changement correspondant du spectre de mutations (Tumas-Brundage and Manser, 1997). De façon intéressante, la fréquence des mutations est aussi corrélée à l'intensité de la transcription (Fukita *et al.*, 1998 ; Bachl *et al.*, 2001 ; Ramiro *et al.*, 2003). Dans ce sens, des travaux réalisés au laboratoire ont démontré que le blocage de la transcription d'un allèle réarrangé s'accompagne d'une chute dramatique du taux de SHM sur cet allèle (Delpy *et al.*, 2004). Il a également été démontré que les régions variables soumises à la SHM présentent de courtes séquences d'ADN sous forme de ssDNA sur les deux brins. La formation de ces structures, nécessaire à l'accessibilité d'AID, dépendrait de la transcription alors que leur stabilisation nécessiterait la présence de complexes protéiques liés à l'ADN (Ronai *et al.*, 2007).

Concernant la CSR, plusieurs études ont clairement démontré que la transcription des régions S est un prérequis obligatoire à ce phénomène (Stavnezer *et al.*, 1988 ; Lutzker and Alt, 1988). Etant donné la répétitivité des régions S et leur caractère riche en dG sur le brin non matrice (ou codant), leur transcription germinale conduirait à la génération de structures secondaires telles que les *R-loops* (*i.e.* hybrides ARN/ADN), les *G-quartets* (*i.e.* structures secondaires à quatre brins) ou les *stem loops* (*i.e.* structures en « épingle à cheveux ») (pour revue : Chaudhuri and Alt, 2004). Ces structures, dont seules les *R-loops* ont été détectées *in vivo* au niveau des régions S, constitueraient un meilleur substrat pour AID (Yu *et al.*, 2003). En effet, comme expliqué dans le chapitre précédent, AID n'exerce son activité enzymatique que sur les ssDNA générés au cours de la transcription des régions ciblées (Fukita *et al.*, 1998; Petersen-Mahrt *et al.*, 2002 ; Chaudhuri *et al.*, 2003). Notons que contrairement aux régions variables nécessitant des complexes protéiques liés à l'ADN pour stabiliser les ssDNA, les *R-loops* formées dans les régions S sont suffisantes pour maintenir l'ADN sous forme de ssDNA (Ronai *et al.*, 2007). Cette dichotomie en SHM et CSR repose sur la différence nucléotidique des régions cibles. Au-delà de la transcription germinale sens, Perlot et collaborateurs ont mis en évidence l'existence de transcrits anti-sens après induction de la CSR. Cette transcription est décelée au niveau de la région donneuse S<sub>μ</sub> ainsi que dans les régions



**Figure 24 : Modèle hypothétique du recrutement d'AID au niveau des "bulles de transcription".**

Dans les LB activés, PKA active AID par phosphorylation de sa serine 38 (P-S38). Cela facilite l'interaction avec CTNNLB1, une protéine interagissant avec le complexe de transcription, ainsi qu'avec RPA, une protéine liée aux ssDNA du brin codant. Par interaction avec la RNA Pol II en cours d'élongation, Spt5 permet également le recrutement d'AID sur les ssDNA exposés. Le complexe exosome est recruté à l'extrémité 3' de l'ARN naissant. De par son activité 3'-5' exonucléasique, il dégrade l'ARN, exposant ainsi des ssDNA auxquels RPA et AID peuvent à nouveau se fixer.

(D'après Pavri and Nussenzweig, 2011)

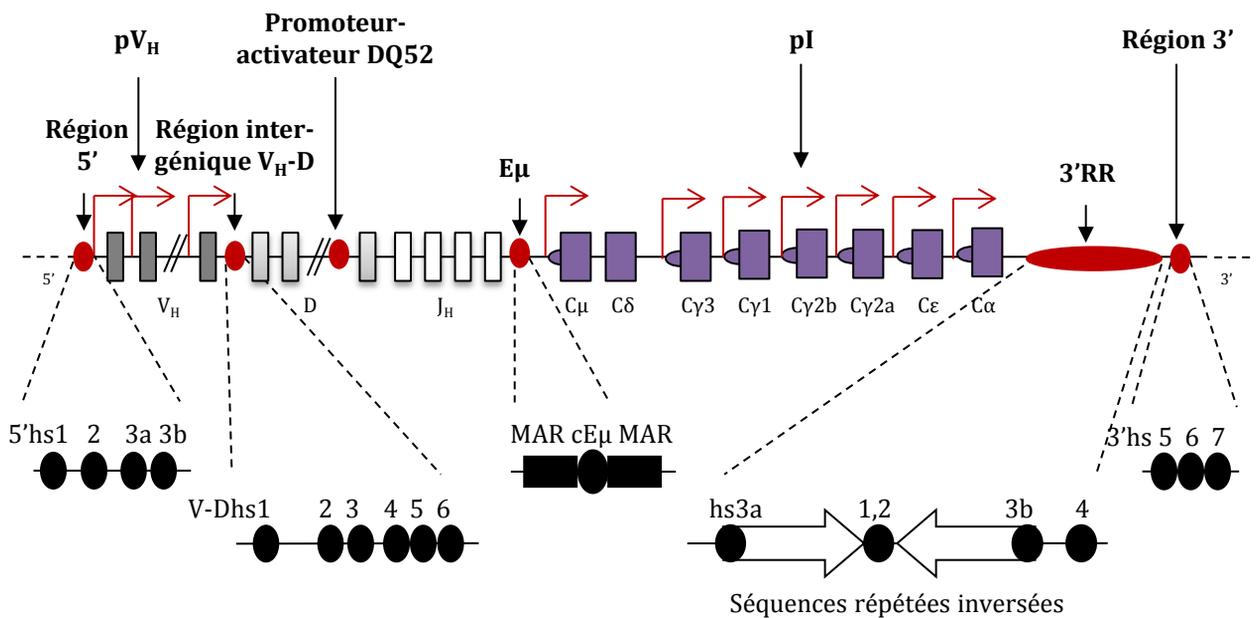
acceptrices Sy1 et Sy2b. Cependant, le rôle de cette transcription anti-sens, dont l'origine précise reste inconnue, est encore énigmatique (Perlot *et al.*, 2008).

D'un point de vue mécanistique, l'accessibilité et le recrutement d'AID sont complexes et séquentiels (pour revues : Maul and Gearhart, 2010 ; Pavri and Nussenzweig, 2011). AID est activée suite à la phosphorylation de sa Sérine 38 par la PKA (Basu *et al.*, 2005) et peut ensuite interagir avec deux cofacteurs clairement identifiés : CTNBL1 et RPA (*Replication Protein A*). AID se lierait alors à son cofacteur CTNBL1, protéine interagissant physiquement avec le complexe de transcription (Conticello *et al.*, 2008 ; Willmann *et al.*, 2012). Des études récentes ont également démontré qu'une fois activée, AID cible des régions où la RNA Pol II (*RNA polymerase II* pour ARN polymérase II) est en état de « pause » et donc en cours d'élongation (Kodgire *et al.*, 2013). Cela créerait une « bulle de transcription » dans laquelle l'ADN, exposé sous forme simple brin, est accessible à AID via Spt5 (*Suppressor of Ty5 homolog*) (Pavri *et al.*, 2010). Dans cette configuration, l'activité d'AID serait faible. La fixation de la protéine RPA aux ssDNA du brin codant permettrait de stabiliser et recruter d'avantage AID (Chaudhuri *et al.*, 2004). Une étude récente montre également que la fixation spécifique de RPA aux loci d'Ig est corrélée à la phosphorylation d'AID par PKA. RPA fonctionnerait alors comme un amplificateur de l'activité d'AID dans ces régions (Yamane *et al.*, 2011). Par ailleurs, des protéines adaptatrices de la famille 14-3-3, fixées sur les motifs « AGCT » présents dans les régions S, recrutent AID et PKA (Xu *et al.*, 2010).

AID cible à la fois le brin matrice et le brin non matrice des gènes transcrits *in vivo*. Pour autant, les données que nous venons d'exposer ne permettent pas d'expliquer comment AID accède au brin matrice. Une étude récente suggère que Spt5 permette également le recrutement de l'exosome (*i.e.* complexe macromoléculaire impliqué dans le traitement des ARN via son activité 3'-5' exonucléasique) à l'extrémité 3' des ARN naissants. Ce complexe dégraderait alors l'ARN naissant, exposant d'avantage le brin non codant sous forme de ssDNA. Cela permettrait à nouveau la fixation de RPA et le ciblage d'AID. Notons qu'au cours d'une élongation « normale », l'extrémité 3' de l'ARN naissant est hybridée avec l'ADN matrice et masquée par la RNA Pol II. Dans les régions ciblées par AID, le recrutement de l'exosome est possible car la RNA Pol II, qui est en état de « pause », est sujette à une « marche arrière », découvrant ainsi l'extrémité 3' de l'ARN naissant (Basu *et al.*, 2011) (**Figure 24**).



Au-delà de l'accessibilité de ses régions cibles suite à la transcription, le mécanisme permettant le ciblage d'AID précisément aux loci d'Ig reste encore à déterminer (pour revues : Odegard and Schatz, 2006 ; Maul and Gearhart, 2010). Il semblerait que les *enhancers* présentent des motifs capables de recruter AID aux loci d'Ig ; cependant, ceci reste une hypothèse et aucun *enhancer* n'a encore été démontré comme capable de recruter AID. En plus des gènes d'Ig, AID peut cibler par erreur des gènes non-Ig tout au long du génome (Liu *et al.*, 2008). Cela suggère que les *enhancers* des loci d'Ig ne sont pas seuls responsables du recrutement d'AID. Il semblerait alors qu'au moins en partie, l'organisation nucléaire soit impliquée dans ce ciblage (Wang *et al.*, 2009).

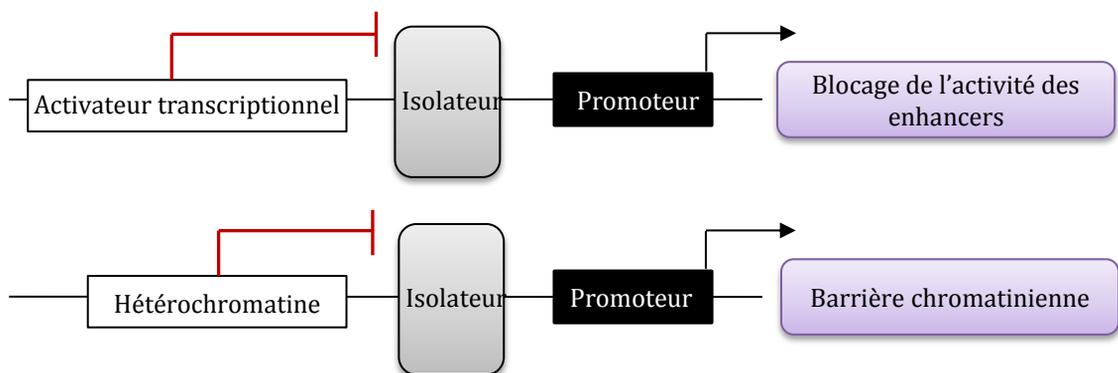


**Figure 25 : Localisation des différents éléments *cis*-régulateurs présents au locus IgH.**

La ligne du haut représente le locus IgH en configuration germinale. Les éléments *cis*-régulateurs sont représentés en rouge. Les régions composées de plusieurs domaines sont représentées par des ronds alors que les promoteurs sont représentés par des flèches.

La ligne inférieure correspond à un grossissement de chaque région régulatrice. Les ronds noirs représentent les sites hs, les carrés représentent les régions d'attachement à la matrice (MAR) et les flèches blanches représentent les séquences répétées inversées.

pVH : promoteur des régions variable; Eμ : *enhancer* intronique Eμ et les MAR associées; pI : promoteurs I; 3'RR : région régulatrice située en 3' du locus; hs : sites hypersensibles à la DNase I.



**Figure 26 : Représentation schématique des deux types d'isolateurs existant chez les vertébrés.**

La première ligne représente les isolateurs empêchant l'activité d'un *enhancer* et donc l'activation du promoteur en aval. La deuxième ligne représente les isolateurs servant de barrière pour empêcher la propagation de l'hétérochromatine.

## 2. ELEMENTS CIS-REGULATEURS

La régulation de l'expression des gènes d'Ig ainsi que le contrôle de l'accessibilité du locus font intervenir des séquences nucléotidiques *cis*-régulatrices et des protéines se fixant à ces séquences (*i.e.* éléments *trans* : facteurs de transcription...).

Plusieurs types d'éléments *cis*-régulateurs ont été identifiés au locus IgH: (1) des régions isolatrices situées à chaque extrémité du locus et entre les segments  $V_H$  et D ; (2) des promoteurs localisés en 5' des segments  $V_H$ , D et de certains segments  $C_H$ , responsables de la transcription appropriée et efficace des gènes correspondants ; (3) des activateurs transcriptionnels (*enhancers*), dont l'un situé dans l'intron entre  $J_{H4}$  et  $C_{\mu}$ , est associé à des régions d'attachement à la matrice (MAR : *Matrix Association Region*) et l'autre plus vaste est situé en 3' des gènes  $C_H$  (pour revue : Perlot and Alt, 2008) (**Figure 25**).

### 2.1. Les régions isolatrices

Les régions isolatrices (ou isolateurs) sont des séquences d'ADN créant des frontières dans la chromatine. Il existe deux types d'isolateurs : ceux qui séparent les activateurs transcriptionnels et les promoteurs afin d'empêcher leur éventuelle interaction, et ceux qui créent une « barrière » empêchant la propagation de l'hétérochromatine (**Figure 26**). De façon plus précise, les isolateurs présentent généralement un motif CCCTC. Les protéines CTCF (*CCCTC binding-factor*) sont des protéines nucléaires en doigt de zinc ubiquitaires. Leur rôle d'isolateur passe par leur capacité à interagir entre elles ou avec d'autres protéines, telles que la cohésine. Ceci conduit à la contraction du locus et à la formation des boucles d'ADN nécessaires aux interactions longues distances (pour revue : Gaszner and Felsenfeld, 2006) (*cf* chapitre 2, 1.1.2 La structure tridimensionnelle du locus).

De nombreux sites de liaison pour CTCF (ou CBE pour *CTCF binding-element*) sont présents sur le locus IgH. Au cours du développement B, le recrutement différentiel de la cohésine au niveau des CBE est impliqué dans la régulation de l'expression génique (Degner *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 2011a). Ainsi, les trois régions détaillées ci-après contiennent des CBE et sont principalement connues pour leurs rôles dans l'accessibilité



et/ou l'isolation chromatinienne (Garrett *et al.*, 2005; Pawlitzky *et al.*, 2006; Featherstone *et al.*, 2010).

### 2.1.1. La région 5'

La région située en 5' du locus IgH contient quatre sites hypersensibles à la DNase I<sup>1</sup> (5' hs1, 2, hs3a et hs3b) localisés environ 30 kb en amont du segment V<sub>H</sub> le plus distal (V<sub>H</sub>J558.55). Suite au traitement à la DNase I, hs1 est détecté uniquement au stade pro-B (*i.e.* durant les réarrangements VDJ) tandis que les sites hs2 et hs3 sont présents tout au long du développement B, ainsi que dans les LT. Des sites de liaison de plusieurs facteurs de transcription essentiels au développement B et aux recombinaisons du locus IgH ont été retrouvés dans la séquence de cette région. Notamment, l'élément 5'hs1 fixe les facteurs de transcription PU.1, Pax5 et E2A spécifiquement au stade pro B et 5'hs2 présente des CBE (Pawlitzky *et al.*, 2006).

Cependant, le remplacement individuel d'hs1 par le gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur pgk (cassette pgk-*neo*<sup>R</sup>), sa délétion propre<sup>2</sup> ainsi que la délétion combinée des quatre éléments (hs1, hs2, hs3a et hs3b) n'ont mis en évidence aucun défaut du développement B, ni des mécanismes de réarrangements VDJ et de CSR. La région 5' ne présenterait donc aucune fonction *cis*-régulatrice sur le locus IgH mais en définirait plutôt les limites chromatinienne (Perlot *et al.*, 2010).

### 2.1.2. La région intergénique V<sub>H</sub>-D

Une grande région inter-génique sépare les segments V<sub>H</sub> et D (Johnston *et al.*, 2006). Elle s'étend sur plus de 90 kb entre le segment V<sub>H</sub> fonctionnel le plus proximal et le segment D le plus distal (DFL16.1) et contient six sites hypersensibles à la DNase I (hs1 à hs6). Parmi ces sites, seuls les éléments hs4 et hs5 contiennent un CBE et des sites de fixation pour différents facteurs de transcription essentiels au développement B (*i.e.* Pax5, Stat3, PU.1) (Featherstone *et al.*, 2010).

---

<sup>1</sup> Seuls les gènes actifs, les régions régulatrices et les sites de fixation à des facteurs de transcription sont hypersensibles au traitement par la DNase I.

<sup>2</sup> On emploie le terme de délétion propre lorsque l'on supprime la cassette pgk-*neo*<sup>R</sup> utilisée pour le remplacement génique, afin de s'affranchir des potentiels effets qui lui sont dus.



Dans un premier temps, le groupe de Corcoran a montré que les deux CBE ont une fonction d'isolateur (en bloquant l'activité des *enhancers*) qui empêche la transcription anti-sens provenant des segments D de s'étendre à la région V<sub>H</sub> proximale. Cette séparation des segments V<sub>H</sub> et D en domaines chromatinien distincts limite l'accessibilité et l'activation des gènes V<sub>H</sub> avant que la recombinaison DJ<sub>H</sub> n'ait eu lieu. Ces isolateurs participeraient donc à la régulation ordonnée des réarrangements VDJ (Featherstone *et al.*, 2010).

Puis le groupe d'Alt a démontré que ces deux CBE ainsi que les potentiels éléments *cis* adjacents forment une région de 4,1 kb nommée IGCR1 (*Intergenic Control Region 1*). Grâce à des modèles murins de délétion et de mutations ciblées, ils ont pu montrer qu'IGCR1 est nécessaire au contrôle de la transcription germinale, assurant ainsi la spécificité tissulaire et temporelle des recombinaisons V(D)J (Giallourakis *et al.*, 2010). Une étude récente suggère qu'IGCR1, *via* la formation de boucles au niveau de ses sites CBE, favoriserait le réarrangement des segments V<sub>H</sub> distaux (Guo *et al.*, 2011a).

### 2.1.3. La région 3'

Des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP pour *Chromatine Immunoprecipitation*) et d'hypersensibilité à la DNase I réalisées sur des cellules B à différents stades de développement et d'activation ont permis de mettre en évidence des sites hypersensibles (hs) localisés à l'extrémité 3' du locus IgH : 3'hs5, hs6 et hs7 (Garrett *et al.*, 2005). Ces éléments, ainsi qu'une région située 7kb en aval de hs7, n'ont pas de rôle en tant que *cis*-activateurs transcriptionnels du locus IgH. Cependant, l'analyse de cette région a mis en évidence plusieurs CBE, lui suggérant une fonction isolatrice (pour revue : Birshtein, 2012).

Les animaux déficients pour ces éléments présentent une discrète diminution de la contraction du locus IgH entraînant un biais de réarrangement V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> avec une utilisation accrue des segments V<sub>H</sub> proximaux (*i.e.* famille VH7183), de DQ52 et de J<sub>H3</sub>. De plus, suite à une stimulation, les cellules B issues de ces animaux présentent une légère augmentation de la transcription des gènes situés en 3' évoquant un rôle d'isolateur transcriptionnel vis-à-vis des gènes situés en aval (Volpi *et al.*, 2012). Cette région est alors qualifiée de frontière 3' du locus IgH.



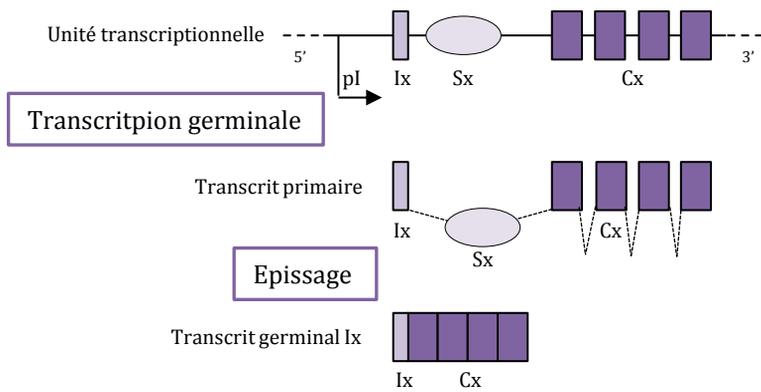
## 2.2. Les promoteurs

Il existe plusieurs sortes de promoteurs au sein du locus IgH : les promoteurs de régions  $V_H$  (pVH), le promoteur-activateur DQ52 (PDQ52) et les promoteurs des régions constantes (pI) (**Figure 23**).

### 2.2.1. Les promoteurs $V_H$

Chaque segment  $V_H$  possède son propre promoteur. Leur activité est comprise dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. La plupart des pVH contiennent une TATA box et un élément initiateur (InR : *Initiator element*) (Buchanan *et al.*, 1997). Ils possèdent également une séquence octamérique très conservée en amont de la TATA box : ATGCAAAT (Parslow *et al.*, 1984). Des études de transfections stables (Dreyfus *et al.*, 1987; Mason *et al.*, 1985) et de transgénèse chez la souris (Jenuwein and Grosschedl, 1991) ont montré que la présence des séquences octamériques est nécessaire à l'activité et à la spécificité cellulaire des promoteurs pVH. Ces séquences sont reconnues par des facteurs de transcription de la famille POU : Oct-1 exprimé de façon ubiquitaire, et Oct-2 spécifique à la lignée B. Ces deux protéines activent efficacement la transcription à partir d'un promoteur d'Ig (LeBowitz *et al.*, 1988; Pfisterer *et al.*, 1994; Pierani *et al.*, 1990). En amont de l'octamère, les promoteurs pVH contiennent une séquence heptamérique (CTCATGA) qui, en association avec l'octamère, assure une activation spécifique et optimale du promoteur (Eaton and Calame, 1987). D'autres éléments ont été localisés en amont de l'heptamère : une région riche en pyrimidines de fonction inconnue et certains sites de liaison pour des facteurs de transcription spécifiques du lignage lymphocytaire B (Johnston *et al.*, 2006).

Ces promoteurs possèdent un double rôle : (1) ils participent à l'accessibilité des segments  $V_H$  en initiant les transcrits germinaux sens et anti-sens  $V_H$  avant les réarrangements  $V_H$ -D $J_H$  (ces transcrits germinaux sont diminués après un réarrangement  $V_H$ D $J_H$  fonctionnel) ; (2) ils transcrivent l'exon  $V_H$ D $J_H$  précédemment réarrangé afin d'assurer l'expression de la chaîne lourde tout au long du développement B (Yancopoulos and Alt, 1985).



**Figure 27 : Génération des transcrits germinaux Ix.**

La première ligne représente l'unité de transcription, composée d'un promoteur pI, d'un exon I, d'une région S et des exons codant Cx associés.

La deuxième ligne représente le transcrit primaire obtenu après transcription de l'unité à partir de pI.

La troisième ligne correspond au transcrit germinale obtenu après épissage entre le site donneur de l'exon I et le site accepteur du premier exon C.

x représente n'importe quel exon constant excepté  $\delta$ .

### 2.2.2. Le promoteur-activateur DQ52

Chaque segment D contient un promoteur bidirectionnel qui est activé après les réarrangements D-J<sub>H</sub> pour générer des transcrits sens et anti-sens (Alessandrini and Desiderio, 1991 ; Chakraborty *et al.*, 2007). DQ52 est le segment D le plus proximal par rapport aux gènes J<sub>H</sub>. Il est préférentiellement utilisé lors des réarrangements D-J<sub>H</sub> (Tsukada *et al.*, 1990). C'est également le seul segment D transcrit bien avant la survenue des premiers réarrangements D-J<sub>H</sub>, générant ainsi les transcrits germinaux sens  $\mu 0$ . Leur expression, qui serait un prérequis pour l'accessibilité des recombinaisons aux régions D-J<sub>H</sub>, est également un indicateur précoce de l'engagement dans la lignée B (Thompson *et al.*, 1995).

La région en 5' de DQ52 présenterait à la fois les caractéristiques d'un promoteur et d'un activateur transcriptionnel, d'où son appellation PDQ52 (Kottmann *et al.*, 1994). Néanmoins, sa délétion chez la souris ne présente pas d'impact majeur sur les recombinaisons D-J<sub>H</sub>, mise à part un léger biais dans l'utilisation des segments D et J<sub>H</sub> distaux. Ces effets minimes sur les réarrangements DJ<sub>H</sub> seraient corrélés à la persistance de transcrits  $\mu 0$ -like suggérant que l'activité hétérogène de PDQ52 n'est pas totalement abolie, probablement suite à l'activité d'un élément *cis*-régulateur redondant (Nitschke *et al.*, 2001 ; Afshar *et al.*, 2006).

### 2.2.3. Les promoteurs I

Les pI (*Intervening*) sont présents en amont de chaque région S associée aux gènes constants du locus IgH, à l'exception de C $\delta$  (pour revue : Chaudhuri *et al.*, 2007). Les transcrits initiés aux pI contiennent l'exon I (situé en aval du pI) épissé sur le premier exon constant qui lui est associé (**Figure 27**).

Ces transcrits germinaux Ix-Cx ne codent aucune protéine mais sont nécessaires à l'accessibilité des régions S. En effet, suite aux stimulations induisant la CSR mais avant la formation des GC, les promoteurs I initient la transcription germinale vers les futurs isotypes (Xu and Stavnezer, 1992), rendant ces régions accessibles à AID (Nambu *et al.*, 2003). Plusieurs études ont ainsi clairement démontré que la transcription des régions S est un prérequis obligatoire à la CSR. En effet, la délétion ciblée d'un exon I et/ou d'un pI (autre qu'I $\mu$ ) induit un blocage de la transcription germinale de la région S associée et



abolie la CSR vers l'isotype concerné. Par exemple, la délétion de la région située en 5' de  $S\gamma 1$  (incluant le promoteur  $I\gamma 1$ ) ou le remplacement de  $I\gamma 2b$  par  $neo^R$  conduit à l'abolition de la CSR vers IgG1 ou IgG2b respectivement (Jung *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1993). Au sein de ces pl, le seul élément structural important semble être leur site d'épissage. En effet, le remplacement d'un pl avec un promoteur hétérologue, s'il induit la génération de transcrit germinaux épissés, est suffisant pour induire la CSR vers l'isotype correspondant. A l'inverse, la délétion du site d'épissage en amont d'une région  $S\gamma$  inhibe la CSR vers l'isotype correspondant (Lorenz *et al.*, 1995 ; Hein *et al.*, 1998). Notons que Perlot et collaborateurs ont également mis en évidence la présence de transcrits anti-sens dans les régions S. Cependant, le site d'initiation de ces transcrits ainsi que leur rôle précis restent encore méconnus (Perlot *et al.*, 2008) (*cf* Chapitre 2, 1.3 La transcription et l'accessibilité aux recombinaisons). Après avoir effectué la CSR, la cellule initie la transcription à partir du promoteur  $I\mu$ , produisant un transcrit hybride  $I\mu$ -Cx. Ainsi, l'étude des transcrits germinaux  $I\mu$ -Cx est un moyen fréquemment utilisé pour cribler les cellules entreprenant la CSR. A l'inverse, bien que leur fonction reste inconnue, la détection des transcrits hybrides est une preuve que la cellule a correctement effectué la CSR (pour revue : Stavnezer, 2000).

L'activation *in vitro* de cellules B (préalablement isolées à partir de rate de souris) 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. Ainsi, l'activation B induite par le lipopolysaccharide (LPS) induit à elle seule la transcription germinale des promoteurs  $I\mu$ ,  $I\gamma 2b$  et  $I\gamma 3$  et par conséquent la CSR vers les isotypes IgG2b et IgG3. L'ajout d'interleukine 4 (IL4) au LPS active la transcription des promoteurs  $I\gamma 1$  et  $I\epsilon$ , induisant la CSR vers IgG1 et IgE. L'ajout d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ou de *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) entraîne respectivement la transcription germinale aux promoteurs  $I\gamma 2a$  ou  $I\alpha$  et la CSR vers IgG2a ou IgA (pour revue : Stavnezer, 2000).



## 2.3. Les activateurs transcriptionnels

Deux activateurs transcriptionnels sont présents au locus IgH : en 5' l'activateur intronique  $E\mu$  qui entouré de deux régions d'attachement à la matrice nucléaire (MAR : *Matrix Attachment Region*) et en 3', la région régulatrice 3'RR qui a fait l'objet des études effectuées au cours de ma thèse.

