

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Sciences

Ecole Doctorale ED 258

UMR CNRS 6101 – Laboratoire d'Immunologie

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Option : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Laurence GUGLIELMI

Le 25 septembre 2003

Modèles *in vivo* pour l'étude de la régulation transcriptionnelle
par les activateurs du locus IgH.

Directeur de Thèse : Yves Denizot, chargé de recherche INSERM, Limoges

soutenue devant le jury composé de :

Président : **Monsieur Raymond Julien** – Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs : **Madame Michèle Goodhardt** – Directeur de recherche CNRS, Paris

Monsieur Jean-Christophe Bories – Chargé de recherche INSERM, Paris

Examineurs : **Monsieur Michel Cogné** – Professeur, Université de Limoges

Monsieur Yves Denizot – Chargé de recherche INSERM, Limoges

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury, Madame Goodhardt et Monsieur Bories qui ont accepté de juger ce travail, Monsieur Julien qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Je suis très reconnaissante à Michel Cogné de m'avoir chaleureusement accueillie dans son laboratoire et pour tout le soutien dont il m'a témoigné.

Je remercie Yves Denizot de m'avoir dirigée tout au long de mon travail, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées durant ces trois années de thèse.

Je remercie tous les membres de l'unité, passés et présents, qui ont fait régner une ambiance conviviale dans le laboratoire : Eric, Laurent, Horia, Christophe, Florence, Zeliha, Cathy (merci pour ton accueil à mon arrivée), Caro, Carla, Vincent et les petits nouveaux, Cécile, Stéphane, et Jacques.

Durant ma dernière année de thèse, j'ai pris un très grand plaisir à travailler avec Véronique dont j'ai beaucoup apprécié la bonne humeur et avec qui j'ai pu partager les doutes mais également les avancées dans nos recherches.

Je n'oublie pas le second : Stéphanie, Christophe et Bertrand, et le sixième : Isabelle, Barbara et Fabrice, et nos voisins du troisième : Eliza et Emilie.

Mes plus profonds remerciements vont à Hei-Lanne et Thomas qui m'ont soutenue et supportée pendant ces trois années et avec qui j'ai partagé les mauvais mais surtout de très bons moments. Leur amitié est précieuse et a été d'un grand réconfort.

Un très grand merci au Paulot sur qui j'ai toujours pu compter et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. J'ai énormément appris grâce à lui. Merci pour sa disponibilité, et sa patience (et pardon pour ma mauvaise humeur) ...

Un grand merci à ma mère et ma sœur Claire pour avoir présidé tant de comités de soutien. Leur présence (malgré la distance parfois) et leurs encouragements ont été inestimables.

Une pensée pour Fabien qui a su veiller à ce que rien n'échappe à cette thèse ...

Résumé en français

L'étude de la régulation transcriptionnelle du locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) est rendue particulièrement complexe par l'existence d'éléments *cis*-régulateurs multiples situés non seulement en 5' mais également en 3' du locus. Chez la souris, la région 3' comporte quatre activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dont l'association constitue une "Région de Contrôle du Locus" (LCR). *In vitro*, ils se comportent comme de puissants co-activateurs de l'élément intronique E μ , situé en 5' du locus.

Dans une première étude, nous avons montré qu'*in vitro* la région 3'IgH se comporte comme une LCR "partielle" ne permettant pas un niveau d'expression d'un transgène associé dépendant du nombre de copies intégrées dans des lignées cellulaires B de souris. Nous avons alors testé la possibilité de recourir à des isolateurs, éléments régulateurs de la transcription ayant pour propriété de protéger un gène de signaux inappropriés émanant des séquences alentours, ainsi que des effets répressifs de la chromatine adjacente. Ainsi, nous avons flanqué nos vecteurs d'expression d'un isolateur du locus de la β -globine de poulet : l'expression des différents vecteurs étudiés devient alors dépendante du nombre de copies intégrées permettant alors à la région 3' IgH de se comporter comme une LCR totale. Les isolateurs semblent ainsi être des outils intéressants pour l'étude de transgènes intégrés de façon aléatoire dans le génome.

Parallèlement, nous avons développé des modèles de souris transgéniques afin d'étudier *in vivo* la contribution des régions régulatrices 5' et 3' dans la modulation de l'expression du locus IgH au cours de la lymphopoïèse B. Les transgènes associent le gène rapporteur *GFP* soit à E μ , soit à la LCR, ou bien à l'association de ces deux régions régulatrices. Nos résultats montrent que, seuls, la LCR ou E μ ne permettent pas une expression du gène rapporteur *GFP*. En revanche, leur association entraîne une activation de la transcription, confirmant ainsi que les régions 5' et 3' IgH agissent en synergie afin d'obtenir une activité transcriptionnelle maximale. Les souris E μ -GFP-LCR présentent une expression du transgène spécifique dans la lignée lymphocytaire B. Cette expression débute à un stade très précoce de la différenciation B puisque des cellules fluorescentes (GFP⁺) pro-B sont détectées, et elle se poursuit tout au long du développement jusqu'au stade de cellules B matures. Pour éviter le phénomène d'inactivation, le vecteur GFP-LCR a été flanqué de l'isolateur de poulet. L'expression du transgène a alors pu être observée au sein de la lignée B, ne débutant qu'au stade pré-B et se prolongeant au stade B mature.

Abstract

***In vivo* models of transcriptional regulation by the IgH locus activators**

Four transcriptional enhancers (namely hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) lie downstream the murin immunoglobulin heavy chain (IgH) locus. It has been suggested that they altogether act as a Locus Control Region (LCR). *In vitro*, they are powerful co-activators of the E μ intronic enhancer, located at the 5' regulatory region of the locus.

We generated transgenic mice in order to study the contribution of the 5' and 3' regulatory regions in modulating the IgH locus expression. Transgenes harbor a VH promoter-*GFP* reporter gene linked either to all four 3' IgH enhancers, or to the E μ element, or to the association of these two regions. We show that the LCR or E μ used alone, do not permit *GFP* expression. However, their association activates transcription, confirming their synergy. E μ -*GFP*-LCR transgenic mice show a B cell lineage specific expression starting in pro-B cells and continuing all along differentiation until mature B cells. To avoid silencing, the *GFP*-LCR vector was flanked by insulators. Its expression was then detected within the B lineage, beginning only at the pre-B cell stage and prolonging to the mature B cell stage.

Keywords : B lymphocytes, gene expression, transcriptional activators, *GFP*

Table des matières

INTRODUCTION.....	7
PARTIE I : La différenciation des lymphocytes B	9
I Réarrangements des gènes d'immunoglobulines.....	9
II Les différents stades du développement B.....	12
1 Les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP).....	12
2 Du CLP au lymphocyte B immature	13
1.1 Le stade pré-pro-B.....	13
1.2 Le stade pro-B	15
1.3 Le stade pré-B	16
1.4 Le stade B immature	18
3 Les étapes finales de la différenciation	19
1.1 La commutation isotypique.....	19
1.2 L'hypermutation somatique.....	20
III Régulation de la différenciation lymphocytaire B	21
1 Rôle des cytokines et des récepteurs de cytokines.....	21
2 Implication des facteurs de transcription	23
1.1 Ikaros.....	25
1.2 PU.1.....	25
1.3 E2A et EBF	26
1.4 c-Myb	26
1.5 Pax5.....	26
1.6 LEF-1	28
PARTIE II : La Régulation de l'Expression des Gènes d'Ig.....	29
I Les promoteurs	30
II Le promoteur-activateur compris dans l'élément DQ52.....	32
III L'activateur transcriptionnel intronique E μ	33
1 Rôle de E μ dans les recombinaisons V(D)J.....	35
2 Rôle des régions MAR	36
IV La région régulatrice située en 3' du locus IgH.....	37
1 Région de Contrôle du Locus.....	39
2 Activité de la région 3' IgH au cours de l'ontogénie B.....	40

3	Synergies entre les éléments 3' IgH.....	42
4	Fonctions proposées pour la région régulatrice 3'IgH.....	42
1.1	Commutation de classe.....	42
1.2	Hypermutation somatique	43
1.3	Expression des chaînes lourdes	43
1.4	Structure de la chromatine.....	44
PARTIE III : Mécanismes Moléculaires de la Régulation de l'Expression des Gènes		46
I	Structure et organisation.....	47
II	Le système d'acétylation/déacétylation de la chromatine	47
1	Acétylation et transcription	47
2	Acétylation et recombinaison.....	48
III	La méthylation.....	48
1	Méthylation et réplication de l'ADN	49
2	Méthylation et répression de la transcription	50
3	Déméthylation et recombinaison.....	51
IV	Un mot sur les isolateurs	52
RESULTATS		55
ARTICLE 1		55
ARTICLE 2		56
ARTICLE 3		57
ARTICLE 4		58
DISCUSSION et PERSPECTIVES		59
DISCUSSION		61
I	Synergies entre les différents éléments activateurs du locus IgH	61
II	Etude de la spécificité tissulaire de la fonction des activateurs	64
III	Inactivation des transgènes.....	65
PERSPECTIVES.....		68
I	Etude de l'activateur hs4 à l'aide de souris knock-out.....	68
II	Transgènes <i>c-myc</i>	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		70

INTRODUCTION

La réponse immunitaire des vertébrés supérieurs comprend un ensemble complexe d'évènements cellulaires et moléculaires destinés à neutraliser spécifiquement l'agent infectieux (bactérie, virus, parasite), la greffe incompatible ou la cellule tumorale. La plupart des cellules du système immunitaire sont d'origine hématopoïétique et dérivent d'une même cellule souche. Seuls les lymphocytes T et B, deux lignées cellulaires bien distinctes, expriment à leur surface des récepteurs capables de reconnaître les antigènes cibles : les récepteurs de cellules T (TCR) et les immunoglobulines (Ig) respectivement. Chaque cellule T ou B exprime un récepteur unique.

Les Ig sont des tétramères protéiques composés de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques et deux chaînes légères (L pour Light) identiques reliées entre elles par des ponts disulfures (figure 1). La plupart des vertébrés possède deux types de chaînes légères, appelés κ et λ , qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , α , ϵ). La comparaison des séquences protéiques de chaînes lourdes et légères a permis de distinguer deux régions rendant compte de la dualité structurale et fonctionnelle des Ig. La partie amino-terminale est très différente d'une chaîne à une autre et est appelée région variable V. Elle définit le site de fixation à l'antigène. La partie carboxy-terminale est, elle, très conservée entre les chaînes légères d'un même type et les chaînes lourdes d'une même classe. Cette région constante C confère à l'Ig ses fonctions effectrices.

Les mécanismes moléculaires conduisant à la synthèse des Ig par les cellules de la lignée lymphocytaire B sont particulièrement complexes. La capacité des cellules à produire un vaste répertoire de récepteurs pour l'antigène est due, notamment, à une série de réarrangements intra-géniques appelés recombinaisons V(D)J. Ce processus se met en place au cours des étapes précoces du développement lymphocytaire et permet l'assemblage de segments de gènes V (variable), J (jonction) et D (diversité), qui s'associent de façon aléatoire afin de générer un nouvel exon codant pour les parties variables des Ig (réarrangements V_LJ_L pour les chaînes légères et V_HDJ_H pour les chaînes lourdes).

Les réarrangements et l'expression des gènes d'Ig se déroulent selon une cinétique ordonnée et sont contrôlés à trois niveaux distincts :

1) *la lignée cellulaire*. Les Ig ne sont exprimées que par les lymphocytes B.

2) *le stade de la différenciation cellulaire*. Au sein d'une lignée cellulaire, les recombinaisons et l'expression des gènes d'Ig sont précisément ordonnées selon le stade du développement de la cellule. Ainsi, classiquement, les réarrangements et l'expression des gènes du locus IgH précèdent les réarrangements et l'expression des gènes codant pour les chaînes légères. De plus, au sein du locus IgH, les réarrangements des segments géniques sont temporellement régulés : les segments D et J_H sont réarrangés dans un premier temps, avant que ce produit de recombinaison D-J_H ne fusionne avec un segment génique V_H.

3) *exclusion allélique*. Le réarrangement complet sur un des allèles, aboutissant à la formation d'un produit V_HDJ_H ou V_LJ_L codant, entraîne l'inhibition du réarrangement sur l'autre allèle.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle du locus IgH au cours du développement des lymphocytes B. Pour cela, nous avons étudié *in vivo* l'implication des différents activateurs transcriptionnels situés en 5' et 3' du locus dans la spécificité cellulaire de l'expression des gènes de chaînes lourdes d'Ig. Nous avons également analysé les stades du développement B au cours desquels ces éléments régulateurs étaient activés.

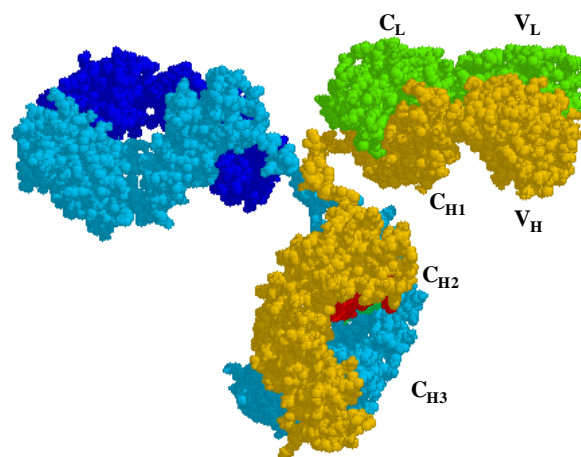


Figure 1 : Représentation tri-dimensionnelle d'une IgG2a de souris.

Les chaînes lourdes sont colorées en jaune et turquoise, les chaînes légères en vert et violet.

Les glycosylations sont indiquées en rouge.

PARTIE I : La différenciation des lymphocytes B

I Réarrangements des gènes d'immunoglobulines

Les régions variables des anticorps sont codées par l'association d'un segment V, d'un segment D pour les chaînes lourdes, et d'un segment J, par un mécanisme appelé "recombinaison V(D)J". Le grand nombre de segments V, D et J disponibles, les multiples combinaisons entre ces éléments (diversité combinatoire) ainsi que l'imprécision de leurs jonctions (diversité jonctionnelle) contribuent considérablement à la diversité des anticorps. Ces réarrangements, comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre, ont lieu aux stades précoces de l'ontogénie B et sont essentiels au bon déroulement de la différenciation des lymphocytes B.

Les recombinaisons entre les différents segments codant les régions variables des gènes de chaîne lourde et légère s'effectuent à des sites spécifiques nommés RSS (séquence signal de recombinaison) constitués de deux motifs consensuels de sept et neuf nucléotides très conservés (heptamère et nonamère) séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides (Tonegawa, 1983). La recombinaison ne peut s'effectuer qu'entre RSS possédant un séparateur de taille différente (règle 12/23). Les RSS sont disposées en 5' et/ou 3' des segments à assembler de façon à ce que les recombinaisons ne puissent se faire qu'entre segments D et J puis V et D pour les chaînes lourdes, et qu'entre V et J pour les chaînes légères.

Les recombinaisons V(D)J mettent en jeu une machinerie enzymatique composée des protéines RAG-1 et RAG-2 (pour "Recombinaison Activating Gene") (Schatz *et al.*, 1989 ; Oettinger *et al.*, 1990). Ces deux protéines sont exprimées de manière simultanée, exclusivement dans les lymphocytes B et T, et spécifiquement au stade du développement où les gènes des récepteurs antigéniques sont réarrangés. Elles interviennent ainsi dans l'assemblage aussi bien des régions variables des gènes d'Ig que de celles du récepteur des cellules T. La recombinase a pour cible les RSS et est nécessaire et suffisante au ciblage du processus de recombinaison V(D)J dès lors que les gènes d'Ig sont "accessibles" aux réarrangements. Bien que les protéines RAG-1 et -2, par elles seules, soient capables de

s'associer aux RSS et de réaliser des coupures *in vitro* (van Gent *et al.*, 1996), l'efficacité de ces réactions est cependant largement favorisée par la présence des protéines architecturales HMG-1 et HMG-2 (High mobility group protein) (Sawchuk *et al.*, 1997 ; van Gent *et al.*, 1997).

Schématiquement, la réaction de recombinaison peut être subdivisée en deux phases (pour revue : Bogue et Roth, 1996) (figure 2). Dans une première étape, les protéines RAG-1 et -2 reconnaissent et assemblent en un "complexe synaptique" les RSS asymétriques de deux segments de gènes, puis induisent une cassure double brin de l'ADN. Chaque clivage conduit à la production d'une extrémité franche au niveau des RSS et d'une structure intermédiaire en "épingle à cheveu" au niveau de la séquence codante. Dans une seconde étape, les cassures sont identifiées, traitées et réarrangées par la machinerie ubiquitaire de réparation de l'ADN. De manière générale, les extrémités codantes sont rapidement assemblées en jonctions codantes. Ce processus implique l'ouverture de la structure en épingle et des modifications favorisant la diversité des récepteurs antigéniques par l'addition et/ou la délétion de nucléotides. En effet, des nucléotides P (palindromiques) sont ajoutés lors du clivage asymétrique des épingles à cheveux. La diversité N (nucléotides) résulte, quant à elle, de l'élimination puis de l'ajout de nouveaux nucléotides par la déoxynucléotidyl terminale transférase (TdT ; pour revue : Gilfillan *et al.*, 1995). Ces insertions N se font de façon aléatoire, sans matrice d'ADN, mais présentent toutefois un biais pour les résidus GC qui sont préférentiellement intégrés. La TdT est exprimée précocement dans la différenciation B, au stade pro-B, lors des réarrangements des gènes du locus IgH. Ainsi, la diversité N est limitée aux chaînes lourdes des Ig. Les extrémités sont ensuite liées pour former une jonction codante. Cette étape de réparation de l'ADN, moins bien caractérisée que la précédente, a pour acteur central le complexe Ku/DNA-PK dont l'un des rôles aux sites de lésion serait le recrutement et l'activation d'enzymes participant à la réparation proprement dite (Ligase IV, le facteur XRCC4, TdT...).

Si un cadre de lecture ouvert est obtenu, l'exon variable V(D)J ainsi formé sera transcrit. L'ARN sera ensuite épissé puis traduit pour permettre la synthèse d'une chaîne lourde ou légère.

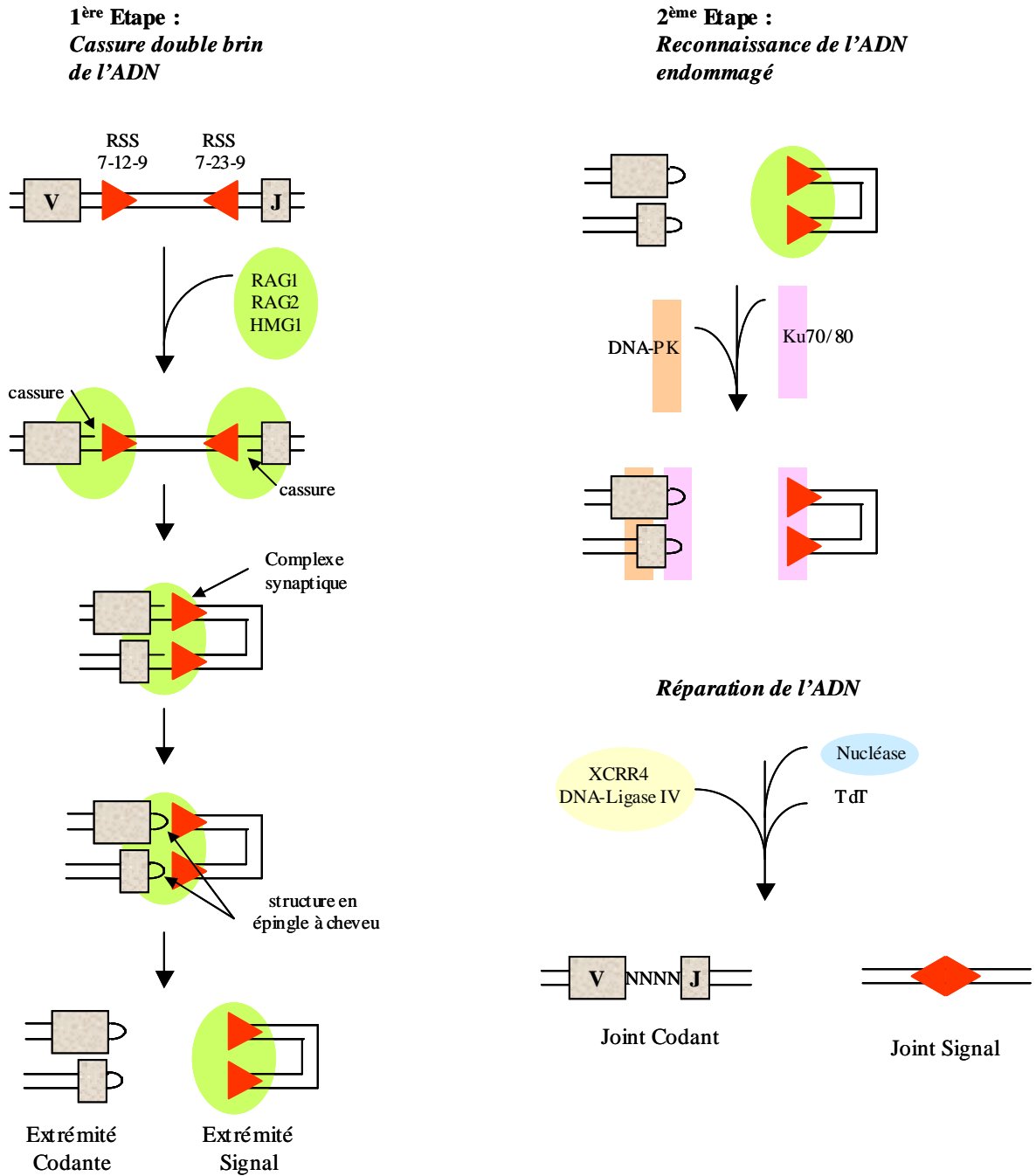


Figure 2 : La réaction de recombinaison V(D)J se produit en deux phases distinctes. Les segments codants et les RSS sont représentés par des rectangles et des triangles respectivement. La machinerie de recombinaison est symbolisée par un ovale (adapté de Hesslein et Schatz, 2001).

