

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

Aurélien TINGUELY

Le 4 octobre 2013

**Transcription et épissage des gènes d'immunoglobulines non-productifs :
Etude des mécanismes mis en jeu et de leur influence
au cours du développement des lymphocytes B**

Directeur de thèse : Dr. Laurent DELPY

JURY

Président

Pr Michel COGNE

Professeurs des université – Université de Limoges

Rapporteurs

Dr Amine KHAMLI

Directeur de recherche CNRS – Toulouse

Dr Claire FRANCASTEL

Directeur de recherche INSERM – Paris

Examineur

Dr Laurent DELPY

Chargé de recherche CNRS – 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

Aurélien TINGUELY

Le 4 octobre 2013

Transcription et épissage des gènes d'immunoglobulines non-productifs :

Etude des mécanismes mis en jeu et de leur influence

au cours du développement des lymphocytes B

Directeur de thèse : Dr. Laurent DELPY

JURY

Président

Pr Michel COGNE Professeurs des université – Université de Limoges

Rapporteurs

Dr Amine KHAMLICH Directeur de recherche CNRS – Toulouse

Dr Claire FRANCASTEL Directeur de recherche INSERM – Paris

Examineur

Dr Laurent DELPY Chargé de recherche CNRS – Limoges

RESUME

Les recombinaisons V(D)J génératrices de la diversité des immunoglobulines (Ig) provoquent, dans deux tiers des cas, l'apparition de PTC pouvant entraîner la production d'Ig tronquées potentiellement néfastes pour la cellule B. Différentes études ont montré que les allèles d'Ig contenant des PTC sont transcrits mais subissent une régulation post-transcriptionnelle considérable diminuant ainsi le taux d'ARNm codant pour une Ig tronquée.

Les projets développés lors de cette thèse ont consisté à poursuivre l'identification des différents processus mis en jeu au cours de la surveillance des transcrits d'Ig non-productifs et à quantifier leur contribution respective au cours du développement B. L'étude de la surveillance des ARN de chaînes lourdes d'Ig (IgH) a révélé une transcription identique des allèles productifs (VDJ+) et non-productifs (VDJ-). De plus cette étude a mis en lumière qu'une coopération très efficace des mécanismes de surveillance des ARNs (NMUP : *nonsense-mediated up-regulation of pre-mRNA*, NAS : *nonsense-associated altered splicing* et NMD : *nonsense-mediated mRNA decay*) permettait de diminuer drastiquement le taux d'ARNm IgH. Nous avons également révélé un lien étroit entre l'intensité de la transcription, l'épissage et la mise en place de ces mécanismes au cours de la maturation B. L'étude de l'activation du NAS au locus Igκ a révélé l'existence d'un nouveau point de contrôle « TIE (*Truncated-Ig Exclusion*) checkpoint » permettant d'éliminer spécifiquement les plasmocytes produisant des Ig tronquées. Pour finir, nous avons démontré que la proximité entre le site donneur d'épissage d'un exon I et son promoteur permet de moduler l'intensité de la transcription de la région S et par conséquent son accessibilité à AID.

En conclusion, nos résultats ont permis de montrer une transcription active des allèles exclus et une coopération des mécanismes assurant le « contrôle qualité » des ARN. De plus, les données concernant la toxicité des Ig tronquées pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement du myélome.

ABSTRACT

During DNA rearrangements of variable immunoglobulin (Ig) segments, random V(D)J junctions increase the diversity of B cell primary repertoire. In two-third of the cases, these random junctions generate frameshift mutations that lead to the appearance of premature termination codons (PTC). If these PTC-containing Ig transcripts are translated, they could generate truncated proteins that could pose a threat to B cell development and function. Several studies including ours showed that non-productively rearranged Ig genes are actively transcribed, and that post-transcriptional regulation strongly downregulated their mRNA levels.

The main issue of this work was to quantify the contribution of the RNA surveillance mechanisms involved in the decrease of non-productive Ig mRNA throughout B cell development. The study of RNA surveillance of IgH transcripts showed that productively and non-productively VDJ-rearranged alleles exhibit equivalent transcription. In addition, our results highlighted the cooperation of three different RNA surveillance mechanisms: NMUP (nonsense-mediated up-regulation of pre-mRNA), NAS (nonsense-associated altered splicing), and NMD (nonsense-mediated mRNA decay). We also demonstrated that IgH transcription and RNA splicing rates determine by which RNA surveillance mechanisms a B lymphocyte can get rid of nonproductive IgH mRNA. With regard to nonproductive Ig κ transcripts, the study of NAS revealed the existence of a new checkpoint, the "TIE (Truncated-Ig Exclusion) checkpoint", that ensures counter-selection of plasma cells producing truncated Ig. Finally, we demonstrated that the proximity between I exon donor splice site and its promoter boost the germline transcription of the S region, and therefore its accessibility to AID during class switch recombination.

In conclusion, our results showed active transcription of excluded alleles and a cooperation of RNA "quality control" mechanisms. In addition, data described here regarding the toxicity of truncated Ig in plasma cells could open new therapeutic perspectives for the treatment of myeloma patients.

REMERCIEMENTS

Avant d'entreprendre d'écrire mes remerciements, je ne pensais pas que ces deux pages allaient être aussi difficiles à rédiger. Non pas qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je m'excuse par avance si jamais c'est le cas et je me lance.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Michel COGNE, qui m'a accueilli dans son laboratoire dès mon stage de master et qui me fait l'honneur d'être le président de ce jury. Je vous remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir conforté dans mon choix de faire une thèse quand, en proie au doute à la fin de mon M2, je vous ai demandé conseil. Je me rappellerai toujours cette phrase « la thèse c'est du sang, de la sueur et des larmes ».

Je remercie chaleureusement madame Claire FRANCASTEL et monsieur Amine KHAMLICHI d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens maintenant à remercier Laurent, pour la qualité de son encadrement pendant toutes ces années. Merci, de m'avoir laissé autant de liberté et d'autonomie tout en sachant parfaitement m'aider, me motiver, me conseiller et me stresser (toujours à bon escient). Tu m'as énormément appris et j'espère que tu n'as pas été déçu de ton choix. Merci également pour tous les bons moments que nous avons partagé et sache que tu seras toujours mon papa du labo.

Il temps pour moi de remercier tous mes collègues du 3^{ème} présents et passés. Ça a été un réel plaisir de travailler en votre compagnie pendant ces quatre années.

Merci Krap et Eric pour votre gentillesse, nos discussions scientifiques et surtout non scientifiques, et tous vos conseils avisés. Si Laurent est mon papa, vous êtes un peu mes tontons (sinon, je ne sais pas si vous avez vu, mais il y a Van Disoul à Glasgow). Merci tata Claire d'avoir essayé de m'apprendre les rudiments de la cytométrie. Merci Anne d'avoir gentiment accepté de me relire le dernier jour avant l'envoi du manuscrit. Merci Seb pour tous tes conseils dans les manips et pour les bons moments passés le dimanche au foot. Merci Yves pour tes anecdotes le matin au café et à toute la « Denizot's team » : Rémi, Christelle (pas Oblet) et Faten. Merci Junior pour toutes tes petites vidéos qui m'ont fait passer des pauses bien agréables pendant la rédaction.

Merci à tous mes voisins de paillasse anciens et nouveaux : Virginie, Rada, Cendrine, Sophie et Nicolas. Merci Jenny pour toutes les corrections que tu apportes à mon english pendant les Friday Day.

Merci à tous ceux dont les bureaux sont répartis dans des recoins du labo : Aurore, Mylène, Stéphanie, Brice, Armand, Sandrine, Amélie, et Zéliha. Merci à Marie pour sa franchise à toute épreuve et pour les soirées bières en compagnie de Nico. Merci à Fabien et Guillaume, les anciens avec qui les collaborations sont allées bien au-delà des manips.

Merci à tout le labo du 2nd : Jean et ses Jeannettes : Nathalie (maman !!!), Chantal, Cathy (merci pour les tris), Abdel (t'es pas une Jeannette), Ibtissam, Estelle, Mona et Amandine.

Merci aux animalier(e)s et à Makiadi qui prennent soin chaque jour de nos petites souris et de notre matériel.

Merci à toute l'équipe de B Cell Design : Jean, Armelle, Cécile et Marie B (une petite série de Miniprep sans colonnes ?). Un grand merci à Gaël, mon coach avec qui j'ai noué une véritable amitié.

Merci à mes Cricris. Merci Christian, mon compatriote suisse pour ta gentillesse et toutes nos discussions sportives. On n'a pas le même métier mais on a la même passion. Merci aussi de m'avoir fait découvrir le Compeix et les talents cachés de Pauline pour la pétanque. Merci Christelle, ma copinette, ma voisine du bureau de l'époque de la stabu à l'ère de l'ilôt. Merci pour ta bonne humeur, nos nombreux fou rires, nos concours de basket poubelle, nos blind-test, nos petits mails, les mojitos dans la piscine de papa Oblet et tous ces moments qui font de toi mon amie. Une petite pensée pour Nivine, ma petite sœur qui assure ma succession avec brio au sein de la Delpy's team.

Je remercie également toute ma famille, ma belle-famille ainsi que les amis qui, avec cette question récurrente « Tu fais quoi déjà ? » m'ont permis de relativiser pendant les moments de doutes. Une mention spéciale pour mon frère à qui je ne dirai qu'une chose « il est où l'hélico ? ». Non, plus sincèrement, je vous remercie pour votre soutien sans faille et vos encouragements durant toutes ces années passées loin de vous (et ce n'est pas fini).

Merci Papa et Maman pour tous ce qui vous avez fait et faites encore pour moi. J'espère qu'un jour Lorenzo sera aussi fier d'être mon fils que je le suis d'être le vôtre.

Enfin, je ne peux pas finir sans avoir une pensée pour Pauline et Lorenzo. Pas besoin de m'étaler ici, vous savez à quel point vous me comblez et comptez pour moi.

A mes parents,

A ma fiancée,

A mon fils,

ABREVIATIONS

3C: capture de conformation chromosomique

3'RR: 3' regulatory region

A

Ac: anticorps

A-EJ: alternative end joining

Ag: antigène

AID: activation-induced deaminase

APE: apurique-apyrimidique endonucléase

ATM: ataxia-telangiectasia mutated

B

BCR: B cell receptor

BER: base excision repair

BSAP: B-cell specific activation protein

Bz: Bortézomibe

C

C: région constante (CL : région constante de chaînes légères/CH : région constante de chaînes lourdes)

CBE: CTCF binding element

CBP: cap binding protein

CD: cluster de différenciation

CDR: complementarity determining region

ChIP: chromatin immunoprecipitation

CHX: cycloheximide

CLP : common lymphoid precursors

C^{PTC}: PTC situé au sein de l'exon constant

CSR: class switch recombination

CTCF: CCCTC-binding factor

CSH: cellule souche hématopoïétique

D

D: segment de diversité

DDR: DSB dependent response

DECID: decay inducing complex

DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit

DNase I: désoxyribonucléase I

DSB: double strand break

E

E2A: E box binding protein 2A

EBF: early B cell factor

eIF: elongation initiation factor

EJC: exon junction complex

ELL2: eleven-nineteen lysine-rich leukemia protein 2

eRF: elongation release factor

ESE: exonic splicing enhancer

ESS: exonic splicing silencer

EZH2: histone-lysine N-methyltransferase 2

F

FISH: fluorescent in situ hybridization

FO: follicular zone

FR: framework region

G

GC: germinal center

H

H: heavy

hMT: human metallothionein

hs: site hypersensible à la DNase I

I

I: intervening

Ig: immunoglobuline

IGCR1: intergenic control region 1

IgH: immunoglobulin heavy chain locus

IgL : immunoglobulin light chain locus

IL : interleukine

ISE: intronic splicing enhancer

ISS: intronic splicing silencer

J

J: segment de jonction (J_L : de chaînes légères/J_H : de chaînes lourdes)

K

KI: knock in

KO: knock out

L

L: light

LB: lymphocyte B

LPS: lipopolysaccharide bactérien

LSR: locus suicide recombination

LT: lymphocyte T

M

MALT: mucosae associated lymphoid tissue

MAR: matrix attachment region

MM: myélome multiple

MMR: *mismatch repair*

MZ: *marginal zone*

N

NAS: *nonsense associated*

altered splicing

neo^R: gène de résistance à la néomycine

NHEJ: *non homologous end joining* (jonction d'extrémités non homologues)

NK: *natural killer*

NMD: *nonsense mediated mRNA decay*

NMTGS: *nonsense mediated transcriptional gene silencing*

NMUP: *nonsense mediated upregulation of pre-mRNA*

P

PABPC: *polyA binding protein cytoplasmic*

PAIRs: *Pax5-activated intergenic repeat elements*

Pax5: *paired-box gene 5*

PAMP: *pathogen associated molecular pattern*

pb: paire de base

PCH: *pericentromeric heterochromatin*

pDH: promoteur des segments DH

PHD: *plant homeo domain*

PKA: protéine kinase A

PTC: *premature termination codon*

PTIP: *Pax interaction with transcription-activation domain protein*

PU1: *purine box factor 1*

pV_H: promoteur des régions variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines

R

Rag: *recombination activating gene*

RE: Réticulum endoplasmique

RNA Pol II: ARN polymérase II

RPA: *replication associated protein*

RS: *recombination sequence*

RSS: *recombination signal sequence*

S

S: région switch

SHM: *somatic hypermutation* (hypermutation somatique)

SMG: *suppressor with morphogenetic effects on genitalia*

Spt5: *suppressor of Ty5 homolog*

SSB: *single strand break*

ssDNA: single strand DNA

STAT5: *signal transducer and activator of transduction 5*

T

TCR: T cell receptor

TD: réponse T dépendante

TdT: *terminal deoxynucleotidyl transferase*

TFII: *transcription factor II*

TI: réponse T indépendante

TIE: *truncated immunoglobulin exclusion*

TPI: *triose phosphate isomerase*

TSS: *transcriptional start site*

U

UNG: *uracile N-glycosylase*

UPF: *up-frameshift*

UPR: *unfolded protein response*

UTR: *untranslated region*

V

V: région variable et segment de variabilité (V_L : de chaînes légères/ V_H : de chaînes lourdes)

V^{PTC}: PTC situé au sein de l'exon VJ

X

XRCC4: *X-ray repair cross complementing protein 4*

Y

YY1: *ying yang 1*

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	1
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
CHAPITRE 1 : TRANSCRIPTION ET REMANIEMENTS DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES	5
1 ORGANISATION DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES	5
1.1 LE LOCUS DES CHAINES LOURDES (IgH)	6
1.2 LES LOCI DE CHAINES LEGERES KAPPA (Igκ) ET LAMBDA (Igλ)	7
2 ONTOGENESE B ET REMANIEMENTS DES GENES D'Ig	8
2.1 L'ONTOGENESE B PRECOCE : LES RECOMBINAISONS V(D)J	8
2.2 L'ONTOGENESE B TARDIVE : LES MECANISMES DE SHM ET CSR.....	13
3 ACCESSIBILITE TRANSCRIPTIONNELLE ET REMANIEMENTS GENIQUES AU LOCUS IgH.....	18
3.1 ACCESSIBILITE ET RECOMBINAISONS V(D)J.....	18
3.1.1 Les modifications de la chromatine	18
3.1.2 La localisation nucléaire du locus IgH	23
3.1.3 La transcription germinale et la structure 3D du locus IgH.....	25
3.2 ACCESSIBILITE ET HYPERMUTATIONS SOMATIQUES.....	31
3.3 ACCESSIBILITE ET COMMUTATION ISOTYPIQUE	32
3.3.1 Le rôle des régions switch.....	33
3.3.2 Les transcrits germinaux.....	33
3.3.3 Le rôle de la transcription germinale.....	34
3.3.4 L'épissage des transcrits germinaux et la CSR	36
3.3.5 La pause de la RNA Pol II et ciblage d'AID.....	37
3.3.6 Les modifications de la chromatine	38
3.3.7 La cis-régulation de la CSR et les interactions à distance	39
CHAPITRE 2 : TRANSCRIPTION ET REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES D'IG NON PRODUCTIFS.....	41
1 TRANSCRIPTION DES GENES D'Ig NON-PRODUCTIFS	41
2 NONSENSE-MEDIATED UPREGULATION OF PRE-mRNA.....	43
3 NONSENSE-ASSOCIATED ALTERED SPLICING	45
3.1 LE NAS DE TYPE I	46
3.2 LE NAS DE TYPE II	46
3.3 LE NAS ET LES IG.....	47
4 NONSENSE MEDIATED mRNA DECAY	47
4.1 LES ACTEURS DU NMD	48
4.1.1 Les protéines UPF	48
4.1.2 Les protéines SMG	50
4.1.3 Le complexe de jonction exon-exon.....	50
4.2 LES MECANISMES DE DEGRADATION PAR NMD.....	51
4.2.1 Le premier tour de traduction : détecter les PTC	51
4.2.2 L'activation du NMD	53

4.2.3	Le cycle de phosphorylation/déphosphorylation d'UPF1 et la dégradation.....	53
4.2.4	La localisation du NMD dans la cellule	55
4.2.5	La règle des 50-55 nucléotides	56
4.2.6	Le NMD EJC-indépendant	57
4.3	LA DEGRADATION PAR NMD DES TRANSCRITS D'Ig NON-PRODUCTIFS.....	58
4.3.1	Le NMD et les IgH	58
4.3.2	Le NMD et les Igκ.....	59
4.3.3	Le NMD et le développement des lymphocytes B.....	59
RESULTATS		61
PARTIE 1 : DIALOGUE ENTRE LA TRANSCRIPTION DU LOCUS IGH ET LES MECANISMES DE SURVEILLANCE DES ARN AU COURS DU DEVELOPPEMENT B.....		62
PARTIE 2 : EPISSAGE ALTERNATIF DES TRANSCRITS D'IMMUNOGLOBULINES NON-PRODUCTIFS		64
PARTIE 3 : LES SITES DONNEURS D'EPISSAGE DES EXONS I INFLUENCENT LA TRANSCRIPTION GERMINALE DES REGIONS SWITCH.		70
DISCUSSION & PERSPECTIVES.....		78
1	LA TRANSCRIPTION BI-ALLELIQUE AU LOCUS IgH	79
2	LA SURVEILLANCE DES ARN DE CHAINES LOURDES D'Ig	81
3	L'ACTIVATION DU NAS ET LE TIE CHECKPOINT.....	85
4	LES Ig TRONQUEES : UNE PERSPECTIVE THERAPEUTIQUE ?	87
5	CONCLUSIONS GENERALES	89
ANNEXES.....		90
ANNEXE 1.....		91
ANNEXE 2.....		92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		93

PREAMBULE

Le système immunitaire assure la défense de l'organisme contre des éléments présentant un danger potentiel pour son intégrité, qu'il s'agisse de pathogènes (bactériens, viraux ou parasitaires) ou d'éventuelles tumeurs. Cette fonction repose essentiellement sur la reconnaissance et la tolérance des constituants normaux de l'organisme (« le Soi ») et l'élimination des éléments altérés ou étrangers (« le Non-soi »). Ce système de défense complexe s'articule autour de deux types d'immunités : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée ou naturelle est une réponse qui n'est pas spécifique de l'agent pathogène. La distinction entre les molécules du Soi et du Non-soi par les cellules de l'immunité innée implique des récepteurs capables de reconnaître des molécules présentes sur les agents pathogènes (PAMP pour *Pathogen Associated Molecular Patterns*). L'immunité adaptative ou acquise est, quant à elle, une réponse spécifique de l'antigène assurée par les lymphocytes T (LT) et B (LB). Elle repose sur la reconnaissance d'un déterminant antigénique (épitope) par les récepteurs des cellules B (BCR pour *B-cell receptor*) et des cellules T (TCR pour *T-cell receptor*). Au cours de la réponse adaptative, les LT et LB interviennent respectivement dans l'immunité cellulaire et humorale. La réponse à médiation humorale implique d'abord la forme membranaire des immunoglobulines (Ig) au sein du BCR et aboutit à la sécrétion d'Ig solubles ou anticorps (Ac) par les plasmocytes (*i.e.* stade de différenciation terminale des cellules B). Ces molécules sont capables de lier spécifiquement un antigène (Ag) dans le but de le neutraliser ou de l'éliminer.

Une longue série de phénomènes d'activation, de coopération cellulaire et de réarrangements intra-géniques est nécessaire avant d'aboutir à la sécrétion clonale d'un type d'Ac, spécifique d'un antigène, par une cellule plasmocytaire. En effet, les gènes codant les Ig ne sont pas fonctionnels dans leur configuration germinale. Les premiers réarrangements ont lieu au cours du développement B précoce et cela indépendamment de la rencontre avec l'antigène. Ce processus appelé recombinaisons V(D)J va assembler les régions variables des chaînes lourdes et légères d'Ig et permettre à chaque LB d'exprimer un BCR unique (pour revue : Jung *et al.*, 2006). D'autres remaniements géniques se déroulent dans les organes lymphoïdes secondaires où les LB activés par l'Ag vont pouvoir améliorer l'affinité et/ou changer les propriétés effectrices de leur BCR grâce aux mécanismes d'hypermutations somatiques (SHM pour *Somatic Hypermutation*) et de commutation de classe (CSR pour *Class switch Recombination*). Ces remaniements géniques dépendent de

l'activité de l'enzyme AID (*Activation Induced Cytidine Deaminase*) (pour revue : Di Noia and Neuberger, 2007 ; Stavnezer *et al.*, 2008).

Cette capacité particulière des LB à façonner leur génome est génératrice de nombreuses cassures de l'ADN. Ces mécanismes doivent donc être finement régulés et contrôlés afin d'éviter des erreurs telles que des translocations d'oncogènes et limiter l'émergence de cellules tumorales. Dans ce programme complexe d'activation génique, la transcription des gènes d'Ig a un rôle prépondérant. Elle est une des clés de l'accessibilité de la chromatine aux enzymes nécessaires aux remaniements. En effet, la synthèse de nombreux transcrits non-codants ou « stériles » est concomitante à la mise en place d'une chromatine décondensée autorisant les recombinaisons.

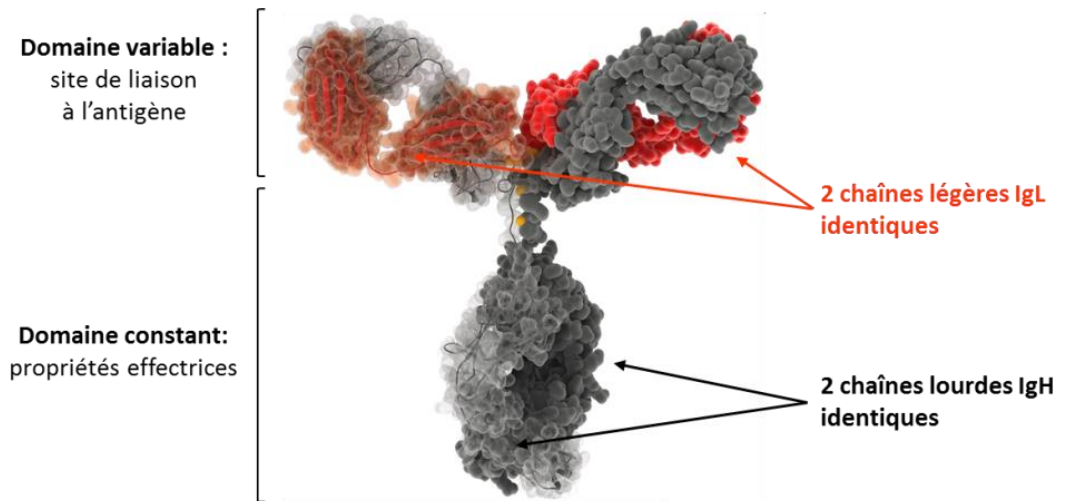
Par ailleurs, le fait de générer un vaste répertoire d'Ig à partir d'un nombre restreint de gènes n'est pas sans conséquences. Lors des recombinaisons V(D)J seul une jonction codante sur trois est en phase et peut coder une chaîne d'Ig fonctionnelle. De nombreux LB vont donc héberger des allèles de chaînes lourdes et légères d'Ig réarrangés de façon non productive. La transcription de ces allèles non productifs peut conduire à la synthèse d'Ig tronquées. Pour empêcher la traduction de telles protéines aberrantes, différents mécanismes de « contrôle qualité des ARN » sont mis en jeu. Ces processus dits de surveillance des ARN sont très actifs dans les lignées lymphoïdes B et T (pour revue : Li and Wilkinson, 1998).

Mes travaux de thèse ont concerné la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des allèles d'Ig réarrangés de façon non-productive et l'impact potentiel de tels transcrits aberrants au cours du développement lymphocytaire B. Je me suis également intéressé au rôle de l'épissage des transcrits germinaux lors de la CSR. Ce manuscrit sera donc principalement focalisé sur la génération des réarrangements V(D)J non-productifs, l'accessibilité transcriptionnelle de ces allèles d'Ig dits « non-productifs » et sur le devenir de leurs transcrits contenant des codons stop prématurés (PTC : *premature termination codon*). Nous détaillerons également l'importance de la transcription non-codante dans les remaniements géniques intervenant naturellement au cours du développement lymphocytaire B.

CONTEXTE

BIBLIOGRAPHIQUE

A



B

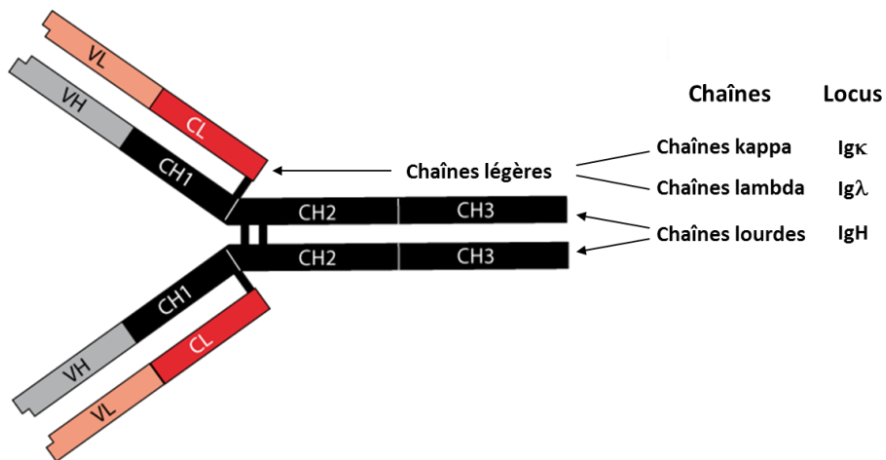


Figure 1: Structure des Immunoglobulines

A : Représentation tridimensionnelle d'une Ig de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en noir et les chaînes légères en rouge.

B : Représentation schématique d'une Ig.

VH et VL : régions variables des chaînes lourdes et légères. CH, CL : régions constantes des chaînes lourdes et légères.

Chapitre 1 : Transcription et remaniements des gènes d'immunoglobulines

copier, couper, coller ...

1 ORGANISATION DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES

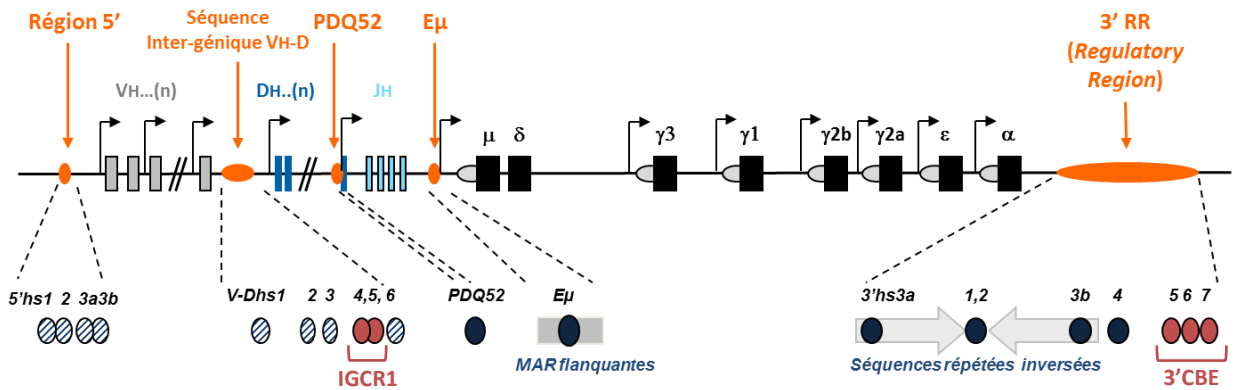
Les Ig sont des glycoprotéines hétérodimériques, d'environ 150 kDa, exprimées à la surface des lymphocytes B ou sécrétées par les plasmocytes. Elles sont composées de deux chaînes lourdes (H pour *Heavy*) identiques et deux chaînes légères (L pour *Light*) identiques (**Figure 1A**). Chaque chaîne est composée d'une région constante (C) et d'une région variable (V). L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'Ag, tandis que les domaines constants des chaînes lourdes (CH) confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline.

L'Homme et la souris possèdent deux types de chaînes légères, appelées κ et λ , qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Les IgG sont subdivisées en 4 sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 chez la souris et IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 chez l'homme qui possède également deux sous-classes d'IgA : IgA1 et IgA2. Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois ou quatre domaines CH : CH1, CH2, CH3 et CH4 (**Figure 1B**).

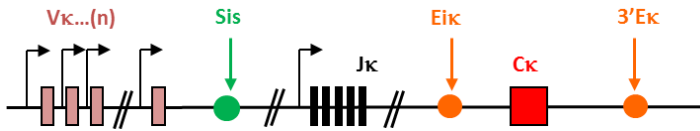
Sur le plan structural, les régions V et C partagent une structure tri-dimensionnelle répondant à la définition de la superfamille des Ig et sont caractérisées par des domaines d'homologie organisés en feuillets β -plissés. La structure tertiaire des domaines V est maintenue par quatre régions très conservées, les régions d'armature (FR1, FR2, FR3, FR4 pour *Framework Regions*). Au sein de ces parties variables, trois régions d'une dizaine d'acides aminés, dites hypervariables (CDR1, CDR2, CDR3 pour *Complementarity Determining Region*) s'associent pour former le paratope (*i.e.* site de liaison à l'Ag) (pour revue : Schroeder and Cavicini, 2010).

En 1965, Dreyer et Bennet ont pour la première fois évoquée que la diversité des Ig puisse être générée par des recombinaisons génétiques, et qu'il devait exister, au sein du génome, plusieurs fragments d'ADN pouvant former la partie variable de l'Ig. A la fin des années 70, de nombreuses études sont venues étayer leur hypothèse. Les travaux de plusieurs groupes ont montré que la formation des chaînes lourdes et légères d'Ig résulte de l'association de plusieurs segments de gènes, et que ces derniers sont organisés en loci sur

A Locus IgH



B Locus Igκ



C Locus Igλ

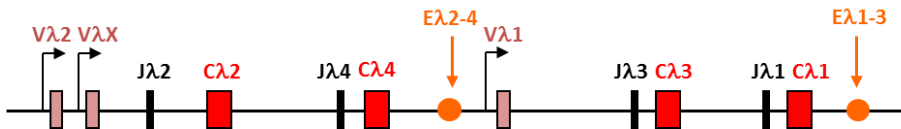


Figure 2: Organisation des loci d'Ig murins

A Le locus IgH dans sa configuration germinale. Les segments codants la partie variable et les gènes constants sont représentés par des rectangles: segments VH (gris), segments DH (bleu), segments JH (bleu clair) et les gènes constants (noir). Les gènes constants sont précédés par des demi-ellipses grises représentant les régions switch. Les différents promoteurs sont représentés par des flèches coudées. Les autres éléments *cis*-régulateurs avérés ou putatifs sont représentés par des cercles ou des ellipses oranges. Ces divers éléments *cis*-régulateurs sont détaillés dans la ligne du dessous: les *enhancers* sont représentés par des cercles bleu marine, les isolateurs par des cercles bordeaux et les éléments potentiellement *cis*-régulateurs par des cercles rayés. Les carrés gris représentent les régions d'attachement à la matrice (MAR) et les flèches grises caractérisent les séquences répétées inversées.

B Le locus Igκ dans sa configuration germinale. Les segments Vκ, Jκ et le gène Cκ sont représentés respectivement par des rectangles rose, noirs et rouge. Les différents promoteurs sont représentés par des flèches coudées. Les *enhancers* sont représentés par des cercles oranges et l'élément *silencer* des recombinaisons par un cercle vert.

C Le locus Igλ dans sa configuration germinale. Les segments Vλ, Jλ et les gènes constants Cλ sont représentés respectivement par des rectangles rose, noirs et rouge. Les différents promoteurs sont représentés par des flèches coudées. Les *enhancers* sont représentés par des cercles oranges.

des chromosomes différents (Dreyer *and* Bennet, 1965 ; Hozumi *and* Tonegawa, 1976 ; Brack *et al.*, 1978 ; Seidman *et al.*, 1978 ; Weigert *et al.*, 1978 ; Schilling *et al.*, 1980 ; Early *et al.*, 1980 ; pour revue Jung *and* Alt, 2004). Nous détaillerons plus particulièrement l'organisation des loci d'Ig murins.

1.1 LE LOCUS DES CHAINES LOURDES (IgH)

Le locus des chaînes lourdes est situé sur le chromosome 12 de la souris (sur le chromosome 14 chez l'Homme), où il s'étend sur plus de trois mégabases.

Dans sa configuration germinale, ce locus contient de multiples segments géniques participant à la formation de la partie variable de l'Ig. Cette dernière est codée par un exon dit VDJ, formé par l'association aléatoire de 3 segments : un segment variable (VH), un segment de diversité (DH) et un segment de jonction (JH). Le locus IgH murin comprend 152 segments VH (dont 97 fonctionnels), regroupés en 15 familles et localisés à l'extrémité 5' du locus (à proximité du télomère). Près de la moitié des segments VH appartiennent à la famille J558 (Brodeur *and* Riblet, 1984 ; Livant *et al.*, 1986 ; Pennell *et al.*, 1989 ; Kofler *et al.*, 1992 ; Mainville *et al.*, 1996). Selon la souche murine, le locus IgH comporte 17 à 20 segments DH, dont 14 fonctionnels, divisés en 4 familles (DFL16, DSP2, DST4 et DQ52) et 4 segments de jonction JH tous fonctionnels (**Figure 2A**) (Kurosawa *and* Tonegawa, 1982 ; Ichihara *et al.*, 1989 ; Feeney *and* Riblet, 1993 ; Johnston *et al.*, 2006 ; Lefranc *et al.*, 2009).

Les segments JH sont suivis de huit gènes codant les différents isotypes de la partie constante des Ig : μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$, ϵ et α . Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde, les régions charnières spécifiques à certains isotypes et les domaines intra-cytoplasmiques et transmembranaires des Ig de surface (Maki *et al.*, 1981 ; Rogers *et al.*, 1981 ; Lefranc *et al.*, 2009).

Le locus IgH contient également de nombreux éléments *cis*-régulateurs qui régulent l'expression des Ig ainsi que les remaniements géniques et qui sont présentés sur la **figure 2**.

1.2 LES LOCI DE CHAINES LEGERES KAPPA (Igκ) ET LAMBDA (Igλ)

Les gènes des chaînes légères d'Ig occupent deux loci indépendants. Le locus κ est situé sur le chromosome 6 de la souris (sur le chromosome 2 chez l'Homme) alors que le locus λ est localisé sur le chromosome 16 chez la souris (sur le chromosome 22 chez l'Homme).

Le locus Igκ murin, dans sa configuration germinale, comporte 174 segments Vκ (dont 94 à 96 sont fonctionnels) regroupés en 20 familles, et 5 segments Jκ (dont seulement 4 fonctionnels). Les segments Vκ et Jκ codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment Cκ code la partie constante (Kofler *et al.*, 1989 ; Strohal *et al.*, 1989 ; Thiebe *et al.*, 1999; Lefranc *et al.*, 2009). Les segments Vκ sont positionnés soit dans le même sens, soit en orientation inverse de la partie génique Jκ-Cκ (Lorenz *et al.*, 1988 ; Weichhold *et al.*, 1990 ; Thiebe *et al.*, 1999) (**Figure 2B**).

Le locus Igλ murin est constitué de 4 familles comprenant chacune une paire de segments Jλ et Cλ (Jλ1 à Jλ4 et Cλ1 à Cλ4). Il est composé de deux unités de recombinaison organisées de façon ordonnée Vλ, Jλ puis Cλ. Ce locus ne comporte que trois segments Vλ : le segment Vλ1 s'associe préférentiellement à Jλ1 et Jλ3 tandis que les segments Vλ2 et Vλ3 s'associent préférentiellement à Jλ2 (Jλ4 et Cλ4 étant défectifs) (Carson *and* Wu, 1989 ; Storb *et al.*, 1989 ; Blomberg *and* Tonegawa, 1982 ; Miller *et al.*, 1982 ; Eisen *and* Reilly, 1985 ; Dildrop *et al.*, 1987 ; Sanchez *and* Casenave, 1987 ; Lefranc *et al.*, 2009) (**Figure 2C**). Le répertoire Vλ très restreint de la souris explique probablement en partie le faible pourcentage de LB exprimant une chaîne légère λ (environ 10%). Chez l'Homme, qui possède presque autant de segments Vκ que Vλ, environ un tiers des cellules B exprime une Igλ (Lefranc *et al.*, 1999). Les gènes λ n'ayant pas fait l'objet de mes travaux de thèse, leurs remaniements ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

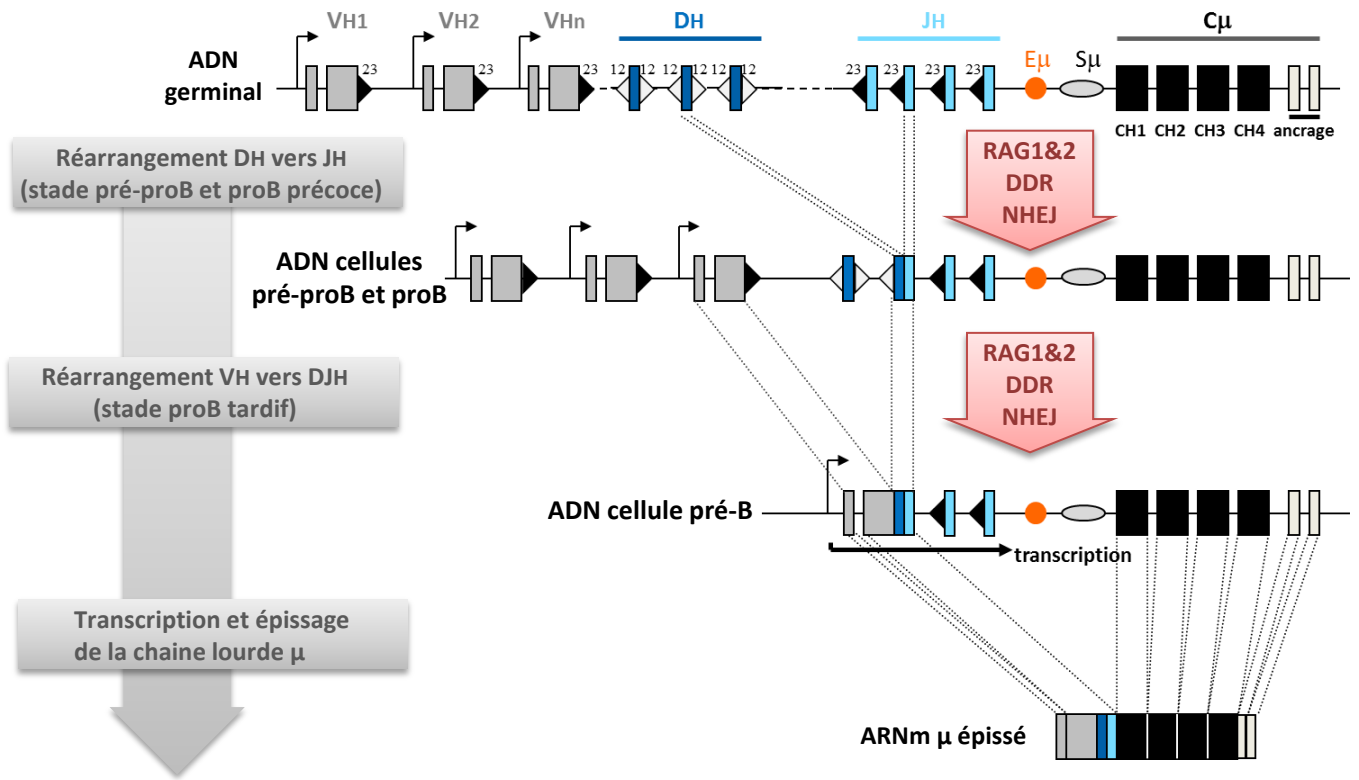


Figure 3: Réarrangements des gènes variables au locus IgH

Les exons codants sont représentés par des rectangles, les introns par des traits fins, les RSS par des triangles, les promoteurs par des flèches coudées, l'activateur E μ par un cercle. La machinerie enzymatique catalysant les recombinaisons V(D)J est présentée par une flèche rose (adapté de Dudley *et al.*, 2005).

2 ONTOGENESE B ET REMANIEMENTS DES GENES D'Ig

2.1 L'ONTOGENESE B PRECOCE : LES RECOMBINAISONS V(D)J

Les gènes d'Ig sont spécifiquement exprimés dans la lignée lymphocytaire B. Spontanément non fonctionnels dans leur configuration germinale, ils doivent subir des recombinaisons somatiques ordonnées afin de pouvoir s'exprimer et permettre la production d'une Ig entière. En effet, les régions variables des Ig sont formées par l'association d'un segment V, d'un segment D (spécifique des chaînes lourdes), et d'un segment J. Ces réarrangements ont lieu aux stades précoces de l'ontogénie B et se déroulent dans la moelle osseuse chez l'adulte (dans le foie chez le fœtus).

La lymphopoïèse B précoce est un processus multi-étapes permettant la prolifération et la maturation des lymphocytes B indépendamment de la présence d'un antigène. Les LB sont issus de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces CSH vont progressivement se différencier, passant par les stades de progéniteurs multipotents puis de précurseurs lymphoïdes communs dits « CLP » (communs aux LB, LT et cellules NK pour *Natural Killer*), pour enfin s'engager vers la lignée B. La production de nombreux facteurs de transcription (notamment Ikaros, E2A, Pax5, EBF1, et PU.1) est essentielle à la promotion et au maintien de leur engagement (pour revue Hardy *et al.*, 2007 ; Fuxa *and* Skok, 2007; Nutt *and* Kee, 2007).

L'engagement des CLP dans le lignage B est caractérisé par l'expression à la surface du marqueur B220 (récepteur du CD45), on parlera alors de cellules **pré-pro-B**. Précurseurs B les plus immatures, elles expriment notamment les marqueurs c-kit et CD43 mais n'expriment pas encore CD19 (Hardy *et al.*, 1991; Rolink *et al.*, 1996 ; Rumfelt *et al.*, 2006, pour revue Hardy *et al.*, 2007). C'est au cours de ce stade pré-pro-B que s'initient les réarrangements des gènes d'Ig. Ils ont d'abord lieu entre un segment DH et un segment JH et s'opèrent simultanément sur les deux allèles. Ils aboutissent à la formation de segments réarrangés DJH. Ce premier évènement caractérise le stade **pro-B dit « précoce » (Figure 3)** (pour revue Jung *et al.*, 2006).

D'un point de vue moléculaire, ces recombinaisons sont initiées par les endonucléases RAG (*Recombination Activating Gene*) codées par les gènes *Rag1* et *Rag2* dont l'expression est restreinte aux seules lignées lymphoïdes B et T (Schatz *et al.*, 1989 ; Oettinger *et al.*, 1990). Ces enzymes vont introduire des cassures doubles brins (DSB, pour

Double-Strand Breaks) précisément entre une séquence spécifique nommée séquence signal de recombinaison ou RSS (pour *Recombination Signal Sequence*) et une séquence codante (dans ce cas le segment DH ou le segment JH). Ces RSS qui bordent tous les segments V, D et J sont constituées d'un heptamère (CACAGTG) et d'un nonamère (ACAAAACC) tous deux extrêmement conservés et séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides nommée «espaceur» (pour revue Tonegawa, 1983). La longueur des espaceurs tient une place importante dans ce processus puisqu'un réarrangement ne peut subvenir qu'entre deux segments dont les RSS possèdent des espaceurs de longueurs différentes (*i.e.* entre une RSS-12 et une RSS-23) selon la règle dite « 12/23 ». Or au locus IgH, les segments VH et JH sont flanqués par une RSS-23 alors que les segments DH sont encadrés par des RSS-12, si bien qu'un segment VH ne pourra jamais s'associer avec un segment JH (pour revue Jung *and* Alt, 2006 ; Schatz *and* Ji, 2011 ; Schatz *and* Swanson, 2011).

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-Dépendant Response*) dépendante d'ATM (pour *Ataxia Telangiectasia Mutated*) afin de les stabiliser et les protéger avant la réparation (Bredemeyer *et al.*, 2006 ; Bredemeyer *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008 ; Zha *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2012 ; Oksenysh *et al.*, 2012 ; pour revue Helmink *and* Slekmann, 2012) . Enfin, la résolution de ces cassures fait appel à la voie NHEJ (*Non Homologous End Joining*), voie prédominante de réparation des DSB dans les cellules de mammifères. Elle met en jeu plusieurs facteurs dont Ku70/Ku80, DNA-PKcs (*DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit*), XRCC4 (*X-ray Repair Cross-Complementing protein 4*), DNA ligase-IV, Artemis et Cernunnos (ou XLF pour *XRCC4-like Factor*) (Taccioli *et al.*, 1994 ; pour revues Bassing *et al.*, 2002 ; Sekiguchi *and* Ferguson, 2006 ; Lieber, 2010 ; Boboila *et al.*, 2012).

Contrairement à la jonction entre deux RSS qui se fait de façon précise, la jonction entre les régions codantes (*i.e.* entre DH et JH et entre VH et DJH) est imprécise, remaniée par l'ajout ou la suppression d'un nombre aléatoire de nucléotides (pour revue Schlissel *et al.*, 2003). En effet, entre la création des DSB et la recombinaison, peuvent apparaître l'addition de courtes duplications palindromiques appelées éléments P. L'ajout de nucléotides peut également se faire de façon totalement aléatoire au niveau de l'extrémité 3' des brins clivés. Ces insertions dites N (pour *Non germline element*) sont dues à l'action de la *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (TdT), dont l'expression est réprimée après le stade proB

(Sakano *et al.*, 1981 ; Kurosawa *and* Tonegawa, 1982 ; Alt *and* Baltimore, 1982 ; Desiderio *et al.*, 1984). Cette grande variabilité jonctionnelle contribue de façon considérable à la diversité des réarrangements, permettant ainsi de générer un large éventail d'Ig à partir d'un nombre limité de gènes.

Parallèlement à la mise en place de ces réarrangements D-JH, les cellules pro-B acquièrent l'expression de CD19 et CD24 et s'engagent de façon irréversible dans la lignée B ; notamment grâce au facteur de transcription Pax-5 (nommé également BSAP pour *B-cell specific activation protein*) qui active les gènes spécifiques du lignage B et inhibe simultanément les gènes spécifiques des autres populations médullaires (pour revue : Cobaleda *et al.*, 2007). Le facteur de transcription E2A et l'interleukine 7 (IL-7) jouent aussi un rôle essentiel dans le maintien de cet engagement (pour revue Nutt *and* Kee, 2007). Par ailleurs, les cellules pro-B expriment les molécules de transduction du signal intracellulaire CD79a et CD79b associées à la calnexine (Nagata *et al.*, 1997).