### 2.3.1. L'activateur intronique $E\mu$ et les régions d'attachement à la matrice

L'activateur intronique  $E\mu$  fut le premier *enhancer* découvert au locus IgH (Banerji *et al.* 1983; Gillies *et al.* 1983). Sa localisation, dans l'intron entre le dernier segment  $J_H$  ( $J_{H4}$ ) et le gène constant  $C\mu$ , lui permet d'être préservé de tous les événements de recombinaisons se produisant au locus IgH. Cet activateur intronique est organisé sous forme d'un élément central de 220 pb (*core  $E\mu$*  ou  $cE\mu$ ) entouré de deux MAR.

#### 2.3.1.1. Le core $E\mu$

Le  $cE\mu$  comporte de nombreux sites de fixation pour des protéines activatrices ou inhibitrices de transcription. De 5' en 3' se situent un site C/EBP (*Ccaat-Enhancer-Binding Proteins*),  $\mu E1$ ,  $\mu E5$ ,  $\mu E2$ ,  $\mu A$ ,  $\mu E3$ ,  $\mu E4$  et une séquence octamérique. Cette dernière permet la fixation de facteurs de transcription B spécifiques Oct-1 et Oct-2 (pour revue : Ernst and Smale, 1995). La spécificité cellulaire d' $E\mu$  serait due aux éléments  $\mu E4$  et  $\mu E5$ . En effet, au sein des lignées non lymphoïdes, la protéine ZEB se fixe à ces deux motifs et entraîne la répression de l'activateur, alors qu'au sein des lignées lymphoïdes, des protéines de la famille E2A se fixent sur  $E\mu$  pour stimuler son activité (Genetta *et al.*, 1994). De plus, l'activité d' $E\mu$  semble spécifique du stade pro-B. Dans ce contexte, l'insertion d' $E\mu$  à la place de sa contrepartie au locus  $\kappa$  ( $Ei\kappa$ ) conduit à des réarrangements  $V\kappa J\kappa$  prématurés au stade pro-B (alors que ces réarrangements se produisent normalement au stade pré-B) (Inlay *et al.*, 2006).  $E\mu$  serait donc impliqué dans le maintien de réarrangements  $V(D)J$  séquentiels (locus IgH avant IgL) en influençant l'accessibilité aux recombinaisons.



Dans ce sens, la délétion d'E $\mu$  dans des lignées cellulaires (Chen *et al.*, 1993 ; Serwe and Sablitzky, 1993) ou dans des souris *knock-out* (KO) (Afshar *et al.*, 2006 ; Perlot *et al.*, 2005 ; Marquet *et al.*, en préparation) conduit à une diminution des réarrangements D-J<sub>H</sub>. Cette réduction limite les substrats nécessaires aux réarrangements suivants, entraînant des réarrangements V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub> fortement affectés. Cet effet est notamment dû à l'action de cE $\mu$  sur les transcrits germinaux  $\mu 0$  ainsi que sur la transcription anti-sens des régions D et J<sub>H</sub> précédant les réarrangements D-J<sub>H</sub> (Bolland *et al.*, 2007). La diminution de ces nombreux transcrits régulateurs coïncide également avec une réduction de la densité de la RNA Pol II dans les régions concernées (Chakraborty *et al.*, 2009). A l'inverse, les transcrits germinaux sens et anti-sens observés dans les régions V<sub>H</sub> ne sont pas affectés par les diverses délétions d'E $\mu$  (Perlot *et al.*, 2005; Afshar *et al.*, 2006). L'activité résiduelle des événements de recombinaison dans ces modèles de délétion suggère l'implication d'autre(s) élément(s) redondants ou complémentaires à E $\mu$ . Parmi les candidats potentiels, le promoteur activateur PDQ52 est exclu car la délétion conjointe d'E $\mu$  et de PDQ52 sur le même allèle n'aggrave pas le défaut provoqué par la simple délétion d'E $\mu$  (Afshar *et al.*, 2006). Il a également été proposé que l'élément E $\mu$  contrôle le phénomène d'exclusion allélique au locus IgH. En effet, des animaux présentant un allèle IgH préalablement réarrangé mais dépourvu de la région E $\mu$  ne réprime plus les réarrangements ni l'expression du second allèle aux stades précoces, ce qui a pour conséquence l'apparition de cellules B exprimant deux chaînes lourdes différentes (Li and Eckhardt, 2009).

Ces effets de la délétion d'E $\mu$  sur les réarrangements D-J<sub>H</sub> peuvent être corrélées à son rôle dans l'épigénétique. Ainsi, une étude récente montre qu'au stade pro-B, E $\mu$  est nécessaire à la localisation des allèles dans l'euchromatine (Guo *et al.*, 2011b). En outre, des études de marques chromatiniennes menées dans des précurseurs B dépourvus de cE $\mu$  révèlent qu'il contribue efficacement à l'apparition de marques de chromatine active (H3K9ac et H3K4me3) suivies de la transcription germinale associée (Chakraborty *et al.*, 2009). De par ses interactions avec d'autres éléments *cis*-régulateurs, cE $\mu$  serait aussi impliqué dans la contraction du locus au cours de l'ontogénie B. Son interaction avec PDQ52 au stade pro-B séquestrerait les segments J<sub>H</sub> dans une boucle d'ADN afin d'éviter leur réarrangement précoce. Les auteurs suggèrent que cette conformation permet le recrutement des Rag et donc l'initiation des réarrangements VDJ. Par la suite, son interaction avec IGCR1 emprisonne la majorité des segments D dans une boucle,



favorisant l'initiation des réarrangements par les Rag recrutées dans la boucle précédente. Outre ses interactions avec PDQ52 et IGCR1, E $\mu$  interagit aussi à distance avec deux autres sites : l'un situé dans les segments V<sub>H</sub> distaux (*i.e.* famille V<sub>H</sub>J558) et l'autre dans les segments V<sub>H</sub> proximaux (*i.e.* famille V<sub>H</sub>7183). Ces interactions seraient en partie responsables du rapprochement physique entre les segments V<sub>H</sub> et la région DJ<sub>H</sub> préalablement réarrangée (Guo *et al.*, 2011b).

Le rôle de cE $\mu$  dans les réarrangements VDJ conduit à un blocage partiel du développement B précoce dans les modèles de KO, induisant une diminution de 50% des cellules B matures en périphérie. De façon générale, après délétion d'E $\mu$ , la transcription au sein du locus IgH est diminuée. Plus particulièrement, comme E $\mu$  sert de promoteur germinale I $\mu$ , sa délétion conduit à une réduction des transcrits germinaux I $\mu$  et par conséquent occasionne un léger défaut de CSR (Perlot *et al.* 2005; Afshar *et al.* 2006; Chakraborty *et al.* 2009 ; Li *et al.*, 2010). Enfin, le rôle d'E $\mu$  sur la SHM reste sujet à controverse. Dans des hybridomes, la délétion de toute la région E $\mu$  ne semble pas affecter la SHM alors que les délétions individuelles de cE $\mu$  et des MAR entraînent une diminution des SHM (Ronai *et al.*, 2005). De même, l'association d'une région variable réarrangée à la délétion de la région E $\mu$  modifie légèrement la fréquence des SHM (Li *et al.*, 2010). A l'inverse, les LB du GC d'animaux KO pour cE $\mu$  ne présentent aucune altération des SHM (Perlot *et al.* 2005).

### 2.3.1.2. Les régions d'attachement à la matrice

Il existe deux types de MAR : les MAR constitutives qui sont continuellement attachées à la matrice nucléaire ; et les MAR facultatives qui sont fixées de façon réversible à la matrice nucléaire mais lient des facteurs nucléaires tissus-spécifiques, rendant les régions associées transcriptionnellement actives. Les MAR entourant le cE $\mu$  sont facultatives. Il semblerait que la spécificité tissulaire de cE $\mu$  dépende des facteurs capables de se lier aux MAR adjacentes. Ainsi, dans des cellules non-B, des régulateurs négatifs se lieraient aux MAR tandis que dans des cellules B, on retrouverait des facteurs activateurs. Dans ce sens, les MAR contribueraient à l'accessibilité d'E $\mu$  via la fixation du facteur de transcription BRIGHT (*B-cell Regulator of IgH Transcription*) (Lin *et al.*, 2007).



Le rôle exact de ces MAR reste encore faiblement étudié. En effet, seul un modèle de délétion des MAR entourant  $c\mu$  existe dans des animaux chimériques. L'étude de ces souris a démontré que les MAR ne sont pas nécessaires à l'efficacité des recombinaisons VDJ, ni au développement B précoce (Sakai *et al.* 1999).

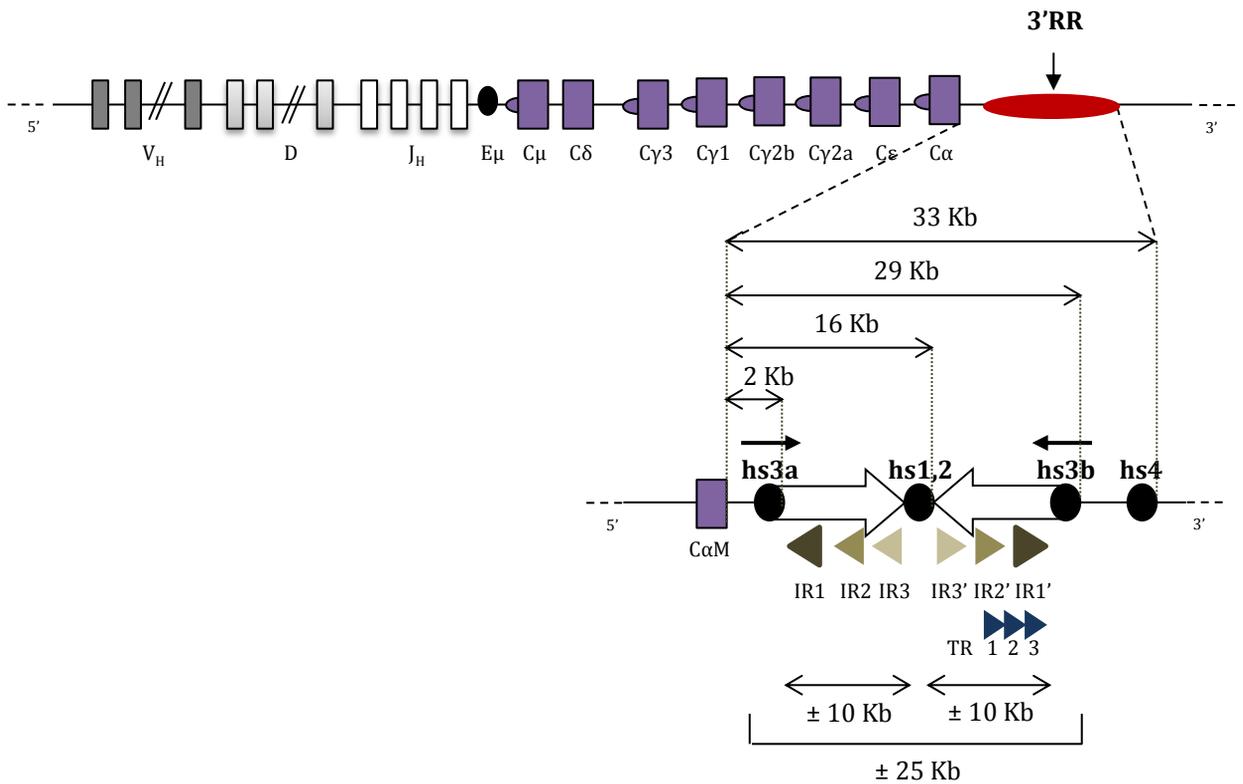
### **2.3.2. La région régulatrice située en 3' du locus**

La région présentée dans cette partie a fait l'objet des études menées lors de mes trois années de thèse. Je détaillerai donc plus précisément toutes les recherches réalisées sur cette région, de sa découverte aux données les plus récentes (pour revues : Khamlichi *et al.*, 2000 ; Vincent-Fabert *et al.*, 2010b ; Pinaud *et al.*, 2011).

#### **2.3.2.1. La découverte des *enhancers* 3'**

Suite à la découverte de l'activateur intronique  $E\mu$ , la présence d'activateurs transcriptionnels supplémentaires dans le locus IgH a été suspectée par l'existence de lignées cellulaires capables d'exprimer leurs gènes IgH en l'absence d' $E\mu$  (Aguilera *et al.*, 1985 ; Klein *et al.*, 1984 ; Wabl and Burrows, 1984 ; Zaller and Eckhardt, 1985). De plus, l'analyse d'hybridomes a démontré que l'oncogène *c-myc* peut être activé après translocation au locus IgH, même si cette dernière induit la délétion d' $E\mu$  (Neuberger and Calabi, 1983). Quelques années plus tard, l'analyse d'une lignée cellulaire présentant une délétion d'environ 4 kb immédiatement en 3' de  $C\alpha$  a mis en évidence une diminution de la transcription du locus IgH (Gregor and Morrison, 1986). Cette étude suggère que d'autre(s) élément(s) activateur(s) existe(nt) au locus IgH et cible la région en aval de  $C\alpha$  comme une candidate potentielle pour contenir ces éléments *cis*-activateurs, d'autant qu'elle n'est jamais affectée par les divers réarrangements se produisant au locus IgH.

La découverte d'un élément régulateur en aval des gènes constants au locus Igk a confirmé l'hypothèse précédente (Meyer and Neuberger, 1989). La recherche d'*enhancers* supplémentaires à  $E\mu$  a alors débuté chez le rat et a conduit à la découverte d'un élément B-spécifique, situé 25 kb en aval de  $C\alpha$  (Pettersson *et al.*, 1990). Son équivalent murin, noté 3' $\alpha$ E, a par la suite été découvert 16 kb en aval du premier exon



**Figure 28 : Structure détaillée de la 3'RR.**

La 3'RR est constituée de 4 éléments notés de 5' en 3': hs3a, hs1,2, hs3b et hs4.

Hs3a, hs1,2 et hs3b constituent un palindrome d'environ 25 Kb dont les extrémités sont hs3a et hs3b. Ces éléments présentent 97% d'identité et sont en orientation inverse (symbolisée par les flèches les surmontant). Le centre de symétrie du palindrome est hs1,2 qui est encadré par environ 10 Kb de régions répétées inversées (IR) dont certaines sont en tandem (TR).

Hs4 est en dehors du palindrome, faisant de la 3'RR une structure quasi-palindromique.

Par rapport à l'exon de membrane C<sub>α</sub> (C<sub>α</sub>M), hs3a est situé à 2 Kb, hs1,2 à 16 Kb, hs3b à 29 Kb et hs4 à 33 Kb.

Le schéma n'est pas à l'échelle.

$C\alpha$  (Dariavach *et al.*, 1991; Lieberson *et al.*, 1991). L'analyse de sites hypersensibles à la DNase I a permis de mettre en évidence deux éléments au sein de cet *enhancer* 3' $\alpha$ E, appelés hs1 et hs2 (Giannini *et al.*, 1993). Cependant, la complexité de l'expression des gènes d'Ig laissait sous-entendre que ces éléments ne peuvent pas à eux seuls réguler l'expression du locus IgH. Des expériences de gènes rapporteurs ont ainsi identifié un second *enhancer*, appelé  $C\alpha$ 3'E et situé à seulement 2 kb du gène  $C\alpha$  murin (Matthias and Baltimore, 1993). Enfin, grâce à la technique d'hypersensibilité à la DNase I, deux autres sites ont été découverts : hs3 et 3' $\alpha$ -hs4 qui sont respectivement à 29 kb et 33 kb en aval de  $C\alpha$  (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson *et al.*, 1995).

En résumé, quatre sites hs, répartis sur plus de 30 kb, ont ainsi pu être découverts en 3' du locus IgH murin. Selon la nomenclature proposée par Saleque en 1997, ces éléments sont dorénavant regroupés sous le terme d'*enhancers* 3' et sont notés de 5' en 3' : hs3a (anciennement  $C\alpha$ 3'E), hs1,2, (anciennement 3' $\alpha$ E), hs3b (anciennement hs3) et hs4 (anciennement 3' $\alpha$ -hs4) (Saleque *et al.*, 1997).

### 2.3.2.2. La structure unique de la région régulatrice 3'

Une analyse par séquençage de cette région a montré que les trois premiers éléments (hs3a, hs1,2, hs3b) forment une structure unique dite quasi-palindromique où la distribution des éléments semble jouer un rôle fonctionnel. Cette structure, dont hs1,2 occupe le centre, s'étend sur plus de 25 kb. De part et d'autre, hs1,2 est entouré de 10 à 12 kb de séquences répétées inversées (IR1 à IR3 pour *Inverted Repeat*) dont certaines sont en tandem (TR pour *Tandem Repeat*). Les extrémités de ce quasi-palindrome sont formées par les éléments hs3a et hs3b qui présentent 97% de similitudes mais sont en orientations inverses (Chauveau and Cogné, 1996; Saleque *et al.*, 1997). L'élément hs4 se trouve en dehors de cette structure et constitue le dernier élément avec une activité *enhancer* (**Figure 28**).

Ces quatre éléments sont suivis par la région 3' constituée des sites hs5, hs6 et hs7 possédant une activité isolatrice grâce à la présence de nombreux CBE (Garrett *et al.*, 2005) (*cf* Chap 2, 2.1.3 La région 3'). Puisque l'insertion d'une cassette *neo<sup>R</sup>* entre hs4 et hs5 n'a pas de conséquence sur la transcription du locus IgH, il est admis que la région 3' constitue la limite du locus IgH sans aucune activité transcriptionnelle sur celui-ci



(Manis *et al.*, 2003). Notons que suivant la littérature, les éléments de la région 3' peuvent être associés aux *enhancers* 3'.

De façon inattendue, une étude récente réalisée au laboratoire a révélé que les *enhancers* 3' sont flanqués de séquences répétitives ressemblant à celles des régions S et nommées LS (*Like-Switch*). Ces régions ainsi que les *enhancers* peuvent être transcrits et mutés par AID après activation des LB. La triade « transcription, structure répétitive et ciblage d'AID » (*i.e.* pré-requis de l'accessibilité des régions S au mécanisme de CSR) étant réunie, il a pu être mis en évidence l'existence de recombinaisons entre S $\mu$  et les sites LS. Ce processus appelé LSR (*Locus Suicide Recombination*) aboutit à la délétion de l'ensemble des gènes constants et de ce fait à l'inactivation du locus IgH (Péron *et al.*, 2012). A l'heure actuelle, l'importance physiologique et la régulation de ce mécanisme sont en cours d'étude.

### 2.3.2.3. La région régulatrice 3' au cours de l'évolution

L'apparition des *enhancers* au locus IgH fait l'objet de plusieurs hypothèses. Qu'ils prennent leur origine dans des duplications ou des transpositions, les *enhancers* conservés au cours de l'évolution sont situés dans des régions qui les préservent de tous les événements de recombinaison se produisant au locus IgH. La 3'RR semble être apparue suite à un phénomène séculaire de duplication de la région contenant les exons C $\mu$ . La duplication et la conservation d'un *enhancer* ancestralement situé en aval de C $\mu$  aurait donné naissance à la 3'RR actuelle (Magor *et al.*, 1999).

Une étude récente a comparé l'organisation de cette région régulatrice dans le génome des vertébrés. Il en ressort que la structure palindromique est très conservée alors que la séquence des régions répétées inversées fluctue au cours de l'évolution. Il semblerait donc que la structure palindromique, plus que la séquence des régions répétées inversées, confère à cette région sa fonctionnalité (D'Addabbo *et al.*, 2011).

Ainsi, une région régulatrice 3' est également retrouvée chez l'Homme où elle suit la particularité du locus IgH. En effet, chez l'Homme, les gènes constants sont dupliqués en deux blocs séparés d'environ 35 kb. En aval de chaque gène C $\alpha$ , une région régulatrice a été identifiée. Constituées de seulement trois éléments (hs3a, hs1,2 et hs4),



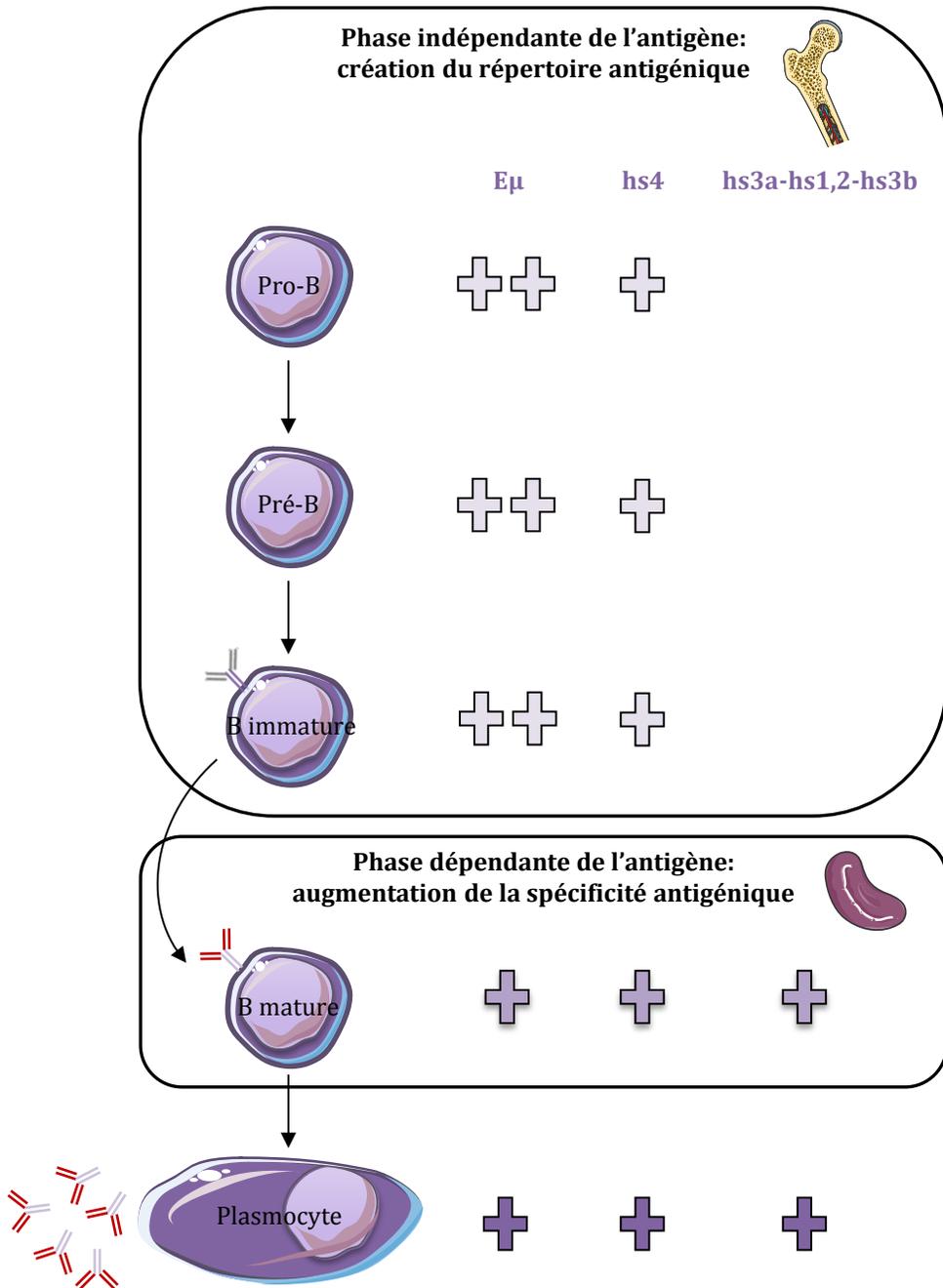
ces régions présentent toutefois la même structure palindromique avec hs1,2 flanqué de régions répétées inversées. A la vue du développement B, les *enhancers* humains présentent le même profil d'activation que leurs homologues murins, faisant encore une fois de la souris un modèle d'étude pertinent (Chen and Birshstein, 1997 ; Mills *et al.*, 1997 ; Pinaud *et al.*, 1997).

#### **2.3.2.4. La cinétique d'activation des *enhancers* 3' au cours de l'ontogénie B**

L'étude de l'activité des *enhancers* 3' a principalement été réalisée par des expériences de gènes rapporteurs suivies de transfections transitoires dans des lignées cellulaires représentant différents stades du développement B ou avec des animaux transgéniques.

La transfection transitoire d'hs1,2 dans une lignée de plasmocytome prouve que cet élément est un activateur transcriptionnel agissant durant les stades tardifs de l'ontogénie B mais à un taux plus faible qu'E $\mu$  (environ 25% de l'activité d'E $\mu$ ) (Dariavach *et al.*, 1991; Lieberson *et al.*, 1991). Cependant, les résultats obtenus dans des lignées B matures sont contradictoires (Dariavach *et al.*, 1991). Des souris transgéniques avec un gène rapporteur sous le contrôle d'hs1,2 présentent une expression importante du transgène, seulement dans les cellules B activées, confirmant le rôle de cet élément durant les stades tardifs de la lymphopoïèse B. Toutefois, la spécificité B de cet élément isolé n'est pas complète puisqu'une expression a également été détectée dans d'autres tissus tels que le thymus, le cœur ou le rein (Arulampalam *et al.*, 1994 ; Andersson *et al.*, 1999).

De même, la transfection transitoire d'un gène rapporteur sous le contrôle d'hs3a montre que l'activité de cet élément est détectée aux stades B mature et plasmocytaire, à un taux allant de 5% à 15% de l'activité d'E $\mu$  (Matthias and Baltimore, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus avec hs3b (Madisen and Groudine, 1994). Ces résultats démontrent que les *enhancers* qui constituent le palindrome sont actifs aux stades tardifs de la différenciation B, leur suggérant un rôle dans le contrôle des mécanismes de diversification secondaire du répertoire antigénique.



**Figure 29 : Activité et synergie des enhancers du locus IgH au cours de l'ontogénie B.**

L'activateur intronique  $E\mu$  est actif pendant tout le développement B mais son activité est maximale aux stades B précoces. Séparément, les *enhancers* 3' ont une activité plus faible qu' $E\mu$ . Hs4 est le seul *enhancer* 3' à être actif tout au long du développement B. Le palindrome est quant à lui actif uniquement aux stades B tardifs de la maturation.

L'intensité de coloration des croix représente la synergie d'activité entre les *enhancers* du locus IgH. Aux stades précoces,  $E\mu$  et hs4 ne synergisent pas alors qu'aux stades tardifs  $E\mu$  et les *enhancers* 3' ont un effet synergique avec une activité maximale au stade plasmocytaire.

Bien qu'ayant une activité faible comparée à celle d'E $\mu$ , l'élément hs4 semble être actif tout au long du développement B, du stade pro-B jusqu'au stade plasmocytaire (Madisen and Groudine, 1994 ; Michaelson *et al.*, 1995) (**Figure 29**).

Les profils d'activité des *enhancers* 3' sont corrélés aux profils de méthylation et d'acétylation de cette région d'ADN. En effet, cette région subit des changements épigénétiques progressifs afin de moduler son accessibilité et donc son activité au cours de l'ontogénie B (Giannini *et al.*, 1993).

L'étude par ChIP des profils d'acétylation des histones H3 et H4 (H3ac et H4ac) ainsi que la diméthylation de l'histone H3 (H3K4me2 et H3K4me3) mettent en évidence une activation séquentielle de la 3'RR. Ainsi, hs4 arbore les marques d'une chromatine active (*i.e.* déméthylation H3K9, méthylation H3K4, acétylation H3ac et H4ac) tout au long du développement B, dès le stade pro-B alors que les éléments constituant le palindrome acquièrent des marques identiques dans les LB matures et les plasmocytes (Garrett *et al.*, 2005 ; Giambra *et al.*, 2008).

### 2.3.2.5. Synergies entre les *enhancers* du locus IgH

Séparément, les éléments localisés en 3' du locus IgH possèdent une activité transcriptionnelle faible. Cependant, des expériences de gènes rapporteurs placés sous le contrôle des diverses combinaisons d'*enhancers* ont révélé des effets synergiques<sup>1</sup>.

Les premières données expérimentales suggérant une synergie entre les différents activateurs du locus IgH proviennent de l'analyse de cellules plasmocytaires transfectées avec un vecteur contenant un gène  $\mu$  réarrangé placé sous le contrôle d'un promoteur pV<sub>H</sub> en présence d'E $\mu$ . Lorsque hs1,2 est ajouté à cette construction, la transcription est augmentée d'un facteur deux (Dariavach *et al.*, 1991). En utilisant la même approche, l'équipe de Mocikat a montré que la transcription est augmentée uniquement lorsque hs1,2 est placé en aval de l'exon constant. De plus, l'allongement de la distance séparant E $\mu$  de hs1,2 renforce l'activation de la transcription (Mocikat *et al.*, 1993; Mocikat *et al.*, 1995). Ainsi, hs1,2 semble interagir avec E $\mu$  de façon dépendante de

---

<sup>1</sup> On parle de synergie lorsque l'effet de la combinaison de plusieurs éléments est égal ou supérieur aux effets additionnés de chacun d'eux pris isolément.



la position et de la distance. Pourtant, l'utilisation d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase, n'a pas mis en évidence de coopération entre E $\mu$  et hs1,2, quel que soit le stade de développement B (Fulton and van Ness, 1994).