II Les différents stades du développement B

Les étapes de différenciation qui conduisent la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B immature se déroulent dans la moelle osseuse en l'absence de stimulation antigénique. Elles dépendent de processus complexes comprenant les remaniements des segments de gènes codant pour le récepteur de l'antigène ainsi que des interactions avec les cellules stromales de la moelle osseuse. Les stades de différenciation suivants se déroulent en périphérie et impliquent une migration à travers les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, amygdale,...). Ces étapes de maturation sont dépendantes de l'antigène et de la costimulation par divers facteurs et cytokines. Elles conduisent les lymphocytes B immatures vers les stades ultimes de différenciation caractérisés par l'acquisition de mutations somatiques, la commutation isotypique, et l'émergence de plasmocytes et de cellules dites "à mémoire".

1 Les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP)

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont à l'origine de toutes les cellules sanguines y compris les lymphocytes (Spangrude *et al.*, 1988). Elles sont caractérisées par leur potentiel de différenciation en de multiples lignées, ainsi que par leur grande capacité d'auto-renouvellement. Les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) issus des HSC sont produits dans le foie fœtal pendant la gestation, puis dans la moelle osseuse après la naissance.

De nombreuses équipes ont tenté de caractériser les progéniteurs de foie fœtal et de moelle osseuse. Sagara et coll. (1997) ont identifié, chez la souris, une population purifiée par fractionnement des cellules de foie fœtal capable de produire des lymphocytes T et B, mais aussi des macrophages appartenant à la lignée myéloïde. Cette population exprime les marqueurs de surface c-kit (récepteur au SCF, appelé également CD117), CD44, le récepteur à l'IL-7 (IL-7R) et B220 mais n'exprime pas les antigènes Thy1, CD3, CD4 et CD8. Une seconde étude, menée par Kondo et coll. (1997), a permis d'isoler, à partir de cellules de moelle osseuse de souris, une population $\text{Lin}^- \text{IL7R}^+ \text{Thy1}^- \text{Sca-1}^{\text{lo}} \text{c-kit}^{\text{lo}}$ qui possède la capacité de reconstituer de façon restreinte la lignée lymphoïde (cellules T, B et NK) *in vivo*. Elle est

en revanche totalement incapable de se différencier en cellules de la lignée myéloïde et érythroïde aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ces deux études soutiennent l'existence d'un progéniteur lymphoïde commun chez la souris. Chez l'homme, les cellules T, B, NK ainsi que les cellules dendritiques dérivent également d'un progéniteur commun de la moelle osseuse (Galy *et al.*, 1995).

2 Du CLP au lymphocyte B immature

Cette phase du développement dépend notamment de la possibilité pour un progéniteur B d'aboutir à des réarrangements efficaces des gènes codant pour les chaînes légères et les chaînes lourdes. Elle conduit donc à la synthèse et à l'expression à la membrane d'une Ig fonctionnelle. La différenciation progresse de la périphérie vers le centre de la moelle osseuse et les principales étapes peuvent être suivies selon l'état de réarrangement des gènes d'Ig et d'après l'expression ou la perte à la surface cellulaire de marqueurs de différenciation. Les différents stades du développement chez la souris sont représentés dans la figure 3.

1.1 *Le stade pré-pro-B*

Dans la moelle osseuse, les précurseurs B les plus immatures constituent une sous-population de cellules exprimant les marqueurs B220, c-kit et CD43 mais pas le marqueur CD19 (Hardy *et al.*, 1991 ; Rolink *et al.*, 1996a), l'ensemble des cellules B220⁺CD19⁻ n'étant pas totalement engagées dans la voie B. Ces cellules, appelées pré-pro-B, ont été caractérisées par Li et coll. (1996). Elles n'ont pas encore réarrangé les gènes d'Ig et expriment fortement le transcrit JH1 germinale (parfois appelé μ o). Ce transcrit, initié en amont de DQ52 et JH1, est issu d'un épissage entre le segment JH1 et le premier exon C μ et constitue l'une des manifestations les plus précoces de l'engagement dans la voie B (Alessandrini et Desiderio, 1991 ; Schlissel *et al.*, 1991a). Les cellules pré-pro-B expriment très faiblement les gènes *RAG-1* et *RAG-2*, laissant ainsi supposer que l'accessibilité des gènes d'Ig précède l'activité de recombinaison. Enfin, l'expression du gène *B29* codant pour Ig α , molécule importante pour la transduction du signal via le récepteur d'antigène, est détectée dès ce stade. Les cellules sont également capables de survivre et de se différencier en cellules pro-B et pré-B lorsqu'elles sont mises en culture en présence de cellules stromales.

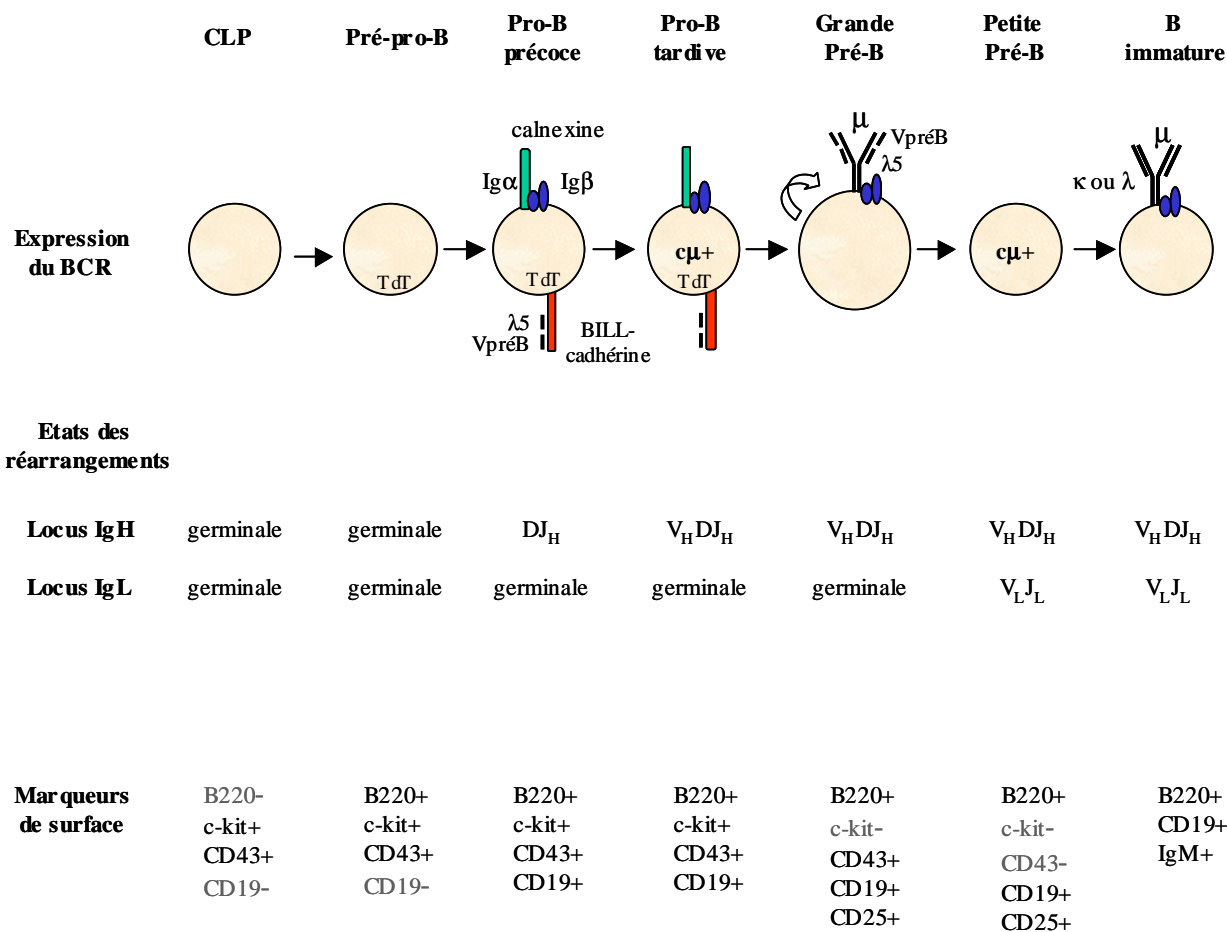


Figure 3 : Les étapes précoces de la différenciation des cellules B chez la souris.

1.2 *Le stade pro-B*

C'est à ce stade que les réarrangements des gènes d'Ig se mettent en place, selon une cinétique contrôlée, permettant ainsi de distinguer deux populations.

- Les réarrangements débutent au locus IgH par la jonction d'un segment D avec un segment J_H, et ceci généralement sur les deux allèles. Ces événements caractérisent le stade pro-B précoce, stade auquel le marqueur CD19 apparaît (CD19 est considéré comme un marqueur très spécifique des cellules de la lignée B à l'exception des plasmocytes).

- Ces premiers réarrangements sont suivis dans les cellules pro-B tardives par l'assemblage, sur un seul allèle, d'un segment V_H avec les segments DJ_H réarrangés. Seuls les segments V_HDJ_H en phase de lecture correcte et sans codon stop codent pour une région variable fonctionnelle et permettent la synthèse d'une chaîne lourde μ cytoplasmique.

Les protéines de transduction du signal intra-cellulaire, Ig α et Ig β , sont exprimées faiblement à la surface des cellules pro-B en association avec la calnexine (Nagata *et al.*, 1997), protéine membranaire à fonction de chaperon qui aide au repliement et à l'association de nombreuses protéines membranaires ou solubles dans la voie sécrétoire. Normalement exprimée dans le réticulum endoplasmique, la présence de la calnexine à la surface des cellules B, ou des cellules T en association avec le complexe CD3 (Wiest *et al.*, 1994, 1995, 1997), apparaît comme une caractéristique des progéniteurs lymphoïdes. Son rôle dans le développement lymphocytaire précoce reste encore à être précisé.

Les cellules pro-B expriment également à leur surface une "pseudo chaîne légère", composée des polypeptides V_{pré-B} et λ 5, en association avec une glycoprotéine de 130 kDa (p130) (Karasuyama *et al.*, 1993). Cette glycoprotéine transmembranaire a été identifiée et appelée BILL-cadherin (Ohnishi *et al.*, 2000). Elle est exprimée par les cellules de la lignée B, de l'intestin, du foie et par les leucocytes. Son expression est biphasique pendant le développement B : elle est tout d'abord exprimée dans les cellules pro-B puis est réexprimée dans les cellules B immatures et matures. Dans des expériences utilisant des extraits cellulaires de la lignée pro-B 38B9, le complexe V_{pré-B}/ λ 5/p130 ne coprécipite pas avec l'hétérodimère Ig α /Ig β (Nagata *et al.*, 1997 ; Meffre *et al.*, 1996) : la vaste majorité de l'hétérodimère ne semble donc pas associée au complexe de pseudo-chaîne légère à la surface des cellules pro-B.

1.3 Le stade pré-B

La chaîne lourde μ est alors exprimée à la surface des cellules, maintenant pré-B, en association avec la pseudo chaîne légère (pour revue : Melchers *et al.*, 1993), et avec les protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. Ce complexe forme le récepteur de cellule pré-B (pré-BCR) (figure 4). Seule la moitié des chaînes μ synthétisées peut s'associer à la pseudo chaîne légère (ten Boekel *et al.*, 1997), conséquence probable de la structure particulière de certains CDR3 (régions déterminant la complémentarité avec l'antigène) empêchant l'appariement des deux chaînes. Le stade pré-B est également caractérisé par la perte des marqueurs c-kit et CD43 et le début de l'expression du marqueur CD25 (Rolink *et al.*, 1994).

Le pré-BCR joue un rôle crucial dans le développement des cellules B. Son expression à la surface permet à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation et de rentrer dans une phase d'expansion clonale ; on parle alors de grande cellule pré-B. Le rôle critique du pré-BCR a été démontré à l'aide de souris mutées par invalidation génique. En effet, un blocage de la différenciation est observé dans les souches de souris $\lambda 5^{-/-}$ (Kitamura *et al.*, 1992a), $VpreB1^{-/-} VpreB2^{-/-}$ (Mundt *et al.*, 2001), $Ig\beta^{-/-}$ (Gong et Nussenzweig, 1996), et $\mu MT^{-/-}$ où la région transmembranaire permettant à la chaîne lourde d'être exprimée à la membrane a été enlevée (Kitamura *et al.*, 1991). Pour chacune de ces souris, la phase de prolifération est absente. L'expression à la surface du pré-BCR entraîne également une diminution transitoire de l'expression des gènes RAG (Grawunder *et al.*, 1995) et un arrêt de la recombinaison des gènes de chaînes lourdes sur l'autre allèle, assurant ainsi l'exclusion allélique (Kitamura et Rajewsky, 1992b ; Löffert *et al.*, 1996).

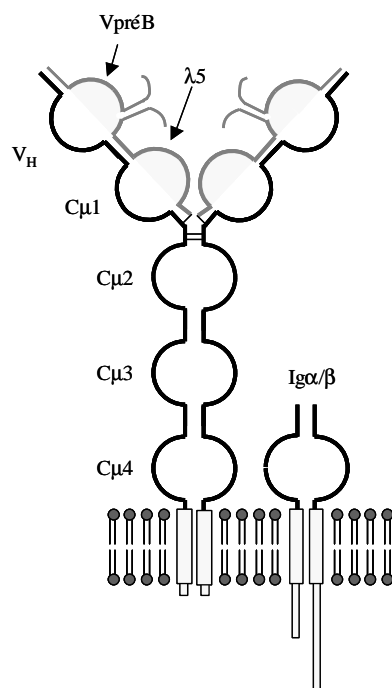


Figure 4 : Schéma d'un récepteur pré-B (pré-BCR)

Les protéines $\lambda 5$ et $VpreB$ sont liées de façon non covalente pour former la pseudo-chaîne

L'existence ou non d'un ligand pour le pré-BCR est un sujet controversé. Récemment, Gauthier et coll. (2002) ont identifié, chez l'homme, une interaction spécifique des pré-BCR recombinants avec la Galectine-1, une lectine produite par les cellules stromales de la moelle osseuse, qui entrerait principalement en interaction avec la chaîne λ -like (équivalent de $\lambda 5$) afin d'induire un signal intracellulaire. Cependant, d'autres équipes, et principalement celle de Rolink, présentent des arguments plaidant en faveur d'une signalisation via le pré-BCR indépendante de la liaison d'un ligand :

- l'expression prématurée d'une chaîne légère transgénique dans les souris $\lambda 5^{-/-}$ permet l'expression d'une IgM membranaire et restaure la prolifération des cellules pré-B (Pelandra *et al.*, 1996 ; Rolink *et al.*, 1996b). Ainsi, une grande variété de chaînes μ associées à la chaîne légère forme des IgM fonctionnant chacune comme un pseudo pré-BCR. Il semble peu probable qu'un nombre limité de ligands puisse interagir avec l'ensemble des CDR des segments V_H et de la pseudo-chaîne légère ;
- des anticorps dirigés spécifiquement contre les composants du pré-BCR ne perturbent pas le développement des cellules B lorsqu'ils sont injectés *in vivo* ou additionnés au milieu de culture de cellules de foie fœtal (Ceredig *et al.*, 2000). L'anticorps anti-chaîne μ est cependant capable de bloquer le développement de cellules B immatures IgM^+ ;
- les cellules pro-B $c\text{-kit}^+CD19^+$ cultivées *ex vivo* dans des conditions particulières sont capables de proliférer en l'absence de cellules stromales ou de cytokines exogènes (Rolink *et al.*, 2000a).

Le stade petite pré-B est marqué par l'arrêt de la phase de prolifération et la réexpression des gènes *RAG*. Les réarrangements V_LJ_L des gènes des chaînes légères ont alors lieu (Ehlich *et al.*, 1993 ; ten Boekel *et al.*, 1995). Ils sont monoalléliques et débutent le plus souvent au locus $Ig\kappa$, car celui-ci est plus précocement accessible. Si aucun réarrangement productif sur les deux allèles ne s'est produit, ils se poursuivent au locus $Ig\lambda$.

Le complexe $Ig\alpha/Ig\beta$ à la surface des précurseurs B est capable de transduire un signal et de permettre le recrutement des protéines tyrosine kinases via leurs motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Ces kinases incluent des protéines

comme Syk ou d'autres kinases de la famille Src. L'implication de ces molécules dans la transduction du signal via le pré-BCR est fortement suggérée : l'utilisation d'anticorps dirigés contre Ig β induit la différenciation de précurseurs pro-B RAG2^{-/-} en petites cellules pré-B *in vivo*, de façon comparable à celle médiée par le pré-BCR au cours du développement normal des cellules B (Nagata *et al.*, 1997). Ce même phénotype est observé chez des souris μ MT^{-/-}, qui présentent un développement B bloqué au stade pro-B (Kitamura *et al.*, 1991), traitées par un anticorps anti-Ig β (Maki *et al.*, 2000). L'analyse des cellules de la moelle osseuse de ces souris montre que le signal induit par le "cross-linking" d'Ig β régule l'accessibilité des locus d'Ig, permettant alors un réarrangement ordonné des gènes d'Ig (Maki *et al.*, 2000) : ainsi, la fixation de l'anticorps anti-Ig β sur son antigène entraîne une suppression des réarrangements des gènes de chaîne lourde et une activation de ceux des gènes de chaîne légère. Les auteurs montrent que ces événements sont associés à un changement d'accessibilité des locus qui est observé avant même que la différenciation des cellules ne soit appréciée par un changement du phénotype de surface.

1.4 *Le stade B immature*

Ce stade est caractérisé par la production d'une chaîne légère classique qui va remplacer la pseudo chaîne légère et donner naissance à une IgM de surface qui confère à la cellule une spécificité donnée de reconnaissance à l'antigène. Les lymphocytes B immatures sont alors sujets à un processus de sélection négative où les cellules possédant des Ig membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées par apoptose. Les cellules qui survivent quittent alors la moelle osseuse pour se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront subir les dernières étapes de maturation.

Les cellules B immatures de la moelle osseuse (et les cellules transitionnelles ayant récemment émigré de la moelle osseuse) reconnaissant des auto-antigènes peuvent aussi réaliser des réarrangements secondaires au locus de chaînes légères et ainsi changer la spécificité de leur récepteur (Gay *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1993 ; Tiegs *et al.*, 1993). Ce phénomène est connu sous le nom "d'édition du récepteur" (ou de "révision" lorsqu'il survient en périphérie) et se produit aussi bien chez l'homme que chez la souris (Dorner *et al.*, 1998). Des phénomènes "d'anergie" peuvent enfin permettre la survie sans activation de certaines cellules portant un BCR auto-réactif.

L'ensemble des événements conduisant à la sélection clonale des lymphocytes B entraîne la perte d'une grande partie des cellules. Les souris produisent quotidiennement entre 10 et 20 millions de lymphocytes B immatures dans la moelle osseuse. Seuls 10% atteignent la périphérie (pour revue : Osmond, 1991) ; 90% d'entre elles semblent mourir après quelques jours (Allman *et al.*, 1993), si bien que seuls 1 à 3% des lymphocytes B immatures générés dans la moelle osseuse deviendront des cellules B matures à durée de vie prolongée (de quelques semaines ou mois, voire peut-être même plusieurs années chez l'homme). Ces données montrent l'existence d'une sélection stringente à la sortie de la moelle osseuse ainsi qu'à la périphérie.

3 Les étapes finales de la différenciation

Les lymphocytes B matures ainsi produits expriment IgM et IgD, et constituent le répertoire "primaire" ou pré-immun, qui pourra être étendu par d'autres processus au cours des réponses immunitaires. Par la suite, une cellule B activée par un antigène exogène va pouvoir répondre par une expansion clonale suivie d'une différenciation vers les deux voies : soit celle des cellules mémoires soit celle des cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes).

1.1 La commutation isotypique

La spécificité antigénique des Ig est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères. Les fonctions effectrices, quant à elles, dépendent des régions constantes des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Au cours de l'immunisation, les anticorps synthétisés par les lymphocytes B matures en réponse à un antigène T-dépendant sont tout d'abord de type IgM, puis sont bientôt remplacés par des Ig d'autres isotypes (IgG dans la majorité des cas). Ce changement d'isotype s'appelle "commutation de classe" et s'opère sans changement de spécificité des clones concernés. Ce phénomène, qui affecte les chaînes lourdes, rapproche le segment V_HDJ_H réarrangé d'un nouveau segment constant de classe différente par un processus de recombinaison somatique. Les lymphocytes B matures vont ainsi pouvoir exprimer et sécréter des IgG, IgA ou IgE.