Le locus IgH subit ensuite un second réarrangement intra-génique mettant en jeu la même machinerie enzymatique. L'association d'un segment VH au segment DJH préexistant achève ainsi la formation de l'exon codant la région variable de la chaîne lourde. Ces recombinaisons caractérisent le stade **pro-B dit « tardif »**. Contrairement aux réarrangements bi-alléliques DJH, le réarrangement VH-DJH se produit de façon asynchrone sur un seul allèle IgH. Suite à ces recombinaisons, la transcription d'un ARN pré-messager (pré-ARNm) est initiée à partir du promoteur situé en 5' de la région variable réarrangée (*i.e.* le promoteur du segment VH recombiné ou pVH) (**Figure 3**). L'exon VDJ ainsi formé est associé à la région constante par épissage du pré-ARNm. De plus, les exons V sont précédés d'une petite séquence de 60 à 90 paires de bases (pb) qui représente l'exon signal ou *leader* (L), codant la majeure partie du peptide signal de la protéine (Huber *et al.*, 1993; Weichhold *et al.*, 1993; pour revue Zachau, 1993 ; Dudley *et al.*, 2005).

Si la jonction VDJ respecte le cadre ouvert de lecture des exons codant la région constante, l'allèle est dit « productif » (VDJ+) et permet la synthèse d'une chaîne lourde μ . Cette chaîne lourde μ est ensuite exportée à la membrane en association avec la pseudo-chaîne légère ($\lambda 5$ et VpréB) et le complexe CD79a/CD79b, formant ainsi le pré-BCR et marquant le stade pré-B de la maturation (pour revue Mårtensson *et al.*, 2007 ; Herzog *et al.*, 2009). La signalisation en aval du pré-BCR réprime l'expression des enzymes RAG et inhibe le réarrangement V-DJH sur le second allèle IgH : c'est le phénomène d'exclusion

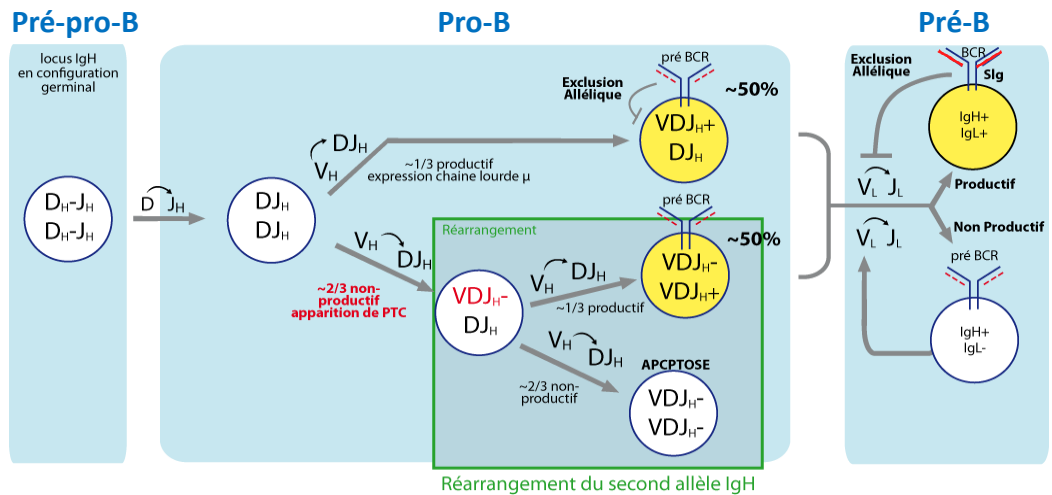


Figure 4: Les recombinaisons V(D)J au cours du développement B

Les recombinaisons V(D)J commencent au stade pré-proB et proB où une première recombinaison D-JH s'effectue sur les deux allèles IgH. La recombinaison d'un segment VH sur le segment DJH réarrangé s'effectue ensuite sur un seul des deux allèles (phénomène d'exclusion allélique). Si ce réarrangement est productif (VDJ+), la chaîne lourde peut s'associer avec une pseudo-chaîne légère pour former le pré-BCR. La signalisation en aval du pré-BCR permet à la cellule de poursuivre sa maturation B et de réarranger ses gènes de chaînes légères. deux fois sur trois, ce réarrangement est non-productif et il entraîne l'apparition de PTC (VDJ-). Un second réarrangement VDJ s'effectue alors sur le second allèle IgH. Les cellules représentées en jaune peuvent passer au stade de différenciation suivant. Les pourcentages indiquent la proportion de cellules présentant la configuration indiquée (d'après Jung *et al.*, 2006).

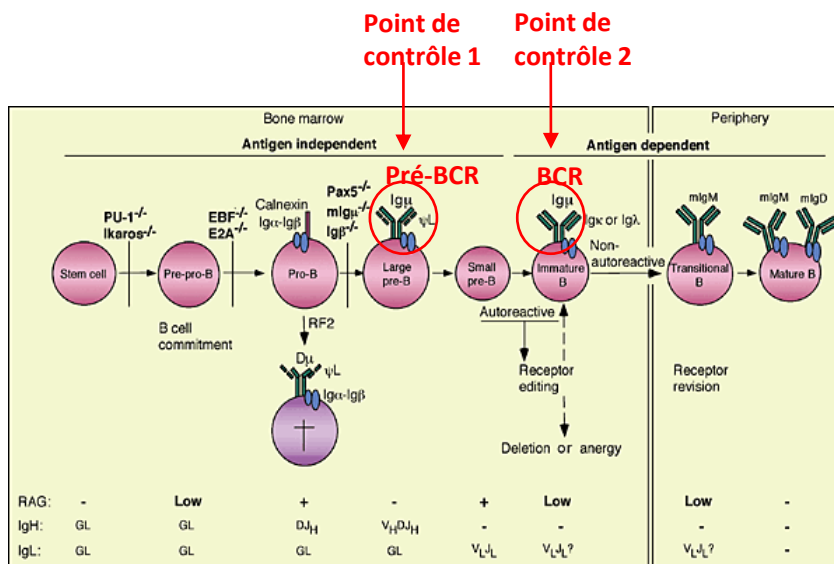


Figure 5: Les stades précoces du développement B

Représentation schématique du développement B précoce indépendant de l'antigène. L'expression de RAG et le statut de réarrangement des loci de chaînes lourdes (IgH) et légères (IgL) sont indiqués sur le schéma. Les étapes auxquelles le développement B est bloqué dans des modèles d'inactivation (-/-) de certains gènes sont marquées par des traits verticaux. Deux points de contrôle permettent la progression de la différenciation B. GL : configuration germinale ; ψL : pseudo-chaîne légère (adapté de Meffre *et al.*, 2000).

allélique (pour revue Vetterman *and* Schlissel, 2010). Ces cellules possèdent donc un allèle productif VDJ+ et un allèle réarrangé DJ (configuration VDJ+/DJ au locus IgH) (**Figure 4**).

Cependant, la grande imprécision des jonctions génère de nombreux réarrangements V(D)J non-productifs (VDJ-). En effet, deux tiers des jonctions V(D)J induisent un décalage du cadre de lecture et l'apparition de codons stop prématurés (PTC) sur le transcrit d'Ig. Si un allèle IgH présente une recombinaison V(D)J hors phase, la survie cellulaire et l'expression d'un pré-BCR nécessitent un réarrangement productif sur le second allèle. Ces cellules présentent alors des réarrangements bi-alléliques au locus IgH. Différentes analyses du répertoire B ont permis de montrer qu'environ la moitié des cellules B hébergent des réarrangements bi-alléliques en configuration VDJ+/VDJ- (**Figure 4**) (Ehlich *et al.*, 1994 ; ten Boekel *et al.*, 1995 ; Daly *et al.*, 2007 ; pour revues Jung *and* Alt, 2006 ; Vettermann *and* Schlissel, 2010).

L'expression du pré-BCR à la surface marque la transition entre le stade pro-B et le stade pré-B. A ce stade, les cellules expriment encore le marqueur de surface CD43 et acquièrent l'expression du CD25. L'expression du pré-BCR est un point de contrôle crucial dans la maturation B (**Figure 5**) (pour revue Melchers, 2005). En effet, sa signalisation entraîne l'arrêt des réarrangements au locus IgH, et permet la survie et l'expansion clonale des grandes cellules pré-B (**large préB**) (2 à 7 cycles de division). 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. Par conséquent, après l'arrêt de la prolifération, les cellules n'expriment plus le pré-BCR. Ces petites cellules pré-B (**small pré-B**) n'expriment plus le marqueur CD43. L'expression de la pseudo-chaîne légère étant arrêtée, la chaîne μ ne peut plus être exportée à la membrane tant qu'une chaîne légère conventionnelle n'est pas produite. Cette absence de signal permet la réexpression des RAG avec pour conséquence l'induction des réarrangements VL-JL aux loci des chaînes légères (pour revues Herzog, 2009 ; Mårtensson, 2010).

Les mécanismes impliqués dans les réarrangements VJ aux loci des chaînes légères sont les mêmes que pour la chaîne lourde, mis à part que la TdT n'est plus exprimée éliminant la possibilité de N-diversité. Ces recombinaisons s'effectuent également de façon ordonnée et vont concerner en premier lieu le locus Ig κ puis le locus Ig λ . Comme pour les chaînes lourdes, le phénomène d'exclusion allélique est également imposé au niveau des chaînes légères. En effet, un segment V κ va être recombinaisonné avec un segment J κ sur un des

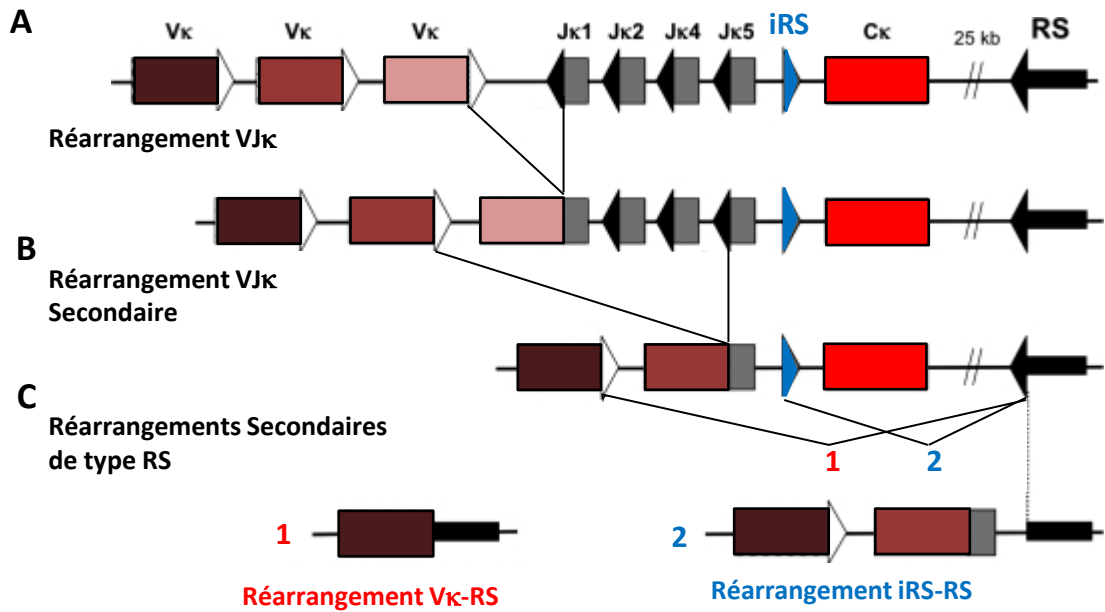


Figure 6: Les réarrangements secondaires au locus *kappa*

A Réarrangement VJ κ classique. Un segment V κ est réarrangé à un segment J κ donné.

B Réarrangement VJ κ secondaire. Un segment V κ situé en amont du premier réarrangement VJ κ est recombinaisonné avec un segment J κ situé en aval.

C Réarrangements secondaires mettant en jeu la séquence RS. Un segment V κ (1 en rouge) ou l'iRS (2 en bleu) se recombine avec la séquence κ RS inactivant ainsi le locus Ig κ . RS : *Recombining Sequence*.

(adapté de Panigrahi *et al.*, 2008).

deux allèles Ig κ . Si l'exon VJ κ ainsi formé est productif (VJ+), une chaîne légère κ peut alors être synthétisée. Pour cela, l'exon VJ formé sera associé à l'exon constant par épissage du pré-ARNm. Cette chaîne légère est ensuite associée à la chaîne lourde μ (déjà présente) pour former une IgM complète. Cette dernière sera exportée à la membrane avec le complexe CD79a/CD79b formant ainsi le BCR. De la même façon qu'au stade pré-B, l'expression du BCR va induire un rétro-contrôle négatif bloquant les réarrangements sur les autres allèles de chaînes légères. On parlera ainsi d'exclusion allélique pour le second allèle Ig κ et d'exclusion isotypique pour les allèles Ig λ . Dans deux tiers des cas, le premier réarrangement VJ κ s'avère être non productif (VJ-), si bien que le second allèle Ig κ est recombinaison à son tour. Enfin, si les deux réarrangements κ sont non productifs, c'est le locus λ qui est recombinaison selon le même principe. (pour revues Gorman *and* Alt, 1998 ; Mostoslavsky *et al.*, 2004).

La présence du BCR caractérise le stade **B immature** et la signalisation induite par ce dernier constitue le deuxième point de contrôle important dans l'ontogénèse B (**Figure 5**). En effet, un processus de sélection négative permet d'éliminer les cellules B immatures dont le BCR reconnaît un antigène du soi (*i.e.* BCR auto-réactif). Certaines cellules dont le BCR est auto-réactif vont tenter d'échapper à cette sélection négative en opérant des recombinaisons secondaires visant à modifier la partie variable de leur chaîne légère : ce processus est appelé édition du BCR. Ainsi, sur un allèle κ déjà réarrangé, une recombinaison peut être tentée entre un segment V κ situé en amont du premier réarrangement VJ κ et un segment J κ situé en aval (**Figure 6**). (Shapiro *and* Weigert, 1987 ; Tiegs *et al.*, 1993 ; Hertz *et* Nemazee, 1997 ; Pelanda *et al.*, 1997; pour revues Jankovic *et al.* 2004 ; Prak *et al.*, 2011). Le locus Ig κ peut également subir des recombinaisons au niveau de séquences nommées RS (*Recombining Sequence*) qui conduisent à son inactivation (Durdik *et al.*, 1984 ; Siminovitch *et al.*, 1985 et 1987 ; Dunda *and* Corcos 1997 ; Retter *and* Nemazee, 1998 ; Panigrahi *et al.*, 2008 ; Vela *et al.*, 2008 ; Daitch *et al.*, 1992 ; pour revue Prak *et al.*, 2011).

A ce stade, les cellules sélectionnées expriment un BCR fonctionnel de type IgM et perdent l'expression du CD25. Elles peuvent quitter la moelle osseuse et migrer *via* la circulation sanguine dans la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT pour *Mucosae Associated Lymphoid Tissue*). C'est au sein de ces différentes structures, communément appelées organes lymphoïdes secondaires, que les

LB activés par l'Ag vont interagir avec les autres acteurs du système immunitaire et subir des remaniements additionnels de leur gènes d'Ig.

2.2 L'ONTOGENESE B TARDIVE : LES MECANISMES DE SHM ET CSR

Les cellules faisant la transition entre le berceau médullaire et la périphérie sont qualifiées de **B transitionnelles**. Les cellules B transitionnelles vont avoir une destinée différente en fonction de la nature du signal induit par leur BCR (*i.e* selon la force de l'activation du BCR). Ainsi, les cellules **B matures** sont divisées en trois catégories : les cellules B folliculaires (B FO), les cellules B de la zone marginale (B MZ) et les cellules B1. Ces cellules diffèrent de par leur localisation, leur phénotype, leur fonction et leur mode d'activation (dépendant ou non des cellules lymphocytaires T) (Lam *and* Rajewsky, 1999 ; Casola *et al.*, 2004 ; pour revues Sagaert *and* De Wolf-Peeters, 2003 ; Pillai *and* Cariappa, 2009). Les B FO représentent la majorité des LB de la rate et des ganglions et sont regroupées en microstructures anatomiques appelées follicules.

Les LB peuvent être activés de deux façons différentes en fonction de la nature des Ag mis en jeu. Lorsque les antigènes sont de nature protéique l'activation des LB nécessite une coopération avec les LT (*i.e.* réponse T-dépendante ou TD). Par contre des Ag dérivés de composants microbiens tels que les lipopolysaccharides (LPS) peuvent induire l'activation des LB en l'absence de LT (*i.e.* réponse T-indépendante ou TI). Les réponses TI concernent les cellules B1 et MZ qui peuvent se différencier rapidement en plasmocytes (extra folliculaires) sécrétant des IgM (parfois des IgG et IgA) (pour revue Cerutti *et al.*, 2013). Les réponses TD font principalement intervenir les B FO et sont considérées comme les seules à aboutir à la formation de cellules B mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie (pour revue Good-Jacobson *and* Tarlinton, 2012). Au sein des follicules, les LB sont dans un microenvironnement propice aux contacts avec les Ag exogènes. Suite à leur rencontre avec l'Ag, les LB activés migrent au centre des follicules et initient la formation de centres germinatifs (GC pour *Germinal Center*) (Allen *et al.*, 2007). On observe dans les GC une expansion rapide et clonale des LB activés, au contact de LT auxiliaires folliculaires et de cellules présentatrices d'antigènes, les FDC (pour *Follicular Dendritic Cells*) (pour revue Victora *and* Nussenzweig, 2012).

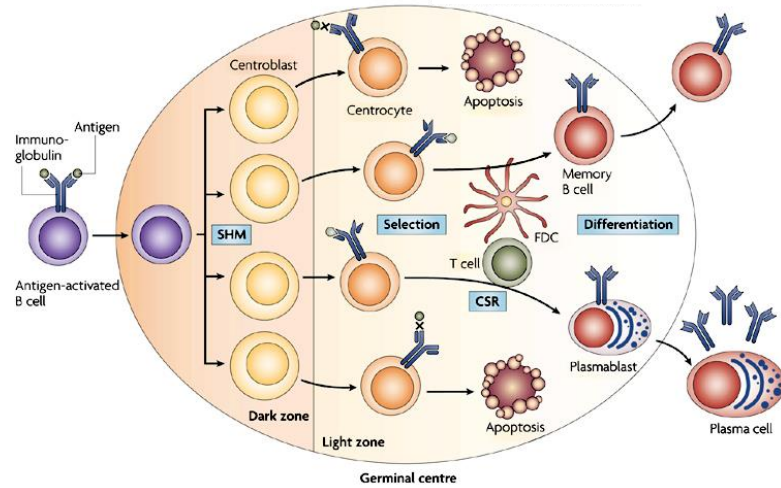


Figure 7: Structure schématique d'un centre germinatif

Les LB activés par la rencontre avec l'Ag vont former la population des centroblastes qui prolifèrent dans la zone sombre du centre germinatif (dark zone) et vont subir le processus de SHM. Ils vont ensuite migrer dans la zone claire (light zone) et former la population des centrocytes. Ces derniers vont être sélectionnés pour leur affinité avec l'Ag, avec l'aide des FDC (cellules dendritiques folliculaires) et des T_H (LT auxiliaires folliculaires). Ils ont alors la capacité de retourner dans la zone sombre. Les centrocytes sélectionnés vont subir la CSR puis se différencier en B mémoires ou en plasmocytes (d'après Klein et Dalla-Favera, 2008).

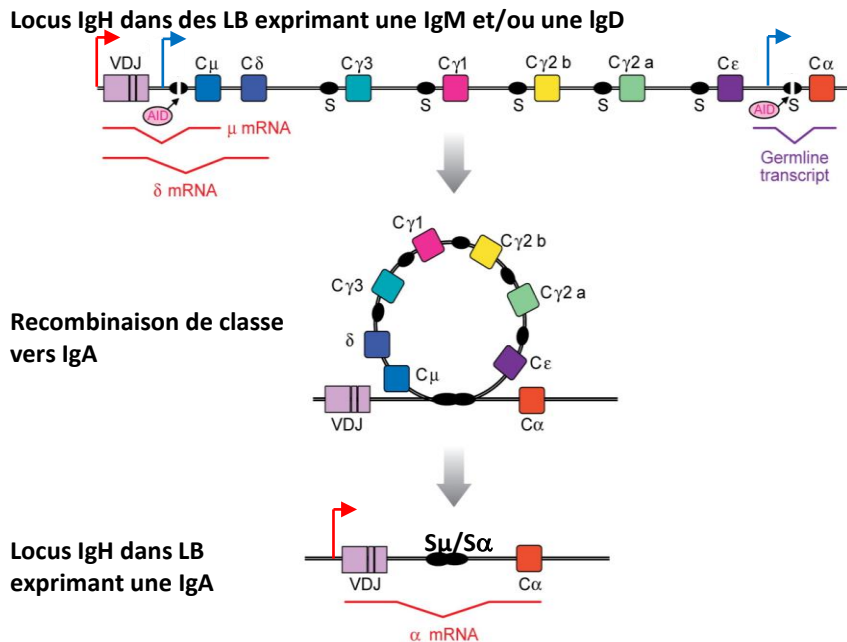


Figure 8 : Mécanisme général de la commutation de classe vers IgA

La flèche rouge indique le promoteur V_H qui va initier la transcription et permettre la production d'IgM (et IgD) par la cellule B. Les promoteurs situés en amont de S_μ et S_α (flèches bleues) vont initier la transcription de ces deux régions S. Les schémas d'épissage des ARNm μ, δ et le transcrite germinale α sont représentés sous le locus, en haut de la figure. Cette transcription germinale va permettre à l'enzyme AID d'initier des cassures dans ces régions S qui vont ensuite être recombinées entre elles, avec élimination de la partie du locus située entre ces deux régions sous la forme d'un cercle d'excision. Le gène codant C_α, rapproché du promoteur V_H, va pouvoir être associé à l'exon VDJ après épissage pour la production d'IgA (d'après Stavnezer *et al.*, 2008).

Au sein des GC, les LB activés subissent de nouvelles modifications des gènes codant leurs chaînes d'Ig afin d'améliorer la spécificité de la réponse antigénique (**Figure 7**). Ce processus de maturation des Ig fait appel à deux mécanismes génétiques : (1) la SHM qui consiste en l'introduction de mutations ponctuelles au niveau de l'exon codant la partie variable des chaînes lourdes et légères d'Ig dans le but d'améliorer l'affinité du BCR pour l'Ag. Les mutations sont majoritairement localisées au niveau des régions hypervariables (*i.e.* les CDR) qui forment le site de fixation antigénique (pour revue Di Noia and Neuberger, 2007). (2) La CSR permet de remplacer la région codant pour les domaines constants de la chaîne lourde $C\mu$ et $C\delta$ par un des autres gènes constants situés en aval : $C\gamma3$, $C\gamma1$, $C\gamma2b$, $C\gamma2a$, $C\alpha$ ou $C\epsilon$. Ce réarrangement intragénique confère aux IgH des fonctions effectrices différentes tout en préservant leur exon VDJ et par conséquent leur spécificité de reconnaissance antigénique. En effet, en amont de chaque région constante (sauf $C\delta$) se trouve une région nommée *switch* (S). Ces dernières sont constituées de séquences répétées, riches en G/C qui sont la cible de mutations ponctuelles pouvant générer des DSB. La CSR est fondée sur la réparation des DSB créées au niveau de la région S dite donneuse ($S\mu$), située en amont de $C\mu$, et au niveau d'une région S dite acceptrice située en aval (Sx , x désignant un isotype de chaîne lourde) entraînant ainsi la formation de jonctions hybrides $S\mu/Sx$. Cette recombinaison entraîne l'excision de la portion chromosomique située entre les deux régions S clivées sous forme d'épisme. La CSR juxtapose ainsi l'exon VDJ réarrangé avec en aval un nouveau gène constant Cx (**Figure 8**). Par conséquent, les transcrits initiés à partir du pVH, entraîneront la synthèse d'une chaîne lourde codant un nouvel isotype (pour revues Chaudhuri *and* Alt, 2004 ; Chaudhuri *et al.*, 2007).

Bien que la SHM et la CSR diffèrent par leurs fonctions, ces deux événements géniques reposent sur l'action de l'enzyme AID dont le ciblage au niveau des régions concernées nécessite leur transcription préalable (pour revues Pavri *and* Nussenzweig, 2011; Stavnezer, 2011). Cette relation étroite entre l'accessibilité transcriptionnelle et le recrutement d'AID dans ces processus de diversification sera détaillée dans les paragraphes 3.2 et 3.3. 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). Cette enzyme exprimée quasi exclusivement par les LB du GC initie la CSR et la SHM en déaminant des déoxycytidines (C) en déoxyuridines (U) au niveau de fragment d'ADN simple

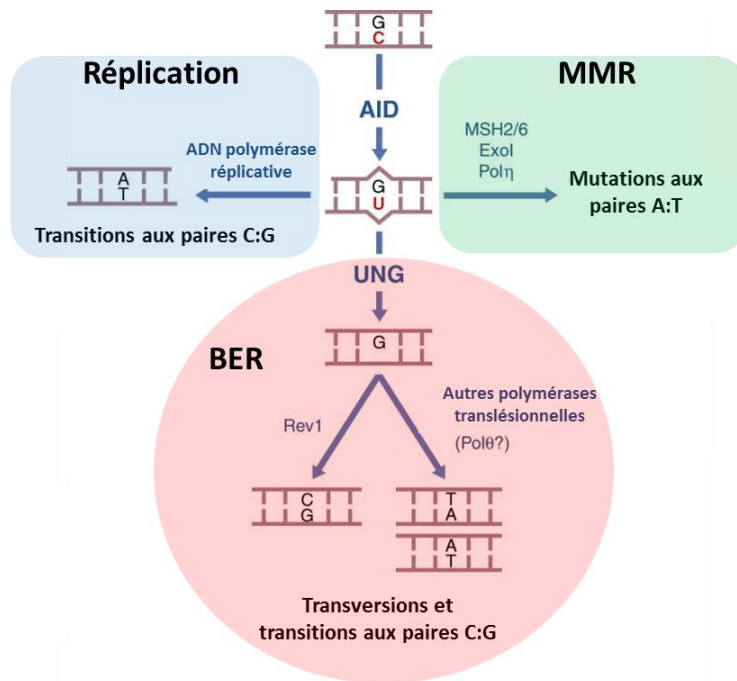


Figure 9 : Prise en charge des mésappariements générés lors des SHM

L'uracile généré sur l'ADN par l'activité d'AID peut être pris en charge par trois voies différentes pour aboutir à une mutation : la simple réplication, la MMR (*MisMatch Repair*) ou la BER (*Base Excision Repair*) (d'après Di Noia *and* Neuberger, 2007).

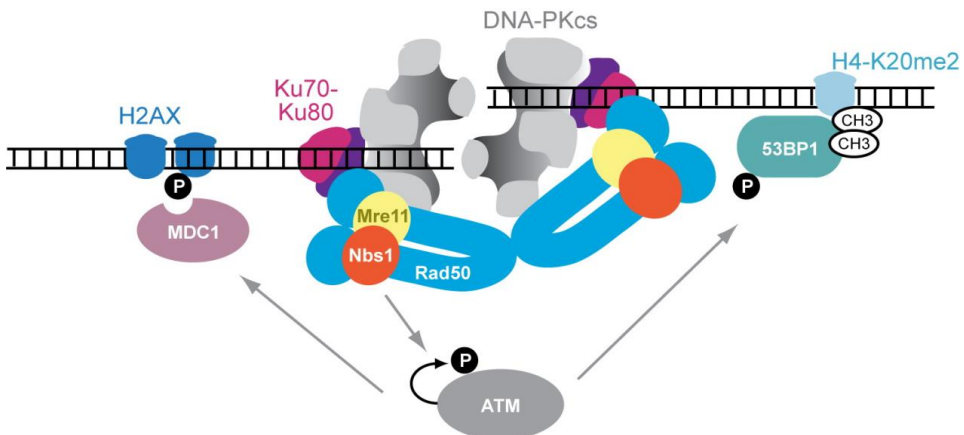


Figure 10 : Protéines impliquées dans la reconnaissance des cassures double brin des régions S lors de la CSR

Les complexes DNA-PK (DNA-PKcs-Ku70-K80) et MRN (MRE11-NBS1-RAD50) se lient à la cassure et recrutent ATM qui va phosphoryler H2AX, 53BP1 et MDC1 conduisant à l'accumulation de toutes ces protéines. RAD50 va permettre aux deux extrémités d'ADN de rester proches et DNA-PK va assurer leur bonne configuration pour favoriser la synapse entre les deux régions S qui seront recombinaées (d'après Stavnezer *et al.*, 2008).

brin (ssDNA pour *single strand DNA*) générés lors de la transcription des régions cibles (Petersen-Mahrt *et al.*, 2002 ; Chaudhuri *et al.*, 2003). L'activité d'AID a lieu préférentiellement lorsque les C sont situées dans des points chauds (ou *hotspots*) ayant pour séquence le motif WRCY (W = *weak* = A/T, R = purine = A/G, et Y = pyrimidine = C/T) (Betz *et al.*, 1993). Le mésappariement U:G qui en résulte peut être pris en charge par différentes voies de réparation de l'ADN pour produire des mutations (dans le cadre des SHM) ou des DSB (dans le cadre de la CSR). Cette différence fondamentale entre SHM et CSR peut 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 (Han *et al.*, 2011 ; pour revues Di Noia and Neuberger, 2007 ; Alt *et al.*, 2013).

Lors de la SHM le mésappariement généré par AID peut être pris en charge par trois voies différentes (pour revue Peled *et al.*, 2008) (**Figure 9**). La lésion peut simplement subir la réplication. La déoxyuridine peut également être excisée par l'enzyme UNG (*Uracil DNA-Glycosylase*) qui crée un site abasique. Ce dernier est ensuite pris en charge par la voie du BER (*Base Excision Repair*) comprenant les endonucléases APE (Apurique-Apyrimidique endonucléases) capables de créer des coupures simple brin au niveau des sites abasiques (Rada *et al.*, 2002 ; Pérez-Durán *et al.*, 2012) ; enfin le mésappariement peut aussi être pris en charge par la voie du MMR (*MisMatch Repair*) (Rada *et al.*, 1998 ; Delbos *et al.*, 2007). Ces différentes voies de réparation vont conduire à l'apparition de transitions ou transversions au niveau de l'ancienne paire C:G mais peuvent également occasionner des mutations au niveau des bases situées à proximité.

Lors de la CSR, le mésappariement U:G généré par AID est excisé par UNG et pris en charge par la voie du BER. Cela produit comme pour la SHM 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). Les DSB sont reconnus par le complexe MRN (Mre11/ Rad50/Nbs1) qui vient se localiser au niveau de la cassure, où il recrute et active ATM (Dinkelmann *et al.*, 2009). ATM phosphoryle ensuite l'histone H2AX (*Histone 2A family member X*) et 53BP1 (*p53-Binding Protein 1*), ce qui aboutit à la formation de foyers de réparation qui vont stabiliser les DSB (**Figure 10**) (Reina san Martin *et al.*, 2003, 2004, 2005 ; Lahdesmaki *et al.*, 2004 ; Kracker *et al.*, 2005 ; Franco *et al.*, 2006 ; pour revue Stavnezer, 2008). La réparation des cassures et par conséquent la jonction entre les deux régions S clivées fait appel à la voie de réparation classique du NHEJ qui peut être suppléée par une

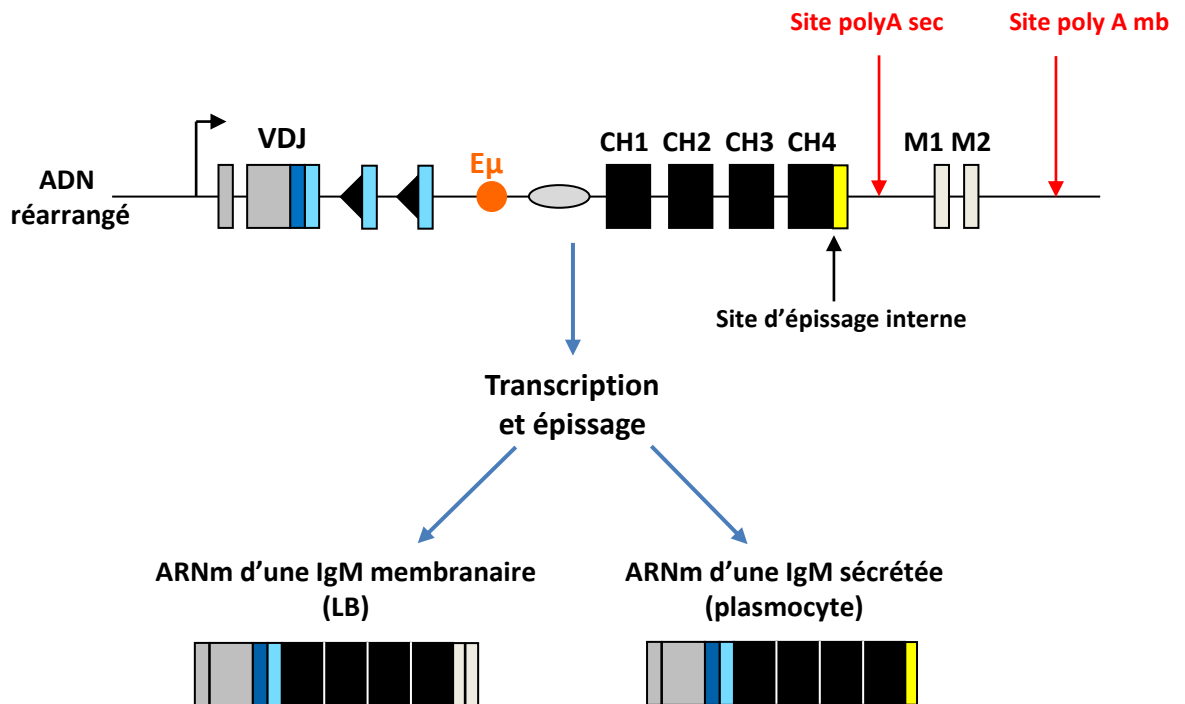


Figure 11 : Passage de la forme membranaire à la forme sécrétée d'une IgM

Dans les LB naïfs ou mémoires, les IgM sont majoritairement produites sous forme membranaire par utilisation du site donneur d'épissage interne au CH4 qui est épissé sur le premier exon de membrane (M1), le site de polyadénylation (polyA) utilisé se situant ainsi après le deuxième exon de membrane (M2). Les plasmocytes quant à eux produisent essentiellement des Ig sous forme sécrétée. Dans le cas de l'IgM, le site d'épissage interne au CH4 n'est pas utilisé, le transcrit comprend ainsi la dernière partie de cet exon (CH-S représentée en jaune) et utilise le site de polyA situé directement en aval (adapté de Lefranc *et al.*, 1999).

voie de réparation alternative appelée A-EJ (*Alternative End Joining*) (Yan *et al.*, 2007). Le complexe MRN, PARP-1 (*Poly ADP-Ribose Polymerase I*), XRCC1 et les ligases I et III interviendraient dans la voie de l'A-EJ (Audebert *et al.*, 2004 ; Robert *et al.*, 2009 ; pour revue Boboila *et al.*, 2012).

Au sein du GC, si les mutations accumulées lors de la SHM ne changent pas, voire diminuent l'affinité du BCR, les LB sont éliminés par apoptose (MacLennan, 1994). Au contraire, si les mutations améliorent l'affinité pour l'antigène, les LB présentant un BCR de haute affinité seront sélectionnés et pourront exprimer grâce au mécanisme de CSR des IgG, des IgA ou des IgE. Elles pourront proliférer avant de se différencier en cellules B mémoires ou en plasmocytes (Rajewsky, 1996 ; pour revues Chaudhuri *and* Alt, 2004 ; Shlomchik *and* Weisel, 2012).

Le rôle principal du LB dans la réponse immunitaire est la sécrétion d'Ac. Pour accomplir cette tâche, le LB doit se différencier en « usine à produire des Ig » : **le plasmocyte**. Ces derniers sont responsables de la sécrétion massive des Ig. Exclusivement dédiés à cette fonction, ils forment une population bien distincte qui n'exprime plus les marqueurs B-spécifiques (B220 et CD19) et est caractérisée par l'expression du CD138 (aussi appelé *syndecan 1*) (Smith *et al.*, 1996). Ces cellules sont plus grandes, avec un réticulum endoplasmique (RE) développé et montrent un programme transcriptionnel complètement différent des LB. Cette population peut être divisée en deux catégories : les plasmocytes à courte durée de vie et des plasmocytes à longue durée de vie. Les plasmocytes à longue durée de vie proviennent de la différenciation de LB activés ayant subi les processus de CSR et SHM au sein du GC. Ces derniers vont migrer dans la moelle osseuse et assurer la sécrétion d'Ig à long terme (pour revue Oracki *et al.*, 2010).

La fonction du plasmocyte est de produire des grandes quantités d'anticorps. Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig s'effectue par épissage alternatif du transcrite de chaîne lourde. Le transcrite codant la forme membranaire est obtenu par utilisation d'un site donneur d'épissage interne au dernier exon constant CH qui va s'épisser sur le premier des deux exons codant la partie transmembranaire (mb). Ce transcrite se termine suite à la rencontre d'un site de polyadénylation très efficace situé en aval des exons membranaires. Le transcrite codant la forme sécrétée n'utilise quant à lui pas ce site d'épissage et intègre donc la totalité du dernier exon CH (**Figure 11**). Sa terminaison a lieu au sein de l'intron entre le dernier exon CH et le premier exon mb car il contient aussi un site de

polyadénylation mais dont l'efficacité est moindre (poly A sec pour sécrété). L'utilisation du poly A sec dans les plasmocytes est surprenante du fait de sa faiblesse et de l'augmentation du taux de transcription au locus IgH. En effet, les données actuelles sur la transcription iraient plutôt dans le sens de l'utilisation du site fort de polyadénylation. Les travaux du groupe de Milcarek ont contribué de façon considérable à la compréhension de ce choix. Ces auteurs ont montré que le facteur d'élongation de la transcription ELL2 (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia protein 2*), dont l'expression est induite dans les plasmocytes, est essentiel au recrutement sur l'ARN polymérase II (RNA Pol II pour *RNA Polymerase II*) du facteur de polyadénylation CstF-64 (*Clivage stimulating factor 64*). Ainsi, la RNA Pol II fortement chargée en facteur de clivage dans les plasmocytes contribuerait à promouvoir l'utilisation du site de polyadénylation de la forme sécrétée des Ig. Au contraire dans les LB matures, la RNA Pol II naviguant avec moins de facteur de clivage pourrait outrepasser le site polyA sec, permettant ainsi l'épissage du dernier exon CH sur les exons de membranes (Shell *et al.*, 2007 ; Martincic *et al.*, 2009 ; pour revue Santos *et al.*, 2011).

Outre les plasmocytes, des **cellules B mémoires** sont générées lors d'une réponse immunitaire primaire (*i.e.* 1^{ère} rencontre avec l'antigène) et vont jouer un rôle important lors de la réponse secondaire (*i.e.* 2^{ème} rencontre avec le même antigène). En effet, suite à la 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 stimulation antigénique (Dogan *et al.*, 2009 ; pour revue Good-Jacobson *and* Shlomchik, 2010).

3 ACCESSIBILITE TRANSCRIPTIONNELLE ET REMANIEMENTS GENIQUES AU LOCUS IgH

3.1 ACCESSIBILITE ET RECOMBINAISONS V(D)J

La machinerie enzymatique qui catalyse les recombinaisons V(D)J est commune aux LB et LT. Pour autant, les réarrangements complets des gènes d'Ig sont restreints aux LB et ceux du TCR aux LT. Au sein de la lignée B, les recombinaisons interviennent selon un processus ordonné concernant le locus IgH en premier puis les loci Ig κ et Ig λ . De même, les réarrangements des chaînes lourdes d'Ig sont effectués de façon séquentielle, puisque l'on détecte d'abord les jonctions D-JH puis V-DJH. Afin d'expliquer la spécificité cellulaire (B et T) et la régulation spatio-temporelle des recombinaisons V(D)J, Alt et Yancopoulos ont proposé « le modèle de l'accessibilité ». Selon ce modèle, l'acquisition d'une structure chromatinienne décondensée (ou ouverte) au niveau des segments à réarranger précède le ciblage par les endonucléases RAG1 et RAG2. Par conséquent, le contrôle des réarrangements passe par le contrôle de l'accessibilité des gènes d'Ig (Yancopoulos *and* Alt, 1986). Au cours des trente dernières années, de nombreuses études ont corroboré cette théorie et ont démontré qu'une myriade de mécanismes épigénétiques gouvernent l'accessibilité des gènes d'Ig (et du TCR). On parle ainsi de transcription non-codante, de remodelage chromatinien par hyper-acétylation et méthylation des histones, de relocalisation nucléaire et de changement de configuration tridimensionnelle du locus.

3.1.1 Les modifications de la chromatine

La structure chromatinienne n'est pas figée et se présente sous forme condensée ou décondensée. Le remodelage de la chromatine joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression génique. Le degré de compaction est faible dans l'euchromatine définie comme ouverte et accessible aux protéines agissant directement sur l'ADN (*i.e.* polymérases, enzymes diverses et facteurs de transcription), et est élevé dans l'hétérochromatine définie comme fermée et inaccessible (pour revues Felsenfeld, 1992; Kadonaga, 1998). L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il est constitué par l'enroulement de 147 pb d'ADN autour d'un octamère protéique composé de 2 copies d'histones H2A, H2B, H3 et H4. L'extrémité amino-terminale des histones (émergeant du nucléosome) peut subir différents types de modifications post-traductionnelles. Ces modifications affectent l'état de

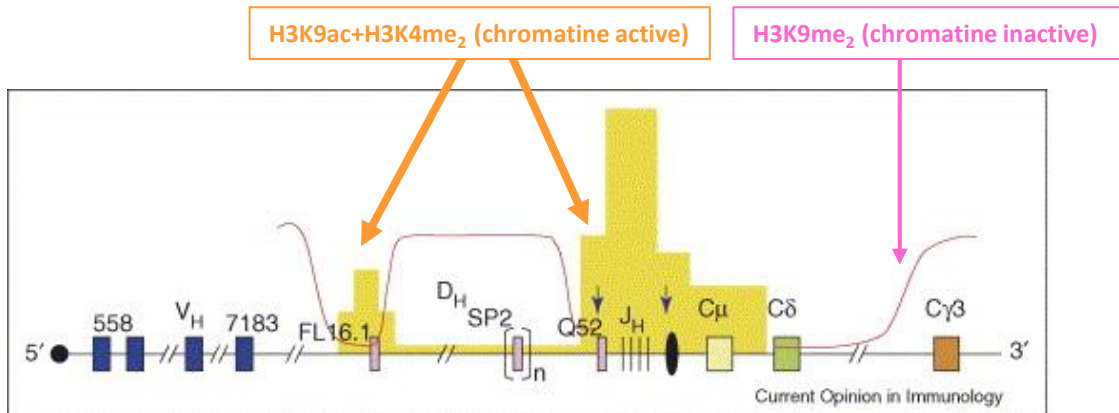


Figure 12 : Modifications des histones au locus IgH avant les recombinaisons D-JH

Dans cette figure sont résumées les modifications des histones détectées dans des précurseurs B non réarrangés. Les marques caractéristiques d'une chromatine ouverte (H3K9ac, H4ac, H3K4me2) sont représentées par une ombre jaune, tandis que les marques hétérochromatiniennes (notamment H3K9me2) sont marquées par un trait rose. Les segments V_H et D_H sont représentés respectivement par des rectangles bleus et roses. Les segments V_H distaux (558), V_H proximaux (7183), le segment D_H distal (DFL16.1), les segments DSP intermédiaires et le segment D_H proximal (DQ52) sont précisés sur le schéma. Les segments J_H sont marqués par des barres verticales noires. Des carrés de couleurs différentes représentent les exons constant C_μ, C_δ et C_{γ3}. Les flèches signalent la localisation de sites hypersensibles à la DNase I et l'ellipse représente l'*enhancer* E_μ (d'après Sen *and* Oltz, 2006).

compaction de l'ADN (pour revue Jenuwein *and* Allis, 2001). Ainsi l'euchromatine 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). Ces marques sont également retrouvées au niveau des régions promotrices. Au contraire l'hétérochromatine 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 Dunleavy *et al.*, 2005 ; Bannister *and* Kouzarides, 2011).

Différents travaux ont fait le lien entre le changement de la configuration chromatinienne et les recombinaisons V(D)J. Une explication simple des effets répresseurs que la chromatine peut avoir sur les réarrangements a été révélée grâce à une expérience de recombinaison *in vitro*. Les auteurs ont montré que l'enroulement d'une RSS au sein d'un nucléosome, la rend réfractaire à la fixation et au clivage par les enzymes RAG1 et RAG2 (Golding *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 1998). De façon générale, les contraintes stériques liées à une forte compaction de la chromatine vont rendre les RSS inaccessibles aux protéines RAG (pour revue Schatz *and* Ji, 2011).

Les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) utilisant des Ac spécifiques des différentes modifications post-traductionnelles des histones ont considérablement renforcé les études du remodelage de la chromatine. De nombreuses expériences ont ainsi montré que les réarrangements V(D)J sont corrélés à des modifications dynamiques et ordonnées de la chromatine au niveau des régions variables. Dans des cellules n'appartenant pas au lignage B, le locus IgH est inaccessible. Par défaut, il présente des marques hétérochromatiniennes typiques : hypoacétylation et diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2). Ce statut répressif pour les recombinaisons est levé progressivement au cours du développement B, permettant ainsi aux endonucléases RAG1 et RAG2 de cibler les segments DH et JH dans un premier temps, puis les segments VH lorsque les segments DJH sont formés. Ainsi, dans des précurseurs B non réarrangés, les segments DH localisés en 5' et en 3' (DFL16.1 et DQ52) et les segments JH possèdent des marques caractéristiques d'une chromatine ouverte (H3K9ac, H4ac, H3K4me2) (**Figure 12**). Par contre, les segments D_{sp} intermédiaires (représentant la majorité des segments DH) sont associés à des nucléosomes présentant des marques hétérochromatiniennes (notamment H3K9me2) (Chowdhury *and* Sen, 2001 ; Johnson *et al.*, 2004 ; Chakraborty *et al.*, 2007 ; Chakraborty *et al.*, 2009). En accord avec cette observation, il a été montré que les segments

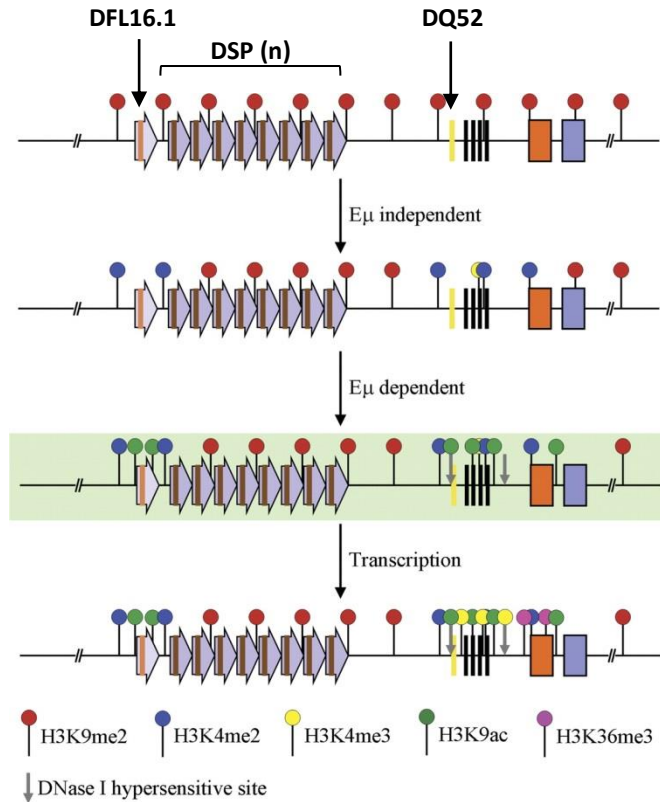


Figure 13 : Modèle de l'activation épigénétique du locus IgH lors des recombinaisons VDJ

Représentation de la région DH-Cμ du locus IgH en configuration germinale dans des cellules non B (ligne du haut). Les flèches violettes et la flèche blanche représentent respectivement les séquences répétées associées aux segments DSP et DFL16.1. Les segments DH sont représentés par des traits : segments DSP (marron), le segment DFL16.1 (orange) et le segment DQ52 (jaune). Les segments JH sont marqués par des traits noirs. Les rectangles orange et bleu représentent les gènes constants Cμ et Cδ. Les ballons caractérisent des modifications d'histones. L'accessibilité de la région DH-Cμ semble s'établir en deux phases : l'une dépendante, l'autre indépendante d'Eμ. Ce modèle d'activation épigénétique est détaillé dans le texte ci-contre (d'après Chakraborty *et al.*, 2009).