Suite à l'identification de hs3b et hs4, Madisen et Groudine ont étudié l'effet d'une combinaison des quatre éléments hs sur la transcription du gène humain de l'hormone de croissance placé sous le contrôle soit d'un promoteur *c-myc* humain, soit d'un promoteur de chaîne légère. Dans une lignée pré-B, ni hs1,2, ni hs3 ne stimulent la transcription, la présence d'hs4 étant obligatoire pour activer le promoteur. De même, dans une lignée de plasmocytome, les deux promoteurs sont activés de façon modérée quand hs1,2, hs3b et hs4 sont utilisés séparément. En revanche, une activation synergique de la transcription est observée en présence d'une combinaison des différents activateurs 3', l'activation maximale étant obtenue avec la combinaison hs1,2-hs3b-hs4 (Madisen and Groudine, 1994). Dans cette configuration, les *enhancers* sont actifs à des stades où ils sont individuellement inactifs (Ong *et al.*, 1998). Lorsque l'association des quatre éléments mime la structure quasi-palindromique endogène, leur activité est augmentée dans des lignées B matures. De plus, au stade pré-B, l'activité d'hs4 est amplifiée par l'addition d'éléments considérés comme inactif à ce stade (*i.e.* hs3a, hs1,2 et hs3b) (Chauveau *et al.*, 1998).

Deux groupes se sont intéressés à la coopération entre E $\mu$  et les éléments 3'. La combinaison d'E $\mu$  avec n'importe lequel des *enhancers* 3' ne modifie pas son activité transcriptionnelle. En revanche, une forte augmentation est obtenue en combinant E $\mu$  et les quatre éléments 3' dans leur configuration semi-palindromique (Chauveau *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998).

En résumé, aux stades précoces, hs4 et E $\mu$  semblent prépondérants, tout en étant incapables de synergiser; aux stades B matures, hs1,2 et hs3 deviennent actifs mais leurs effets continuent d'être potentialisés par E $\mu$  et hs4 jusqu'au stade plasmocytaire où l'efficacité de la combinaison E $\mu$ -hs3a-hs1,2-hs3b-hs4 semble optimale (Chauveau *et al.*, 1998) **(Figure 29)**.



### 2.3.2.6. Les *enhancers* 3' : une région de contrôle du locus ?

Les caractéristiques synergiques, tissus et stades-spécifiques des *enhancers* 3' laissent à penser qu'ils forment une région de contrôle du locus (LCR pour *Locus Control Region*). En effet, une LCR est une région d'ADN capable de diriger l'expression des gènes qui lui sont associés de façon tissus-spécifique, proportionnellement au nombre de copies et indépendamment du site d'intégration. Généralement, une LCR est composée d'activateurs transcriptionnels colocalisés à des sites hs (pour revue : Li *et al.*, 2002).

En 1994, Madisen et Groudine transfectent une lignée murine de plasmocytome avec un transgène liant l'oncogène *c-myc* à trois *enhancers* 3' (hs1,2, hs3b et hs4). Ces éléments activent *c-myc* indépendamment du site d'intégration mais proportionnellement au nombre de copies (Madisen and Groudine, 1994). Ils définissent dès lors cette région comme une LCR, la renommant 3'LCR.

Par la suite, plusieurs études ont développé des modèles murins dans lesquels l'expression d'un transgène est régulée par les quatre *enhancers* 3' sous la forme mini-locus<sup>1</sup>. L'étude de ces animaux a confirmé que les *enhancers* 3' assurent une expression du transgène restreinte à la lignée lymphocytaire B et indépendamment du site d'intégration. Cependant, le niveau d'expression du transgène ne semble pas être corrélé au nombre de copies intégrées, contestant la qualification de LCR (Chauveau *et al.*, 1999 ; Guglielmi *et al.*, 2003a). D'après les auteurs, la combinaison minimale d'éléments utilisés dans la construction mini-locus ainsi que l'absence d'isolateurs seraient à l'origine des phénotypes observés (Guglielmi *et al.*, 2003b et 2003c). Afin de s'affranchir de cette ambiguïté quant à un potentiel rôle de LCR, le nom actuel de cette région est devenu région régulatrice située en 3' du locus IgH (3'RR pour *IgH* 3' *Regulatory Region*).

---

<sup>1</sup> Une construction mini-locus consiste à associer les éléments d'un locus dans leur ordre naturel, sans tenir compte des distances les séparant. Dans ce cas, les auteurs ont associé les quatre core *enhancers* sur 6 kb, sans le respect de la configuration palindromique due aux séquences répétées inversées encadrant hs1,2.



### 2.3.2.7. Les facteurs *trans* contrôlant la 3'RR

Cette activation séquentielle de la 3'RR au cours de l'ontogénie B laisse supposer que des facteurs de transcription agissent en *trans* afin de moduler son activité. De nombreuses études se sont attachées à déterminer les sites de fixation présents dans la séquence de la 3'RR. De par sa taille et la complexité de sa structure, la 3'RR peut lier une multitude de facteurs, qu'ils soient spécifiques du lignage lymphocytaire B ou ubiquitaires. Nous présenterons ici les principaux sites retrouvés dans la 3'RR et le rôle majeur des facteurs *trans* s'y fixant.

Trois sites octamères imparfaits mais capables de lier Oct-1 et Oct-2 ont été identifiés dans hs3a et hs3b (Matthias and Baltimore, 1993). Cependant, aucune coopération entre ces deux facteurs n'a pu être mise en évidence. Les éléments hs3 possèdent également des sites de fixation pour les protéines Maf (sites MARE pour *MAf Recognition Element*). Le rôle physiologique de ces protéines dans les LB est mal connu. Cependant, leur liaison aux éléments hs3 dans les cellules B indifférenciées entraîne leur répression, empêchant ainsi une transcription prématurée de la chaîne lourde d'Ig (Madisen and Groudine, 1994 ; Muto *et al.*, 1998). De multiples sites  $\mu$ E2 et  $\mu$ E5 (famille *E-box*) sont retrouvés dans hs3a et hs3b (Matthias and Baltimore, 1993). Ils lieraient les facteurs E12 et E47 dont la régulation est due aux dominants négatifs de la famille Id. Id1 et Id2 sont responsables de l'inhibition d'expression des gènes d'Ig dans les lignées non-B et Id3 réprime leur expression aux stades B précoces, permettant donc une régulation tissulaire et temporelle des *enhancers* 3' (Meyer *et al.*, 1995). Une étude a démontré qu'après activation par des molécules induisant la CSR, le facteur de transcription Ying Yang 1 (YY1) se lie et active les éléments hs3 afin de recruter les enzymes responsables du remodelage chromatinien. Sachant que YY1 peut également se fixer à certains promoteurs, il pourrait être impliqué dans des interactions longue distance entre la 3'RR et les promoteurs I, leur suggérant un rôle dans la CSR (Gordon *et al.*, 2003).

L'élément hs1,2 est l'*enhancer* 3' le plus étudié. De nombreux sites de liaisons à des facteurs de transcription ont ainsi été découverts au sein de sa séquence. Comme dans les éléments hs3, un site  $\mu$ E5 capable de fixer les produits du gène E2A a été identifié. Aux stades B précoces et B matures n'ayant pas rencontrés l'antigène (*i.e. resting*), Id3 régule négativement le site  $\mu$ E5 et par conséquent l'activité d'hs1,2 dans ces



cellules (Meyer *et al.*, 1995). Une séquence octamérique est également présente dans hs1,2. Au stade plasmocytaire, la fixation simultanée d'Oct-2 et OCA-B permet l'activation d'hs1,2, cette dernière étant augmentée après stimulation au LPS (Tang and Sharp, 1999). De même, un site de fixation pour NF- $\kappa$ B (site  $\kappa$ B) a été identifié dans hs1,2. Il est impliqué dans des complexes répresseurs aux stades précoces mais stimule hs1,2 dès l'activation des LB. Ces données suggèrent un rôle d'hs1,2 dans les mécanismes de diversification secondaire (Michaelson *et al.*, 1996). Au sein de l'élément hs1,2, deux sites liant le facteur BSAP ont été identifiés (Neurath *et al.*, 1995). Aux stades B matures, BSAP se fixe sur ses sites cibles où il s'associe physiquement avec les facteurs Oct et NF $\kappa$ B pour permettre une répression concertée de hs1,2 (Singh and Birshtein, 1996). Suite à la sous-expression de Pax5 au stade plasmocytaire, ces interactions sont perdues, autorisant alors les facteurs Oct et NF $\kappa$ B à favoriser l'activité transcriptionnelle de hs1,2 (Neurath *et al.*, 1994, 1995; Singh and Birshtein, 1996). De même, PU.1 et d'autres facteurs appartenant à la famille ETS, se lient à hs1,2 aux stades plasmocytaires afin d'augmenter la transcription de la chaîne lourde recombinée (Neurath *et al.*, 1995).

En accord avec son activité dès les stades précoces de la lymphopoïèse B, l'élément hs4 est régulé différemment des autres *enhancers* 3', tout en fixant les mêmes facteurs. Le site  $\kappa$ B joue un rôle dans l'activation de hs4, du stade pré-B jusqu'au stade plasmocytaire. Oct-1 régule positivement hs4 dans les pré-B et les B matures alors que BSAP interagit avec des complexes inhibiteurs. A l'inverse, BSAP activerait hs4 à partir des stades LB activés, lui conférant un double rôle variant avec le stade de développement B (Wakatsuki *et al.*, 1994 ; Michaelson *et al.*, 1996). De plus, comme pour hs1,2, Oct-2 et OCA-B collaborent dans les LB activés pour favoriser l'activité d'hs4 (Tang and Sharp, 1999).

*In vitro*, il a également été montré que l'activité transcriptionnelle de la 3'RR peut être modulée par des agents chimiques (Sulentic *et al.*, 2004).



### 2.3.2.8. Le rôle de la 3'RR lors de l'ontogénie B et des événements géniques au locus IgH

L'implication de la 3'RR lors des événements géniques se produisant au locus IgH a été longuement étudiée *via* différents modèles. Pour cela, des délétions d'une partie de cette région, qu'elles soient spontanées ou ciblées, ont été analysées dans des lignées cellulaires et dans le génome murin.

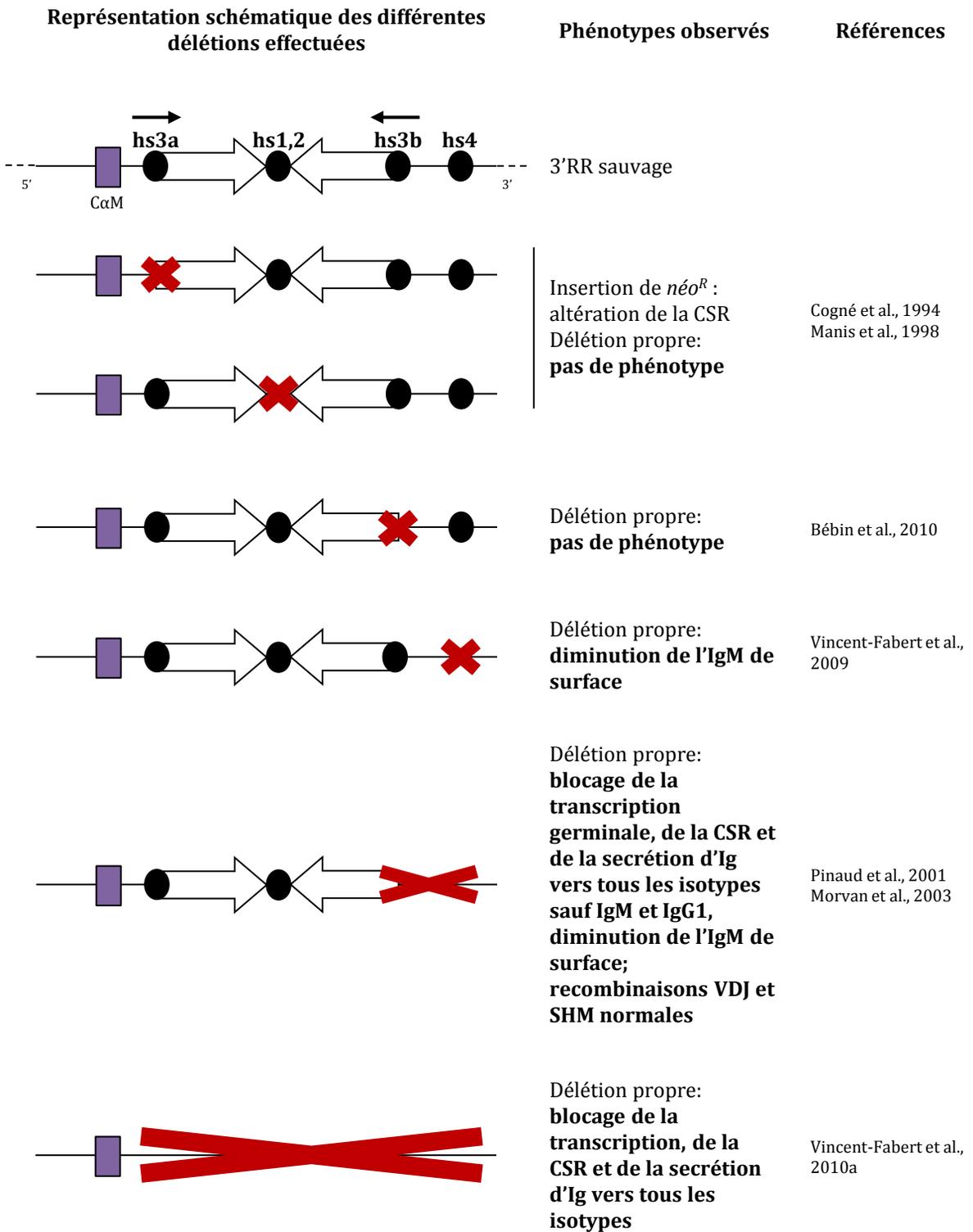
La première délétion de la 3'RR observée dans une lignée est à l'origine de sa découverte. Cette lignée B mature productrice d'IgA présente une large délétion spontanée en aval de C $\alpha$  ainsi qu'une diminution par sept de la transcription IgH (Gregor and Morrison, 1986). Des délétions plus limitées des *enhancers* de la 3'RR endogène dans des lignées conduisent seulement à des effets mineurs. Ainsi, la délétion naturelle du couple hs3a/hs1,2 dans une lignée pré-B n'affecte pas l'expression du locus IgH. Sa fusion avec un myélome, introduisant la mutation au stade plasmocytaire, n'a toujours aucun effet sur l'expression de la chaîne lourde, ni sur la CSR spontanée vers IgG1 (Saleque *et al.*, 1999). Ces résultats montrent qu'hs3a et hs1,2 sont dispensables pour la CSR et pour l'expression du locus IgH aux stades précoces et tardifs suggérant qu'hs3b et hs4 sont suffisants pour réguler ces activités.

Par transgénèse, le remplacement d'hs1,2 par une cassette *neo*<sup>R</sup> et sa transfection dans une lignée cellulaire B mature affecte l'expression du locus IgH (Lieberson *et al.*, 1995). Cependant, ce phénotype serait dû à « l'effet *neo* »<sup>1</sup> et non à la délétion d'hs1,2. De même, une construction mini-locus comprenant l'unité transcriptionnelle  $\gamma$ 2b suivie des quatre *enhancers* 3' a été transfectée dans plusieurs lignées cellulaires après délétions ciblées de différentes paires d'*enhancers*. Ces expériences ont démontré un rôle du couple hs3b/hs4 dans l'expression du locus IgH aux stades tardifs du développement B (Shi and Eckhardt, 2001). Ces résultats, suggérant un rôle des *enhancers* lors des stades matures de l'ontogénie B lorsqu'ils sont combinés, sont corrélés à leur activité synergique aux stades tardifs.

Afin de valider les données obtenues *in vitro*, l'utilisation de chromosomes artificiels et/ou de grands transgènes fournit d'intéressantes données chez la souris.

---

<sup>1</sup> Il est maintenant largement admis que l'insertion du gène *neo*<sup>R</sup> dans un locus perturbe les interactions entre les éléments *cis*-régulateurs, engendrant un phénotype qui n'est pas lié à la délétion d'origine.



**Figure 30 : Modèles murins de délétions affectant la 3'RR**

Dans la colonne de gauche, les croix rouges représentent les délétions effectuées. La colonne du milieu cite les principaux phénotypes observés et la dernière colonne correspond aux références bibliographiques ayant réalisées/analysées ces modèles murins.

Deux études soulignent un rôle important du couple hs3b/hs4 dans les phénomènes de diversification secondaire. Différents transgènes contenant pI $\epsilon$ , S $\epsilon$  et C $\epsilon$  avec ou sans les paires hs1,2/hs3a ou hs3b/hs4 montrent une surexpression des transgènes en présence des *enhancers*. Néanmoins, seul le transgène contenant le couple hs3b/hs4 est muté au niveau de S $\epsilon$  dans des LB activés (Laurencikienė *et al.*, 2007). Ces mutations, stigmates du ciblage d'AID précédant la CSR, sont la preuve qu'hs3b et hs4 permettent le recrutement de la machinerie de recombinaison. Dans des souris chimériques portant des transgènes IgH avec différentes combinaisons des *enhancers* 3', l'augmentation de la SHM, corrélée à une transcription accrue, est fournie par le binôme hs3b/hs4 (Terauchi *et al.*, 2001). A l'inverse, un modèle animal porteur d'un transgène composé d'un segment VDJ réarrangé associé aux activateurs transcriptionnels E $\mu$  et hs1,2 suggère que ces deux éléments ne sont pas suffisants pour induire la SHM (Tumas-Brundage *et al.*, 1997). Dunnick et collaborateurs ont établi des souris transgéniques avec un BAC (*Bacterial Artificial Chromosome* pour chromosome artificiel bactérien) contenant un exon VDJ réarrangé et tous les gènes C<sub>H</sub>, sans la région 3'RR située en aval. Ces souris présentent une diminution de la SHM des exons VDJ réarrangés et un défaut des transcrits germinaux et de la CSR associée (Dunnick *et al.*, 2005, 2009). Avec des BAC contenant différentes combinaisons des quatre *enhancers*, ce groupe a également précisé que l'augmentation de la CSR est proportionnelle au nombre d'*enhancers* présents, confirmant leur activité synergique. De plus, il semblerait que les *core enhancers* plutôt que les 24 Kb de régions IR les séparant soient indispensables à la CSR (Dunnick *et al.*, 2011).

Enfin, l'étude de la lymphopoïèse B chez des souris portant des délétions de la 3'RR endogène fournit une image plus complète du rôle de cette région *in vivo* (**Figure 30**). Ainsi, le remplacement d'hs3a par une cassette *neo<sup>R</sup>* diminue l'expression du locus IgH ainsi que la CSR vers tous les isotypes alors que sa délétion propre n'induit pas de phénotype (Manis *et al.*, 1998). De même, le remplacement d'hs1,2 par une cassette *neo<sup>R</sup>* diminue l'expression du locus IgH ainsi que la CSR vers tous les isotypes excepté IgG1. Cette baisse de la CSR est corrélée à une diminution de la transcription germinale des gènes constants concernés (Cogné *et al.*, 1994). Encore une fois, la délétion propre de cet élément n'entraîne aucun phénotype, suggérant que les phénotypes observés dans ces



souris reflètent « l'effet *neo* » (Manis *et al.*, 1998). La délétion d'hs3b n'entraîne également aucun effet sur le développement B *in vivo* (Bébin *et al.*, 2010). Seule la délétion d'hs4 entraîne un léger phénotype, à savoir une diminution d'expression de la chaîne lourde membranaire dans les cellules B matures au repos (Vincent-Fabert *et al.*, 2009). Tous ces modèles de délétions individuelles des quatre *enhancers* de la 3'RR ont démontré une redondance fonctionnelle de ces éléments dans le contrôle de l'ontogénie B *in vivo*.

De façon similaire à la suppression d'hs4, le modèle murin de délétion conjointe des éléments distaux hs3b et hs4 présente une diminution de l'expression de la chaîne lourde. De plus, cette délétion du couple hs3b/hs4 perturbe la transcription germinale corrélée à une réduction de la CSR et de la sécrétion d'Ig vers tous les isotypes exceptés IgM et IgG1 (Pinaud *et al.*, 2001). Pour autant, les recombinaisons V(D)J et la SHM ne sont pas affectées par la délétion de ces deux éléments (Morvan *et al.*, 2003).

L'obtention au laboratoire d'une lignée murine délétée pour la totalité de la 3'RR (*i.e.* plus de 30 Kb allant d'hs3a jusqu'à hs4 inclus) a clarifié son rôle dans la lymphopoïèse B *in vivo* (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Bien que ces animaux, appelés dans ce manuscrit souris 3'RR-déficientes, présentent une maturation des LB normale jusqu'au stade plasmocytaire, la délétion de la 3'RR abolit la CSR vers tous les gènes C<sub>H</sub> ainsi que la sécrétion vers tous les isotypes. Comparés aux animaux contrôles, les transcrits germinaux I<sub>x</sub>-C<sub>x</sub>, pré-requis pour la CSR, sont diminués par cinq à vingt-cinq suivant les isotypes. A l'inverse, les transcrits hybrides I<sub>μ</sub>-C<sub>x</sub> sont au moins diminués par cent (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Ainsi, la 3'RR semble agir comme une unité fonctionnelle contrôlant la transcription et les événements géniques se produisant après la rencontre avec l'Ag exogène, lors des stades tardifs du développement B.

La dichotomie observée entre transcrits germinaux et hybrides dans les souris 3'RR-déficientes suggère que cette région contrôle la CSR non seulement en stimulant la transcription germinale des gènes C<sub>H</sub> mais aussi en régulant d'autres mécanismes tels que la formation de boucles d'ADN promouvant le rapprochement des séquences à recombiner. Dans ce sens, la technique de 3C a mis en évidence la formation de boucles rapprochant E<sub>μ</sub> de la 3'RR afin de former un complexe E<sub>μ</sub>-3'RR. Dans les LB matures non activés, E<sub>μ</sub> et la 3'RR interagissent et séquestrent tous les gènes C<sub>H</sub>. Selon les cytokines utilisées, l'activation cellulaire B conduit au recrutement des promoteurs germinaux et



des régions S correspondantes au niveau de ce complexe E $\mu$ -3'RR. Ces interactions, stabilisées par AID, favorisent la formation de synapses S-S en rapprochant S $\mu$  des régions S normalement situées en aval (Wuerffel *et al.*, 2007). Ainsi, les éléments 3' agiraient grâce à la formation de boucles permettant une interaction physique directe entre un activateur et un promoteur rendu accessible après stimulation. Sachant que la délétion de cE $\mu$  affecte faiblement la CSR et la formation du complexe E $\mu$ -3'RR, d'autres éléments doivent interagir avec la 3'RR pour favoriser la formation des synapses S-S (Wuerffel *et al.*, 2007). Une étude a démontré qu'après une stimulation LPS plus IL-4, la protéine PTIP (*i.e.* protéine appartenant au complexe KMT2C/D capable de méthyliser H3K4) stabilise la fixation de Pax5 sur la 3'RR et promeut la formation de boucles chromatiniennes vers pIy1, probablement suite à des interactions avec des protéines liées au pI (Schwab *et al.*, 2011).

Notons que son activité transcriptionnelle confère à la 3'RR un rôle dans la lymphomogénèse B associée à des translocations d'oncogènes au locus IgH (pour revue : Vincent-Fabert *et al.*, 2010b). Ce rôle de la 3'RR dans le développement B pathologique sera brièvement présenté en **Annexes**.

En résumé, l'expression de l'IgM n'est que faiblement touchée par des délétions limitées à un des éléments constituant le palindrome, confirmant les redondances fonctionnelles entre ces éléments (Cogné *et al.*, 1994 ; Manis *et al.*, 1998 ; Bébin *et al.*, 2010). Seuls les modèles incluant la délétion de l'élément hs4 (*i.e.* souris KO pour hs4 ou KO pour hs3b/hs4) diminuent l'expression de l'IgM membranaire, et par conséquent du BCR, dans les LB matures au repos (Pinaud *et al.*, 2001; Vincent-Fabert *et al.*, 2009). Il semble toutefois que ce phénotype soit spécifique du statut quiescent de ces cellules puisqu'une fois activés, les LB déficients pour hs4 retrouvent une expression normale de la chaîne lourde (Vincent-Fabert *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, le principal rôle de la 3'RR démontré *in vivo* se limite à la régulation de la CSR et de la transcription associée (Pinaud *et al.*, 2001; Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Un potentiel rôle de la 3'RR dans les stades précoces du développement B et notamment dans les recombinaisons VDJ reste encore à démontrer. De même, dans un contexte endogène, le rôle de la 3'RR dans le contrôle de la SHM n'a pas encore été clairement étudié.



---

# ***Problématique & Objectifs***

---



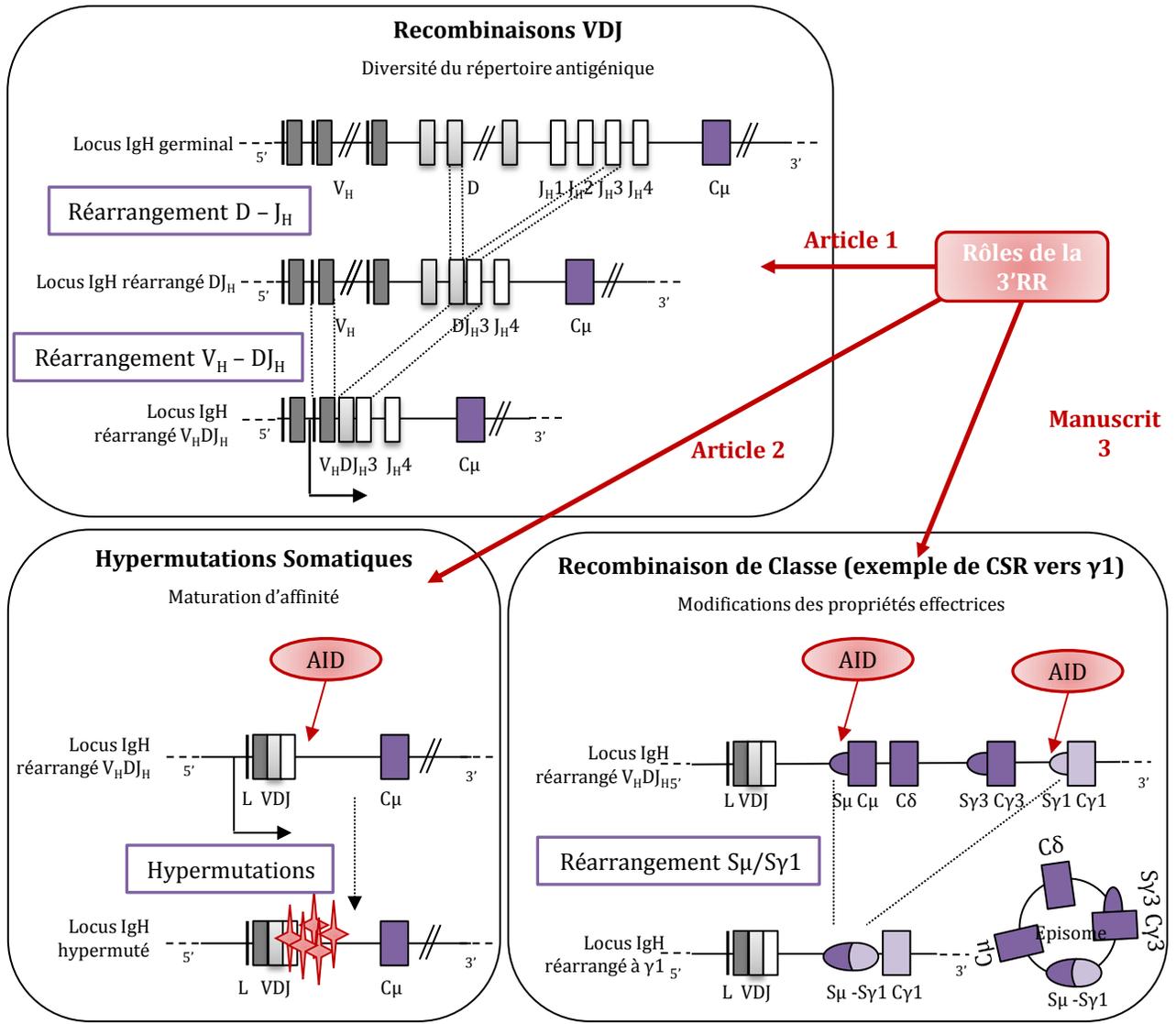
Durant le développement B, le locus *IgH* subit trois évènements majeurs de réarrangements géniques. Lors de la phase précoce de l'ontogénie B, indépendamment de la rencontre avec l'Ag, les recombinaisons V(D)J donnent la diversité au répertoire antigénique. Lors de la phase tardive de la lymphopoïèse B, suite à la rencontre avec l'Ag exogène, les SHM permettent la maturation d'affinité des anticorps. Enfin, la CSR autorise la cellule B à acquérir de nouvelles fonctions effectrices.