La commutation de classe des Ig s'accompagne de la transcription germinale des régions constantes ciblées par le processus de recombinaison, et est sous la dépendance de nombreux signaux incluant l'interaction CD40L-CD40 et l'intervention de cytokines (Manis *et al.*, 2002). Ainsi, chez la souris, la présence d'IL4 conduira à la production d'IgG₁ et IgE, le TGFβ d'IgA et IgG_{2b}, l'IFNγ d'IgG_{2a} et IgG₃ et l'IL5 d'IgM et IgA.

La commutation de classe nécessite également l'intervention de la protéine AID (pour "cytidine déaminase induite après activation") (pour revue : Kenter *et al.*, 2003). Cette protéine est exclusivement exprimée *in vivo* dans les centres germinatifs et *in vitro* après stimulation des splénocytes par le LPS ou le CD40L en présence d'IL4. La suppression à l'état homozygote du gène codant pour cette protéine bloque totalement les réarrangements de commutation de classe (Muramatsu *et al.*, 2000).

1.2 L'hypermutation somatique

Le processus d'hypermutation somatique des gènes variables des Ig est un mécanisme majeur de diversification du répertoire des lymphocytes B. Il est à la base de la maturation de l'affinité des anticorps lors de la réponse aux antigènes dépendants des lymphocytes T. Les mécanismes moléculaires et biochimiques responsables du processus d'hypermutation restent actuellement imparfaitement connus. Cependant, les résultats d'études réalisées *in vitro* ou dans des modèles de souris exprimant un transgène d'Ig, ont permis de définir certaines caractéristiques de ce processus. Ils surviennent essentiellement lors d'une étape extrêmement brève de la différenciation des cellules B au niveau des centres germinatifs au cours des proliférations cellulaires (McKean *et al.*, 1984). La distribution des mutations n'est pas fortuite : les mutations intéressent essentiellement les régions variables et leurs régions adjacentes (Lebecque et Gearhart, 1990) et sont ciblées essentiellement au niveau des CDR. Les mutations sont ponctuelles, en majorité des substitutions nucléotidiques, mais les insertions et les délétions sont possibles (pour revue : Bertz *et al.*, 1993). Les séquences en *cis* du locus des Ig semblent indispensables au déclenchement (ou la régulation) du processus d'hypermutation (Sharpe *et al.*, 1991 ; Bertz *et al.*, 1994 ; Goyenechea *et al.*, 1997). La mise en évidence du rôle du promoteur et des séquences activatrices des locus d'Ig dans l'hypermutation somatique suggère un lien direct entre la transcription et l'hypermutation (Peters et Storb, 1996 ; Tumas-Brundage *et al.*, 1997a ; Fukita *et al.*, 1998 ; Chaudhuri *et al.*, 2003). Tout comme la commutation de classe, le processus d'hypermutation nécessite la transcription des gènes ciblés, l'interaction de CD40 et l'intervention de la protéine AID.

III Régulation de la différenciation lymphocytaire B

1 Rôle des cytokines et des récepteurs de cytokines

Les premières étapes du développement sont strictement dépendantes du microenvironnement particulier apporté par les cellules stromales de la moelle osseuse. L'interaction des précurseurs B avec les cellules stromales est cruciale pour un développement normal des lymphocytes, et la sécrétion de facteurs solubles par les cellules stromales (IL7, SCF, SDF-1) régule la croissance, la maturation et la survie des précurseurs (figure 5).

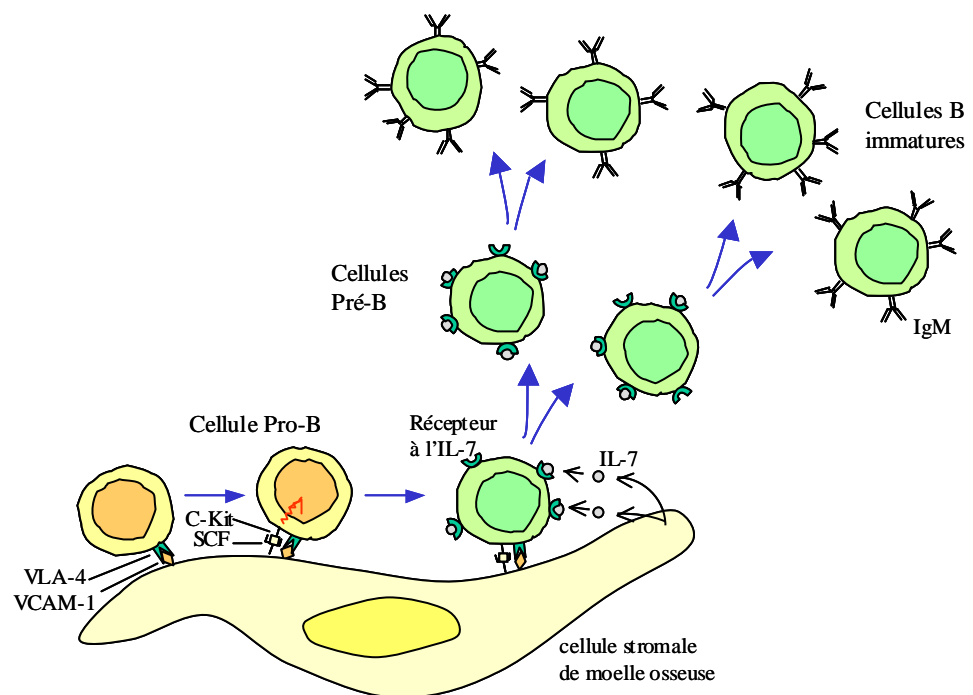


Figure 5: Les cellules stromales de la moelle osseuse sont nécessaires pour la maturation des cellules pro-B en cellules pré-B.

Les premières étapes de différenciation comportent une série d'interactions des précurseurs avec les cellules stromales impliquant diverses molécules d'adhérence (CAM). Ainsi, l'intégrine VLA-4, exprimée à la surface des précurseurs B, interagit avec VCAM-1 des cellules stromales conduisant à l'apparition de cellules pro-B précoces. Ces dernières expriment le récepteur c-kit qui fixe le SCF des cellules stromales, avec pour résultat une amplification du compartiment pro-B. Les cellules pro-B tardives sont alors stimulées par l'IL-7, une cytokine produite par les cellules stromales, qui assure la prolifération des cellules maintenant pré-B.

De façon surprenante, et ce malgré un rôle démontré *in vitro*, un grand nombre de cytokines et de récepteurs de cytokines pris individuellement, ne semblent pas avoir une action déterminante sur le développement lymphocytaire. La grande majorité des souris déficientes pour une cytokine ou un récepteur n'ont pas montré d'altérations phénotypiques évidentes. Ces études *in vivo* soulignent les actions redondantes qui peuvent être exercées par les différentes cytokines.

Une exception à cette situation est l'IL7, qui est indispensable durant la lymphopoïèse, au développement des cellules T et B (Grabstein *et al.*, 1993 ; Peschon *et al.*, 1994). La liaison de l'IL7 sur son récepteur induit l'association de la chaîne IL7R α à la chaîne γ (γ c) commune aux récepteurs de cytokines, et entraîne l'activation des Janus kinases Jak1 et Jak3. Les souris déficientes pour l'IL7, l'IL7R, la γ c, Jak1 ou Jak3 présentent un blocage sévère dans la différenciation des lymphocytes T et B aux stades précoces, le développement des cellules B étant bloqué au stade pro-B tardif (pour revue : Hofmeister *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent également que d'autres cytokines, dépendantes de γ c (dont IL2, IL4, IL9 et IL15) n'interviennent pas en complément à ce stade précoce du développement lymphoïde.

L'IL7R transmet deux types de signaux aux précurseurs T et B (Candéias *et al.*, 1997a). Un premier signal permet la survie et la prolifération. Dans les cellules T, l'IL7 induit l'expression du gène anti-apoptotique *Bcl-2* (von Freeden-Jeffry *et al.*, 1997) et la surexpression d'un transgène *Bcl-2* restaure le développement T $\alpha\beta$ dans les souris IL7R^{-/-} (Maraskovsky *et al.*, 1997 ; Akashi *et al.*, 1997). En revanche, cette surexpression ne parvient pas à restaurer la lymphopoïèse B (Maraskovsky *et al.*, 1998). De plus, par l'activation de la PI3 kinase, l'IL7R active la prolifération des précurseurs B (Venkitaraman et Cowling, 1994). L'IL7R transmet un autre signal impliqué dans l'induction des recombinaisons V(D)J. La caractérisation de ce phénomène a été rendue possible par l'analyse de souris IL7R déficientes où les recombinaisons V(D)J sont différemment affectées suivant le locus considéré. Il apparaît que l'IL7R est absolument requis pour l'induction de la transcription et des réarrangements TCR γ (Candéias *et al.*, 1997b) alors que les réarrangements TCR β sont peu affectés et les réarrangements TCR α se produisent normalement. Dans les cellules B, en absence de l'IL7R, l'efficacité des réarrangements complets V_H-DJ_H au locus IgH diminue avec l'éloignement des segments V_H et DJ_H réarrangés. Le défaut de réarrangement est causé par une diminution de l'accessibilité, appréciée par l'analyse de la transcription germinale

(Corcoran *et al.*, 1998). Les mêmes auteurs ont montré que l'expression du facteur de transcription Pax-5 ainsi que l'expression des gènes régulés par Pax-5 sont fortement diminuées en absence du récepteur à l'IL7.

SDF-1 est une autre cytokine qui joue un rôle important dans la lymphopoïèse B. Il s'agit d'une chémokine exprimée dans de très nombreux tissus, originellement décrite comme un facteur de croissance des cellules pré-B (Nagasawa *et al.*, 1994). Les souris déficientes pour SDF-1 meurent à la naissance. Outre un déficit dans la production de lymphocytes B et dans la colonisation du foie fœtal et de la moelle osseuse par les progéniteurs hématopoïétiques, les souris SDF-1^{-/-} présentent également une diminution des progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse et des perturbations au niveau du septum ventriculaire du cœur (Nagasawa *et al.*, 1996). Les souris rendues déficientes pour l'expression du récepteur du SDF-1 (CXCR4), meurent *in utero* (Tachibana *et al.*, 1998 ; Zou *et al.*, 1998). L'analyse des embryons révèle des anomalies identiques à celles observées chez les souris SDF-1^{-/-}, suggérant que CXCR4 pourrait être le seul récepteur de SDF-1. De plus, ces souris présentent des défauts dans la migration des cellules neuronales et un déficit dans la vascularisation du tractus intestinal. Il est devenu clair que SDF-1 a un pouvoir chimiotactique sur les cellules pro-B et pré-B (D'Apuzzo *et al.*, 1997). Cette observation, faite chez l'homme et la souris, a permis de mieux comprendre comment les progéniteurs B pouvaient "migrer" dans ou entre les foyers de cellules stromales de la moelle osseuse : SDF-1 servirait à retenir dans le microenvironnement de la moelle osseuse les précurseurs B qui recevraient alors les signaux de croissance et de différenciation adéquats. On peut noter que SDF-1 agit également plus tardivement sur les cellules B matures et sur l'architecture des organes lymphoïdes périphériques (Casamayor-Pallejà *et al.*, 2001).

2 Implication des facteurs de transcription

Les événements de différenciation les plus précoces qui se déroulent dans la moelle osseuse conduisent à l'émergence successive des différentes lignées que constituent les mégacaryocytes, les érythrocytes, les granulocytes, les monocytes et enfin les lymphocytes. L'ordre d'émergence a été précisé à l'aide de mutations qui portent le plus souvent sur des

facteurs de transcription. Un précurseur lymphoïde commun (CLP) unique est vraisemblablement à l'origine des lignées T et B et des cellules NK. L'argument de cette provenance commune est tiré de l'analyse du phénotype de mutants du gène *Ikaros* obtenus par inactivation génique chez la souris.

Au cours de la différenciation lymphocytaire, les facteurs de transcription, en se fixant sur différents promoteurs et activateurs, sont impliqués dans la quiescence, la survie et la mort des cellules B ainsi que dans les prises de décisions lors de l'engagement des cellules dans une lignée spécifique.

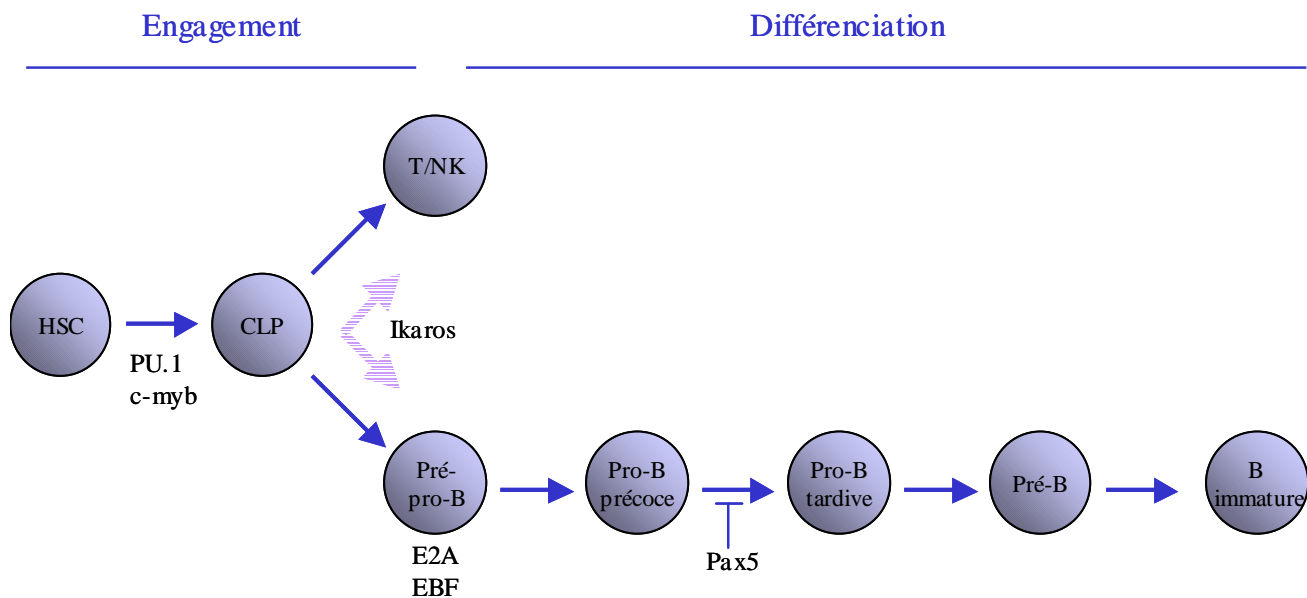


Figure 6: Schéma récapitulatif des différents facteurs de transcription impliqués dans l'engagement et la différenciation des lymphocytes B.

L'influence du facteur Ikaros sur l'engagement des précurseurs lymphoïdes vers la lignée B et T/NK est marquée par une flèche hachurée.

1.1 *Ikaros*

Le gène *Ikaros* code pour une famille de facteurs de transcription à motif "doigts de zinc" spécifiquement exprimé dans les cellules lymphoïdes. Son expression est détectée dans le sac vitellin, siège de l'hématopoïèse précoce, dès le 8^{ème} jour du développement embryonnaire chez la souris. Il est exprimé également par les thymocytes fœtaux et adultes ainsi que par les cellules NK, T et B matures.

Chez la souris, la mutation ciblée du motif de liaison à l'ADN d'*Ikaros* entraîne une absence de l'ensemble des cellules B, T et NK ainsi que de leurs précurseurs les plus précoces connus, alors que les autres lignées hématopoïétiques ne sont pas affectées par la mutation (Georgopoulos *et al.*, 1994). Ces résultats mettent en avant le rôle important de la protéine *Ikaros* dans la différenciation et/ou la prolifération d'un précurseur lymphoïde et suggèrent une intervention précoce de la protéine au cours du développement lymphoïde. De récentes expériences suggèrent que les membres de la famille *Ikaros* sont aussi nécessaires dans l'engagement des cellules dans la lignée T (Cortes *et al.*, 1999) ainsi que pour la différenciation des lymphocytes T (Winandy *et al.*, 1999).

1.2 *PU.1*

PU.1 est un membre de la famille des facteurs de transcription Ets possédant un domaine de liaison à l'ADN "hélice-boucle-hélice". Il est spécifiquement exprimé dans les cellules hématopoïétiques. La mutation du gène *PU.1* chez la souris a été effectuée par deux laboratoires qui présentent des résultats légèrement différents. Singh et coll. ont montré que la mutation est létale dès le stade embryonnaire. L'analyse histologique suggère que la mutation affecte les précurseurs myéloïdes pluripotents ainsi que les progéniteurs lymphoïdes (Scott *et al.*, 1994). La délétion du gène *PU.1* effectuée par le groupe de Maki s'accompagne d'une septicémie sévère causant la mort des souris après la naissance (McKercher *et al.*, 1996). En accord avec les résultats de la première étude, les souris ne présentent ni macrophages, ni neutrophiles, ni lymphocytes T et B. Cependant, chez les souris soumises à un traitement antibiotiques, des neutrophiles et des lymphocytes T apparaissent dans les jours suivant la naissance. Ces résultats suggèrent que *PU.1*, chez la souris adulte, puisse être nécessaire uniquement au développement des macrophages et des lymphocytes B.

1.3 E2A et EBF

Le gène E2A code pour deux protéines : E12 et E47 à motif "hélice-boucle-hélice". Ces protéines jouent un rôle essentiel au cours des stades précoces du développement des lymphocytes B et T α/β . En effet, les souris E2A^{-/-} présentent un blocage précoce de l'ontogenèse B, avant même les premiers réarrangements D-J_H (Zhuang *et al.*, 1994 ; Bain *et al.*, 1994) et un blocage partiel du développement T à ce même stade. La surexpression de la protéine E47 dans des lignées cellulaires non B entraîne l'activation d'un certain nombre de gènes spécifiques de la lignée B tels que λ 5, VpréB, Rag-1 et Pax5 (Kee et Murre, 1998 ; Choi *et al.*, 1996 ; Sigvardsson *et al.*, 1997). Cette surexpression réalisée dans des lignées cellulaires pré-T induit l'initiation de la transcription germinale I μ , ainsi que les réarrangements D-J_H au locus IgH (Schlissel *et al.*, 1991b).

EBF (pour "Early B-cell Factor") est un facteur de transcription qui joue également un rôle dans l'engagement dans la lignée B. Chez les souris déficientes pour EBF, la différenciation de la lignée B est bloquée avant les réarrangements des gènes d'Ig (Lin et Grosschedl, 1995). Tout comme E2A, EBF semble être un facteur nécessaire à la formation des précurseurs B les plus précoces.

1.4 c-Myb

c-Myb est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires. La délétion du gène c-myb par recombinaison homologue chez la souris est létale aux jours 13-15 du développement embryonnaire (Mucenski *et al.*, 1991). Des expériences de reconstitution de souris Rag^{-/-} par des cellules souches embryonnaires (ES) c-myb^{-/-} ont montré que la protéine est nécessaire pour le développement des lymphocytes B et T (Allen *et al.*, 1999). L'analyse de ces souris montre que les cellules ES c-myb^{-/-} ne sont pas capables de se différencier en précurseurs de cellules B ou de monocytes/macrophages, alors que les cellules T sont elles bloquées au stade double négative (CD4⁻CD8⁻).

1.5 Pax5

Le gène Pax5 code pour les facteurs de transcription BSAP (pour "B-cell Specific Activation Protein). L'analyse détaillée de l'expression du gène a montré qu'il pouvait présenter, par le biais d'épissage alternatif, quatre messagers différents (Pax5a, Pax5b, Pax5d

et Pax5e). Le messenger Pax5a est exprimé aux stades précoces de la différenciation B mais pas au stade plasmocyte ; l'isotype Pax5b serait quant à lui restreint aux cellules B matures. Les conséquences de l'expression des différents messagers de Pax5 n'ont toutefois pas encore été définies (Zwollo *et al.*, 1997). Ces facteurs s'expriment également dans d'autres tissus comme le système nerveux central et les testicules (Adams *et al.*, 1992 ; Busslinger et Urbánek, 1995).

Les souris déficientes pour le gène Pax5 sont incapables de survivre au delà de trois semaines et présentent un blocage complet du développement B au stade pro-B précoce (stade pré-BI selon la nomenclature de Rolink) (Urbánek *et al.*, 1994). Les cellules pré-BI présentes dans ces animaux ont un phénotype sauvage : elles expriment les marqueurs c-kit, B220, CD43 et IL7R, et ont effectué les réarrangements D-J_H sur les deux allèles (Urbánek *et al.*, 1994 ; Nutt *et al.*, 1997) ; elles expriment les gènes lymphoïdes ou spécifiques de la lignée B tels que RAG-1, RAG-2, TdT, λ 5, VpréB, Ig α , Ig β , E2A et EBF (Nutt *et al.*, 1997 ; Nutt *et al.*, 1998). Seul le marqueur CD19, dont l'expression est contrôlée par Pax5, n'est pas retrouvé à la surface de ces cellules.