DFL16.1 et DQ52 sont préférentiellement utilisés lors des réarrangements (Tsukada *et al.*, 1990). Parmi les différentes marques de chromatine active détectées au niveau de la région englobant DQ52 et les segments JH, le motif H3K4me3 est directement impliqué dans le recrutement des recombinaisons. En effet, la protéine RAG2 possède un domaine PHD (pour *Plant Homeo Domain*) qui a la propriété de se fixer de manière spécifique sur ce motif (Liu *et al.*, 2007b ; Matthews *et al.*, 2007 ; Xu and Feeney, 2009). Dans ce sens, une liaison particulièrement élevée de la protéine RAG2 est détectée au niveau de la région JH (Ji *et al.*, 2010b). Au début du stade pré-proB, lorsque les réarrangements DH-JH s'effectuent, les régions incluant les segments V_H possèdent les marques d'une chromatine inactive (Morshead *et al.*, 2003). Ceci contribue à l'exécution ordonnée des recombinaisons V(D)J (D-JH précèdent V-DJH) en permettant une fixation des protéines RAG restreinte à la région DH-JH.

Des études de marques chromatiniennes menées dans des précurseurs B non réarrangés dépourvus de l'*enhancer* intronique E_μ suggèrent que l'accessibilité de la région DH-JH s'établit en deux phases et soulignent le rôle clé de cet *enhancer* dans le contrôle des recombinaisons V(D)J (**Figure 13**). Au cours de la première phase, indépendante d'E_μ, apparaissent les diméthylations activatrices de l'histone H3 (H3K4me2) tandis que les motifs H3K9me2 sont éliminés. Cette première étape semble rendre E_μ accessible à des facteurs de transcription. Il s'en suit une seconde phase au cours de laquelle E_μ contribue efficacement à l'apparition de marques de chromatine active (H3K9ac et H3K4me3) (Chakraborty *et al.*, 2009). Il a été suggéré que des protéines fixées au niveau de E_μ recrutent des enzymes de remodelage de la chromatine, permettant de générer les conditions optimales pour déclencher la transcription germinale (ou non codante) au niveau de cette région. Dans ce sens, le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF est un candidat potentiel. En effet, les protéines SWI/SNF sont recrutées au niveau de la région DH-JH de façon dépendante d'E_μ. De plus, le *knockdown* de la sous unité ATPase de ce complexe dans des précurseurs B entraîne une diminution de la transcription non-codante au locus IgH et abolit les recombinaisons D-JH (Morshead *et al.*, 2003 ; Osipovich *et al.*, 2009). Etant donné que la méthyltransférase permettant la mise en place des motifs H3K4me3 est souvent associé à la RNA Pol II, la transcription non-codante activée par E_μ (*cf* § 3.1.3) serait importante pour mettre en place les marques H3K4me3 au niveau de la région DH-JH et permettre le recrutement des RAG (Chakraborty *et al.*, 2009).

A la fin du stade pro-B, les réarrangements se poursuivent par la jonction d'un segment VH sur le segment recombiné DJH. Dans le contexte d'accessibilité chromatinienne, une question majeure concerne le ciblage précis des segments VH au niveau des segments DJH. En effet, comment se fait-il qu'un segment VH situé à plus de 2 Mb du segment DJH est recombiné précisément sur ce dernier et non sur les segments DH non réarrangés adjacents ? (le plus proche étant situé moins de 4kb en amont du segment DJH). Les premiers éléments de réponse proviennent d'une étude récente du groupe de Sen. Ces auteurs ont démontré que les segments DJH présentent des marques de chromatine ouverte (H3K9ac et H3K4me2 H3K4me3) qui ne s'étendent pas aux segments DH situés en amont. Ils ont également mis en évidence une relocalisation des RAG au niveau des segments DJH. Par conséquent, les modifications épigénétiques induites par le réarrangement D-JH restreignent les recombinases au niveau du segment DJH. Ces données supposent que les RAG associées à la RSS située en 5' du segment DJH (en capturant un segment VH accessible) initient la recombinaison VH-DJH de façon précise (Subrahmanyam *et al.*, 2012).

Une fois les recombinaisons D-JH effectuées, les segments VH proximaux acquièrent à leur tour un statut actif (histones hyperacétylées). Enfin, sous la dépendance de la signalisation par le récepteur à l'interleukine 7 (IL7-R) et de son effecteur STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), les histones des régions incluant les segments VH distaux deviennent également hyperacétylées. Cette acétylation semble principalement confinée au niveau des promoteurs et des RSS des segments VH (Chowdhury *and* Sen, 2001; Johnson *et al.*, 2003 ; Bertolino *et al.*, 2005). Récemment, les données concernant le rôle de l'IL7 et de STAT5 dans l'accessibilité des segments VH distaux ont été controversées par les travaux de Malin *et al.* En utilisant la technique de « CHIP on chip », ces auteurs n'ont pas ou peu détecté de marques de chromatine active au niveau de ces segments VH, à l'exception des segments de la famille VH3609 (disséminés entre les segments VHJ558) (Malin *et al.*, 2010). Des études complémentaires méritent d'être menées afin de réconcilier ces différentes études.

La régulation de la recombinaison est différente entre les segments VH proximaux et distaux. En effet, dans des cellules pro-B déficientes pour le facteur de transcription Pax5, le facteur YY1 (pour *Ying Yang 1*), la chaîne α du récepteur à l'IL7 (IL7-R α) ou bien encore l'Histone-lysine N-méthyltransferase (EZH2), les réarrangements des segments VH distaux sont fortement diminués voire abolis alors que ceux des segments VH proximaux se font

efficacement. En ce qui concerne Pax5 et YY1, des défauts de contraction du locus expliquent en partie le défaut de réarrangement des segments V_H distaux (Corcoran *et al.*, 1998 ; Hesslein *et al.*, 2003 ; Su *et al.*, 2003, Fuxa *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2007a). L'histone méthyltransferase EZH2 est responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Cette modification inhibitrice diffère entre les segments V_H distaux et proximaux, les motifs H3K27me3 étant présents uniquement dans la région contenant les segments V_H proximaux. Puisque la délétion conditionnelle de EZH2 induit la diminution de l'utilisation des segments V_H distaux lors des réarrangements, les marques répressives présentes au niveau des segments V_H proximaux permettraient une utilisation homogène de tous les segments V_H (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 au niveau des segments V_H deviennent hypoacétylées, rendant ainsi ces régions moins accessibles aux recombinaisons (Chowdhury et Sen, 2003). De façon concomitante, le groupe de Skok a mis en évidence une relocalisation des allèles non-productifs (réarrangés DJ ou VDJ-) au niveau de l'hétérochromatine centromérique qui empêcherait de futurs réarrangements (Roldan *et al.*, 2005) (cf § 3.1.2).

Des changements de l'état de méthylation des gènes d'Ig ont également été mis en évidence. Ainsi, l'analyse du profil de méthylation des gènes des chaînes lourdes et légères d'Ig montre que les loci sont méthylés dans les tissus non lymphoïdes et que l'établissement des recombinaisons V(D)J au cours du développement B est associée à une déméthylation des séquences d'Ig (Storb *and* Arp, 1983 ; Mather *and* Perry, 1983 ; Goodhardt *et al.*, 1993 ; Mostoslavsky *et al.*, 1998 ; pour revue : Goldmit *and* Bergman, 2004). Cependant la déméthylation seule n'est pas suffisante pour initier les recombinaisons V(D)J (Cherry *et al.*, 2000). De façon intéressante, les segments recombinés DJ_H sont déméthylés, tandis que les segments DH et JH non réarrangés sont méthylés. Cette déméthylation étant dépendante d'Éμ, ces données vont dans le sens d'un marquage spécifique du segment DJ_H avant l'initiation des réarrangements V-DJ_H (Selimyan *et al.*, 2013).

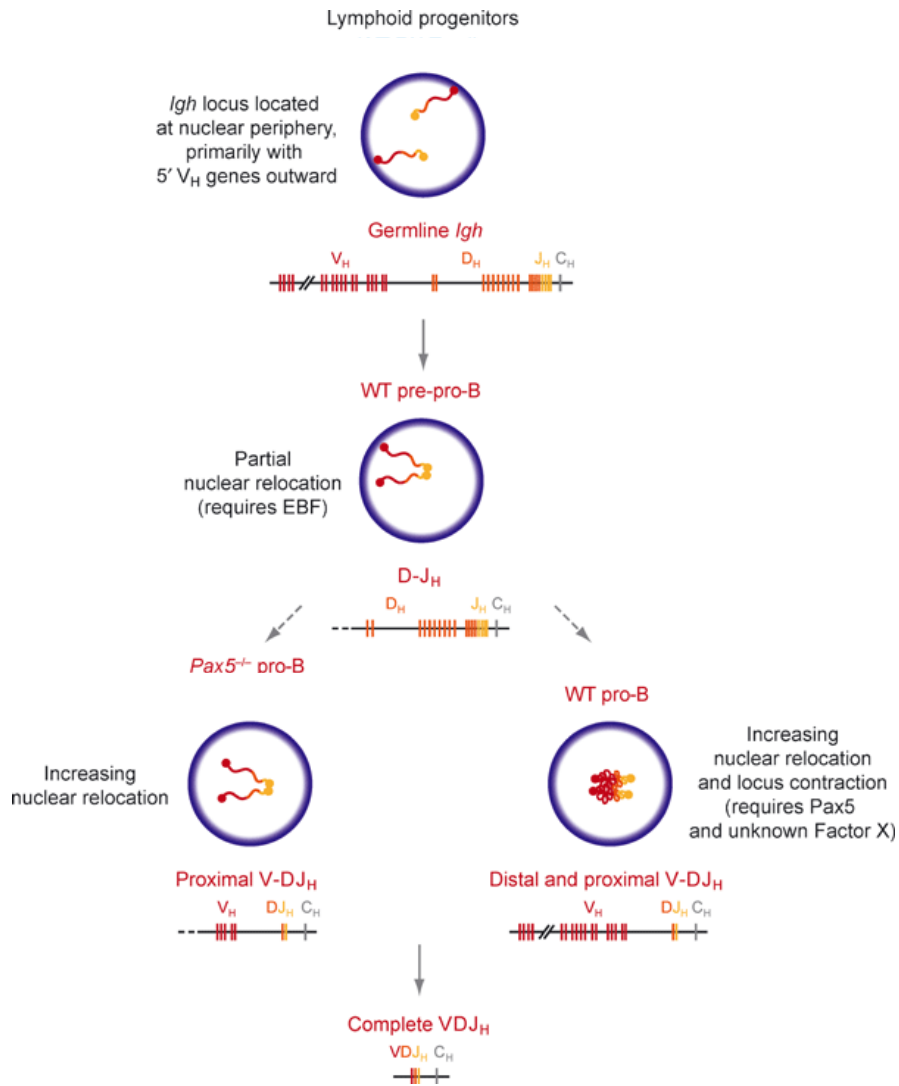


Figure 14 : Modèle de relocalisation nucléaire du locus IgH

Dans des progéniteurs lymphoïdes le locus IgH est ancré à la périphérie nucléaire via sa région 5'. Il y réside dans un état décontracté. La migration des allèles IgH débute au stade pré-proB où l'expression du facteur de transcription EBF (*Early B cell Factor*) va entraîner une relocalisation centrale partielle de ces derniers concomitante à l'initiation des recombinaisons D-J_H. La seconde étape, corrélée aux recombinaisons V_H-D_H, a lieu au stade proB et coïncide avec un positionnement des allèles IgH au centre du noyau. L'expression de Pax5, et potentiellement d'un autre facteur restant à identifier, induit la contraction du locus IgH (adapté de Hewitt *et al.*, 2010).

3.1.2 La localisation nucléaire du locus IgH

Le noyau des cellules eucaryotes contient des domaines actifs ou inactifs sur le plan transcriptionnel. Par conséquent le positionnement nucléaire d'un gène peut influencer son expression. Ainsi, 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 (PCH pour *Pericentromeric Heterochromatin*) contribue à leur répression transcriptionnelle (*silencing*) (pour revues Lamond *and* Earnshaw, 1998 ; Kosak *and* Groudine 2004).

Plusieurs études ont mis en évidence la mobilité du locus IgH au niveau nucléaire. Au sein des CSH, les allèles IgH sont localisés au niveau de la périphérie nucléaire. La lamine, protéine de la membrane nucléaire, s'associe aux séquences distales VHJ558 permettant ainsi l'ancrage du locus IgH. L'engagement dans la voie de différenciation lymphocytaire B induit des changements dans le positionnement nucléaire des allèles IgH. Au stade pro-B, ces allèles migrent au centre du noyau où l'environnement est considéré comme permissif pour la transcription et la recombinaison (Kosak *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2005).

Basé sur l'ensemble des études de FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) réalisées sur le locus IgH, Skok *et al.* ont proposé un modèle de relocalisation nucléaire s'effectuant en deux étapes. Dans les CLP, le locus IgH est ancré à la périphérie nucléaire *via* sa région 5'. Il y réside dans un état « décontracté », les segments VH étant éloignés de la région DH-JH (**Figure 14**). La migration des allèles IgH débute au stade pré-proB où l'expression du facteur de transcription EBF (*Early B cell Factor*) va entraîner une relocalisation centrale partielle de ces derniers concomitante à l'initiation des recombinaisons D-JH. La seconde étape, corrélée aux recombinaisons VH-DJH, a lieu au stade proB et coïncide avec un positionnement des allèles IgH au centre du noyau (pour revue Hewitt *et al.*, 2010). En parallèle, l'expression du facteur de transcription PAX5, et potentiellement d'un autre facteur restant à identifier, induit la contraction du locus IgH. Ce repliement tridimensionnel de la chromatine rapproche les segments VH distaux des segments recombinés DJH, ce qui les place à une distance physique des segments DJH comparable à celle des segments VH proximaux. Alors que les segments VH proximaux sont réarrangés de façon efficace, la recombinaison des segments VH distaux est très sévèrement affectée chez les animaux déficients pour Pax5; cette contraction du locus IgH s'avère donc essentielle aux réarrangements de ces derniers (Nutt

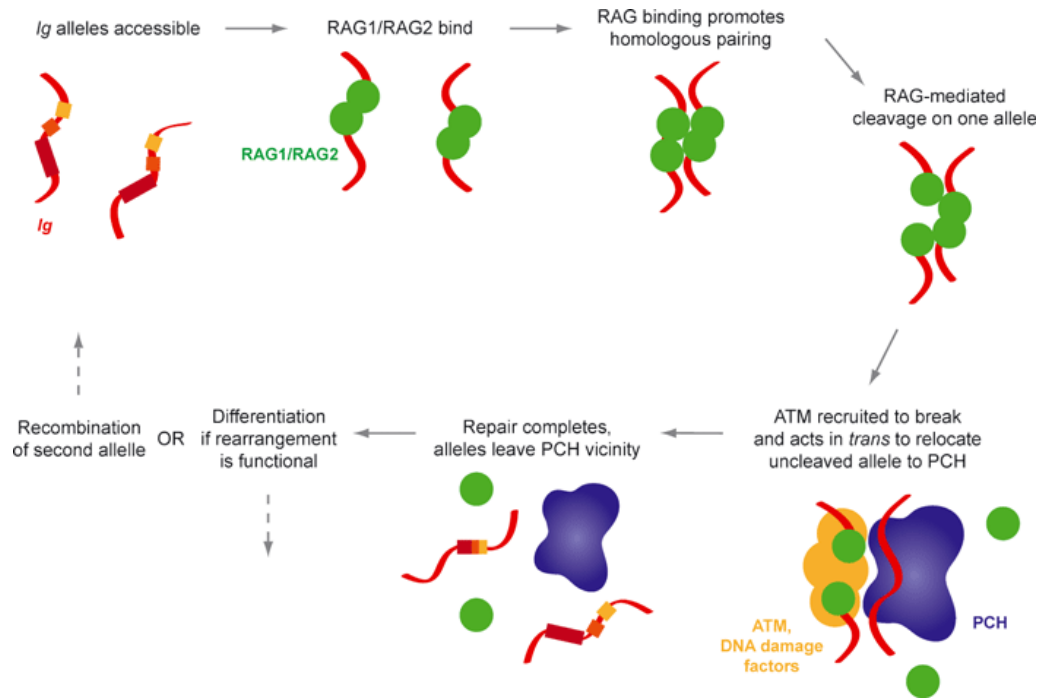


Figure 15 : ATM et le recrutement des allèles IgH au niveau de la PCH

Un appariement des deux allèles IgH est observé dans environ 20% des cellules pré-pro-B et pro-B suite à la fixation des RAG. Dans ces cellules qui réarrangent leurs allèles IgH, l'introduction de cassures d'ADN sur un allèle induit le repositionnement ATM-dépendant de l'autre au niveau de la PCH. Une fois ce premier réarrangement effectué, ATM quitte le site de cassure et permet à l'allèle IgH exclu de se dissocier de la PCH. Si ce premier réarrangement est productif, la cellule pro-B peut se différencier en cellule pré-B, mais si ce réarrangement est non-productif, le second allèle IgH est recombiné à son tour (adapté de Hewitt *et al.*, 2010).

et al., 1997 ; Hesslein *et al.*, 2003, Fuxa *et al.*, 2004 ; Sayegh *et al.*, 2005 ; Roldan *et al.*, 2005 ; pour revue Medvedovic *et al.*, 2011).

L'établissement d'un réarrangement V(D)J productif sur un allèle IgH entraîne d'une part, la décontraction du locus sur les deux allèles rendant ainsi les segments VH non-réarrangés réfractaires à de futurs recombinaisons et d'autre part le recrutement de l'allèle réarrangé de façon non-productive (VDJ- ou DJ) au niveau de l'hétérochromatine péracentromérique. Cette localisation nucléaire asymétrique étant maintenue pendant les réarrangements de chaînes légères, son rôle est donc d'empêcher les recombinaisons RAG, nouvellement exprimées au stade pré-B, d'agir sur l'allèle IgH exclu lors des stades ultérieurs de différenciation (contribuant ainsi à l'exclusion allélique) (Roldan *et al.*, 2005). Au stade pré-B, il a également été démontré une association interchromosomique transitoire entre un allèle IgH et un allèle Ig κ au niveau de la PCH. Cette interaction, régulée par l'*enhancer 3'Ek*, permet le recrutement de l'allèle IgH au niveau de la PCH dans plus de 60% des cellules pré-B, et contribue à sa décontraction (Hewitt *et al.*, 2008).

Enfin, une étude récente a mis en évidence un appariement des deux allèles IgH dans environ 20% des cellules pré-pro-B et pro-B. Dans ces cellules qui réarrangent leurs allèles IgH, l'introduction de cassures d'ADN sur un allèle induit le repositionnement ATM-dépendant de l'autre au niveau de la PCH (**Figure 15**). Il a été proposé que ATM, activé par les cassures de l'ADN sur un allèle, agirait en *trans* sur l'allèle non clivé pour empêcher l'apparition de cassures sur ce dernier, et contribuerait ainsi à la réalisation asynchrone des recombinaisons VH-DJH. Une fois ce premier réarrangement effectué, ATM quitterait le site de cassure et permettrait à l'allèle IgH exclu de se dissocier de la PCH (par exemple si son réarrangement était requis dans le cadre d'une recombinaison non-productive sur le premier allèle) (Hewitt *et al.*, 2009).

Le positionnement nucléaire asymétrique des allèles IgH n'est plus observé à partir du stade immature tardif, où la cellule B nouvellement produite, et exprimant fortement le BCR à la surface, présente à nouveau ces deux loci IgH au niveau de l'euchromatine. Ce positionnement nucléaire symétrique est maintenu dans les cellules B matures naïves (Skok *et al.*, 2001).

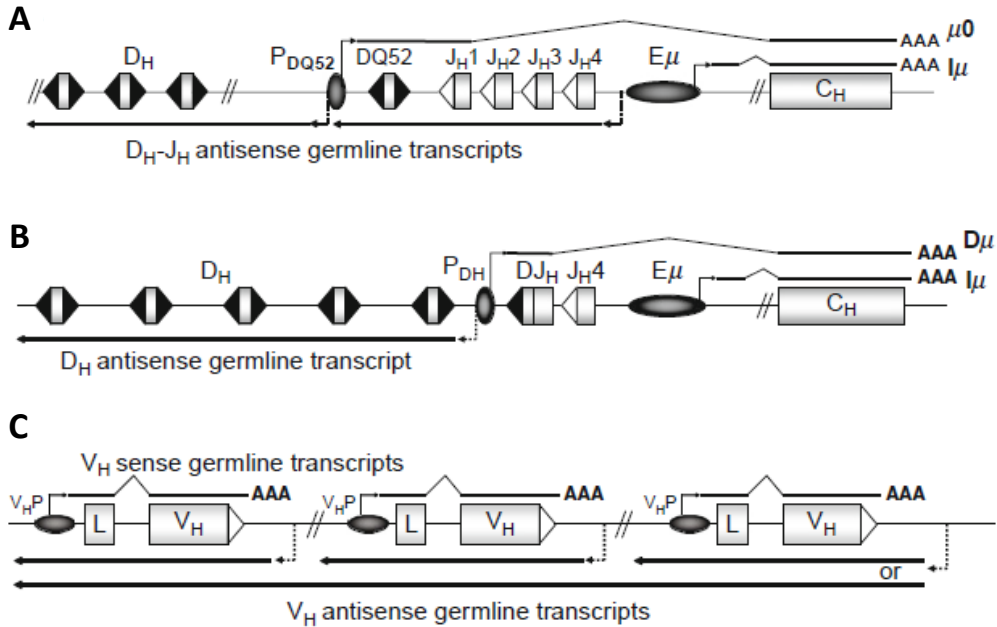


Figure 16 : Les transcrits germinaux lors des recombinaisons V(D)J

Les segments V_H , D_H et J_H , ainsi que le gène constant μ (noté C_H) sont représentés par des rectangles. Les *enhancers* et les promoteurs sont caractérisés par des ellipses. Les RSS présentant des espaces de 12 ou 23 pb sont représentées respectivement par des triangles blancs et noirs. Les sites d'initiation potentiels de la transcription sont signalés par des flèches coudées hachurées.

A Les premiers transcrits germinaux apparaissent lorsque le locus IgH est en configuration germinale, et sont initiés au promoteur de DQ52 (transcrits $\mu 0$) et en aval de E_μ (transcrits I_μ). Ils sont épissés et polyadénylés. La région D_H - J_H est transcrite en orientation antisens.

B Les segments DJ_H réarrangés sont transcrits à partir du promoteur du segment D_H recombiné. Le segment DJ_H est épissé sur les exons codants le gène constant C_μ et ce transcrit appelé D_μ est polyadénylé.

C Les segments V_H non réarrangés sont transcrits en orientation sens et antisens. Les transcrits sens sont de courts transcrits épissés et polyadénylés alors que les transcrits antisens semblent être de longs transcrits non codants (adapté de Perlot *and* Alt, 2008).

3.1.3 La transcription germinale et la structure 3D du locus IgH

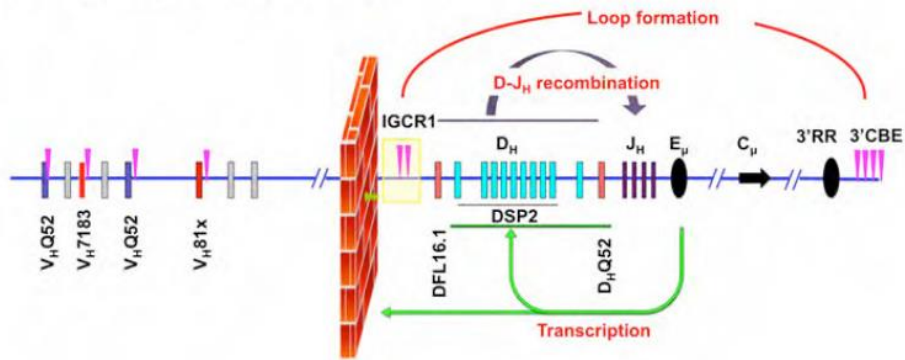
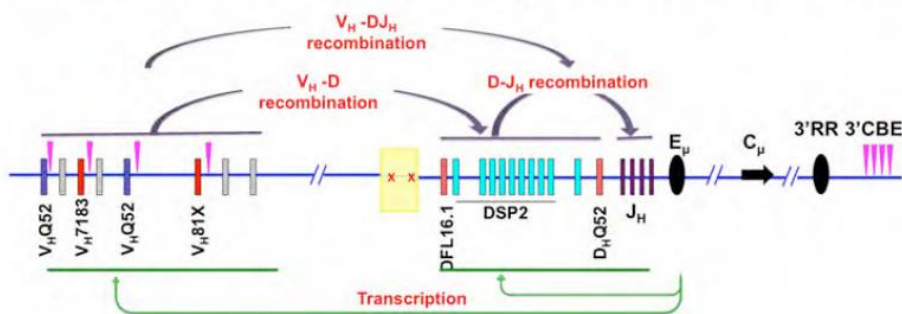
Jusqu'en 1985, il était pensé que les segments VH étaient silencieux tant qu'ils n'étaient pas réarrangés et rapprochés physiquement de l'enhancer $E\mu$, mais Yancopoulos *and* Alt ont découvert qu'ils sont activement transcrits dans des précurseurs B avant que les recombinaisons V-DJH s'effectuent (Yancopoulos *and* Alt, 1985). Ces travaux révélant pour la première fois le lien étroit entre la transcription non-codante au locus IgH et les recombinaisons V(D)J ont provoqué une véritable révolution dans la compréhension de ce processus. Suite à cette observation de nombreux autres transcrits non-codant ont été mis en évidence lors des réarrangements. La cinétique d'apparition de ces multiples transcrits étant corrélée à la nécessité d'accessibilité des régions sujettes aux réarrangements, ils sont indéniablement des marqueurs de l'ouverture chromatinienne. Bien que leur rôle exact fasse encore débat aujourd'hui, de nombreuses études penchent en faveur d'une importance capitale de cette transcription non-codante à la fois dans le ciblage des RAG et dans l'établissement de la structure tri-dimensionnelle du locus. Ainsi, les éléments *cis*-régulateurs du locus IgH ne sont pas seulement essentiels à l'expression des gènes d'Ig réarrangés mais contrôlent également l'accessibilité de la région variable lors des réarrangements.

Les premiers transcrits non-codants détectés au locus IgH, ont dans un premier temps été qualifiés de « stériles » ou « germinaux » pour les différencier des transcrits codants initiés au niveau des segments VDJ réarrangés. Les premiers transcrits germinaux apparaissent avant les réarrangements D-JH et sont initiés au promoteur de DQ52 (transcrits μ_0) et en aval de $E\mu$ (transcrits $I\mu$) (**Figure 16A**) (Alessandrini *and* Desiderio, 1991 ; Lennon *and* Perry, 1985). La transcription de μ_0 semble être un préalable nécessaire aux réarrangements D-JH ; elle permettrait d'augmenter l'accessibilité de la région DH-JH aux enzymes de recombinaison (Thompson *et al.*, 1995). Simultanément l'apparition de transcrits antisens (orientation inversée par rapport aux gènes constants) est observée dans les régions JH et DH. Ces transcrits antisens couvrent toute la région DH-JH (environ 60 kb) et sont initiés en amont de $E\mu$ (Bolland *et al.*, 2007; Chakraborty *et al.*, 2007 ; Perlot *et al.*, 2008 ; pour revue Perlot *and* Alt, 2008). De façon intéressante, la délétion de l'enhancer $E\mu$ entraîne une diminution drastique des recombinaisons D-JH accompagnée d'une baisse considérable des transcrits μ_0 et $I\mu$ (Perlot *et al.*, 2005). De même, les transcrits antisens de la région DH ne sont plus détectés en l'absence de $E\mu$ (Bolland *et al.*, 2007). La disparition 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). L'ensemble de ces données suggère qu'Èµ contrôle les recombinaisons D-JH en partie *via* l'activation de la transcription germinale. Il est postulé que le passage de la RNA Pol II permet de décondenser la chromatine au niveau de la région DH-JH. La RNA Pol II et les facteurs de remodelage chromatinien associés à cette dernière rendraient les segments DH accessibles, et mettraient en place les motifs H3K4me3 nécessaires au ciblage de RAG2 (pour revue : Corcoran, 2010 ; Feeney, 2011). Dans ce sens, les travaux d'Abarrategui *and* Krangel ont démontré que la transcription germinale est requise pour les réarrangements du TCRα. Ces auteurs ont introduit par recombinaison homologue une séquence de terminaison permettant de bloquer la RNA pol II en aval du promoteur TEA (modèle murin TEA-T pour *T Early Alpha promoter Terminator*) ou du segment Jα56 (modèle murin 56R). Ils ont ainsi pu montrer que le blocage de la transcription germinale entraîne une diminution drastique de la recombinaison des segments Jα situés en aval de la séquence de terminaison. De plus, ils observent une baisse considérable des motifs H3K4me3 au niveau de ces segments (Abarrategui *and* Krangel, 2006 ; 2007 ; pour revue Del Blanco *et al.*, 2011). Une étude complémentaire révélant un défaut de recrutement de RAG1 en aval du blocage est venu conforter ces observations (Ji *et al.*, 2010a). La transcription non codante semble donc être un acteur majeur du processus de recombinaisons V(D)J et non un stigmate de l'accessibilité chromatinienne.

Suite aux recombinaisons D-JH, les segments réarrangés DJH sont également transcrits à partir du promoteur situé en 5' du segment DH (pDH) (transcrits Dµ) (**Figure 16B**) (Reth *and* Alt, 1984; Alessandrini *and* Desiderio, 1991). En effet, tous les segments DH qui ont été étudiés présentent un promoteur bidirectionnel, mais leur activité n'a été détectée que dans des lignées cellulaires réarrangées DJH (Chakraborty *et al.*, 2007). Ainsi d'hypothétiques transcrits germinaux DH sens pourraient être initiés au niveau des pDH ; ils n'ont cependant encore jamais été identifiés (pour revue Perlot *and* Alt, 2008).

Dans le même temps, des transcrits germinaux sens et antisens sont initiés au niveau de la région VH. Les transcrits germinaux VH sens sont faciles à détecter pour la famille VHJ558, mais plus difficiles pour ce qui est des autres familles. Ces petits transcrits sont initiés à partir des pVH ; ils traversent la région codant le segment VH et sont polyadénylés en aval de cette dernière (**Figure 16C**) (Yancopoulos *and* Alt, 1985 ; pour revue Perlot *and*

A**Recombinaison D-JH au stade pré-pro-B dans des cellules sauvages****B****Recombinaison D-JH au stade pré-pro-B dans des cellules IGCR1/CBE^{-/-}****Figure 17 : Modèles de recombinaison D-JH dans des cellules B sauvages et IGCR1/CBE^{-/-}**

A Dans des cellules pré-pro-B sauvages, la région de contrôle intergénique 1 (IGCR1) agit comme un isolateur et bloque l'activation précoce de la transcription germinale au niveau des segments V_H proximaux (allant de V_H81X à V_HQ52). L'IGCR1 interagit avec les éléments de fixation pour le facteur CTCF au niveau de la 3'RR (3'CBE) séparant les segments V_H et la région D-J_H dans deux domaines chromatiniens différents. Ainsi, seuls les réarrangements D-J_H peuvent avoir lieu à ce stade.

B Des mutations des sites CBE de l'IGCR1 (modèle murin IGCR1/CBE^{-/-}) suppriment cette activité isolatrice. Des transcrits de novo apparaissent au niveau des segments V_H proximaux corrélés avec des réarrangements désordonnés à ce stade de développement (adapté de Guo *et al.*, 2011b)

Alt, 2008). Au contraire, les transcrits VH antisens s'étendent sur plusieurs segments VH et les régions intergéniques adjacentes. La région VH étant composée de petits segments VH d'environ 500 pb séparés par de grandes régions intergéniques de 10 à 20 kb, ces transcrits antisens sont de long transcrits non-codants (Bolland *et al.*, 2004 ; pour revue Corcoran, 2010). Récemment, Verma-Gaur *et al.* ont démontré que les transcrits VH antisens sont présents en plus grande quantité que les transcrits sens. Cette étude a également révélé que les transcrits VH antisens sont principalement initiés au niveau de cinq domaines distincts de la région VH distale : au niveau de trois éléments PAIR (*Pax5 Activated Intergenic Repeats*) (PAIR 4, 6 et 11); dans une région de 200 kb au niveau des segments VHJ558 les plus proximaux, et au niveau des segments VHJ606 (Verma-Gaur *et al.*, 2012). La fenêtre d'expression de ces transcrits étant précisément corrélée avec l'initiation des recombinaisons V-DJH, cette transcription germinale (notamment antisens) est supposée ouvrir la chromatine au niveau de la région VH, favorisant ainsi les interactions à distance au sein du locus IgH et l'accessibilité des segments VH à la machinerie de recombinaison (pour revue Stubbington *and* Corcoran, 2013).

Les travaux des groupes d'Alt et de Corcoran ont récemment apporté les premières preuves du rôle clé de la transcription non-codante dans la régulation des recombinaisons V-DJH. En effet, la grande région intergénique d'environ 90kb séparant les segments VH et DH contient une région de contrôle nommée IGCR1 (*Intergenic Control Region 1*) nécessaire au maintien de l'ordre des recombinaisons V(D)J. Dans un premier temps, le groupe de Corcoran a montré que cette région contient deux sites de fixation pour CTCF ou CBE (pour *CTCF Binding Element*) et que ces derniers sont des isolateurs empêchant la transcription antisens DH de s'étendre à la région VH proximal (**Figure 17A**) (Featherstone *et al.*, 2010). Le groupe de Alt a ensuite confirmé le mécanisme par une large délétion de toute la région intergénique (Giallourakis *et al.*, 2010). Puis, cette même équipe a invalidé les deux CBE de l'IGCR1 (animaux IGCR1-CBE^{-/-}) et mis en évidence une altération des réarrangements V(D)J avec une utilisation préférentielle des segments VH proximaux au détriment des segments distaux. Ce modèle murin présente également des réarrangements désordonnés avec l'initiation des recombinaisons VH-D et VH_{proximaux}-DJH au stade pré-proB, alors que seuls les réarrangements D-JH ont lieu à ce stade. Chez ces animaux mutés, le contrôle tissulaire s'avère aussi être rompu puisqu'une partie des LT présentent des réarrangements VH-DJH.

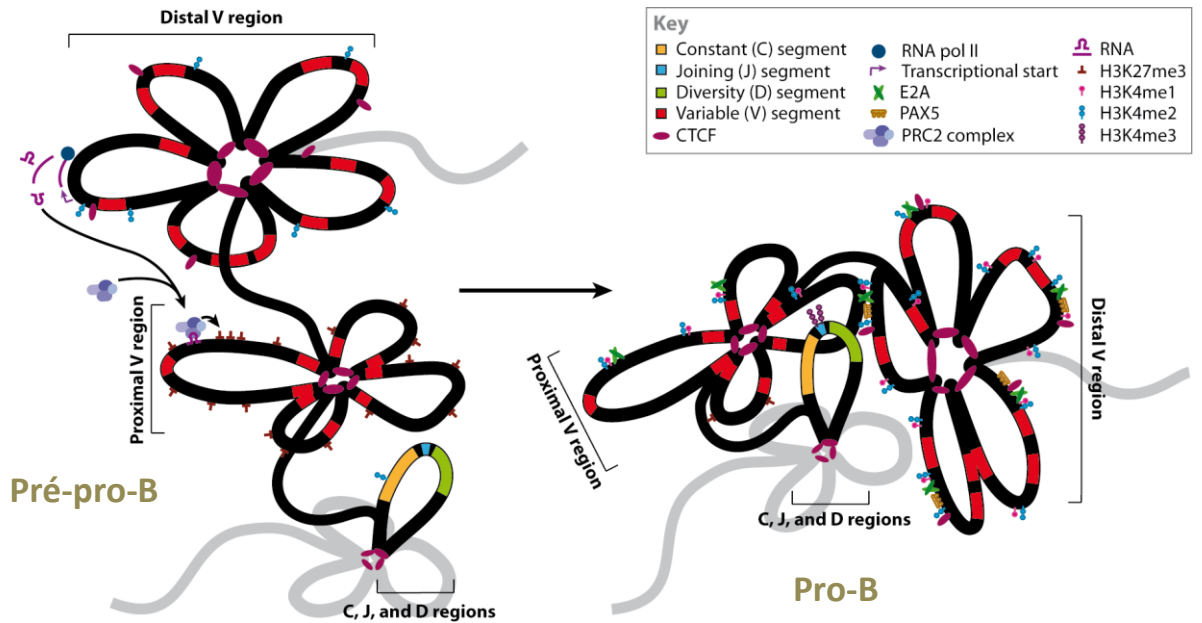


Figure 18: Représentation schématique de la structure tri-dimensionnelle du locus IgH

Les différents segments V_H , D_H , J_H et les gènes constants sont représentés par des bandes de couleur (cf encadré). Dans des cellules pré-proB, le locus IgH est composé de trois structures 3D constituées de multiples boucles d'ADN organisées en forme de rosette. Les trois structures 3D sont bien séparées les unes des autres: le locus est décontracté. Au stade pro-B s'opère un rapprochement spatial des deux structures contenant les segments V_H distaux et proximaux au niveau de la structure 3D contenant la région D_H - J_H et les gènes constants. Le locus IgH est contracté (adapté de Bossen *et al.*, 2012)

De façon intéressante, ces défauts sont corrélés avec l'apparition *de novo* de transcrits germinaux au niveau des segments VH proximaux (alors qu'ils sont indétectables dans des précurseurs B sauvage) (**Figure 17B**). Dans ce modèle muté, l'initiation de la transcription germinale est donc clairement associée à la mise en place des recombinaisons (Guo *et al.*, 2011b). L'apparition de ces nouveaux transcrits germinaux peut ainsi être expliquée d'un point de vue topologique. En effet, l'IGCR1 interagit à distance avec $E\mu$ et les sites CBE des isolateurs de la 3'RR (ou 3'CBE) (Degner *et al.*, 2011 ; Guo *et al.*, 2011a et b). L'interaction entre l'IGCR1 et les 3'CBE est dépendante de CTCF et de la cohésine (Degner *et al.*, 2011), alors que l'interaction avec $E\mu$ semble impliquer le facteur de transcription YY1 (Guo *et al.*, 2011a). Les dérèglements observés dans le modèle IGCR1-CBE^{-/-} suggèrent que la fixation de CTCF au niveau de l'IGCR1 (et par conséquent la formation de la boucle IGCR1-3'CBE) est nécessaire pour séquestrer $E\mu$ et les segments VH proximaux dans des domaines chromatiniens différents. Au stade pré-proB, ce cloisonnement empêcherait ainsi $E\mu$ d'activer la transcription germinale des segments proximaux (Guo *et al.*, 2011b).

La régulation d'un locus aussi étendu que le locus IgH passe donc par une régulation « spatiale » basée sur des changements de conformation tri-dimensionnelle. Les différentes régions du locus IgH vont se rapprocher et s'éloigner au cours du développement B. Différentes études de FISH-3D et d'interactions par capture de conformation chromosomique (3C et 4C) ont ainsi mis en évidence des modifications topologiques du locus IgH lors des réarrangements. Une étude de FISH 3D, menée à l'aide de 12 sondes réparties sur la totalité du locus IgH, a démontré que les segments VH sont rapprochés de la région DH-JH spécifiquement au stade pro-B. Les approches bio-informatiques et géométriques de cette étude suggèrent qu'au stade pré-pro-B le locus IgH se trouve dans une configuration étendue dite décontractée composée d'au moins trois structures 3D constituées de multiples boucles d'ADN organisées en forme de rosette (**Figure 18**). Ainsi les segments VH sont physiquement éloignés de la région DH-JH lors des recombinaisons D-JH. Au stade pro-B s'opère un rapprochement physique des segments VH au niveau de la région DH-JH ; le locus IgH se trouve cette fois dans un état dit contracté (Jhunjunwala *et al.*, 2008 ; pour revue Bossen *et al.*, 2012). Récemment, les travaux de 3C et 4C du groupe de Sen ont clairement démontré deux formes de compaction chromosomique du locus IgH. Le premier niveau de compaction concerne la mise en place des trois structures 3D contenant les boucles d'ADN ; le second correspond au rapprochement spatial de ces différentes

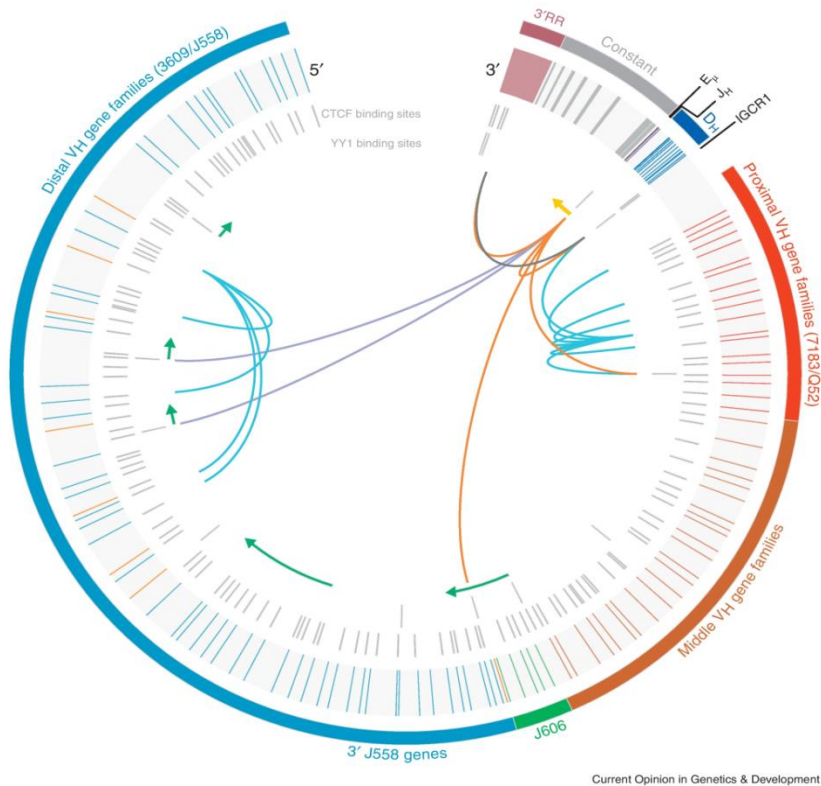


Figure 19: L'architecture du locus IgH

Représentation circulaire du locus IgH où les barres de couleur extérieures représentent les segments VH, DH, JH et les gènes constants. Au sein des segments VH distaux, les barres bleues internes représentent les membres de la famille VHJ558, les barres oranges représentent la famille 3609 et les barres vertes la famille J606. Les barres grises internes indiquent les sites de liaison pour CTCF et YY1. Les flèches vertes indiquent les principaux transcrits antisens de la région VH observés dans les cellules pro-B. La flèche jaune indique la transcription de μ . Les courbes au centre du cercle représentent des interactions à distance observées par des techniques de 3C et 4C. Le lien gris indique l'interaction entre l'IGCR1 et la 3'RR. Les liens oranges correspondent aux interactions dépendantes de $E\mu$, tandis que les liens bleus correspondent aux interactions $E\mu$ -indépendantes impliquant CTCF. Les liens violets caractérisent les interactions entre $E\mu$ et les éléments PAIR 4 et 6 (d'après Stubbington *and* Corcoran, 2013).

structures. Ils ont aussi révélé le rôle clé de l'enhancer $E\mu$ dans l'établissement de la conformation 3D du locus IgH (Guo *et al.*, 2011a).

Ainsi, une première structure formée de trois boucles d'ADN permet un rapprochement des segments DH, JH, et CH grâce à des interactions entre $E\mu$ et le promoteur de DQ52, entre l'IGCR1 et $E\mu$ et enfin entre $E\mu$ et la 3'RR. Cette première structure, dépendante d' $E\mu$, crée un domaine DH-JH- $E\mu$ -CH qui favoriserait l'exécution des réarrangements D-JH au stade pré-proB. Par des expériences de ChIP, Guo *et al.* proposent que la formation de ces boucles fait intervenir le facteur de transcription YY1. Les interactions $E\mu$ -3'RR et $E\mu$ -IGCR1 pourraient être dues à des liaisons homotypiques entre des facteurs YY1 fixés au niveau des deux partenaires ou à des liaisons entre YY1 fixé à $E\mu$ et des facteurs CTCF liés au niveau de l'IGCR1 et de la 3'RR (**Figure 19**). La formation des deux autres structures 3D est indépendante d' $E\mu$. L'une est mise en place au niveau de la région VH distale, l'autre au niveau de la région VH proximale. Ces deux structures n'interagissant pas entre elles, les segments VH distaux et proximaux sont inclus dans deux domaines différents. Les multiples boucles composant ces deux régions sont dues à des interactions entre des facteurs CTCF fixés au niveau des segments VH (Guo *et al.*, 2011a). En effet, plus de soixante sites CTCF ont été identifiés au locus IgH dont la majorité est localisée au niveau de la région VH (Degner *et al.*, 2009 ; Ebert *et al.*, 2011 ; pour revue Bossen *et al.*, 2012). Outre ces interactions au sein du domaine DH-JH- $E\mu$ -CH, l'enhancer $E\mu$ interagit aussi à distance avec deux autres sites : l'un situé au niveau des segments VH distaux (à proximité des segments VHJ558 les plus 3'), l'autre situé au niveau des segments VH proximaux (à proximité des segments VH7183 les plus 5'). Au stade pro-B, ces interactions dépendantes d' $E\mu$ et impliquant YY1 seraient en partie responsables du rapprochement physique entre les segments VH et la région D-JH (Guo *et al.*, 2011a).

Récemment, il a été montré qu' $E\mu$ interagit aussi avec deux éléments PAIR (*i.e.* PAIR 4 et 6) situés au niveau de la région VH distale (à environ 2 Mb d' $E\mu$) et que ces interactions sont médiées par YY1 (**Figure 19**) (Verma-Gaur *et al.*, 2012). Précédemment, le groupe de Busslinger a découvert quatorze éléments PAIR présentant des sites de fixation pour PAX5, CTCF, E2A et la cohésine. Ces éléments conservés sont situés en amont des segments VH distaux de la famille VH3609. La fixation de Pax5 sur les éléments PAIR a lieu spécifiquement au stade pro-B et initie la transcription antisens de ces régions. Cette transcription non-codante est également corrélée à la mise en place de marques de chromatine active

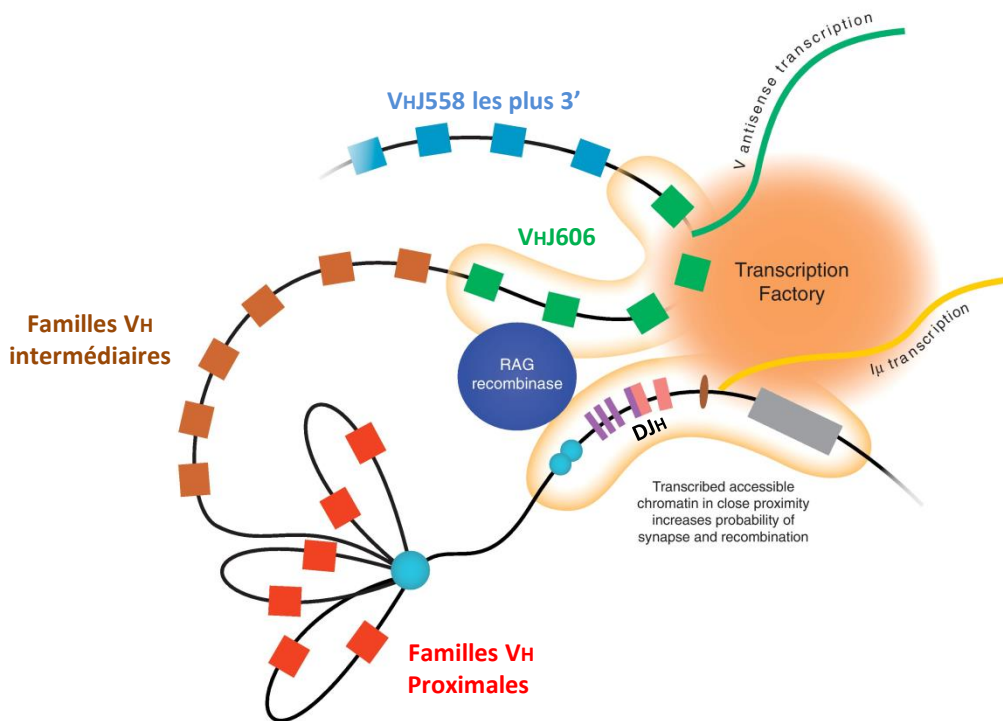


Figure 20: Modèle de la *transcription factory* lors des recombinaisons V-DJH

Représentation schématique du locus IgH. Des rectangles représentent les segments VH (rouges, marrons verts et bleus), les segments DH (violets), les segments JH (roses) et les gènes constants (gris). La transcription antisens initiée au niveau des segments VHJ606 est prise comme un exemple représentatif. Cette transcription non-codante en prenant place dans la même *transcription factory* qu' μ (ellipse brune) peut rapprocher les segments VHJ606 à proximité du segment recombiné DJH. Ce rapprochement facilite leur recombinaison par les endonucléases RAG (d'après Stubbington and Corcoran, 2013).