Tous ces évènements géniques sont finement régulés et sont notamment sous le contrôle d'éléments *cis*-régulateurs intervenant dans l'accessibilité du locus aux différentes recombinaisons. Dans la partie 3' du locus *IgH*, l'élément régulateur principal est la 3'RR qui s'étend sur environ 30 kb. Elle est constituée de quatre activateurs transcriptionnels formant une structure quasi-palindromique. La délétion individuelle de ces éléments a révélé des rôles redondants. Ainsi, pour clarifier le rôle de la 3'RR dans le développement B, le laboratoire a créé un modèle murin délété pour les 30 kb de cette région : ce sont les souris 3'RR-déficientes (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Dans l'ensemble, ces souris présentent un développement B normal mais montrent une abolition de la CSR vers tous les gènes constants et un déficit de sécrétion de tous les isotypes d'Ig.

L'objectif de ma thèse a été de continuer l'étude des souris 3'RR-déficientes afin de compléter les connaissances actuelles sur le rôle de la 3'RR lors du développement B normal (**Figure 31**).

Ainsi, l'étude des réarrangements VDJ dans ces animaux nous a permis de clarifier le rôle de la 3'RR lors de ce processus et donc de déterminer son implication dans les stades précoces de l'ontogénie B (**Article 1**).

Les souris 3'RR-déficientes présentent un défaut majeur de CSR, processus initié par la même enzyme que la SHM. Ainsi, l'étude des SHM dans les souris 3'RR-déficientes nous a permis de parachever les données actuelles sur le rôle de la 3'RR au cours des stades tardifs de la lymphopoïèse B (**Article 2**).



**Figure 31 : Représentation schématique des objectifs de ma thèse.**

Lors de ma thèse, j'ai étudié des souris présentant une délétion de la 3'RR afin d'analyser les trois évènements géniques se produisant au locus IgH et de déterminer l'implication de la 3'RR dans le contrôle de chacun de ces mécanismes.

Par la suite, nous avons approfondi l'étude du rôle de la 3'RR dans la CSR. Grâce à notre modèle murin, nous avons pu mettre en évidence et caractériser un phénomène rare et encore méconnu : la CSR vers  $\delta$  (**Manuscrit 3**).

Les trois publications issues de ces travaux seront présentées dans la partie **Résultats**.

Les recombinaisons géniques se produisant au locus IgH peuvent être la cause de translocations d'oncogènes. Ces derniers sont alors sous le contrôle des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH, notamment la 3'RR. Cela conduit à leur surexpression, à l'origine du développement de lymphomes.

Au cours de ma thèse, j'ai également contribué à l'étude du rôle de la 3'RR dans la lymphomogénèse B. Pour cela, j'ai poursuivi l'analyse de modèles murins exprimant des lymphomes. Cette partie de mon travail de thèse a donné lieu à trois publications que j'ai co-signé et qui seront présentées en **Annexes**.



---

# ***Résultats***

---



**Article 1. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination.**

Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Remi Fiancette, Michel Cogné, Eric Pinaud & Yves Denizot.

*The Journal of Biological Chemistry*, 2012, volume 287, numéro 11, pages 8356-8360.

**Article 2. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells.**

Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Alexis Saintamand, Rémi Fiancette, Marie Marquet, Isabelle Robert, Bernardo Reina-San-Martin, Eric Pinaud, Michel Cogné & Yves Denizot.

*The Journal of Experimental Medicine*, 2013, volume 210, numéro 8, pages 1501-1507.

**Manuscrit 3. AID-induced C $\mu$ -C $\delta$  class switch recombination occurs independently of the IgH 3' regulatory region.**

Pauline Rouaud\*, Alexis Saintamand\*, Faten Saad, Claire Carrion, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné & Yves Denizot.

\*Contribution équivalente

*En révision à The Journal of Experimental Medicine.*



## Article 1

**Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination.**

Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Remi Fiancette, Michel Cogné, Eric Pinaud & Yves Denizot.

*The Journal of Biological Chemistry*, 2012, volume 287, numéro 11, pages 8356-8360.

**Ces résultats ont également fait l'objet d'une présentation affichée:**

P. Rouaud, C. Vincent-Fabert, R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. The immunoglobulin heavy-chain locus 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) is dispensable for VDJ assembly. British Society of Immunology. 5-7 décembre 2011, Liverpool, UK.

De nombreuses études ont démontré que les éléments régulateurs localisés en 5' du locus IgH contrôlent les réarrangements V(D)J (Nitschke *et al.*, 2001 ; Featherstone *et al.*, 2010 ; Giallourakis *et al.*, 2010 ; Guo *et al.*, 2011a ; Sakai *et al.*, 1999). L'activateur intronique E $\mu$  a d'ailleurs été décrit comme l'élément majeur contrôlant ces recombinaisons (Perlot *et al.*, 2005). Bien que des interactions chromosomiques entre E $\mu$  et la 3'RR aient été mises en évidence dans des cellules pro-B (Guo *et al.*, 2011a et 2011b), le rôle de la 3'RR dans les réarrangements V(D)J n'a jamais été élucidé. Nous avons étudié ce processus dans les souris 3'RR-déficientes.

La technique de recombinaison homologue utilisée pour obtenir les souris 3'RR-déficientes a nécessité une étape de transfection dans des cellules ES de la souche 129, entraînant l'apparition d'un allèle *IgH* d'allotype *a*. L'analyse par cytométrie en flux des cellules CD25<sup>+</sup> de moëlle osseuse de souris hétérozygotes *a* <sup>$\Delta$ 3'RR</sup>/*b*<sup>wt</sup> n'a révélé aucune différence dans l'utilisation des deux allèles. Ainsi, l'allèle *a* délété pour la 3'RR subit les mécanismes de réarrangements V(D)J à un taux similaire à l'allèle *b* sauvage, laissant supposer que la délétion de la 3'RR n'a pas de rôle crucial dans le déroulement de ce processus.

Cependant, la 3'RR pourrait influencer la diversité des réarrangements V(D)J, soit en modifiant le choix des segments V<sub>H</sub>, D et J<sub>H</sub> utilisés pour former le CDR3, soit en altérant le taux des insertions de type N et P autour de la jonction (*i.e.* témoignage de



l'activité de la TdT lors des mécanismes de réparation mis en œuvre pour associer les trois segments).

Ainsi, nous avons analysé l'usage des segments  $V_H$  et  $J_H$  par PCR multiplex. Pour cela, 92 PCR (technique couplant 23 amorces dans les segments  $V_H$  les plus représentés et les 4 segments  $J_H$ ) ont été réalisées à partir de l'ADNg de cellules CD25<sup>+</sup> afin de s'affranchir des biais de répertoire générés par la sélection antigénique. Les résultats obtenus n'ont mis en évidence aucune différence dans la diversité des segments utilisés lors des réarrangements V(D)J entre des animaux *Wt* et les souris 3'RR-déficientes. La 3'RR ne contrôle donc pas la diversité des segments  $V_H$  et  $J_H$  utilisés.

L'amplification, le clonage et le séquençage des jonctions D dans des cellules pré-B CD25<sup>+</sup> (*i.e.* avant sélection antigénique) et dans des splénocytes CD43<sup>-</sup> (*i.e.* après sélection antigénique) n'ont révélé aucune différence ni dans l'usage des segments D, ni dans le pourcentage de séquences N et P au niveau de la jonction.

En dépit de ses interactions avec  $E\mu$  aux stades précoces du développement B, nous avons montré que la 3'RR est dispensable pour le processus de réarrangements V(D)J.





## Article 2

**The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells**

Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Alexis Saintamand, Rémi Fiancette, Marie Marquet, Isabelle Robert, Bernardo Reina-San-Martin, Eric Pinaud, Michel Cogné & Yves Denizot.

*The Journal of Experimental Medicine*, 2013, volume 210, numéro 8, pages 1501-1507.

**Ces résultats ont également fait l'objet de deux présentations orales:**

P. Rouaud, C. Vincent-Fabert, R. Fiancette, M. Marquet, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region is a key control element of heavy chain somatic hypermutation in mice. European Congress of Immunology. 5-8 septembre 2012, Glasgow, UK.

P. Rouaud, C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, M. Cogné, E. Pinaud and Y. Denizot. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B-cells. 4th workshop Axe 2 Cancéropôle GSO. 18-19 avril 2013, Toulouse, France.

Les éléments régulateurs localisés en 5' du locus IgH contrôlent les réarrangements V(D)J (Nitschke *et al.*, 2001 ; Perlot *et al.*, 2005 ; Featherstone *et al.*, 2010 ; Giallourakis *et al.*, 2010 ; Guo *et al.*, 2011a ; Sakai *et al.*, 1999) alors que la 3'RR est impliquée dans la CSR (Pinaud *et al.*, 2001 ; Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Bien que la CSR et la SHM soient des mécanismes AID-dépendants survenant dans les centres germinatifs, le rôle de la 3'RR dans la SHM est encore incertain. La délétion génomique des deux derniers éléments constituant la 3'RR (souris hs3b/hs4-déficientes) n'affecte pas ce processus (Morvan *et al.*, 2003). A l'inverse, des expériences de transgénèses montrent que hs3b et hs4 permettent la SHM de régions préalablement transcrites (Tumas-Brundage *et al.*, 1997 ; Terauchi *et al.*, 2001). L'utilisation de transgènes BAC présentant ou non la totalité de la 3'RR démontrent l'importance de cette région dans la SHM du segment V(D)J déjà réarrangé (Dunnick *et al.*, 2009). Afin de clarifier le rôle de la 3'RR dans la SHM, nous avons analysé ce phénomène dans les souris 3'RR-déficientes.

Pour cela, nous avons trié les cellules activées des GC (B220<sup>+</sup>PNA<sup>high</sup>Fas<sup>+</sup>) à partir de plaques de Peyer de souris 3'RR-déficientes et *Wt*. Ces animaux ont été préalablement immunisés par voie orale avec des globules rouges de mouton à 10%



pendant quinze jours et par voie intra-péritonéale avec du LPS à 10 µg de LPS pendant trois jours. En accord avec un développement B normal, l'analyse par cytométrie en flux a révélé des taux similaires de cellules B220<sup>+</sup>PNA<sup>high</sup>Fas<sup>+</sup> entre les souris 3'RR-déficientes et les *Wt*.

Nous avons alors amplifié, cloné et séquencé les régions V(D)J réarrangées aux loci IgH et Igκ. L'analyse de la SHM dans la région variable du locus IgH chez les souris 3'RR-déficientes montre une diminution de 90% du nombre de séquences mutées ainsi qu'une réduction de 98% du nombre de mutations par séquences.

Pour vérifier que cette diminution du taux de mutations dans les souris 3'RR-déficientes n'est pas due à un défaut global de mutations dans ces animaux, nous avons analysé la SHM dans la région variable du locus Igκ (*i.e.* chaîne légère des Ig). La comparaison avec des animaux *Wt* ne révèle aucune différence que ce soit dans le pourcentage de séquences mutées (91% chez les *Wt* versus 87% dans les animaux 3'RR-déficients) ou dans le nombre de mutations par séquence.

Sµ est également une région connue pour subir la SHM avec une fréquence élevée en 5' puis une diminution vers son extrémité 3'. Pour contrôler si la délétion de la 3'RR affecte ce profil de mutations, nous avons analysé la SHM en 5' de Sµ dans les souris 3'RR-déficientes. En accord avec les résultats obtenus dans la région variable du locus IgH, nous avons mis en évidence, chez ces souris, une diminution drastique du taux de SHM comparé aux *Wt*.

Ainsi, nos résultats montrent que, comme pour la CSR, la 3'RR est le principal élément contrôlant la SHM. Ces données renforcent le concept selon lequel, par opposition à l'activateur intronique Eµ, la 3'RR régit l'activité du locus aux stades tardifs du développement B.

La SHM est corrélée à la transcription (Fukita *et al.*, 1998). Afin de déterminer le mécanisme par lequel la 3'RR contrôle la SHM, nous avons analysé la transcription dans les cellules subissant la SHM. Comme attendu, la transcription primaire aux loci Igκ n'est pas affectée par la délétion de la 3'RR. De façon surprenante, la transcription n'est que faiblement diminuée au locus IgH (réduction d'un facteur deux). Pour confirmer nos



résultats, nous avons analysé la transcription dans des cellules B220<sup>+</sup>PNA<sup>high</sup> de rate provenant d'animaux 3'RR-déficients. De même que dans les plaques de Peyer, la transcription primaire est légèrement diminuée au locus IgH alors qu'elle n'est pas affectée au locus Igκ. La mise en évidence d'un recrutement de la RNA Pol II, au locus IgH des souris 3'RR-déficientes, confirme la présence d'une transcription active. Néanmoins, la faible diminution de la transcription observée dans les souris 3'RR-déficientes ne peut expliquer à elle seule la disparition de la SHM dans ces animaux.

La 3'RR étant une cible d'AID (Péron *et al.*, 2012), nous avons émis l'hypothèse d'une interaction entre la 3'RR et AID, permettant son recrutement au locus IgH. Dans nos animaux 3'RR-déficients, AID ne pourrait plus être recrutée et ne pourrait donc plus jouer son rôle, notamment lors de la SHM. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé le recrutement d'AID par CHIP. Seul un bruit de fond d'immunoprécipitation d'AID, comparable à celui observé dans des animaux AID-déficients, est détecté au locus IgH des souris 3'RR-déficientes, suggérant donc que le recrutement d'AID au locus IgH se produit de façon 3'RR-dépendante.

En conclusion, notre étude montre que :

- La 3'RR est essentielle au processus de SHM ;
- AID est recrutée au locus IgH par un mécanisme dépendant de la 3'RR ;
- Contrairement aux dogmes établis, la SHM ne suit pas la transcription de façon linéaire et proportionnelle.





## Manuscrit 3

**AID-induced C $\mu$ -C $\delta$  class switch recombination occurs independently of the IgH 3' regulatory region.**

Pauline Rouaud\*, Alexis Saintamand\*, Faten Saad, Claire Carrion, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné & Yves Denizot.

\*Contribution équivalente

En révision à *The Journal of Experimental Medicine*

La CSR consiste en la substitution du gène constant C $\mu$  par un des gènes constants  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$  situé en aval afin de générer des Ig respectivement d'isotypes IgG, E ou A, ayant des propriétés effectrices qui leur sont propres. Ce mécanisme se produit grâce à la présence, en amont de chaque gène constant excepté  $\delta$ , de régions répétitives appelées régions S. En raison de l'absence de région S, l'obtention d'une Ig d'isotype IgD se fait par épissage alternatif d'un long ARN pré-messager contenant les exons  $\mu$  et  $\delta$ , autorisant la co-expression IgM/IgD. Cependant, il y a plusieurs années, l'étude d'un myélome à IgD a révélé la délétion du gène C $\mu$  (Arpin *et al.*, 1998). De même, une étude récente réalisée chez l'Homme a montré que quelques rares cellules B étaient capables de recombiner à IgD après une délétion du gène C $\mu$  médiée par AID (Chen *et al.*, 2009 ; Chen and Cerutti, 2010). Les cellules IgM-IgD<sup>+</sup> résultantes sont principalement retrouvées dans les amygdales et les muqueuses nasales. Chez des souris Wt, la présence de cellules B IgM<sup>low</sup>IgD<sup>high</sup> du côté anti-mésentérique de l'intestin (Hamada *et al.*, 2002), pourrait représenter la contrepartie murine des cellules IgM-IgD<sup>+</sup> humaines.

Ainsi, nous avons voulu confirmer l'existence d'une CSR vers  $\delta$  chez la souris. De plus, la 3'RR étant le principal élément de régulation de la CSR vers  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$  (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a), nous avons voulu étudier son implication dans celle vers  $\delta$ .

Pour commencer notre étude, nous avons cherché à caractériser la CSR vers IgD dans les ganglions mésentériques (MLN pour *Mesenteric Lymph Nodes*) de souris Wt. Après avoir confirmé la présence d'une région S-like en amont de C $\delta$  appelée  $\sigma_\delta$  (Preud'homme *et al.*, 2000), nous avons détecté des jonctions S $\mu$ - $\sigma_\delta$  par une technique d'amplification par PCR nichée suivie d'une hybridation. L'amplification, le clonage et le



séquençage de ces jonctions  $S\mu-\sigma\delta$  nous a permis d'analyser le type de jonction (jonctions directes, micro-homologies, insertions et recombinaison inter-allélique, *i.e.* mécanisme de réparation mis en œuvre) et les mutations autour de la jonction (*i.e.* stigmates AID). Leur comparaison avec des jonctions obtenues après CSR vers  $\gamma 1$  et  $\gamma 3$ , nous a révélé que la CSR vers  $\delta$  présente des caractéristiques différentes des CSR dites « classiques ». En effet, bien que la localisation des cassures dans les régions S soit comparable, les jonctions  $S\mu-\sigma\delta$  sont majoritairement de type micro-homologies >5pb, insertions et recombinaisons inter-alléliques alors que les jonctions « classiques » sont principalement directes ou de faible micro-homologie. De plus, la fréquence de mutations dans  $S\mu$  et la région S acceptrice est diminuée lors de la CSR vers  $\delta$ , impliquant un ciblage moins important d'AID lors de cette CSR. Néanmoins et de façon similaire à l'homme, l'impossibilité à détecter ces jonctions dans des animaux AID-déficients nous indique que cette recombinaison est bien dépendante d'AID.

La CSR vers  $\delta$  semblant différente des CSR « classiques », nous avons voulu déterminer si elle est également dépendante de la 3'RR. L'analyse par hybridation et séquençage nous a permis de mettre en évidence des jonctions  $S\mu-\sigma\delta$  dans les souris 3'RR-déficientes. Ces jonctions sont plus abondamment représentées que dans des souris *Wt* (tout en présentant les mêmes caractéristiques) et sont donc clairement 3'RR-indépendantes. De plus, la technique de LM-PCR (*Ligation-Mediated PCR*) a mis en évidence une augmentation des cassures dans  $\sigma\delta$  chez les animaux 3'RR-déficients. De façon surprenante, le profil de mutations des jonctions  $S\mu-\sigma\delta$  est identique entre les souris *Wt* et 3'RR-déficientes. Cependant, ces cellules présentent un répertoire B naïf, que ce soit au locus IgH ou, plus surprenant, au locus contrôle Ig $\kappa$ . Cette absence de SHM laisse supposer que ces cellules subissent la CSR après une activation T-indépendante (Bergqvist *et al.*, 2010). En accord avec leur répertoire naïf, seulement 10 % de ces cellules sont PNA<sup>high</sup>Fas<sup>+</sup> et B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>, confirmant une activation T-indépendante (Bergqvist *et al.*, 2010). La caractérisation phénotypique des cellules IgM-IgD<sup>+</sup> par cytométrie en flux et immunohistochimie a également révélé que, comme chez l'homme, ces cellules sont CD5<sup>+</sup>, Cd11b<sup>-</sup>, CD138<sup>-</sup> (Chen *et al.*, 2009).



Nos résultats montrent que malgré l'absence d'une région S $\delta$  classique, la CSR vers  $\delta$  existe dans des souris *Wt* mais présente des caractéristiques différentes des CSR vers  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$  : (1) elle se produit de façon 3'RR-indépendante ; (2) la diminution des mutations dans ces jonctions suggère un ciblage moins important d'AID ; (3) contrairement aux jonctions S $\mu$ -S $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$  réparées par la voie du C-NHEJ, les jonctions S $\mu$ -S $\delta$  présentent des caractéristiques typiques de la voie de réparation de l'A-EJ (Yan *et al.*, 2007) ; (4) Les cellules IgD<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup> et les jonctions S $\mu$ -S $\delta$  résultantes sont uniquement détectées dans les MLN où l'activation semble être T-indépendante.



**Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region**

Running title: Regulation of  $\mu\delta$ CSR

Pauline Rouaud, Alexis Saintamand, Faten Saad, Claire Carrion, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné, Yves Denizot

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

Address correspondence : 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](mailto:yves.denizot@unilim.fr)

Keywords: B cells, IgH 3' regulatory region, knock-out mice, class switch recombination, IgD, AID





---

## ***Discussion & Perspectives***

---



## 1. La 3'RR : une région très étudiée

Au moyen d'un modèle murin déjà présent au laboratoire, mes travaux de thèse se sont concentrés sur la 3'RR. Les fonctions de cette région à la structure complexe restent encore incertaines.

### 1.1. De sa découverte à son analyse *in vitro* et *in vivo*

Depuis la découverte en 1991 du premier élément la constituant (Dariavach *et al.*, 1991; Lieberson *et al.*, 1991), la 3'RR a fait l'objet de nombreuses études.

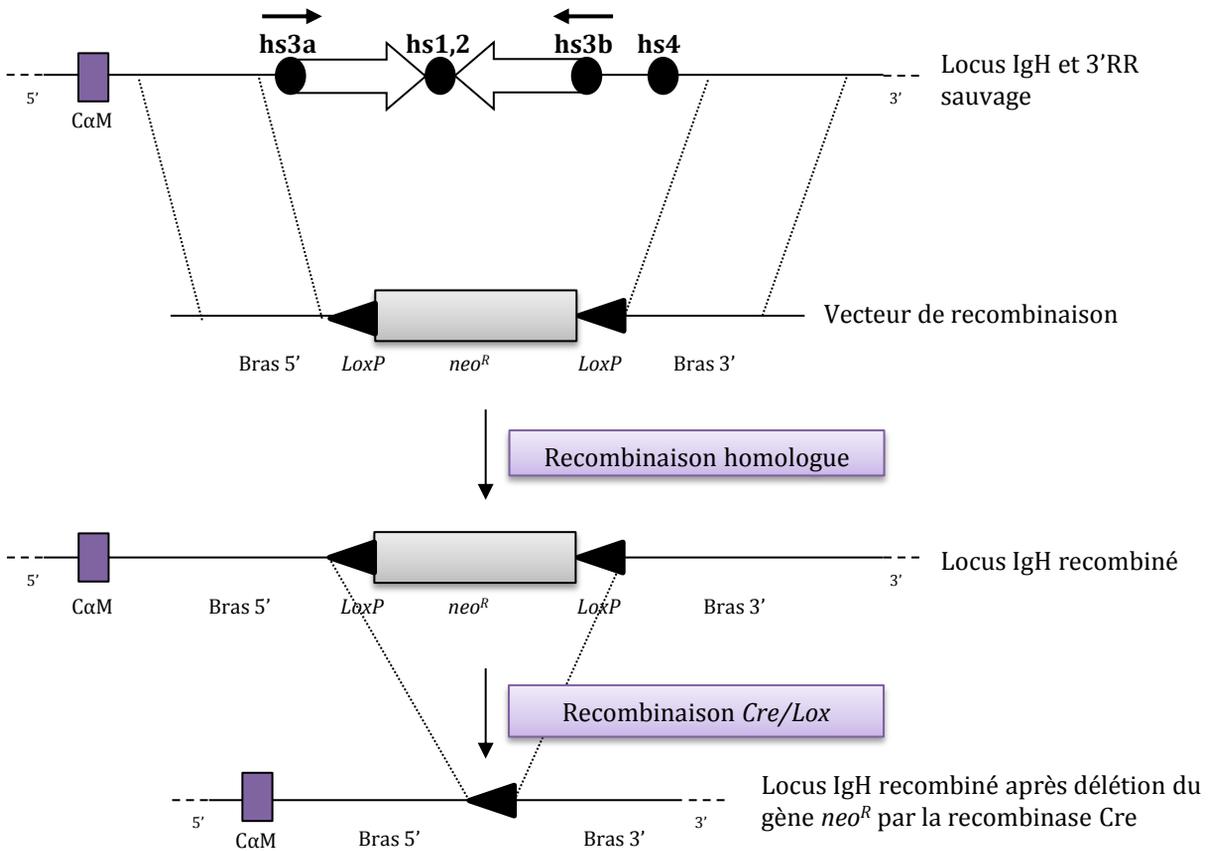
La cinétique d'activité et la synergie des différents éléments la composant ont d'abord été analysées par des systèmes de gènes rapporteurs (Dariavach *et al.*, 1991 ; Matthias and Baltimore, 1993 ; Madisen and Groudine, 1994 ; Michaelson *et al.*, 1995 ; Chauveau *et al.*, 1998). Il est ressorti de ces études une activité synergique des éléments constituant la 3'RR lors des stades tardifs de l'ontogénie B.

Par la suite, le rôle de la 3'RR dans le développement B et dans les événements géniques le ponctuant a été analysé au moyen de lignées présentant des délétions spontanées ou ciblées d'une partie de la 3'RR (Gregor and Morrison, 1986 ; Lieberson *et al.*, 1995 ; Saleque *et al.*, 1999 ; Shi and Eckhardt, 2001). Ces études ont confirmé un rôle des *enhancers* lors des stades tardifs de l'ontogénie B.

Enfin, l'utilisation de grands transgènes et/ou de BAC chez la souris a confirmé le rôle de la 3'RR lors des mécanismes de diversification secondaire (*i.e.* SHM et CSR) *in vivo* (Tumas-Brundage *et al.*, 1997 ; Terauchi *et al.*, 2001 ; Laurencikienė *et al.*, 2007 ; Dunnick *et al.*, 2005, 2009, 2011).

### 1.2. De la transgénèse à la délétion endogène

Cependant, toutes ces études ne fournissent qu'une vision restreinte du rôle de la 3'RR dans la lymphopoïèse B. En effet, ces études ont été réalisées *in vitro* ou *in vivo* au moyen de transgènes, sans jamais représenter le contexte endogène. Il est maintenant admis que le meilleur moyen de déterminer le rôle d'une région régulatrice dans le



**Figure 32 : Représentation schématique de la technique de recombinaison homologue utilisée pour générer les souris 3'RR-déficientes.**

La première ligne représente la 3'RR au locus IgH dans sa configuration sauvage

La deuxième représente le vecteur de recombinaison avec les deux bras encadrant la région à déléter ainsi que la cassette *neo<sup>R</sup>* flanquée de sites *LoxP*.

La troisième ligne représente le locus IgH après recombinaison : la 3'RR a été remplacée par la cassette *neo<sup>R</sup>*.

La quatrième ligne représente le locus IgH recombiné après délétion du gène *neo<sup>R</sup>* par la recombinaison Cre: la délétion est « propre ».

développement cellulaire consiste à réaliser le KO de cette région pour regarder, *in vivo*, son impact chez la souris.

L'invalidation se fait alors par la technique de recombinaison homologue (**Figure 32**). Les premières étapes consistent en la création d'un vecteur de clonage comprenant : (1) deux « bras » correspondant aux régions d'ADN en amont et en aval de celle à éliminer ; (2) différentes cassettes de sélection permettant de cribler les cellules ES recombinantes. Notamment, la cassette *neo<sup>R</sup>* qui est flanquée de sites LoxP est placée entre les bras 5' et 3' afin de remplacer la région d'intérêt suite à la recombinaison homologue. Après transfection, les cellules ES recombinantes sur un allèle sont injectées dans des blastocystes, eux-mêmes réimplantés dans des souris pseudo-gestantes en vue de l'obtention de chimères. Une lignée homozygote pour la délétion est ensuite dérivée de ces chimères. Les animaux possèdent alors le gène *neo<sup>R</sup>* à la place de la région à étudier. Afin de s'affranchir de « l'effet *neo* » et de réaliser une délétion propre, les souris *neo<sup>R</sup>/neo<sup>R</sup>* sont croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre : on obtient des souris  $\Delta/\Delta$  (Cohen-Tannoudji and Babinet, 1998).

La grande majorité des KO de la 3'RR ont été réalisés au laboratoire et ont mis en évidence une redondance fonctionnelles des *enhancers* constituant la 3'RR (Cogné *et al.*, 1994 ; Manis *et al.*, 1998 ; Vincent-Fabert *et al.*, 2009 ; Bébin *et al.*, 2010). Seule la délétion conjointe d'hs3b et d'hs4 conduit à une diminution de la transcription germinale corrélée à une réduction de la CSR et de la sécrétion d'Ig vers tous les isotypes, exceptés IgM et IgG1 (Pinaud *et al.*, 2001), sans toutefois affecter les réarrangements VDJ, ni la SHM (Morvan *et al.*, 2003). Pour confirmer les différents phénotypes observés *in vivo* et potentiellement atténués par des redondances fonctionnelles entre les *enhancers* 3', le laboratoire a créé une lignée murine présentant une délétion génomique de la totalité de la 3'RR, depuis hs3a jusqu'à hs4 : ce sont les souris 3'RR-déficientes (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Ces animaux présentent un défaut majeur de CSR et de sécrétion d'Ig vers tous les isotypes (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a), confirmant le rôle de la 3'RR lors des stades tardifs du développement B.