Les cellules pré-BI-Pax5^{-/-} n'apparaissent pas engagées de façon irréversible dans la lignée B. Elles sont en effet capables *in vitro* de se différencier en cellules NK, dendritiques et myéloïdes lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions de culture particulières (Nutt *et al.*, 1999). Elles sont également capables de reconstituer *in vivo* le compartiment pré-BI dans la moelle osseuse et de se différencier en thymocytes et cellules T matures (Rolink *et al.*, 1999) ainsi qu'en cellules NK, dendritiques, myéloïdes et érythroïdes (Schaniel *et al.*, 2002a). Ces résultats mettent en évidence le rôle important du facteur BSAP dans l'ontogenèse B et dans l'engagement irréversible vers la voie de différenciation B. Schaniel et coll. (2002b) vont plus loin encore dans leur analyse puisqu'ils ont montré que les cellules pré-BI-Pax5^{-/-} sont multipotentes, possèdent une grande capacité d'autorenouvellement et de reconstitution à long terme (c'est-à-dire qu'après transplantation *in vivo*, elles sont capables de migrer vers leur site de différenciation approprié dans la moelle osseuse), propriétés comparables à celles des HSC.

Les protéines BSAP semblent fonctionner soit en activant soit en réprimant des gènes : elles régulent positivement les gènes mb-1, CD19, N-myc et Lef-1 et répriment la protéine de surface PD-I et la chaîne J (Fitzsimmons *et al.*, 1996 ; Rinkenberger *et al.*, 1996 ; Nutt *et al.*, 1998). De nombreux gènes restreints à la lignée lymphoïde B possèdent des sites de fixation pour BSAP dans leurs promoteurs (CD19, λ 5, Vpré-B et Blk,...) ; cependant, à l'exception de

CD19, l'expression de ces gènes semble tout à fait normale dans les animaux déficients pour BSAP (Nutt *et al.*, 1997). De nombreux sites pour la fixation de BSAP sont présents au sein du locus IgH : en particulier dans les activateurs hs1,2 et hs4, dans les promoteurs des régions I et dans les régions S μ , S γ , S α (Liao *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Busslinger et Urbánek, 1995 ; pour revue : Stavnezer, 1996 ; Michaelson *et al.*, 1996 ; Fitzsimmons *et al.*, 1996).

1.6 LEF-1

LEF-1 (pour "Lymphoid Enhancer-binding Factor") est une protéine de fixation à l'ADN, membre de la famille des HMG (High-Mobility Group). Elle est exprimée dans les cellules T, et transitoirement dans les cellules B, aux stades pro-B et pré-B. Son rôle dans le développement B a récemment été étudié à l'aide de souris déficientes pour la protéine (Reya *et al.*, 2000). L'absence de Lef-1 ne modifie pas le développement B, mais diminue le pool de cellules pro-B et pré-B à cause d'un défaut dans la prolifération et la survie des progéniteurs B. Les cellules proB-Lef-1^{-/-} présentent une augmentation des taux d'ARNm fas et c-myc qui pourraient expliquer la réduction du nombre de cellules pro-B. Les auteurs mettent également en avant le rôle que pourrait jouer la voie de signalisation Wnt dans la prolifération et la survie des cellules pro-B, les protéines Wnt étant mitogéniques pour ces cellules et cet effet est étant médié par LEF-1 (Reya *et al.*, 2000).

PARTIE II : La Régulation de l'Expression des Gènes d'Ig

Les gènes d'Ig sont regroupés en trois locus, IgH, Igκ et Igλ, situés, chez la souris, sur trois chromosomes distincts (chromosomes 12, 6 et 16 respectivement) (figure 7). Tous ces locus sont caractérisés par la présence d'éléments *cis*-régulateurs, aux fonctions intriquées, qui agissent sur la régulation de la transcription mais également sur le contrôle des réarrangements des gènes d'Ig. L'ensemble de ces événements est ordonné et lié aux stades de différenciation de la cellule B.

Cinq types d'éléments *cis*-régulateurs interviennent dans l'expression spécifique des gènes d'Ig dans les cellules B (pour revue : Ernst et Smale, 1995) : les promoteurs, les activateurs, les atténuateurs, les régions d'attachement à la matrice (MAR) et les régions de contrôle du locus (LCR). Ces éléments régulateurs présentent des sites de fixation pour différents facteurs de transcription agissant en *trans* (figures 8, 9 et 10). Certains de ces motifs sont communs à plusieurs éléments régulateurs lymphoïdes et non lymphoïdes. L'accessibilité de ces différents sites, dépendante de la structure de la chromatine elle-même, est primordiale pour l'activation d'un élément régulateur. Parmi les nombreuses protéines se fixant aux éléments *cis*-régulateurs, certaines sont ubiquitaires, d'autres sont spécifiques de la lignée B. Elles interviennent dans l'activation synergique ou dans la répression de ces éléments suivant le stade de différenciation (pour revue : Khamlichi *et al.*, 2000).

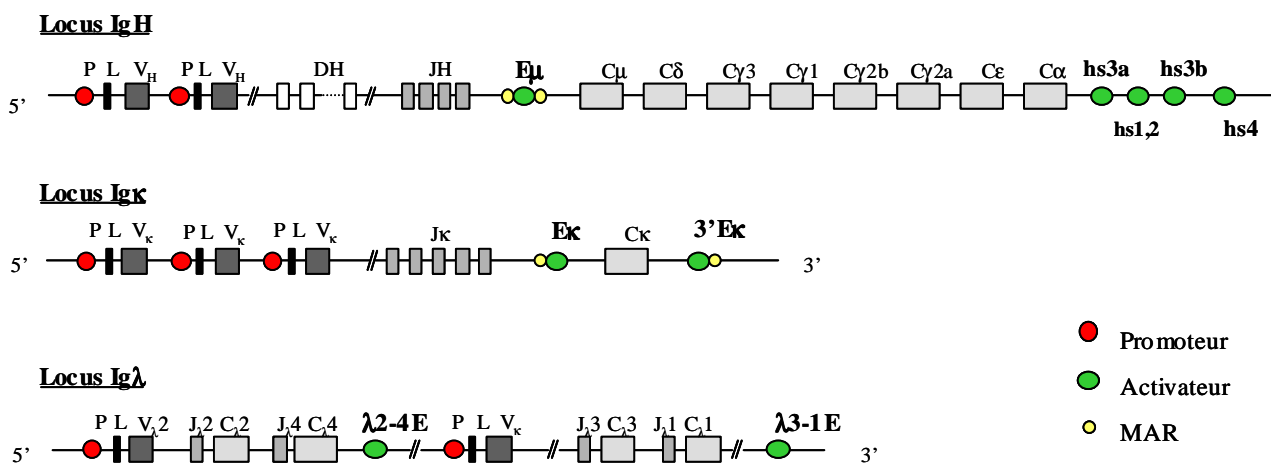


Figure 7 : Organisation des gènes codant les Ig chez la souris.

I Les promoteurs

Les promoteurs des gènes de chaînes lourdes et légères d'Ig se situent en amont de chaque région V et assurent un niveau basal de transcription. Leur activité est comprise dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. L'ensemble des promoteurs des gènes d'Ig partage une caractéristique commune : ils possèdent une séquence octamérique très conservée en amont de la TATA box, ATGCAAAT dans les promoteurs des gènes de chaînes lourdes (pVH), ou la séquence inversée ATTTGCAT dans les promoteurs des gènes de chaînes légères (pVL) (Falkner *et al.*, 1984 ; Parslow *et al.*, 1984). Des études de transfections stables (Mason *et al.*, 1985 ; Dreyfus *et al.*, 1987 ; Wirth *et al.*, 1987) et de transgénèse chez la souris (Jenuwein et Grosschedl, 1991) ont montré que la spécificité cellulaire de l'activité des promoteurs d'Ig pouvait en partie être expliquée par la présence de ces séquences "octamères". L'extinction des gènes d'Ig dans les cellules T matures dépend notamment de l'octamère (Mason *et al.*, 1985). D'autres promoteurs de gènes spécifiques de cellules B tels que *B29* (Ig β), *CD20* et *CD21* (CR2) comportent également des sites octamères importants pour leur fonction (Hermanson *et al.*, 1989 ; Thevenin *et al.*, 1993 ; Christensen *et al.*, 1992).

En plus de l'octamère, les promoteurs V_H contiennent une séquence heptamérique qui semble absente des promoteurs V_L. Cet heptamère est nécessaire pour assurer, en association avec l'octamère, une activation spécifique et optimale du promoteur (Ballard *et al.*, 1987 ; Eaton *et al.*, 1987). L'octamère et l'heptamère lient *in vitro* les mêmes facteurs de transcription Oct et semblent avoir une interaction coopérative (Poellinger *et al.*, 1989 ; Kemler *et al.*, 1989). Bien que les promoteurs confèrent une spécificité lymphoïde aux gènes d'Ig, ils peuvent avoir une activité transcriptionnelle dans des cellules non lymphoïdes (Grosschedl *et al.*, 1985 ; Mason *et al.*, 1985 ; Picard *et al.*, 1985). D'autres éléments ont été localisés en amont de l'heptamère : une région riche en pyrimidines (Eaton *et al.*, 1987) de fonction inconnue, un motif reconnu par le facteur de transcription Ig/EBP-1 et un motif μ E3.

Des promoteurs ont également été décrits en amont de chaque gène des régions constantes des chaînes lourdes d'Ig, à l'exception de C δ . Ce sont les sites d'initiation de la transcription germinale observée en particulier en préalable à la commutation isotypique.

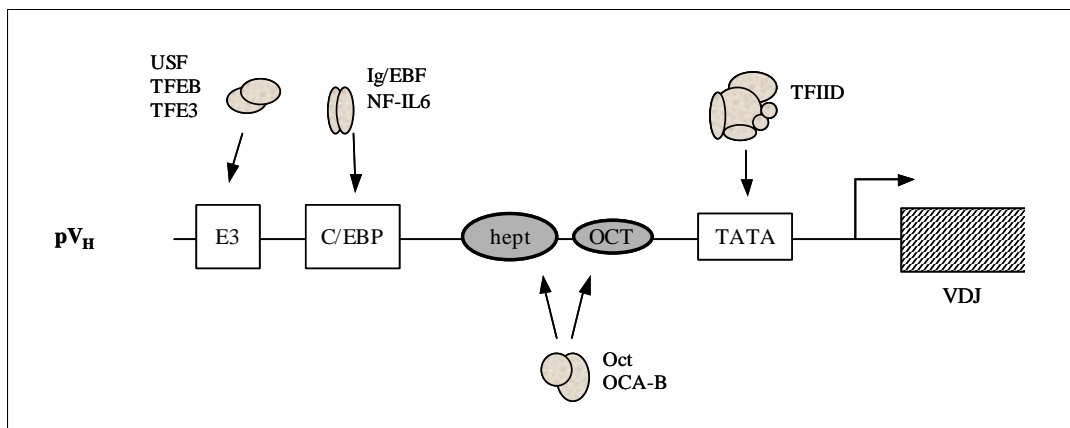


Figure 8 : les promoteurs V_H.

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

Facteurs Oct et co-facteur

Éléments essentiels des promoteurs des régions V, les sites octamères sont retrouvés également au niveau des activateurs transcriptionnels situés en 5' (E μ) et 3' (LCR) du locus IgH. Ces séquences sont entre autres reconnues les facteurs Oct-1 et Oct-2 qui appartiennent à la famille des protéines POU. La forme en hélice-boucle-hélice du domaine de liaison à l'ADN permet une forte affinité de ces protéines pour l'ADN. Alors que Oct-1 est exprimée de façon ubiquitaire, l'expression de Oct-2 est prédominante dans les cellules B. Ces protéines sont capables d'activer fortement la transcription à partir d'un promoteur d'Ig (LeBowitz *et al.*, 1988 ; Pierani *et al.*, 1990 ; Pfisterer *et al.*, 1994). L'importance de la séquence octamère a clairement été démontrée au sein de l'activateur E μ . Ainsi, pour un bon contrôle de la transcription dans des cellules pré-B stimulées par du LPS, ces sites doivent être présents aussi bien au niveau de E μ que du promoteur V_H. Des transgènes portant un site octamère muté au niveau de E μ présentent une forte réduction de l'effet activateur (Jenuwein *et al.*, 1991 ; Annweiler *et al.*, 1992).

Le facteur coactivateur OBF-1 (nommé également OCA-B ou Bob-1), dont l'expression est spécifique des cellules B, interagit avec les facteurs Oct-1 ou Oct-2 une fois ceux-ci fixés aux sites octamères. Le rôle des facteurs Oct-2 et OBF-1 sur le développement des cellules B a été pondéré par l'obtention d'animaux mutés : les souris doubles mutantes *Oct-2^{-/-} OBF-1^{-/-}* montrent que ce facteur de transcription B spécifique n'est pas indispensable pour le développement de lymphocytes B (Schubart *et al.*, 2001). OBF-1 semble cependant utile à la commutation de classe, à la formation de centres germinatifs et à la différenciation terminale conduisant à la sécrétion de certaines sous-classes d'Ig (Schubart *et al.*, 1996 ; Schubart *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 1996). La simple inactivation du gène *Oct-2* chez la souris entraîne un blocage de la prolifération des cellules B ainsi qu'un défaut dans la sécrétion d'Ig suite à une stimulation antigénique (Corcoran *et al.*, 1993 ; Corcoran et Karvelas, 1994). Ces résultats suggèrent que Oct-2 est important dans les stades tardifs de la différenciation des lymphocytes B alors que l'activation transcriptionnelle semble pouvoir être initiée de façon égale par l'un ou l'autre des facteurs Oct (Pfisterer *et al.*, 1994 ; Schubart *et al.*, 2001).

II Le promoteur-activateur compris dans l'élément DQ52

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

- sa location est très conservée entre les espèces : il s'agit du segment D_H le plus distal du locus IgH, situé en amont et juste à proximité des segments J_H. Le gène DQ52 et les séquences avoisinantes sont hautement conservés entre les espèces. En revanche, au sein d'une même espèce, DQ52 ne présente qu'une faible homologie avec les autres segments D_H (Dirkes *et al.*, 1994).
- le segment DQ52 est préférentiellement utilisé lors des premiers réarrangements D-J_H au cours de l'ontogénie (Bangs *et al.*, 1991 ; Tsukada *et al.*, 1990).
- DQ52 est le seul segment D_H à être transcrit bien avant la survenue des premiers réarrangements V(D)J (Alessandrini et Desiderio, 1991 ; Li *et al.*, 1996). Ces transcrits germinaux, appelés μ^o , peuvent être considérés comme l'un des indicateurs les plus précoces de l'engagement vers la lignée B (Li *et al.*, 1996) et leur transcription pourrait être un préalable nécessaire à l'accessibilité de la région D-J à la recombinaison V(D)J (Thompson *et*

al., 1995). Ils sont initiés, aussi bien chez l'homme que chez la souris, au niveau d'une séquence située immédiatement en amont de DQ52 (Alessandrini et Desiderio, 1991 ; Thompson *et al.*, 1995). Des expériences étudiant les complexes protéiques associés aux régions situées en 5' des gènes constants du locus IgH ont montré que la région comprenant l'élément DQ52 fixe préférentiellement des protéines nucléaires extraites de cellules pré-B et ont ainsi permis de suspecter le rôle régulateur de cette région (Kottmann *et al.*, 1992). Une analyse de la région située en 5' de DQ52, réalisée à partir de précurseurs B humains, révèle de nombreux sites potentiels de fixation pour des facteurs nucléaires comme E2A, Ets, NF- κ B et AP2 (Thompson *et al.*, 1995).

L'activateur situé en 5' de DQ52 a finalement été caractérisé par Kottmann et coll. (1994). Il constitue un promoteur-activateur synergique de E_{μ} , impliqué dans l'activation des réarrangements précoces aux stades initiaux de l'ontogénie B. La délétion de cet activateur chez la souris ne se traduit cependant que par un biais de l'utilisation des segments J_H (avec l'arrêt de l'utilisation des segments $JH3$ et $JH4$, les plus éloignés de DQ52) sur l'allèle muté. Le rôle proposé pour ce promoteur-activateur serait le contrôle de l'accessibilité des segments J_H situé en 3' et par conséquent il jouerait un rôle important dans le contrôle des réarrangements D- J_H . Une participation potentielle aux réarrangements secondaire du locus IgH pourrait également être envisagée (Nitschke *et al.*, 2001). Les segments $JH1$ et $JH2$ n'étant pas affectés par la mutation, les auteurs suggèrent qu'il puisse exister d'autres régions contrôlant les réarrangements D- J_H .

III L'activateur transcriptionnel intronique E_{μ}

L'activateur transcriptionnel E_{μ} fut le premier décrit au sein du locus IgH. Il est localisé dans l'intron séparant les régions J des régions constantes (Banerji *et al.*, 1983). Cet élément régule positivement de nombreux événements propres à la lignée lymphocytaire B comme les réarrangements V(D)J (Engler *et al.*, 1991 ; Chen *et al.*, 1993 ; Serwe et Sablitzky, 1993) et la transcription initiée au niveau de multiples promoteurs du locus (promoteurs V_H , promoteurs germinaux,...). Cet élément semble actif tout au long du développement B. Sa localisation lui permet d'être habituellement préservé par les événements de recombinaisons survenant sur le locus (recombinaisons V(D)J ou commutation de classe). De part et d'autre

de E μ se situent des séquences d'ancrage à la matrice nucléaire MARs (Matrix Associated Region) (figure 9).

Plusieurs équipes ont étudié la spécificité tissulaire de l'expression de transgènes placés sous le contrôle de l'élément régulateur E μ . Bien que les souris transgéniques présentent une très forte expression dans les lymphocytes B, il a généralement été observé, en parallèle, une expression en dehors du compartiment B, le plus souvent dans les cellules T. Ce point sera analysé plus loin, dans la partie discussion de ce manuscrit.

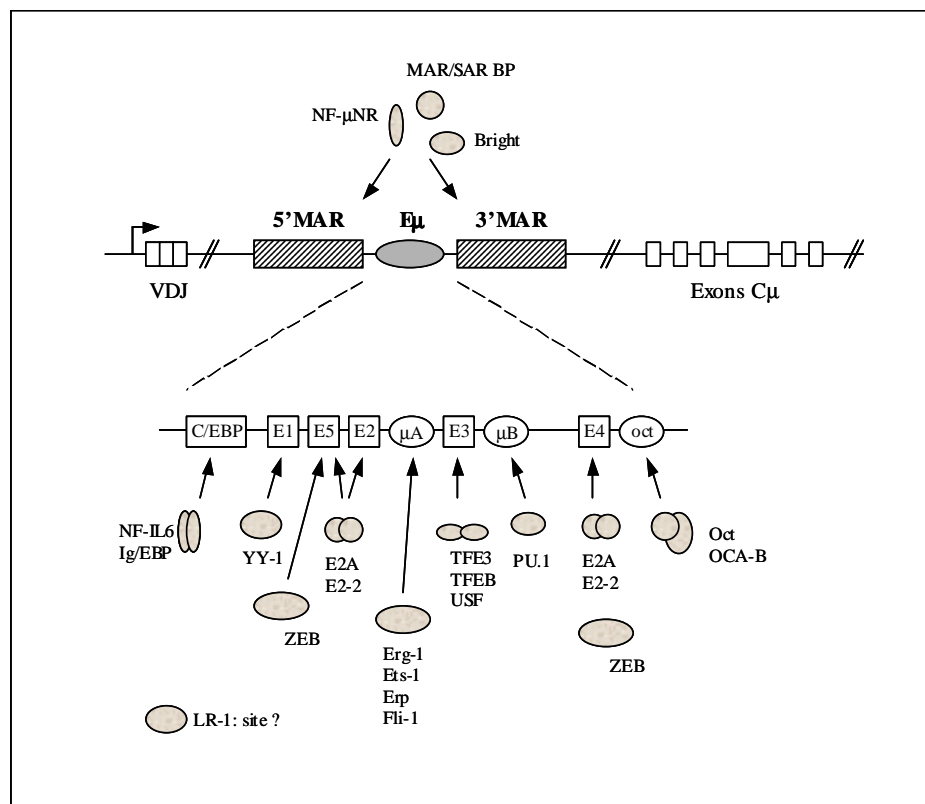


Figure 9 : L'activateur intronique E μ chez la souris.

Les sites de fixation et les facteurs nucléaires sont indiqués. E μ contient un motif octamère et cinq motifs correspondant aux "E-box", nommés μ E1 à μ E5.

1 Rôle de E μ dans les recombinaisons V(D)J

Le rôle de l'activateur E μ dans la régulation des réarrangements V(D)J a été étudié dans des animaux mutés pour E μ . Le remplacement du complexe E μ /MARs par le gène de résistance à la néomycine (*neo^r*) chez la souris entraîne une inhibition très sévère des réarrangements, de la déméthylation et de la transcription germinale associés au locus J_H (Chen *et al.*, 1993). Alors que le remplacement de l'élément 3'MAR ne semble avoir aucun effet sur les réarrangements et donc sur l'accessibilité des segments J_H, le remplacement de l'élément 5'MAR entraîne une diminution importante des recombinaisons D-J_H mais n'empêche pas la déméthylation du locus J_H. Ces expériences *in vivo* confirment le rôle de E μ , mais aussi des séquences situées en amont, dans l'accessibilité des régions permettant l'assemblage d'un exon VDJ de chaîne lourde (Chen *et al.*, 1993). Dans une autre série d'expériences, Serwe et Sablitzky (1993) ont remplacé E μ ainsi que les MAR par une courte séquence d'ADN. Les analyses effectuées sur des cellules B spléniques purifiées ont mis en évidence des réarrangements D-J_H peu diminués, alors que les réarrangements complets V_H-DJ_H sont fortement affectés. Ces résultats ont été confortés par des expériences complémentaires délétant systématiquement les différents éléments E μ , 5'MAR, 3'MAR et MARs (Sakai *et al.*, 1999a). L'analyse de ces souris a montré que E μ , en absence des séquences MAR, est nécessaire et suffisant à l'induction des recombinaisons, ainsi qu'à la transcription du locus IgH dans les cellules B matures. Le contrôle différentiel des réarrangements D-J_H versus V_H-DJ_H implique certainement d'autres éléments *cis*-activateurs du locus qui pourraient agir en coopération avec E μ . L'analyse de délétions de E μ survenues spontanément dans des lignées pré-B a montré qu'une fois les jonctions V_HDJ_H achevées, E μ ne semble plus indispensable à la transcription du locus IgH (Wabl et Burrows, 1984).