(H3K9ac, H3K4me2, H3K4me3). La déficience pour Pax5 étant associée à un défaut de contraction du locus IgH, ces données suggèrent que la transcription germinale des éléments PAIR joue un rôle important dans ce phénomène (Ebert *et al.*, 2011). Dans ce sens, les interactions entre E μ et les éléments PAIR 4 et 6 ne sont pas détectées au stade pré-proB quand la transcription antisens des régions PAIR est absente. De même, des précurseurs B déficients pour YY1 présentent un défaut d'interaction E μ -PAIR accompagné d'une baisse drastique de ces transcrits germinaux (Verma-Gaur *et al.*, 2012). La délétion d'E μ n'affectant pas cette transcription germinale, les interactions E μ -PAIR ne semblent pas être le reflet d'un rôle activateur d'E μ vis-à-vis des promoteurs des éléments PAIR.

Le rôle actif de la transcription des éléments PAIR dans la contraction du locus IgH peut s'expliquer par la présence au sein du noyau de zones interchromosomiques appelées *transcription factories*. Ces régions, adjacentes aux chromosomes, sont riches en RNA Pol II, facteurs d'épissages, facteurs de polyadénylation et en enzymes de réparation de l'ADN (pour revues Edelman *and* Fraser, 2012 ; Papantonis *and* Cook 2013). En effet, les travaux du groupe de Feeney ont montré que la désorganisation des *transcription factories* dans des cellules pro-B affecte les interactions PAIR-E μ (Verma-Gaur *et al.*, 2012). Sachant que les facteurs YY1 et PAX5 activent la transcription antisens des éléments PAIR indépendamment d'E μ , ces auteurs ont proposé que l'*enhancer* E μ et les éléments PAIR (4 et 6) peuvent interagir entre eux, en étant recrutés au sein d'une même *transcription factory* (**Figure 20**). Selon ce modèle, l'initiation des transcrits antisens permettrait le rapprochement des segments VH distaux à proximité des segments DJH. Cette juxtaposition pourrait être temporellement stabilisée par l'établissement d'interactions YY1-YY1 entre E μ et les éléments PAIR. Cette théorie peut également expliquer les biais de recombinaison observés dans le modèle IGCR1-CBE^{-/-}. En effet, l'initiation de transcrits germinaux *de novo* au niveau des segments VH proximaux augmenterait leur probabilité de recombinaison.

De façon générale, l'activation de la transcription non codante des régions VH pourrait avoir un double rôle. D'une part, elle permettrait le recrutement des segments VH et E μ au sein d'une même *transcription factory*, et par conséquent faciliterait la contraction du locus IgH. D'autre part, elle participerait activement à l'accessibilité des RSS et à leur ciblage par les endonucléases RAG. Par conséquent, la présence des pVH (en amont de chaque segment VH) et de plusieurs promoteurs antisens permet donc un choix dynamique et stochastique d'éléments qui peuvent être recrutés à proximité d'E μ . Le recrutement de

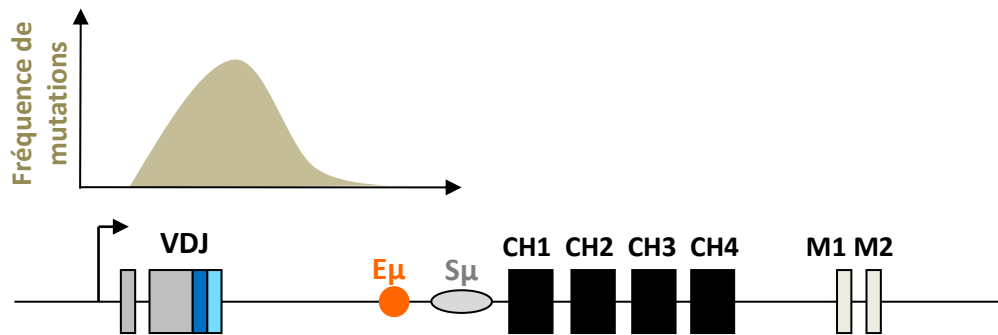


Figure 21: Profil des hypermutations somatiques au niveau des exons VDJ réarrangés

Les mutations observées lors de la SHM s'étendent de 150 pb à environ 1,5 kb après le site d'initiation de la transcription fourni par le promoteur (flèche noire) du segment V réarrangé. L'exemple du locus IgH réarrangé illustre le ciblage de l'activité d'AID sur l'exon VDJ. L'*enhancer* E μ et la partie constante C μ ne sont pas touchés par les mutations (adapté de Peled *et al.*, 2008).

ces promoteurs optimiserait ainsi le positionnement des segments VH lors des réarrangements V-DJH (Verma-Gaur *et al.*, 2012 ; pour revues Stubbington *and* Corcoran, 2013 ; Shih *and* Krangel, 2013).

3.2 ACCESSIBILITE ET HYPERMUTATIONS SOMATIQUES

Le mécanisme de SHM introduit des mutations au niveau de la partie variable des gènes d'Ig à raison de 10^{-3} mutations par paires de bases et par génération, ce qui est un million de fois plus élevé que le taux de mutations somatiques spontanées (pour revue Odegard *and* Schatz, 2006). Aux loci d'Ig, les SHM s'étendent sur une région d'environ 150 pb à 1,5 kb en aval du site d'initiation de la transcription (TSS pour *Transcriptional Start Site*) fournit par le promoteur du segment V réarrangé. La fréquence de mutation n'est pas constante le long de cette région : elle est maximale au niveau de la région codante et décroît ensuite exponentiellement, laissant ainsi intacts les exons codant la partie constante de l'Ig (**Figure 21**). De même, la région située en 5' du pVH n'est pas touchée par les mutations. Ces données ont donc supposées une connexion entre la transcription et le processus de SHM. En effet, la limite 5' du spectre de mutation est étroitement corrélée à la présence du pVH (Crews *et al.*, 1981 ; Kim *et al.*, 1981 ; Gearhart *and* Bogenhagen, 1983 ; Lebecque *and* Gearhart, 1990 ; Rada *and* Milstein, 2001).

Différentes études ont montré que le processus de SHM est couplé à la transcription des gènes d'Ig. La première démonstration claire de l'importance de la transcription dans le ciblage des mutations a été apportée par le groupe de Storb. En utilisant un transgène d'Ig κ , ces auteurs ont montré que l'exon C κ qui n'est normalement pas muté, le devient lorsqu'un promoteur de segment V κ est inséré en amont. Le spectre et la fréquence de mutations qu'ils observent au niveau du segment C κ s'avère être similaire à celui du segment V κ dans un cas normal (Peters *and* Storb, 1996). Cette étude est la première preuve réelle que le TSS marque la limite 5' des hypermutations. Ces observations ont été confirmées dans un transgène IgH où le déplacement du pVH de 750 pb est associé à un changement correspondant du spectre de mutations (Tumas-Brundage *and* Manser, 1997). De façon intéressante, la fréquence de mutation est aussi corrélée à l'intensité de la transcription (Fukita *et al.*, 1998 ; Bachl *et al.*, 2001). 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. De plus, cette étude a révélé des taux d'hypermutations somatiques similaires sur les exons VDJ en phase et hors phase impliquant une transcription des allèles non-productifs équivalente à celle des allèles productifs (*cf* chapitre 2 § 1 et article 1) (Delpy *et al.*, 2004a).

La découverte d'AID et les données actuelles sur la distribution de la RNA Pol II aux loci d'Ig (*cf* § 3.3.5) tendent à étayer le modèle du couplage « SHM et transcription » proposé par le groupe de Storb dans les années 90. Ces auteurs avaient postulé qu'un facteur mutagène (MuF pour *Mutator Factor*) présent uniquement dans les LB en cours de mutation, était associé à la RNA Pol II et que les mutations apparaissaient quand MuF était déposé sur l'ADN au moment où la RNA Pol II était dans un état de pause (*i.e.* lorsqu'elle marque un arrêt) (Peters *and* Storb, 1996). Ce groupe a récemment démontré que l'induction artificielle de la pause de la RNA pol II (par des séquences de terminaison) est associée à une fréquence de mutations plus élevée sur le brin non matrice. Cette pause serait corrélée à l'exposition prolongée du brin non-matrice sous forme d'ADN simple brin (ssDNA pour *single strand DNA*), ce qui faciliterait l'action d'AID (Kodgire *et al.*, 2013).

3.3 ACCESSIBILITE ET COMMUTATION ISOTYPIQUE

La CSR, permettant à un LB d'exprimer une chaîne lourde différente de l'IgM ou l'IgD, est un mécanisme complexe et hautement régulé. Elle cible des *hotspots* de recombinaisons appelés région S situées en amont de tous les gènes constants à l'exception de C δ . De plus, chaque gène constant appartient à une unité transcriptionnelle composée d'un promoteur nommé I (*Intervening*), d'un exon I non-codant, d'une région S et des exons codant le domaine constant. Cette organisation est importante car la transcription est à la base du mécanisme de CSR. En effet, la CSR vers un gène constant requiert en premier lieu la transcription de l'unité à laquelle il appartient. Cette condition impérative est permise car les promoteurs I qui initient cette transcription répondent à des signaux transmis par les LT et les cytokines environnantes. Dans ce contexte, la transcription permettrait de rendre les régions S accessibles à AID et/ou participerait directement à son recrutement au niveau de ces régions (pour revues Chaudhuri *et al.*, 2007 ; Pavri *and* Nussenzweig 2011) .

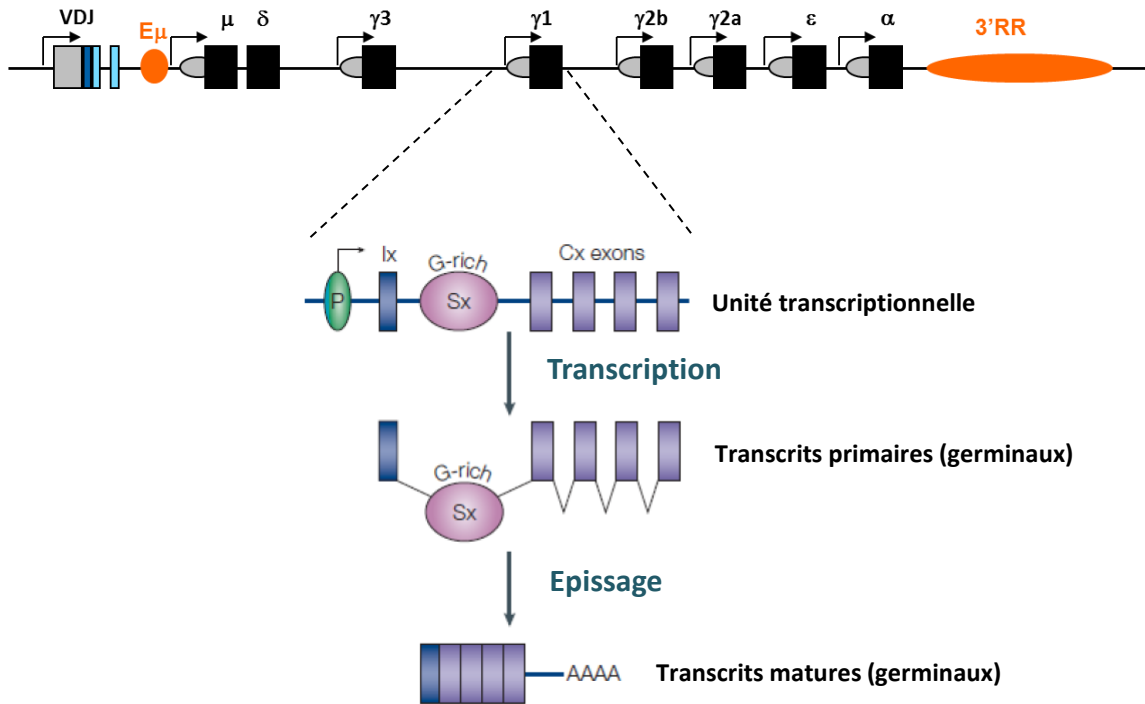


Figure 22 : Génération des transcrits germinaux sens lors de la CSR

Les exons codant un isotype de chaîne lourde font partie d'une unité transcriptionnelle contenant un promoteur I (P), un exon I non codant (Ix) et une région S riche en G sur le brin non-matrice. x représente n'importe quel isotype sauf δ . La transcription de l'unité initiée par le promoteur I va générer des transcrits primaires qui vont ensuite être épissés entre le site donneur de l'exon I et le site accepteur du premier exon Cx (adapté de Chaudhuri *and* Alt, 2004).

3.3.1 Le rôle des régions *switch*

Comme nous l'avons déjà mentionné, les régions S sont les séquences répétées riches en G/C (G sur le brin non matrice) qui sont la cible des mutations par AID et par conséquent des DSB lors de la CSR. Leur taille varie de 1 à 12 kb en fonction de l'isotype. Puisque les cassures apparaissent principalement dans les régions S, il a été suggéré que les motifs riches en G peuvent être impliqués dans le ciblage d'AID. Différents modèles de délétion, inversion ou bien encore remplacement de différentes régions S ont permis d'étudier le rôle de ces régions dans la CSR. La conclusion de toute cette littérature est que les régions S contribuent par leur orientation, leur longueur et leur caractère répétitif à cibler les recombinaisons sans qu'elles soient pour autant indispensables à la CSR. Elles sont donc requises pour permettre une CSR optimale (Luby *et al.*, 2001 ; Khamlichi *et al.*, 2004, Shinkura *et al.*, 2003 ; Zarrin *et al.*, 2005, 2008 ; pour revue Chaudhuri *et al.*, 2007).

3.3.2 Les transcrits germinaux

Tous les transcrits germinaux lors de la CSR ont une structure analogue. Le TSS est localisé en 5' de chaque région S au niveau du promoteur I. Après initiation, la transcription se poursuit à travers un exon I non codant, traverse la région S intronique et les différents exons constants CH et s'achève au site de polyadénylation normal des ARNm (**Figure 22**). Les transcrits primaires générés sont ensuite épissés entre le site donneur de l'exon I et le site accepteur du premier exon constant (CH1) formant ainsi des transcrits germinaux de type Ix-Cx. Ces transcrits matures nommés pré-switch ne semblent coder aucune protéine car ils présentent des cadres de lecture ouverts très courts dûs à la présence de nombreux codons stop dans les exons I (Lennon *and* Perry, 1985 ; Stavnezer-Nordgren *and* Sirlin, 1986, Stavnezer *et al.*, 1988, Lutzker *and* Alt, 1988 ; Radcliffe *et al.*, 1990 ; Xu *and* Stavnezer, 1992 pour revue Chaudhuri *and* Alt, 2004). Un second type de transcrits est produit suite à la recombinaison. Ces transcrits post-switch sont initiés par le promoteur I μ , traversent l'exon I μ puis la région S hybride (S μ /Sx) formée par le réarrangement et les exons codant l'isotype nouvellement recombinaison. Après épissage, ces ARNm de type I μ -Cx sont également stériles (Li *et al.*, 1994 ; pour revue Chaudhuri *et al.*, 2007). La détection des transcrits pré- et post-switch est classiquement utilisée pour estimer l'activité d'une unité transcriptionnelle et l'efficacité de la CSR respectivement.

Outre les transcrits germinaux sens, des transcrits antisens (vraisemblablement non épissés) peuvent également être détectés au niveau des régions S, suivant le même profil d'expression que les transcrits sens (Perlot *et al.*, 2008). En revanche, les exons C μ (localisés en aval de S μ) qui ne sont pas ciblés par AID ne sont pas transcrits en orientation antisens. Ces données ont donc suggéré que la transcription antisens des régions S contribuerait à leur ciblage par AID. Cependant, Haddad *et al.* ont récemment démontré que seule la transcription sens de la région S γ 3 est essentielle et suffisante pour induire la CSR vers IgG3 *in vivo*. En effet, lorsque ces auteurs bloquent spécifiquement la transcription sens au niveau S γ 3, en insérant une cassette de polyadénylation et de pause transcriptionnelle en amont de cette région, la CSR vers IgG3 est abolie. Par contre, le blocage de la transcription antisens par l'insertion de la même cassette en aval de S γ 3 n'affecte pas la CSR vers cet isotype (Haddad *et al.*, 2011).

Enfin, il est à noter que ce phénomène de transcription germinale touche aussi bien l'allèle productif que l'allèle non-productif et qu'il n'est pas rare que les deux allèles IgH recombinent vers le même gène constant (Delpy *et al.*, 2003).

3.3.3 Le rôle de la transcription germinale

L'activation de cellules B isolées de rate de souris *in vitro* par un agent mitogène (stimulation de la voie TLR4 ou de la voie CD40) combiné à des cytokines est un moyen fréquemment utilisé pour étudier les mécanismes de CSR. L'activation B induite par le lipopolysaccharide (LPS) induit à elle seule la transcription germinale des promoteurs I μ , I γ 2b et I γ 3 et par conséquent la CSR vers les isotypes IgG2b et IgG3. L'ajout d'IL4 au LPS active la transcription des promoteurs I γ 1 et I ϵ , induisant la CSR vers IgG1 et IgE. L'ajout d'interféron γ (IFN γ) ou de *Transforming Growth Factor* β (TGF β) entraîne respectivement la transcription germinale aux promoteurs I γ 2a ou I α et la CSR vers IgG2a ou IgA (pour revue Stavnezer, 2000).

La découverte de transcrits germinaux concomitants à la CSR a permis de considérer très tôt qu'une grande partie de la régulation de ce processus passe par le contrôle de cette transcription germinale (Stavnezer *et al.*, 1988 ; Lutzker and Alt, 1988). 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 simple exon I et/ou d'un promoteur I a révélé que la

transcription germinale d'une région S acceptrice donnée est requise pour 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 un gène de résistance à la néomycine transcrit en orientation inverse conduisent à l'abolition de la CSR pour IgG1 et IgG2b respectivement (Jung *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1993). De plus, le remplacement d'un promoteur I avec un promoteur hétérologue peut induire la CSR vers un isotype dans des conditions où elle ne devrait pas être induite (Lorenz *et al.*, 1995 ; Harriman *et al.*, 1996).

Le rôle de la transcription dans la CSR et dans les SHM est devenu évident lorsqu'il a été démontré qu'AID n'exerce son activité enzymatique que sur des fragments de ssDNA. De nombreuses études ont ainsi établi que la génération de ssDNA au cours de la transcription germinale des régions S semble être impliquée dans le ciblage de l'action d'AID vers ces régions (Peterson-Mahrt *et al.*, 2002 ; Chaudhuri *et al.*, 2003 ; Dickerson *et al.*, 2003 ; Ramiro *et al.*, 2003 ; Bransteitter *et al.*, 2003). Etant donné la répétitivité des régions S et leur caractère riche en G sur le brin non matrice (ou codant), leur transcription germinale peut conduire à la genèse de structures secondaires telles que des *R-loops* (hybrides ARN/ADN), des *G-quartets* (quadruplexes G) ou des *stem loops* (structure en épingle à cheveux) (pour revue Chaudhuri and Alt, 2004). Parmi ces structures, les *R-loops* sont les seules à avoir été détectées *in vivo* au niveau des régions S (Yu *et al.*, 2003). En effet, lors de la transcription des régions S des hybrides ARN/ADN stables peuvent se former. Au sein de ces structures, le brin d'ADN non matrice se retrouve isolé sous forme de ssDNA sur une longueur pouvant excéder 1 kb. Ainsi, les *R-loops* peuvent contribuer à la génération de ssDNA au niveau des régions S. Néanmoins il a été montré que leur présence n'était pas indispensable au processus de CSR (pour revue Pavri and Nussenzweig, 2011). Par ailleurs, le ciblage d'AID au niveau du brin non matrice libre dans les bulles de transcription pourrait être stabilisée *via* son interaction avec la protéine RPA (*Replication Associated Protein*) qui est une protéine capable de se lier aux ssDNA (Chaudhuri *et al.*, 2004). De plus cette interaction est dépendante de la phosphorylation d'AID par la protéine kinase A (PKA) (Basu *et al.*, 2005 ; Vuong *et al.*, 2009). Il a récemment été suggéré que le recrutement d'AID précède celui de RPA, qui agirait seulement dans un but de stabilisation afin de promouvoir l'activité déaminase d'AID (Yamane *et al.*, 2011). Par ailleurs, des travaux publiés par l'équipe de Casali montrent que des protéines adaptatrices de la famille 14-3-3 sont fixées sur les motifs AGCT, fréquemment répétés sur le brin non matrice des régions S, et que ces dernières

recrutent AID et PKA (Xu *et al.*, 2010). Un aspect encore plus révélateur du rôle clé que joue la transcription dans la CSR et les SHM a été mis en lumière par la découverte qu'AID s'associe physiquement avec le complexe de transcription dans les cellules B (Nambu *et al.*, 2003 ; Pavri *et al.*, 2010 ; Willmann *et al.*, 2012) (cf § 3.3.5)

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 a accès au brin matrice. Le groupe d'Alt a récemment résolu ce problème. Ils ont découvert que le *RNA exosome* (*i.e.* un complexe présentant une activité exoribonucléasique 3'-5') s'associe avec AID et fournit un accès au brin matrice *in vitro*. Ces auteurs ont aussi montré que le recrutement de ce complexe au niveau des régions S dépend d'AID et que la déplétion de ces sous unités induit une diminution de la CSR dans la lignée murine CH12 (Basu *et al.*, 2011). De façon intrigante, le *RNA exosome* peut dégrader un ARN uniquement si son extrémité 3' est libre. Au cours d'une élongation normale, cette situation n'arrive pas puisque l'extrémité 3' de l'ARN naissant est hybridée avec l'ADN matrice et de surcroît masquée par la RNA Pol II. Pour expliquer cette énigme, Basu *et al* proposent que le recrutement du *RNA exosome* au niveau des sites de pause peut avoir lieu car la RNA Pol II en pause est souvent sujette à une marche arrière (*backtracking*), qui découvre ainsi l'extrémité 3' de l'ARN naissant (Cheung *and* Cramer, 2011 ; Basu *et al.*, 2011).

3.3.4 L'épissage des transcrits germinaux et la CSR

Bien qu'essentielle, la transcription germinale en elle-même n'est pas suffisante pour induire la CSR de façon optimale. En effet, le remplacement de l'exon I μ par un promoteur efficace (E μ associé à un promoteur pVH) conduit à une transcription normale, pourtant la CSR vers IgE est diminuée d'un facteur 10 à 100 dans ce modèle murin (Bottaro *et al.*, 1994). Cette dichotomie entre le caractère obligatoire de la transcription germinale et le fait qu'elle ne soit pas à elle seule suffisante pour permettre la recombinaison peut s'expliquer par les travaux du groupe de Radbruch sur l'importance de la maturation des transcrits germinaux dans la CSR. Ces auteurs ont démontré que l'épissage des transcrits pré-switch, et/ou la machinerie d'épissage, est requis pour induire ce processus (Lorenz *et al.*, 1995 ; Hein *et al.*, 1998). Récemment, ces observations ont été renforcées par la découverte que CTNNLB1 et

PTBP2, des protéines impliquées respectivement dans l'épissage et sa régulation, sont requises pour une CSR efficace (Conticello *et al.*, 2008, Nowak *et al.*, 2011). Si ces travaux révèlent la contribution de l'épissage dans le processus de CSR, les mécanismes sous-jacents restent encore méconnus et ont fait l'objet d'une partie de mes travaux de thèse présentés dans la Partie n°3 des résultats.

3.3.5 La pause de la RNA Pol II et ciblage d'AID

La transcription est un processus qui peut se subdiviser en plusieurs étapes : la formation du complexe de pré-initiation, l'initiation, la pause à proximité du promoteur, l'élongation et la terminaison. Ces différentes étapes sont directement liées à la phosphorylation du domaine carboxy terminal (CTD) de la RNA Pol II qui peut ainsi fournir un point d'ancrage pour différents facteurs protéiques. On retrouve ainsi des facteurs de remodelage chromatinien, des facteurs d'élongation de la transcription, ou bien encore des facteurs impliqués dans la maturation des ARNm. La transition entre l'étape de pause et l'étape d'élongation est un des événements les mieux connus. Lorsque la RNA Pol II est dans un état de pause, elle est phosphorylée au niveau de la serine 5 de son CTD (RNA Pol II ser5-P), suite au déclenchement de la phase d'élongation, cette phosphorylation est perdue au profit de celle de la serine 2 du CTD (RNA Pol II ser2-P) (pour revues Fuda *et al.*, 2009 ; Brookes *and* Pombo, 2009).

De façon similaire aux SHM, le spectre de mutations générées par AID lors de la CSR débute environ 150 pb en aval du TSS fourni par un promoteur I. Par contre, les mutations s'étendent sur toute la région S que celle-ci fasse 1 kb ou 12 kb (Xue *et al.*, 2006). Des études récentes sur la distribution de la RNA Pol II et d'AID au locus IgH ont suggéré un lien entre la pause de la RNA Pol II et l'activité d'AID. Comme nous l'avons déjà évoqué dans le contexte des SHM, l'idée d'une telle connexion avait été proposée bien avant la découverte d'AID par Storb *et al.* (Peters *and* Storb, 1996). Des études récentes, menées avec des LB activés, ont montré que la fixation de la RNA Pol II est maximale au niveau des régions S. La densité de Pol II fixée augmente entre le promoteur I et la région S et décroît en aval de la région S (Rajagopal *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009). Ce profil de fixation de la polymérase est en accord avec un blocage de l'élongation au niveau des régions S. Il est frappant de constater que cette distribution de la RNA Pol II corrèle parfaitement avec le spectre de mutations. Ces

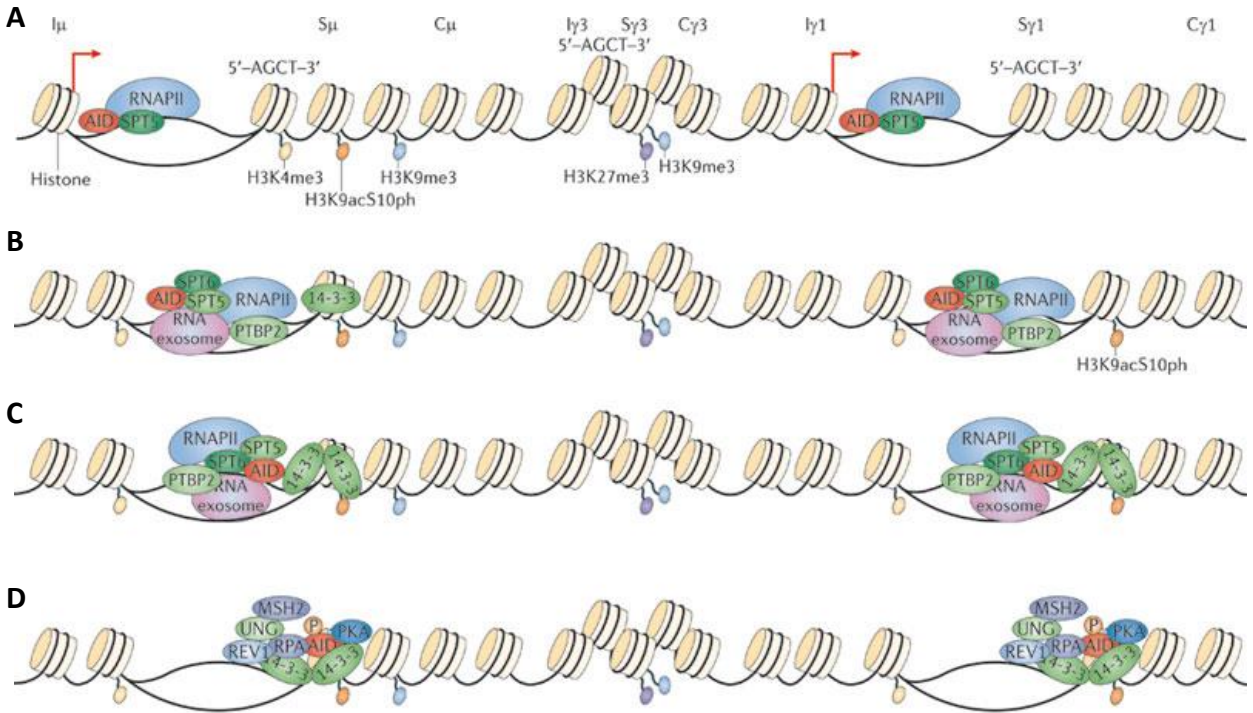


Figure 23 : Le ciblage d'AID lors de la CSR

La figure illustre le ciblage d'AID lors de la CSR vers IgG1.

A La RNA Pol II et des enzymes de remodelage chromatinien (tels que les histones acétyl-transférase et méthyl-transférase) sont recrutées au niveau du promoteur Iγ1 pour initier la transcription germinale de la région Sy1 et catalyser les modifications des histones au niveau de cette dernière. La région Sμ est quant à elle constitutivement transcrite. Grâce au facteur d'élongation de la transcription SPT5, la RNA Pol II s'associe avec AID au niveau des promoteurs Iμ et Iγ1.

B Pendant l'élongation de la transcription, la RNA Pol II qui forme un complexe macromoléculaire avec SPT5 et, peut-être, SPT6, PTBP2 et le RNA exosome marque une pause au niveau des régions Sμ et Sγ1. Cette pause pourrait avoir un rôle dans la mise en place de modifications chromatinienne permissives (H3K4me3: ovales jaunes et H3K9acS10ph: ovales oranges). Ces modifications associées à la perte de modifications répressives comme H3K9me3 (ovales bleu clair) et H3K27me3 (ovales pourpres) reflètent une chromatine ouverte au niveau de Sμ et Sγ1 qui permet l'accès à AID et à d'autres facteurs de la CSR. AID étant "accrochée" sur la machinerie de transcription, elle est donc fortement présente dans les régions S en raison du blocage de la RNA Pol II. Le *backtracking* de la RNA Pol II lors de la pause permettrait le recrutement du RNA exosome et rendrait le brin matrice accessible à AID.

C et D La présence d'adaptateurs protéiques de la famille 14-3-3 (par leurs interactions avec des répétitions 5'-AGCT-3) favorisait également la stabilisation d'AID au niveau des régions S. Ces dernières recrutent PKA qui peut phosphoryler AID et permettre l'interaction entre AID et RPA fixé au niveau de l'ADN simple brin (d'après Xu *et al.*, 2012).

données supportent donc le modèle proposé par le groupe de Storb (Peter *and* Storb, 1996 ; Rajagopal *et al.*, 2009). L'accumulation de la RNA Pol II ayant lieu en l'absence d'AID, cette pause transcriptionnelle pourrait permettre de prolonger le temps d'exposition du ssDNA (libéré lors de la transcription) et favoriser ainsi son contact avec AID.

La découverte que le facteur de pause transcriptionnelle Spt5 (*Supressor of Ty5 homolog*) est requis pour la CSR a souligné l'importance de la pause de la RNA pol II dans les processus de SHM et de CSR (Pavri *et al.*, 2010). Ce facteur Spt5 est connu pour interagir avec la RNA Pol II ser5-P et avec le ssDNA. Pavri *et al.* ont démontré que Spt5 sert d'adaptateur dans le recrutement d'AID sur la RNA Pol II en pause. En effet, la déplétion de Spt5 entraîne une baisse de la quantité de RNA Pol II co-immunoprécipitée avec AID. En revanche, une déplétion de la RNA Pol II n'affecte pas l'interaction entre AID et Spt5. Cette association AID-RNA Pol II en pause a été confirmée par des expériences de CHIP-seq montrant qu'AID est recrutée au niveau d'un millier de loci dans le génome. Cette fixation d'AID est particulièrement importante à proximité des promoteurs dans des régions connues pour être associées à la pause transcriptionnelle (Yamane *et al.*, 2011). Ces données confirment une étude précédente montrant que les mutations induites par AID touchent de nombreux gènes transcrits dans les cellules B (Liu *et al.*, 2008). Des analyses structurales ont révélé la présence de Spt5 à proximité de ssDNA dans des bulles de transcription (Klein *et al.*, 2011). Basé sur ces études, l'interaction d'AID avec Spt5 au niveau des régions S suite à la pause de la RNA Pol II pourrait ainsi positionner cette déaminase à proximité de son substrat. Par ailleurs, Spt5 pourrait être le pivot central de la CSR. Outre le fait qu'il recrute AID sur la RNA Pol II en pause, il est aussi connu pour interagir avec le *RNA exosome* (Andrulis *et al.*, 2002) et avec des facteurs d'épissage (pour revue Kenter *et al.*, 2012). Une étude récente a montré que AID pourrait aussi être associée à la RNA Pol II en cours d'élongation *via* son interaction avec le complexe PAF (*RNA Polymerase Associated Factor*) (Wilmann *et al.*, 2012). La **Figure 23** représente un modèle actuel sur le ciblage d'AID au niveau des régions S.

3.3.6 Les modifications de la chromatine

A la liste des éléments permettant le recrutement d'AID sur les régions S s'ajoute la régulation épigénétique. Des enzymes et des molécules adaptatrices sont sélectivement

recrutées et stabilisées au niveau des régions S qui subissent la CSR. Ceci est possible, car seules les régions S visées par la recombinaison présentent des marques d'une chromatine ouverte. En effet, ces régions perdent des marques d'histone répressives telles que H3K27me3 au profit de marques actives (H3ac, H4ac, H3K9ac, H3K4me3, H3K36me3, H3K27ac, ...) (Nambu *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2006, 2009; Chowdhury *et al.*, 2008 ; Kuang *et al.*, 2009; Daniel *et al.*, 2010; Pavri *et al.*, 2010; Stanlie *et al.*, 2010, Yamane *et al.*, 2011 ; pour revue Li *et al.*, 2013). L'induction concomitante des modifications d'histones et de la transcription germinale suggère une régulation coordonnée de ces deux processus par des facteurs de transcription qui se fixent sur les promoteurs I. De tels facteurs pourraient recruter PTIP (*PAX Interaction with Ttranscription-activation domain Protein*) qui a un rôle crucial dans l'initiation de la transcription germinale et dans la génération de multiples modifications d'histones (H3K4me3, H3K36me3, H3K27ac) dans les régions S (Daniel *et al.*, 2010). Dans des études menées sur la totalité du génome, le motif H3K4me3 est plus rarement retrouvé au niveau des régions codantes que dans les promoteurs associés à ces régions (pour revue Heintzman *and* Ren, 2007). L'enrichissement de ce motif au niveau des régions S comparativement aux promoteurs I et aux exons constants pourrait être dû au recrutement de facteurs de remodelages chromatinien par la RNA Pol II (ou par les facteurs qui y sont associés). Parmi les candidats possibles, le complexe FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription complex*), la méthyl-transférase SET1 ou bien encore le facteur SPT6, semblent impliqués dans la mise en place du motif H3K4me3 au niveau des régions S (Stanlie *et al.*, 2010 ; Okazaki *et al.*, 2011 ; Begum *et al.*, 2012 ; pour revues Kenter *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2012). Enfin, il faut souligner l'importance de la marque de chromatine inactive H3K9me3 au niveau du recrutement d'AID sur la région S μ . Cette marque permettrait 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).

3.3.7 La *cis*-régulation de la CSR et les interactions à distance

La 3'RR constitue un des éléments *cis*-régulateur majeur du locus IgH. Malgré la faible activité des quatre *enhancers* qui composent cette région, ils présentent une action synergique et assurent une forte transcription de gènes cibles (Madisen *and* Groudine, 1994; Michaelson *et al.*, 1995; Chauveau *et al.*, 1998). Ces quatre activateurs constituent une LCR

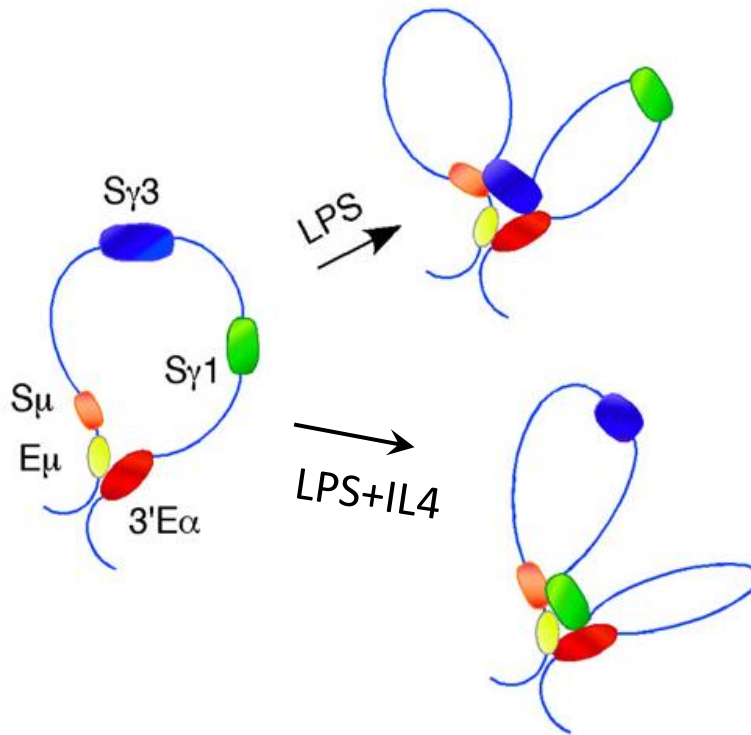


Figure 24 : Interactions entre Eμ, régions S et 3' RR lors de la CSR

Dans les cellules B au repos, Eμ interagit physiquement avec la 3'RR (à gauche). Après stimulation par le LPS, le promoteur Iγ3 est recruté à proximité des *enhancers*. En présence de LPS + IL4, c'est le promoteur Iγ1 qui est recruté. Le recrutement d'un promoteur permet le rapprochement d'une région S donnée à proximité de Sμ facilitant ainsi la formation de la synapse entre les régions S (d'après Wuerffel *et al.*, 2007).

(*Locus Control Region*) dont l'activité est restreinte à la lignée B et culmine dans les LB activés par l'antigène (pour revues Khamlichi *et al.*, 2000; Pinaud *et al.*, 2011). La 3'RR contrôle l'expression des chaînes lourdes d'Ig mais aussi la transcription germinale initiée au niveau des promoteurs I. Ainsi, les souris 3'RR déficientes, dans lesquelles les quatre *enhancers* ont été invalidés, présentent une diminution drastique du CSR vers tous les isotypes et un processus de SHM totalement aboli (Vincent-Fabert *et al.*, 2010 ; Rouaud *et al.*, 2013).

Les *enhancers* de la 3'RR vont ainsi interagir avec les promoteurs I pour augmenter la transcription initiée par ceux-ci. Des expériences de 3C ont démontré l'interaction physique entre la 3' RR, E μ et les promoteurs I γ 3 ou I γ 1 lors d'une stimulation par du LPS ou du LPS en présence d'IL4 respectivement, permettant ainsi le rapprochement entre S μ et la région S acceptrice concernée (**Figure 24**) (Wuerffel *et al.*, 2007). Récemment, PTIP a été identifié comme interagissant avec PAX5 pour permettre ces interactions (Schwab *et al.*, 2011). En ce qui concerne les SHM, Rouaud *et al.* ont récemment démontré que la 3'RR n'affecte que modérément la transcription initiée au niveau des promoteurs pVH, mais est nécessaire au recrutement d'AID. Cette étude démontre aussi une abolition du recrutement d'AID au niveau de S μ . Ces données suggérant un rôle de la 3'RR dans le recrutement d'AID au cours de la CSR, semblent aller au-delà d'une activité restreinte à la transcription germinale des promoteurs I (Rouaud *et al.*, 2013).

De façon inattendue, une étude réalisée au laboratoire et à laquelle j'ai participé a récemment révélé que les *enhancers* de la 3'RR sont flanqués de séquences répétitives ressemblant à celles des régions S nommées LS (*Like-Switch*). Ces régions LS ainsi que les *enhancers* peuvent être transcrits et mutés par AID lors de l'activation de la cellule B. Finalement, la triade « transcription, structure répétitive, ciblage par AID », pré-requis de l'accessibilité des régions S aux recombinaisons de type CSR étant réunies, il a pu être mis en évidence l'existence de recombinaisons entre la région S μ et les sites LS de la 3'RR. Ce processus appelé *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 en Annexe 2). A l'heure actuelle, l'importance physiologique ainsi que la régulation de ce mécanisme sont en cours d'étude.

Chapitre 2 : Transcription et régulation post-transcriptionnelle des gènes d'Ig non productifs

contrôler, supprimer ...

1 TRANSCRIPTION DES GENES D'Ig NON-PRODUCTIFS

Comme nous avons pu l'aborder précédemment, les gènes d'Ig subissent des recombinaisons V(D)J au niveau de leur région variable. Ces réarrangements permettent de générer un vaste répertoire immun à partir d'un nombre restreint de gènes. Cependant la grande imprécision des jonctions entraîne deux fois sur trois un décalage du cadre de lecture et l'apparition de PTC. Par conséquent, une forte proportion de LB (environ 50%) présente un allèle réarrangé de façon non productive (VDJ-). La transcription abondante de ces allèles hors phase pourrait entraîner la synthèse de chaînes d'Ig tronquées pouvant gêner l'assemblage et la production normale des Ig. Pour autant, de tels transcrits matures non-sens ne sont que très rarement détectés dans les banques d'ADNc. Ces observations ont suggéré que l'exclusion allélique était maintenue par le *silencing* des allèles non productifs.

Dans ce sens, les travaux de DNA et RNA FISH réalisés par l'équipe de Skok ont mis en évidence le recrutement de l'allèle IgH non-productif (DJ ou VDJ-) au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. Cette localisation nucléaire asymétrique a conduit à un modèle stipulant que le recrutement de l'allèle exclu au niveau de cette zone répressive inhibe sa transcription et cela notamment dans des cellules B activées (Skok *et al.*, 2001 ; Roldan *et al.*, 2005). Toujours dans ce contexte d'extinction de l'allèle non-productif, le groupe de Mühlemann a montré, dans des lignées cellulaires, que la présence d'un PTC sur un mini-gène d'Ig μ inactive sa transcription en induisant la mise en place de marques chromatiniennes répressives (*i.e.* H3K9me3) (Bühler *et al.*, 2005 ; Stalder and Mühlemann, 2007). Ces auteurs ont nommé ce phénomène *nonsense-mediated transcriptional gene silencing* (NMTGS). Néanmoins, ces mêmes auteurs ont montré que ce mécanisme de *silencing*, mis en évidence dans une lignée non B à l'aide de transgènes, ne se produisait pas dans une lignée pro-B présentant des réarrangements bi-alléliques au locus IgH (VDJ+/VDJ-) (Eberle *et al.*, 2009a).

Cependant, plusieurs études sont venues controverser ce modèle de *silencing* de l'allèle exclu. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que la transcription germinale préalable à la CSR s'effectue de façon similaire sur les deux allèles IgH, indiquant ainsi une

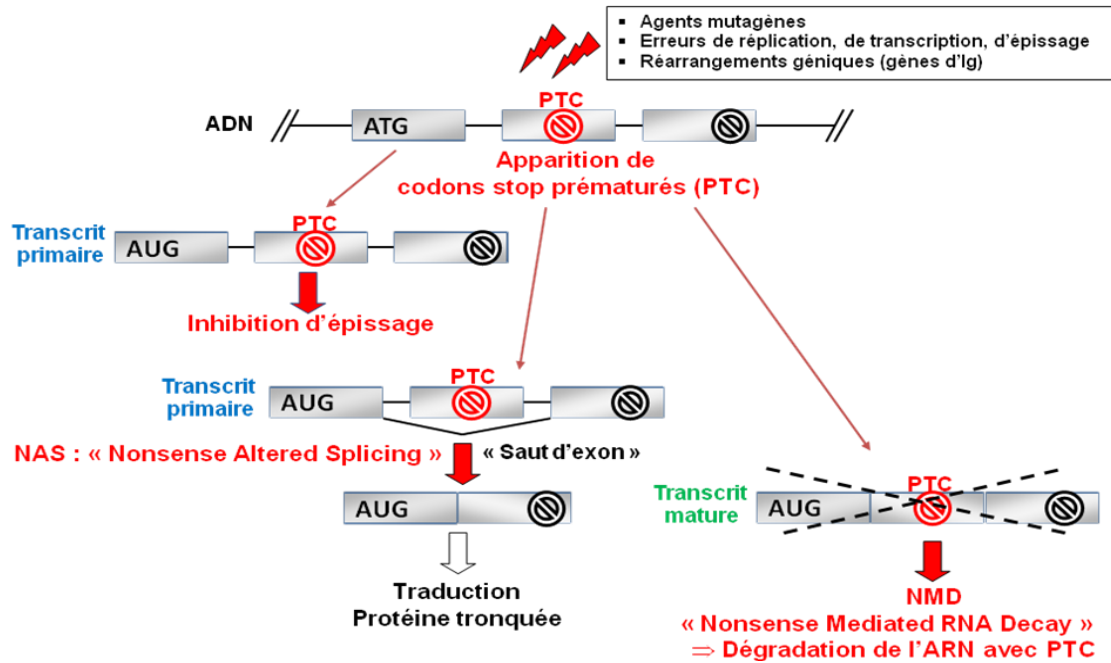


Figure 25 : Les différents mécanismes de surveillance des ARN

La surveillance des transcrits présentant des codons stop prématurés (PTC) peut s'effectuer à différents stades de l'expression génique. Les transcrits primaires hors phase peuvent être pris en charge par le phénomène d'inhibition d'épissage. Au cours de l'épissage, c'est le phénomène de NAS qui prend le relais. Enfin, les transcrits matures contenant un PTC sont dégradés par NMD.

certaine accessibilité transcriptionnelle de l'allèle IgH non productif (Delpy *et al.*, 2003). De plus, une preuve indirecte de la transcription efficace des allèles VDJ- a été apporté en étudiant comparativement la fréquence de SHM sur les deux allèles IgH. L'apparition de SHM étant proportionnelle au taux de transcription, ces résultats ont montré une fréquence équivalente de mutations sur les allèles IgH productifs et nonproductifs (Delpy *et al.*, 2004a). Ces données plaidant en faveur d'une absence d'inhibition transcriptionnelle des allèles IgH non-productifs ont été étayées par les travaux de RNA-FISH de Daly *et al.* mettant en évidence la transcription bi-allélique des allèles IgH dans des cellules B primaires (Daly *et al.*, 2007). En accord, avec ces résultats, Eberle *et al.* ont observé une transcription équivalente des deux allèles IgH dans la lignée proB qui leur a servi à l'étude du NMTGS (Eberle *et al.*, 2009a).

La transcription des allèles d'Ig non productifs a aussi été observée au niveau des gènes de chaînes légères. Au locus Ig κ , environ 40 à 50% des cellules présentent des réarrangements bialléliques VJ+/VJ- (Coleclough *et al.*, 1981 ; pour revue Mostoslavsky *et al.*, 2004). De tels réarrangements sont aisément détectables au sein de l'ADN génomique des cellules B, de même que leurs transcrits primaires, indiquant que ces allèles exclus bénéficient aussi d'un certain degré de transcription. Comme pour les chaînes lourdes, le niveau de détection des séquences hors phase est très faible parmi les transcrits épissés au point qu'ils deviennent quasi-indétectables dans les cellules B matures (Delpy *et al.*, 2004b).