### 1.3. Intérêts et limites de notre modèle murin 3'RR-déficient

Contrairement aux souris transgéniques présentant un BAC du locus IgH sans la 3'RR (Dunnick *et al.*, 2005, 2009), les souris 3'RR-déficientes permettent des analyses du développement B dans un contexte endogène. Ainsi, ces animaux ont fait l'objet d'études encore jamais réalisées telles que le rôle de la 3'RR lors des réarrangements VDJ (**Article 1**) et lors de la formation des boucles d'ADN concomitantes à ces réarrangements (Medvedovic *et al.*, 2013). Notre modèle nous a également permis de réconcilier les données actuelles sur le rôle de la 3'RR dans la SHM (Tumas-Brundage *et al.*, 1997 ; Terauchi *et al.*, 2001 ; Morvan *et al.*, 2003 ; Dunnick *et al.*, 2009) tout en apportant une avancée dans la compréhension d'un phénomène très étudié : le recrutement d'AID au locus IgH (**Article 2**). De plus, notre modèle s'est révélé un très bon outil dans la mise en évidence et surtout la caractérisation d'un mécanisme encore méconnu : la CSR vers  $\delta$  (**Manuscrit 3**).

Nous pouvons toutefois nous demander si les phénotypes observables dans les souris 3'RR-déficientes sont la conséquence de la délétion de la 3'RR en tant que telle ou de la délétion de 30 Kb dans le génome de l'animal. Dans l'hypothèse où la délétion de 30 Kb induirait un phénotype, nous pouvons supposer que celui-ci serait détectable dès les stades précoces du développement B. Or, les souris 3'RR-déficientes présentent un développement B médullaire normal. Comparativement aux modèles murins de BAC ou de délétion conjointe hs3b/hs4, le phénotype observé chez les souris 3'RR-déficientes est aggravé, suggérant que ces observations sont une conséquence de l'absence de la 3'RR.

### 1.4. Toujours plus de modèles murins pour étudier la 3'RR

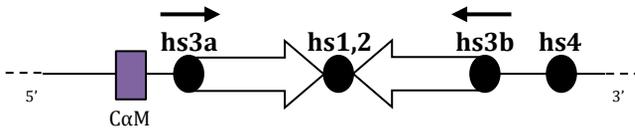
A l'heure actuelle et malgré les nombreux modèles d'étude disponibles, il est encore difficile d'aborder la fonction précise de chaque élément constituant la 3'RR (activateurs transcriptionnels, régions répétées inversées). La redondance entre éléments, les synergies possibles et les interactions que 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. Dans ce sens, le rôle de la structure quasi-palindromique dans l'activité de la 3'RR reste une question

A

Représentation schématique des différentes délétions effectuées

Éléments supprimés

Avancement du projet

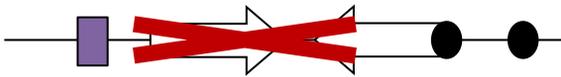


3'RR sauvage



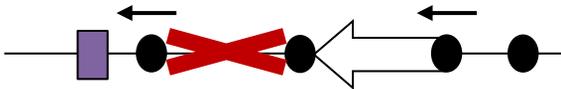
**Quasi-palindrome :**  
hs3a, hs1,2 et hs3b

Obtention d'animaux  $\Delta/\Delta$   
Marquet et al,  
expériences en cours  
de réalisation



**Pour comparaison  
avec le KO hs3b/hs4 :**  
hs3a et hs1,2

Obtention de  
chimères et attente  
de transmission

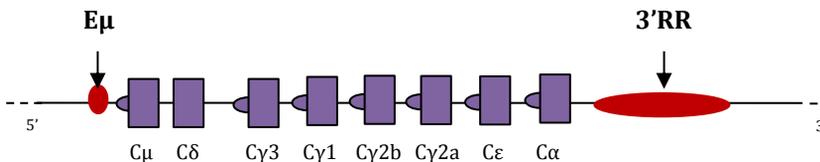


**Déstructuration du  
palindrome :** délétion  
des régions IR entre  
hs3a et hs1,2 et  
réintroduction d'hs1,2  
et d'hs3a en orientation  
inverse

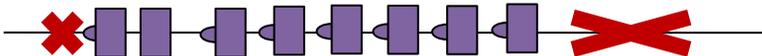
B

Représentation schématique de la double délétion effectuée

Avancement du projet



Eμ et 3'RR sauvages



Obtention de chimères et attente de transmission

**Figure 33 : Perspectives de modèles murins avec des délétions de la 3'RR.**

A : Dans la colonne de gauche, les croix rouges représentent les délétions effectuées. La colonne du milieu cite en détail les éléments supprimés et la dernière colonne correspond à l'avancement des projets.

B : Dans la colonne de gauche, les croix rouges représentent les délétions effectuées et la deuxième colonne correspond à l'avancement du projet.

particulièrement pertinente qu'il convient de continuer à étudier. En effet, sachant que la structure quasi-palindromique de la 3'RR est très conservée au cours de l'évolution (D'Addabbo *et al.*, 2011) et que les KO individuels des *enhancers* n'engendrent pas de phénotype, nous pouvons nous demander si ceux observés lors de délétions multiples proviennent des *enhancers* eux-mêmes ou de la structure si particulière de cette région.

Pour répondre à cette problématique, le laboratoire a généré une lignée murine présentant une délétion des trois éléments qui constituent le palindrome (*i.e.* hs3a à hs3b) (expériences en cours de réalisation par l'équipe du Dr Pinaud). L'analyse de ces souris et leur comparaison avec les animaux déficients pour hs4 (Vincent-Fabert *et al.*, 2009) pourra apporter un début de réponse concernant l'expression de l'IgM aux stades matures. De même, afin de déterminer plus précisément les *enhancers* responsables de la production d'IgM et d'IgG1 (*i.e.* isotypes persistant dans le double KO hs3b/hs4 mais pas dans le KO total de la 3'RR), nous générons actuellement des animaux déficients pour le couple hs3a/hs1,2 (**Figure 33A**).

Cependant, ces approches restent encore trop « radicales », laissant ouverte la question du rôle de la structure quasi-palindromique, en dehors des éléments *core enhancers*. En effet, est-ce que les régions IR présentes à l'intérieur de ce palindrome sont importantes ? Pour répondre à cette question, un projet est en cours dans lequel les régions IR entre hs3a et hs1,2 sont éliminées et où hs3a et hs1,2 sont ré-introduits, avec hs3a dans le même sens que hs3b. Ainsi, la structure quasi-palindromique est perturbée, tout en gardant les *enhancers*. La comparaison de ces animaux avec les animaux KO hs3a/hs1,2 nous renseignera plus précisément sur le rôle des IR et de la structure quasi-palindromique (**Figure 33A**).



## 2. Le rôle de la 3'RR lors des stades précoces de l'ontogénie B

La première partie de mon travail de thèse a consisté à étudier les réarrangements VDJ dans les souris 3'RR-déficientes afin de clarifier le rôle de cette région dans la création et la diversité du répertoire antigénique, et donc de déterminer son implication dans les stades précoces de l'ontogénie B (**Article 1**).

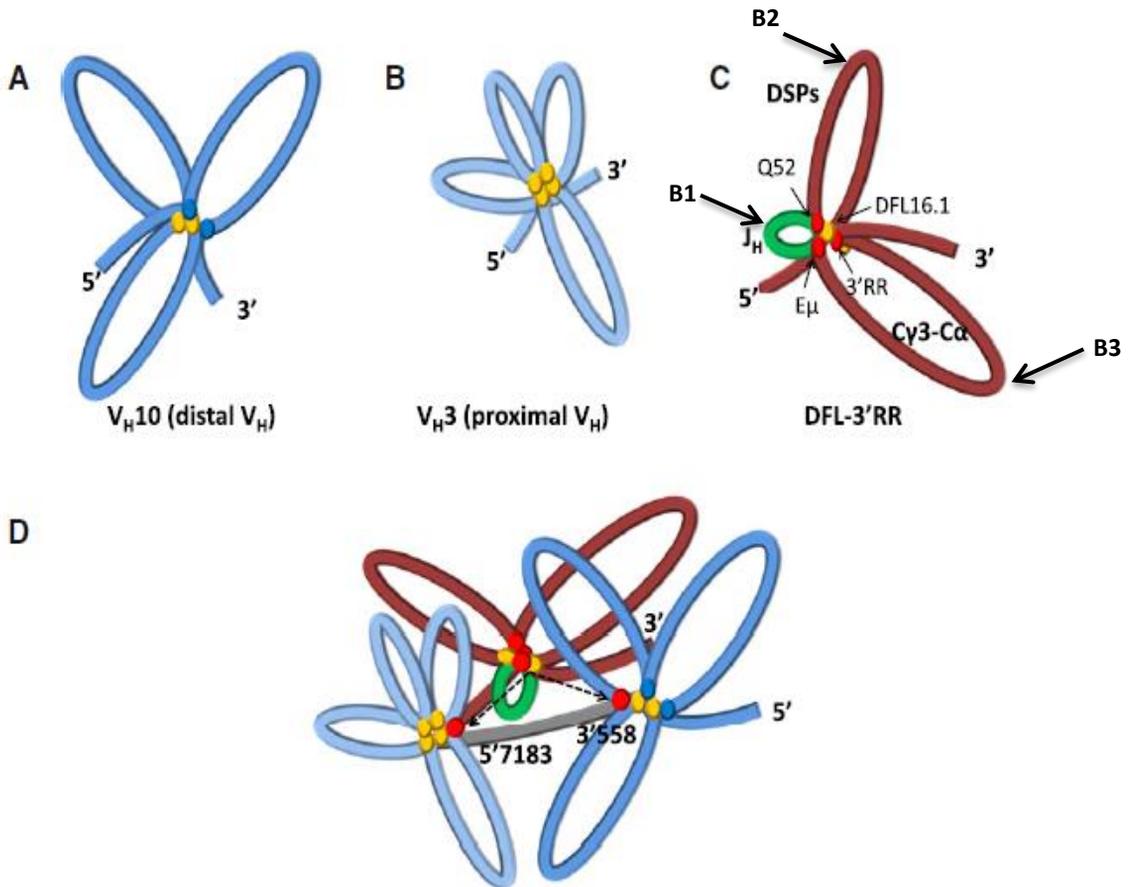
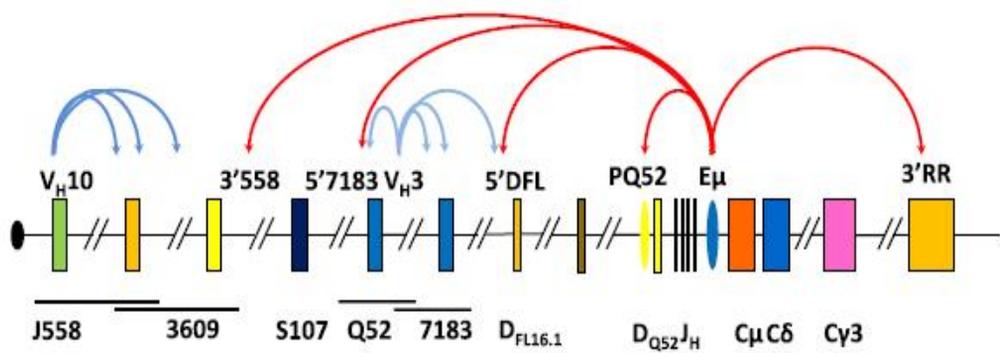
### 2.1. La 3'RR et le développement B médullaire

L'analyse des LB issus de la moelle osseuse d'animaux hétérozygotes a montré une utilisation équivalente des deux allotypes  $a^{\Delta 3'RR}$  et  $b^{Wt}$ . De plus, dans des animaux homozygotes, la chaîne lourde est transcrite de façon similaire aux animaux *Wt* dans les cellules pro-B et pré-B (données non publiées). Ces résultats confirment le développement B médullaire normal décrit par Vincent-Fabert et collaborateurs dans ces animaux (Vincent-Fabert *et al.*, 2010).

### 2.2. La 3'RR et les réarrangements VDJ

Le développement B précoce normal observé en l'absence de la 3'RR semble indiquer que l'allèle muté subit les réarrangements VDJ à un taux similaire à l'allèle sauvage. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude des réarrangements VDJ dans des cellules pro-B d'animaux 3'RR-déficients comparés aux *Wt*. Au-delà de la diversité combinatoire (*i.e.* choix des segments  $V_H$ , D et  $J_H$  utilisés), la diversité jonctionnelle générée lors du raccord des trois segments  $V_H$ , D et  $J_H$  n'est pas altérée par la délétion de la 3'RR. La 3'RR est donc dispensable à la création et à la diversité du répertoire antigénique.

Nos résultats confirment ceux obtenus avec les KO d'hs4 seul ou du couple hs3b/hs4 (Morvan *et al.*, 2003 ; Vincent-Fabert *et al.*, 2009). Alors que ces modèles pourraient refléter la redondance fonctionnelle entre les *enhancers*, l'absence de phénotype aux stades précoces dans notre modèle de délétion totale confirme que la 3'RR dans sa totalité n'est pas impliquée dans le contrôle du développement B médullaire, invalidant alors l'hypothèse d'un rôle précoce d'hs4.



**Figure 34 : Compaction du locus IgH au cours des réarrangements VDJ.**

A-C : Le premier degré 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 : Ces deux domaines sont constitués de plusieurs boucles dont la formation est indépendante d'Eμ. Ils impliquent l'interaction des segments V<sub>H</sub> distaux et proximaux entre eux.

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

D : Le deuxième degré de compaction de la chromatine implique l'interaction de Eμ avec des sites spécifiques de la région V<sub>H</sub>.

(D'après Guo et al., 2011)

### 2.3. Une coopération E $\mu$ -3'RR ?

Nos résultats contrastent avec ceux obtenus chez les souris E $\mu$ -déficientes (Perlot *et al.*, 2005) et suggèrent que parmi les éléments *cis*-régulateurs du locus *IgH*, seuls ceux situés en 5' seraient impliqués dans les stades précoces du développement B. Cependant, l'activité résiduelle des événements de recombinaison dans les animaux déficients pour E $\mu$  suggère l'implication d'autre(s) élément(s). Parmi les candidats potentiels, PDQ52 est exclu car sa délétion conjointe avec E $\mu$  n'aggrave pas le phénotype engendré par la simple délétion d'E $\mu$  (Afshar *et al.*, 2006).

Suite à plusieurs études, la 3'RR semblait être un bon candidat pour une éventuelle coopération avec E $\mu$  lors des réarrangements VDJ. En effet, par analogie au locus *IgH*, la délétion de l'enhancer intronique E $\kappa$  réduit les réarrangements V $\kappa$ -J $\kappa$  (Xu *et al.*, 1996), alors que sa délétion conjointe avec les *enhancers* 3' *Igk* bloque complètement les recombinaisons V $\kappa$ -J $\kappa$  (Inlay *et al.*, 2002). De plus, une interaction physique entre E $\mu$  et la 3'RR a été démontrée par la technique de 3C lors des réarrangements VDJ (Guo *et al.*, 2011a). En effet, les travaux du groupe de Sen ont démontré deux degrés de compaction chromosomique lors des réarrangements VDJ : le premier correspond à trois structures 3D créées suite à la formation de boucles d'ADN (**Figure 34A, B et C**) ; le second correspond au rapprochement spatial de ces différentes structures (**Figure 34D**). La formation des deux premières structures 3D est indépendante d'E $\mu$ . A l'inverse, la troisième structure formée de trois boucles d'ADN est la conséquence d'interactions entre E $\mu$  et PDQ52, entre E $\mu$  et IGCR1 et enfin entre E $\mu$  et la 3'RR. Cette structure créerait un domaine D-J $_H$ -E $\mu$ -C $_H$  favorisant l'exécution des réarrangements D-J $_H$  au stade pré-proB. Par des expériences de CHIP, Guo et collaborateurs proposent que les interactions avec E $\mu$  fassent intervenir le facteur de transcription YY1, dont la délétion avait déjà démontré une implication dans la contraction du locus *IgH* (Liu *et al.*, 2007a). Au stade pro-B, ces interactions dépendantes d'E $\mu$  et impliquant YY1 seraient en partie responsables du rapprochement physique entre les segments V $_H$  et la région D-J $_H$  (Guo *et al.*, 2011a).

Nos résultats démontrant que la 3'RR est dispensable aux réarrangements VDJ remettent en cause cette interaction E $\mu$ -3'RR. A moins que l'absence d'interaction E $\mu$ -3'RR dans notre modèle murin ne soit compensée par l'interaction d'E $\mu$  avec les CBE situés dans la région 3' (*i.e.* région isolatrice située en 3' de la 3'RR) (Guo *et al.*, 2011a) ?



Pour clarifier définitivement cette éventuelle coopération E $\mu$ -3'RR, nous générons actuellement des souris KO pour E $\mu$  et la 3'RR. A l'instar du modèle murin ciblant le locus I $\mu$  (Inlay *et al.*, 2002), nous tentons d'obtenir des animaux déficients pour les deux *enhancers* sur le même allèle (**Figure 33B**).



### 3. Le rôle de la 3'RR lors des stades tardifs de l'ontogénie B

La deuxième partie de mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle de la 3'RR lors des stades tardifs du développement B, en étudiant les processus de SHM et de CSR dans les souris 3'RR-déficientes (**Article 2 et Manuscrit 3**).

#### 3.1. La 3'RR et le développement B en périphérie

La maturation et le devenir des LB dépendent des signaux de survie fournis par le pré-BCR et le BCR (*i.e.* point de contrôle 1 et 2 de l'ontogénie B). Bien que présentant un développement B précoce normal, les souris 3'RR-déficientes diminuent la transcription globale au locus IgH (et par conséquent l'expression du BCR) dans les LB matures (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Ces résultats sont cohérents avec une étude ayant mis en évidence une interaction pV<sub>H</sub>-3'RR non dépendante d'E $\mu$  et corrélée à la transcription de la chaîne lourde aux stades tardifs (Ju *et al.*, 2007).

Contrairement aux résultats obtenus avec des LB immatures issus de la moelle osseuse, certains résultats préliminaires obtenus dans des animaux hétérozygotes  $a^{\Delta 3'RR}/b^{Wt}$  montrent une surexpression de l'allèle *b* dans les LB de la rate (Rouaud, Saintamand *et al.*, en préparation). Cette dichotomie entre développement B précoce et tardif dans les animaux 3'RR-déficients suggère un blocage de la maturation B en périphérie. Pour déterminer l'impact de cette réduction de transcription et d'expression du locus IgH dans le devenir des LB 3'RR-déficients, nous allons analyser précisément les différentes populations matures de la rate ainsi que la qualité de la signalisation fournie par le BCR après activation de ces cellules.

Cette diminution de l'expression de la chaîne lourde en périphérie (et par conséquent du BCR) amène également à réfléchir au devenir de la chaîne légère et des autres constituants du BCR (*i.e.* molécules CD79a/CD79b) dans ces cellules. Comme attendu, la transcription puis l'expression de la chaîne légère et des protéines CD79a/CD79b dans les LB périphériques issus d'animaux 3'RR-déficientes sont normales (données non publiées). Que deviennent ces protéines toujours traduites dans les LB périphériques des souris 3'RR-déficientes ?



Dans les modèles KO pour les chaînes légères (Zou *et al.*, 2003), la rétention de la chaîne lourde dans le réticulum endoplasmique (RE) passe par la fixation des protéines chaperonnes (*e.g.* BIP pour *Binding Immunoglobulin Protein*) sur l'exon constant C<sub>H1</sub>. En l'absence de ce domaine, les chaînes lourdes seules sont exprimées à la surface cellulaire et sécrétées sous forme libre dans la circulation (Lee *et al.*, 1999 ; Zou *et al.*, 2007). Ces chaînes libres peuvent, dans certains cas, conduire à l'émergence de pathologies telles que le dépôt de chaînes lourdes (HCDD pour *Heavy Chain Deposition Disease*). La présence de chaînes légères non associées à des chaînes lourdes, si elles ne sont pas retenues dans le RE, pourrait également conduire à leur sécrétion et potentiellement à l'émergence de maladie de dépôt (LCDD pour *Light Chain Deposition Disease*) (pour revue : Ronco *et al.*, 2006). Dans ce sens, nous avons recherché la présence de chaînes légères dans le sérum et l'urine des souris 3'RR-déficientes afin de déterminer si elles sont sécrétées en absence de chaînes lourdes. Comparativement aux animaux *Wt*, nous n'avons pas détecté de chaînes légères libres que ce soit dans le sérum ou dans l'urine des souris 3'RR-déficientes (données non publiées). Ces résultats suggèrent que les chaînes légères traduites sont directement prises en charge par la machinerie intracellulaire sans être sécrétées par la cellule.

Par analogie aux modèles murins KO pour les chaînes légères (Zou *et al.*, 2003) ou pour Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  (Pelandra *et al.*, 2002), deux hypothèses sont alors possibles. Faute d'association avec une chaîne lourde, les protéines chaperonnes responsables de l'association du BCR pourraient favoriser la rétention des protéines néo-synthétisées (*i.e.* chaîne légère, CD79a et CD79b) dans le RE (Lee *et al.*, 1999). La détection par Q-PCR des marqueurs de stress du RE permettrait de tester cette première théorie. Les chaînes légères non associées à une chaîne lourde pourraient également être retenues par BIP puis transférées vers le protéasome où elles seraient dégradées (Lee *et al.*, 1999). L'analyse par *Western Blot* de LB périphériques préalablement incubés avec du Velcad® (*i.e.* inhibiteur du protéasome) permettrait de tester cette deuxième hypothèse.



### 3.2. La 3'RR et la SHM

La diminution d'expression de la chaîne lourde au stade B mature n'est retrouvée que dans la rate des animaux 3'RR-déficients. L'organisation du GC et le taux de cellules B activées (B220<sup>+</sup>PNA<sup>high</sup>Fas<sup>+</sup>) dans les ganglions et les plaques de Peyer sont comparables aux animaux *Wt*. Nous avons donc pu analyser les SHM dans notre modèle murin et mettre en évidence un rôle prépondérant de la 3'RR dans ce processus (**Article 2**). En effet, la délétion de la 3'RR entraîne une absence de mutations dans la région V<sub>H</sub> des cellules B issues du GC (B220<sup>+</sup>PNA<sup>high</sup>Fas<sup>+</sup>). Cette absence de SHM suggère qu'aucun autre élément additionnel ne coopère avec la 3'RR pour contrôler les SHM. Ces résultats renforcent donc le concept selon lequel la 3'RR, dans sa totalité, régule l'activité du locus IgH lors des stades tardifs du développement B.

Plus étonnamment, les cellules ne subissant plus la SHM continuent à transcrire la chaîne lourde à un taux de 50%, remettant en cause le dogme transcription/SHM (Fukita *et al.*, 1998). Nos données peuvent être corrélées avec des études récentes réalisées au locus de la chaîne légère d'Ig chez le poulet. Leurs résultats montrent que l'élément 3' cis-régulateur DIVAC (*i.e. DiVersification ACTivator*) est indispensable à la SHM bien qu'il agisse sans augmenter la transcription (Kothapalli *et al.*, 2008, Blagodatski *et al.*, 2009 ; Kohler *et al.*, 2012).

### 3.3. Une avancée dans le recrutement d'AID au locus IgH ?

AID est la protéine clé de la SHM et de la CSR, deux processus régulés par la 3'RR. De plus, il a récemment été démontré au laboratoire que la 3'RR est transcrite et ciblée par AID (Péron *et al.*, 2012). Afin d'expliquer cette dissociation transcription/SHM, nous avons émis l'hypothèse qu'une coopération entre la 3'RR et AID permettrait le recrutement de cette dernière au locus IgH. Suite à une collaboration avec l'équipe de Bernardo Reina San-Martin (IGBMC, CNRS UMR 7104 - Inserm U 964, Strasbourg), nous avons mis en évidence une telle coopération au moyen de ChIP (**Article 2**). Comme conclu en 2011 par l'équipe de Fugman à propos du locus IgL de poulet, nous pouvons dissocier l'activité mutationnelle et transcriptionnelle de la 3'RR (Kothapalli *et al.*, 2011).



Cette découverte est très intéressante puisque le mécanisme moléculaire précis permettant le ciblage et le recrutement d'AID aux loci d'Ig est encore inconnu et fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine de l'immunogénétique (pour revue : Larijani and Martin, 2012).

Nous savons que la transcription est essentielle pour fournir un substrat à AID (Petersen-Mahrt *et al.*, 2002 ; Chaudhuri *et al.*, 2003). Cependant, tous les ssDNA ne sont pas hypermutés. Alors comment expliquer qu'AID cible préférentiellement les gènes d'Ig ? Il est clair que certaines caractéristiques des loci d'Ig semblent faire d'eux un meilleur substrat pour AID, et bien que la mise en évidence d'une collaboration 3'RR-AID au locus IgH soit une avancée concernant ce ciblage précis d'AID, certaines questions subsistent. Est-ce que la 3'RR recrute AID au locus IgH de manière directe, à travers des interactions physiques ? D'autres partenaires sont-ils impliqués ? Si oui, quels seraient ces partenaires ? Est-ce que la 3'RR recrute AID au locus IgH de manière indirecte, en influençant l'état de compaction de la chromatine et ainsi l'accessibilité des régions cibles à AID ? Dans ce sens, nous analysons par CHIP les marques de chromatine au niveau des régions VDJ et S. Nous entreprenons également de quantifier, au moyen d'une conversion au bisulfite, le taux de ssDNA dans les souris 3'RR-déficientes. Si ce taux est diminué par rapport aux animaux *Wt*, cela suggèrera que la 3'RR régule au moins en partie l'accessibilité de la chromatine à AID. Dans le cas contraire, le rôle de la 3'RR dans le recrutement d'AID serait plus direct et nécessiterait la recherche de partenaires supplémentaires.

Jusque-là, le recrutement d'AID et de ses partenaires au locus IgH était principalement étudié lors de la CSR, mécanisme reproductible *in vitro*. L'absence de lignée cellulaire faisant de la SHM ainsi que l'absence d'un motif unique dans les régions variables comparées aux régions S, rendent l'étude du recrutement d'AID lors de la SHM très complexe. Des mutations dans la partie N-terminale d'AID conduisent à une CSR normale mais à un défaut de SHM (Shinkura *et al.*, 2004), alors que des délétions dans son domaine C-terminal engendrent un phénotype inverse (Barreto *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que les partenaires d'AID varient en fonction de l'activité de celle-ci. Cette hypothèse est d'autant plus plausible qu'il a été démontré une stabilisation différente des ssDNA lors de la SHM et de la CSR. Du fait de leur richesse en dG, les régions S transcrites conduisent à la formation de *R-loops*, stabilisant l'ADN sous forme



de ssDNA (*i.e.* substrat d'AID). A l'inverse, la transcription des régions variables conduit uniquement à l'exposition de l'ADN sous forme de ssDNA. Leur stabilisation nécessite le recrutement de protéines liées à l'ADN (Ronai *et al.*, 2007). De même, alors que l'implication de Spt5 et du RNA exosome dans le recrutement d'AID au niveau des bulles de transcription ont été clairement démontrées lors de la CSR (Pavri *et al.*, 2010 ; Basu *et al.*, 2011), l'utilisation d'un transgène a suggéré que le motif CAGGTG (*i.e.* site de liaison aux produits du gène E2A) est essentiel pour le ciblage d'AID lors de la SHM (Michael *et al.*, 2003). Sachant que la 3'RR possède des sites de liaison aux produits du gène E2A (Matthias and Baltimore, 1993 ; Meyer *et al.*, 1995), elle pourrait être l'intermédiaire entre ce motif et le recrutement d'AID *via* sa partie N-terminale (Shinkura *et al.*, 2004), au locus IgH lors de la SHM.

Par ailleurs, toutes les études réalisées jusqu'à présent sur la 3'RR laissent supposer que son rôle repose entièrement sur le contrôle de la transcription (pour revue : Pinaud *et al.*, 2011). Nos résultats concernant une collaboration AID-3'RR ainsi que les études indiquant que la 3'RR est impliquée dans la formation de boucles d'ADN (Wuerffel *et al.*, 2007 ; Guo *et al.*, 2011 ; Medvedovic *et al.*, 2013) mettent en exergue une nouvelle facette de la façon dont la 3'RR régule l'expression du locus IgH.

### 3.4. La 3'RR et la CSR

Par la suite, nous avons approfondi l'étude du rôle de la 3'RR dans la CSR. Ce mécanisme, qui permet à la cellule d'acquérir de nouvelles fonctions effectrices, se produit grâce à la présence de régions répétitives appelées régions S et localisées en amont de chaque gène constant excepté  $\delta$  (pour revues : Chaudhuri and Alt, 2004 ; Chaudhuri *et al.*, 2007). En l'absence de région S $\delta$  classique, l'obtention d'une IgD se fait par épissage alternatif du grand transcrit primaire contenant les exons  $\mu$  et  $\delta$ , autorisant la co-expression IgM/IgD (Moore *et al.*, 1981). L'absence de région S $\delta$  classique et la co-expression de l'IgD avec l'IgM, font de cette classe isotypique un mystère pour les immunologistes. D'un point de vue phylogénique, l'IgD est aussi ancestrale que l'IgM mais son évolution est plus labile, entraînant des duplications ou des délétions de certains de ses domaines au cours de l'évolution (Ohta and Flajnik, 2006).