L'étude menée par Bories et coll. (1996) décrit l'analyse de souris dans lesquelles l'activateur E β , unique activateur du locus TCR β décrit jusqu'à présent, peut être fonctionnellement remplacé par E μ pour stimuler les réarrangements endogènes. Les souris présentent alors un taux significatif (cependant plus faible que lorsque E β est présent) de jonctions D β -J β dans les cellules T. Les jonctions D β -J β n'ont cependant pu être détectées dans les cellules B de ces souris. Les auteurs ont donc suggéré l'existence, au sein du locus TCR β endogène, d'un élément régulateur négatif empêchant les réarrangements à ce locus dans les

cellules B. Le remplacement par $E\mu$ d'une région plus longue contenant, en plus de $E\beta$, la région C β 2 du locus TCR β , a conforté cette hypothèse puisque cette mutation est suffisante pour induire des recombinaisons D β -J β dans les cellules B (Eyquem *et al.*, 2002). Le remplacement de $E\beta$ seul par $E\mu$ permet toutefois l'activation de la transcription germinale des gènes du TCR β dans les cellules B. Ces résultats rappèlent ceux obtenus à l'aide de substrats de recombinaisons transgéniques (Capone *et al.*, 1993), montrant que la transcription n'est pas, à elle seule, suffisante pour activer les recombinaisons V(D)J.

2 Rôle des régions MAR

Le rôle des régions MAR flanquant l'élément $E\mu$ reste encore controversé. Elles agissent en coopération avec l'élément $E\mu$ et permettent à ce dernier d'agir à distance (Forrester *et al.*, 1994 ; Jenuwein *et al.*, 1997). Des expériences, utilisant des substrats de recombinaison méthylés *in vitro*, ont montré que $E\mu$ seul ne permet qu'une reconfiguration locale de la chromatine alors que son association avec les MAR permet l'acétylation des histones sur une plus longue distance (Forrester *et al.*, 1999). Des modèles transgéniques montrent que les MARs n'influenceraient pas la fixation de facteurs nucléaires sur l'activateur $E\mu$ et ne modifieraient pas l'acétylation des histones proximaux. Elles seraient cependant impliquées dans l'acétylation d'histones au niveau de séquences plus éloignées et permettraient ainsi l'activation de certains promoteurs (comme les promoteurs V_H) (Fernandez *et al.*, 2001). Elles semblent nécessaires à une bonne expression du locus car une délétion de ces MARs diminue considérablement l'expression d'un transgène de chaîne lourde IgM dans un hybridome (Oancea *et al.*, 1997).

D'autres résultats tendent à minimiser le rôle des MARs sur la régulation du locus. En effet, des hybridomes réalisés à l'aide de cellules B d'animaux mutés dans la région de $E\mu$ et des MARs flanquantes montrent qu'en l'absence de ces régions régulatrices, la commutation de classe est diminuée mais n'est pas totalement abolie (Bottaro *et al.*, 1998) ; la délétion des MARs associées à cet élément montre qu'une cellule B peut s'en dispenser pour effectuer les commutations de classe (Sakai *et al.*, 1999b). Le contraste entre le rôle important des MARs au sein de transgènes (Forrester *et al.*, 1994 ; Jenuwein *et al.*, 1997 ; Fernandez *et al.*, 2001) et le peu d'impact de leur délétion ciblée dans le locus (Bottaro *et al.*, 1998 ; Sakai *et al.*, 1999a

et b) est une indication probable de leur rôle important mais redondant de celui d'autres éléments régulateurs.

IV La région régulatrice située en 3' du locus IgH

L'activateur transcriptionnel intronique $E\mu$ a longtemps été considéré comme l'élément central de la régulation transcriptionnelle du locus IgH. La description de lignées cellulaires ayant spontanément délétées $E\mu$, et continuant à transcrire leurs gènes d'Ig à un taux normal a remis ce rôle en question (Klein *et al.*, 1984 ; Wabl et Burrows, 1984 ; Aguilera *et al.*, 1985 ; Zaller et Eckhardt, 1985). De même, certaines translocations de l'oncogène *c-myc* au locus IgH, entraînant la disparition de l'élément $E\mu$, permettent une forte expression de l'oncogène (Neuberger et Calabi, 1983). Une large délétion de la région située au-delà du gène α , associée à une diminution de la transcription, faisait de cette région une candidate pour contenir des éléments *cis*-régulateurs (Gregor et Morrison, 1986).

Ainsi, chez le rat, un activateur spécifique de la lignée B fut identifié 25 kb en 3' des régions $C\alpha$ et appelé 3' α E (Pettersson *et al.*, 1990). Son équivalent chez la souris se trouve 16 kb en 3' de $C\alpha$ (Davariach *et al.*, 1991 ; Lieberson *et al.*, 1991) : il est orienté en sens inversé mais contient des séquences très homologues au "noyau" de l'activateur de rat ; de plus, des séquences en orientation inversée bordent cet élément chez les deux espèces. Ultérieurement, un activateur plus faible, appelé $C\alpha$ 3'E, fut localisé seulement 2 kb en 3' de l'exon de membrane α (Matthias et Baltimore, 1993). L'exploration de la région 3' α chez la souris par la recherche de zones d'hypersensibilité à la DNase I a permis de superposer ces régions hypersensibles (hs) aux éléments décrits comme *cis*-activateurs. Ainsi, l'élément IgH 3' α E a pu être confondu avec les sites hs1 et hs2 (Giannini *et al.*, 1993 ; Madisen et Groudine, 1994 ; Michaelson *et al.*, 1995). Deux autres activateurs hs3 et hs4 furent de la même façon identifiés respectivement 29 kb et 33 kb en 3' de $C\alpha$.

Le séquençage plus large des régions 3' IgH a révélé une structure globalement palindromique contenant de longues séquences en répétition inversées qui flanquent l'élément 3' α E (hs1 et 2), centre de ce palindrome, le plus grand jamais décrit chez les mammifères (Chauveau et Cogné, 1996). L'élément proximal $C\alpha$ 3' (Mathias et Baltimore, 1993) se trouve être l'homologue inverse de l'élément hs3. Pour plus de clarté, nous adopterons la

nomenclature suivante (Saleque *et al.*, 1997) pour les activateurs de la région 3' α de souris (dans l'ordre de 5' vers 3') : C α 3'E : **hs3a** ; IgH 3' : **hs1,2** ; HS3 : **hs3b** ; **hs4** ne présente pas d'ambiguïté (figure 10A).

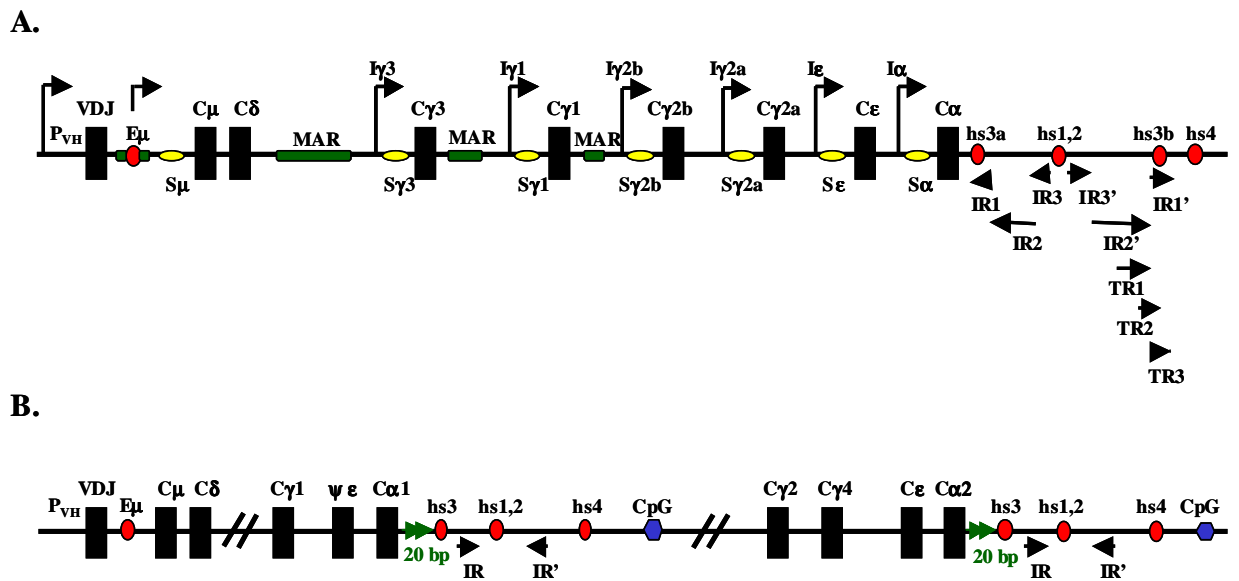


Figure 10 : Structure des locus IgH de l'homme et de la souris.

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

A : locus de la souris ; les ellipses jaunes représentent les régions "switch" et les rectangles verts les régions d'ancrage à la matrice (MAR), les promoteurs germinaux sont signalés par les flèches cassées.

B : locus humain ; les régions en 3' des gènes α 1 et α 2 contiennent des activateurs, des séquences répétées composées de segments de 20 pb (flèches vertes), des régions riches en G+C (hexagones bleus).

Chez l'homme, les gènes constants sont dupliqués en deux blocs, séparés par environ 35 kb. Des éléments similaires aux activateurs de souris sont présents en 3' de chacun des deux gènes α . Ils sont au nombre de trois et sont nommés dans l'ordre : hs3a (Mills *et al.*, 1997 ; Pinaud *et al.*, 1997) ; hs1,2 (Chen et Birshstein, 1997 ; Mills *et al.*, 1997 ; Pinaud *et al.*, 1997) ; et hs4 (Mills *et al.*, 1997). Comme chez la souris, l'élément hs1,2 est flanqué par des régions répétées inversées d'environ 2 kb, mais leur séquence diffère totalement de celle des régions flanquant hs1,2 chez la souris. L'élément hs3b est absent chez l'homme (figure 10B).

L'existence d'un polymorphisme dans les régions 3' α humaines complique leur étude. En effet, il existe plusieurs allèles présentant une différence au sein de l'élément hs1,2. Selon l'allèle considéré, hs1,2 se trouve orienté différemment et contient un nombre variable de répétitions directes d'une séquence de 53 pb (incluant des sites potentiels de fixation de facteurs nucléaires) (Pinaud *et al.*, 1997 ; Aupetit *et al.*, 2000 ; Denizot *et al.*, 2001).

Des îlots de séquences riches en CpG, dont le rôle n'a pas encore été défini, sont situés en aval des éléments hs4 humains (Sadhu *et al.*, 1997).

Chez la souris, une origine de réplication a été identifiée à une distance d'environ 50 kb en aval de hs4. Elle permet la réplication de l'ensemble des gènes constants en une seule fourche de réplication progressant de 3' vers 5' (Zhou *et al.*, 2002).

1 Région de Contrôle du Locus

Les régions de contrôle du locus (LCR) sont définies par leur capacité à activer l'expression d'un transgène avec un taux transcriptionnel élevé, comparable à celui du gène endogène : i) quel que soit son site d'intégration, ii) de façon dépendante du nombre de copies intégrées, iii) tout en respectant la spécificité cellulaire (pour revue : Li *et al.*, 2002). Les composants d'une LCR sont généralement co-localisés avec des sites d'hypersensibilité à la DNase I. La région 3' du locus IgH chez la souris est souvent désignée comme une LCR car elle en présente certaines propriétés. Ce fut tout d'abord suggéré par des techniques de transfections stables de plasmocytes ayant intégré l'oncogène *c-myc* associé à l'ensemble des sites hypersensibles à la DNase I excepté hs3a (Madisen et Groudine, 1994). Une seconde étude menée *in vitro* utilise les gènes rapporteurs CAT ou κ placés sous le contrôle du

palindrome seul (Chauveau *et al.*, 1998a). Les auteurs montrent que l'association des trois activateurs hs3a, hs1,2 et hs3b permet une expression indépendante du site d'intégration du transgène mais également indépendante du nombre de copies. Ainsi, l'une des propriétés de la LCR n'est pas vérifiée. L'analyse *in vivo* de la région 3' IgH confirme ces derniers résultats. Des souris transgéniques portant le gène de la β -globine associé aux quatre activateurs hs3a-hs1,2-hs3b-hs4 ont été réalisées (Chauveau *et al.*, 1999). L'expression du transgène est restreinte aux cellules B de la rate et indépendante du site d'intégration, mais, là encore, aucune corrélation stricte entre le nombre de copies et le niveau d'expression du transgène n'a pu être observée. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la combinaison des éléments situés en 3' du locus IgH se comporte comme une LCR partielle.

2 Activité de la région 3' IgH au cours de l'ontogénie B

L'activité transcriptionnelle dépendante de la région 3' IgH a été appréciée essentiellement par des expériences de transfection dans différentes lignées cellulaires établies correspondant à des stades de différenciation B définis, et plus récemment par des modèles d'animaux transgéniques. Il est bon de considérer avec prudence les résultats obtenus sur des lignées cellulaires, le parallèle *in vivo/in vitro* pouvant être imparfait. De plus, les systèmes de vecteurs d'expression ne peuvent s'intéresser qu'à un nombre limité de séquences *cis*-régulatrices, alors qu'au sein d'une cellule l'organisation de l'ADN fait se côtoyer un grand nombre d'éléments régulateurs interagissant les uns avec les autres.

Le profil de méthylation/déméthylation relatant l'accessibilité de la région a montré que la région 3' IgH semble se déméthyler au fur et à mesure de l'ontogénie B jusqu'au stade final plasmocytaire (Giannini *et al.*, 1993).

L'activateur hs1,2 de rat fut décrit comme actif aux stades B tardifs, son activité maximale étant atteinte au stade plasmocytaire (Pettersson *et al.*, 1990). L'élément hs1,2 de souris ne semble également actif qu'aux stades tardifs mais avec une activité moindre au stade plasmocytaire (Davariach *et al.*, 1991 ; Lieberon *et al.*, 1991). Les résultats obtenus dans les lignes B matures sont contrastés (Davariach *et al.*, 1991 ; Fulton et Van Ness, 1994) ; il est ainsi préférable de relativiser les enseignements des différents modèles, chaque lignée étant un cas particulier.

Les éléments hs3a et hs3b sont décrits comme des activateurs assez faibles en expression transitoire (5 à 15% de l'activité de E μ). Leur activité n'est détectée qu'aux stades B mature et plasmocytaire (Matthias et Baltimore, 1993 ; Madisen et Groudine, 1994).

hs4 est également un élément considéré comme assez faible mais son activité se retrouve tout au long du développement B, depuis le stade pro-B jusqu'au stade plasmocytaire (Madisen et Groudine, 1994 ; Michaelson *et al.*, 1995).

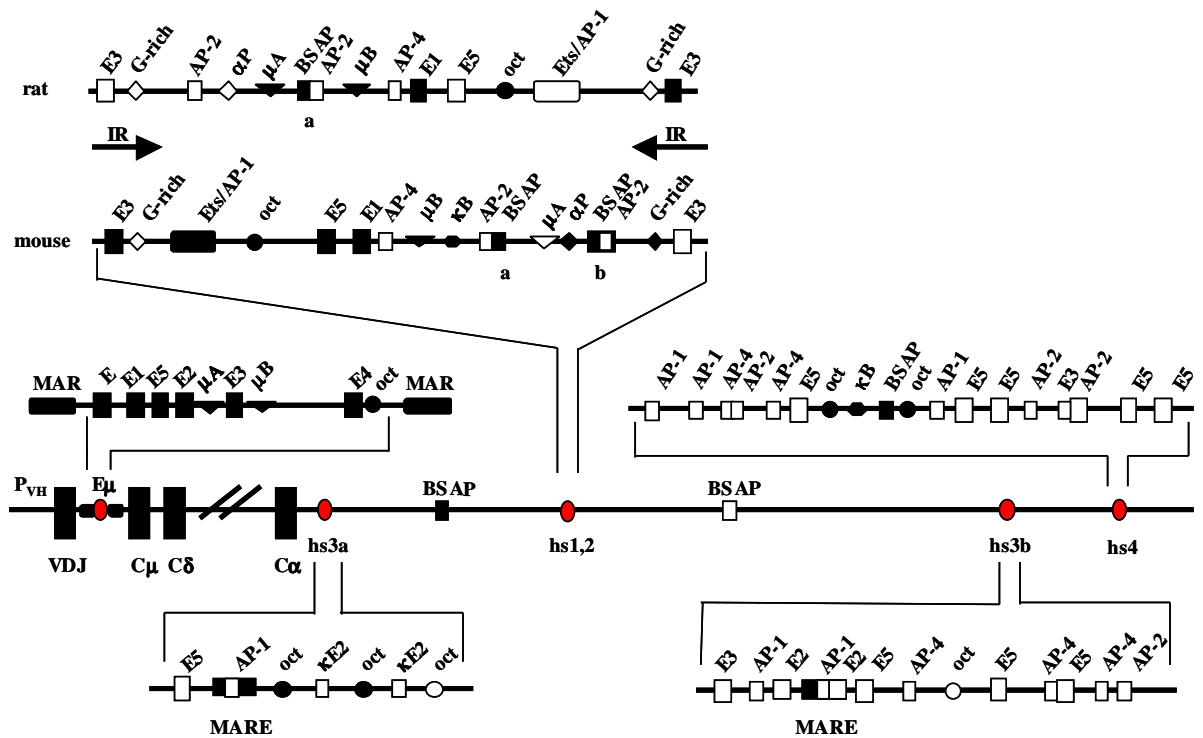


Figure 11 : Schéma détaillant les sites consensus de fixation pour les facteurs nucléaires au sein des activateurs 3' du locus IgH de souris (comparaison souris/rat pour hs1,2). Les sites pour lesquels la fixation a été démontrée apparaissent en noir, les sites potentiels sont représentés par des symboles non colorés. (d'après Khamlichi *et al.*, 2000).

3 Synergies entre les éléments 3' IgH

Notre équipe a analysé l'importance de la structure palindromique et l'activité synergique des éléments transcriptionnels situés dans la région 3' IgH par transfection de différentes lignées B de souris caractérisant les stades pré-B, B mature et plasmocyte (Chauveau *et al.*, 1998b). Les vecteurs d'expression utilisés réunissent le gène rapporteur CAT à différentes combinaisons et orientations des activateurs, en association ou non avec E μ . Les résultats montrent que :

- pris séparément, les activateurs apparaissent faibles ; les éléments hs1,2 et hs3 sont actifs dans les lignées B mature et plasmocyte, alors que dans la lignée pré-B, seuls les activateurs E μ et hs4 sont actifs.

- l'activité transcriptionnelle maximale est atteinte lorsque l'association des éléments de la région 3' correspond à l'arrangement palindromique endogène, soulignant d'une part le bénéfice de cette architecture et d'autre part la nécessité des quatre activateurs pour obtenir un activateur optimal provenant de la région 3'. Cette association est fortement active à tous les stades de différenciation testés et est capable d'entrer en coopération avec l'élément E μ . L'ensemble de ces observations suggère que la régulation de l'expression des gènes des chaînes lourdes d'Ig ne se fait pas par l'action individuelle ou additive de différents éléments mais par l'action synergique et concertée d'un ensemble de séquences régulatrices réparties sur le locus.

4 Fonctions proposées pour la région régulatrice 3'IgH

Les fonctions de la région 3' IgH n'ont pas encore été clairement définies. Son rôle dans les différents événements tels que la transcription, les recombinaisons V_HDJ_H, l'hypermutation et la commutation de classe fait actuellement l'objet de nombreuses études.

1.1 *Commutation de classe*

Le remplacement par recombinaison homologue de l'activateur hs1,2 par la cassette *pgk-néor* chez la souris n'a aucune influence sur les recombinaisons V(D)J. Par contre, ces souris présentent un défaut de transcription germinale de certaines régions constantes et de

synthèse des IgG2b et IgG3 *in vivo*, et un défaut de commutation isotypique vers toutes les régions constantes à l'exception de C γ 1 *in vitro* (Cogné *et al.*, 1994). Un phénotype similaire est observé pour le remplacement de l'élément hs3a par pgk-*néo*' (Manis *et al.*, 1998a). Cependant, la suppression des marqueurs de sélections par l'action de la recombinaise *cre* permet la restauration d'un phénotype sauvage dans les deux cas (Manis *et al.*, 1998a), assignant ainsi un rôle mineur et/ou redondant aux éléments proximaux de la LCR qui ne semblent pas indispensables à la commutation de classe. En revanche, la délétion conjointe de hs3b et hs4, ou leur remplacement par le gène *néo*' chez la souris, altère la transcription germinale des régions constantes et la commutation de classe vers tous les isotypes à l'exception de IgG1 et IgM (Pinaud *et al.*, 2001), montrant ainsi le rôle important que peuvent jouer ces deux éléments dans le processus de commutation isotypique. Les souris présentent un nombre normal de cellules B dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires.