Même si la localisation nucléaire asymétrique des allèles d'Ig semble maintenir l'exclusion allélique en prévenant les réarrangements sur les allèles exclus, elle n'empêche vraisemblablement pas leur transcription.

Afin d'éviter les effets néfastes générés par la transcription puis la traduction des gènes d'Ig non-productifs, la surveillance des ARN est très active dans la lignée B et intervient tout au long de la maturation des transcrits (**Figure 25**). Dans un premier temps, un processus d'inhibition d'épissage appelé NMUP (*Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA*) agit directement sur les transcrits primaires. Durant l'épissage, le phénomène de NAS (*Nonsense-associated Altered Splicing*) permet d'éliminer les exons contenant des PTC par épissage alternatif. Enfin, les transcrits matures contenant des PTC sont dégradés par le mécanisme de NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*). Ces trois processus sont donc complémentaires et peuvent coexister au sein d'une même cellule pour contrôler

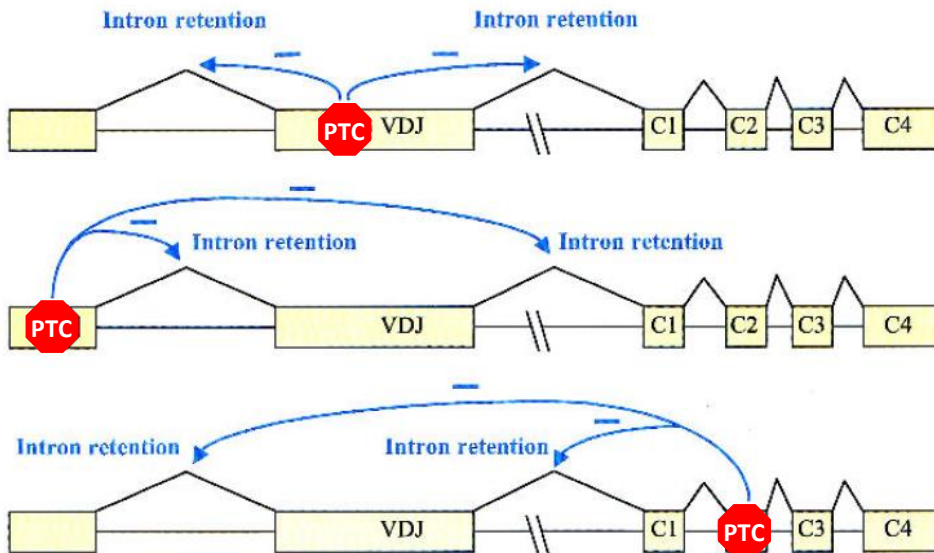


Figure 26 : La position du PTC n'a pas d'impact sur le NMUP des pré-ARN Ig μ

Représentation schématique d'un transcrit primaire de chaîne lourde μ . Des PTC (rouge) situés dans trois exons différents du transcrit, entraînent la rétention des mêmes introns et cela avec la même efficacité (d'après Mühlemann *et al.*, 2001; Maquat, 2002).

efficacement la qualité des ARN (Baumann *et al.*, 1985 ; Connor *et al.*, 1994 ; Lozano *et al.*, 1994 ; Aoufoushi *et al.*, 1996 ; Jäck *et al.*, 1989 ; Mühlemann *et al.*, 2001 ; Delpy *et al.*, 2004b ; Eberle *et al.*, 2009a ; Chemin *et al.*, 2010 en Annexe 1 ; pour revue Isken *and* Maquat, 2007).

2 NONSENSE-MEDIATED UPREGULATION OF PRE-mRNA

L'épissage des pré-ARNm est une étape cruciale de l'expression génique chez les eucaryotes. Il concerne au moins 95% des gènes et constitue un préalable à l'exportation des ARNm dans le cytoplasme, siège de la synthèse protéique (Pan *et al.*, 2008 ; pour revues Corcos et Solier, 2005 ; Fiset *et al.*, 2009). Cette étape de la maturation ARN est sujette à un premier mécanisme de « contrôle qualité » appelé NMUP. De façon intrigante, la présence de PTC sur les pré-ARNm peut inhiber leur épissage et entraîner leur accumulation. En bloquant ainsi l'épissage des transcrits primaires, ce phénomène permet de réduire considérablement le taux de transcrits matures contenant des PTC.

L'existence du NMUP a été révélée par le groupe de Milstein. Ces auteurs ont démontré que l'apparition de PTC dans les gènes $Ig\kappa$ s'accompagne d'une accumulation des pré-ARNm non épissés. Leurs données indiquent également que le processus de NMUP n'est pas dépendant de la synthèse protéique et permet de réduire considérablement le taux d'ARNm $Ig\kappa$ non-sens (Lozano *et al.*, 1994 ; Aoufouchi *et al.*, 1996). Par la suite, une étude de Mühlemann *et al.* a révélé que les pré-ARNm d' $Ig\mu$ et du TCR β contenant des PTC sont également soumis au NMUP. Ces auteurs ont démontré que seules les mutations non-sens entraînent une inhibition de l'épissage des pré-ARNm et que cet effet n'est pas influencé par la localisation du PTC. En effet, la rétention des introns est similaire même si les mutations non-sens sont localisées dans des exons différents (**Figure 26**). De façon intéressante, ils ont également montré que l'accumulation des transcrits primaires $Ig\mu$ hors phase a lieu à proximité du site de transcription (Mühlemann *et al.*, 2001). Toutes ces données sous-entendent que la cellule est apte à identifier la présence de PTC au sein même du noyau. Nous noterons que ce mécanisme a aussi été identifié pour les transcrits non-sens du virus MVM (*Minute Virus of Mice*) (Gersappe *et al.*, 1999 ; Naeger *et al.*, 1992).

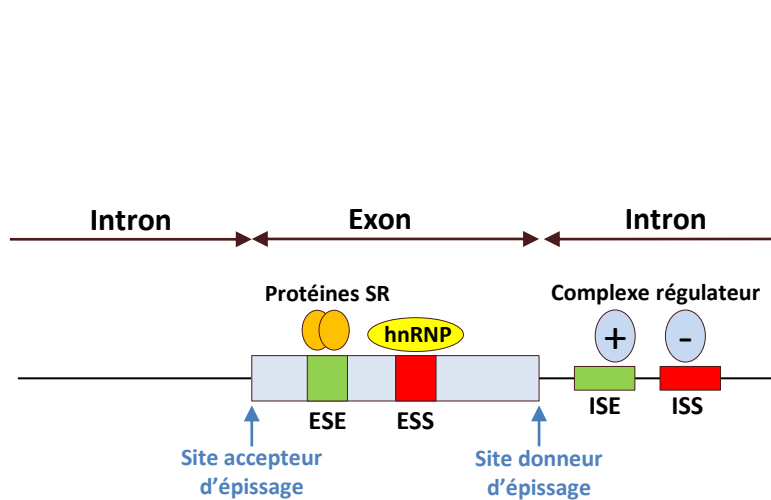


Figure 27 : Régulation de l'épissage des pré-ARNm

Représentation schématique d'un transcrit primaire. Les séquences *cis* régulant l'épissage sont représentées par des rectangles: activatrices (en vert) et inhibitrices (en rouge). Sont représentés également différents facteurs protéiques *trans* qui reconnaissent ces séquences. SR: *Serine Rich*; hnRNP : *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*; ESE : *exonic splicing enhancer*; ISS : *intrinsic splicing silencer* (adapté de Corcos and Solier, 2005).

Récemment, une étude menée par l'équipe de Wilkinson pour comprendre les fondements moléculaires du NMUP a permis de montrer qu'une accumulation de transcrits primaires non épissés (ou partiellement épissés) pouvait également avoir lieu en présence de mutations faux-sens (Imam *et al.*, 2010). Dans cette étude réalisée à l'aide de constructions chimériques contenant l'exon VDJ du TCR β et le gène codant la triose phosphate isomérase (TPI), la perturbation du cadre de lecture n'est pas indispensable à l'établissement du NMUP. Dans ce cas précis, les mutations qu'elles soient non-sens ou faux-sens entraînent une accumulation des transcrits primaires car elles modifient des séquences *cis*-régulatrices de l'épissage. En effet, des facteurs protéiques impliqués dans l'épissage sont capables de reconnaître des séquences *cis*-régulatrices situées dans les exons ou les introns. Lorsque ces séquences sont dites activatrices, elles sont reconnues par des facteurs facilitant le recrutement du spliceosome et ainsi l'épissage. En revanche, lorsque ces séquences sont inhibitrices, les facteurs protéiques *trans* qui s'y fixent perturbent le recrutement de la machinerie d'épissage. En fonction de leur activité (activatrice ou inhibitrice) et de leur localisation (exon ou intron), ces séquences sont subdivisées en quatre catégories : ESE et ESS d'une part (*Exonic Splicing Enhancer* et *Exonic Splicing Silencer*) ; ISE et ISS d'autre part (*Intronic Splicing Enhancer* et *Intronic Splicing Silencer*) (**Figure 27**) (pour revues Tazi *et al.*, 2005 ; Wahl *et al.*, 2009).

Dans l'étude d'Imam *et al.* les mutations générées détruisent des ESE. L'épissage est donc altéré indépendamment de la nature de la mutation (non-sens, faux-sens ou silencieuse) (Imam *et al.*, 2010). Néanmoins, la simple mutation d'une séquence ESE ne semble pas suffisante pour induire du NMUP. Ces auteurs postulent que l'accumulation du pré-ARNm ne peut se produire que si trois critères sont réunis : (1) le pré-ARNm a des séquences qui préviennent une dégradation nucléaire rapide ; (2) il échappe à l'export nucléaire et (3) l'architecture du transcrit primaire ne favorise pas la mise en place d'évènements d'épissage alternatif.

Ces résultats, en contradiction avec les travaux de l'équipe de Mühlemann, semblent être le reflet de deux mécanismes d'accumulation des transcrits primaires mutés : l'un dépendant et l'autre indépendant du cadre de lecture (Mühlemann *et al.*, 2001 ; Imam *et al.*, 2010). Le terme de NMUP serait donc plus adapté au phénomène dépendant du cadre de lecture. Des travaux auxquels j'ai participé au début de ma thèse ont permis d'étudier la surveillance des ARN au locus Igk (Chemin *et al.*, 2010 en Annexe 1). Ainsi, en utilisant, des

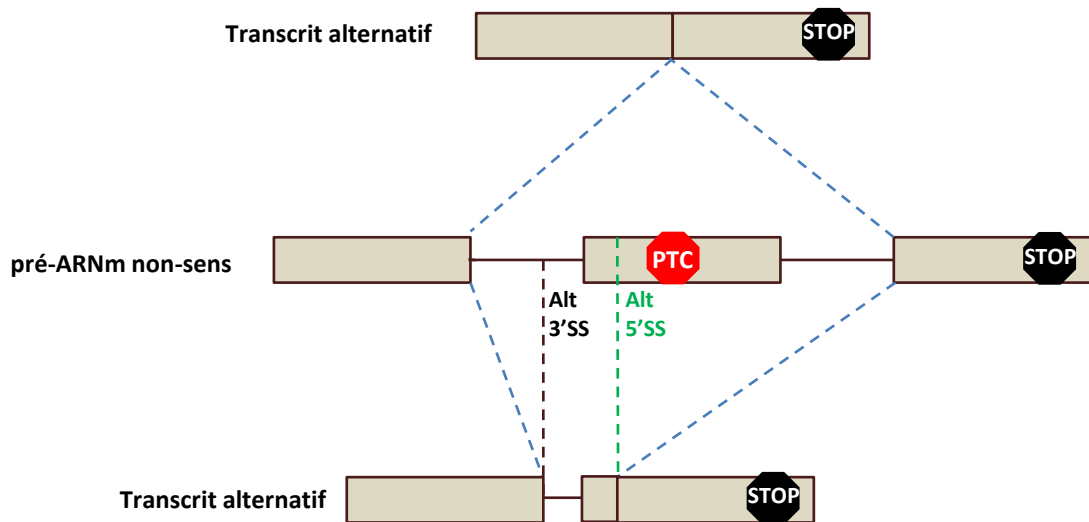


Figure 28 : Exclusion d'un exon contenant un PTC par le processus de NAS

Cette représentation schématique illustre deux exemples d'épissage alternatifs suite à l'action du NAS. La ligne du haut représente l'exclusion de l'exon contenant le PTC par un phénomène de « saut d'exon ». La ligne du bas représente l'exclusion de l'exon contenant le PTC par l'utilisation de site cryptique d'épissage (adapté de Maquat, 2002).

constructions plasmidiques recréant des réarrangements VJ κ productifs et non-productifs dans un contexte physiologique, nous avons pu montrer que le NMUP des transcrits primaires Ig κ non-sens n'est vraisemblablement pas dû à une perturbation de séquences ESE mais à la seule présence du PTC. En accord avec les données d'Aoufouchi *et al.* nous observons une accumulation de transcrits hors phases non épissés ou partiellement épissés qui n'est pas dépendante de la synthèse protéique (Chemin *et al.*, 2010).

Une étude récente a apporté quelques pistes concernant la mécanistique du NMUP. Par des approches d'imagerie sur des lignées cellulaires vivantes, de Turrís *et al.* ont démontré que l'accumulation des transcrits primaires Ig μ contenant des PTC au site de la transcription est dépendante de UPF1 (*up-frameshift 1*) et SMG6 (*suppressor with morphogenetic effects on genitalia 6*), deux protéines impliquées dans le NMD (*cf* § 4). Il avait déjà été supposé qu'UPF1 pouvait s'associer avec le domaine CTD de la RNA Pol II (Iborra *et al.*, 2004). Ces auteurs proposent que ces deux protéines peuvent reconnaître les transcrits primaires contenant des PTC et entraîner leur rétention au site de la transcription (de Turrís *et al.*, 2011).

3 NONSENSE-ASSOCIATED ALTERED SPLICING

La fidélité de l'expression génique peut également être contrôlée durant l'épissage. En effet, la présence d'un PTC sur un pré-ARNm peut induire des modifications du patron d'épissage. Ce processus nommé *nonsense-associated altered splicing* (NAS) est un autre mécanisme de réponse aux mutations non-sens qui, par épissage alternatif, permet d'exclure les exons contenant des PTC. Ainsi, la reconnaissance d'un PTC peut entraîner l'activation de sites cryptiques d'épissage afin d'exclure l'exon contenant la mutation. Cette exclusion peut également se produire tout simplement par un phénomène de saut d'exon (**Figure 28**). Si le transcrit alternatif ainsi formé conserve la phase ouverte de lecture et si l'élimination de l'exon muté n'abolit pas la fonction protéique, le NAS peut procurer un avantage sélectif en permettant la synthèse de protéines tronquées qui conservent partiellement ou entièrement leur fonction. A l'inverse, ce processus peut également générer des protéines tronquées potentiellement néfastes pour la cellule (Dietz *et al.*, 1993 ; Dietz *and* Kendzior, 1994 ; Hentze *and* Kulozik 1999 ; pour revue Maquat, 2002).

Les mécanismes moléculaires responsables du NAS ne sont que partiellement élucidés et il semble que 2 types de NAS peuvent avoir lieu : l'un imputé à des mutations touchant des séquences régulatrices de l'épissage (*i.e.* NAS de type I), l'autre dû à des décalages du cadre de lecture (*i.e.* NAS de type II).

3.1 LE NAS DE TYPE I

Dans les cas de NAS de type I, le phénomène d'épissage alternatif et de saut d'exon résulte de mutations non-sens qui détruisent des séquences ESE. Comme décrit pour l'inhibition d'épissage, lorsque ces séquences sont mutées, les facteurs qui les reconnaissent ne peuvent plus se fixer, ce qui réduit la fréquence d'inclusion dans l'ARNm de l'exon contenant le PTC. Les ESE pouvant être modifiées non seulement par des mutations non-sens, mais aussi par des mutations faux-sens ou des mutations silencieuses, ces dernières induisent également le NAS de type I. Le NAS de type I ne correspond donc pas à un effet spécifique du PTC (Cartegni *et al.*, 2002). Ce NAS de classe I semble indépendant de la synthèse protéique et a été décrit pour les transcrits codant le TCR β , BRCA1, la fibrilline et l'Ig μ (Chang *et al.*, 2007a ; Liu *et al.*, 2001 ; Caputi *et al.*, 2002 ; Maquat, 2002 ; Mohn *et al.*, 2005 ; Bühler *and* Mühlemann, 2005). Outre la destruction de séquence ESE, il peut aussi arriver que la mutation non-sens induisent l'apparition de séquences ESS, et provoquent l'exclusion de l'exon muté en inhibant la reconnaissance de ses sites d'épissage (Disset *et al.*, 2006).

3.2 LE NAS DE TYPE II

Le NAS de type II se produit en présence de mutations non-sens qui interrompent le cadre de lecture et conduit à l'élimination de l'exon contenant le PTC. Dans ce cas, l'épissage alternatif est vraiment provoqué par une perturbation du cadre de lecture et non par une altération de séquences régulatrices telles que les ESE. Il s'agirait donc d'un NAS capable de reconnaître spécifiquement l'exon contenant le PTC et de l'exclure. Trois points permettent de mettre en évidence ce phénomène : (1) seules les mutations non-sens, et pas les mutations faux-sens à des positions équivalentes, sont capables d'induire l'épissage alternatif. C'est le cas de mutations particulières localisées sur les gènes de la fibrilline et les gènes du TCR β (Mendell *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002a et 2002b) ; (2) l'épissage alternatif

des exons contenant les PTC est inhibée lorsque le codon d'initiation AUG ou la séquence consensus de Kozak sont mutés (Wang et al. 2002a, Wang et al. 2002b) ; (3) le NAS n'apparaît plus lorsque l'on restaure le cadre de lecture (Wang et al. 2002b).

De façon intéressante, seul le NAS de type II (et non le NAS de type I), est inhibé lorsque la protéine UPF1 est supprimée (Chang *et al.*, 2007a). Le NAS de type II et le NMD ont donc en commun la nécessité de faire intervenir UPF1 (Mendell *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007a). En revanche, le NAS n'est pas affecté par la déplétion d'autres facteurs impliqués dans le NMD (*i.e.* UPF2, UPF3/3X, SMG1 ou eIF4A3) indiquant que ces deux mécanismes sont différents (Wang et al. 2002a; Chang *et al.*, 2007a).

3.3 LE NAS ET LES IG

En utilisant des mini-gènes μ , l'équipe de Mühlemann a démontré que la présence de PTC entraîne l'épissage alternatif de ces transcrits primaires hors phase. Le remplacement des mutations non-sens par des mutations faux-sens a révélé que ces transcrits alternatifs résultent d'un phénomène de NAS de type I (Bühler *and* Mühlemann, 2005). Notre stratégie de mini-locus, nous a permis d'étudier ce phénomène au locus $Ig\kappa$. Contrairement aux travaux de Bühler, nous avons détecté des transcrits alternatifs d' $Ig\kappa$ uniquement pour les transcrits contenant des PTC. De plus, nous montrons que ce phénomène est nettement plus marqué dans les lignées plasmocytaires. Les gènes d' Ig étant très fortement transcrits dans les plasmocytes, nos résultats supposent que le NAS est dépendant de l'intensité de transcription (Chemin *et al.*, 2010). En effet, il est désormais admis que la transcription et l'épissage peuvent être concomitants et sont influencés par la vitesse d'élongation de la RNA Pol II (Das *et al.*, 2006 ; pour revue Shukla *and* Oberdoerffer, 2012).

4 NONSENSE MEDIATED mRNA DECAY

Le NMD est un processus de surveillance des ARN qui a pour but d'éliminer les transcrits matures contenant des PTC. En effet, il est important pour la cellule d'éliminer ces transcrits aberrants car leur traduction pourrait entraîner la synthèse de protéines tronquées potentiellement néfastes pour l'organisme (perte de fonction, dominant négatif) (pour revue Chang *et al.*, 2007b ; Schoenberg et Maquat, 2012 ; Schweingruber *et al.*, 2013).

Ce processus, découvert il y a plus de 25 ans par Baserga et Benz, a été intensément étudié. Ces études ont souvent eu recours aux gènes d'Ig et du TCR comme d'outils du fait de leur propension à acquérir des PTC au cours des réarrangements V(D)J (Baserga *and* Benz., 1988).

4.1 LES ACTEURS DU NMD

4.1.1 Les protéines UPF

Chez les mammifères, quatre protéines UPF ont été identifiées : UPF1, UPF2, UPF3 (nommée aussi UPF3a) et UPF3X (nommée aussi UPF3b). Elles constituent le coeur de la machinerie du NMD. En effet, l'utilisation de petits ARN interférents (siARN) dirigés contre ces protéines inhibe le NMD (Mendell *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2003; Mendell *et al.*, 2004; Gehring *et al.*, 2005; Wittmann *et al.*, 2006). D'autre part, la fixation artificielle de ces protéines sur la partie 3'UTR d'un ARNm dépourvu de PTC est suffisante pour induire sa dégradation par NMD (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Gehring *et al.*, 2003; Gehring *et al.*, 2005; Kunz *et al.*, 2006).

Parmi les protéines UPF, **UPF1** (ou RENT1 pour *Regulator of Nonsense Transcripts 1*) est, d'un point de vue fonctionnel, le facteur clé du NMD (pour revue Mühlemann *et al.*, 2008). Parmi les facteurs UPF, UPF1 est le plus conservé entre les espèces avec près de 98% de similitude entre les protéines murines et humaines (Culbertson *and* Leeds 2003). Ses séquences N-terminale et C-terminale contiennent de multiples résidus sérine dont les cycles de phosphorylation/déphosphorylation ont un rôle capital dans le NMD (*cf* § 4.2.3) (Yamashita *et al.*, 2001). Cette protéine possède une activité hélicase 5'-3' qui est essentielle au NMD. En effet, la mutation R844C qui abolit cette activité hélicase confère un effet dominant négatif à la protéine UPF1 et inhibe le NMD dans les cellules de mammifère (Sun *et al.*, 1998). UPF1 possède aussi une activité ATPase dépendante de l'ARN (Bhattacharya *et al.*, 2000). Il a été montré que cette activité est nécessaire pour le relâchement et le recyclage des facteurs du NMD fixés sur l'ARNm (Franks *et al.*, 2010). UPF1 est localisée principalement dans le cytoplasme, mais elle est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Mendell *et al.*, 2002). UPF1 s'associe avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (*elongation Release Factor*) ainsi qu'avec UPF2 (pour revue Mühlemann *et al.*, 2008). Enfin, l'inactivation du gène *upf1* est létale chez la souris ; les embryons meurent entre 3,5 et 5,5 jours révélant ainsi le rôle essentiel de cette protéine

dans de nombreuses fonctions biologiques (Medgalchi *et al.*, 2001). Nous noterons son rôle dans la réplication, le maintien de l'intégrité du génome et la protection des séquences télomériques (Azzalin *and* Lingner, 2006 ; pour revue Isken *and* Maquat, 2008)

La protéine **UPF2** sert d'adaptateur moléculaire. Elle fait le lien entre UPF1 et UPF3 (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Mendell *et al.*, 2000; Serin *et al.*, 2001). Pour cela, elle possède des domaines de liaison à UPF1 dans ses régions N- et C-terminales et un domaine d'interaction avec UPF3a/UPF3b dans sa partie C-terminale (Serin *et al.*, 2001). UPF2 présente aussi plusieurs domaines appelés MIF4G (pour *Middle of eIF4G-like*) qui ont été décrits initialement dans le facteur d'initiation de la traduction eIF4G. Ces domaines seraient impliqués dans son interaction avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4A et eIF3 (Mendell *et al.*, 2000). Cette protéine possède des séquences de localisation nucléaire dans sa partie C-terminale et peut être retrouvée dans la fraction nucléaire et dans la fraction cytoplasmique (Lejeune *et al.*, 2002). Cependant, sa localisation s'avère être principalement cytoplasmique et concentrée au niveau de la région périnucléaire (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Serin *et al.*, 2001)

Les gènes *upf3* et *upf3X* sont localisés respectivement sur le chromosome 13 et sur le chromosome X (Serin *et al.*, 2001). Chaque protéine **UPF3** possède deux isoformes issues d'un épissage alternatif. UPF3 (ou UPF3a) présente une forme courte (UPF3S) dans laquelle l'exon 4 est exclu, et une forme longue (UPF3L) contenant cet exon. De façon similaire, UPF3X (ou UPF3b) présente une forme courte dans laquelle l'exon 8 est exclu, et une forme longue incluant cet exon (Lykke-Andersen *et al.*, 2000 ; Serin *et al.*, 2001). Bien que la région N-ter de UPF3 et UPF3X contienne un domaine RRM (*RNA Recognition Motif*), ces protéines ne se lient pas directement à l'ARN. En revanche ce domaine permet leur interaction avec UPF2 (Kadlec *et al.*, 2004). Ces deux protéines présentent une localisation majoritairement nucléaire mais elles peuvent faire la navette vers le cytoplasme (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Serin *et al.*, 2001). Malgré leur similarité, leurs effets sur le NMD semblent être différents. En effet, la fixation artificielle de UPF3X dans la partie 3'UTR d'un ARNm dépourvu de PTC induit fortement sa dégradation, alors que l'effet de UPF3 est plus modeste (Lykke-Andersen *et al.*, 2000). De même, l'inhibition d'UPF3X avec un siRNA abolit le NMD alors que celle d'UPF3 ne le permet pas (Kunz *et al.*, 2006).

4.1.2 Les protéines SMG

Les protéines SMG (*Suppressor with Morphogenetic effects on Genitalia*) jouent un rôle crucial dans la régulation du NMD en intervenant dans le cycle de phosphorylation et déphosphorylation de UPF1 (*cf* § 4.2.3). Six protéines SMG ont été identifiées : SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8 et SMG9.

SMG1 est une kinase qui phosphoryle UPF1 sur ses régions N et C-terminales (Yamashita et al. 2001). Elle appartient à la famille des PI3KK (*Phosphatidylinositol 3-Kinase related Kinases*). La phosphorylation d'UPF1 par SMG1 est une étape clé du NMD. En effet, il a été démontré que l'inhibition de l'activité kinase de SMG1 par mutagenèse ou par l'utilisation d'inhibiteurs de PI3KK stabilise les ARNm soumis au NMD (Yamashita *et al.*, 2001). Récemment, il a été rapporté que SMG1 forme un complexe avec les protéines **SMG8** et **SMG9** (Yamashita *et al.*, 2009). Les travaux de Yamashita *et al.* ont mis en évidence que SMG8 est nécessaire pour le recrutement de SMG1 sur le complexe de surveillance et régule directement l'activité kinase de SMG1 sur UPF1 *in vivo*. SMG9 quant à elle, est requise pour l'interaction entre SMG1 et SMG8 (Yamashita *et al.*, 2009).

Les protéines **SMG5**, **SMG6** et **SMG7** sont non redondantes et participent à la déphosphorylation d'UPF1. Ce ne sont pas des phosphatases, mais elles servent d'adaptateurs entre la protéine phosphatase 2A (PP2A) et la forme phosphorylée d'UPF1 (Chiu *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2003). Leur partie N-terminale présente un domaine 14-3-3, motif de fixation aux phospho-sérines, qui est impliqué dans l'interaction avec UPF1 phosphorylée (Fukuhara *et al.*, 2005). Une mutation au sein de ce domaine inhibe l'interaction de SMG7 avec UPF1 phosphorylée *in vitro* (Fukuhara *et al.*, 2005). SMG5 et SMG6 possèdent également un domaine PIN (*Pilt N-terminal domain*) qui est caractéristique des protéines phosphodiesterase avec une activité ribonucléasique. Le domaine PIN de SMG6 est responsable du clivage endonucléolytique de l'ARNm non-sens à proximité du PTC lors de l'initiation de la dégradation (Gatfield *and* Izaurralde, 2004; Huntzinger *et al.*, 2008; Eberle *et al.*, 2009b).

4.1.3 Le complexe de jonction exon-exon

Dans les cellules de mammifères, le NMD dépend généralement de l'épissage et nécessite que le PTC soit positionné au moins 50 à 55 nucléotides en amont de la dernière

jonction entre deux exons (*cf* § 4.2.5). Cette règle de position des PTC est due à la fixation lors de l'épissage d'un complexe nommé EJC (*Exon Junction Complex*) à 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon. Ce complexe protéique d'environ 350 kDa est fixé à l'ARNm dans le noyau et y reste associé dans le cytoplasme jusqu'à ce que l'ARNm soit traduit (Le Hir *et al.*, 2000a et 2000b ; pour revue Le Hir *and* Séraphin, 2008). Le « cœur » de l'EJC est un hétérotétramère constitué par quatre protéines associées de façon stable : eIF4A3, MLN51, Y14 et Magoh (Ballut *et al.*, 2005; Tange *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2006). Parmi ces protéines eIF4A3 se lie directement à l'ARNm et sert d'ancre pour la fixation des autres facteurs de l'EJC (Chan *et al.*, 2004; Shibuya *et al.* 2004). Le « cœur » de l'EJC sert ensuite de plateforme d'ancrage à d'autres facteurs, notamment UPF2 et UPF3/3X, qui interagissent de façon transitoire avec l'ARNm (pour revue Le Hir *and* Andersen, 2008). Les protéines UPF3/3X sont recrutées sur l'EJC *via* Y14 au sein du noyau (Kim *et al.*, 2001; Gehring *et al.*, 2003). La protéine UPF2, quant à elle, s'associerait à UPF3/3X à l'intérieur et/ou à la périphérie du noyau (Lejeune *et al.*, 2002).

4.2 LES MECANISMES DE DEGRADATION PAR NMD

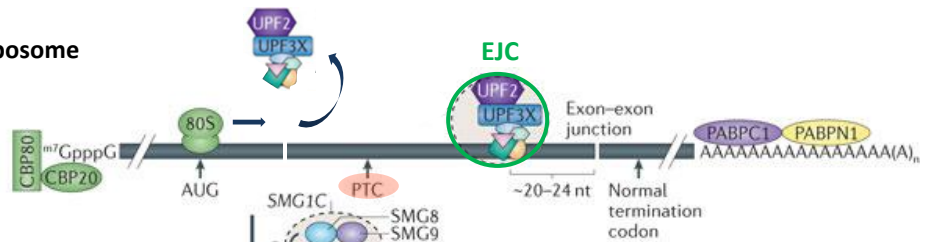
Il est essentiel pour la cellule de pouvoir faire la distinction entre un codon de terminaison prématuré et le codon de terminaison physiologique afin de dégrader uniquement les ARNm porteurs de PTC et éviter leur traduction. Dans ce contexte, le rôle du complexe de surveillance est de coupler la reconnaissance d'un PTC avec la machinerie de dégradation des ARNm afin d'accélérer l'élimination du transcrit aberrant (Conti *and* Izaurrealde, 2005; Amrani *et al.*, 2006 ; pour revue Schweingruber *et al.*, 2013). Nous allons d'abord détailler la suite la mécanistique du NMD classique qui est dépendant de l'interaction entre le complexe de surveillance et un EJC fixé en aval. Dans le paragraphe 4.2.6, nous aborderons le fait que cette dégradation peut également avoir lieu de façon EJC-indépendante.

4.2.1 Le premier tour de traduction : détecter les PTC

La reconnaissance d'un PTC sur un ARNm et l'activation du NMD nécessitent une étape de traduction. En effet, il a été montré que le blocage de la traduction par l'introduction d'une tige-boucle dans la partie 5'UTR de l'ARNm ou par traitement avec des

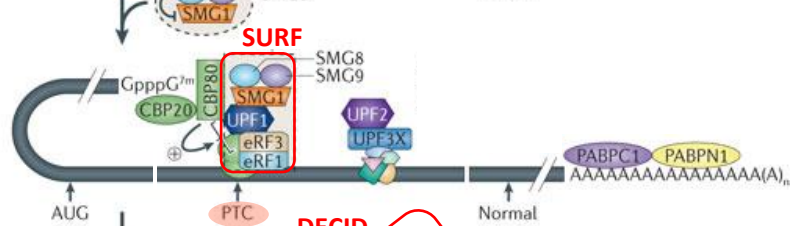
A

Premier tour de traduction :
élimination des EJC par le ribosome



B

Reconnaissance du PTC :
mise en place du complexe SURF



C

Interaction entre SURF et EJC :
mise en place du complexe DECID

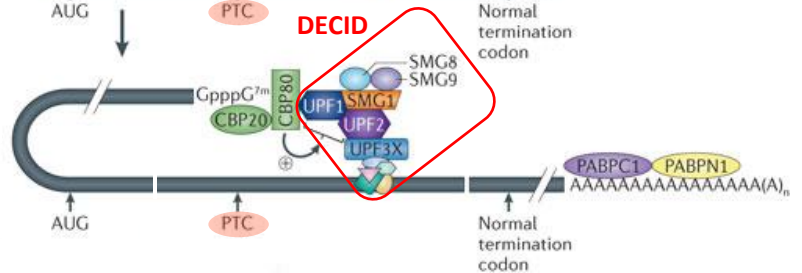


Figure 29 : Mise en place du complexe de surveillance

La première lecture de l'ARNm par le ribosome permet de détecter la présence éventuelle de codons stop prématurés et d'induire soit la dégradation des ARN non-sens ; soit la traduction des transcrits normaux. Lorsqu'un PTC est détecté, le complexe de surveillance se met en place pour induire la dégradation de l'ARNm aberrant. La mise en place de DECID va entraîner la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 (adapté de Schoenberg *and* Maquat, 2012).

composés chimiques tels que le cycloheximide (CHX) ou la puromycine inhibe la dégradation des ARNm contenant des PTC par NMD (Belgrader *et al.*, 1993 ; Carter *et al.*, 1995). Afin d'éviter la synthèse de protéines tronquées, il semble nécessaire que la reconnaissance d'un PTC se fasse le plus tôt possible. Dans ce sens, plusieurs travaux ont permis d'établir que les ARNm porteurs d'un PTC sont reconnus et ciblés pour la dégradation au cours d'un premier tour de traduction (Ishigaki *et al.*, 2001; Lejeune *et al.*, 2002). En effet, une des caractéristiques majeures des ARNm néosynthétisés est la fixation sur la coiffe de l'hétérodimère CBP80-CBP20. Ce complexe sera ensuite remplacé par eIF4E après la primo-lecture de l'ARNm par le ribosome, ce qui permet une synthèse protéique intense (Dostie *and* Dreyfuss, 2002). Les travaux du groupe de Maquat ont démontré que le NMD (chez les mammifères) a lieu uniquement sur des ARNm fixés par CBP80 et non sur des ARNm portant eIF4E indiquant que seuls les ARNm non-sens nouvellement synthétisés sont soumis au NMD (Ishigaki *et al.*, 2001 ; Chiu *et al.*, 2004). De plus ce groupe a montré que UPF2, UPF3 et des composants de l'EJC ne sont plus détectés sur les ARNm liés à eIF4E (Lejeune *et al.*, 2002). Ainsi, au cours du premier tour de traduction, le passage du ribosome permet de déplacer les complexes EJC fixés sur l'ARNm. Cette primo lecture de l'ARNm agit tel un scanner et permet de vérifier la qualité de l'ARNm. Toutefois, des travaux récents du groupe de Mühlemann semblent indiquer que les ARNm aberrant liés à eIF4E sont aussi dégradés par NMD (Rufener *and* Mühlemann, 2013).

Dans un ARNm normal, le codon de terminaison est localisé dans le dernier exon par conséquent le premier tour de traduction va éliminer tous les EJC présents sur l'ARNm. La détection du codon stop physiologique par le ribosome entraîne l'arrêt de ce dernier et le recrutement des facteurs de terminaison de la traduction : eRF1 et eRF3. Les protéines PABPC (*Poly A Binding Protein Cytoplasmic*) fixées sur la queue polyA à proximité du codon stop vont stimuler le relargage du polypeptide et la dissociation du ribosome (Singh *et al.*, 2008 ; pour revue Kervestin *and* Jacobson, 2012).

Lorsqu'un ARNm porte un PTC positionné en amont d'une jonction exon-exon, le ribosome peut déplacer de la même façon tous les EJC qui se trouvent en amont du PTC (**Figure 29A**). Cependant, quand il rencontre le PTC, le ribosome s'arrête alors qu'il reste encore un (ou plusieurs) EJC fixé(s) en aval. Ainsi, la présence d'un EJC en aval du codon de terminaison indique qu'il s'agit d'un PTC et déclenche la dégradation de l'ARNm aberrant par NMD (pour revue Nicholson *and* Mühlemann, 2010).

4.2.2 L'activation du NMD

D'un point de vue moléculaire, la rencontre du PTC par le ribosome entraîne, comme pour le codon stop physiologique, le recrutement d'eRF1 et eRF3. UPF1 et SMG1 sont ensuite recrutées par les facteurs eRFs aboutissant ainsi à la mise en place d'un complexe protéique nommé « **SURF** » sur le PTC (**Figure 29B**). L'assemblage de ce complexe est indépendant de l'EJC, puisqu'il peut avoir lieu en l'absence d'UPF2 et Y14 (Czaplinski *et al.*, 1998 ; Kashima *et al.*, 2006). Le complexe SURF contient également les protéines SMG8 et SMG9 (pour revue Schoenberg *and* Maquat., 2012).

La présence de la kinase SMG1 dans le complexe SURF n'est pas suffisante pour induire la phosphorylation d'UPF1. En effet, le complexe SURF doit interagir avec l'EJC fixé en aval pour que la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 se produise. Le pont moléculaire entre les deux complexes se fait *via* UPF2, capable d'interagir à la fois avec UPF1 et UPF3. SURF et EJC réunis forment le complexe **DECID** (*Decay Inducing Complex*) (**Figure 29C**). C'est la formation de DECID qui permet la phosphorylation d'UPF1 et déclenche le processus de dégradation (Kashima *et al.*, 2006).

De façon intéressante, la protéine de la coiffe CBP80 semble avoir un rôle important dans la mise en place de DECID. En effet, il avait été mis évidence que CBP80 stimulait le NMD en augmentant l'interaction entre UPF1 et UPF2 (Hosoda *et al.*, 2005). Récemment, les travaux de Hwang *et al.* ont montré que CBP80 facilite la mise en place de DECID en deux étapes: d'abord CBP80 stimule l'association de SMG1-UPF1 avec eRF1-eRF3 pour former le complexe SURF au niveau du PTC, et ensuite CBP80 stimule l'interaction de SMG1-UPF1 dans SURF avec UPF2 dans l'EJC pour induire la phosphorylation de UPF1 (Hwang *et al.*, 2010 ; pour revue Schoenberg *and* Maquat., 2012).

4.2.3 Le cycle de phosphorylation/déphosphorylation d'UPF1 et la dégradation

La phosphorylation d'UPF1 entraîne la dégradation d'un ARNm contenant un PTC (Kashima *et al.*, 2006). A l'heure actuelle, la façon dont UPF1 phosphorylée induit le processus de dégradation n'est que partiellement expliquée. Il semble que la phosphorylation d'UPF1 induise un remodelage du complexe de surveillance et permette le recrutement des facteurs impliqués dans sa déphosphorylation et/ou accélérant la dégradation de l'ARNm non-sens. Dans ce sens, UPF1 non phosphorylée s'associe

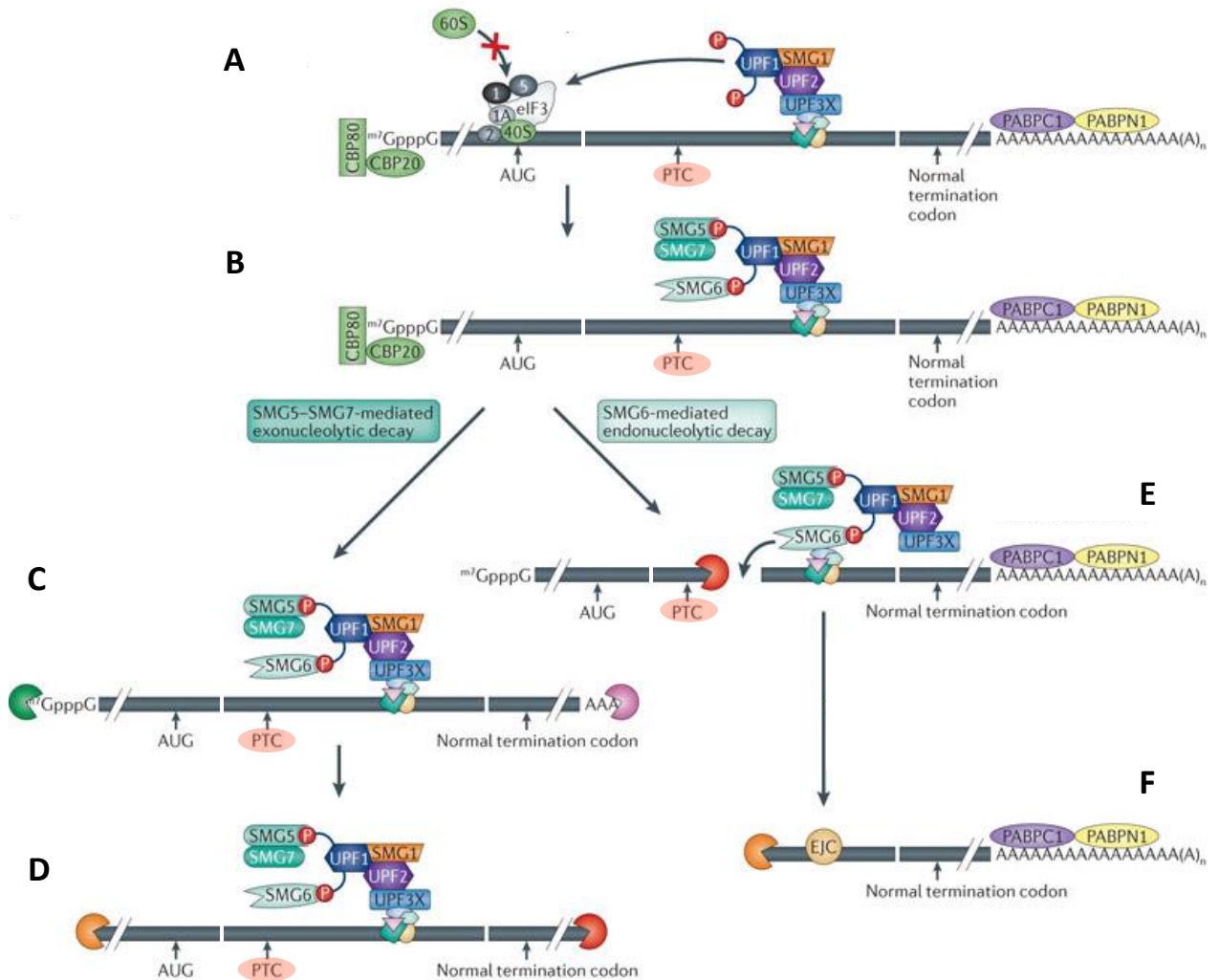


Figure 30 : La dégradation des transcrits contenant des PTC

A UPF1 phosphorylée inhibe la formation des ribosomes en se fixant sur eIF3

B La phosphorylation d'UPF1 permet le recrutement de SMG6 et du complexe SMG5-SMG7

C et D Le complexe SMG5-SMG7 induit la dégradation exonucléolytique de l'ARNm aberrant. La coiffe est éliminée par des enzymes de *decapping* et la queue polyA est éliminée par des enzymes de déadénylation.

E et F SMG6 entraîne un clivage endonucléolytique à proximité du PTC. L'ARNm aberrant est ensuite dégradé par des exonucléases (adapté de Schoenberg *and* Maquat, 2012).

préférentiellement avec UPF2, alors qu'UPF1 phosphorylée présente plus d'affinité avec le complexe SMG5-SMG7 et avec les enzymes de dégradation DCP1a, XRN1 et RRP4 (Ohnishi *et al.*, 2003; Schell *et al.*, 2003).

Une autre conséquence de la phosphorylation d'UPF1 est l'inhibition de la traduction des ARNm non-sens. En effet, UPF1 phosphorylée se fixe au facteur d'initiation de la traduction eIF3 et empêche ainsi la formation du ribosome. De cette façon, la détection d'un PTC dans un ARNm lors de la primo-lecture bloque les futurs cycles de traduction (**Figure 30A**) (Isken *et al.*, 2008).

Une fois phosphorylé, le facteur UPF1 peut interagir avec le complexe SMG5-SMG7 et avec SMG6, ce qui entraîne le recrutement de la phosphatase 2A (PP2A) responsable de sa déphosphorylation (**Figure 30B**) (Chiu *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2003). La déphosphorylation d'UPF1 est aussi cruciale dans le mécanisme du NMD. En effet, l'inhibition de l'interaction de SMG5 avec UPF1, soit par des mutants de SMG5, soit par la molécule inhibitrice NMDI1, entraîne l'accumulation d'UPF1 sous sa forme phosphorylée et inhibe le NMD (Ohnishi *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2007). Dans le complexe formé par SMG5 et SMG7, cette dernière pourrait être le lien entre le complexe de surveillance et la machinerie de dégradation. Il semble que SMG7 possède deux domaines fonctionnels : un domaine N-terminal nécessaire à l'interaction avec SMG5 et UPF1 phosphorylée et un domaine C-terminal impliqué dans l'interaction avec les composants de la machinerie de dégradation (Unterholzner *and* Izaurralde 2004). Alors que SMG5 et SMG7 agissent sous la forme d'un complexe, SMG6 semble quant à elle agir de façon plus indépendante (Chiu *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2003, Kashima *et al.*, 2010).

Ainsi, il existerait deux voies possibles pour la dégradation des ARNm après la phosphorylation d'UPF1 : (1) UPF1 phosphorylée serait fixée par SMG5-SMG7 ce qui conduirait au recrutement des enzymes de déadénylation et de *decapping* (élimination de la coiffe), telle que DCP2, et enfin à la dégradation de l'ARNm non-sens par les exonucléases 5'-3' (par exemple XRN1) et 3'-5' (*RNA exosome*) (**Figure 30C et D**); (2) UPF1 phosphorylée serait fixée par SMG6 ce qui induirait un clivage endonucléolytique à proximité du PTC et la dégradation des deux fragments par des exonucléases (**Figure 30E et F**) (Muhlrad *and* Parker, 1994; Mitchell *and* Tollervey, 2003; Yamashita *et al.*, 2005; Couttet *and* Grange, 2004; Unterholzner *and* Izaurralde, 2004; Kashima *et al.*, 2010; Eberle *et al.*, 2009b; pour revue Lejeune *et al.*, 2003). La déphosphorylation d'UPF1 semble être impliquée dans la

dissociation et le recyclage des protéines UPF et SMG (pour revues Chang *et al.*, 2007b ; Kerverstin et Jacobson, 2012)

4.2.4 La localisation du NMD dans la cellule

La localisation nucléaire ou cytoplasmique de la primo-lecture fait débat. Le NMD a-t-il lieu dans le noyau, le cytoplasme ou dans les deux compartiments ?

Au début des années 90, des études ont mis en évidence des taux réduits d'ARNm non-sens par rapport à leur équivalents normaux, non seulement dans la fraction cytoplasmique mais aussi dans la fraction nucléaire, ce qui suggérait que le NMD peut avoir lieu dans les deux compartiments cellulaires (pour revue Maquat, 1995). Cependant, l'existence du NMD dans le noyau semble paradoxale. Comme nous l'avons vu précédemment, le NMD dépend de la traduction qui est reconnue comme un processus cytoplasmique. De plus, ces observations semblent être une particularité des cellules de mammifères car dans les autres espèces étudiées, le NMD se cantonne à la fraction cytoplasmique. Pour expliquer les résultats observés, les deux modèles suivant ont été proposés.

Le modèle du « *scanning* nucléaire » repose sur l'existence d'un mécanisme de traduction nucléaire, où des pseudo-ribosomes nucléaires détecteraient les ARNm non-sens et induiraient un NMD intranucléaire (Wilkinson *and* Shyu, 2002). Cette hypothèse s'appuie sur les travaux d'Iborra *et al.* montrant que 5 à 10% de la synthèse protéique aurait lieu dans le noyau (Iborra *et al.*, 2001). Mais, il s'est avéré que ce taux de traduction nucléaire était largement surestimé par des contaminations d'origine cytoplasmique inhérentes au protocole de purification de ces deux compartiments. Il semblerait plutôt que la traduction nucléaire soit inférieure à 1% (Nathanson *et al.*, 2003).