Il y a plusieurs années, l'analyse de plusieurs lignées d'hybridomes ont mis en évidence un évènement de recombinaison vers C $\delta$ , induisant la délétion de C $\mu$  (Owens *et al.*, 1991). Par la suite, l'étude d'un myélome à IgD a également révélé la délétion du gène C $\mu$  (Arpin *et al.*, 1998). Récemment, une étude réalisée chez l'Homme a montré que quelques rares cellules B étaient capables de recombiner à IgD après une délétion du gène C $\mu$  médiée par AID (Chen *et al.*, 2009 ; Chen and Cerutti, 2010). Les cellules IgM<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup> résultantes sont principalement retrouvées dans les amygdales et les muqueuses nasales. La présence, chez des souris *Wt*, de cellules B IgM<sup>low</sup>IgD<sup>high</sup> du côté anti-mésentérique de l'intestin (Hamada *et al.*, 2002), pourrait représenter la contrepartie murine des cellules IgM-IgD<sup>+</sup> humaines. Ainsi, nous avons voulu confirmer l'existence d'une CSR vers  $\delta$  chez la souris. De plus, la 3'RR étant le principal élément de régulation de la CSR vers  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$  (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a), nous avons voulu étudier son implication dans celle vers  $\delta$  (**Manuscrit 3**).

Bien que faible, nous avons confirmé l'existence d'une CSR vers  $\delta$ , dans les MLN de souris *Wt*. Ce mécanisme se produit entre S $\mu$  et une région *S $\delta$ -like* précédemment nommée  $\sigma\delta$  (Preud'homme *et al.*, 2000). Alors que les régions S classiques sont des répétitions en tandem de séquences riches en dG, la région  $\sigma\delta$  présente de courtes séquences riches en dG, répétées sur seulement 0,5 Kb. Or, les régions S, de par leur caractère répétitif, contribuent à l'efficacité de la CSR. Alors comment expliquer que la CSR vers  $\delta$  ait lieu malgré l'absence d'une région S classique ? Plusieurs modèles de délétion, d'inversion ou de remplacement de différentes régions S ont montré qu'elles contribuent à l'efficacité de la CSR, sans pour autant être indispensables à ce mécanisme (Luby *et al.*, 2001 ; Khamlichi *et al.*, 2004, Shinkura *et al.*, 2003 ; Zarrin *et al.*, 2008). La région  $\sigma\delta$  serait donc suffisante pour permettre une CSR vers  $\delta$ . La corrélation directe entre fréquence de CSR et longueur de la région S souligne l'importance de la taille de la région S dans l'efficacité de la CSR (Zarrin *et al.*, 2005). Nous pouvons donc supposer que le taux très faible de CSR vers  $\delta$  chez la souris est corrélé à la petite taille de la région  $\sigma\delta$  (*i.e.* 0,5 Kb).

Comme chez l'homme, la CSR vers  $\delta$  est dépendante d'AID (Chen *et al.*, 2009). Sachant que la transcription des régions cibles est un prérequis au mécanisme de CSR, ce ciblage d'AID dans S $\mu$  et  $\sigma\delta$  suggère que la région est préalablement transcrite. Le seul transcrit connu dans cette région correspond au long ARN pré-messager comprenant les



régions  $S\mu$  et  $\sigma\delta$ . Il serait intéressant de rechercher, au moyen de RACE 5' et de système de gène rapporteur, un promoteur homologue aux promoteurs I en amont de  $\sigma\delta$ . Néanmoins, la fréquence de mutations dans  $S\mu$  et la région S acceptrice est diminuée lors de la CSR vers  $\delta$  comparé aux CSR vers  $\gamma$ , suggérant un ciblage moins important d'AID lors de cette CSR. En accord avec la faible fréquence de cette CSR, ces résultats suggèrent que la région cible n'est pas assez transcrite pour former des *R-loops* stables (*i.e.* hybrides ADN/ARN) capables de rendre la région accessible au ciblage d'AID (Yu *et al.*, 2003).

Les jonctions  $S\mu$ - $C\delta$  issues de cette CSR présentent les stigmates de la voie de réparation de l'A-EJ. Cette voie de réparation encore peu connue utilise des microhomologies de séquences entre les régions S à recombinaison (Yan *et al.*, 2007). Elle peut se substituer au NHEJ quand celui-ci est absent afin de maintenir la CSR à des taux pouvant aller jusqu'à 50% comparé à des animaux sauvages (Boboila *et al.*, 2010). Bien que des stigmates d'une réparation par la voie de l'A-EJ soient également retrouvés dans les hybridomes IgD<sup>+</sup> (Owens *et al.*, 1991), la raison pour laquelle la CSR vers  $\delta$  utilise cette voie de réparation reste encore inconnue.

Étonnamment, cette CSR est indépendante de la 3'RR puisque sa fréquence est plus élevée dans les animaux 3'RR-déficients que dans les *Wt*. Cela pourrait s'expliquer par un mécanisme de compensation mis en place par le système immunitaire pour pallier à l'absence des autres isotypes (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). En effet, les patients atteints de syndromes hyper-IgM présentent un fort taux de CSR vers  $\delta$ , suite à un tel mécanisme (Chen and Cerutti, 2010). De plus, la protéine 53BP1, un senseur de la voie DDR, pourrait être impliquée dans ce mécanisme. En effet, sa délétion entraîne une augmentation des jonctions intra-régions S (Reina-San-Martin *et al.*, 2007). Cela s'explique par la capacité de 53BP1 à inhiber les réarrangements courte distance se produisant par recombinaison homologue dans les régions S, au profit des réarrangements longue distance médiés par le NHEJ (Bothmer *et al.*, 2010). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que 53BP1 interagit normalement avec la 3'RR lors de la reconnaissance des DSB pour faciliter les recombinaisons longue distance. Dans notre modèle, l'absence de la 3'RR ne permettrait plus le recrutement de 53BP1 au locus IgH, entraînant deux effets intrinsèquement liés : (1) une absence des recombinaisons

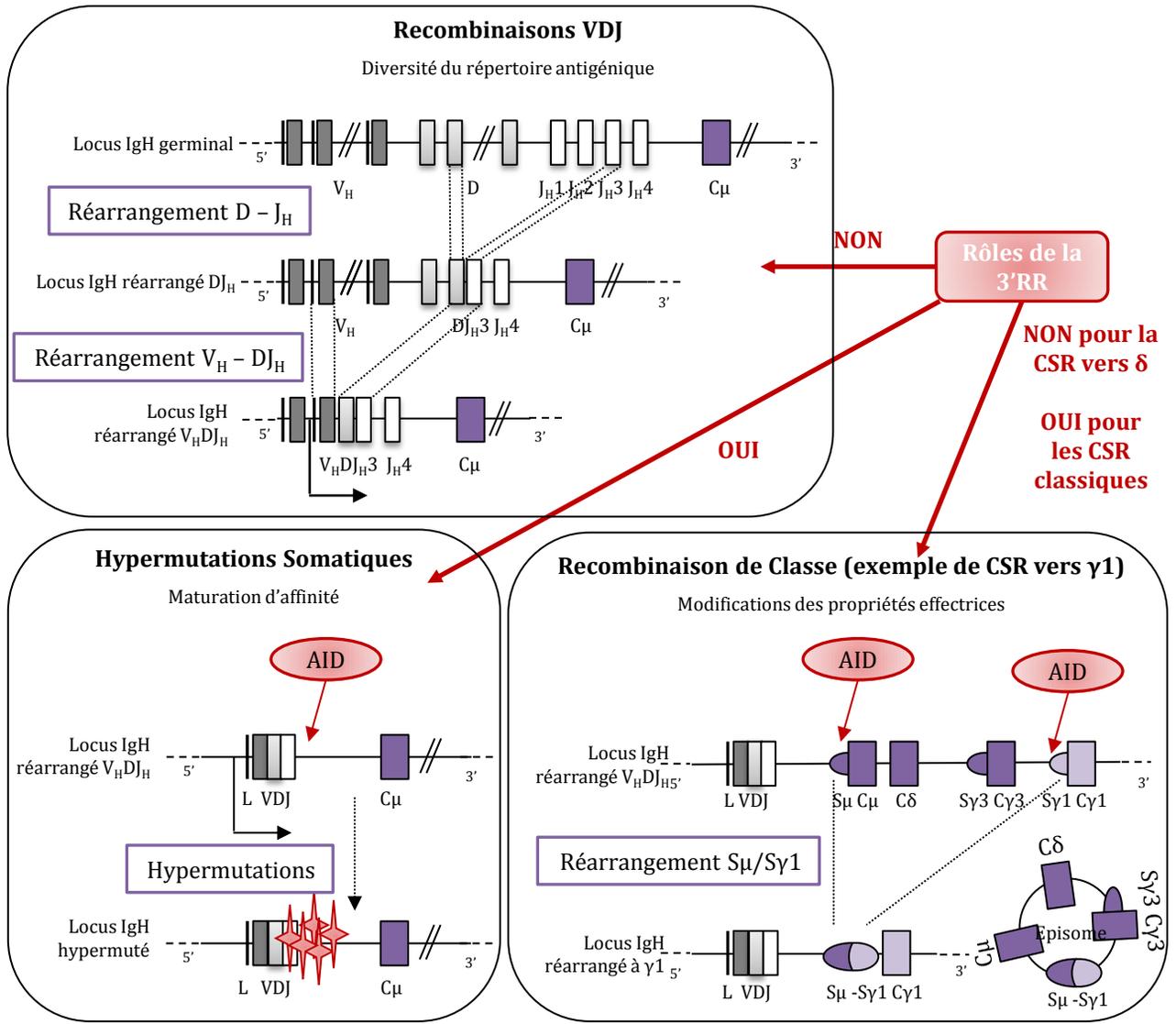


longue distance (*i.e.* recombinaison entre  $S\mu$  et  $S\gamma$ ,  $S\epsilon$  ou  $S\alpha$ ) et (2) une augmentation des réarrangements courte distance (*i.e.* recombinaison entre  $S\mu$  et  $\sigma\delta$ ).

Lors de la CSR vers  $\delta$ , l'absence de la 3'RR n'affecte ni la localisation des points de cassures dans  $S\mu$  et  $\sigma\delta$ , ni le taux de mutations dans ces régions (*i.e.* stigmates AID), ni le type de jonctions obtenues (*i.e.* stigmates du mécanisme de réparation mis en œuvre). Ce taux identique de mutations entre les animaux *Wt* et 3'RR-déficients semble en contradiction avec l'Article 2 dans lequel nous avons démontré qu'en plus de son rôle dans la CSR, la 3'RR est un élément central dans le recrutement d'AID au locus IgH, lors du processus de SHM des régions variables et de  $S\mu$ . Cette observation, en accord avec la localisation ganglionnaire de cette CSR, plaide en faveur d'une régulation spécifique autorisant le recrutement d'AID au locus IgH d'une manière 3'RR-indépendante.

En résumé, nous avons démontré que contrairement aux CSR « classiques », celle vers  $\delta$  présente des caractéristiques qui lui sont propres : (1) elle est détectée uniquement dans les MLN ; (2) elle est réparée par la voie de l'A-EJ et (3) elle est augmentée dans les animaux 3'RR-déficients. Toutes ces différences avec les CSR « classiques » confortent l'idée selon laquelle la CSR vers  $\delta$  est soumise à une régulation particulière, permettant le recrutement d'AID de façon 3'RR-indépendante et en réponse à des stimuli encore indéterminés.

Jusqu'à maintenant, les connaissances sur la CSR vers  $\delta$  chez la souris provenaient uniquement d'études réalisées sur des myélomes ou des hybridomes (Preud'homme *et al.*, 2000; Owens *et al.*, 1991). Les souris 3'RR-déficientes constituent donc le premier modèle murin permettant d'étudier ce phénomène dans des cellules B primaires. Il sera alors intéressant de caractériser les cellules IgM-IgD<sup>+</sup> issues de cette CSR particulière. Nous savons déjà qu'elles présentent un répertoire B naïf et n'expriment pas les marqueurs de surface caractérisant les LB activés. Cela suggère que ces cellules ont effectué leur CSR avant la formation du GC (Bergqvist *et al.*, 2010). Les MLN seraient alors un site privilégié contenant tous les facteurs nécessaires à cette CSR impliquée dans la protection contre les Ag T-indépendants. Nous pouvons supposer que cette CSR se produit naturellement avant la formation du GC dans les animaux *Wt* mais qu'un mécanisme de compensation la « démasque » dans les souris 3'RR-déficientes (Bergqvist *et al.*, 2010).



**Figure 35 : Représentation schématique des conclusions générales de ma thèse.**

Lors de ma thèse, j'ai démontré que la 3'RR n'a pas de rôle dans la diversité des réarrangements VDJ alors qu'elle est impliquée dans le recrutement d'AID, l'enzyme initiant les mécanismes de SHM et de CSR. Cela renforce le concept selon lequel la 3'RR contrôle l'activité du locus IgH durant les stades tardifs de l'ontogénie B. A l'inverse, la 3'RR n'est pas impliquée dans un phénomène encore méconnu : la CSR vers δ, suggérant une origine ancestrale de ce mécanisme.

#### 4. Conclusions générales

En conclusion, cette thèse aura permis de continuer l'étude des souris 3'RR-déficientes afin de compléter les connaissances actuelles sur le rôle de la 3'RR lors du développement B normal (**Figure 35**).

Nous avons ainsi montré qu'au travers d'une coopération avec AID, la 3'RR est l'élément principal contrôlant la SHM et les CSR « classiques » mais sans rôle dans la diversité des réarrangements VDJ. Ces résultats renforcent le concept selon lequel la 3'RR régule l'activité du locus IgH durant des stades tardifs du développement B.

Parallèlement, nous avons mis en exergue un mécanisme rare et encore méconnu : la CSR vers  $\delta$ . Contrairement aux CSR « classiques », ce mécanisme n'est pas régulé par la 3'RR. Notre modèle murin nous a alors offert l'opportunité de réaliser une caractérisation moléculaire et mécanistique de ce nouveau « switch ».



---

# ***Annexes***

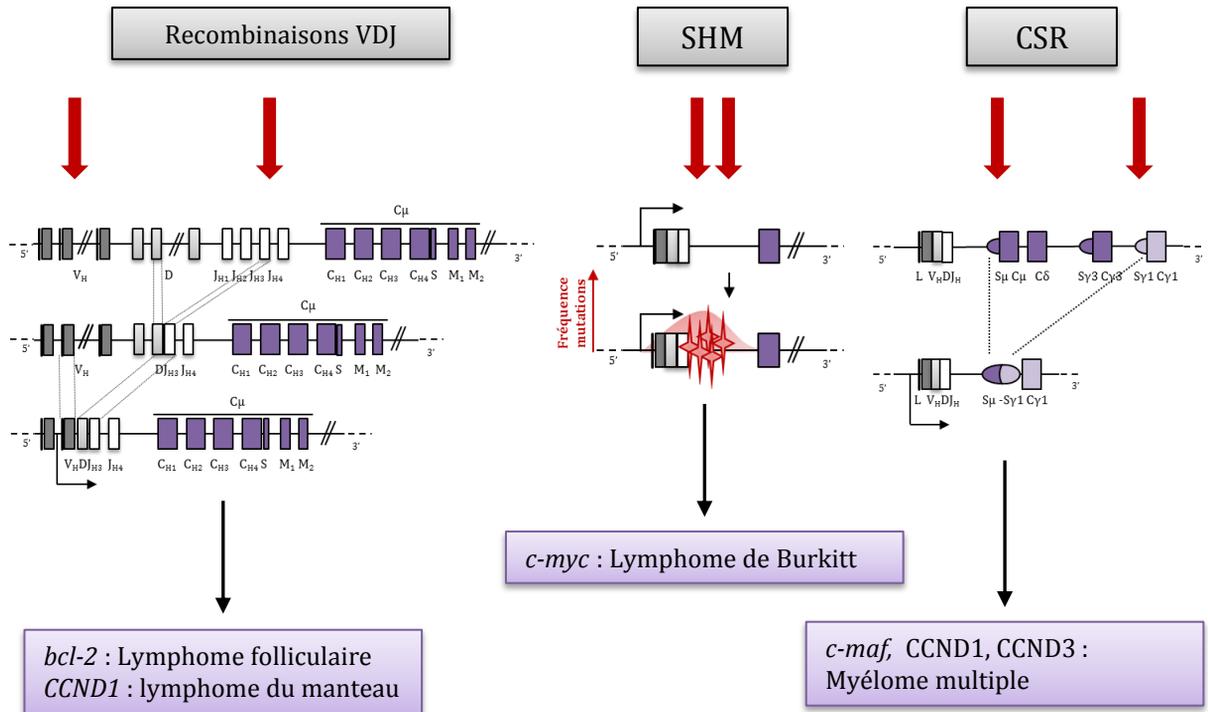
---



Outre les travaux menés sur le rôle de la 3'RR dans les mécanismes de diversification des anticorps, j'ai également contribué à l'étude du rôle de cette région régulatrice dans un contexte B pathologique.

J'ai participé à l'étude des souris *c-myc-3'RR/p53<sup>+/-</sup>* (**Article 1**) et *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>* (**Article 2**) dont la majeure partie des expérimentations a été réalisée par les Dr Rémi Fiancette et Christelle Vincent-Fabert, dans le cadre de leur thèse de sciences. J'ai également effectué les expérimentations permettant l'analyse comparative des transcriptomes de ces deux modèles murins (**Article 3**).

Cette partie est uniquement présentée en annexe puisqu'elle n'a pas fait l'objet principal de mes recherches de thèse. Afin de replacer le contexte, je présenterai succinctement les lymphomes B impliquant l'oncogène *c-myc*, le suppresseur de tumeur p53 et la protéine CDK4, suivis des résultats obtenus au cours de ma thèse ainsi que des perspectives qu'ils offrent en terme de thérapie.



**Figure 36 : Les trois points critiques de cassure et de translocation au locus IgH.**

A gauche, la représentation schématique des réarrangements VDJ, au milieu les hypermutations somatiques et à droite la recombinaison de classe.

Les sites de cassure et de translocations sont indiqués par les flèches rouges.

Les gènes transloqués et les lymphomes émergeant sont indiqués dans les carrés violets.

(D'après Kuppers, 2005.)

## Chapitre 1 – Introduction à la lymphomogénèse

### Du lymphocyte B au lymphome B...

Lorsque le développement normal d'un lymphocyte (B ou T) est perturbé, des lymphomes ou leucémies peuvent apparaître. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, quatre-vingt-cinq pourcents des lymphomes sont d'origine B et il en existe 15 types. A chaque stade de développement d'une cellule B peut émerger un clone malin conduisant à l'apparition de lymphomes (pour revues: Lenz and Staudt, 2010 ; Vincent-Fabert *et al.*, 2010b).

## 1. TRANSLOCATIONS ET EMMERGENCE DE LYMPHOMES

### 1.1. Les zones de translocation

Lors de la lymphopoïèse B, les loci IgH et IgL subissent de nombreux remaniements géniques. Ces processus créent une instabilité génomique à l'origine de translocations chromosomiques pouvant amener certains oncogènes au sein des loci d'Ig.

Les trois grands évènements géniques survenant au locus IgH peuvent conduire à trois zones de translocation (**Figure 36**):

- lors des recombinaisons V(D)J, le point de cassure sera adjacent aux segments D ou J. C'est le cas de la translocation de *bcl-2* ou de la *cycline D1* (*CCND1*) lors du lymphome folliculaire et du lymphome du manteau respectivement;
- lors de la SHM, le point de cassure se situera dans le segment VDJ réarrangé. C'est le cas de la translocation de *c-myc* lors du lymphome de Burkitt;
- lors de la CSR, le point de cassure se trouvera dans les régions S. C'est le cas de la translocation de *c-maf*, *CCND1* ou *CCND3* lors du myélome multiple.

### 1.2. Les *enhancers* et l'émergence de lymphomes

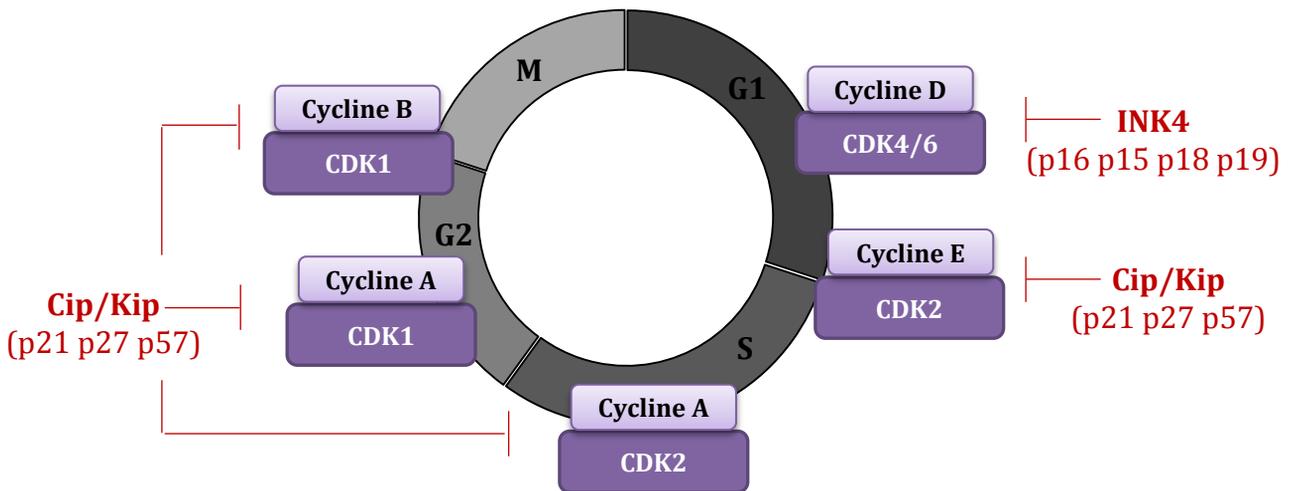
L'expression des oncogènes transloqués aux loci d'Ig passe alors sous le contrôle des éléments *cis*-régulateurs de ces loci, favorisant leur surexpression et donc la transformation tumorale (Küppers, 2005).



Dans ce sens, de nombreuses études, dont certaines ont été réalisées au laboratoire, ont démontré que la translocation d'oncogènes au locus IgH place ces derniers sous le contrôle transcriptionnel d'E $\mu$  et de la 3'RR. Dans des modèles transgéniques, alors que les souris E $\mu$ -*c-myc* développent uniquement des lymphomes immatures, les souris *c-myc*-3'RR développent des proliférations des B du GC similaires au lymphome de Burkitt humain (Truffinet *et al.*, 2007 ; Gostissa *et al.*, 2009). Ainsi, la 3'RR est impliquée dans les processus de lymphomogénèse lors des stades tardifs du développement B. De plus, le rôle de la 3'RR dans la transcription du locus IgH au stade plasmocytaire (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a) suggère une implication de cette région dans la dérégulation des oncogènes transloqués au locus IgH lors des myélomes. Au-delà de l'oncogène *c-myc*, d'autres modèles associant des oncogènes à la 3'RR ont été développés. De façon similaire à ce qui a été décrit quand E $\mu$  est associé au transgène, les souris CCND1-3'RR démontrent que dans les LB matures, la CCND1 à elle seule n'est pas suffisante pour promouvoir la lymphomogénèse (Fiancette *et al.*, 2010).

Les causes de cassures dans les loci des oncogènes ne sont pas entièrement connues mais dépendraient de facteurs environnementaux et métaboliques. Deux études se sont intéressées au rôle d'AID dans l'émergence de lymphomes. Il a d'abord été montré que des translocations d'oncogènes au loci d'Ig se produisent dans des lignées plasmocytaires tumorales déficientes pour AID (Kovalchuk *et al.*, 2007). Par la suite, il a été démontré que, de par sa capacité à générer des DSB, AID contribue à la lymphomogénèse dérivée des GC (Pasqualucci *et al.*, 2008). Notre mise en évidence d'une coopération entre la 3'RR et AID (**Article 2**) pourrait alors participer à la compréhension des mécanismes de translocations oncogéniques AID-3'RR-dependants se produisant au locus *IgH*.

Dans la majorité des cas de lymphomes, la translocation d'oncogènes au loci d'Ig n'est pas le seul mécanisme impliqué. D'autres évènements oncogéniques tels que l'infection par un virus transformant (*e.g.* *Epstein-Barr Virus* ou EBV), la mutation de gènes suppresseur de tumeur (*e.g.* *p53*) ou de protéines du cycle cellulaire (*e.g.* CDK4) sont également impliqués.



**Figure 37 : Représentation schématique des protéines du cycle cellulaire.**

Le rond gris représente les différentes phases du cycle cellulaire. Les carrés violet clair représentent les cyclines et les foncés représentent les cdk qui leur sont associées. Les traits rouges représentent l'activité des inhibiteurs sur les différents complexes cyclines/CDK.

## 2. PROLIFERATION TUMORALE

### 2.1. Les protéines du cycle cellulaire

La progression des cellules eucaryotes dans le cycle cellulaire est régulée par l'activité de complexes protéiques associant une kinase dépendant des cyclines (CDK pour *cyclin-dependant kinase*) et une cycline. Les cyclines sont des protéines liant les CDK afin de les activer. Il existe quatre types de CDK (CDK 1, CDK2, CDK4 et CDK6) et quatre types de cycline (cycline A, B, D et E). La succession des différents complexes cycline-CDK permet la progression ordonnée et régulée du cycle cellulaire. Pour cela, la formation des complexes est fortement régulée, notamment par les inhibiteurs de la famille INK4 qui se fixent à CDK4 ou CDK6 pour empêcher leur association avec la cycline D (**Figure 37**).

Chez l'Homme, de nombreux cancers sont liés à des mutations au niveau des kinases impliquées dans le cycle cellulaire, conduisant à leur dérégulation et à une prolifération cellulaire incontrôlée. Une étude portant sur des individus prédisposés aux mélanomes a mis en évidence une mutation de CDK4 (Wölfel *et al.*, 1995 ; Zuo *et al.*, 1996). La substitution de l'arginine en position 24 en une cystéine (R24C) affecte le site de liaison de CDK4 à son inhibiteur INK4. Ainsi, le mutant CDK4<sup>R24C</sup> échappe au contrôle négatif d'INK4, le complexe cycline D/CDK4 est constitutivement actif et la prolifération est continuellement activée. Un modèle murin présentant la mutation CDK4<sup>R24C</sup> a été créé afin d'étudier le rôle de CDK4 dans l'oncogénèse. Bien que développant des tumeurs, les souris CDK4<sup>R24C</sup> ne développent pas de lymphomes (Sotillo *et al.*, 2001 ; Rane *et al.*, 2002). Comme CDK4 et *c-myc* sont des partenaires réciproques, nous nous sommes intéressés au rôle de CDK4 dans la lymphomogénèse B *c-myc*-induite.

### 2.2. L'oncogène *c-myc*

Dans un contexte physiologique, *c-myc* est qualifié de proto-oncogène car il joue un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes biologiques. Il code le facteur de transcription c-Myc impliqué dans le cycle cellulaire, la différenciation, l'adhésion cellulaire, le métabolisme et l'apoptose (Vita and Henriksson, 2006).



Comme expliqué précédemment, de par leurs mécanismes de réarrangements géniques, les loci codant les gènes d'Ig sont sensibles aux translocations d'oncogènes conduisant à l'émergence de lymphomes. Le lymphome de Burkitt chez l'Homme consiste en une prolifération monoclonale maligne de cellules B matures. Il est toujours associé à une translocation de l'oncogène *c-myc*, dans 80% des cas au locus IgH. A cause de sa proximité avec les éléments *cis*-régulateurs du locus, le *c-myc* transloqué est transcriptionnellement actif (pour revue: Janz, 2006).

### **2.3. Le suppresseur de tumeur p53**

La protéine p53 est le produit d'un gène suppresseur de tumeur, c'est à dire un gène qui lorsqu'il n'est plus exprimé ou que son produit est inactivé, conduit au développement d'une tumeur. La protéine p53 est activée en réponse aux dommages à l'ADN et à l'instabilité génomique et agit comme suppresseur de tumeur soit en maintenant l'intégrité cellulaire, soit en empêchant la propagation des cellules cancéreuses. Pour cela, p53 peut réguler les mécanismes de transcription, provoquer l'arrêt du cycle cellulaire et la senescence ou induire l'apoptose. L'importance de p53 comme suppresseur de tumeur est mise en évidence par le fait que son gène est muté ou délété dans la moitié des tumeurs humaines (pour revue: Zilfou and Lowe, 2009).

Physiologiquement, le locus *IgH* subit des remaniements géniques pouvant mettre en danger l'intégrité du génome de la cellule B. p53 intervient à différents stades du développement B afin d'éliminer les cellules présentant des translocations qui activent des oncogènes (Robbiani *et al.*, 2009). Ainsi, sa mutation, en association avec la translocation d'oncogènes, conduit à l'émergence de lymphomes.