1.2 *Hypermutation somatique*

L'association de E μ et de l'élément hs1,2 n'induit pas d'hypermutation pour un transgène (constitué de gène de chaîne lourde) dans plusieurs lignées cellulaires ou *in vivo* chez la souris (Tumas-Brundage *et al.*, 1997b). L'analyse plus poussée des souris déficientes pour hs3b et hs4 montre que ces éléments ne sont nécessaires ni pour l'assemblage des segments V_HDJ_H, ni pour la survenue de l'hypermutation somatique (Le Morvan *et al.*, 2003). Les auteurs suggèrent ainsi que les événements de commutation de classe et d'hypermutation, bien que nécessitant des facteurs et des signaux communs, peuvent être dissociés quant à leur recrutement par les différentes séquences *cis*-régulatrices. Ces résultats sont en contradiction avec ceux observés par transgénèse montrant que la présence de hs3b et hs4, associés aux éléments E μ /pVH, suffit à induire l'hypermutation d'un gène rapporteur (Terauchi *et al.*, 2001).

1.3 *Expression des chaînes lourdes*

Dans la lignée pré-B 70Z/3, une large délétion d'environ 30 kb a éliminé une région incluant hs3a et hs1,2 (Saleque *et al.*, 1999). Malgré l'absence de ces deux éléments, aucune diminution de l'expression de la chaîne μ n'a pu être constatée. La seule présence de E μ et des éléments distaux hs3b et hs4 suffit à induire une forte expression de chaîne lourde à ce stade.

Notons que l'hybridome 70Z/3-NSO, dérivé de la lignée pré-B, est capable spontanément de commutation isotypique vers $C\gamma 1$ (Saleque *et al.*, 1999), confirmant que les deux premiers éléments de la LCR 3' ne sont pas nécessaires à la commutation de classe vers IgG1.

Chez les souris déficientes pour $hs1,2$, la transcription des gènes μ , $\gamma 1$ et α demeure normale, seule la transcription germinale de quelques gènes C_H est affectée (Cogné *et al.*, 1994), alors que la délétion conjointe des activateurs $hs3b$ et $hs4$ affecte la transcription germinale de la plupart des gènes constants, et probablement l'expression du gène μ dans les lymphocytes B au repos (Pinaud *et al.*, 2001). La lignée LPI-2, dont le locus IgH présente une large délétion incluant cette fois toute la région 3', présente une très faible expression du gène α en comparaison à la lignée parentale sans délétion (Gregor et Morisson, 1986). On peut donc penser que la région 3', dans sa globalité, régule la transcription des gènes de chaîne lourde réarrangés par le biais de coopérations entre des éléments multiples et redondants.

1.4 Structure de la chromatine

La structure de la chromatine est un élément clé de la régulation de l'expression des gènes, permettant l'accessibilité des régions *cis*-modulatrices aux facteurs de transcription. Cette notion sera détaillée plus loin dans la partie III de ce manuscrit.

Les auteurs ayant décrit l'association $hs1,2-3b-4$ comme une LCR, ont montré que cette combinaison d'activateurs pouvait déréguler la transcription de l'oncogène *c-myc* par le changement d'utilisation du promoteur (de P2 à P1) de façon similaire à ce qui est observé dans certains lymphomes de Burkitt et dans les plasmocytomes de souris (Madisen et Groudine, 1994). Cette même combinaison est cependant capable de conférer une forte expression de *c-myc* en présence du seul promoteur P2 (Madisen *et al.*, 1998). Dans ce cas, l'hypersensibilité de la région à la DNase I, le degré de méthylation et la position des nucléosomes demeurent inchangés, mais une immuno-précipitation de la chromatine montre une augmentation de l'acétylation des histones sur la totalité du vecteur contenant $hs1,2-3b-4$, et non pas simplement l'acétylation des histones situés sur les régions promotrices. La LCR pourrait ainsi contribuer au maintien d'une région dans un état transcriptionnellement actif en recrutant des facteurs contenant des histones acétyl-transférases (HAT), initiant une acétylation des histones qui se propage par la suite dans toute la région environnante (Madisen *et al.*, 1998).

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

- le modèle "looping" suggère la formation d'une boucle permettant des interactions directes et stables entre les facteurs transcriptionnels fixés à la LCR et ceux fixés à proximité des promoteurs (figure 12). Un tel modèle pourrait expliquer le fonctionnement de la LCR 3' du locus IgH. En effet, le remplacement de l'élément hs1,2 provoquant l'effondrement de certaines classes d'Ig (Cogné *et al.*, 1994), fait supposer qu'il peut interagir, en plus de sa capacité à stimuler les promoteurs V_H , avec les promoteurs situés en amont des régions I rendues accessibles selon les stimulus. Les éléments de la LCR interagiraient, de façon alternative et selon le stade de différenciation de la cellule B, avec les différents promoteurs (pVH et pI) du locus IgH (Arulampalam *et al.*, 1997).

- le deuxième schéma d'activation implique une chaîne de complexes protéiques ancrés à la fibre chromatinienne se propageant depuis l'activateur jusqu'au promoteur. C'est le modèle "linking" mettant en jeu des protéines à homéodomains.

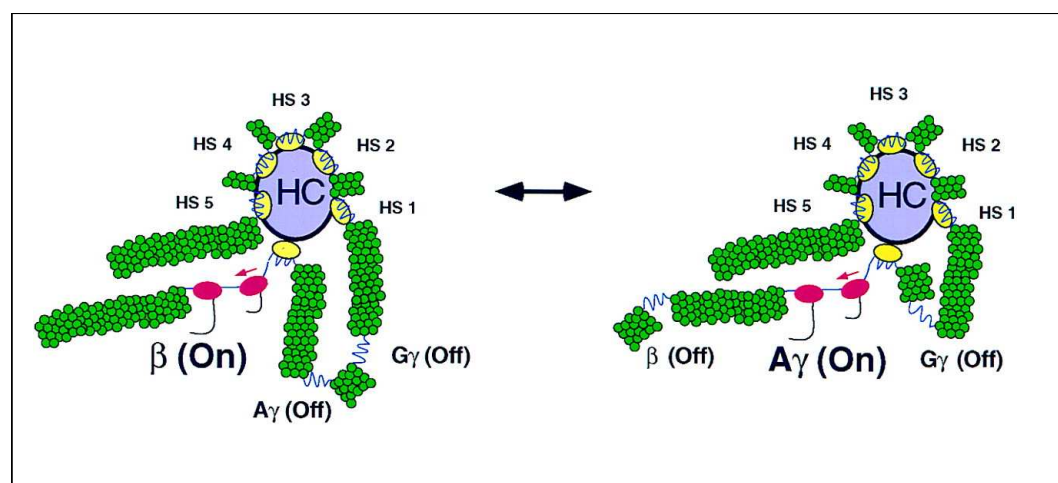


Figure 12 : Modèle d'interaction entre les éléments activateurs (HS) 5' et les promoteurs du gène de la β -globine (d'après Bulger et Groudine, 1999).

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

PARTIE III : Mécanismes Moléculaires de la Régulation de l'Expression des Gènes

Le génome des eucaryotes est organisé sous forme de chromatine. En plus de permettre à l'ADN d'être contenu dans le noyau, elle participe également à la régulation de l'expression des gènes. Pour permettre l'activation de la transcription, la chromatine doit être remaniée. Sa structure, comprenant l'association des nucléosomes, doit être décondensée rendant ainsi accessibles aux facteurs de transcription les séquences activatrices de l'ADN. Finalement, la structure du gène doit être réorganisée afin de permettre le passage de la polymérase. Des combinaisons de facteurs ubiquitaires et spécifiques se lient sur les séquences activatrices afin de contrôler l'expression des gènes. La fixation coopérative des facteurs *trans*-activateurs et des protéines architecturales au niveau des activateurs entraîne l'assemblage d'une structure nucléoprotéique appelé "enhanceosome".

Comprendre comment les gènes sont exprimés dans un type cellulaire particulier et à un stade de développement donné reste l'une des questions fondamentales de la biologie. Les gènes sont souvent activés de manière transitoire. Dans ce cas, les événements qui s'en suivent incluent l'inactivation du complexe d'initiation de la transcription et finalement l'établissement d'une structure condensée de la chromatine au niveau du gène et de ses séquences régulatrices. Le mécanisme d'inactivation d'un gène peut varier, mais implique généralement la liaison de répresseurs sur des éléments atténuateurs.

Différentes hypothèses ont été proposées afin d'expliquer les mécanismes qui influencent la réorganisation spécifique de la structure de la chromatine au niveau des gènes du TCR ou des Ig. L'activation spécifique de la transcription de ces locus pourrait entraîner, lors de la progression de la polymérase, un relâchement de la structure de la chromatine. Néanmoins, d'autres processus tels que la méthylation des dinucléotides CpG, l'acétylation des histones et l'activation de complexes multiprotéiques dépendants de l'ATP, permettent aussi de modifier la structure de la chromatine.

I Structure et organisation

Dans le noyau de cellules eucaryotes, l'ADN est compacté sous forme de chromatine. L'unité de base est le nucléosome, composé d'ADN (146 pb) enroulé autour d'un octamère d'histones (formé de deux paires d'hétérodimères H2A/H2B et H3/H4) et lié à l'histone H1 ou H5. D'autres protéines non histones, telles que les protéines HMG, participent aussi à la compaction de la chromatine.

De nombreuses études ont révélé le rôle critique de la chromatine dans la régulation de la transcription. Une structure très compacte de l'ADN est généralement associée à l'inactivation des gènes. Les gènes silencieux sont généralement localisés au niveau des télomères ou du centromère du chromosome et à la périphérie du noyau. La cellule dispose de deux classes prépondérantes de complexes enzymatiques pour moduler la conformation de la chromatine. La première regroupe les histones acétyl-transférases et les déacétylases qui respectivement ajoutent ou enlèvent un groupement acétyl à l'extrémité amino-terminale des histones. La seconde, comprend des complexes de modification de la chromatine dépendante de l'ATP qui altèrent la structure de la chromatine en changeant la position ou la conformation des nucléosomes.

II Le système d'acétylation/déacétylation de la chromatine

1 Acétylation et transcription

Les parties basiques des histones H3 et H4 sont soumises à une acétylation réversible par des histones acétyl-transférases (HAT) ou inversement à une déacétylation par des déacétylases (HDAC). L'acétylation diminue les charges négatives des histones, affaiblit l'interaction de ces dernières avec l'ADN et inhibe le repliement de la fibre nucléosomique. Ainsi, l'hyperacétylation des histones est associée à la chromatine transcriptionnellement active (euchromatine) alors que l'hypoacétylation est associée à la chromatine silencieuse (hétérochromatine).

L'identification de protéines possédant une activité acétylase ou déacétylase a largement contribué à la compréhension du lien direct existant entre l'acétylation des histones

et l'expression des gènes. En effet, certaines de ces enzymes ont été précédemment identifiées comme des composants de la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase II, ou comme des co-activateurs ou des co-répresseurs de la transcription (pour revue : Struhl, 1998). Cependant, il n'a pas été clairement démontré si les histones constituent les substrats physiologiques de l'ensemble de ces protéines. En effet, un grand nombre de co-activateurs de la transcription possède une activité HAT leur permettant d'acétyler, non seulement les histones, mais aussi des facteurs composant la machinerie de transcription, des activateurs/répresseurs (tels que GATA-1 et p53) et des protéines architecturales comme HMG-17 et 14 (Herrera *et al.*, 1999).

2 Acétylation et recombinaison

L'acétylation des histones provoque une modification spécifique de la structure des nucléosomes permettant l'accès aux facteurs de la transcription des séquences d'ADN adjacentes. Ceci suggère un rôle potentiel de l'acétylation dans la régulation de l'accessibilité des séquences RSS et donc dans le contrôle des recombinaisons V(D)J. Des expériences *in vitro* ont montré que l'initiation des recombinaisons V(D)J est inhibée lorsque les RSS sont situées dans une structure nucléosomale compacte (Kwon *et al.*, 1998 ; Golding *et al.*, 1999). Lorsque les nucléosomes sont déstabilisés par la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des déacétylases, les réarrangements sont restaurés (Cherry et Baltimore, 1999 ; McBlane et Boyes, 2000 ; Mathieu *et al.*, 2000). Les expériences de McBlane montrent que le traitement de cellules pré-B en culture par la TSA stimule les réarrangements du locus Igk mais pas du locus TCR β suggérant ainsi que la spécificité tissulaire de la régulation des recombinaisons V(D)J ne peut être expliquée uniquement par l'acétylation des histones. Des analyses effectuées *in vivo* ont permis de mettre en évidence une corrélation étroite entre l'acétylation des histones et les réarrangements des locus TCR α/δ et TCR β (McMurry et Krangel, 2000 ; Mathieu *et al.*, 2000).

III La méthylation

Le processus de méthylation permet l'addition d'un groupement méthyl (CH₃) sur la cytosine d'un dinucléotide CG. Parmi les mécanismes de verrouillage de l'expression des

gènes, la méthylation des cytosines apparaît de plus en plus comme un élément de contrôle important. Elle joue un rôle essentiel au cours de plusieurs processus biologiques associés au développement, comme l'inactivation du chromosome X et les phénomènes d'empreinte génomique ("imprinting"), ainsi que dans la spécificité tissulaire de l'expression des gènes (Jones et Takai, 2001). L'inactivation imposé par la méthylation joue aussi un rôle important dans les essais thérapeutiques ; la méthylation des gènes suppresseurs de tumeurs contribue directement à la progression de certains cancers alors que la méthylation d'ADN exogène introduit dans des cellules compromet les effets de la thérapie génique. Par ailleurs, la nature stable de la répression dépendante de la méthylation suggère que ce type de répression soit utilisé pour l'inactivation globale de l'expression de nombreux gènes qui ne sont pas nécessaires dans certaines cellules différenciées. Des phénomènes de méthylation de l'ADN au niveau des adénines surviennent également et ont été occasionnellement corrélés avec l'activité de certains gènes. Leur signification biologique est cependant moins claire et moins bien explorée à ce jour que pour la méthylation des CpG.

Enfin, outre les phénomènes de méthylation/déméthylation de l'ADN, on commence actuellement à décrypter l'existence d'un code complexe de méthylation des histones sur différents résidus Lysine, qui semble "marquer" les régions actives des locus (d'une façon variant selon le stade de maturation cellulaire).

1 Méthylation et réplication de l'ADN

Le profil de méthylation de chacune des cellules est lié à un processus dynamique de méthylation et déméthylation. Une DNA-méthyltransférase, Dnmt1, présente une forte affinité pour l'ADN hémiméthylé et fonctionne durant la réplication afin de maintenir le patron de méthylation préexistant. L'inactivation de cette enzyme, à l'aide d'oligonucléotides anti-sens, entraîne un arrêt de la réplication de l'ADN en phase S (Milutinovic *et al.*, 2003), ce qui permettrait à la cellule de se protéger des erreurs dans la méthylation de l'ADN et de coordonner l'héritage des informations génétiques et épigénétiques. Dnmt3a et Dnmt3b, méthylent l'ADN *de novo* de manière non aléatoire (pour revue Hsieh, 2000). En revanche, la mise en évidence d'une déméthylase est très controversée (Cervoni *et al.*, 1999 ; Ng et Bird, 1999).

2 Méthylation et répression de la transcription

La méthylation peut interférer avec la transcription i) directement par l'inhibition de la fixation de facteurs activateurs ou par la fixation de facteurs répresseurs sur les séquences déméthylées entraînant alors l'exclusion de la machinerie de transcription, ii) indirectement par l'induction d'une structure "fermée" de la chromatine.

La mise en évidence de la protéine MeCP2, qui se fixe spécifiquement sur l'ADN méthylé, a permis de mieux comprendre le lien entre la méthylation et l'inhibition de la transcription (Jones *et al.*, 1998 ; Nan *et al.*, 1998). Cette protéine possède un domaine de liaison sur les résidus méthyl-CpG (MBD), ainsi qu'un domaine de répression de la transcription (TRD). Elle peut agir de deux manières afin d'inhiber la transcription. Par son domaine de liaison, MeCP2 peut se fixer sur une cytosine méthylée d'un dinucléotide CpG et recruter une activité HDAC par l'intermédiaire de son domaine TRD (pour revue : Bird et Wolffe, 1999), ce qui a pour effet de maintenir un état condensée de la chromatine. D'autre part, il a été montré *in vitro* que le domaine TRD interagit avec la machinerie de transcription, et plus particulièrement avec TFIID. Au niveau de l'ADN méthylé, ce complexe permet la stabilisation d'un état répressif (Kaludov et Wollfe, 2000). Ces résultats montrent ainsi que la méthylation des séquences de gènes induit la répression de la transcription par sa capacité d'interaction avec MeCP2.

Il a été récemment montré que MeCP2 pouvait également interagir directement avec la méthyltransférase Dnmt1 par son domaine TRD (Kimura et Shiota, 2003). Le complexe MeCP2-Dnmt1 ne contient pas de HDAC. Il permettrait de maintenir le profil de méthylation en se fixant à l'ADN hémiméthylé lors des divisions cellulaires.

L'inactivation des gènes par la méthylation est un phénomène bien connu des rétrovirologues en particulier dans le cadre de la thérapie génique et des expérimentateurs utilisant des transgènes, qu'ils soient épisomaux ou bien intégrés dans le génome. Les raisons exactes de l'inactivation d'un gène exogène ne sont toujours pas clairement connues. Le mode et le site d'intégration ainsi que la nature même du gène rapporteur pourrait en être la cause. Certains auteurs ont suggéré que les séquences régulatrices puissent également participer au phénomène d'extinction (Hertz *et al.*, 1999). L'enjeu est maintenant de trouver les moyens de passer outre l'inactivation à l'aide d'éléments tels que les LCR ou les isolateurs. Ces éléments

régulateurs de la transcription peuvent toutefois provoquer un biais dans le cas de l'étude de l'activité transcriptionnelle dépendante de séquences *cis*-régulatrices des transgènes.

3 Déméthylation et recombinaison

L'implication de la méthylation des CpG dans la structure réprimée de la chromatine a permis de suggérer une relation entre méthylation et contrôle des recombinaisons V(D)J. Une corrélation étroite entre déméthylation et réarrangements des gènes des récepteurs d'antigènes a été observée aussi bien pour des substrats artificiels que pour des gènes endogènes. Cependant, bien que nécessaire, l'hypométhylation ne suffit pas à l'induction des réarrangements (Engler *et al.*, 1999 ; Chen et Townes, 2000 ; Cherry *et al.*, 2000). La déméthylation joue un rôle majeur dans l'accessibilité à la recombinaison V(D)J des différents locus. Elle semblerait précéder les réarrangements. Pour le locus Ig κ , la déméthylation d'un seul allèle se produit avant même les stades pro-B et pré-B (stade des premiers réarrangements du gène κ) (Mostoslavsky *et al.*, 1998). Ces résultats montrent que la déméthylation précède et corrèle avec l'activité des recombinaisons V(D)J ; par ailleurs, la constatation d'une asymétrie inter-allélique de la déméthylation suggère son rôle dans le phénomène d'exclusion allélique.

La déméthylation des locus IgH et Igk coïncide avec la survenue des réarrangements V(D)J dans les précurseurs B (Mather *et al.*, 1983 ; Storb *et al.*, 1983 ; Goodhardt *et al.*, 1993). Au cours du développement B, l'initiation et le réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères sont précédés par une réorganisation de la structure chromatinienne des gènes d'Ig. Des expériences de sensibilité à la DNase I ont montré que la réorganisation de la chromatine au voisinage des segments V et J des locus endogènes IgH et Igk se produit avant les recombinaisons V(D)J alors que l'arrêt de ces recombinaisons implique des changements de la chromatine uniquement au niveau des segments V (Maës *et al.*, 2001). Les auteurs montrent également une augmentation de l'acétylation des histones au stade pro-B à ces deux locus.

IV Un mot sur les isolateurs

Les isolateurs sont des éléments de régulation transcriptionnelle ayant la propriété de protéger un gène (ou un groupe de gènes) de signaux inappropriés émanant des séquences adjacentes. Fonctionnellement, cette protection se fait selon au moins deux modalités (pour revue : West *et al.*, 2002) (figure 13) :

- les isolateurs bloquent les interactions activateur-promoteur (ou répresseur-promoteur) si et seulement s'ils sont situés entre ces deux éléments ; on parle alors de fonction de blocage ;
- ils protègent les gènes des effets répressifs de la chromatine adjacente ; on parle dans ce cas de barrière chromatinienne.

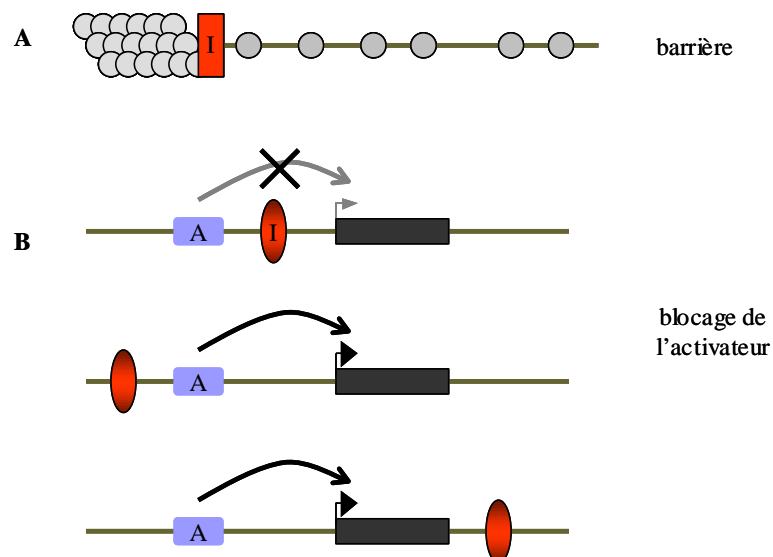


Figure 13 : Deux fonctions sont associées aux isolateurs :

A : Certains isolateurs peuvent agir comme une barrière contre la formation et la progression de la condensation de la chromatine.