Le modèle de « l'export co-traductionnel » suggérerait que le NMD a lieu dans le cytoplasme mais sur les ARNm non-sens qui sont en cours d'export. Les ribosomes du côté cytoplasmique de la membrane nucléaire engageraient la traduction des ARNm en transit à travers le pore nucléaire, de manière à ce que la reconnaissance du PTC se fasse lorsque l'ARNm est encore physiquement lié à la membrane nucléaire. Dans ce sens, les travaux de Singh *et al.* ont apporté la preuve que la reconnaissance des PTC se fait dans le cytoplasme (Singh *et al.*, 2007). Le blocage des interactions entre les protéines UPF par l'expression de

peptides ciblant ces protéines a pour conséquence l'inhibition du NMD, seulement lorsque ces peptides sont exprimés dans le cytoplasme. De plus, la rétention artificielle de UPF1 dans le noyau (en déplaçant UPF1 dans le cytoplasme et en surexprimant une forme de UPF1 fusionnée à un signal de rétention nucléaire) a pour effet d'inhiber le NMD. Ces résultats penchent donc en faveur d'un NMD cytoplasmique (Singh *et al.*, 2007). Cette année, le voile a définitivement été levé par les travaux du groupe de Maquat montrant en RNA FISH que le NMD a lieu très rapidement à la sortie du pore nucléaire lors de l'export de l'ARNm (Trcek *et al.*, 2013).

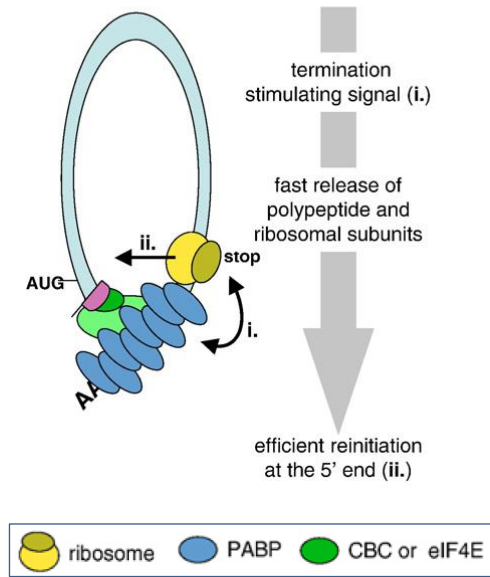
4.2.5 La règle des 50-55 nucléotides

Un codon de terminaison, qu'il soit prématuré ou physiologique, possède la même séquence de nucléotides (TGA, TAG ou TAA). Par conséquent, la distinction entre un signal physiologique de terminaison de la traduction et une interruption prématurée de la synthèse protéique repose sur d'autres mécanismes que la lecture stricte des séquences nucléotidiques. Dans ce sens, le NMD repose sur les interactions entre le complexe SURF et un EJC situé en aval. Ainsi, des ARNm qui contiennent un PTC dans le dernier exon ne constituent pas de bons substrats pour une dégradation par NMD.

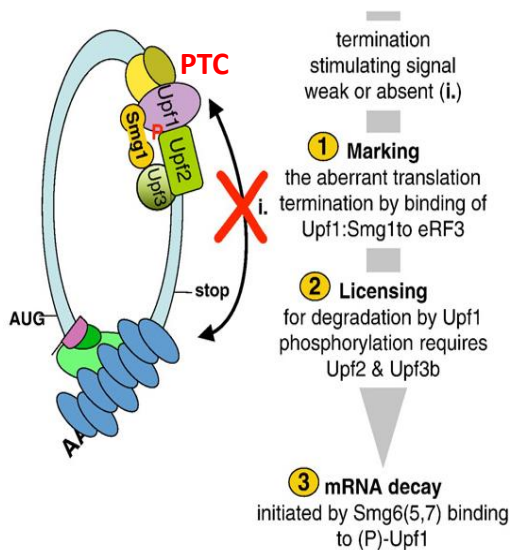
Les premières études menées sur les ARNm de la TPI ont montré que seuls les PTC situés suffisamment en amont de la dernière jonction exon-exon sont soumis au NMD (Daar *and* Maquat, 1988; Cheng *et al.*, 1990). Plus tard, il a été établi qu'un PTC doit être situé au minimum 50 nucléotides en amont du dernier intron pour déclencher la dégradation de l'ARNm de la TPI (Zhang *et al.*, 1998a). Des résultats similaires obtenus en étudiant le gène codant la β -globine humaine ont permis d'apporter un caractère général à ce paramètre de distance (Zhang *et al.*, 1998b). Sur la base de ces observations, la « règle des 50 à 55 nucléotides » a été établie et implique qu'un codon stop est reconnu comme un PTC s'il est localisé à plus de 50-55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon (Nagy *and* Maquat 1998). Ce postulat explique pourquoi les codons stop physiologiques situés dans le dernier exon ne déclenchent pas le NMD, et pourquoi les ARNm mono-exoniques y sont aussi insensibles (Maquat *and* Li, 2001; Brocke *et al.*, 2002).

Cependant, des ARNm porteurs d'un PTC situé à moins de 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon font exception et peuvent être dégradés par NMD.

A Terminaison au niveau du codon stop physiologique



B NMD EJC-Indépendant



C NMD EJC-dépendant

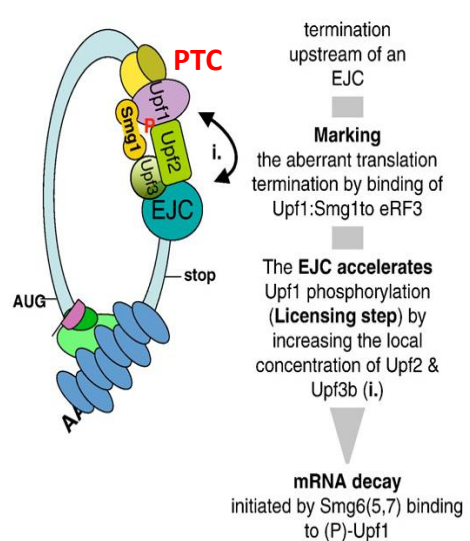


Figure 31: Comparaison entre NMD EJC-indépendant et NMD EJC-dépendant

A Lorsque le ribosome rencontre le codon stop physiologique, les protéines PABPC fixées au niveau de la queue polyA transmettent un signal de terminaison qui entraîne la dissociation du ribosome.

B Lors du NMD EJC-indépendant, la distance anormalement longue entre le PTC et la queue polyA ne permet pas aux protéines PABPC de transmettre le signal de terminaison. L'arrêt du ribosome sur le PTC permet le recrutement d'UPF1 et SMG1, puis d'UPF2 et UPF3. Une fois le complexe de surveillance mis en place, UPF1 est phosphorylée et la dégradation peut s'initier.

C Lors du NMD EJC-dépendant, la présence d'UPF2 et UPF3 fixées sur l'EJC (à proximité du PTC) accélère la mise en place du complexe de surveillance et la phosphorylation d'UPF1 (adapté de Mühlemann *et al.*, 2008).

C'est notamment le cas des transcrits Ig κ non productifs dans lesquels les PTC créés par des jonctions V κ -J κ hors phase se situent soit dans le dernier exon, soit trois nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon. Bien qu'ils ne respectent pas la règle de position, ces transcrits Ig κ non-sens sont néanmoins dégradés. Toutefois, leur dégradation s'avère nettement moins efficace que celle des transcrits qui respectent cette règle (Delpy *et al.*, 2004b ; Chemin *et al.*, 2010). Cette dégradation fait appel à un processus de NMD de « secours » indépendant de l'interaction SURF-EJC.

4.2.6 Le NMD EJC-indépendant

Un processus appelé NMD *failsafe* est capable d'induire la dégradation d'un ARNm non-sens lorsqu'il n'y a pas d'EJC fixé en aval du PTC. En effet, il a été montré que des transcrits contenant un PTC dans le dernier exon pouvaient être dégradés par NMD (Cheng *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1998b, Bühler *et al.*, 2006). Néanmoins, la fixation d'un EJC en aval du PTC, augmente considérablement l'efficacité de la dégradation de ces transcrits. Le mécanisme d'activation de ce NMD EJC-indépendant est encore méconnu. L'allongement de la partie 3'UTR d'un minigène Ig μ induit la reconnaissance du codon stop physiologique comme étant un PTC et déclenche la dégradation par NMD. Cela suggère que ce mécanisme est un vestige du mécanisme de faux 3'UTR décrit chez la levure (Bühler *et al.*, 2006 ; Eberle *et al.*, 2008). Chez la levure, c'est la distance anormalement longue entre un PTC et la queue polyA qui permet de déterminer que ce codon stop est prématuré (Amrani *et al.*, 2004 ; Rehwinkel *et al.*, 2006). Cela s'explique par le fait que la protéine PABP1 (PABPC chez les mammifères) ne peut plus interagir avec les facteurs de terminaison de la traduction. Le ribosome étant ainsi bloqué au niveau du PTC, le complexe de surveillance peut se mettre en place (Amrani *et al.*, 2004 et 2006).

Des données récentes ont révélé un lien étroit entre le NMD chez les mammifères et la protéine PABPC1. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la rencontre d'un codon stop physiologique par le ribosome entraîne le recrutement d'eRF1 et eRF3. La dissociation du ribosome est ensuite stimulée par les protéines PABPC fixées sur la queue polyA (**Figure 31**). De façon intéressante, le NMD EJC-dépendant peut être inhibé lorsque la distance entre le PTC et PABPC est raccourcie ou en fixant artificiellement PABPC en aval du PTC (Ivanov *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008). De plus, eRF3 est capable d'interagir

directement avec PABPC1 et avec UPF1 *in vitro* mais avec une affinité plus élevée pour PABPC que pour UPF1 (Singh *et al.*, 2008). Toutes ces données suggèrent que la fixation préférentielle de PABPC1 sur eRF3 empêche le recrutement d'UPF1 et la formation de SURF (Singh *et al.*, 2008 ; Peixeiro *et al.*, 2012).

Dans le cadre du NMD EJC-indépendant, la distance anormalement longue entre le PTC et la queue polyA ne permet pas à PABPC1 de transmettre son signal de terminaison laissant le temps au complexe SURF de se mettre en place (**Figure 31**). Par la suite, UPF1 peut recruter UPF2 et UPF3 et induire la dégradation. Par conséquent, l'EJC pourrait être considéré comme un *enhancer* du NMD en augmentant la concentration des protéines UPF2 et UPF3 à proximité des PTC et en favorisant ainsi la mise en place de DECID (pour revues Mühemann *et al.*, 2008 ; Schweingruber *et al.*, 2013).

4.3 LA DEGRADATION PAR NMD DES TRANSCRITS D'Ig NON-PRODUCTIFS

4.3.1 Le NMD et les IgH

De nombreuses études réalisées dans des lignées cellulaires et des hybridomes ont révélé la dégradation des transcrits IgH non productifs par NMD (Baumann *et al.*, 1985 ; Jäck *et al.*, 1989 ; Connor *et al.*, 1994 ; Bühler *et al.*, 2004). La première constatation d'une diminution du taux d'ARNm IgH contenant des PTC a été publiée en 1985 avant la découverte du mécanisme de NMD (Baumann *et al.*, 1985). Quelques années plus tard, une étude a montré que l'introduction de PTC au niveau des allèles IgH dans des lignées murines pré-B et plasmocytaires induit une diminution drastique des transcrits hors phase qui n'est pas due à un *silencing* de ces allèles non productifs (Jäck *et al.*, 1989). Ces données ont suggéré pour la première fois que les transcrits issus d'allèles IgH non-productifs pouvaient être très efficacement dégradés par NMD. Dans ce sens, la présence de PTC au niveau de l'exon VDJ des IgH entraîne une dégradation par NMD de ces ARNm hors phase qui est nettement plus forte que celles d'autres ARNm de mammifères (Bühler *et al.*, 2004 ; Gudikote and Wilkinson, 2002).

Cette dégradation très efficace des transcrits IgH non-sens peut s'expliquer car ils sont de très bons substrats de NMD. En effet, même si les réarrangements V(D)J génèrent des décalages du cadre de lecture, les PTC ne peuvent apparaître qu'au niveau de l'exon VDJ ou dans le premier exon codant le domaine constant (CH1). Par conséquent, ces PTC

respectent toujours la règle de position imposée par le NMD. De plus, il semble que des séquences présentes au sein de l'exon VDJ peuvent renforcer l'activité du processus de NMD (Bühler *et al.*, 2004).

4.3.2 Le NMD et les Ig κ

La dégradation par NMD des transcrits Ig κ non-productifs est nettement moins efficace que celle des transcrits IgH. Cette différence provient du fait que les PTC des transcrits Ig κ ne respectent pas la règle de position et que, selon toute vraisemblance, leur dégradation fait intervenir le NMD EJC-indépendant (Delpy *et al.*, 2004b). Les constructions mini-locus Ig κ nous ont permis de quantifier la dégradation par NMD de ces transcrits non-sens au cours du développement B et nous avons ainsi pu confirmer leur faible sensibilité au NMD. En revanche, cette étude a révélé une coopération efficace des différents processus de surveillance (NMUP, NAS et NMD) qui permet de réduire considérablement le taux d'ARNm Ig κ hors phase. Malgré une contribution individuelle faible, la coopération de ces trois mécanismes de surveillance permet une éradication de près de 60% des transcrits hors phases dans des précurseurs B, allant jusqu'à 90% dans les lignées plasmocytaires. Etant donné la capacité de sécrétion des plasmocytes, cette surveillance drastique permet de limiter considérablement la synthèse d'Ig tronquées (Chemin *et al.*, 2010)

4.3.3 Le NMD et le développement des lymphocytes B

Même si les transcrits d'Ig non-sens sont connus pour être soumis à une surveillance très marquée, peu d'études ont été réalisées dans un contexte physiologique. Pourtant, des travaux récents menés par l'équipe de Jäck ont montré que la présence de transcrit Ig μ non-sens ne pouvant être dégradés par NMD peut avoir de lourdes conséquences sur le développement B. L'accumulation de ces transcrits non-sens dans leurs modèles murins entraîne un blocage au stade pro-B. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que la dégradation par NMD pourrait participer au phénomène d'exclusion allélique dans la cellule pro-B et à l'induction des réarrangements sur le second allèle lorsque le premier aboutit à un VDJ non-productif (Lutz *et al.*, 2011). En parallèle, il a été montré que l'inhibition du NMD par l'expression d'un dominant négatif d'UPF1 induit également une accumulation de cellules pro-B (Frischmeyer-Gueirrerio *et al.*, 2011). L'importance du NMD a également été

démontrée dans un modèle murin présentant un KO conditionnel d'UPF2. Même si ces auteurs n'ont pas analysé en détail la lignée B, ils ont constaté que la réponse proliférative des cellules B était considérablement affectée par l'inactivation d'UPF2 alors que le taux de cellules B matures au repos n'était que très peu modifié (Weischenfeldt *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données met en lumière le fait qu'un défaut de surveillance des ARN peut avoir des conséquences physiologiques importantes au cours du développement B.

Les projets développés au laboratoire autour de cette thématique consistent à poursuivre l'identification des différents processus mis en jeu au cours de la surveillance des transcrits d'Ig et surtout, à quantifier leur contribution respective au cours du développement B. Parmi ces approches, mes travaux de thèse ont permis d'évaluer la surveillance des transcrits de chaînes lourdes d'Ig dans des cellules B isolées à partir de souris *knock-in* (IgH^{frV_k/+}) hébergeant des PTC au locus IgH (Partie 1 : Article 1). En collaboration avec Guillaume Chemin, j'ai étudié le phénomène de NAS et montré que la présence d'Ig κ tronquées produites à partir des transcrits alternatifs modifiait le répertoire Ig κ dans les plasmocytes (Partie 2 : Article 2 et résultats préliminaires). Enfin, j'ai étudié l'épissage des transcrits germinaux et apporté des précisions sur le rôle des sites donneurs d'épissage des exons I lors de la CSR (Partie 3 : résultats préliminaires).

RESULTATS

Partie 1 : Dialogue entre la transcription du locus IgH et les mécanismes de surveillance des ARN au cours du développement B

ARTICLE 1 :

Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development.

Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., & Delpy, L.

Molecular and Cellular Biology. 2012. Volume 32, pages 107–117.

Objectifs

Au début de ma thèse, nous avons évalué la surveillance des ARN de chaînes légères d'Ig κ et quantifié la contribution de chacun des mécanismes de surveillance : NMD, NAS et inhibition d'épissage (Chemin *et al.*, 2010 en Annexe 1). Afin d'étendre cette étude, nous avons analysé la transcription et la surveillance des ARN de chaînes lourdes d'Ig au cours du développement lymphocytaire B.

Méthodologie

A partir d'un modèle de souris *knock-in* hébergeant des PTC au locus IgH (IgH^{frV κ /wt}) (Delpy *et al.*, 2003 ; Reynaud *et al.*, 2005), nous avons analysé la transcription et la régulation post-transcriptionnelle des allèles VDJ- au cours de la maturation B. Nous avons trié par cytométrie en flux des populations B représentatives des différents stades de maturation B. L'accessibilité transcriptionnelle des allèles IgH a d'abord été analysée par PCR quantitative (qPCR) à l'aide de sondes spécifiques de chacun des allèles, après des CHIP anti-H3ac et anti-RNA Pol II. Ces qPCR allèle-spécifiques nous ont également permis de quantifier le taux de pré-ARNm issus des allèles productif et non-productifs. L'efficacité du NMD a été évaluée par Northern Blot et par RT-qPCR, après traitement des cellules au cycloheximide (CHX) ou à la wortmannine, deux inhibiteurs classiquement utilisés pour étudier le NMD. Afin de modéliser le lien entre l'activation des cellules B (et/ou la réponse proliférative) et l'efficacité des processus de surveillance des ARN, des LB marqués au CFSE puis stimulés au LPS pendant deux jours ont été triés par cytométrie en flux. L'activation des LB va entraîner

leur prolifération et va se traduire par une diminution de l'intensité de fluorescence (CFSE^{low}) comparativement aux cellules non divisées fortement marquées (CFSE^{high}).

Resultats

De nombreuses questions subsistaient concernant l'accessibilité transcriptionnelle des allèles IgH non-productifs (VDJ-). Cette étude a permis de montrer une transcription équivalente des allèles IgH VDJ+ et VDJ-. Nos données ont révélé un profil d'acétylation de l'histone H3 identique pour les deux allèles IgH indiquant la présence de marques d'une chromatine active au niveau de l'allèle hors phase. Nous avons également mis en évidence une accumulation spécifique des pré-ARNm VDJ- apparentée au phénomène de NMUP. De façon originale, nos résultats ont permis de montrer une corrélation inverse entre l'intensité de la transcription du locus IgH et l'efficacité du NMUP. En effet, les pré-ARNm VDJ- s'accumulent fortement dans les précurseurs B et les LB au repos présentant une faible transcription des allèles IgH alors qu'ils ne s'accumulent quasiment pas dans les LB stimulés au LPS et les plasmocytes dont la transcription des allèles IgH est nettement plus forte. Notre analyse du processus de NMD a révélé que cette dégradation permet une disparition quasi complète des ARNm issus des allèles VDJ- dans les cellules B activées. De plus, nous avons montré que l'efficacité du NMD était corrélée avec le taux d'épissage de ces ARNm non-sens.

En résumé, notre étude a permis de mettre en évidence une forte accessibilité transcriptionnelle des allèles exclus et une coopération efficace des processus de surveillance des ARNs (NMUP et de NMD) permettant d'éradiquer les ARNm issus des allèles VDJ- et d'éviter ainsi la synthèse d'Ig tronquées.

Partie 2 : Epissage alternatif des transcrits d'immunoglobulines non-productifs

ARTICLE 2 :

A truncated immunoglobulin exclusion checkpoint shapes the repertoire of terminally differentiated plasma cells

Chemin, G.*, Tinguely, A.*, (*Contribution équivalente) Srour, N., Lechouane, F., Péron, S., Sirac, C., Cogné, M., & Delpy, L.

Soumis

Objectifs

Les transcrits Ig κ sont composés de trois exons : L (leader), VJ κ (exon variable), C κ (exon constant). Des réarrangements hors phase induisent l'apparition de PTC au sein de l'exon VJ (V^{PTC}) ou de l'exon C κ (C^{PTC}). Dans une étude précédente, nous avons montré que l'activation du NAS entraîne l'élimination de l'exon VJ κ contenant le PTC par épissage alternatif et donne ainsi naissance à des transcrits alternatifs de type Leader-C κ (Chemin *et al.*, 2010). L'élimination de l'exon V^{PTC} au sein de ces transcrits alternatifs pourrait aboutir à la synthèse d'un domaine C κ potentiellement néfaste pour le LB. Ainsi, dans cette étude, nous avons analysé l'impact des Ig κ tronquées au cours du développement B et de la différenciation plasmocytaire.

Méthodologie

Nous avons utilisé différentes constructions plasmidiques mimant des réarrangements VJ κ 5 en phase (F pour fonctionnel) et hors phase entraînant l'apparition de PTC au sein de l'exon VJ κ (V^{PTC}) ou au sein de l'exon C κ (C^{PTC}). Pour que cette étude se rapproche du contexte physiologique, ces différents réarrangements ont été intégrés au sein d'un plasmide contenant une grande partie de la séquence du locus Ig κ . Ces constructions F, V^{PTC} et C^{PTC} ont été co-transfectées dans des lignées B matures et plasmocytaires. Les transcrits alternatifs L-C κ ont été détectés par RT-PCR et quantifiés par électrophorèse capillaire à l'aide d'un oligonucléotide fluorescent et du logiciel GeneMapper (Applied Biosystem). La production d'Ig tronquées suite à l'activation du NAS a été observée par

Western Blot ou par ELISA sur des lysats cellulaires ou des surnageants de culture des lignées plasmocytaires transfectées traitées ou non avec un inhibiteur du protéasome (MG132). La mortalité des lignées suite au traitement MG132 a été analysée par cytométrie en flux avec des marquages annexine V.

Chez la souris, nous avons ensuite analysé le répertoire Ig κ en se focalisant sur les jonctions VJ κ 5. Cette analyse a été réalisée par PCR sur l'ADN génomique à l'aide d'un oligonucléotide V κ consensus (sens) et d'un oligonucléotide antisens situé en aval de J κ 5. Cette étude a été réalisée sur des populations B isolées à partir de souris sauvages (C57BL/6) et de souris KI (DH-LMP2A) présentant une insertion du gène LMP2A au locus IgH (Casola *et al.*, 2004). Cette protéine du virus EBV est capable d'activer de façon constitutive les voies de signalisation situées en aval du BCR et permet un développement lymphocytaire indépendant de l'expression du BCR.

Resultats

Notre analyse dans les lignées transfectées avec les constructions V^{PTC} et C^{PTC} a révélé un fort taux de transcrits alternatifs L-C κ dans les lignées exprimant la construction V^{PTC}. En revanche, ces transcrits alternatifs sont quasiment indétectables dans les lignées exprimant la construction C^{PTC}. Ces données montrent que la position du PTC influence l'efficacité du NAS et plaident ainsi plutôt en faveur d'un NAS dépendant du cadre de lecture. De plus, la quantification de ces transcrits alternatifs a révélé une efficacité du processus de NAS nettement plus marquée dans la lignée plasmocytaire que dans la lignée B. Ces données soulignent la corrélation entre l'épissage alternatif et l'intensité de la transcription au locus IgH.

Nous avons également mis en évidence la présence de domaines C κ par WB dans les lignées exprimant le V^{PTC}. Par conséquent, la traduction des transcrits L-C κ entraîne la synthèse d'Ig κ tronquées. Par ailleurs, nous avons pu montrer que ces protéines tronquées sont dégradées par le protéasome. De façon intéressante, les lignées plasmocytaires exprimant la construction V^{PTC} présentent une apoptose très marquée après traitement par le MG132, et cette apoptose semble consécutive à un stress élevé du RE .

Chez la souris, notre analyse des jonctions VJ κ 5 a montré une disparition sélective des plasmocytes présentant des réarrangements non-productifs de type V^{PTC}. Cette contre

sélection s'effectue en deux étapes, la première est observée entre le stade pré-B et le stade B immature, soit après l'expression du BCR, tandis que la seconde plus drastique a lieu au cours de la différenciation plasmocytaire. A l'aide du modèle DH-LMP2A, nous avons également observé une disparition identique des plasmocytes hébergeant des réarrangements V^{PTC}. L'ensemble de ces données suggèrent un effet toxique des Igκ tronquées, indépendamment de l'expression des chaînes lourdes, au cours de la différenciation plasmocytaire.

En résumé nos données ont permis d'identifier un nouveau point de contrôle dans le développement lymphocytaire B : le *TIE checkpoint (Truncated-Ig exclusion checkpoint)*. Ce contrôle, dicté par les Ig tronquées, façonne le répertoire Igκ en contre-sélectionnant les plasmocytes transcrivant des allèles Igκ non-productifs sujets à un épissage alternatif. Cette toxicité des Igκ semble vraisemblablement due à un engorgement du RE.

Extrait de la lettre adressée à l'éditeur

This manuscript provides evidence for a new checkpoint during B cell development, able to sense the presence of truncated immunoglobulin (Ig). Indeed, our findings demonstrate that a selection control dedicated to truncated Ig exclusion ("TIE-checkpoint") shapes the repertoire of terminally differentiated plasma cells and counterselects those transcribing nonproductive Igκ alleles.

Background:

Although the error-prone V(D)J recombination process generates numerous out-of-frame V(D)J junctions, previous studies including ours have shown that the level of nonproductive Ig mRNAs is mainly controlled by the cooperative action of RNA surveillance pathways (i.e. splicing inhibition, nonsense-associated altered splicing: NAS, nonsense-mediated mRNA decay: NMD). Whereas NMD ensures efficient degradation of nonproductive Ig mRNAs and hence prevents the translation of truncated Ig, less is known about the production of truncated Ig domains upon alternative splicing of nonproductive Ig transcripts.

Description of the study and impact of new findings:

The current analysis addresses whether truncated Ig produced upon alternative splicing of nonproductive Ig transcripts exert any effect in B and plasma cells.

Using the Ig kappa (Igκ) light chain gene structure as a model composed of only the "Leader" (L), "Variable" (V) and "Constant" (C) exons, we provide evidence for efficient alternative

splicing that results in translation of truncated Ig κ chains in B lineage cells. Our findings demonstrate that, independently of the classical constraints related to Ag specificity, the presence of truncated Ig shapes the B cell repertoire by eliminating plasma cells expressing nonproductive Ig genes exposed to alternative splicing. In addition, we found that this novel TIE-checkpoint is mediated by endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis.

Many B lymphocytes harbour nonproductive V(D)J rearrangements of their Ig genes. We discovered that although production of the resulting aberrant Ig is partly avoided thanks to RNA surveillance, production of some truncated Ig still occurs and may then affect cell survival.

In addition, we also found that tumor plasma cells expressing truncated Ig were highly sensitive to proteasome inhibitor treatments. Being able to modulate ER stress, unfolded protein response (UPR) and proteasome activity is of considerable interest for multiple myeloma (MM) patients. Therefore, these findings should open new therapeutic strategies (for example by reinforcing the production of truncated Ig using NMD inhibitors or splicing modulators) to potentiate proteasome inhibitor treatments currently used in MM patients.

Finally, we believe that the TIE-checkpoint, even though it actively shapes the Ig repertoire, can be considered as a weakness in the immune system by mainly acting late in B cell differentiation. Indeed, this process allow some cells to participate in the costly process of Ag-driven selection and affinity maturation although they will finally not be able to reach the plasma cell compartment. Independently of any V region- based selection, the late TIE-checkpoint involves the sole presence of truncated Ig and is not due to a perturbation of BCR assembly that could sense a defective Ag response.

RESULTATS PRELIMINAIRES :

Etude *in vivo* du NAS des transcrits IgH non-productifs

Objectifs

Les résultats obtenus dans cette partie sont en lien avec les études présentées précédemment (articles 1 et 2 et annexe 1). Les travaux réalisés consistent à analyser comparativement l'efficacité du NAS dans les lymphocytes B primaires et les plasmocytes. Les observations présentées dans l'article 2 montrent une disparition des plasmocytes hébergeant un type particulier de réarrangements non-productifs au locus des Ig κ (réarrangements de classe V^{PTC}). A l'aide de lignées plasmocytaires, nous avons montré que l'épissage alternatif de transcrits V^{PTC} conduisait à la production d'Ig tronquées, et que le stress du RE provoqué par la présence de ces Ig tronquées augmentait l'apoptose des cellules traitées avec des inhibiteurs du protéasome. L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence un nouveau point de contrôle appelé *TIE-checkpoint* aboutissant à l'élimination des plasmocytes dès lors qu'ils expriment une Ig tronquée. Puisque l'activation du *TIE-checkpoint* conduit à une disparition quasi complète des plasmocytes hébergeant des réarrangements V^{PTC}, nous n'avons pas pu analyser le phénomène de NAS *in vivo*. Dans cette étude, nous avons donc réalisé un modèle permettant d'analyser le phénomène de NAS *in vivo* sans activer le *TIE-checkpoint*. Dans ce nouveau modèle, l'activation du NAS sur les transcrits d'Ig non-productifs n'entraîne pas l'apparition d'Ig tronquées.

Méthodologie

Nous avons réalisé ce nouveau modèle d'analyse du NAS *in vivo* par croisement des souris IgH^{frV κ} et DH-LMP2A, toutes deux présentant des insertions au sein du locus IgH. Chez les souris IgH^{frV κ /DH-LMP2A}, la maturation B et la différenciation plasmocytaire sont dictées par l'expression de la protéine LMP2A (Casola *et al.*, 2004 ; Lechouane *et al.*, 2013). L'allèle non-productif IgH^{frV κ} peut quant à lui subir librement des réarrangements VDJ et être exprimé durant tout le développement B (article 1). L'activation du NAS sur l'allèle IgH^{frV κ} peut conduire à l'élimination de l'exon additionnel *frameshift* (frV κ) et permettre l'expression d'une chaîne lourde normale lorsque le réarrangement VDJ respecte le cadre ouvert de

lecture (**Figure 1**). L'analyse du NAS a été réalisée sur des cellules B (B220+/CD138-) et des plasmocytes (B220-/CD138+) isolés de rate et triés par cytométrie en flux.

Au moyen de PCR semi-quantitative utilisant une amorce sens localisée dans le segment VH (VH7183) et une amorce anti-sens située dans l'exon CH1 μ (CmuR), nous avons analysé comparativement les transcrits alternatifs (*alt-mRNA*) dans les cellules B et les plasmocytes. Les produits de PCR ont ensuite été clonés et les jonctions VDJ analysées.

Résultats

L'analyse par PCR semi-quantitative des *alt-mRNA* nous a permis de constater que ces transcrits sont abondants dans les plasmocytes et quasi indétectables dans les cellules B (**Figure 2**).

L'analyse par séquençage des réarrangements VDJ impliqués, nous a permis d'identifier douze jonctions CDR3 différentes. Ces résultats, montrant une oligoclonalité des jonctions VDJ, indiquent que l'activation du NAS s'effectue dans la plupart des plasmocytes.

En conclusion de cette étude réalisée *in vivo*, nous avons pu montrer pour la première fois que l'activation du NAS sur les transcrits d'Ig non-productifs est beaucoup plus marquée dans les plasmocytes que dans les cellules B. En accord avec ces résultats et avec une traduction active des transcrits ayant subi le NAS, nous avons trouvé des quantités importantes d'IgM dans le sérum des souris IgH^{frVk/DH-LMP2A} (environ 15 μ g/ml).

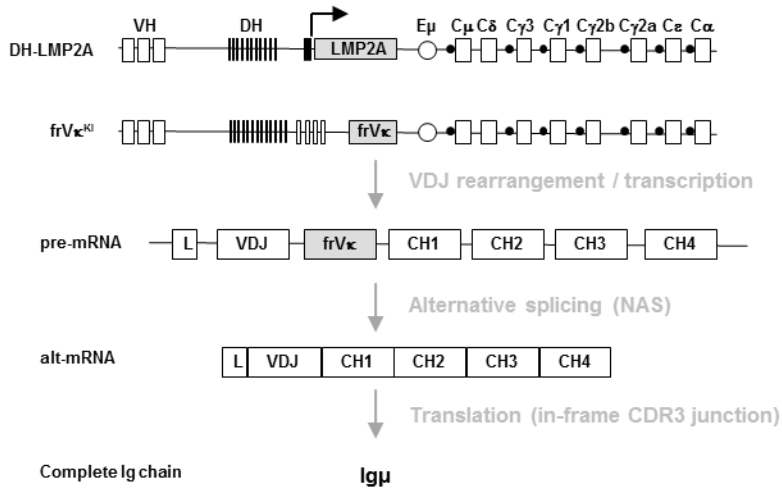


Figure 1 : Activation du NAS dans le modèle murin IgH^{frV κ /DH-LMP2A}

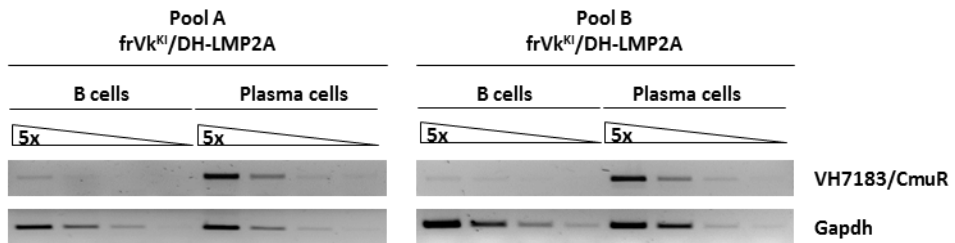


Figure 2 : Mise en évidence du NAS dans les plasmocytes

Partie 3 : Les sites donneurs d'épissage des exons I influencent la transcription germinale des régions switch.

RESULTATS PRELIMINAIRES :

Etude du rôle des sites donneurs d'épissage des exons I lors de la CSR

Objectifs

La transcription germinale des régions S est un préalable nécessaire à la CSR. Pour autant, cette transcription n'est pas à elle seule suffisante pour que la CSR soit optimale (Bottaro *et al.*, 1994). En effet, les travaux du groupe de Radbruch sont venus étayer ces observations et ont démontré que la maturation des transcrits germinaux est un pré-requis indispensable à la CSR. Ces travaux ont démontré que l'épissage des transcrits pré-switch (I γ -C α) a un rôle crucial dans ce processus. Par recombinaison homologue, ces auteurs ont créé deux modèles murins dans lesquels l'ensemble promoteur I γ 1/exon I γ 1 a été remplacé par le promoteur de la méthallothionéine II humaine (hMT pour *human Methallothionein*) avec ou sans conservation du site donneur d'épissage de l'exon I γ 1 (modèles murins s-hMT et hMT respectivement) (**Figure 1**). Ils ont ainsi pu montrer qu'une stimulation des cellules B induit la CSR à IgG1 uniquement lorsque le site donneur d'épissage est présent (s-hMT) et ce malgré la transcription de la région S γ 1 dans le modèle dépourvu de site d'épissage (hMT) (Lorenz *et al.*, 1995 ; Hein *et al.*, 1998). Par des approches indirectes, d'autres études ont confirmé le rôle clé de l'épissage des transcrits pré-switch dans la CSR (Qiu *et al.*, 1999 ; Kuzin *et al.*, 2000 ; Samara *et al.*, 2006). Bien que des travaux récents tendent vers une implication de la machinerie d'épissage dans le recrutement d'AID au niveau des régions S, le rôle de cette maturation des ARN dans la CSR reste encore méconnu (Conticello *et al.*, 2008 ; Nowak *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été démontré que la présence d'un site donneur d'épissage à proximité d'un promoteur facilite le recrutement du complexe d'initiation de la transcription et ainsi augmente le taux de transcription (Furger *et al.*, 2002 ; Damgaard *et al.*, 2008). Sachant que les exons I sont de courts exons, leur site donneur d'épissage est positionné à proximité du promoteur I. Nous avons alors émis l'hypothèse que le rôle potentiel des sites donneurs d'épissage des exons I au cours de la CSR serait d'augmenter la transcription germinale et l'accessibilité à AID des régions S.

Méthodologie

Pour réaliser la suite de notre étude nous avons utilisé les modèles hMT et s-hMT créés par Lorenz et *al.* ainsi que des animaux sauvages (*Wt*) de génotype C57BL/6 (Lorenz et *al.*, 1995). Toutes les expériences ont été réalisées avec des souris homozygotes. Afin d'analyser la transcription germinale qui précède la CSR dans ces animaux, nous avons stimulé *in vitro* des lymphocytes isolés de la rate après centrifugation sur une solution de Ficoll. Les lymphocytes *Wt* ont été stimulés avec du LPS seul pour induire la CSR vers IgG3 et IgG2b ou en présence d'IL4 pour induire la CSR vers IgG1 et IgE. Le promoteur hMT étant inductible au LPS, la stimulation des lymphocytes hMT et s-hMT avec ce mitogène est suffisante pour induire une commutation vers l'isotype IgG1.

Après 48h de stimulation, nous avons quantifié la transcription germinale qui précède la CSR vers IgG1. Pour ce faire, il est classiquement réalisé une quantification des transcrits germinaux pré-switch $I\gamma 1-C\gamma 1$. Comme le modèle hMT présente un défaut d'épissage nous avons quantifié les transcrits primaires pré-switch (pGLT pour *primary Germline Transcript*). Cette quantification a été réalisée par RT-qPCR à l'aide d'oligonucléotides localisés entre la région $S\gamma 1$ et le site donneur d'épissage de l'exon $I\gamma 1$, (communs chez tous les animaux utilisés). Nous avons également amplifié, cloné et séquencé une partie de la région $S\gamma 1$ (environ 1200 pb) pour évaluer la présence de mutations induites par AID au sein de cette dernière.

Après 60h de stimulation, nous avons analysé l'accessibilité transcriptionnelle et chromatinienne de la région $S\gamma 1$ par CHIP anti-RNA Pol II et anti-H3ac respectivement. Peu de CSR est détectable à ce temps précoce de stimulation mais la transcription germinale est maximale.

Après 96h de stimulation et à l'aide de PCR semi quantitative nous avons quantifié le taux de transcrits post-switch $I\mu-C\gamma 1$ et $I\mu-C\gamma 2$ afin de mesurer indirectement l'efficacité de la CSR vers IgG1 et IgG2b dans les modèles hMT et s-hMT. Par RT-qPCR nous avons aussi évalué l'activation d'AID dans ces deux modèles.

Résultats

Dans un premier temps nous avons calculé *in silico* l'efficacité des sites donneurs d'épissage des exons I et des exons CH1 (Table 1). Nous montrons que les sites donneurs d'épissage des exons I sont aussi efficaces que ceux des exons CH1, ce qui semble confirmer le rôle important de l'épissage des exons I dans la CSR.

Dans le but de contrôler les défauts de CSR vers IgG1 observés par Lorenz et *al.* dans le modèle hMT et valider la suite de notre étude, nous avons quantifié par RT-PCR le taux de transcrits post-switch après 96h de stimulation au LPS (**Figure 2**). Comme attendu, les transcrits $I\mu$ -C γ 1 sont très abondants dans le modèle s-hMT alors qu'ils sont quasiment indétectables dans le modèle hMT. Ces résultats confirment que la CSR vers IgG1 est induite uniquement lorsque le site donneur d'épissage de l'exon I γ 1 est présent. En revanche, les transcrits post switch $I\mu$ -C γ 2b sont aisément détectables dans les deux modèles, et à des taux équivalents, révélant une CSR vers IgG2 efficace dans le modèle hMT. Ainsi, ces résultats démontrent que l'abolition quasi-totale de la CSR vers IgG1 dans le modèle hMT n'est pas due à une déficience plus générale de la machinerie de recombinaison.

Après validation du modèle, nous avons analysé l'activation de la transcription germinale qui précède la CSR. Pour ce faire, nous avons quantifié par RT-qPCR le taux de pGLT produits par les lymphocytes après 48h de stimulation (**Figure 3A**). En accord avec une activation de la CSR vers IgG1, nous observons une augmentation drastique du taux de pGLT lorsque les lymphocytes issus d'animaux *Wt* sont stimulés en présence de LPS et d'IL4 comparativement à la stimulation avec le LPS seul. Ces données validant notre méthode d'analyse de la transcription germinale, nous avons ensuite quantifié les pGLT dans les lymphocytes issus d'animaux homozygotes hMT et s-hMT. Nous observons des taux comparables de pGLT chez les lymphocytes issus de souris s-hMT stimulés en présence de LPS et les lymphocytes issus de souris *Wt* stimulés en présence de LPS + IL4. Nous démontrons ainsi que l'activation de la transcription germinale en présence de LPS dans le modèle s-hMT est quasiment aussi efficace que celle observée pour les animaux *Wt* en condition classique de stimulation. De façon intéressante, le taux de pGLT observé pour les lymphocytes issus d'animaux s-hMT stimulés en présence de LPS ou de LPS + IL4 est huit fois plus élevé que celui observé pour les lymphocytes issus d'animaux hMT dans les mêmes conditions de stimulation. Ces résultats suggèrent que la transcription germinale est altérée lorsque le site donneur d'épissage est absent. Ainsi, le site donneur d'épissage de I γ 1 semble

avoir un rôle sur l'intensité de transcription et par conséquent sur l'accessibilité à AID de la région $S\gamma 1$.

Bien que non significative, nous observons également une faible augmentation (facteur 2) du taux de pGLT dans les lymphocytes issus de souris hMT stimulés au LPS comparativement à celui observé pour les lymphocytes issus de souris Wt dans ces conditions de stimulation. Cette légère différence pourrait expliquer le peu de CSR vers IgG1 observée dans le modèle hMT (**Figure 2**). Par ailleurs, l'ajout d'IL4 ne semble pas avoir d'effet sur la transcription initiée par le promoteur hMT puisque les taux de pGLT détectés après stimulation des lymphocytes issus d'animaux hMT ou s-hMT au LPS+IL4 sont similaires à ceux observés pour les lymphocytes des mêmes souris stimulés en présence de LPS seul.

Afin de conforter ces observations, nous avons réalisé des CHIP anti RNA-Pol II sur des lymphocytes hMT et s-hMT stimulés pendant 60h en présence de LPS (**Figure 3B**). A l'aide de cinq qPCR distinctes nous avons pu analyser la fixation de la RNA Pol II sur tout le locus $I\gamma 1$ ainsi que sur le promoteur hMT. En accord avec notre quantification des pGLT, les lymphocytes issus de souris s-hMT présentent un enrichissement en RNA Pol II d'environ un facteur 3 sur tout le locus $I\gamma 1$ ainsi que sur le promoteur hMT comparativement aux lymphocytes issus de souris hMT. Cette forte tendance confirme l'influence du site donneur d'épissage de l'exon $I\gamma 1$ sur la transcription initiée par le promoteur hMT.

Nous nous sommes également intéressés à l'accessibilité de la région $S\gamma 1$ et nous avons réalisé des CHIP anti-H3ac (**Figure 4A**). Nos résultats montrent que le promoteur hMT des souris s-hMT présente un profil d'acétylation de l'histone H3 environ trois fois plus fort que celui observé avec les souris hMT. Dans le modèle s-hMT nous observons une augmentation significative du niveau d'acétylation de l'histone H3 en amont de la région $S\gamma 1$ (Sg1U) comparativement à celui observé au niveau du promoteur. De façon intéressante, cette augmentation du profil d'acétylation spécifiquement en aval du site d'épissage n'est pas retrouvée dans le modèle hMT. Nos résultats révèlent également une chute du profil d'acétylation de l'histone H3 en aval de la région $S\gamma 1$ dans les deux modèles, mais cette marque d'acétylation reste environ trois fois plus forte dans les souris s-hMT que dans les souris hMT. L'ensemble de nos données suggère que la présence du site donneur d'épissage vraisemblablement par son action sur la transcription germinale permet d'augmenter l'accessibilité du locus $\gamma 1$. Par ailleurs, l'augmentation de l'acétylation de l'histone H3 en

amont de la région $S\gamma 1$ dans le modèle hMT semble indiquer un rôle plus spécifique du site donneur d'épissage et/ou de la machinerie d'épissage dans la mise en place de ces marques à cet endroit précis.

Nous avons ensuite voulu vérifier si cette accessibilité transcriptionnelle et chromatinienne accrue de la région $S\gamma 1$ s'accompagnait d'un meilleur ciblage par AID. Nous avons analysé la présence de mutations introduites par AID au sein de la région $S\gamma 1$ après 48h de stimulation au LPS (**Figure 4B**). Cette analyse a été réalisée pour des animaux hMT, s-hMT ainsi que sur des cellules *Wt* stimulées au LPS en tant que contrôle négatif. Comme attendu au vu du défaut de CSR vers IgG1 dans les animaux hMT, nous détectons un pourcentage de séquences mutées similaire à celui observé dans les animaux *Wt* (hMT : 1.64 % et *Wt* : 2,63%). En revanche, les souris s-hMT présentent un plus grand pourcentage de séquences mutées (s-hMT : 11,1 %) démontrant un meilleur ciblage d'AID au niveau de la région $S\gamma 1$ quand le site donneur d'épissage est présent. En outre, nous avons montré que le défaut de ciblage d'AID n'était pas dû à un défaut d'expression d'AID dans le modèle hMT (**Figure 4C**). Il est à noter que la seule séquence mutée obtenue dans le modèle hMT (**Figure 4B**) présente un grand nombre de mutations indiquant vraisemblablement de multiples tentatives d'attaque par AID sur une quantité limitée de substrat.

Comme nous détectons un peu de CSR vers IgG1 dans les souris hMT. Nous avons voulu vérifier si les transcrits germinaux initiés par le promoteur hMT dans ce modèle dépourvue du site donneur d'épissage ne pouvaient pas activer un site cryptique d'épissage situé en aval (**Figure 5**). Nous avons donc quantifié par RT-qPCR la présence de transcrits pré-switch épissés de type $I\gamma 1$ - $C\gamma 1$, en utilisant un oligonucléotide sens situé dans l'exon hMT (HMT For) et un oligonucléotide antisens situé dans l'exon CH1 du gène $\gamma 1$ ($C\gamma 1R$). Dans le modèle s-hMT nous détectons la présence d'abondants transcrits pré-switch hMT- $C\gamma 1$ présentant un épissage au niveau du site donneur de l'exon $I\gamma 1$ sur l'exon CH1. Dans le modèle hMT nous arrivons à détecter un taux très faible de transcrits hMT- $C\gamma 1$ plus grand utilisant un site cryptique d'épissage situé environ 250 pb en aval du site donneur de l'exon $I\gamma 1$. La présence de ces transcrits germinaux présentant un épissage au niveau d'un site cryptique pourrait expliquer le taux très faible de CSR vers IgG1 observé dans le modèle hMT (**Figure 2**).

Discussion

Cette thématique étant un peu éloignée des travaux sur la surveillance des ARN présentés précédemment, nous avons préféré intégrer ci-après la discussion de ces travaux.

Les modèles hMT et s-hMT ont été élaborés il y a près de vingt ans par l'équipe de Radbruck. A l'aide de ces modèles, ces auteurs ont émis l'hypothèse que l'épissage des transcrits germinaux a un rôle crucial dans la CSR (Lorenz *et al.*, 1995, Hein *et al.*, 1998). Bien que plusieurs études aient confirmé cette relation entre l'épissage et la CSR, les mécanismes sous-jacents sont restés peu étudiés (Qiu *et al.*, 1999 ; Kuzin *et al.*, 2000 ; Samara *et al.*, 2006 ; Conticello *et al.*, 2008 ; Nowak *et al.*, 2011). Dans le but d'apporter des précisions, nous avons analysé l'accessibilité transcriptionnelle de la région S γ 1 dans les modèles murins hMT et s-hMT. De façon originale, notre étude a mis en évidence un rôle encore inexploré du site donneur d'épissage des exons I dans le processus de CSR. En effet, nous avons démontré que la présence du site donneur d'épissage de I γ 1 à proximité du promoteur hMT permet d'augmenter l'intensité de la transcription germinale de la région S γ 1 et ainsi son accessibilité à AID.