## Chapitre 2 – Résultats

**Article 1. A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene.**

Remi Fiancette, Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Brice Laffleur, Michel Cogné & Yves Denizot.

*The Journal of Immunology*, 2011, volume 187, numéro 11, pages 5772-5782.

**Article 2. A defect of the INK4-CDK4 checkpoint and myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice.**

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette\*, Pauline Rouaud\*, Christel Baudet, Véronique Truffinet, Virginie Magnone, Angélique Guillaudeau, Michel Cogné, Pierre Dubus & Yves Denizot.

\* Contribution équivalente

*The American Journal of Pathology*, 2012, volume 180, numéro 4, pages 1688-1701.

**Article 3. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/CDK4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin.**

Pauline Rouaud, Remi Fiancette, Christelle Vincent-Fabert, Virginie Magnone, Michel Cogné, Pierre Dubus & Yves Denizot.

*Oncotarget*, 2012, volume 3, numéro 5, pages 586-593.



## Article 1

**A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene.**

Remi Fiancette, Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Brice Laffleur, Michel Cogne & Yves Denizot.

*The Journal of Immunology*, 2011, volume 187, numéro 11, pages 5772-5782.

**Ces résultats ont également fait l'objet d'une présentation affichée:**

P. Rouaud, R. Fiancette, C. Vincent-Fabert, M. Cogné, and Y. Denizot. A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. Welcome Trust Center: Mouse models disease. 1-3 février 2012, Hinxton, Cambridge, UK.

De précédents travaux réalisés au laboratoire ont permis de réaliser un modèle murin mimant la translocation chromosomique à l'origine du lymphome de Burkitt (BL). Pour cela, une stratégie "mini-locus" a été utilisée afin de lier l'oncogène *c-myc* à la 3'RR : c'est le modèle *c-myc-3'RR* (Truffinet *et al.*, 2007).

Par la suite, nous avons voulu créer un modèle murin capable de reproduire les différents types de lymphomes susceptibles d'émerger lorsque *c-myc* est surexprimé. Pour cela, nous avons introduit le transgène précédemment utilisé pour modéliser les lymphomes de Burkitt dans un fond génétique déficient pour p53. Notre intérêt s'est porté sur la protéine p53, suppresseur de tumeur, car le gène *p53* est connu pour être muté ou délété dans environ 50% des cas de tumeurs humaines (Goh *et al.*, 2011). Ainsi, nous avons croisé les souris *c-myc-3'RR* (Truffinet *et al.*, 2007) avec des souris *p53*<sup>-/-</sup> (Lowe *et al.*, 1993) fournies par le laboratoire du Pr. Jean-Pierre de Villartay (U768 Hôpital Necker – Enfants malades, Paris).

Les animaux doubles transgéniques *c-myc-3'RR/p53*<sup>+/-</sup> développent rapidement des lymphomes qui se manifestent par une hypertrophie de la rate et des ganglions lymphatiques. La mortalité est accrue et précoce comparée aux souris *c-myc-3'RR*. Les tumeurs sont des néoplasies B monoclonales et nous avons pu mettre en évidence quatre types de lymphomes, phénotypiquement différents:

- des lymphomes de Burkitt classiques (non activés) : IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD43<sup>-</sup> Cd138<sup>-</sup> CD5<sup>-</sup>



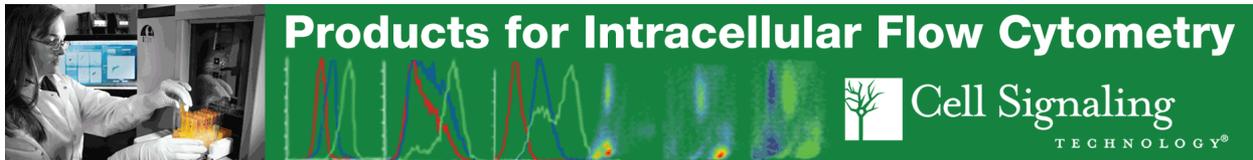
- des lymphomes de Burkitt actives : IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> Cd138<sup>-</sup> CD5<sup>-</sup>
- des lymphomes de type manteau : IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> Cd138<sup>-</sup> CD5<sup>+</sup>
- des lymphomes affectant les plasmablastes : IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD43<sup>+</sup> Cd138<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup>

L'analyse protéique des différents types de lymphomes a révélé l'existence de complexes CDK6-cycline D, démontrant que CDK6 est impliquée dans la prolifération et l'émergence des lymphomes chez les animaux *c-myc-3'RR/p53<sup>+/-</sup>*. L'analyse du transcriptome a mis en évidence une signature génétique spécifique à chaque type de lymphome.

Le modèle *c-myc-3'RR/p53<sup>+/-</sup>* montre donc que la dérégulation de *c-myc* médiée par la 3'RR permet l'émergence de lymphomes variés dans des cellules ayant préalablement un défaut de p53. En effet, la perte de fonction de p53 crée un environnement permissif au développement tumoral en diminuant les mécanismes de défense anti-tumorale intrinsèques à la cellule. De plus, ces données confirment le rôle cis-activateur de la 3'RR sur les oncogènes transloqués lors des lymphomes B matures.

En produisant différents types de lymphomes, les souris *c-myc-3'RR/p53<sup>+/-</sup>* constituent un outil intéressant pour tester d'éventuels traitements thérapeutiques.





## A p53 Defect Sensitizes Various Stages of B Cell Development to Lymphomagenesis in Mice Carrying an IgH 3' Regulatory Region-Driven *c-myc* Transgene

This information is current as of October 2, 2013.

Rémi Fiancette, Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Brice Laffleur, Virginie Magnone, Michel Cogné and Yves Denizot

*J Immunol* 2011; 187:5772-5782; Prepublished online 28 October 2011;  
doi: 10.4049/jimmunol.1102059  
<http://www.jimmunol.org/content/187/11/5772>

- 
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2011/10/28/jimmunol.1102059.DC1.html>
- References** This article **cites 38 articles**, 16 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/187/11/5772.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 © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.





## Article 2

**A defect of the INK4-CDK4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice.**

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette\*, Pauline Rouaud\*, Christel Baudet, Véronique Truffinet, Virginie Magnone, Angélique Guillaudeau, Michel Cogné, Pierre Dubus & Yves Denizot.

\* Contribution équivalente

*The American Journal of Pathology*, 2012, volume 180, numéro 4, pages 1688-1701.

Dans le but de modéliser les lymphomes du manteau humain, nous avons introduit le transgène précédemment utilisé pour modéliser les lymphomes de Burkitt dans un fond génétique où CDK4 est constitutivement active. Notre intérêt s'est porté sur la protéine CDK4 car la principale caractéristique des lymphomes du manteau est la surexpression de la CCND1 dont CDK4 est le partenaire catalytique. Pour cela, nous avons utilisé les souris CDK4R24C. L'arginine en position 24 est remplacée par une cystéine (R24C), ce qui abolit l'interaction entre CDK4 et son inhibiteur INK4, rendant CDK4 constitutivement active et potentiellement oncogénique (Wolfel *et al.*, 1995). Ainsi, nous avons croisé les souris *c-myc-3'RR* (Truffinet *et al.*, 2007) avec des souris CDK4<sup>R24C</sup> fournies par le Pr. Pierre Dubus (Université de Bordeaux 2, EA 2406).

Les animaux doubles transgéniques *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>* ont une durée de vie comparable aux souris *c-myc-3'RR* mais ne développent pas de lymphomes de Burkitt. Leurs tumeurs se manifestent par une hypertrophie de la rate et une hyperleucocytose. Les cellules malignes expriment toutes le B220 et le CD19, marqueurs de la lignée B, et sont également IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, et CD5<sup>+</sup> mais CD23<sup>-</sup>. Ce profil d'expression est typique du lymphome du manteau humain (Parrens *et al.*, 2006). L'analyse protéique a révélé que la prolifération des cellules tumorales passe par la formation de complexes cyclines D-CDK4 mais pas CDK6. L'analyse du transcriptome a mis en évidence une signature génétique comparable aux lymphomes du manteau humains.



Le modèle *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>* montre donc que la surexpression B-spécifique de *c-myc* dans un contexte où CDK4 est constitutivement active permet de modéliser le lymphome du manteau humain. En effet, la dérégulation de l'axe CDK4-INK4 crée un environnement permissif au développement tumoral, uniquement dans un contexte de surexpression de *c-myc*. Ces données confirment le rôle des inhibiteurs du cycle cellulaire, en particulier INK4, dans la modulation de la lymphomogénèse (Serrano *et al.*, 1997).

En modélisant le lymphome du manteau humain, les souris *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>* constituent un outil intéressant pour tester CDK4 et/ou INK4 comme d'éventuelles cibles thérapeutiques.





## Article 3

**Mantle cell lymphoma-like lymphomas in *c-myc-3'RR/p53*<sup>+/-</sup> mice and *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>* mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin.**

Pauline Rouaud, Remi Fiancette, Christelle Vincent-Fabert, Virginie Magnone, Michel Cogné, Pierre Dubus & Yves Denizot.

*Oncotarget*, 2012, volume 3, numéro 5, pages 586-593.

Les deux modèles murins précédemment présentés (*c-myc-3'RR/p53*<sup>+/-</sup> et *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>*) peuvent conduire au développement de lymphomes ressemblant aux lymphomes du manteau humains (Fiancette *et al.*, 2011 ; Vincent-Fabert *et al.*, 2012). Dans les deux modèles, les tumeurs expriment les mêmes marqueurs de différenciation B: B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup>. Cependant, les tumeurs présentent une cinétique d'apparition et une signature protéomique différente, liées à leur statut mutationnel:

- apparition des tumeurs à 3 mois et implication de complexes cycline D/CDK6 chez les souris *c-myc-3'RR/p53*<sup>+/-</sup>
- apparition des tumeurs à 6 mois et implication de complexes cycline D/CDK4 chez les souris *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>*

Se pose alors la question des voies génétiques conduisant à l'émergence de lymphomes phénotypiquement identiques dans ces deux modèles. Afin de déterminer une origine biologique potentiellement commune à ces lymphomes, j'ai réalisé une analyse transcriptomique comparative.

Les seules différences mises en évidence lors de cette analyse sont directement liées aux mutations à l'origine des modèles murins. Par exemple, les gènes impliqués dans le diabète et l'obésité sont surexprimés dans les souris *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>* car l'activation de CDK4 conduit à une hyperplasie des îlots de Langerhans (Rane *et al.*, 1999). De même, certains gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont surexprimés dans les souris *c-myc-3'RR/p53*<sup>+/-</sup>, expliquant que les lymphomes de ces animaux soient plus agressifs que ceux des souris *c-myc-3'RR/CDK4<sup>R24C</sup>*.



Ainsi, il n'existe pas de profil différentiel d'expression de gènes autres que ceux liés au statut mutationnel des animaux, et donc pas de signature génétique spécifique à chaque modèle. De façon similaire aux variant de lymphomes du manteau développés chez l'Homme, ceux de nos deux modèles murins ont la même origine cellulaire.

Cette analyse comparative du transcriptome nous permet donc de conclure que la dérégulation de deux voies de signalisation différentes (voie p53 ou axe CDK4-INK4) dans une même cellule B, peut conduire à l'émergence de lymphomes phénotypiquement identiques mais avec des stigmates oncogéniques différents.

L'analyse transcriptomique des tumeurs pourrait devenir un outil de routine dans les laboratoires hospitaliers, afin de déterminer un traitement personnalisé et adapté aux stigmates oncogéniques de chaque tumeur.



## Chapitre 3 – Conclusions & Discussions

La présence d'une CDK4 constitutivement active suite à la mutation CDK4<sup>R24C</sup> perturbe l'axe CDK4/INK4, de même qu'une surexpression de la cycline D1 ou une délétion d'INK4 sont des dérèglements fréquemment associés à l'émergence de lymphomes du manteau (Jares and Campo, 2008). CDK4<sup>R24C</sup> seule ne modifie pas l'homéostasie B mais est capable de collaborer avec *c-myc* pour modifier un phénotype Burkitt en un lymphome du manteau (**Article 1**). Ce changement de phénotype s'explique par le fait que la modification de l'axe CDK4/INK4 induit des mutations secondaires conférant un avantage oncogénique au *c-myc* déjà surexprimé. Ainsi, la coopération entre *c-myc* et une CDK4 constitutivement active nous a permis d'obtenir un modèle murin présentant les principales caractéristiques du lymphome du manteau humain. Comparé aux modèles murins précédemment établis (Ford *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2006), les dysfonctionnements induits dans notre modèle semblent plus proches des mutations susceptibles d'apparaître spontanément et de favoriser l'émergence d'un lymphome du manteau. Ce modèle constitue donc un outil précieux pour d'éventuelles études pharmacologiques et thérapeutiques.

La déficience de p53 favorise l'instabilité génomique et l'acquisition de mutations pouvant favoriser l'émergence de lymphomes (Goh *et al.*, 2011). Le transfert du transgène *c-myc-3'RR* dans un fond génétique déficient pour p53 abolit les mécanismes de lutte anti-tumorale mis en œuvre par la cellule, et favorise donc l'apparition d'un large spectre de lymphomes (**Article 2**). La variété des lymphomes obtenus prouve le potentiel multi-oncogénique de *c-myc*. Parmi eux, nous retrouvons un lymphome phénotypiquement proche du lymphome du manteau humain.

A partir des souris *c-myc-3'RR* connues pour développer un lymphome de Burkitt (Truffinet *et al.*, 2007), nous avons montré que la mutation activatrice de CDK4 et la déficience de p53 sont capables de collaborer avec *c-myc* dans sa transformation lymphocytaire B en diversifiant son potentiel oncogénique. Ces mutations agissent



comme un second “coup oncogénique” ayant un impact sur la lymphomogenèse induite par la seule surexpression de *c-myc*. Ces modèles, de par leur origine expérimentale, sont réalistes et cohérents avec les mécanismes naturels induisant la lymphomogenèse.

De façon surprenante, ces deux modèles peuvent conduire à l'apparition de lymphomes de type manteau. Dans les deux cas, les cellules tumorales présentent le même phénotype de surface mais apparaissent avec des cinétiques différentes et une signature protéomique différente. L'analyse transcriptomique des tumeurs issues de ces deux modèles murins ne met pas en évidence de différences autres que celles dues à leur statut mutationnel (**Article 3**). Tout comme les variant du lymphome du manteau humain, les lymphomes développés par nos modèles murins proviennent de la même entité cellulaire (Jares *and* Campo, 2008). Ainsi, la dérégulation de deux voies de signalisation distinctes au sein d'une même cellule B peut conduire à l'émergence d'un lymphome unique portant des stigmates oncogéniques différents. Ces stigmates oncogéniques sont à l'origine de l'hétérogénéité proliférative des lymphomes et donc des réponses divergentes aux traitements. L'analyse transcriptomique des tumeurs pourrait être un prérequis à des traitements personnalisés (Alinari *et al.*, 2012).



---

## ***Références bibliographiques***

---



## A

- Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A., and Oltz, E.M. (2006). Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J. Immunol.* *176*, 2439–2447.
- Aidinis, V., Bonaldi, T., Beltrame, M., Santagata, S., Bianchi, M.E., and Spanopoulou, E. (1999). The RAG1 homeodomain recruits HMG1 and HMG2 to facilitate recombination signal sequence binding and to enhance the intrinsic DNA-bending activity of RAG1-RAG2. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6532–6542.
- Alessandrini, A., and Desiderio, S.V. (1991). Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 2096–2107.
- Alinari, L., Christian, B., and Baiocchi, R.A. (2012). Novel targeted therapies for mantle cell lymphoma. *Oncotarget* *3*, 203–211.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., and Cancro, M.P. (1992). Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenic and exhibit unique signaling characteristics. *J. Immunol.* *149*, 2533–2540.
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* *3*, 1209–1219.
- Alt, F.W., Blackwell, T.K., and Yancopoulos, G.D. (1987). Development of the primary antibody repertoire. *Science* *238*, 1079–1087.
- Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.-L., Guo, C., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* *152*, 417–429.
- Andersson, T., Furebring, C., Borrebaeck, C.A., and Pettersson, S. (1999). Temporal expression of a V(H) promoter-Cmu transgene linked to the IgH HS1,2 enhancer. *Mol. Immunol.* *36*, 19–29.
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J. Exp. Med.* *205*, 1357–1368.
- Arakawa, H., Shimizu, T., and Takeda, S. (1996). Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci. *Int. Immunol.* *8*, 91–99.
- Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Fugier-Vivier, I., Brière, F., Banchereau, J., Lebecque, S., and Liu, Y.J. (1998). The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, Cmu-Cdelta switch, and lambda light chain expression. *J. Exp. Med.* *187*, 1169–1178.
- Arulampalam, V., Grant, P.A., Samuelsson, A., Lendahl, U., and Pettersson, S. (1994). Lipopolysaccharide-dependent transactivation of the temporally regulated immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *Eur. J. Immunol.* *24*, 1671–1677.



Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.* *279*, 55117–55126.

## B

Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M., and Olsson, C. (2001). Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J. Immunol.* *166*, 5051–5057.

Banerji, J., Olson, L., and Schaffner, W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* *33*, 729–740.

Barneda-Zahonero, B., Roman-Gonzalez, L., Collazo, O., Mahmoudi, T., and Parra, M. (2012). Epigenetic Regulation of B Lymphocyte Differentiation, Transdifferentiation, and Reprogramming. *Comparative and Functional Genomics 2012*, 1–10.

Barreto, V., Reina-San-Martin, B., Ramiro, A.R., McBride, K.M., and Nussenzweig, M.C. (2003). C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol. Cell* *12*, 501–508.

Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* *438*, 508–511.

Basu, U., Meng, F.-L., Keim, C., Grinstein, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wasserman, C.R., Wesemann, D.R., et al. (2011). The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. *Cell* *144*, 353–363.

Bébin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogné, N., Lecardeur, S., Cogné, M., and Pinaud, E. (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* *184*, 3710–3717.

Begum, N.A., Stanlie, A., Nakata, M., Akiyama, H., and Honjo, T. (2012). The histone chaperone SPT6 is required for AID target determination through H3K4me3 regulation. *The Journal of Biological Chemistry*.

Bergqvist, P., Stensson, A., Lycke, N.Y., and Bemark, M. (2010). T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *J. Immunol.* *184*, 3545–3553.

Betz, A.G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C., and Neuberger, M.S. (1993). Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 2385–2388.

Birshtein, B.K. (2012). The role of CTCF binding sites in the 3' immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Front Genet* *3*, 251.

Blagodatski, A., Batrak, V., Schmidl, S., Schoetz, U., Caldwell, R.B., Arakawa, H., and Buerstedde, J.-M. (2009). A cis-acting diversification activator both necessary and sufficient for AID-mediated hypermutation. *PLoS Genet.* *5*, e1000332.



Boboila, C., Yan, C., Wesemann, D.R., Jankovic, M., Wang, J.H., Manis, J., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M., and Alt, F.W. (2010). Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *J. Exp. Med.* *207*, 417–427.

Boboila, C., Alt, F.W., and Schwer, B. (2012). Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* *116*, 1–49.

Bolland, D.J., Wood, A.L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E.M., and Corcoran, A.E. (2007). Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 5523–5533.

Borghesi, L., Hsu, L.-Y., Miller, J.P., Anderson, M., Herzenberg, L., Herzenberg, L., Schlissel, M.S., Allman, D., and Gerstein, R.M. (2004). B lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* *199*, 491–502.

Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J. Exp. Med.* *207*, 855–865.

Bredemeyer, A.L., Sharma, G.G., Huang, C.-Y., Helmink, B.A., Walker, L.M., Khor, K.C., Nuskey, B., Sullivan, K.E., Pandita, T.K., Bassing, C.H., et al. (2006). ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. *Nature* *442*, 466–470.

Buchanan, K.L., Smith, E.A., Dou, S., Corcoran, L.M., and Webb, C.F. (1997). Family-specific differences in transcription efficiency of Ig heavy chain promoters. *J. Immunol.* *159*, 1247–1254.

## C

Calame, K.L. (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat. Immunol.* *2*, 1103–1108.

Calsou, P., Delteil, C., Frit, P., Drouet, J., and Salles, B. (2003). Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *J. Mol. Biol.* *326*, 93–103.

Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., and Pillai, S. (2001). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* *14*, 603–615.

Chakraborty, T., Chowdhury, D., Keyes, A., Jani, A., Subrahmanyam, R., Ivanova, I., and Sen, R. (2007). Repeat organization and epigenetic regulation of the DH-Cmu domain of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Mol. Cell* *27*, 842–850.

Chakraborty, T., Perlot, T., Subrahmanyam, R., Jani, A., Goff, P.H., Zhang, Y., Ivanova, I., Alt, F.W., and Sen, R. (2009). A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J. Exp. Med.* *206*, 1019–1027.



- Chaturvedi, A., Martz, R., Dorward, D., Waisberg, M., and Pierce, S.K. (2011). Endocytosed BCRs sequentially regulate MAPK and Akt signaling pathways from intracellular compartments. *Nat. Immunol.* *12*, 1119–1126.
- Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 541–552.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* *422*, 726–730.
- Chaudhuri, J., Khuong, C., and Alt, F.W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* *430*, 992–998.
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol.* *94*, 157–214.
- Chauveau, C., and Cogné, M. (1996). Palindromic structure of the IgH 3'locus control region. *Nat. Genet.* *14*, 15–16.
- Chauveau, C., Pinaud, E., and Cogne, 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.
- Chauveau, C., Jansson, E.A., Müller, S., Cogné, M., and Pettersson, S. (1999). Cutting edge: Ig heavy chain 3' HS1-4 directs correct spatial position-independent expression of a linked transgene to B lineage cells. *J. Immunol.* *163*, 4637–4641.
- Chemin, G., Tinguely, A., Sirac, C., Lechouane, F., Duchez, S., Cogné, M., and Delpy, L. (2010). Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J. Immunol.* *184*, 5009–5017.
- Chen, C., and Birshstein, B.K. (1997). Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J. Immunol.* *159*, 1310–1318.
- Chen, K., and Cerutti, A. (2010). New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol. Rev.* *237*, 160–179.
- Chen, C., Nagy, Z., Prak, E.L., and Weigert, M. (1995). Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity* *3*, 747–755.
- Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K., and Alt, F.W. (1993). Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J.* *12*, 4635–4645.
- Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengtén, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., et al. (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* *10*, 889–898.



Chowdhury, D., and 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.

Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 24, 343–349.

Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* 8, 463–470.

Cogné, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H.L., and Alt, F.W. (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77, 737–747.

Cohen-Tannoudji, M., and Babinet, C. (1998). Beyond “knock-out” mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 929–938.

Conticello, S.G., Ganesh, K., Xue, K., Lu, M., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2008). Interaction between antibody-diversification enzyme AID and spliceosome-associated factor CTNNB1. *Mol. Cell* 31, 474–484.

Corcoran, A.E., Riddell, A., Krooshoop, D., and Venkitaraman, A.R. (1998). Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 391, 904–907.

Corcoran, A.E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin. Immunol.* 17, 141–154.

Corfe, S.A., and Paige, C.J. (2012). The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin. Immunol.* 24, 198–208.

Cyster, J.G. (2010). B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat. Immunol.* 11, 989–996.

## D

D'Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., and 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.

Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G., and Mårtensson, I.-L. (2007). Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26, 4273–4282.

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

Degner, S.C., Wong, T.P., Jankevicius, G., and 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., and 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., Sirac, C., Le Morvan, C., and Cogné, M. (2004). Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol.* *173*, 1842–1848.
- Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W., and Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* *311*, 752–755.
- Dias, S., Silva, H., Jr, Cumano, A., and Vieira, P. (2005). Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* *201*, 971–979.
- Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J.M., and Ferguson, D.O. (2009). Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 808–813.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* *10*, 1292–1299.
- Dreyfus, M., Doyen, N., and Rougeon, F. (1987). The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *EMBO J.* *6*, 1685–1690.
- Driessen, R.L., Johnston, H.M., and Nilsson, S.K. (2003). Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp. Hematol.* *31*, 1284–1291.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* *86*, 43–112.
- Dunleavy, E., Pidoux, A., and Allshire, R. (2005). Centromeric chromatin makes its mark. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 172–175.
- Dunnick, W.A., Shi, J., Graves, K.A., and Collins, J.T. (2005). The 3' end of the heavy chain constant region locus enhances germline transcription and switch recombination of the four gamma genes. *J. Exp. Med.* *201*, 1459–1466.
- Dunnick, W.A., Collins, J.T., Shi, J., Westfield, G., Fontaine, C., Hakimpour, P., and Papavasiliou, F.N. (2009). Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J. Exp. Med.* *206*, 2613–2623.
- Dunnick, W.A., Shi, J., Zerbato, J.M., Fontaine, C.A., and Collins, J.T. (2011). Enhancement of antibody class-switch recombination by the cumulative activity of four separate elements. *J. Immunol.* *187*, 4733–4743.



**E**

Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981–992.

Eaton, S., and Calame, K. (1987). Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7634–7638.

Edelman, G.M. (1970). The structure and function of antibodies. *Sci. Am.* 223, 34–42.

Egawa, T., Kawabata, K., Kawamoto, H., Amada, K., Okamoto, R., Fujii, N., Kishimoto, T., Katsura, Y., and Nagasawa, T. (2001). The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 15, 323–334.

Ehrenstein, M.R., and Neuberger, M.S. (1999). Deficiency in Msh2 affects the efficiency and local sequence specificity of immunoglobulin class-switch recombination: parallels with somatic hypermutation. *EMBO J.* 18, 3484–3490.

Ernst, P., and Smale, S.T. (1995). Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2, 427–438.

**F**

Fairfax, K.A., Kallies, A., Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2008). Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin. Immunol.* 20, 49–58.

Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., and 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., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.

Fiancette, R., Amin, R., Truffinet, V., Vincent-Fabert, C., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010). A myeloma translocation-like model associating CCND1 with the immunoglobulin heavy-chain locus 3' enhancers does not promote by itself B-cell malignancies. *Leuk. Res.* 34, 1043–1051.

Ford, R.J., Shen, L., Lin-Lee, Y.C., Pham, L.V., Multani, A., Zhou, H.-J., Tamayo, A.T., Zhang, C., Hawthorn, L., Cowell, J.K., et al. (2007). Development of a murine model for blastoid variant mantle-cell lymphoma. *Blood* 109, 4899–4906.

Fritz, E.L., Rosenberg, B.R., Lay, K., Mihailović, A., Tuschl, T., and Papavasiliou, F.N. (2013). A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* 14, 749–755.

Fugmann, S.D., and Schatz, D.G. (2001). Identification of basic residues in RAG2 critical for DNA binding by the RAG1-RAG2 complex. *Mol. Cell* 8, 899–910.



Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., and Schatz, D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 495–527.

Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* *9*, 105–114.

Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirosawa, S., Taniguchi, M., et al. (1997). Disruption of the *Bcl6* gene results in an impaired germinal center formation. *J. Exp. Med.* *186*, 439–448.

Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., and Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev.* *18*, 411–422.

## G

Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenkov, V.V., and Birshtein, B.K. (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the *igh* locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1511–1525.

Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 703–713.

Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., and Schiff, C. (2002). Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 13014–13019.

Genetta, T., Ruezinsky, D., and 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. *Mol. Cell. Biol.* *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., et al. (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., Skoultschi, A.I., Hardy, R.R., et al. (2008). Pax5 and linker histone H1 coordinate DNA methylation and histone modifications in the 3' regulatory region of the immunoglobulin heavy chain locus. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6123–6133.

Giannini, S.L., Singh, M., Calvo, C.F., Ding, G., and Birshtein, B.K. (1993). DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J. Immunol.* *150*, 1772–1780.

Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., and 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.



- Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2005). IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* *33*, D256–261.
- Goh, A.M., Coffill, C.R., and Lane, D.P. (2011). The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* *223*, 116–126.
- Good-Jacobson, K.L., and Tarlinton, D.M. (2012). Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.* *24*, 403–408.
- Gordon, S.J., Saleque, S., and Birshtein, B.K. (2003). Yin Yang 1 is a lipopolysaccharide-inducible activator of the murine 3' Igh enhancer, hs3. *J. Immunol.* *170*, 5549–5557.
- Gorman, J.R., van der Stoep, N., Monroe, R., Cogne, M., Davidson, L., and Alt, F.W. (1996). The Ig(kappa) enhancer influences the ratio of Ig(kappa) versus Ig(lambda) B lymphocytes. *Immunity* *5*, 241–252.
- Gostissa, M., Yan, C.T., Bianco, J.M., Cogné, M., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2009). Long-range oncogenic activation of Igh-c-myc translocations by the Igh 3' regulatory region. *Nature* *462*, 803–807.
- Gregor, P.D., and Morrison, S.L. (1986). Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 1903–1916.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Comte, I., Dessain, M.L., Drouet, M., Ayer-Le Lievre, C., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003a). 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. *Biochim. Biophys. Acta* *1642*, 181–190.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Truffinet, V., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003b). Insulators to improve expression of a 3(′)IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *307*, 466–471.
- Guglielmi, L., Truffinet, V., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003c). The beta-globin HS4 insulator confers copy-number dependent expression of IgH regulatory elements in stable B cell transfectants. *Immunol. Lett.* *89*, 119–123.
- Guikema, J.E.J., Linehan, E.K., Tsuchimoto, D., Nakabeppu, Y., Strauss, P.R., Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2007). APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* *204*, 3017–3026.
- Guo, C., Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., and Sen, R. (2011a). 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., et al. (2011b). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* *477*, 424–430.