B : D'autres peuvent servir d'élément de blocage d'un activateur. Ils protègent ainsi l'action d'un activateur si et seulement s'il est placé entre ce dernier et un promoteur.

(adapté de Burgess-Beusse *et al.*, 2002).

Découverts à l'origine chez la drosophile (Udvardy *et al.*, 1985), les isolateurs ont par la suite été identifiés dans d'autres organismes, depuis la levure jusqu'à l'homme. Ces éléments ont été localisés dans les séquences régulatrices des gènes complexes, entre deux

locus adjacents ou aux limites entre la chromatine condensée (locus actif) et décondensée (locus inactif). Dans certains cas, ils sont co-localisés avec les MAR (Nabirochkin *et al.*, 1998). Au sein des séquences isolatrices se trouvent un ou plusieurs sites hypersensibles à la DNase I, ainsi que des sites de fixation pour des protéines à motifs en doigts de zinc.

L'isolateur le mieux caractérisé chez les vertébrés est présent en 5' du locus de la β -globine chez le poulet (Chung *et al.*, 1993) (figure 14). Il contient un site hypersensible à la DNase I appelé HS4 qui est retrouvé dans tous les tissus. Sa localisation coïncide avec la région transitoire entre la conformation active et inactive de la chromatine (Hebbes *et al.*, 1994). L'activité isolatrice est localisée dans un fragment d'ADN de 250 pb riches en GC (Chung *et al.*, 1997). Ce fragment présente cinq sites de fixation pour des facteurs nucléaires, dont un site de fixation pour la protéine CTCF (CCCTC-binding factor) à onze motifs en doigt de zinc. Cette protéine est très conservée chez les vertébrés et son expression est ubiquitaire. Elle serait responsable de l'activité bloquante des isolateurs (Bell *et al.*, 1999).

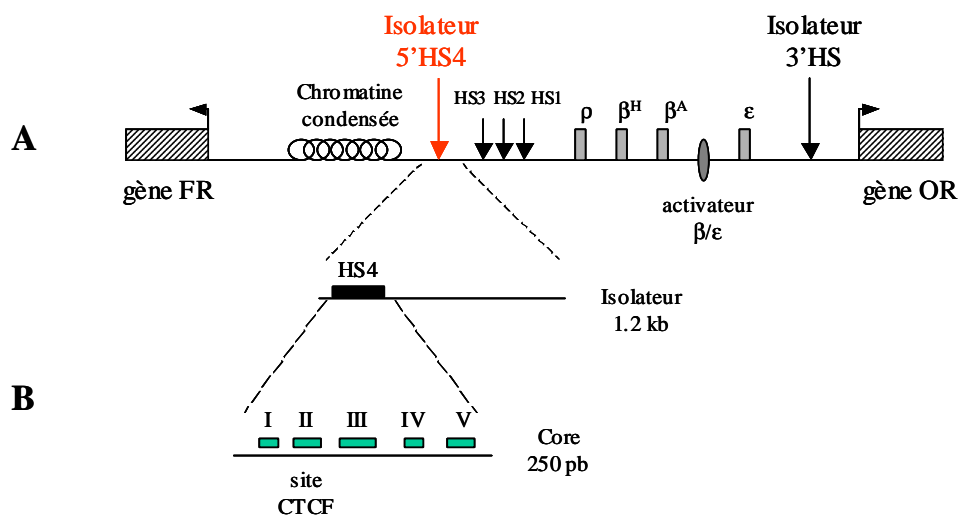


Figure 14 : Localisation et structure de l'isolateur 5'HS4 de poulet

A : Schéma du locus de la β -globine de poulet. Les gènes de la globine sont représentés par des rectangles gris, l'activateur β/ϵ par une ellipse grise. La LCR est localisée en amont des gènes de la β -globine. Le locus est encadré par deux isolateurs, 5'HS4 et 3'HS4. Il est flanqué du côté 5' d'une région de chromatine condensée (16 kb) et d'un gène codant un récepteur au folate (FR), et du côté 3' d'un gène codant un récepteur odorant (OR).

B : Structure du "core" isolateur montrant le site de fixation pour la protéine CTCF.

(d'après Recillas-Targa *et al.*, 2002).

Fonctionnel chez de nombreuses espèces, y compris la souris (Szabo *et al.*, 2002), l'isolateur 5'HS4 a été testé pour sa capacité à protéger un gène rapporteur contre les effets de position. Ainsi, il confère une expression indépendante du site d'intégration d'un gène responsable de la couleur des yeux chez la drosophile (Chung *et al.*, 1997). Il agirait comme une barrière chromatinienne en permettant l'acétylation des régions protégées, et/ou en inhibant l'action des histones déacétylases et des méthylases (Pikaart *et al.*, 1998). Cependant des expériences de transfection stable tendent à relativiser le rôle de cet isolateur. Il ne serait pas dominant dans tous les contextes et n'empêcherait pas systématiquement une inactivation des transgènes suivant le site d'intégration (Walters *et al.*, 1999). De plus, alors que l'isolateur augmente la probabilité de l'expression d'un rétrovirus intégré aléatoirement dans une lignée cellulaire erythroleucémique de souris et protège les séquences LTR de la méthylation, il ne protège pas le vecteur rétroviral de la méthylation dans une lignée de cellules ES (Rivella *et al.*, 2000). Enfin, les activités de blocage des activateurs et de barrière chromatinienne semblent dissociées (Recillas-Targa *et al.*, 2002). La première serait dépendante du site de fixation pour la protéine CTCF, alors que la seconde dépendrait des quatre autres régions du fragment de 250 pb et ne nécessiterait pas CTCF.

RESULTATS

ARTICLE 1

Références :

The β -globin HS4 insulator confers copy-number dependent expression of IgH regulatory elements in stable B cell transfectants. (2003) Laurence Guglielmi, Véronique Truffinet, Michel Cogné, et Yves Denizot. Immunology Letters, Vol. 89, pages 119-123.

Des expériences de transfections stables et de transgénèse ont montré que la région 3' IgH et l'élément E μ se comportent chez la souris comme une LCR, conférant au gène rapporteur dans des lignées lymphoïdes une expression spécifique indépendante du site d'intégration. Afin de déterminer plus précisément l'effet de ces régions régulatrices sur une éventuelle expression dépendante du nombre de copies intégrées, nous avons étudié par transfection stable l'expression du gène rapporteur *GFP* associé aux activateurs transcriptionnels de la région 3' IgH et/ou à E μ . Nous avons également analysé l'effet de l'isolateur 5'HS4 de la β -globine de poulet lorsqu'il est placé de part et d'autre des constructions. Nous démontrons que la région 3' IgH, en présence ou non de E μ , ne permet une expression dépendante du nombre de copies que lorsque les constructions sont flanquées d'isolateurs.

ARTICLE 2

Références :

Effect of the E μ IgH enhancer on expression of a GFP reporter gene in transfected B cells and transgenic mice. (2003) Laurence Guglielmi, Marc Le Bert, Michel Cogné, et Yves Denizot. *Immunology Letters*, Vol. 86, Pages 77-83.

L'activateur intronique E μ , largement utilisé dans des modèles de souris transgéniques, possède une activité transcriptionnelle s'exprimant principalement dans la lignée lymphoïde B. Son étude *in vitro* a montré qu'il semblait actif tout au long du développement des lymphocytes B. Nous souhaitons développer un modèle *in vivo* nous permettant de déterminer avec précision les stades de la différenciation B au cours desquels E μ est actif. Nous avons ainsi construit un transgène dans lequel le gène rapporteur *GFP* est placé sous le contrôle de pVH et de l'activateur E μ . Alors que cette construction s'exprime fortement dans des lignées de souris pré-B (18.81) et B mature (A20), elle ne s'exprime pas dans les 3 lignées de souris transgéniques établies. Le transgène est méthylé dans les différents tissus analysés et aucun transcrit GFP n'a pu être mis en évidence. Nos résultats soulignent ainsi la différence qui peut exister entre les modèles *in vitro* et *in vivo* et la plus grande ampleur des effets positionnels dans ces derniers.

ARTICLE 3

Références :

Insulators to improve expression of a 3' IgH LCR-driven reportergene in transgenic mouse models. (2003) Laurence Guglielmi, Marc Le Bert, Véronique Truffinet, Michel Cogné, et Yves Denizot. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol. 307, pages 466-471.

La région 3' du locus IgH de la souris permet, dans des systèmes de transfection transitoire, une forte expression des gènes rapporteurs dans des lignées cellulaires B matures et semble inactive dans des cellules représentatives des stades de différenciation B plus précoces. Des analyses de ciblage génique ont également montré le rôle de l'ensemble des éléments de cette région dans des événements tardifs de la différenciation tels que la commutation isotypique. Afin d'analyser *in vivo*, l'activité transcriptionnelle induite par cette région au cours du développement B, nous avons établi un modèle de souris transgénique, analogue à celui exposé précédemment, dans lequel le gène codant pour la GFP est cette fois-ci placé sous le contrôle de pVH et de la LCR entière (c'est-à-dire comprenant les quatre éléments hs). Les transgènes utilisés sont entourés ou non de l'isolateur 5'HS4 de la β -globine de poulet afin d'éviter les effets de position occasionnés par l'insertion aléatoire des transgènes dans le génome hôte.

Nous démontrons que, dans notre modèle, la région 3' IgH n'est pas capable à elle seule d'induire *in vivo* la transcription du gène *GFP*. En revanche, la présence des isolateurs permet d'éviter, au moins partiellement, l'inactivation du transgène. L'analyse de ces souris montre que la région 3' IgH est active uniquement dans les cellules B, du stade pré-B au stade B mature. Nous montrons ainsi le bénéfice que peuvent apporter les isolateurs pour faciliter l'expression de transgènes. Cependant, ceux-ci ne permettent pas une expression, non seulement "à coup sûr", mais également stable dans le temps, puisque nos transgènes actifs chez des animaux jeunes sont ainsi finalement inactivés au cours du vieillissement de la souris.

ARTICLE 4

Références :

Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model. (2003) Laurence Guglielmi, Marc Le Bert, Isabelle Comte, Marie-Laure Dessain, Mireille Drouet, Christiane Ayer-Le Lievre, Michel Cogné, et Yves Denizot. *Biochemica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* (accepté pour publication).

Nous avons souhaité affiner notre analyse en établissant des lignées de souris transgéniques dans lesquelles le gène rapporteur *GFP* est placé sous le double contrôle des séquences 3' IgH et de l'activateur intronique E μ . Nos résultats montrent que l'association des deux régions régulatrices, 3' et 5', permet une expression du transgène, alors que chacune des régions régulatrices utilisée isolément ne le permet pas. Le transgène est exprimé uniquement dans la lignée B dès le stade pro-B et son expression se poursuit tout au long du développement jusqu'au stade B mature. Ce modèle, comme les précédents, n'échappe pas au phénomène d'inactivation par méthylation du transgène avec l'âge.

Nos résultats montrent ainsi que l'ensemble des éléments nécessaires au contrôle de la régulation transcriptionnelle du locus IgH agissent en coopération, voire en synergie, afin de permettre ensemble une activité transcriptionnelle maximale.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons développé des modèles de souris transgéniques nous permettant d'analyser plus particulièrement deux points : i) la spécificité tissulaire de l'expression de transgènes placés sous le contrôle des différents activateurs $E\mu$ et/ou LCR (figure 15) ; ii) les stades du développement des lymphocytes B au cours desquels les transgènes sont exprimés.

Pour cela, nous avons utilisé le gène codant pour la GFP comme rapporteur. Les cellules exprimant cette protéine peuvent être facilement analysées individuellement et directement par passage au cytomètre de flux : elles peuvent alors être marquées par des anticorps dirigés contre des antigènes de surface caractérisant un type cellulaire ou un stade de différenciation donné. Les vecteurs d'expression que nous avons utilisés respectent l'arrangement endogène du locus IgH : l'organisation palindromique de la région 3' IgH est conservée, et le fragment $E\mu$ de nos constructions comprend les éléments MAR situés en 5' et 3' de l'activateur. Nous avons également testé la possibilité de recourir à l'isolateur 5'HS4 de la β -globine de poulet afin de limiter les effets de position lors de l'intégration aléatoire des transgènes dans un génome hôte.

Nous avons obtenu jusqu'à présent deux lignées de souris présentant une expression de la GFP, les lignées I-GFP-LCR-I et $E\mu$ -GFP-LCR. Leur analyse montre que ces deux transgènes sont spécifiquement exprimés dans la lignée B. La région 3' IgH est active du stade pré-B au stade B mature, alors que l'association des deux régions régulatrices 3' IgH et $E\mu$ permet une expression du transgène tout au long du développement B, du stade pro-B au stade B mature. Afin de poursuivre cette étude, nous allons prochainement obtenir des souris I- $E\mu$ -GFP-I. Nous disposons actuellement d'animaux chimères portant cette construction et nous attendons la transmission germinale du transgène pour effectuer l'analyse de son profil d'expression.

Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré des résultats différents. Les transgènes s'expriment tous de façon stable dans des lignées cellulaires, alors qu'ils sont soumis à une inactivation chez la souris. Celle-ci intervient soit très tôt, dès les premiers jours du développement embryonnaire pour les transgènes $E\mu$ -GFP et GFP-LCR, soit progressivement au cours de l'ontogénie de la souris pour les transgènes $E\mu$ -GFP-LCR et I-GFP-LCR-I. Elle est probablement la conséquence du processus de méthylation des séquences d'ADN exogène.

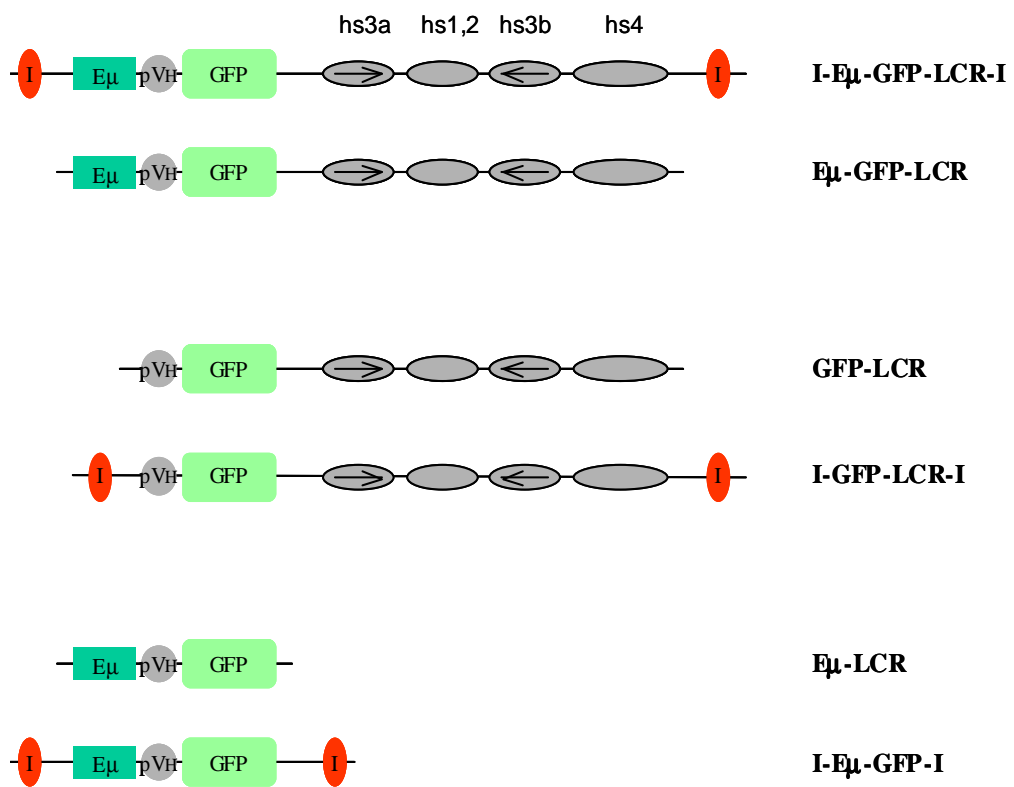


Figure 15 : Récapitulatif des différentes constructions utilisées dans nos travaux

DISCUSSION

I Synergies entre les différents éléments activateurs du locus IgH

La recherche de synergies transcriptionnelles entre l'activateur intronique $E\mu$ et les éléments 3' du locus IgH a été mise en oeuvre par plusieurs équipes. Chacune a employé des promoteurs et des combinaisons d'activateurs différentes. Les gènes rapporteurs utilisés et les lignées cellulaires transfectées sont également distincts. Les résultats de l'ensemble de ces études en sont, de ce fait, assez délicats à comparer. Il semble cependant en ressortir qu'une coopération importante a lieu entre les différentes régions *cis*-régulatrices. L'organisation génomique des différentes séquences activatrices pourrait également jouer un rôle important dans cette régulation. Une équipe a constaté que la distance séparant $E\mu$ de $hs1,2$ pouvait avoir des conséquences importantes sur l'effet activateur transcriptionnel (Mocikat *et al.*, 1993 et 1995). $hs1,2$ placé en aval du gène d'expression a un effet co-activateur de l'élément $E\mu$, alors que sa juxtaposition à $E\mu$ annule curieusement tout effet activateur. $hs1,2$ semble ainsi interagir avec $E\mu$ différemment selon la disposition et la distance qui sépare les deux éléments. Dans un système utilisant le gène rapporteur de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase, d'autres auteurs n'ont pu montrer de coopération entre $E\mu$ et $hs1,2$ en expression transitoire dans des lignées pré-B, B et plasmocytaire (Fulton et Van Ness, 1994).

La région 3' IgH constitue une région de contrôle de locus (LCR). Cette fonction a tout d'abord été montrée *in vitro* par transfection stable d'une lignée plasmocytaire (Madisen et Groudine, 1994). Elle a ensuite été confirmée, dans une unique étude, chez des animaux transgéniques dans lesquels le gène tronqué de la β -globine humaine a été placé sous le contrôle de pVH et de la LCR globale. Dans ce dernier cas, il n'a cependant pu être établi de relation linéaire entre le nombre de copies du transgène et son niveau d'expression (Chauveau *et al.*, 1999). L'ensemble des constructions utilisant les éléments 3' ne renferme que les "cœurs" des activateurs. Il pourrait cependant exister au sein des régions intervenantes d'autres séquences nécessaires aux éléments $hs3a$, $hs1,2$, $hs3b$ et $hs4$ pour constituer une LCR complète. Ainsi, l'élément $hs1,2$ est flanqué de répétitions inversées qui jouent certainement

un rôle important dans la régulation de la région 3'. Ces répétitions pourraient participer, avec l'aide de facteurs de liaison à l'ADN, à l'établissement d'une structure secondaire ou tertiaire de la chromatine (Pinaud *et al.*, 1997). Une situation similaire existerait pour d'autres LCR telle que celle du locus de la β -globine de souris où l'élément hs3 est flanqué de répétitions en tandem de 600 pb (Hug *et al.*, 1992), ou celui de l'adénosine déaminase chez l'homme qui est entouré de plusieurs répétitions inversées et en tandem (Aronow *et al.*, 1995).

Au cours de cette thèse, nous avons déterminé *in vivo* la cinétique d'activation de la région 3' IgH chez la souris, en association ou non avec E μ , au cours du développement des lymphocytes B. Nos résultats vont dans le sens de ceux précédemment observés *in vitro* lors d'expériences de transfection transitoire utilisant les gènes rapporteurs luciférase ou CAT (Ong *et al.*, 1998 ; Chauveau *et al.*, 1998b). Les activateurs sont disposés dans le génome de façon linéaire et semblent interagir les uns avec les autres afin d'obtenir une large unité fonctionnelle. E μ est actif aux stades précoces de la différenciation B : il joue un rôle dans la transcription, et sa délétion a montré son importance dans le contrôle des recombinaisons V_H à DJ_H (Chen *et al.* 1993 ; Serwe et Sablitzky, 1993). Dans les étapes plus tardives de la différenciation, E μ devient moins important. Les éléments hs3a, hs1,2, hs3b et hs4 débutent alors leur activité : ils agissent en synergie et probablement en coopération avec E μ afin de permettre la transcription de gènes leur étant associés. Leur implication dans les événements tels que la commutation de classe et l'hypermutation somatique renforce l'idée d'une activité tardive de ces activateurs au cours du développement B. L'analyse des souris I-E μ -GFP-I nous permettra de confirmer si E μ , pris individuellement, permet une activation de la transcription uniquement au cours des stades précoces de la différenciation B, ou s'il reste fonctionnel tout au long de la différenciation.