De nombreuses études ont révélé un lien entre la transcription germinale lors de la CSR et la mise en place de marques de chromatine active au niveau des régions S. Dans ce sens, la déficience pour le facteur PTIP, qui a un rôle crucial dans l'initiation de la transcription germinale, est associée à une réduction drastique des marques H3K4me3 et H3Ac au niveau des régions S (Daniel *et al.*, 2010 ; Schwab *et al.*, 2011). Par ailleurs, le groupe de Kenter a démontré une présence accrue des marques H3Ac, H4Ac, H3K4me3 au niveau des régions S uniquement lorsqu'elles sont transcrites (Wang *et al.*, 2006 et 2009). De plus, ces auteurs ont montré une corrélation entre la présence de ces marques et la fixation de la RNA Pol II ser5-P suggérant un lien entre la pause de la RNA Pol II et le remodelage chromatinien. En accord avec ces observations, nos travaux montrent que le profil d'acétylation de l'histone H3 au niveau de la région S γ 1 est corrélé à l'intensité de la transcription germinale. En effet, la présence de cette marque est nettement plus marquée dans le modèle s-hMT que dans le modèle hMT dont la transcription germinale est beaucoup plus faible. Afin de confirmer l'augmentation de la transcription germinale observée en présence du site donneur d'épissage, nous prévoyons également de quantifier par CHIP le recrutement de facteurs d'initiation de la transcription (TFIIH, TFIIIB, TBP) au promoteur hMT.

Nous avons également démontré une accumulation spécifique de marques H3ac en aval du site d'épissage dans le modèle s-hMT. N'ayant pas observé un tel enrichissement dans le modèle hMT, nos données semblent indiquer que cette acétylation préférentielle, indicatrice d'une très grande accessibilité, est la conséquence de la reconnaissance du site donneur d'épissage de l'exon I. Par conséquent, la présence de la région *Sy1* n'est pas suffisante à une ouverture optimale de la chromatine. Ces données suggèrent que la rencontre du site donneur d'épissage et la mise en place du spliceosome entraîne une pause de la RNA Pol II comme cela a pu être observé chez la levure au niveau du site accepteur d'épissage (Alexander *et al.*, 2010). Dans ce sens, le facteur Spt5 qui permet le recrutement d'AID sur la RNA Pol II en pause interagit avec des facteurs impliqués dans la maturation des ARN dont des facteurs d'épissage (pour revue Kenter *et al.*, 2012). En accord avec nos données, il a été récemment démontré une accumulation de RNA Pol II ser5-P en aval de μ dans des souris déficientes pour les séquences répétées en tandem de la région $S\mu$ ($S\mu\text{TR}^{-/-}$) (Luby *et al.*, 2001 ; Balter *et al.*, 2012). Par conséquent, la pause de la RNA Pol II observée par ces auteurs n'est pas due à la présence de la région $S\mu$. De façon intéressante, la région entre μ et le cœur de la région $S\mu$ contient deux sites donneurs d'épissage cryptiques qui sont utilisés lorsque le site donneur de μ est muté (Kuzin *et al.*, 2000). Bien que les données de Balter *et al.* semblent corroborer notre hypothèse, l'accumulation de RNA Pol II observée par ces auteurs n'a pas été détectée dans un modèle de délétion plus important de la région $S\mu$ ($S\mu^{\Delta/\Delta}$) dépourvu de sites cryptiques d'épissage mais conservant le site donneur de μ (Khamlichi *et al.*, 2004 ; Rajagopal *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données souligne l'importance du dialogue entre la RNA pol II, les facteurs recrutés par le site donneur d'épissage des exons I et la région S. Nous souhaitons poursuivre ces travaux en analysant le recrutement de la RNA Pol II ser5-P dans les modèles hMT et s-hMT.

Par ailleurs, dans le modèle hMT, nous détectons une très faible quantité de transcrits pré-switch HMT-C γ 1 utilisant un site cryptique d'épissage localisé en aval du site donneur de γ 1. La présence de ces rares transcrits pourrait expliquer le taux résiduel de CSR vers IgG1 observé chez ces animaux. Ces données sont en accord avec les travaux de Kuzin *et al.* démontrant que la mutation du site du site donneur d'épissage de μ active des sites cryptiques et permet une CSR efficace (Kuzin *et al.*, 2000). De même, l'insertion du gène *neo^f* en aval de l'exon γ 3 active des sites cryptiques d'épissage permettant un taux partiel de CSR vers cet isotype (Samara *et al.*, 2006). En outre CTNNB1, un composant du spliceosome, et

PTBP2, un facteur régulateur d'épissage, ont également été impliqués dans la CSR. Ainsi, une fonction cruciale des sites donneurs d'épissage des exons I serait de recruter le spliceosome et que ce dernier pourrait aussi être nécessaire au ciblage d'AID (Conticello *et al.*, 2008 ; Nowak *et al.*, 2011).

Pour conclure, nous proposons un modèle dans lequel l'épissage des exons I lors de la CSR aurait un double rôle : (1) la présence du site donneur d'épissage d'un exon I à proximité du promoteur I permettrait d'augmenter la transcription germinale initiée par ce dernier ; (2) il pourrait induire une pause de la RNA Pol II suite au recrutement et à la mise en place de la machinerie d'épissage. Cette pause pourrait ainsi faciliter le recrutement d'AID via Spt5. De plus, le recrutement du spliceosome pourrait aussi faciliter l'interaction entre AID et les facteurs CTNNBL1 et PTBP2 et stabiliser AID au niveau de son substrat.

Au final, ces données nous éclairent sur le rôle des sites donneurs d'épissage des exons I au cours de la CSR. De façon inattendue, elles suggèrent également que la proximité entre le site donneur d'épissage de l'exon I et son promoteur permet de moduler l'intensité de la transcription de la région S, et par conséquent son accessibilité à AID.

Table 1 : Donor splice-sites of I-exons and CH1-exons

Ig isotype	I -exon		CH1-exon	
	Donor site	Donor site score	Donor site	Donor Site score
IgM	ATG G TAA G C	91,29	CAG G TAA G A	100,84
IgG3	AAG G TGAG T	100,77	TCG G TGAG A	81,58
IgG1	GCG G TAA G T	93,64	TTG G TGAG A	82,2
IgG2b	AGAG T AA G C	78,21	TTG G TGAG A	82,2
IgG2a	AGAG T AA G C	78,21	TTG G TGAG G	82,43
	AGG G TAA G G	91,16		
	CAG G TAT G G	90,48		
IgE	CAG G TAT T A	77,3	TAG G TAA G T	102,08
IgA	CAG G TGG G T	90,41	CTG G TAA A G	79,26
	GAG G CA A G G	80,08		
	AAG G TAG G C	89,59		
Average ± SD		87,38 ± 7,71		87,23 ± 9,79

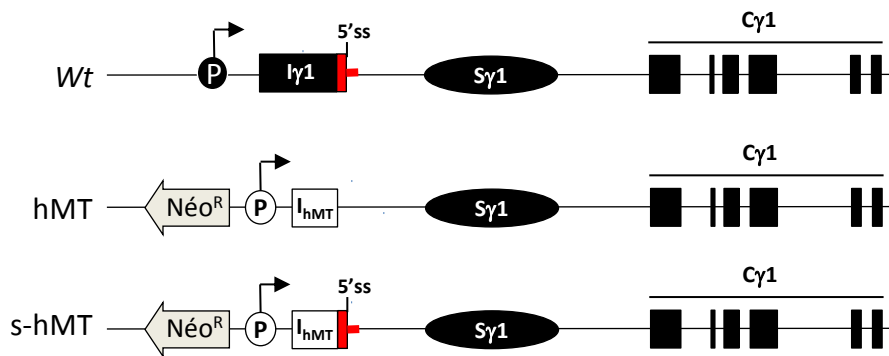


Figure 1: Représentation schématique du locus $I\gamma 1$ dans les modèles murins hMT et s-hMT

Les éléments blancs sont les segments géniques spécifiques aux modèles hMT et s-hMT et ne sont pas retrouvés dans les animaux *Wt*. Les éléments noirs représentent les segments géniques du locus $\gamma 1$ *Wt*. Le fragment rouge correspond à la séquence de l'exon $I\gamma 1$ contenant le site donneur d'épissage ($5'SS$ pour $5'$ splice site) conservé dans le modèle s-hMT et absente dans le modèle hMT.

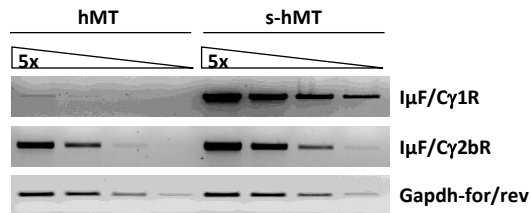
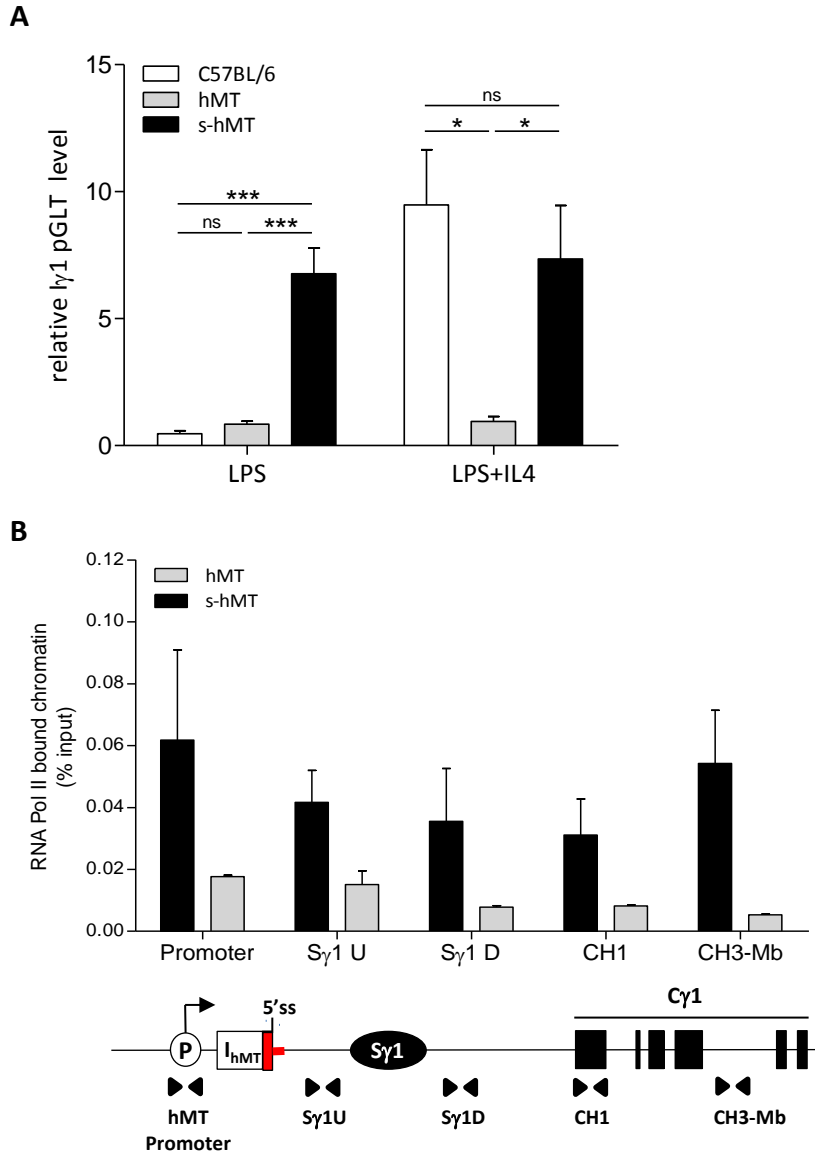


Figure 2: Analyse de la CSR dans les modèles hMT et s-hMT

Les RT-PCR ont été réalisées sur des ARN totaux extraits de lymphocytes isolés de rate provenant d'animaux homozygotes hMT et s-hMT. Ces lymphocytes ont été stimulés *in vitro* au LPS pendant 4 jours. Les PCR ont été réalisées en conditions semi-quantitatives à partir de dilution en série d'ADNc d'un facteur 5. Les couples d'oligonucléotides I μ F/C γ 1R et I μ F/C γ 2bR amplifient respectivement les transcrits post switch I μ -C γ 1 et I μ -C γ 2b. L'amplification des transcrits de la Gapdh a été utilisée pour la normalisation.



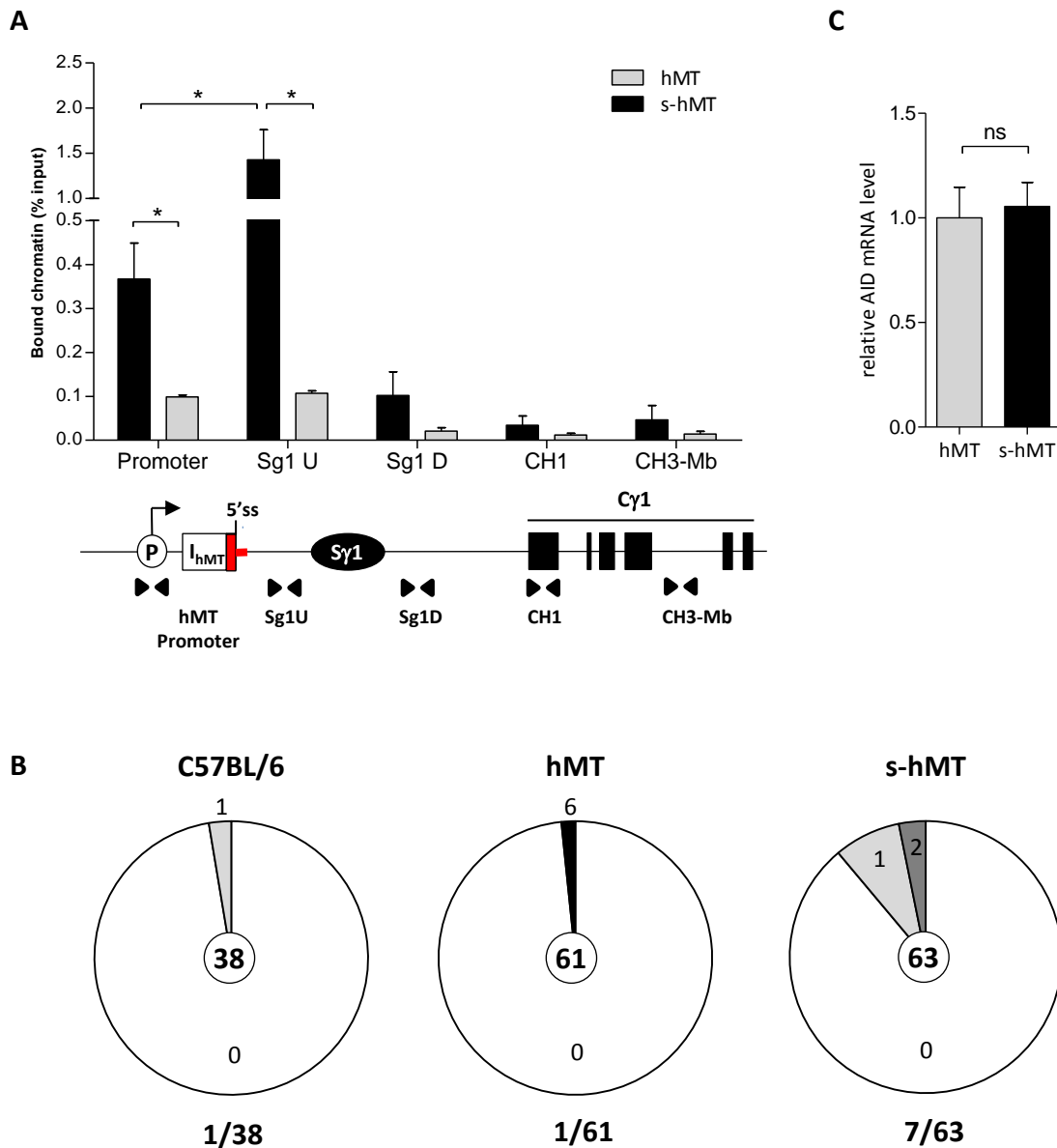


Figure 4: L'accessibilité de la région Sg1 est influencée par la présence du site donneur d'épissage de l'exon $\gamma 1$
A Analyse par CHIP de l'acétylation de l'histone H3 (H3ac) au locus $\gamma 1$. Les CHIP ont été réalisées sur des lymphocytes provenant de souris hMT et s-hMT stimulés au LPS pendant 60h. Les histogrammes représentent l'enrichissement relatif en H3ac exprimé en % d'input. La position des couples d'oligonucléotides (triangles) utilisés pour les qPCR est décrites sur le schéma représentatif du locus $\gamma 1$ dans le modèle s-hMT. Les graphiques montrent les résultats obtenus pour 3 expériences indépendantes. (* $p < 0,05$) **B** Analyse de la fréquence de SHM induites par AID au sein de la région Sg1 dans des lymphocytes issus d'animaux hMT, s-hMT et Wt stimulés au LPS pendant 48h. Le nombre total de séquences est indiqué dans les cercles au centre des camemberts. Le nombre de mutations par séquences analysées est indiqué dans chaque portion. Les animaux Wt servent de contrôle négatif. Le nombre de séquences mutées /nombre total de séquences analysées est inscrit en dessous des camemberts.
C Analyse en RT-qPCR de l'expression d'AID dans des lymphocytes provenant des souris hMT et s-hMT stimulés au LPS pendant 48. L'expression d'AID a été normalisée par rapport à l'expression de la Gapdh et comparée selon la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'expression d'AID dans les lymphocytes provenant des souris hMT a été normalisée 1. Les résultats représentent 4 expériences indépendantes.

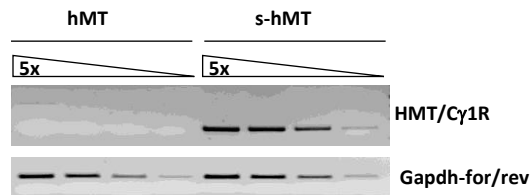


Figure 5: Utilisation d'un site cryptique d'épissage dans le modèle hMT

Les RT-PCR ont été réalisées sur des ARN totaux extraits de lymphocytes isolés de rate provenant d'animaux homozygotes hMT et s-hMT. Ces lymphocytes ont été stimulés *in vitro* au LPS pendant 2 jours. Les PCR ont été réalisées en conditions semi-quantitatives à partir de dilution en série d'ADNc d'un facteur 5. Le couple d'oligonucléotides HMT/Cγ1R permet d'amplifier les transcrits pré-switch qui présentent un épissage de l'exon hMT sur l'exon CH1γ1. L'amplification des transcrits de la Gapdh a été utilisée pour la normalisation.

***DISCUSSION
& PERSPECTIVES***

1 LA TRANSCRIPTION BI-ALLELIQUE AU LOCUS IgH

Chaque LB exprime une Ig unique, ce qui implique que pour chaque composant des chaînes d'Ig (IgH et IgL) ne soit exprimé qu'un seul allèle. Pour autant, près de la moitié des LB présente des réarrangements bi-alléliques. Afin d'expliquer cette expression mono-allélique, les travaux de Skok *et al.* ont montré que les allèles d'Ig réarrangés de façon non-productive (VDJ- au locus IgH et VJ- au loci IgL) peuvent être recrutés au niveau de la PCH et ainsi être placés sous silence au niveau transcriptionnel (Skok *et al.*, 2001 ; Roldan *et al.*, 2005). Cependant, plusieurs études ont révélé une transcription active des allèles exclus, invalidant ainsi l'hypothèse d'un *silencing* des allèles exclus (Delpy *et al.*, 2004a et 2004b ; Daly *et al.*, 2007 ; Eberle *et al.*, 2009a).

Afin de lever les doutes sur ces résultats contradictoires concernant le *silencing* des allèles exclus, nous avons analysé la transcription et la régulation post-transcriptionnelle des allèles IgH non-productifs au cours du développement B (Article 1). Cette étude a été permise grâce au modèle murin IgH^{frVκ/wt} ; les allèles productifs et non-productifs étant imposés par la mutation, ils peuvent ainsi être détectés spécifiquement. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'accessibilité chromatinienne et transcriptionnelle des allèles productifs et non-productifs dans des cellules B activées au LPS. Nos données de CHIP ont révélé que les deux allèles IgH présentent une charge équivalente de RNA pol II et un profil d'acétylation de l'histone H3 similaire. Ces résultats confirment les données précédemment obtenues au laboratoire qui, par comparaison de la fréquence de SHM, suggéraient que les allèles productifs et non-productifs étaient transcrits à des taux voisins dans des cellules B du centre germinatif (Delpy *et al.*, 2004a). Une autre conclusion majeure de notre étude réalisée dans un contexte physiologique est l'absence d'une régulation de type NMTGS, initialement décrite à l'aide de transgènes d'Ig non-productifs dans des lignées non-B (Bühler *et al.*, 2005). Nos observations s'opposent donc au modèle de *silencing* de l'allèle exclu proposé par Skok *et al.* et suggèrent que le maintien de l'exclusion allélique ne s'opère pas au niveau transcriptionnel. Ces résultats sont en accord avec les observations de Daly *et al.* montrant, par la technique de RNA-FISH, une transcription bi-allélique des allèles IgH (Skok *et al.*, 2001 ; Bühler *et al.*, 2005 ; Daly *et al.*, 2007). Récemment, nos données de CHIP révélant la présence de marques de chromatine active sur les allèles hors phase ont été confirmées par une étude de 4C-seq utilisant des amorces spécifiques de chacun des allèles

IgH (Holwerda *et al.*, 2013). De façon intéressante, Holwerda *et al.* ont démontré que les allèles IgH productifs et non-productifs présentent des interactions chromosomiques similaires et résident dans un domaine chromatinien actif. De plus, aucune différence n'a été détectée entre les LB au repos et stimulés. Ainsi, l'ensemble de ces données suggère une accessibilité transcriptionnelle et une localisation nucléaire symétrique des deux allèles IgH, y compris dans des cellules B stimulées. En contradiction avec l'hypothèse d'un *silencing* transcriptionnel des allèles exclus, l'exclusion allélique semble agir uniquement au niveau des réarrangements V(D)J en favorisant les recombinaisons sur un allèle. Dès lors que les allèles d'Ig présentent un réarrangement complet (productif ou non-productif), aucune différence n'apparaît au niveau transcriptionnel.

Dans ce sens, l'étude menée par Holwerda *et al.* a révélé que les segments VH distaux sont associés à un domaine chromatinien moins actif que le reste du locus IgH. Ce recrutement des segments VH distaux au niveau d'une zone plus répressive restreindrait l'activité des *enhancers* aux seuls promoteurs des segments variables réarrangés, qu'ils soient productifs ou non-productifs.

Afin d'étendre ces études concernant la localisation et le mouvement des allèles IgH lors de la maturation B, nous proposons d'utiliser notre modèle IgH^{frVκ/wt} pour suivre spécifiquement chacun des allèles par des techniques de FISH. En effet, tous les travaux de DNA-FISH à l'heure actuelle caractérisent les allèles IgH hors phase par la distance entre les régions constantes et les segments VH distaux. Cette relation se base sur le fait que les allèles IgH non-productifs présentent soit des réarrangements DJH, soit des segments VDJ hors phase qui font principalement intervenir les segments VH proximaux (Roldan *et al.*, 2005). Comme la détection de l'allèle hors phase repose toujours sur cette corrélation et non sur une détection spécifique, les résultats de ces études sont toujours biaisés par l'interprétation de la distance entre les segments VH distaux et les régions constantes. De plus, certains réarrangements productifs peuvent impliquer les segments VH proximaux, et des segments VH distaux peuvent être associés à des jonctions VDJ hors phase. Ainsi, le modèle IgH^{frVκ/wt}, permettant de détecter spécifiquement chaque allèle IgH à l'aide de sondes marquées par des fluorochromes de couleur différentes, pourrait faciliter les études de localisation nucléaire.

2 LA SURVEILLANCE DES ARN DE CHAINES LOURDES D'Ig

Notre étude ayant apporté la preuve d'une transcription active des allèles IgH non-productifs, nous avons ensuite analysé leur régulation post-transcriptionnelle en mesurant l'efficacité des différents mécanismes de surveillance des ARN. Nous avons ainsi quantifié le phénomène de NMUP et montré une accumulation spécifique des pré-ARNm issus d'allèles IgH hors phase au cours du développement B. Nous avons également révélé une corrélation inverse entre l'intensité de la transcription au locus IgH et l'efficacité du NMUP (*cf* Article 1). En effet, les transcrits primaires hors phase s'accumulent fortement dans les précurseurs B et les cellules B au repos présentant une faible transcription au locus IgH, alors qu'ils ne s'accumulent pratiquement pas dans des cellules B stimulées et des cellules plasmocytaires dans lesquelles la transcription du locus IgH est plus forte. Nous avons également analysé la dégradation par NMD des ARNm IgH non-productifs. Nos observations ont révélé une dégradation par NMD très marquée aboutissant à une disparition quasi complète de ces transcrits matures hors phase. De plus, nous avons confirmé la corrélation entre le taux d'épissage et l'efficacité du NMD précédemment observée par l'équipe de Wilkinson dans des lignées (Gudikote *et al.*, 2005). Par conséquent, la dégradation par NMD est très forte dans les cellules B stimulées (95%) et les plasmocytes (80%) comparativement à celle observée dans les cellules B au repos (50%). Cette activité du NMD plus marquée dans les cellules B stimulées est en accord avec les travaux de Weischenfeldt *et al.* qui avaient montré que la réponse proliférative des LB était considérablement affectée par l'inactivation d'UPF2, un acteur majeur du NMD (Weischenfeldt *et al.*, 2008). Les travaux présentés dans l'Article 2 mettant en évidence la toxicité de chaînes d'Ig tronquées pourraient permettre d'expliquer les données obtenues par Weischenfeldt *et al.* Ainsi, l'apparition d'IgH tronquées suite à l'inhibition du NMD dans des LB activés pourrait induire leur apoptose. En effet, la dégradation par NMD étant très forte dans ces cellules stimulées, une importante synthèse d'IgH tronquées pourrait se produire dans ces cellules. En revanche, les cellules B au repos, qui ne présentent pas une dégradation par NMD aussi efficace, seraient moins affectées par son inhibition.

A l'heure actuelle, il est désormais établi que de nombreux gènes peuvent subir un épissage co-transcriptionnel influencé par la vitesse d'élongation de la RNA Pol II. En effet, différentes études ont démontré que le ralentissement artificiel de la RNA pol II favorise

l'inclusion d'exon alternatif (pour revue : Luco *et al.*, 2011). Dans les précurseurs B et les LB au repos présentant une faible intensité de transcription au locus IgH, nous supposons que la détection du PTC sur les pré-ARNm d'IgH non-productifs peuvent induire un ralentissement de la RNA Pol II suffisant pour diminuer l'épissage et favoriser l'accumulation des transcrits non ou partiellement épissés. En revanche, lors des stades de différenciation B plus tardifs, la forte transcription du locus IgH ne permettrait pas ou peu la mise en place du NMUP mais favoriserait l'épissage et ainsi l'activation du NMD. Cette hypothèse supporte également nos données démontrant la forte dégradation par NMD des ARNm IgH hors phase dans les cellules B activées. Ainsi, l'activation des LB et/ou la différenciation plasmocytaire, en modifiant l'intensité de la transcription, modulent également l'efficacité de l'épissage et orientent le choix du processus de surveillance des ARN mis en jeu. De façon intéressante, les processus de NMUP et NMD semblent être complémentaires dans les cellules B au repos ou activées. Quel que soit le mécanisme impliqué, cette surveillance permet de diminuer efficacement le taux de transcrits matures IgH non-productifs au cours de la maturation B, évitant ainsi la synthèse d'Ig tronquées.

Afin d'étudier le lien entre l'activation des différents mécanismes de surveillance et la vitesse d'élongation de la RNA pol II au sein du locus IgH, nous souhaitons réaliser des ChIP pour regarder s'il existe un enrichissement en RNA Pol II ser5-P (en pause) au niveau des exons contenant les PTC comparativement aux autres exons constant. Nous proposons également de traiter les cellules B activées avec des inhibiteurs de l'élongation de la RNA Pol II tels que le DRB. Si nos suppositions sont exactes le ralentissement artificiel de la RNA Pol II favoriserait l'activation du NMUP et ainsi l'accumulation des pré-ARNm hors phase. Pour s'affranchir des effets néfastes d'un inhibiteur de transcription, une alternative pourrait être de transfecter les lignées B matures ou plasmocytaires avec des plasmides codant une RNA Pol II mutée dont la processivité est ralentie (RNA Pol II dite « C4 ») (Coulter *and* Greenleaf, 1985 ; Ip *et al.*, 2011).

Les différences d'accumulation de transcrits primaires que nous observons au cours du développement B peuvent également réconcilier les données actuelles sur la transcription bi-allélique des allèles IgH et les travaux de l'équipe de Skok supposant un *silencing* de l'allèle exclu. Bien que l'efficacité du NMUP soit faible dans les cellules B stimulées, nous pouvons supposer que les transcrits primaires détectés par Skok *et al.* en RNA FISH sont le reflet de l'accumulation des pré-ARNm IgH hors phase et non l'image des

transcrits IgH productifs. De façon identique aux expériences énoncées précédemment pour la localisation nucléaire des allèles IgH, le modèle IgH^{frVκ/wt} pourrait servir à la détection spécifique des pré-ARNm IgH en RNA FISH. Nous proposons également de coupler ce ciblage des transcrits primaires avec la détection de protéines impliquées dans les différents processus de surveillance des ARN afin d'apporter des précisions sur les mécanismes moléculaires qui régissent le NMUP (par exemple UPF1, SMG1, SMG6). Cette technique permettrait également de vérifier si comme l'avait démontré précédemment l'équipe de Mühlmann dans des lignées cellulaires ou des hybridomes, les pre-ARNm IgH non-sens s'accumulent au site de la transcription dans des cellules B primaires (Mühlmann *et al.*, 2001 ; de Turrís *et al.*, 2011).

Comme nous avons pu l'aborder dans le chapitre I de ce manuscrit, la vitesse d'élongation de la RNA Pol II augmente dans les cellules plasmocytaires (pour revue : Santos *et al.*, 2011). En accord avec cette littérature, nous avons observé une augmentation de la transcription au locus IgH dans les plasmablastes comparativement aux cellules B activées. Pourtant, nous n'avons pas détecté de différences dans l'efficacité de l'épissage entre ces deux types cellulaires. Néanmoins, nous avons supposé que le taux d'épissage dans les plasmablastes était sous-estimé par l'activation du NAS. En effet, notre méthodologie de quantification des ARNm IgH non-sens ne permet pas de quantifier la présence de transcrits alternatifs qui, par un phénomène de saut d'exon, se retrouvent dépourvus des exons contenant des PTC (frVκ et/ou CH1). Nos travaux sur les chaînes légères kappa ayant démontré que les transcrits alternatifs générés par le NAS pouvaient créer des Ig tronquées délétères pour les plasmocytes (Article 2), il est difficile d'analyser l'efficacité du NAS *in vivo*.

Afin de s'affranchir de ce problème de toxicité, nous avons tiré profit du modèle IgH^{frVκ} pour analyser l'activation du NAS au locus IgH *in vivo* (Partie 2 ; résultats préliminaires). En effet, l'activation du NAS sur l'allèle IgH^{frVκ} peut induire l'exclusion de l'exon frVκ et entraîner l'expression de transcrits IgH productifs lorsque le réarrangement VDJ est en phase. Ne pouvant pas faire la distinction entre les transcrits alternatifs ayant éliminé l'exon frVκ et les ARNm issus de l'allèle IgH productif, nous avons décidé de croiser les animaux IgH^{frVκ} et les animaux DH-LMP2A. Ainsi, dans les animaux hétérozygotes IgH^{frVκ/DH-LMP2A}, le développement B est permis par l'expression de la protéine LMP2A et les ARNm IgH productifs que nous détectons proviennent obligatoirement de l'activation du

NAS sur l'allèle IgH^{frVκ}. De même, la détection d'IgM est la conséquence de la traduction de ces transcrits alternatifs.

Nous avons ainsi pu démontrer que l'activation du NAS est très marquée dans les plasmocytes comparativement aux LB. Ces données sont en accord avec nos précédentes observations, réalisées dans des lignées B sur les transcrits Igκ non-sens (Chemin *et al.*, 2010 en Annexe 1 et Article 2). De plus, la détection de réarrangements VDJ oligoclonaux indique que ce processus n'est pas restreint à quelques plasmocytes. En outre, l'activation du NAS est responsable de la synthèse d'une quantité non négligeable d'IgM, ce qui tend à confirmer nos suppositions sur la production d'Igκ tronquées dans les plasmocytes et l'activation du *TIE-checkpoint in vivo*.

Le NAS étant principalement activé dans les plasmocytes *in vivo*, nos travaux suggèrent que ce processus de surveillance est dépendant de l'intensité de la transcription. Les données actuelles sur l'épissage alternatif et la vitesse d'élongation de la RNA Pol II vont dans ce sens. Comme nous l'avons déjà abordé une vitesse d'élongation rapide va entraîner l'exclusion des exons alternatifs alors qu'une vitesse plus faible de la RNA Pol II aura tendance à induire l'inclusion des exons alternatifs (de la Mata *et al.*, 2003, Howe *et al.*, 2003 ; Ip *et al.*, 2011 ; pour revue Shukla *and* Oberdoerffer, 2012). Bien que l'activation initiale du NAS soit liée à la reconnaissance d'un PTC, la vitesse d'élongation de la RNA pol II semble influencer de façon identique le NAS et l'épissage alternatif conventionnel (non dépendant d'un PTC mais ayant un rôle primordial au cours du développement chez les eucaryotes).

De façon intéressante, la protéine UPF1 est requise pour l'activation du NMUP et du NAS de type II, si bien que l'on peut s'interroger sur une possible connexion entre ces deux mécanismes (Chang *et al.*, 2007b ; de Turrís *et al.*, 2011). En effet, on peut se demander s'il ne s'agit pas d'un seul et même mécanisme de surveillance affectant l'épissage des transcrits non-sens mais dont l'action diffère en fonction de l'intensité de transcription. Lorsque l'intensité de la transcription des loci d'Ig est faible (dans les LB au repos), la reconnaissance du PTC sur le pré-mRNA non-sens pourrait entraîner une pause de la RNA Pol II suffisante pour la mise en place du NMUP et l'accumulation de pré-ARNm non-sens. A l'inverse, la reconnaissance du PTC lors d'une vitesse d'élongation rapide de la RNA Pol II favoriserait l'exclusion de l'exon contenant le PTC. Dans ce sens, la surexpression de facteurs d'élongation de la transcription tel qu'ELL2 dans les plasmocytes pourrait entraîner le

recrutement de protéines impliqués dans l'épissage co-transcriptionnel et favoriser l'activation du NAS (Martincic *et al.*, 2009 ; pour revue Santos *et al.*, 2011). D'ailleurs, une étude récente a démontré que l'inactivation du facteur ELL2 dans une lignée plasmocytaire entraînait une modification du patron d'épissage pour environ 12% des transcrits exprimés (Benson *et al.*, 2012).

3 L'ACTIVATION DU NAS ET LE TIE CHECKPOINT

Des travaux réalisés au laboratoire avaient mis en évidence une dégradation des transcrits Ig κ hors phase par un processus de NMD non classique (Delpy *et al.*, 2004b). Ces transcrits ne respectant pas la règle de position des PTC, les données actuelles suggèrent qu'il s'agit d'une dégradation par un processus de NMD EJC-indépendant, dont l'efficacité est moins importante que le NMD classique. Par la suite, nous avons démontré dans des lignées que l'action combinée des différents processus de surveillance des ARN (NMUP, NAS et NMD) permettait de diminuer drastiquement le taux ARNm Ig κ hors phase (Chemin *et al.*, 2010 en Annexe 1). Nous avons également montré que l'élimination de l'exon VJ κ contenant le PTC par le processus de NAS entraîne la production de transcrits alternatifs de type L-C κ . La traduction de ces transcrits alternatifs pouvant entraîner la production de domaines C κ potentiellement néfastes pour les LB, la seconde partie de ma thèse fut consacrée à l'étude de l'impact de la synthèse de ces Ig κ tronquées sur le développement B et la différenciation plasmocytaire.

Nous avons ainsi démontré que l'activation du NAS est influencée par la position du PTC. En effet, nous avons détecté des forts taux de transcrits alternatifs L-C κ pour les constructions Ig κ hors phase présentant un PTC au sein de l'exon variable (V^{PTC}) alors qu'ils sont quasi inexistantes lorsque le PTC est positionné dans l'exon C κ (C^{PTC}). Cette activation préférentielle semble confirmer que le NAS au locus Ig κ est dépendant du cadre de lecture (Type II). En accord avec nos travaux précédents (Chemin *et al.*, 2010) et nos résultats préliminaires avec le modèle IgH^{frV κ /DH-LMP2A}, nous avons observé une activation du NAS plus marquée dans les lignées plasmocytaires que dans les lignées B. De façon originale, nous avons démontré que la traduction des transcrits L-C κ permet la production d'Ig tronquées activement dégradées par le protéasome. Cette synthèse d'Ig tronquées n'est pas sans

conséquence puisqu'elle augmente l'apoptose des lignées plasmocytaires exprimant la construction V^{PTC} lorsqu'elles sont traitées avec du MG132, un inhibiteur du protéasome. Cette sensibilité accrue des cellules exprimant une Ig tronquée aux inhibiteurs du protéasome est corrélée à une expression élevée de CHOP, un facteur impliqué dans l'apoptose consécutive à un stress du RE. En complément de ces observations réalisées sur les lignées plasmocytaires, nous avons mis en évidence chez la souris une disparition drastique des plasmocytes présentant des réarrangements non-productifs de type V^{PTC}. Cette contre sélection des plasmocytes exprimant une Ig κ tronquée est également détectée dans le modèle murin DH-LMP2A n'exprimant pas de chaîne lourde. L'ensemble de ces résultats suggère un effet toxique des Ig κ tronquées qui ne résulte pas d'une perturbation de l'assemblage chaînes lourdes et légères. Au vu de nos résultats dans les lignées et des données de la littérature démontrant que la survie des plasmocytes dépend de leur capacité à surmonter le stress du RE induit par une synthèse massive d'Ig, nous supposons que la production d'Ig κ tronquées dans les plasmocytes hébergeant des réarrangements V^{PTC} engorgerait le RE de ces derniers et induirait leur apoptose (Cenci *et al.*, 2006 ; Meister *et al.*, 2007 ; Cenci *and* Sitia, 2007 ; pour revue Cenci *et al.*, 2011).

Cette disparition de cellules plasmocytaires induite par une toxicité intrinsèque des Ig tronquées constitue un nouveau point de contrôle agissant à un stade tardif de la maturation B, lors de la différenciation plasmocytaire. Nos données suggèrent que ce point de contrôle que nous avons appelé *TIE checkpoint* est la résultante de deux processus : (1) une forte activation du NAS dans les plasmocytes et (2) une grande sensibilité de ces derniers à l'apoptose induite par un stress du RE. Bien que le *TIE checkpoint* permette de prévenir la production de plasmocytes pouvant sécréter des Ig κ tronquées, sa survenue tardive peut aussi être considérée comme une faiblesse du système immunitaire. En effet, alors que le *TIE checkpoint* est lié à la transcription et l'épissage alternatif des allèles d'Ig non-productifs, il conduit à l'élimination d'un nombre non négligeable de plasmocytes capables de répondre à une stimulation antigénique et dont les gènes d'Ig ont potentiellement subi des processus de maturation d'affinité. Par conséquent, ce *TIE checkpoint* pourrait réduire le taux de plasmocytes et donc la quantité d'Ac produits en réponse à une stimulation antigénique.

Afin de démontrer formellement que la production d'Ig tronquées permet d'induire l'apoptose des plasmocytes *in vivo*, nous développons actuellement un nouveau modèle

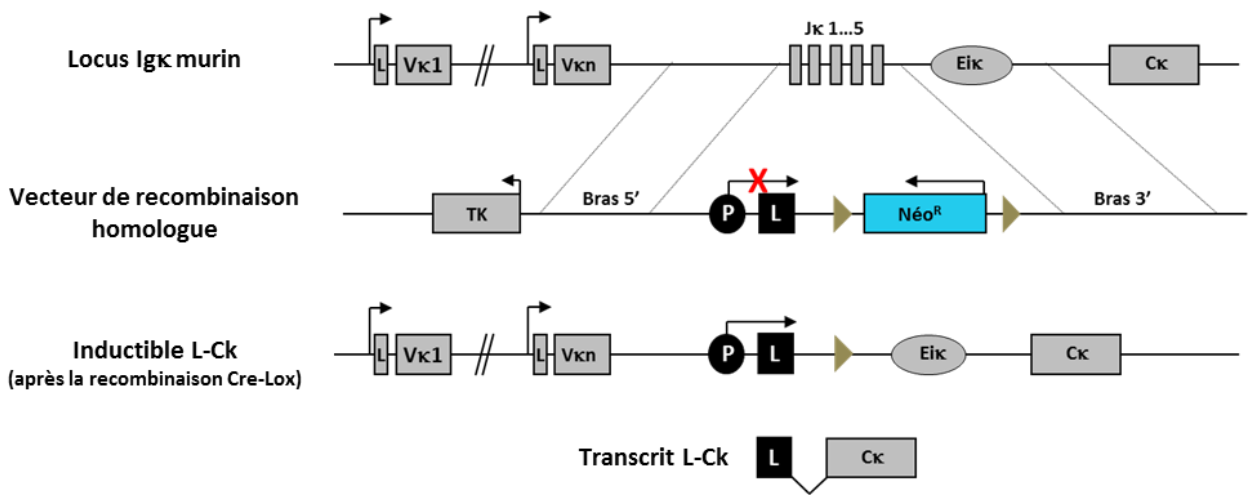


Figure 32 : Description du modèle murin *ind-Trunc-Ig*

murin permettant une production inductible d'Ig tronquées : modèle KI « ind-Trunc-Ig» (**Figure 32**). Par recombinaison homologue nous avons remplacé les segments J κ par un pVH, un exon Leader humain et le gène de résistance à la néomycine (*neo*^R). Chez ces animaux, le développement B sera analysé après croisement avec des souris exprimant la recombinase Cre de façon inductible (souris « Cre-ERT2 » : localisation nucléaire de la Cre après ajout de tamoxifène ; disponibles au laboratoire). La délétion du gène *neo*^R devrait permettre la transcription et l'épissage de l'exon Leader sur l'exon C κ et ainsi induire la production d'Ig κ tronquées. La présence d'un exon Leader humain facilitera la détection des transcrits L-C κ . Nous avons obtenu récemment une transmission germinale de la mutation et l'analyse de ce nouveau modèle devrait débiter rapidement.

4 LES Ig TRONQUEES : UNE PERSPECTIVE THERAPEUTIQUE ?

Le myélome multiple (MM) est un cancer incurable des cellules plasmocytaires caractérisé dans la plupart des cas par une production élevée d'anticorps. La survie de ces plasmocytes tumoraux comme celle des plasmocytes normaux est influencé par leur capacité à résister au stress du RE induit par leur synthèse massive d'Ig. Afin de faciliter leur survie, les plasmocytes activent la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*), une voie de signalisation qui ajuste la capacité du RE, favorise le bon repliement des protéines, et augmente la dégradation des protéines mal repliées par le protéasome. A l'heure actuelle, un des traitements du MM consiste à déréguler cette machinerie en administrant aux patients du Bortezomib (Bz), un inhibiteur du protéasome (pour revues Laubach *et al.*, 2011 ; Cenci *et al.*, 2011 ; Moreau *et al.*, 2012 ; Moore and Hollien, 2012). Un nombre croissant d'étude semble indiquer que l'effet toxique de cet inhibiteur sur les cellules plasmocytaires serait causé par une accumulation de protéines mal repliées (pour revue Pascal *et al.*, 2009). De façon intéressante, il a été rapporté une corrélation entre le niveau de production d'Ig et la sensibilité des cellules de myélome au Bz (Meister *et al.*, 2007).

En s'appuyant sur nos travaux révélant une importante dégradation par NMD des transcrits d'Ig non-productifs et une forte toxicité des Ig κ tronquées dans les plasmocytes, nous proposons de traiter les cellules de myélome avec des inhibiteurs spécifiques du NMD. Nous supposons que l'inhibition du NMD en stabilisant les ARNm d'Ig contenant des PTC

pourrait entraîner la synthèse d'Ig tronquées et induire l'apoptose des plasmocytes tumoraux. Même si l'inhibition du NMD pourrait entraîner la production de protéines tronquées de façon générale, la mise en place d'une telle thérapie devrait s'avérer plus efficace sur des cellules cancéreuses hébergeant des transcrits d'Ig non-productifs. Des collaborations sont en cours pour développer de nouveaux inhibiteurs spécifiques du NMD présentant une toxicité moins élevée que les inhibiteurs de traduction classiquement utilisés.

Chez les patients atteints de MM, les perspectives thérapeutiques seraient d'utiliser des inhibiteurs spécifiques du NMD seuls ou en combinaison avec le Bz pour promouvoir la mort des plasmocytes tumoraux en accentuant le stress du RE. Cette combinaison d'inhibiteurs pourrait présenter des effets synergiques, en augmentant le taux de protéines mal repliées, et par conséquent le stress du RE, tout en diminuant leur dégradation par le protéasome. L'avenir des approches thérapeutiques utilisant conjointement des inducteurs de stress du RE et du Bz semble donc très prometteur, et particulièrement adapté aux patients résistants au Bz. Ces traitements combinés pourraient également permettre d'administrer des doses plus faibles de drogues ou d'espacer les périodes de traitement.

L'autre originalité de cette étude consiste à comparer la sensibilité des cellules de myélome aux inhibiteurs de NMD, en présence ou en absence d'Ig tronquées. Cette analyse comparative permettra de distinguer les effets généraux des inhibiteurs de NMD (augmentation du stress du RE consécutive à l'accumulation massive de protéines tronquées) et les effets spécifiques causés par l'accumulation d'Ig tronquées.

5 CONCLUSIONS GENERALES

Pour conclure, cette thèse aura permis d'analyser la transcription et le devenir des transcrits d'Ig non-productifs. L'analyse des mécanismes mis en jeu par les lymphocytes B pour se protéger de la synthèse d'Ig tronquées a permis d'identifier un nouveau point de contrôle agissant principalement lors de la différenciation plasmocytaire (*TIE-checkpoint*). Au final, nous espérons avoir apporté un peu de lumière sur la transcription des allèles exclus et sur la remarquable coopération des mécanismes assurant le « contrôle qualité » des ARN. Nous espérons que notre démonstration concernant la toxicité des Ig tronquées pourra ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement du myélome. Enfin, dans une tout autre mesure, ce travail de thèse nous aura permis de mettre en exergue un rôle encore insoupçonné des sites donneur d'épissage des exons I dans le processus de CSR.

ANNEXES

Annexe 1

Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts.

Chemin, G., Tinguely, A., Sirac, C., Lechouane, F., Duchez, S., Cogné, M., & Delpy, L.
The Journal of Immunology. 2010. Volume 184, pages 5009–5017.

Annexe 2

AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells.

Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., & Cogné, M.

Science. 2012. Volume 336, pages 931–934.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abarrategui, I., and Krangel, M.S. (2006). Regulation of T cell receptor-alpha gene recombination by transcription. *Nat. Immunol.* *7*, 1109–1115.
- 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.
- Alexander, R.D., Innocente, S.A., Barrass, J.D., and Beggs, J.D. (2010). Splicing-dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Mol. Cell* *40*, 582–593.
- Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* *27*, 190–202.
- Alt, F.W., and Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *79*, 4118–4122.
- 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.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., and Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* *432*, 112–118.
- Amrani, N., Dong, S., He, F., Ganesan, R., Ghosh, S., Kervestin, S., Li, C., Mangus, D.A., Spatrack, P., and Jacobson, A. (2006). Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 39–42.
- Andersen, C.B.F., Ballut, L., Johansen, J.S., Chamieh, H., Nielsen, K.H., Oliveira, C.L.P., Pedersen, J.S., Séraphin, B., Le Hir, H., and Andersen, G.R. (2006). Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* *313*, 1968–1972.
- Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lis, J.T. (2002). The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* *420*, 837–841.
- Aoufouchi, S., Yélamos, J., and Milstein, C. (1996). Nonsense mutations inhibit RNA splicing in a cell-free system: recognition of mutant codon is independent of protein synthesis. *Cell* *85*, 415–422.
- 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.
- Azzalin, C.M., and Lingner, J. (2006). The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways. *Cell Cycle* *5*, 1496–1498.