**H**

Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., et al. (2002). Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* *168*, 57–64.

Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* *173*, 1213–1225.

Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 595–621.

Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* *26*, 703–714.

Hein, K., Lorenz, M.G., Siebenkotten, G., Petry, K., Christine, R., and Radbruch, A. (1998). Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* *188*, 2369–2374.

Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R.S., Bruce, C.K., Kysela, B., Green, A.J., Bianchi, J., Wilson, T.E., Jackson, S.P., and Doherty, A.J. (2006). Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J. Biol. Chem.* *281*, 37517–37526.

Hertz, M., and Nemazee, D. (1997). BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD-bone marrow B cells in vitro. *Immunity* *6*, 429–436.

Horejsí, V., Zhang, W., and Schraven, B. (2004). Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 603–616.

**I**

Inlay, M., Alt, F.W., Baltimore, D., and Xu, Y. (2002). Essential roles of the kappa light chain intronic enhancer and 3' enhancer in kappa rearrangement and demethylation. *Nat. Immunol.* *3*, 463–468.

Inlay, M.A., Lin, T., Gao, H.H., and Xu, Y. (2006). Critical roles of the immunoglobulin intronic enhancers in maintaining the sequential rearrangement of IgH and Igk loci. *J. Exp. Med.* *203*, 1721–1732.

**J**

Jaeger, S., Fernandez, B., and Ferrier, P. (2013). Epigenetic aspects of lymphocyte antigen receptor gene rearrangement or “when stochasticity completes randomness.” *Immunology* *139*, 141–150.

Janz, S. (2006). Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair (Amst.)* *5*, 1213–1224.

Jares, P., and Campo, E. (2008). Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *142*, 149–165.



Jeevan-Raj, B.P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J.H., Cammas, F., Alt, F.W., Losson, R., and Reina-San-Martin, B. (2011). Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* *208*, 1649–1660.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.

Jenuwein, T., and Grosschedl, R. (1991). Complex pattern of immunoglobulin mu gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities. *Genes Dev.* *5*, 932–943.

Jhunjunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., Cutchin, S., Riblet, R., van Dongen, J.J.M., Grosveld, F.G., Knoch, T.A., and Murre, C. (2008). The 3D structure of the immunoglobulin heavy-chain locus: implications for long-range genomic interactions. *Cell* *133*, 265–279.

Ji, Y., Resch, W., Corbett, E., Yamane, A., Casellas, R., and 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., and 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., and Birshstein, 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, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006). Mechanism and Control of V(d)j Recombination at the Immunoglobulin Heavy Chain Locus. *Annual Review of Immunology* *24*, 541–570.

Jung, S., Rajewsky, K., and Radbruch, A. (1993). Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* *259*, 984–987.

## K

Karasuyama, H., Kudo, A., and Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J. Exp. Med.* *172*, 969–972.

Keim, C., Kazadi, D., Rothschild, G., and Basu, U. (2013). Regulation of AID, the B-cell genome mutator. *Genes Dev.* *27*, 1–17.

Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* *103*, 3828–3836.

Kikuchi, K., Lai, A.Y., Hsu, C.-L., and Kondo, M. (2005). IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* *201*, 1197–1203.

Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 22–33.



- Klein, S., Sablitzky, F., and Radbruch, A. (1984). Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. *EMBO J.* *3*, 2473–2476.
- Kodgire, P., Mukkavar, P., Ratnam, S., Martin, T.E., and Storb, U. (2013). Changes in RNA polymerase II progression influence somatic hypermutation of Ig-related genes by AID. *J. Exp. Med.* *210*, 1481–1492.
- Kohler, K.M., McDonald, J.J., Duke, J.L., Arakawa, H., Tan, S., Kleinstein, S.H., Buerstedde, J.-M., and Schatz, D.G. (2012a). Identification of core DNA elements that target somatic hypermutation. *J. Immunol.* *189*, 5314–5326.
- Kohler, K.M., McDonald, J.J., Duke, J.L., Arakawa, H., Tan, S., Kleinstein, S.H., Buerstedde, J.-M., and Schatz, D.G. (2012b). Identification of core DNA elements that target somatic hypermutation. *J. Immunol.* *189*, 5314–5326.
- Kosak, S.T., and Groudine, M. (2004). Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev.* *18*, 1371–1384.
- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* *296*, 158–162.
- Kothapalli, N., Norton, D.D., and Fugmann, S.D. (2008). Cutting edge: a cis-acting DNA element targets AID-mediated sequence diversification to the chicken Ig light chain gene locus. *J. Immunol.* *180*, 2019–2023.
- Kothapalli, N.R., Collura, K.M., Norton, D.D., and Fugmann, S.D. (2011). Separation of mutational and transcriptional enhancers in Ig genes. *J. Immunol.* *187*, 3247–3255.
- Kottmann, A.H., Zevnik, B., Welte, M., Nielsen, P.J., and Köhler, G. (1994). A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* *24*, 817–821.
- Kovalchuk, A.L., duBois, W., Mushinski, E., McNeil, N.E., Hirt, C., Qi, C.-F., Li, Z., Janz, S., Honjo, T., Muramatsu, M., et al. (2007). AID-deficient Bcl-xL transgenic mice develop delayed atypical plasma cell tumors with unusual Ig/Myc chromosomal rearrangements. *J. Exp. Med.* *204*, 2989–3001.
- Kuang, F.L., Luo, Z., and Scharff, M.D. (2009). H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 5288–5293.
- Kumar, R., DiMenna, L., Schrode, N., Liu, T.-C., Franck, P., Muñoz-Descalzo, S., Hadjantonakis, A.-K., Zarrin, A.A., Chaudhuri, J., Elemento, O., et al. (2013). AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature* *500*, 89–92.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 251–262.



**L**

- Larijani, M., and Martin, A. (2012). The biochemistry of activation-induced deaminase and its physiological functions. *Seminars in Immunology*.
- Laurencikiene, J., Tamosiunas, V., and Severinson, E. (2007). Regulation of epsilon germline transcription and switch region mutations by IgH locus 3' enhancers in transgenic mice. *Blood* *109*, 159–167.
- LeBowitz, J.H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D., and Sharp, P.A. (1988). Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro. *Genes Dev.* *2*, 1227–1237.
- Lee, Y.K., Brewer, J.W., Hellman, R., and Hendershot, L.M. (1999). BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2209–2219.
- Lefranc, M.-P., Clement, O., Kaas, Q., Duprat, E., Chastellan, P., Coelho, I., Combres, K., Ginestoux, C., Giudicelli, V., Chaume, D., et al. (2005). IMGT-Choreography for immunogenetics and immunoinformatics. *In Silico Biol. (Gedruckt)* *5*, 45–60.
- Lenz, G., and Staudt, L.M. (2010). Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *362*, 1417–1429.
- Li, F., and Eckhardt, L.A. (2009). A role for the IgH intronic enhancer E mu in enforcing allelic exclusion. *J. Exp. Med.* *206*, 153–167.
- Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D.A., and Eckhardt, L.A. (2010). Comparison of identical and functional Igh alleles reveals a nonessential role for E $\mu$  in somatic hypermutation and class-switch recombination. *J. Immunol.* *185*, 6049–6057.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., and Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Blood* *100*, 3077–3086.
- Lieberson, R., Giannini, S.L., Birshtein, B.K., and Eckhardt, L.A. (1991). An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res.* *19*, 933–937.
- Lieberson, R., Ong, J., Shi, X., and Eckhardt, L.A. (1995). Immunoglobulin gene transcription ceases upon deletion of a distant enhancer. *EMBO J.* *14*, 6229–6238.
- Lin, D., Ippolito, G.C., Zong, R.-T., Bryant, J., Koslovsky, J., and Tucker, P. (2007). Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Mol. Cancer* *6*, 23.
- Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4771–4780.
- Liu, H., Schmidt-Supprian, M., Shi, Y., Hobeika, E., Barteneva, N., Jumaa, H., Pelanda, R., Reth, M., Skok, J., Rajewsky, K., et al. (2007a). Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes Dev.* *21*, 1179–1189.



Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841–845.

Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R., and Desiderio, S. (2007b). 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, B.F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., and Carsetti, R. (1999). B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor–Derived Signals. *The Journal of Experimental Medicine* 190, 75.

Lorenz, M., Jung, S., and Radbruch, A. (1995). Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 267, 1825–1828.

Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847–849.

Luby, T.M., Schrader, C.E., Stavnezer, J., and Selsing, E. (2001). The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 193, 159–168.

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

## M

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794.

Madisen, L., and Groudine, M. (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev.* 8, 2212–2226.

Magor, B.G., Ross, D.A., Pilström, L., and Warr, G.W. (1999). Transcriptional enhancers and the evolution of the IgH locus. *Immunol. Today* 20, 13–17.

Malhotra, D., Fletcher, A.L., and Turley, S.J. (2013). Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunol. Rev.* 251, 160–176.

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

Manis, J.P., Michaelson, J.S., Birshtein, B.K., and Alt, F.W. (2003). Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region. *Mol. Immunol.* 39, 753–760.

Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett.* 584, 2572–2579.



- Martin, F., Oliver, A.M., and 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., and Neuberger, M.S. (1985). Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* *41*, 479–487.
- Matthias, P., and Baltimore, D. (1993). The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 1547–1553.
- Maul, R.W., and Gearhart, P.J. (2010). AID and somatic hypermutation. *Adv. Immunol.* *105*, 159–191.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* *83*, 387–395.
- McBride, K.M., Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., and Nussenzweig, M.C. (2004). Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J. Exp. Med.* *199*, 1235–1244.
- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Barreto, V.M., Robbiani, D.F., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2006). Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 8798–8803.
- Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., Tamir, I.M., Schwickert, T.A., Novatchkova, M., Sun, Q., Huis In 't Veld, P.J., Guo, C., Yoon, H.S., et al. (2013). Flexible Long-Range Loops in the VH Gene Region of the Igh Locus Facilitate the Generation of a Diverse Antibody Repertoire. *Immunity* *39*, 229–244.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* *1*, 379–385.
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., and Cambier, J.C. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* *25*, 953–962.
- Meyer, K.B., and Neuberger, M.S. (1989). The immunoglobulin kappa locus contains a second, stronger B-cell-specific enhancer which is located downstream of the constant region. *EMBO J.* *8*, 1959–1964.
- Meyer, K.B., Skogberg, M., Margenfeld, C., Ireland, J., and Pettersson, S. (1995). Repression of the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer by helix-loop-helix protein Id3 via a functionally important E47/E12 binding site: implications for developmental control of enhancer function. *Eur. J. Immunol.* *25*, 1770–1777.
- Michael, N., Shen, H.M., Longerich, S., Kim, N., Longacre, A., and Storb, U. (2003). The E box motif CAGGTG enhances somatic hypermutation without enhancing transcription. *Immunity* *19*, 235–242.



Michaelson, J.S., Giannini, S.L., and Birshtein, B.K. (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* *23*, 975–981.

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

Mills, F.C., Harindranath, N., Mitchell, M., and Max, E.E. (1997). Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J. Exp. Med.* *186*, 845–858.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869–877.

Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 283–294.

Moore, K.W., Rogers, J., Hunkapiller, T., Early, P., Nottenburg, C., Weissman, I., Bazin, H., Wall, R., and Hood, L.E. (1981). Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 1800–1804.

Morvan, C.L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A., and Cogné, M. (2003). The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* *102*, 1421–1427.

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

Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 18470–18476.

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

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

## N

Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 107–116.

Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., et al. (2007). Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3008–3022.



Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302, 2137–2140.

Neuberger, M.S., and Calabi, F. (1983). Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes. *Nature* 305, 240–243.

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

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

Niuro, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956.

Nishana, M., and Raghavan, S.C. (2012). Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* 137, 271–281.

Nitschke, L., Kestler, J., Tallone, T., Pelkonen, S., and Pelkonen, J. (2001). Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J. Immunol.* 166, 2540–2552.

Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22.

Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., and Li, G.C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551–555.

## O

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573–583.

Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517–1523.

Ohta, Y., and Flajnik, M. (2006). IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10723–10728.

Ong, J., Stevens, S., Roeder, R.G., and Eckhardt, L.A. (1998). 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J. Immunol.* 160, 4896–4903.

Oprea, M., and Perelson, A.S. (1997). Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J. Immunol.* 158, 5155–5162.

Osmond, D.G., Rolink, A., and Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol. Today* 19, 65–68.



Owens, J.D., Jr, Finkelman, F.D., Mountz, J.D., and Mushinski, J.F. (1991). Nonhomologous recombination at sites within the mouse JH-C delta locus accompanies C mu deletion and switch to immunoglobulin D secretion. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 5660–5670.

## P

Parrens, M., Belaud-Rotureau, M.-A., Fitoussi, O., Carerre, N., Bouabdallah, K., Marit, G., Dubus, P., de Mascarel, A., and Merlio, J.-P. (2006). Blastoid and common variants of mantle cell lymphoma exhibit distinct immunophenotypic and interphase FISH features. *Histopathology* *48*, 353–362.

Parslow, T.G., Blair, D.L., Murphy, W.J., and Granner, D.K. (1984). Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 2650–2654.

Parsons, S.J., and Parsons, J.T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* *23*, 7906–7909.

Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., 3rd, Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* *40*, 108–112.

Patenaude, A.-M., Orthwein, A., Hu, Y., Campo, V.A., Kavli, B., Buschiazzi, A., and Di Noia, J.M. (2009). Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 517–527.

Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V., et al. (2010). Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* *143*, 122–133.

Pawlitzky, I., Angeles, C.V., Siegel, A.M., Stanton, M.L., Riblet, R., and Brodeur, P.H. (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J. Immunol.* *176*, 6839–6851.

Pelanda, R., Braun, U., Hobeika, E., Nussenzweig, M.C., and Reth, M. (2002). B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J. Immunol.* *169*, 865–872.

Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 481–511.

Pérez-Durán, P., Belver, L., de Yébenes, V.G., Delgado, P., Pisano, D.G., and Ramiro, A.R. (2012). UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *209*, 1379–1389.

Perlot, T., and Alt, F.W. (2008). Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv. Immunol.* *99*, 1–32.



- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., and Pinaud, E. (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 14362–14367.
- Perlot, T., Pawlitzky, I., Manis, J.P., Zarrin, A.A., Brodeur, P.H., and Alt, F.W. (2010). Analysis of mice lacking DNaseI hypersensitive sites at the 5' end of the IgH locus. *PLoS ONE* *5*, e13992.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* *336*, 931–934.
- Peters, A., and Storb, U. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* *4*, 57–65.
- Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Difilippantonio, M.J., Wilson, P.C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D.R., et al. (2001). AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* *414*, 660–665.
- Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S., and Neuberger, M.S. (2002). AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* *418*, 99–103.
- Petro, J.B., Gerstein, R.M., Lowe, J., Carter, R.S., Shinnars, N., and Khan, W.N. (2002). Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *277*, 48009–48019.
- Pettersson, S., Cook, G.P., Brüggemann, M., Williams, G.T., and Neuberger, M.S. (1990). A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* *344*, 165–168.
- Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L.M., and Wirth, T. (1994). Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities. *EMBO J.* *13*, 1654–1663.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* *424*, 103–107.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 959–971.
- Pierani, A., Heguy, A., Fujii, H., and Roeder, R.G. (1990). Activation of octamer-containing promoters by either octamer-binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B-cell-specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 6204–6215.
- Pike, B.L., Boyd, A.W., and Nossal, G.J. (1982). Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *79*, 2013–2017.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.



Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C., and Cogné, M. (1997). Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2981–2985.

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

Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* *110*, 27–70.

Porter, R.R. (1973). Structural studies of immunoglobulins. *Science* *180*, 713–716.

Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* *41*, 599–613.

Preud'homme, J.L., Petit, I., Barra, A., Morel, F., Lecron, J.C., and Lelièvre, E. (2000). Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol. Immunol.* *37*, 871–887.

## R

Rada, C., and Milstein, C. (2001). The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J.* *20*, 4570–4576.

Rada, C., Ehrenstein, M.R., Neuberger, M.S., and Milstein, C. (1998). Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting. *Immunity* *9*, 135–141.

Rada, C., Jarvis, J.M., and Milstein, C. (2002a). 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., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., and Neuberger, M.S. (2002b). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol.* *12*, 1748–1755.

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

Ramírez, J., Lukin, K., and Hagman, J. (2010). From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Current Opinion in Immunology* *22*, 177–184.

Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat. Immunol.* *4*, 452–456.

Ramiscal, R.R., and Vinuesa, C.G. (2013). T-cell subsets in the germinal center. *Immunol. Rev.* *252*, 146–155.



- Rane, S.G., Cosenza, S.C., Mettus, R.V., and Reddy, E.P. (2002). Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 644–656.
- Rauta, P.R., Nayak, B., and Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol. Lett.* *148*, 23–33.
- Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* *452*, 243–247.
- Reina-San-Martin, B., Chen, J., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2007). Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1-/- B cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 235–239.
- Reth, M.G., and 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-Labeolouse, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* *102*, 565–575.
- Reynaud, S., Delpy, L., Fleury, L., Dougier, H.-L., Sirac, C., and Cogné, M. (2005). Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* *174*, 6176–6183.
- Rezk, S.A., Nathwani, B.N., Zhao, X., and Weiss, L.M. (2013). Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Hum. Pathol.* *44*, 937–950.
- Robbiani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., et al. (2009). AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol. Cell* *36*, 631–641.
- Robert, I., Dantzer, F., and Reina-San-Martin, B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* *206*, 1047–1056.
- Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* *6*, 31–41.
- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Shulman, M.J., and 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.
- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Li, Z., Martin, A., and Scharff, M.D. (2007). Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *204*, 181–190.



Ronco, P., Plaisier, E., Mougnot, B., and Aucouturier, P. (2006). Immunoglobulin light (heavy)-chain deposition disease: from molecular medicine to pathophysiology-driven therapy. *Clin J Am Soc Nephrol* 1, 1342–1350.

Roth, D.B., Zhu, C., and Gellert, M. (1993). Characterization of broken DNA molecules associated with V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10788–10792.

Rumfelt, L.L., Zhou, Y., Rowley, B.M., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2006). Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J. Exp. Med.* 203, 675–687.

## S

Sagaert, X., and De Wolf-Peeters, C. (2003). Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunol. Lett.* 90, 179–186.

Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., et al. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675–685.

Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B.P., and Alt, F.W. (1999). Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1526–1531.

Saleque, S., Singh, M., Little, R.D., Giannini, S.L., Michaelson, J.S., and Birshtein, B.K. (1997). Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J. Immunol.* 158, 4780–4787.

Saleque, S., Singh, M., and Birshtein, B.K. (1999). Ig heavy chain expression and class switching in vitro from an allele lacking the 3' enhancers DNase I-hypersensitive hs3A and hs1,2. *J. Immunol.* 162, 2791–2803.

Sandel, P.C., and Monroe, J.G. (1999). Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10, 289–299.

Saribasak, H., Maul, R.W., Cao, Z., McClure, R.L., Yang, W., McNeill, D.R., Wilson, D.M., 3rd, and Gearhart, P.J. (2011). XRCC1 suppresses somatic hypermutation and promotes alternative nonhomologous end joining in Igh genes. *J. Exp. Med.* 208, 2209–2216.

Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263.

Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 167–202.

Schlissel, M.S. (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 890–899.

Schlissel, M., Constantinescu, A., Morrow, T., Baxter, M., and Peng, A. (1993). Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev.* 7, 2520–2532.



- Schrader, C.E., Linehan, E.K., Mochegova, S.N., Woodland, R.T., and Stavnezer, J. (2005). Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.* *202*, 561–568.
- Schroeder, H.W., Jr, and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S41–52.
- Schwab, K.R., Patel, S.R., and Dressler, G.R. (2011a). Role of PTIP in class switch recombination and long-range chromatin interactions at the immunoglobulin heavy chain locus. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1503–1511.
- Schwab, K.R., Patel, S.R., and Dressler, G.R. (2011b). Role of PTIP in class switch recombination and long-range chromatin interactions at the immunoglobulin heavy chain locus. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1503–1511.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.
- Serwe, M., and Sablitzky, F. (1993). V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J.* *12*, 2321–2327.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* *21*, 81–93.
- Shi, X., and Eckhardt, L.A. (2001). Deletional analyses reveal an essential role for the hs3b/hs4 IgH 3' enhancer pair in an Ig-secreting but not an earlier-stage B cell line. *Int. Immunol.* *13*, 1003–1012.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and 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., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* *4*, 435–441.
- Shinkura, R., Ito, S., Begum, N.A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H., and Honjo, T. (2004). Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* *5*, 707–712.
- Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* *247*, 52–63.
- Singh, M., and Birshtein, B.K. (1996). Concerted repression of an immunoglobulin heavy-chain enhancer, 3' alpha E(hs1,2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 4392–4397.
- Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Mönch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S.E.W. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* *17*, 463–472.



- Sitnicka, E., Brakebusch, C., Martensson, I.-L., Svensson, M., Agace, W.W., Sigvardsson, M., Buza-Vidas, N., Bryder, D., Cilio, C.M., Ahlenius, H., et al. (2003). Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis. *J. Exp. Med.* *198*, 1495–1506.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M., et al. (2001). Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* *2*, 848–854.
- Smith, M.R., Joshi, I., Jin, F., and Al-Saleem, T. (2006). Murine model for mantle cell lymphoma. *Leukemia* *20*, 891–893.
- Sotillo, R., Dubus, P., Martín, J., de la Cueva, E., Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J.* *20*, 6637–6647.
- Stanlie, A., Aida, M., Muramatsu, M., Honjo, T., and Begum, N.A. (2010). Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 22190–22195.
- Stavnezer, J. (2000). Molecular processes that regulate class switching. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *245*, 127–168.
- Stavnezer, J. (2011). Complex regulation and function of activation-induced cytidine deaminase. *Trends Immunol.* *32*, 194–201.
- Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2006). Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends Genet.* *22*, 23–28.
- Stavnezer, J., Radcliffe, G., Lin, Y.C., Nietupski, J., Berggren, L., Sitia, R., and Severinson, E. (1988). Immunoglobulin heavy-chain switching may be directed by prior induction of transcripts from constant-region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 7704–7708.
- Stavnezer, J., Björkman, A., Du, L., Cagigi, A., and 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.
- Stubington, M.J.T., and Corcoran, A.E. (2013). Non-coding transcription and large-scale nuclear organisation of immunoglobulin recombination. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *23*, 81–88.
- Su, T.T., and Rawlings, D.J. (2002). Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J. Immunol.* *168*, 2101–2110.
- Sulentic, C.E.W., Zhang, W., Na, Y.J., and Kaminski, N.E. (2004). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, an exogenous modulator of the 3'alpha immunoglobulin heavy chain enhancer in the CH12.LX mouse cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *309*, 71–78.
- Swanson, P.C. (2004). The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes. *Immunol. Rev.* *200*, 90–114.



**T**

- Ta, V.-T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., et al. (2003). AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat. Immunol.* *4*, 843–848.
- Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., and 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.
- Tang, H., and Sharp, P.A. (1999). Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity* *11*, 517–526.
- Tarlinton, D. (2006). B-cell memory: are subsets necessary? *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 785–790.
- Terauchi, A., Hayashi, K., Kitamura, D., Kozono, Y., Motoyama, N., and Azuma, T. (2001). A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J. Immunol.* *167*, 811–820.
- Thompson, A., Timmers, E., Schuurman, R.K., and Hendriks, R.W. (1995). Immunoglobulin heavy chain germ-line JH-C mu transcription in human precursor B lymphocytes initiates in a unique region upstream of DQ52. *Eur. J. Immunol.* *25*, 257–261.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1009–1020.
- Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., and Delpy, L. (2012). Cross Talk between Immunoglobulin Heavy-Chain Transcription and RNA Surveillance during B Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 107–117.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575–581.
- Truffinet, V., Pinaud, E., Cogné, N., Petit, B., Guglielmi, L., Cogné, M., and Denizot, Y. (2007). The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* *179*, 6033–6042.
- Tsubata, T., and Reth, M. (1990). The products of pre-B cell-specific genes ( $\lambda$ 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J. Exp. Med.* *172*, 973–976.
- Tsukada, S., Sugiyama, H., Oka, Y., and Kishimoto, S. (1990). Estimation of D segment usage in initial D to JH joinings in a murine immature B cell line. Preferential usage of DFL16.1, the most 5' D segment and DQ52, the most JH-proximal D segment. *J. Immunol.* *144*, 4053–4059.
- Tumas-Brundage, K., and Manser, T. (1997). The transcriptional promoter regulates hypermutation of the antibody heavy chain locus. *J. Exp. Med.* *185*, 239–250.



Tumas-Brundage, K.M., Vora, K.A., and Manser, T. (1997). Evaluation of the role of the 3'alpha heavy chain enhancer [3'alpha E(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol. Immunol.* *34*, 367–378.

## V

Victoria, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.

Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogné, N., Cogné, M., and 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.

Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010a). 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., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2010b). The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3306–3311.

Vita, M., and Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* *16*, 318–330.

Volpi, S.A., Verma-Gaur, J., Hassan, R., Ju, Z., Roa, S., Chatterjee, S., Werling, U., Hou, H., Jr, Will, B., Steidl, U., et al. (2012). Germline deletion of Igh 3' regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5-7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the Igh locus. *J. Immunol.* *188*, 2556–2566.

## W

Wabl, M.R., and Burrows, P.D. (1984). Expression of immunoglobulin heavy chain at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 2452–2455.

Wakatsuki, Y., Neurath, M.F., Max, E.E., and Strober, W. (1994). The B cell-specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation. *J. Exp. Med.* *179*, 1099–1108.

Wang, J.H. (2013). The role of activation-induced deaminase in antibody diversification and genomic instability. *Immunol. Res.* *55*, 287–297.

Wang, J.H., Gostissa, M., Yan, C.T., Goff, P., Hickernell, T., Hansen, E., Difilippantonio, S., Wesemann, D.R., Zarrin, A.A., Rajewsky, K., et al. (2009). Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature* *460*, 231–236.

Willmann, K.L., Milosevic, S., Pauklin, S., Schmitz, K.-M., Rangam, G., Simon, M.T., Maslen, S., Skehel, M., Robert, I., Heyer, V., et al. (2012). A role for the RNA pol II-associated PAF complex in AID-induced immune diversification. *J. Exp. Med.* *209*, 2099–2111.

Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-



insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* *269*, 1281–1284.

Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and 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.

## X

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

Xu, C.-R., Schaffer, L., Head, S.R., and 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, Y., Davidson, L., Alt, F.W., and Baltimore, D. (1996). Deletion of the Ig kappa light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V kappa J kappa rearrangement. *Immunity* *4*, 377–385.

Xu, Z., Fulop, Z., Wu, G., Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., Thomas, L.M., Al-Qahtani, A., White, C.A., Park, S.-R., et al. (2010). 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1124–1135.

## Y

Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H., Robbiani, D.F., McBride, K., Nussenzweig, M.C., and 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.

Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* *449*, 478–482.

Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* *40*, 271–281.

Yancopoulos, G.D., Desiderio, S.V., Paskind, M., Kearney, J.F., Baltimore, D., and Alt, F.W. (1984). Preferential utilization of the most JH-proximal VH gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* *311*, 727–733.

Ye, M., and Graf, T. (2007). Early decisions in lymphoid development. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 123–128.

Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* *4*, 442–451.



**Z**

- Zaller, D.M., and Eckhardt, L.A. (1985). Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *82*, 5088–5092.
- Zandi, S., Ahsberg, J., Tsapogas, P., Stjernberg, J., Qian, H., and Sigvardsson, M. (2012). Single-cell analysis of early B-lymphocyte development suggests independent regulation of lineage specification and commitment in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 15871–15876.
- Zarrin, A.A., Tian, M., Wang, J., Borjeson, T., and Alt, F.W. (2005). Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 2466–2470.
- Zarrin, A.A., Goff, P.H., Senger, K., and 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., and 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.
- Zilfou, J.T., and Lowe, S.W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a001883.
- Zou, X., Piper, T.A., Smith, J.A., Allen, N.D., Xian, J., and Brüggemann, M. (2003). Block in development at the pre-B-II to immature B cell stage in mice without Ig kappa and Ig lambda light chain. *J. Immunol.* *170*, 1354–1361.
- Zou, X., Osborn, M.J., Bolland, D.J., Smith, J.A., Corcos, D., Hamon, M., Oxley, D., Hutchings, A., Morgan, G., Santos, F., et al. (2007). Heavy chain-only antibodies are spontaneously produced in light chain-deficient mice. *J. Exp. Med.* *204*, 3271–3283.
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N., and Dracopoli, N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat. Genet.* *12*, 97–99.