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.
- Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., and Le Hir, H. (2005). The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 861–869.
- Balter, B.B., Ciccone, D.N., Oettinger, M.A., and Selsing, E. (2012). Mice lacking Σ tandem repeats maintain RNA polymerase patterns but exhibit histone modification pattern shifts linked to class switch site locations. *Mol. Immunol.* *52*, 1–8.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* *21*, 381–395.
- Baserga, S.J., and Benz, E.J., Jr (1988). Nonsense mutations in the human beta-globin gene affect mRNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 2056–2060.
- Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* *109 Suppl*, S45–55.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* *438*, 508–511.
- 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.
- Baumann, B., Potash, M.J., and Köhler, G. (1985). Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J.* *4*, 351–359.
- Begum, N.A., Stanlie, A., Nakata, M., Akiyama, H., and Honjo, T. (2012). The histone chaperone Spt6 is required for activation-induced cytidine deaminase target determination through H3K4me3 regulation. *J. Biol. Chem.* *287*, 32415–32429.
- Belgrader, P., Cheng, J., and Maquat, L.E. (1993). Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 482–486.
- Benson, M.J., Aijö, T., Chang, X., Gagnon, J., Pape, U.J., Anantharaman, V., Aravind, L., Pursiheimo, J.-P., Oberdoerffer, S., Liu, X.S., et al. (2012). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like (hnRNPLL) and elongation factor, RNA polymerase II, 2 (ELL2) are regulators of mRNA processing in plasma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 16252–16257.
- Bertolino, E., Reddy, K., Medina, K.L., Parganas, E., Ihle, J., and Singh, H. (2005). Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat. Immunol.* *6*, 836–843.

- 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.
- Betz, A.G., Milstein, C., González-Fernández, A., Pannell, R., Larson, T., and Neuberger, M.S. (1994). Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* *77*, 239–248.
- Bhattacharya, A., Czaplinski, K., Trifillis, P., He, F., Jacobson, A., and Peltz, S.W. (2000). Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* *6*, 1226–1235.
- Del Blanco, B., García, V., García-Mariscal, A., and Hernández-Munain, C. (2011). Control of V(D)J Recombination through Transcriptional Elongation and Changes in Locus Chromatin Structure and Nuclear Organization. *Genet Res Int* *2011*, 970968.
- Blomberg, B., and Tonegawa, S. (1982). DNA sequences of the joining regions of mouse lambda light chain immunoglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *79*, 530–533.
- 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.
- Ten Boekel, E., Melchers, F., and Rolink, A. (1995). The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int. Immunol.* *7*, 1013–1019.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Johnston, C.M., Bunting, S.F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P.J., and Corcoran, A.E. (2004). Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat. Immunol.* *5*, 630–637.
- 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.
- Bossen, C., Mansson, R., and Murre, C. (2012). Chromatin topology and the regulation of antigen receptor assembly. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 337–356.
- Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P., and Alt, F.W. (1994). S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J.* *13*, 665–674.
- Brack, C., Hiram, M., Lenhard-Schuller, R., and Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* *15*, 1–14.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4102–4107.
- 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.

- Bredemeyer, A.L., Huang, C.-Y., Walker, L.M., Bassing, C.H., and Sleckman, B.P. (2008). Aberrant V(D)J recombination in ataxia telangiectasia mutated-deficient lymphocytes is dependent on nonhomologous DNA end joining. *J. Immunol.* *181*, 2620–2625.
- Brocke, K.S., Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2002). The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 331–335.
- Brodeur, P.H., and Riblet, R. (1984). The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur. J. Immunol.* *14*, 922–930.
- Brookes, E., and Pombo, A. (2009). Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states. *EMBO Rep.* *10*, 1213–1219.
- Bühler, M., and Mühlemann, O. (2005). Alternative splicing induced by nonsense mutations in the immunoglobulin mu VDJ exon is independent of truncation of the open reading frame. *RNA* *11*, 139–146.
- Bühler, M., Paillusson, A., and Mühlemann, O. (2004). Efficient downregulation of immunoglobulin mu mRNA with premature translation-termination codons requires the 5'-half of the VDJ exon. *Nucleic Acids Res.* *32*, 3304–3315.
- Bühler, M., Mohn, F., Stalder, L., and Mühlemann, O. (2005). Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol. Cell* *18*, 307–317.
- Bühler, M., Steiner, S., Mohn, F., Paillusson, A., and Mühlemann, O. (2006). EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 462–464.
- C**
- Caputi, M., Kendzior, R.J., Jr, and Beemon, K.L. (2002). A nonsense mutation in the fibrillin-1 gene of a Marfan syndrome patient induces NMD and disrupts an exonic splicing enhancer. *Genes Dev.* *16*, 1754–1759.
- Carson, S., and Wu, G.E. (1989). A linkage map of the mouse immunoglobulin lambda light chain locus. *Immunogenetics* *29*, 173–179.
- Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 285–298.
- Carter, M.S., Duskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S., and Wilkinson, M.F. (1995). A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J. Biol. Chem.* *270*, 28995–29003.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* *5*, 317–327.
- Cenci, S., and Sitia, R. (2007). Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett.* *581*, 3652–3657.

- Cenci, S., Mezghrani, A., Cascio, P., Bianchi, G., Cerruti, F., Fra, A., Lelouard, H., Masciarelli, S., Mattioli, L., Oliva, L., et al. (2006). Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *EMBO J.* *25*, 1104–1113.
- Cenci, S., van Anken, E., and Sitia, R. (2011). Proteostenosis and plasma cell pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 216–222.
- Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 118–132.
- 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.
- Chan, C.C., Dostie, J., Diem, M.D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J., and Dreyfuss, G. (2004). eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* *10*, 200–209.
- Chang, Y.-F., Chan, W.-K., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007a). Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame. *J. Biol. Chem.* *282*, 29738–29747.
- Chang, Y.-F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007b). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 51–74.
- 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., 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.
- 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.

- Cheng, J., Fogel-Petrovic, M., and Maquat, L.E. (1990). Translation to near the distal end of the penultimate exon is required for normal levels of spliced triosephosphate isomerase mRNA. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 5215–5225.
- Cheng, J., Belgrader, P., Zhou, X., and Maquat, L.E. (1994). Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6317–6325.
- Cherry, S.R., Beard, C., Jaenisch, R., and Baltimore, D. (2000). V(D)J recombination is not activated by demethylation of the kappa locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 8467–8472.
- Cheung, A.C.M., and Cramer, P. (2011). Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation. *Nature* *471*, 249–253.
- Chiu, S.-Y., Serin, G., Ohara, O., and Maquat, L.E. (2003). Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA* *9*, 77–87.
- Chiu, S.-Y., Lejeune, F., Ranganathan, A.C., and Maquat, L.E. (2004). The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev.* *18*, 745–754.
- Chowdhury, D., and Sen, R. (2001). Stepwise activation of the immunoglobulin mu heavy chain gene locus. *EMBO J.* *20*, 6394–6403.
- 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.
- Chowdhury, M., Forouhi, O., Dayal, S., McCloskey, N., Gould, H.J., Felsenfeld, G., and Fear, D.J. (2008). Analysis of intergenic transcription and histone modification across the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 15872–15877.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* *8*, 463–470.
- Coleclough, C., Perry, R.P., Karjalainen, K., and Weigert, M. (1981). Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature* *290*, 372–378.
- Connor, A., Wiersma, E., and Shulman, M.J. (1994). On the linkage between RNA processing and RNA translatability. *J. Biol. Chem.* *269*, 25178–25184.
- Conti, E., and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 316–325.
- Coticello, 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. (2010). The epigenetic role of non-coding RNA transcription and nuclear organization in immunoglobulin repertoire generation. *Semin. Immunol.* *22*, 353–361.

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.

Corcos, L., and Solier, S. (2005). [Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]. *Med Sci (Paris)* 21, 253–260.

Coulter, D.E., and Greenleaf, A.L. (1985). A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 13190–13198.

Couttet, P., and Grange, T. (2004). Premature termination codons enhance mRNA decapping in human cells. *Nucleic Acids Res.* 32, 488–494.

Crews, S., Griffin, J., Huang, H., Calame, K., and Hood, L. (1981). A single VH gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: somatic mutation is correlated with the class of the antibody. *Cell* 25, 59–66.

Culbertson, M.R., and Leeds, P.F. (2003). Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 207–214.

Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S.V., Han, X., Weng, Y., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Ter-Avanesyan, M.D., and Peltz, S.W. (1998). The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 12, 1665–1677.

D

Daar, I.O., and Maquat, L.E. (1988). Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 8, 802–813.

Daitch, L.E., Moore, M.W., Persiani, D.M., Durdik, J.M., and Selsing, E. (1992). Transcription and recombination of the murine RS element. *J. Immunol.* 149, 832–840.

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.

Damgaard, C.K., Kahns, S., Lykke-Andersen, S., Nielsen, A.L., Jensen, T.H., and Kjems, J. (2008). A 5' splice site enhances the recruitment of basal transcription initiation factors in vivo. *Mol. Cell* 29, 271–278.

Daniel, J.A., Santos, M.A., Wang, Z., Zang, C., Schwab, K.R., Jankovic, M., Filsuf, D., Chen, H.-T., Gazumyan, A., Yamane, A., et al. (2010). PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination. *Science* 329, 917–923.

Das, R., Dufu, K., Romney, B., Feldt, M., Elenko, M., and Reed, R. (2006). Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly. *Genes Dev.* 20, 1100–1109.

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.

- Degner, S.C., Verma-Gaur, J., Wong, T.P., Bossen, C., Iverson, G.M., Torkamani, A., Vettermann, C., Lin, Y.C., Ju, Z., Schulz, D., et al. (2011). CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9566–9571.
- 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., Le Bert, M., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2003). Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2108–2113.
- Delpy, L., Sirac, C., Le Morvan, C., and Cogné, M. (2004a). Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol.* *173*, 1842–1848.
- Delpy, L., Sirac, C., Magnoux, E., Duchez, S., and Cogné, M. (2004b). RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional kappa alleles and detects premature termination within the last kappa exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 7375–7380.
- 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.
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J. Exp. Med.* *197*, 1291–1296.
- Dietz, H.C., and Kendzior, R.J., Jr (1994). Maintenance of an open reading frame as an additional level of scrutiny during splice site selection. *Nat. Genet.* *8*, 183–188.
- Dietz, H.C., Valle, D., Francomano, C.A., Kendzior, R.J., Jr, Pyeritz, R.E., and Cutting, G.R. (1993). The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science* *259*, 680–683.
- Dildrop, R., Gause, A., Müller, W., and Rajewsky, K. (1987). A new V gene expressed in lambda-2 light chains of the mouse. *Eur. J. Immunol.* *17*, 731–734.
- Disset, A., Bourgeois, C.F., Benmalek, N., Claustres, M., Stevenin, J., and Tuffery-Giraud, S. (2006). An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 999–1013.
- 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.
- Dostie, J., and Dreyfuss, G. (2002). Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr. Biol.* *12*, 1060–1067.

Dreyer, W.J., and Bennett, J.C. (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *54*, 864–869.

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.

Dunda, O., and Corcos, D. (1997). Recombining sequence recombination in normal kappa-chain-expressing B cells. *J. Immunol.* *159*, 4362–4366.

Dunleavy, E., Pidoux, A., and Allshire, R. (2005). Centromeric chromatin makes its mark. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 172–175.

Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.-H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., and Lejeune, F. (2007). Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J. Cell Biol.* *178*, 1145–1160.

Durdik, J., Moore, M.W., and Selsing, E. (1984). Novel kappa light-chain gene rearrangements in mouse lambda light chain-producing B lymphocytes. *Nature* *307*, 749–752.

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.

Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z., and Mühlemann, O. (2008). Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol.* *6*, e92.

Eberle, A.B., Herrmann, K., Jäck, H.-M., and Mühlemann, O. (2009a). Equal transcription rates of productively and nonproductively rearranged immunoglobulin mu heavy chain alleles in a pro-B cell line. *RNA* *15*, 1021–1028.

Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., and Jensen, T.H. (2009b). SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 49–55.

Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvagiotto, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2011). The distal V(H) gene cluster of the Igh locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity* *34*, 175–187.

Edelman, L.B., and Fraser, P. (2012). Transcription factories: genetic programming in three dimensions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 110–114.

Ehlich, A., Martin, V., Müller, W., and Rajewsky, K. (1994). Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr. Biol.* *4*, 573–583.

Eisen, H.N., and Reilly, E.B. (1985). Lambda chains and genes in inbred mice. *Annu. Rev. Immunol.* *3*, 337–365.

F

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.

Feeney, A.J. (2011). Epigenetic regulation of antigen receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 171–177.

Feeney, A.J., and Riblet, R. (1993). DST4: a new, and probably the last, functional DH gene in the BALB/c mouse. *Immunogenetics* *37*, 217–221.

Felsenfeld, G. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* *355*, 219–224.

Fisette, J.-F., Michelle, L., Revil, T., and Chabot, B. (2009). [Guiding and integrating to control and diversify splicing]. *Med Sci (Paris)* *25*, 175–180.

Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., et al. (2006). H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol. Cell* *21*, 201–214.

Franks, T.M., Singh, G., and Lykke-Andersen, J. (2010). Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* *143*, 938–950.

Frischmeyer-Guerrero, P.A., Montgomery, R.A., Warren, D.S., Cooke, S.K., Lutz, J., Sonnenday, C.J., Guerrero, A.L., and Dietz, H.C. (2011). Perturbation of thymocyte development in nonsense-mediated decay (NMD)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 10638–10643.

Fuda, N.J., Ardehali, M.B., and Lis, J.T. (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* *461*, 186–192.

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

Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., and Conti, E. (2005). SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell* *17*, 537–547.

Furger, A., O'Sullivan, J.M., Binnie, A., Lee, B.A., and Proudfoot, N.J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* *16*, 2792–2799.

Fuxa, M., and Skok, J.A. (2007). Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 129–136.

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

Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2004). Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* *429*, 575–578.

Gearhart, P.J., and Bogenhagen, D.F. (1983). Clusters of point mutations are found exclusively around rearranged antibody variable genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 3439–3443.

Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2003). Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol. Cell* *11*, 939–949.

Gehring, N.H., Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M.H., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2005). Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol. Cell* *20*, 65–75.

Gersappe, A., Burger, L., and Pintel, D.J. (1999). A premature termination codon in either exon of minute virus of mice P4 promoter-generated pre-mRNA can inhibit nuclear splicing of the intervening intron in an open reading frame-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *274*, 22452–22458.

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.

Golding, A., Chandler, S., Ballestar, E., Wolffe, A.P., and Schlissel, M.S. (1999). Nucleosome structure completely inhibits in vitro cleavage by the V(D)J recombinase. *EMBO J.* *18*, 3712–3723.

Goldmit, M., and Bergman, Y. (2004). Monoallelic gene expression: a repertoire of recurrent themes. *Immunol. Rev.* *200*, 197–214.

Goodhardt, M., Cavelier, P., Doyen, N., Kallenbach, S., Babinet, C., and Rougeon, F. (1993). Methylation status of immunoglobulin kappa gene segments correlates with their recombination potential. *Eur. J. Immunol.* *23*, 1789–1795.

Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2010). Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J. Immunol.* *185*, 3117–3125.

Good-Jacobson, K.L., and Tarlinton, D.M. (2012). Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.* *24*, 403–408.

Gorman, J.R., and Alt, F.W. (1998). Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Adv. Immunol.* *69*, 113–181.

Gudikote, J.P., and Wilkinson, M.F. (2002). T-cell receptor sequences that elicit strong down-regulation of premature termination codon-bearing transcripts. *EMBO J.* *21*, 125–134.

Gudikote, J.P., Imam, J.S., Garcia, R.F., and Wilkinson, M.F. (2005). RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 801–809.

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

Haddad, D., Oruc, Z., Puget, N., Laviolette-Malirat, N., Philippe, M., Carrion, C., Le Bert, M., and Khamlichi, A.A. (2011). Sense transcription through the S region is essential for immunoglobulin class switch recombination. *EMBO J.* *30*, 1608–1620.

Han, L., Masani, S., and Yu, K. (2011). Overlapping activation-induced cytidine deaminase hotspot motifs in Ig class-switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 11584–11589.

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

Harriman, G.R., Bradley, A., Das, S., Rogers-Fani, P., and Davis, A.C. (1996). IgA class switch in I alpha exon-deficient mice. Role of germline transcription in class switch recombination. *J. Clin. Invest.* *97*, 477–485.

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.

Heintzman, N.D., and Ren, B. (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 386–400.

Helmink, B.A., and Sleckman, B.P. (2012). The response to and repair of RAG-mediated DNA double-strand breaks. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 175–202.

Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* *96*, 307–310.

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

- Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 195–205.
- Hesslein, D.G.T., Pflugh, D.L., Chowdhury, D., Bothwell, A.L.M., Sen, R., and Schatz, D.G. (2003). Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev.* *17*, 37–42.
- Hewitt, S.L., Farmer, D., Marszalek, K., Cadera, E., Liang, H.-E., Xu, Y., Schlissel, M.S., and Skok, J.A. (2008). Association between the Igk and Igh immunoglobulin loci mediated by the 3' Igk enhancer induces “decontraction” of the Igh locus in pre-B cells. *Nat. Immunol.* *9*, 396–404.
- Hewitt, S.L., Yin, B., Ji, Y., Chaumeil, J., Marszalek, K., Tenthorey, J., Salvagiotto, G., Steinel, N., Ramsey, L.B., Ghysdael, J., et al. (2009). RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* *10*, 655–664.
- Hewitt, S.L., Chaumeil, J., and Skok, J.A. (2010). Chromosome dynamics and the regulation of V(D)J recombination. *Immunol. Rev.* *237*, 43–54.
- Le Hir, H., and Andersen, G.R. (2008). Structural insights into the exon junction complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 112–119.
- Le Hir, H., and Séraphin, B. (2008). EJC at the heart of translational control. *Cell* *133*, 213–216.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., and Moore, M.J. (2000a). The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* *19*, 6860–6869.
- Le Hir, H., Moore, M.J., and Maquat, L.E. (2000b). Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev.* *14*, 1098–1108.
- Holwerda, S.J.B., van de Werken, H.J.G., Ribeiro de Almeida, C., Bergen, I.M., de Bruijn, M.J.W., Verstegen, M.J.A.M., Simonis, M., Splinter, E., Wijchers, P.J., Hendriks, R.W., et al. (2013). Allelic exclusion of the immunoglobulin heavy chain locus is independent of its nuclear localization in mature B cells. *Nucleic Acids Res.* *41*, 6905–6916.
- Hosoda, N., Kim, Y.K., Lejeune, F., and Maquat, L.E. (2005). CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 893–901.
- Howe, K.J., Kane, C.M., and Ares, M., Jr (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* *9*, 993–1006.
- Hozumi, N., and Tonegawa, S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *73*, 3628–3632.

Huber, C., Schäble, K.F., Huber, E., Klein, R., Meindl, A., Thiebe, R., Lamm, R., and Zachau, H.G. (1993). The V kappa genes of the L regions and the repertoire of V kappa gene sequences in the human germ line. *Eur. J. Immunol.* *23*, 2868–2875.

Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Saulière, J., and Izaurralde, E. (2008). SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* *14*, 2609–2617.

Hwang, J., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D., and Maquat, L.E. (2010). UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Mol. Cell* *39*, 396–409.

I

Iborra, F.J., Jackson, D.A., and Cook, P.R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* *293*, 1139–1142.

Iborra, F.J., Jackson, D.A., and Cook, P.R. (2004). The case for nuclear translation. *J. Cell. Sci.* *117*, 5713–5720.

Ichihara, Y., Hayashida, H., Miyazawa, S., and Kurosawa, Y. (1989). Only DFL16, DSP2, and DQ52 gene families exist in mouse immunoglobulin heavy chain diversity gene loci, of which DFL16 and DSP2 originate from the same primordial DH gene. *Eur. J. Immunol.* *19*, 1849–1854.

Imam, J.S., Gudikote, J.P., Chan, W.-K., and Wilkinson, M.F. (2010). Frame-disrupting mutations elicit pre-mRNA accumulation independently of frame disruption. *Nucleic Acids Res.* *38*, 1559–1574.

Ip, J.Y., Schmidt, D., Pan, Q., Ramani, A.K., Fraser, A.G., Odom, D.T., and Blencowe, B.J. (2011). Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Res.* *21*, 390–401.

Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L.E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* *106*, 607–617.

Isken, O., and Maquat, L.E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* *21*, 1833–1856.

Isken, O., and Maquat, L.E. (2008). The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 699–712.

Isken, O., Kim, Y.K., Hosoda, N., Mayeur, G.L., Hershey, J.W.B., and Maquat, L.E. (2008). Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* *133*, 314–327.

Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* *27*, 736–747.

J

Jäck, H.M., Berg, J., and Wabl, M. (1989). Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* *19*, 843–847.

Jankovic, M., Casellas, R., Yannoutsos, N., Wardemann, H., and Nussenzweig, M.C. (2004). RAGs and regulation of autoantibodies. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 485–501.

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.

Jhunjhunwala, 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., Little, A.J., Banerjee, J.K., Hao, B., Oltz, E.M., Krangel, M.S., and Schatz, D.G. (2010a). Promoters, enhancers, and transcription target RAG1 binding during V(D)J recombination. *J. Exp. Med.* *207*, 2809–2816.

Ji, Y., Resch, W., Corbett, E., Yamane, A., Casellas, R., and Schatz, D.G. (2010b). The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci. *Cell* *141*, 419–431.

Johnson, K., Angelin-Duclos, C., Park, S., and Calame, K.L. (2003). Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V(H) gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2438–2450.

Johnson, K., Pflugh, D.L., Yu, D., Hesslein, D.G.T., Lin, K.-I., Bothwell, A.L.M., Thomas-Tikhonenko, A., Schatz, D.G., and Calame, K. (2004). B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V(H) locus depends on Pax5. *Nat. Immunol.* *5*, 853–861.

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.

Jung, D., and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* *116*, 299–311.

Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 541–570.

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

Kadlec, J., Izaurralde, E., and Cusack, S. (2004). The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 330–337.

- Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307–313.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20, 355–367.
- Kashima, I., Jonas, S., Jayachandran, U., Buchwald, G., Conti, E., Lupas, A.N., and Izaurralde, E. (2010). SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 24, 2440–2450.
- Kenter, A.L., Feldman, S., Wuerffel, R., Achour, I., Wang, L., and Kumar, S. (2012). Three-dimensional architecture of the IgH locus facilitates class switch recombination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1267, 86–94.
- Kervestin, S., and Jacobson, A. (2012). NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 700–712.
- Khamlichi, A.A., Pinaud, E., Decourt, C., Chauveau, C., and Cogné, M. (2000). The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv. Immunol.* 75, 317–345.
- 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.
- Kim, S., Davis, M., Sinn, E., Patten, P., and Hood, L. (1981). Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged VH genes. *Cell* 27, 573–581.
- Kim, V.N., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* 293, 1832–1836.
- Klein, B.J., Bose, D., Baker, K.J., Yusoff, Z.M., Zhang, X., and Murakami, K.S. (2011). RNA polymerase and transcription elongation factor Spt4/5 complex structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 546–550.
- 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.
- Kofler, R., Duchosal, M.A., and Dixon, F.J. (1989). Complexity, polymorphism, and connectivity of mouse Vk gene families. *Immunogenetics* 29, 65–74.
- Kofler, R., Geley, S., Kofler, H., and Helmberg, A. (1992). Mouse variable-region gene families: complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses. *Immunol. Rev.* 128, 5–21.
- Kosak, S.T., and Groudine, M. (2004). Gene order and dynamic domains. *Science* 306, 644–647.

- 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.
- Kracker, S., Bergmann, Y., Demuth, I., Frappart, P.-O., Hildebrand, G., Christine, R., Wang, Z.-Q., Sperling, K., Digweed, M., and Radbruch, A. (2005). Nibrin functions in Ig class-switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 1584–1589.
- 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.
- Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., and Gehring, N.H. (2006). Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA* *12*, 1015–1022.
- Kurosawa, Y., and Tonegawa, S. (1982a). Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J. Exp. Med.* *155*, 201–218.
- Kurosawa, Y., and Tonegawa, S. (1982b). Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J. Exp. Med.* *155*, 201–218.
- Kuzin, I.I., Ugine, G.D., Wu, D., Young, F., Chen, J., and Bottaro, A. (2000). Normal isotype switching in B cells lacking the I mu exon splice donor site: evidence for multiple I mu-like germline transcripts. *J. Immunol.* *164*, 1451–1457.
- Kwon, J., Imbalzano, A.N., Matthews, A., and Oettinger, M.A. (1998). Accessibility of nucleosomal DNA to V(D)J cleavage is modulated by RSS positioning and HMG1. *Mol. Cell* *2*, 829–839.
- L**
- Lähdesmäki, A., Taylor, A.M.R., Chrzanowska, K.H., and Pan-Hammarström, Q. (2004). Delineation of the role of the Mre11 complex in class switch recombination. *J. Biol. Chem.* *279*, 16479–16487.
- Lam, K.P., and Rajewsky, K. (1999). B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J. Exp. Med.* *190*, 471–477.
- Lamond, A.I., and Earnshaw, W.C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* *280*, 547–553.
- Laubach, J., Richardson, P., and Anderson, K. (2011). Multiple myeloma. *Annu. Rev. Med.* *62*, 249–264.
- Lebecque, S.G., and Gearhart, P.J. (1990). Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J. Exp. Med.* *172*, 1717–1727.
- Lechouane, F., Bonaud, A., Delpy, L., Casola, S., Oruc, Z., Chemin, G., Cogné, M., and Sirac, C. (2013). B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 619–628.

- Lefranc, M.P., Pallarès, N., and Fripiat, J.P. (1999). Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus. *Hum. Genet.* *104*, 361–369.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* *37*, D1006–1012.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., and Maquat, L.E. (2002). The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* *21*, 3536–3545.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* *12*, 675–687.
- Lennon, G.G., and Perry, R.P. (1985). C mu-containing transcripts initiate heterogeneously within the IgH enhancer region and contain a novel 5'-nontranslatable exon. *Nature* *318*, 475–478.
- Li, S., and Wilkinson, M.F. (1998). Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* *8*, 135–141.
- Li, G., Alt, F.W., Cheng, H.-L., Brush, J.W., Goff, P.H., Murphy, M.M., Franco, S., Zhang, Y., and Zha, S. (2008). Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Mol. Cell* *31*, 631–640.
- Li, G., Zan, H., Xu, Z., and Casali, P. (2013). Epigenetics of the antibody response. *Trends Immunol.*
- Li, S.C., Rothman, P.B., Zhang, J., Chan, C., Hirsh, D., and Alt, F.W. (1994). Expression of I mu-C gamma hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int. Immunol.* *6*, 491–497.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 181–211.
- 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, H.X., Cartegni, L., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2001). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat. Genet.* *27*, 55–58.
- 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, X., Jiang, W., Dubois, R.L., Yamamoto, K., Wolner, Z., and Zha, S. (2012). Overlapping functions between XLF repair protein and 53BP1 DNA damage response factor in end joining and lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 3903–3908.

- 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.
- Livant, D., Blatt, C., and Hood, L. (1986). One heavy chain variable region gene segment subfamily in the BALB/c mouse contains 500-1000 or more members. *Cell* 47, 461–470.
- Lorenz, M., Jung, S., and Radbruch, A. (1995). Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 267, 1825–1828.
- Lorenz, W., Schäble, K.F., Thiebe, R., Stavnezer, J., and Zachau, H.G. (1988). The J kappa proximal region of the human K locus contains three uncommon V kappa genes which are arranged in opposite transcriptional polarities. *Mol. Immunol.* 25, 479–484.
- Lozano, F., Maertzdorf, B., Pannell, R., and Milstein, C. (1994). Low cytoplasmic mRNA levels of immunoglobulin kappa light chain genes containing nonsense codons correlate with inefficient splicing. *EMBO J.* 13, 4617–4622.
- 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.
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., and Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 144, 16–26.
- Luning Prak, E.T., Monestier, M., and Eisenberg, R.A. (2011). B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217, 96–121.
- Lutz, J., Heideman, M.R., Roth, E., van den Berk, P., Müller, W., Raman, C., Wabl, M., Jacobs, H., and Jäck, H.-M. (2011). Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10644–10649.
- Lutzker, S., and Alt, F.W. (1988). Structure and expression of germ line immunoglobulin gamma 2b transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1849–1852.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., and Steitz, J.A. (2000). Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121–1131.

M

- 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.
- Mainville, C.A., Sheehan, K.M., Klamann, L.D., Giorgetti, C.A., Press, J.L., and Brodeur, P.H. (1996). Deletional mapping of fifteen mouse VH gene families reveals a common organization for three Igh haplotypes. *J. Immunol.* 156, 1038–1046.

- Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W., and Tonegawa, S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* *24*, 353–365.
- Malin, S., McManus, S., Cobaleda, C., Novatchkova, M., Delogu, A., Bouillet, P., Strasser, A., and Busslinger, M. (2010). Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat. Immunol.* *11*, 171–179.
- Maquat, L.E. (1995). When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* *1*, 453–465.
- Maquat, L.E. (2002). NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes Dev.* *16*, 1743–1753.
- Maquat, L.E., and Li, X. (2001). Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA* *7*, 445–456.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007). The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 137–142.
- Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett.* *584*, 2572–2579.
- Martincic, K., Alkan, S.A., Cheatle, A., Borghesi, L., and Milcarek, C. (2009). Transcription elongation factor ELL2 directs immunoglobulin secretion in plasma cells by stimulating altered RNA processing. *Nat. Immunol.* *10*, 1102–1109.
- De la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A.R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol. Cell* *12*, 525–532.
- Mather, E.L., and Perry, R.P. (1983). Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 4689–4693.
- Matthews, A.G.W., Kuo, A.J., Ramón-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N., et al. (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* *450*, 1106–1110.
- Medghalchi, S.M., Frischmeyer, P.A., Mendell, J.T., Kelly, A.G., Lawler, A.M., and Dietz, H.C. (2001). *Rent1*, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 99–105.
- Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., and Busslinger, M. (2011). *Pax5*: a master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Adv. Immunol.* *111*, 179–206.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., et al. (2007). Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* *67*, 1783–1792.

- Melchers, F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 578–584.
- Mendell, J.T., Medghalchi, S.M., Lake, R.G., Noensie, E.N., and Dietz, H.C. (2000). Novel Upf2p orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 8944–8957.
- Mendell, J.T., ap Rhys, C.M.J., and Dietz, H.C. (2002). Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* *298*, 419–422.
- Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H.C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* *36*, 1073–1078.
- 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.
- Miller, J., Selsing, E., and Storb, U. (1982). Structural alterations in J regions of mouse immunoglobulin lambda genes are associated with differential gene expression. *Nature* *295*, 428–430.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2003). An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* *11*, 1405–1413.
- Mohn, F., Bühler, M., and Mühlemann, O. (2005). Nonsense-associated alternative splicing of T-cell receptor beta genes: no evidence for frame dependence. *RNA* *11*, 147–156.
- Moore, K.A., and Hollien, J. (2012). The unfolded protein response in secretory cell function. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 165–183.
- Moreau, P., Richardson, P.G., Cavo, M., Orłowski, R.Z., San Miguel, J.F., Palumbo, A., and Harousseau, J.-L. (2012). Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* *120*, 947–959.
- Morshead, K.B., Ciccone, D.N., Taverna, S.D., Allis, C.D., and Oettinger, M.A. (2003). Antigen receptor loci poised for V(D)J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 11577–11582.
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Kirillov, A., Pelanda, R., Cedar, H., Chess, A., and Bergman, Y. (1998). Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev.* *12*, 1801–1811.
- Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Rajewsky, K. (2004). The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* *118*, 539–544.
- Mühlemann, O., Mock-Casagrande, C.S., Wang, J., Li, S., Custódio, N., Carmo-Fonseca, M., Wilkinson, M.F., and Moore, M.J. (2001). Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol. Cell* *8*, 33–43.

Mühlemann, O., Eberle, A.B., Stalder, L., and Zamudio Orozco, R. (2008). Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 538–549.

Muhrad, D., and Parker, R. (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370, 578–581.

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.

N

Naeger, L.K., Schoborg, R.V., Zhao, Q., Tullis, G.E., and Pintel, D.J. (1992). Nonsense mutations inhibit splicing of MVM RNA in cis when they interrupt the reading frame of either exon of the final spliced product. *Genes Dev.* 6, 1107–1119.

Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K.S., and Karasuyama, H. (1997). The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 7, 559–570.

Nagy, E., and Maquat, L.E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* 23, 198–199.

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.

Nathanson, L., Xia, T., and Deutscher, M.P. (2003). Nuclear protein synthesis: a re-evaluation. *RNA* 9, 9–13.

Nicholson, P., and Mühlemann, O. (2010). Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1615–1620.

Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annual Review of Biochemistry* 76, 1–22.

Nowak, U., Matthews, A.J., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* 12, 160–166.

Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715–725.

Nutt, S.L., Thévenin, C., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 198, 227–235.

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.

Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P., and Ohno, S. (2003). Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* *12*, 1187–1200.

Okazaki, I., Okawa, K., Kobayashi, M., Yoshikawa, K., Kawamoto, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Kitawaki, Y., Taniguchi, H., Natsume, T., et al. (2011). Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 7920–7925.

Oksenysh, V., Alt, F.W., Kumar, V., Schwer, B., Wesemann, D.R., Hansen, E., Patel, H., Su, A., and Guo, C. (2012). Functional redundancy between repair factor XLF and damage response mediator 53BP1 in V(D)J recombination and DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 2455–2460.

Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., and Tarlinton, D.M. (2010). Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* *237*, 140–159.

Osipovich, O.A., Subrahmanyam, R., Pierce, S., Sen, R., and Oltz, E.M. (2009). Cutting edge: SWI/SNF mediates antisense Igh transcription and locus-wide accessibility in B cell precursors. *J. Immunol.* *183*, 1509–1513.

P

Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* *40*, 1413–1415.

Panigrahi, A.K., Goodman, N.G., Eisenberg, R.A., Rickels, M.R., Naji, A., and Luning Prak, E.T. (2008). RS rearrangement frequency as a marker of receptor editing in lupus and type 1 diabetes. *J. Exp. Med.* *205*, 2985–2994.

Papantonis, A., and Cook, P.R. (2013). Transcription Factories: Genome Organization and Gene Regulation. *Chem. Rev.*

Pavri, R., and Nussenzweig, M.C. (2011). AID targeting in antibody diversity. *Adv. Immunol.* *110*, 1–26.

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.

- Peixeiro, I., Inácio, Â., Barbosa, C., Silva, A.L., Liebhaber, S.A., and Romão, L. (2012). Interaction of PABPC1 with the translation initiation complex is critical to the NMD resistance of AUG-proximal nonsense mutations. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1160–1173.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R.M., Nemazee, D., and Rajewsky, K. (1997). Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity* *7*, 765–775.
- 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.
- Pennell, C.A., Sheehan, K.M., Brodeur, P.H., and Clarke, S.H. (1989). Organization and expression of VH gene families preferentially expressed by Ly-1+ (CD5) B cells. *Eur. J. Immunol.* *19*, 2115–2121.
- 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., Li, G., and Alt, F.W. (2008). Antisense transcripts from immunoglobulin heavy-chain locus V(D)J and switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 3843–3848.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., 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-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.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.
- 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.

Q

- Qiu, G., Harriman, G.R., and Stavnezer, J. (1999). Ialpha exon-replacement mice synthesize a spliced HPRT-C(alpha) transcript which may explain their ability to switch to IgA. Inhibition of switching to IgG in these mice. *Int. Immunol.* *11*, 37–46.

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., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., and Neuberger, M.S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol.* *12*, 1748–1755.
- Radcliffe, G., Lin, Y.C., Julius, M., Marcu, K.B., and Stavnezer, J. (1990). Structure of germ line immunoglobulin alpha heavy-chain RNA and its location on polysomes. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 382–386.
- Rajagopal, D., Maul, R.W., Ghosh, A., Chakraborty, T., Khamlichi, A.A., Sen, R., and Gearhart, P.J. (2009). Immunoglobulin switch mu sequence causes RNA polymerase II accumulation and reduces dA hypermutation. *J. Exp. Med.* *206*, 1237–1244.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* *381*, 751–758.
- 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.
- Rehwinkel, J., Raes, J., and Izaurralde, E. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 639–646.
- Reina-San-Martin, B., Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R.F., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2003). H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *197*, 1767–1778.
- Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J. Exp. Med.* *200*, 1103–1110.
- Reina-San-Martin, B., Nussenzweig, M.C., Nussenzweig, A., and Difilippantonio, S. (2005). Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 1590–1595.
- 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.
- Retter, M.W., and Nemazee, D. (1998). Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J. Exp. Med.* *188*, 1231–1238.

- 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.
- 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.
- Rogers, J., Choi, E., Souza, L., Carter, C., Word, C., Kuehl, M., Eisenberg, D., and Wall, R. (1981). Gene segments encoding transmembrane carboxyl termini of immunoglobulin gamma chains. *Cell* *26*, 19–27.
- 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.
- Rolink, A., ten Boekel, E., Melchers, F., Fearon, D.T., Krop, I., and Andersson, J. (1996). A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* *183*, 187–194.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2013). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* *210*, 1501–1507.
- Rufener, S.C., and Mühlemann, O. (2013). eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 710–717.
- 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.
- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M., and Tonegawa, S. (1981). Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* *290*, 562–565.
- Samara, M., Oruc, Z., Dougier, H.-L., Essawi, T., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2006). Germ line transcription in mice bearing neor gene downstream of Iggamma3 exon in the Ig heavy chain locus. *Int. Immunol.* *18*, 581–589.
- Sanchez, P., Marche, P.N., Le Guern, C., and Cazenave, P.A. (1987). Structure of a third murine immunoglobulin lambda light chain variable region that is expressed in laboratory mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 9185–9188.
- Santos, P., Arumemi, F., Park, K.S., Borghesi, L., and Milcarek, C. (2011). Transcriptional and epigenetic regulation of B cell development. *Immunol. Res.* *50*, 105–112.

- Sayegh, C.E., Sayegh, C., Jhunjunwala, S., Riblet, R., and Murre, C. (2005). Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev.* *19*, 322–327.
- Schatz, 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.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* *59*, 1035–1048.
- Schell, T., Köcher, T., Wilm, M., Seraphin, B., Kulozik, A.E., and Hentze, M.W. (2003). Complexes between the nonsense-mediated mRNA decay pathway factor human upf1 (up-frameshift protein 1) and essential nonsense-mediated mRNA decay factors in HeLa cells. *Biochem. J.* *373*, 775–783.
- Schilling, J., Clevinger, B., Davie, J.M., and Hood, L. (1980). Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature* *283*, 35–40.
- Schlissel, M.S. (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 890–899.
- Schoenberg, D.R., and Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 246–259.
- 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. (2011). Role of PTIP in class switch recombination and long-range chromatin interactions at the immunoglobulin heavy chain locus. *Mol. Cell Biol.* *31*, 1503–1511.
- Schweingruber, C., Rufener, S.C., Zünd, D., Yamashita, A., and Mühlemann, O. (2013). Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 612–623.
- Seidman, J.G., Leder, A., Edgell, M.H., Polsky, F., Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., and Leder, P. (1978). Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *75*, 3881–3885.
- Sekiguchi, J.M., and Ferguson, D.O. (2006). DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* *124*, 260–262.
- Selimyan, R., Gerstein, R.M., Ivanova, I., Precht, P., Subrahmanyam, R., Perlot, T., Alt, F.W., and Sen, R. (2013). Localized DNA demethylation at recombination intermediates during immunoglobulin heavy chain gene assembly. *PLoS Biol.* *11*, e1001475.

- Serin, G., Gersappe, A., Black, J.D., Aronoff, R., and Maquat, L.E. (2001). Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.* *21*, 209–223.
- Shapiro, M.A., and Weigert, M. (1987). How immunoglobulin V kappa genes rearrange. *J. Immunol.* *139*, 3834–3839.
- Shell, S.A., Martincic, K., Tran, J., and Milcarek, C. (2007). Increased phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II and loading of polyadenylation and cotranscriptional factors contribute to regulation of the ig heavy chain mRNA in plasma cells. *J. Immunol.* *179*, 7663–7673.
- Shibuya, T., Tange, T.Ø., Sonenberg, N., and Moore, M.J. (2004). eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 346–351.
- Shih, H.-Y., and Krangel, M.S. (2013). Chromatin architecture, CCCTC-binding factor, and V(D)J recombination: managing long-distance relationships at antigen receptor loci. *J. Immunol.* *190*, 4915–4921.
- 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.
- Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* *247*, 52–63.
- Shukla, S., and Oberdoerffer, S. (2012). Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 673–683.
- Silva, A.L., Ribeiro, P., Inácio, A., Liebhaber, S.A., and Romão, L. (2008). Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* *14*, 563–576.
- Siminovitch, K.A., Bakhshi, A., Goldman, P., and Korsmeyer, S.J. (1985). A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature* *316*, 260–262.
- Siminovitch, K.A., Moore, M.W., Durdik, J., and Selsing, E. (1987). The human kappa deleting element and the mouse recombining segment share DNA sequence homology. *Nucleic Acids Res.* *15*, 2699–2705.
- Singh, G., Jakob, S., Kleedehn, M.G., and Lykke-Andersen, J. (2007). Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm. *Mol. Cell* *27*, 780–792.
- Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* *6*, e111.

- 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, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur. J. Immunol.* *26*, 444–448.
- Stalder, L., and Mühlemann, O. (2007). Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin micro genes requires translation of its mRNA. *J. Biol. Chem.* *282*, 16079–16085.
- 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., 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., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 261–292.
- Stavnezer-Nordgren, J., and Sirlin, S. (1986). Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO J.* *5*, 95–102.
- Storb, U., and Arp, B. (1983). Methylation patterns of immunoglobulin genes in lymphoid cells: correlation of expression and differentiation with undermethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *80*, 6642–6646.
- Storb, U., Haasch, D., Arp, B., Sanchez, P., Cazenave, P.A., and Miller, J. (1989). Physical linkage of mouse lambda genes by pulsed-field gel electrophoresis suggests that the rearrangement process favors proximate target sequences. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 711–718.
- Strohhal, R., Helmberg, A., Kroemer, G., and Kofler, R. (1989). Mouse V_k gene classification by nucleic acid sequence similarity. *Immunogenetics* *30*, 475–493.
- Stubbington, 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, I.-H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovskiy, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* *4*, 124–131.

Subrahmanyam, R., Du, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Ji, Y., Zhang, Y., Alt, F.W., Schatz, D.G., and Sen, R. (2012). Localized epigenetic changes induced by DH recombination restricts recombinase to DJH junctions. *Nat. Immunol.* *13*, 1205–1212.

Sun, X., Perlick, H.A., Dietz, H.C., and Maquat, L.E. (1998). A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 10009–10014.

T

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.

Tange, T.Ø., Shibuya, T., Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2005). Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* *11*, 1869–1883.

Tazi, J., Durand, S., and Jeanteur, P. (2005). The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 469–478.

Thiebe, R., Schäble, K.F., Bensch, A., Brensing-Küppers, J., Heim, V., Kirschbaum, T., Mitlöhner, H., Ohnrich, M., Pourrajabi, S., Röschenthaler, F., et al. (1999). The variable genes and gene families of the mouse immunoglobulin kappa locus. *Eur. J. Immunol.* *29*, 2072–2081.

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.

Trcek, T., Sato, H., Singer, R.H., and Maquat, L.E. (2013). Temporal and spatial characterization of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* *27*, 541–551.

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.

De Turris, V., Nicholson, P., Orozco, R.Z., Singer, R.H., and Mühlemann, O. (2011). Cotranscriptional effect of a premature termination codon revealed by live-cell imaging. *RNA* *17*, 2094–2107.

U

Unterholzner, L., and Izaurralde, E. (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* *16*, 587–596.

V

Vela, J.L., Aït-Azzouzene, D., Duong, B.H., Ota, T., and Nemazee, D. (2008). Rearrangement of mouse immunoglobulin kappa deleting element recombining sequence promotes immune tolerance and lambda B cell production. *Immunity* *28*, 161–170.

Verma-Gaur, J., Torkamani, A., Schaffer, L., Head, S.R., Schork, N.J., and Feeney, A.J. (2012). Noncoding transcription within the Igh distal V(H) region at PAIR elements affects the 3D structure of the Igh locus in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 17004–17009.

Vettermann, C., and Schlissel, M.S. (2010). Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol. Rev.* *237*, 22–42.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.

Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* *116*, 1895–1898.

Vuong, B.Q., Lee, M., Kabir, S., Irimia, C., Macchiarulo, S., McKnight, G.S., and Chaudhuri, J. (2009). Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination. *Nat. Immunol.* *10*, 420–426.

W

Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* *136*, 701–718.

Wang, J., Chang, Y.F., Hamilton, J.I., and Wilkinson, M.F. (2002a). Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol. Cell* *10*, 951–957.

Wang, J., Hamilton, J.I., Carter, M.S., Li, S., and Wilkinson, M.F. (2002b). Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. *Science* *297*, 108–110.

Wang, L., Whang, N., Wuerffel, R., and Kenter, A.L. (2006). AID-dependent histone acetylation is detected in immunoglobulin S regions. *J. Exp. Med.* *203*, 215–226.

Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A.A., and Kenter, A.L. (2009). S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J. Exp. Med.* *206*, 1817–1830.

Weichhold, G.M., Klobeck, H.G., Ohnheiser, R., Combriato, G., and Zachau, H.G. (1990). Megabase inversions in the human genome as physiological events. *Nature* *347*, 90–92.

Weichhold, G.M., Ohnheiser, R., and Zachau, H.G. (1993). The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics* 16, 503–511.

Weigert, M., Gatmaitan, L., Loh, E., Schilling, J., and Hood, L. (1978). Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* 276, 785–790.

Weischenfeldt, J., Damgaard, I., Bryder, D., Theilgaard-Mönch, K., Thoren, L.A., Nielsen, F.C., Jacobsen, S.E.W., Nerlov, C., and Porse, B.T. (2008). NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes Dev.* 22, 1381–1396.

Wilkinson, M.F., and Shyu, A.-B. (2002). RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat. Cell Biol.* 4, E144–147.

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.

Wittmann, J., Hol, E.M., and Jäck, H.-M. (2006). hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1272–1287.

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, C.-R., and Feeney, A.J. (2009). The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *J. Immunol.* 182, 1362–1369.

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, 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.

Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531.

Xue, K., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2006). The in vivo pattern of AID targeting to immunoglobulin switch regions deduced from mutation spectra in *msh2*^{-/-} *ung*^{-/-} mice. *J. Exp. Med.* 203, 2085–2094.

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.

Yamashita, A., Ohnishi, T., Kashima, I., Taya, Y., and Ohno, S. (2001). Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* *15*, 2215–2228.

Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 1054–1063.

Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., et al. (2009). SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* *23*, 1091–1105.

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., and Alt, F.W. (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu. Rev. Immunol.* *4*, 339–368.

Yang, Q., Riblet, R., and Schildkraut, C.L. (2005). Sites that direct nuclear compartmentalization are near the 5' end of the mouse immunoglobulin heavy-chain locus. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6021–6030.

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

Zachau, H.G. (1993). The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene* *135*, 167–173.

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.

Zha, S., Guo, C., Boboila, C., Oksenysh, V., Cheng, H.-L., Zhang, Y., Wesemann, D.R., Yuen, G., Patel, H., Goff, P.H., et al. (2011). ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature* 469, 250–254.

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.

Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., LaDuca, J.P., and Maquat, L.E. (1998a). At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5272–5283.

Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., and Maquat, L.E. (1998b). Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA* 4, 801–815.