Ong et coll. (1998) ont montré que la synergie entre les activateurs est beaucoup moins importante quand un promoteur différent de pVH est utilisé. Les motifs de fixation de protéines présents dans les promoteurs, ainsi que dans chacun des activateurs, contribuent très probablement à cet effet synergique. Ainsi, le contrôle transcriptionnel du locus IgH change au cours du développement B. Les activateurs ont un rôle différent suivant le stade de développement considéré. Ceci implique que les multiples motifs de fixation de facteurs nucléaires soient différemment occupés à divers moments.

Birshstein et coll. ont émis l'hypothèse selon laquelle l'ensemble de la région 3' du locus consisterait en deux unités : la première impliquerait le palindrome hs3a-hs1,2-hs3b et la seconde comprendrait l'élément isolé, hs4. Chez la souris, en plus de cette dualité structurale, intervient une dualité fonctionnelle avec des éléments réputés faibles et spécifiques des cellules B matures et des plasmocytes (hs3a, hs12, hs3b) et un élément fortement actif aux stades précoces de la différenciation B (hs4). Il a été montré un effet concerté des trois partenaires du palindrome : les meilleurs effets activateurs transcriptionnels obtenus l'ont été lorsque le palindrome était présent dans son intégralité en respectant la conformation endogène. De plus, un fort effet transcriptionnel a été observé, dans les plasmocytes, avec le fragment contenant les répétitions inversées immédiatement flanquantes de hs1,2 (Chauveau *et al.*, 1998b).

Le locus IgH humain est plus complexe que celui de la souris. Il présente une duplication des régions constantes associée à une duplication des régions régulatrices situées en 3' de C α 1 et C α 2. Ces dernières se révèlent être quasi identiques l'une à l'autre et présentent de grandes similitudes avec la région 3' du locus de souris, notamment l'inclusion d'une structure palindromique centrée sur hs1,2 (seul l'élément hs3b n'est pas dupliqué en aval de hs1,2). Il faut cependant noter que contrairement aux éléments régulateurs 3' de souris qui s'étendent sur environ 35 kb, les éléments humains se condensent sur environ 15 kb. Mills et coll. attribuent à ces régions les différences d'expression observées entre les deux groupes de régions constantes. Ainsi, l'expression des régions constantes situées dans le groupe le plus en 5' sur le locus est beaucoup plus élevée que celle des régions situées plus en aval (Sideras *et al.*, 1992). La distance entre E μ et les régions régulatrices 3' pourrait participer à la modulation de l'expression des régions constantes. Les synergies observées, chez la souris, entre E μ et les différents activateurs transcriptionnels 3' du locus confortent cette hypothèse. Ces données laissent en effet présager un rôle important des interactions entre toutes les régions régulatrices du locus IgH pour l'expression des chaînes d'Ig humaines.

L'implication éventuelle des régions régulatrices 3' IgH dans certaines pathologies est assez peu documentée. On peut à ce sujet citer certains cas de lymphomes de Burkitt présentant des translocations chromosomiques (8:14) de l'oncogène *c-myc* qui le placent au voisinage de la partie 3' du locus IgH. De telles recombinaisons n'associent pas l'activateur intronique E μ à l'oncogène. Ce fait laisserait supposer que les activateurs transcriptionnels 3' du locus sont vraisemblablement responsables de l'expression dérégulée de *c-myc* (Madisen et

Groudine, 1994). Par ailleurs, compte tenu du rôle supposé de ces éléments dans le processus de commutation isotypique, leur altération pourrait également être associée à des anomalies de production de certains isotypes d'Ig. Ainsi, une étude réalisée chez des patients présentant des néphropathies idiopathiques à IgA (maladie de Berger), caractérisées par une hyperproduction des IgA₁, montre que la présence d'un allèle particulier de hs1,2 est corrélée avec une progression plus rapide de la maladie (Aupetit *et al.*, 2000). D'autres déficits immunitaires humoraux mériteraient d'être explorés en "3'IgH" tels que les déficits sélectifs en IgA et/ou en sous classe d'IgG.

II Etude de la spécificité tissulaire de la fonction des activateurs

La question de la spécificité tissulaire de l'expression des gènes d'Ig fait l'objet de nombreuses recherches. Cette spécificité a été dans un premier temps attribuée aux promoteurs. Des études dans des lignées cellulaires ont tout d'abord montré qu'ils étaient actifs spécifiquement dans les lymphocytes B, tout au long du développement (Mason *et al.*, 1985 ; Dreyfus *et al.*, 1987 ; Wirth *et al.*, 1987 ; Staudt et Lenardo, 1991). Cependant, dans des expériences de transgénèse, le promoteur V_H est actif aussi bien dans les cellules B que dans les thymocytes lorsqu'il est associé à l'activateur E_μ (Grosschedl *et al.*, 1984 ; Grosschedl et Baltimore, 1985 ; Jenuwein et Grosschedl, 1991) ; une expression "aberrante" a également été observée dans les muscles squelettiques (Jenuwein et Grosschedl, 1991). De nombreux autres modèles de transgénèse ayant pour séquence régulatrice E_μ, mais utilisant un promoteur autre que pVH, montrent une expression restreinte à la lignée lymphoïde (Reik *et al.*, 1987 ; Cook *et al.*, 1995 ; Storb *et al.*, 1986 ; Hagman *et al.*, 1989).

L'activité de E_μ dans la lignée T peut s'expliquer par la fixation sur cet activateur de facteurs transcriptionnels soit spécifiques de la lignée lymphoïde soit ubiquitaires. Certains auteurs ont suggéré que des protéines de régulation négative pourraient se fixer sur les séquences activatrices afin de réprimer leur expression dans des cellules non B (Kadesch *et al.*, 1986). Il a d'ailleurs été montré initialement que les MAR régulent négativement l'élément E_μ (Cockerill *et al.*, 1987 ; Wasylyk et Wasylyk, 1986).

Un modèle intéressant de souris transgénique a été décrit, étudiant l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de E_μ et du promoteur de la conalbumine de poulet. Ce

transgène est transcrit aussi bien dans les cellules B que dans d'autres tissus, ces derniers variant d'une lignée à une autre (Gerlinger *et al.*, 1986). Cet exemple illustre bien la difficulté de travailler sur des animaux transgéniques. Bien qu'ils présentent un profil d'expression commun, des différences individuelles peuvent apparaître, soulignant le problème de reproductibilité entre les différentes équipes de recherche. Chaque lignée de souris transgénique constitue ainsi un modèle en soi.

Des résultats similaires ont été obtenus avec un gène rapporteur C μ placé sous le contrôle de hs1,2 et de pVH qui s'exprime à la fois dans les lignées B et T (Andersson *et al.*, 1998). Chauveau et coll. (1999) ont réalisé un modèle de souris transgénique dans lequel le gène tronqué de la β -globine a été placé sous le contrôle de pVH et des quatre activateurs hs3a, hs1,2, hs3b, et hs4. L'analyse de ces souris a pu mettre en évidence la présence d'ARN β -globine spécifiquement dans le compartiment B. Une très faible expression a pu être observée dans le thymus. Elle serait due à la présence de quelques cellules B dans ce tissu. Ainsi, l'association de l'ensemble des activateurs situés en 3' du locus IgH semble nécessaire à l'activité spécifique de la région régulatrice 3' dans les cellules B.

A la vue de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que chacun des éléments de régulation puisse participer à la spécificité cellulaire de l'expression des Ig sans en être, pour autant, suffisant : ils n'agissent pas individuellement mais en collaboration afin d'obtenir une expression correcte selon le stade du développement et le type cellulaire. Il reste maintenant à définir les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation. Tous ces activateurs possèdent de multiples motifs de fixation pour des facteurs nucléaires qu'ils soient ubiquitaires, spécifiques de la lignée lymphoïde ou de la lignée B.

III Inactivation des transgènes

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression de nos différentes constructions par transfection stable de lignées cellulaires B de souris. Toutes les constructions s'expriment à la fois dans des cellules pré-B et B mature, et leur expression est stable. Nous avons cultivé certains clones plus de trois mois sans observer de modification de l'expression de la GFP. En

revanche, le profil observé par transgénèse est tout autre. Les transgènes E μ -GFP et GFP-LCR ne sont pas exprimés *in vivo* et sont méthylés dès le stade embryonnaire. Ainsi, pris individuellement, les activateurs de la région 5' et 3' ne permettent pas, dans nos modèles, une expression du transgène. Ces résultats remettent en cause leur propriété de LCR. L'association des deux régions régulatrices au sein d'un même transgène entraîne en revanche une expression de la GFP, confirmant que l'ensemble des séquences *cis*-régulatrices contenues dans le locus IgH participe à la régulation de la transcription afin de former une unité fonctionnelle importante. Dans ces dernières souris (lignée E μ -GFP-LCR), l'expression de la GFP est cependant transitoire. Les souris âgées de plus de six semaines ne présentent plus de cellules fluorescentes détectables. Nous avons recherché les causes de cette inactivation. Il ne s'agissait pas d'une délétion du transgène, ni de mutations introduites dans la séquence codant pour la GFP (communication C. Le Morvan). La stimulation des splénocytes par différentes combinaisons de cytokines n'a pas permis de réactiver l'expression. Nous nous sommes alors intéressés au profil de méthylation du transgène à différents âges de souris. De façon intéressante les résultats de cette analyse ont montré que le profil de méthylation n'est pas corrélé à l'activité transcriptionnelle et n'est pas spécifique du tissu exprimant le transgène. Ainsi la séquence codant pour la GFP chez des souris jeunes, âgées de 1 à 2 semaines, est complètement déméthylée quel que soit le tissu considéré (rate, thymus, foie adulte, cœur ou reins) alors que le transgène n'est exprimé que dans la rate et la moelle osseuse de ces souris. La méthylation progressive du transgène se fait ensuite en parallèle dans tous ces tissus. Ces résultats montrent que la déméthylation de l'ADN n'est pas suffisante pour induire la transcription des gènes qui nécessite la fixation d'un complexe protéique sur les séquences promotrices et activatrices. Le fait que les transgènes déméthylés ne soient pas exprimés dans des tissus autres que la rate et la moelle osseuse pourrait être la conséquence de la fixation de protéines impliquées dans la régulation négative du locus IgH ou d'une absence de fixation de facteurs de transcription.

Les paramètres influençant l'inactivation des séquences d'ADN exogènes par le processus de méthylation ne sont pas clairement définis. De nombreuses hypothèses ont été émises parmi lesquelles :

- le site d'intégration : un transgène intégré dans une région fortement réprimée, à proximité de l'hétérochromatine, aurait moins de chance d'être exprimé que s'il était intégré dans une région à chromatine ouverte.

- l'intégration dans le génome de cellules transfectées aboutit souvent à la formation de multimères. Or il a été montré que l'intégration d'un grand nombre de copies en tandem pouvait aboutir à une inactivation des transgènes (Garrick *et al.*, 1998).

- la séquence même du gène rapporteur (le gène GFP présente notamment de nombreux sites de méthylation potentielle) et la nature des activateurs et promoteurs régulant son expression pourraient également jouer un rôle (Hertz *et al.*, 1999).

Pour palier à l'inactivation systématique de nos constructions chez la souris, nous avons utilisé, comme outil, l'isolateur 5' HS4 de poulet. En effet, cet isolateur a été décrit pour sa capacité à augmenter la probabilité de l'expression de transgènes intégrés de façon aléatoire dans le génome et à le protéger de la méthylation (Rivella *et al.*, 2000). Ainsi, chez la souris, les isolateurs permettent l'expression du transgène GFP-LCR qui en leur absence est silencieux (article 3). Ils n'empêchent cependant pas une perte progressive de son expression. De plus, ils n'induisent pas une expression "à coup sûr" puisque sur quatre lignées de souris portant le transgène I-GFP-LCR-I provenant de quatre clones ES différents seule la moitié d'entre elles présente une expression de la GFP. Or, d'autres auteurs ont montré que les isolateurs ne permettaient pas une expression systématique des transgènes selon le site d'intégration (Walters *et al.*, 1999), ce qui pourrait être également le cas dans notre étude.

Nous avons également montré, par transfection stable de lignée cellulaire 18.81 et A20, que, seuls, ni E μ et ni LCR ne peuvent conférer une expression du gène rapporteur GFP dépendante du nombre de copies intégrées. En revanche, la présence des isolateurs flanquant la construction rétablit cette propriété (article 1). Ainsi, en protégeant nos différentes constructions des signaux activateurs ou répresseurs émanant des séquences adjacentes, l'isolateur 5'HS4 permet une expression plus homogène d'un clone cellulaire à un autre pour un nombre de copies de transgène intégré équivalent.

PERSPECTIVES

I Etude de l'activateur hs4 à l'aide de souris knock-out

Une des approches utilisées pour l'étude des éléments *cis*-activateurs de la région 3' IgH a consisté en leur remplacement ou leur délétion par recombinaison homologue chez la souris. Le remplacement des éléments hs1,2 par la cassette *pgk-néo'* a montré une dérégulation des événements de commutation de classe (accompagnée d'une diminution de la transcription germinale) touchant les isotypes IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgE (Cogné *et al.*, 1994). En revanche les délétions individuelles de hs1,2 ou hs3a ne s'accompagne d'aucune anomalie (Manis *et al.*, 1998). Plus récemment, il a été montré que la délétion conjointe des deux activateurs les plus en aval du locus, hs3b et hs4, altère la commutation de classe et la synthèse des Ig (Pinaud *et al.*, 2001). Une hypothèse serait que ce dernier phénotype soit dû à l'absence de l'élément hs4. En effet, la délétion totale de hs3a n'ayant conféré aucun phénotype particulier, la suppression de son homologue hs3b pourrait également être sans effet majeur, d'autant que ce dernier n'existe pas chez l'homme. Pour répondre à cette question nous avons entrepris la délétion de l'élément hs4 chez la souris. Ce projet rentre dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr. Alt (Harvard Medical School, Boston) qui a pour projet la délétion de l'ensemble du palindrome (hs3a-hs1,2-hs3b) afin de rechercher l'utilité des séquences répétées de part et d'autre de l'élément hs1,2.

II Transgènes *c-myc*

Dans les cellules de lymphomes de Burkitt, une translocation mettant en contact le proto-oncogène *c-myc* avec des séquences régulatrices du locus IgH (t14;18, 75% des cas) ou des locus Ig κ ou Ig λ (t2;8 ou t8;22, 25% des cas) est souvent observée. L'expression de la protéine c-Myc, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire des cellules normales, est alors dérégulée et conduit à une prolifération accrue des cellules B.

Jusqu'à présent les animaux transgéniques *c-myc* documentés ont été réalisés avec des transgènes incluant des éléments activateurs introniques (E μ ou les activateurs de chaînes légères) dont l'activité au cours du développement B est précoce (Harris *et al.*, 1988 ; Schmidt *et al.*, 1988 ; Polack *et al.*, 1993). Aucun des modèles obtenus n'a ainsi pu reproduire réellement la biologie du lymphome de Burkitt, identifié comme une prolifération "centre germinatif ou post-centre germinatif". En effet, les souris transgéniques développent pour la plupart des lymphomes B de phénotype immature, essentiellement pré-B.

Nous sommes donc actuellement en train de réaliser des souris I-*c-myc*-LCR-I qui incluent les activateurs 3' IgH connus pour leur activité tardive au cours de l'ontogénie B et jouant un rôle majeur dans le processus de commutation de classe spécifiquement activé au sein des centres germinatifs. Nous espérons pouvoir obtenir de souris transgéniques qui reconstituent un modèle de lymphome plus proche de la pathologie humaine.

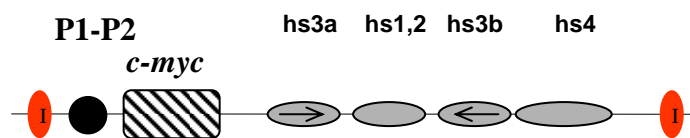


Figure 16 : construction *c-myc*

le proto-oncogène *c-myc* humain est placé sous le double contrôle de la LCR 3' IgH et de ses deux promoteurs P1 et P2.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams B., Dorfler P., Aguzzi A., Kozmik Z., Urbanek P., Maurer-Fogy I., et Busslinger M. (1992) Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev.* **6**, 1589-1607.

Aguilera R., Hope T., et Sakano H. (1985) Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas. *EMBO J.* **4**, 3689-3693.

Akashi K., Kondo M., von Freeden-Jeffry U., Murray R., et Weissman I.L. (1997) Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* **89**,1033-1041.

Alessandrini A., et Desiderio S. (1991) Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2096-2107.

Allen R.D., Bender T.P., et Siu G. (1999) c-Myb is essential for early T cell development. *Genes Dev.* **13**, 1073-1078.

Allman D.M., Ferguson S.E., Lentz V.M., et Cancro M.P. (1993) Peripheral B cell maturation. II. Heat stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J. Immunol.* **151**, 4431-4444.

Andersson T., Furebring C., Borrebaeck C.A.K., et Pettersson S. (1998) Temporal expression of a V_H promoter-C_μ transgene linked to the IgH HS1,2 enhancer. *Mol. Immunol.* **36**, 19-29.

Annweiler A., Muller U., et Wirth T. (1992) Fonctionnal analysis of defined mutations in the immunoglobulin heavy-chain enhancer in transgenic mice. *Nucl. Acids. Res.* **20**, 1503-1509.

Aronow B.J., Ebert C.A., Valerius M.T., Potter S.S., Wiginton D.A., Witte D.P., et Hutton J.J. (1995) Dissecting a locus control region: facilitation of enhancer function by extended enhancer-flanking sequences. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1123-1135.

Arulampalam V., Eckhardt L., et Pettersson S. (1997) The enhancer shift: a model to explain the developmental control of IgH gene expression in B-lineage cells. *Immunol. Today* **18**, 549-554.

Aupetit C., Drouet M., Pinaud E., Denizot Y., Aldigier J-C., Bridoux F., et Cogné M. (2000) Alleles of the $\alpha 1$ immunoglobulin gene 3' enhancer control evolution of IgA nephropathy toward renal failure. *Kidney Int.* **58**, 966-971.

Bain G., Maandag E.R., Izon D.J., Amsen D., Kruisbeek A.M., Weintraub B.C., Krop I., Schlissel M.S., Feenley A.J., van Roon M., van der Valk M., Riele H., Berns A., et Murre C. (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of Ig gene rearrangements. *Cell* **79**, 885-892.

Ballard D.W., et Bothwell A. (1987) Mutational analysis of the immunoglobulin heavy chain promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9626-9630.

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

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

Bell A.C., West A.G., et Felsenfeld G. (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**, 387-396.

Betz A.G., Neuberger M.S., et Milstein C. (1993) Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol. Today* **14**, 405-411.

Betz A.G., Milstein C., Gonzales-Fernandez A., Pannell R., Larson T., et Neuberger M.S. (1994) Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin κ gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* **77**, 239-248.

Bird A.P., et Wolffe A.P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-454.

Bogue M., et Roth D.B. (1996) Mechanism of V(D)J recombination. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 175-180.

Bories J-C., Demengeot J., Davidson L., et Alt F.W. (1996) Gene-targeted deletion and replacement of the T-cell receptor β -chain enhancer: The role of enhancer elements in controlling V(D)J recombination accessibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7871-7876.

Bottaro A., Young F., Chen J., Serwe M., Stablitzky F., et Alt F.W. (1998) Deletion of the IgH intronic enhancer of associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int. Immunol.* **10**, 799-806.

Bulger M., et Groudine M. (1999) Looping versus linking: toward a model for a long-distance gene activation. *Genes Dev.* **13**, 2465-2477.

Burgess-Beusse B., Farrell C., Gaszner M., Litt M., Mutskov V., Recillas-Targa F., Simpson M., West A., et Felsenfeld G. (2002) The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16433-16437.

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

Candéias S., Muegge K., et Durum S.K. (1997a) IL-7 receptor and VDJ recombination: Trophic versus mechanistic actions. *Immunity* **6**, 501-508.

Candéias S., Peschon J.J., Muegge K., et Durum S.K. (1997b) Defective T-cell receptor γ gene rearrangement in interleukin-7 receptor knockout mice. *Immunol. Letters* **57**, 9-14.

Capone M., Watrin F., Fernex C., Horvat B., Krippel B., Wu L., Scollay R., et Ferrier P. (1993) TCR beta and TCR alpha gene enhancers confer tissue- and stage-specificity on V(D)J recombination events. *EMBO J.* **12**, 4335-4336.

Casamayor-Pallejà M., Mondière P., Amara A., Bella C., Dieu-Nosjean M-C., Caux C., et Defrance T. (2001) Expression of macrophage inflammatory protein-3 α , stromal cell-derived factor-1, and B-cell-attracting chemokine-1 identifies the tonsil crypt as an attractive site for B cells. *Blood* **97**, 3992-3994.

Ceredig R., Rolink A.G., Melchers F., et Andersson J. (2000) The B cell receptor, but not the pre-B cell receptor, mediates arrest of B cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* **30**, 759-767.

Cervoni N., Bhattacharya S., et Szyf M. (1999) DNA demethylase is a processive enzyme. *J. Biol. Chem.* **274**, 8363-8366.

Chaudhuri J., Tian M., Khuong C., Chua K., Pinaud E., et Alt F.W. (2003) Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* **422**, 726-730.

Chauveau C., et Cogné M. (1996) Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* **14**, 15-16.

Chauveau C., Decourt C., et Cogné M. (1998a) Insertion of the IgH locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants. *Gene* **222**, 279-285.

Chauveau C., Pinaud E., et Cogné M. (1998b) Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3048-3056.

Chauveau C., Jansson E A., Müller S., Cogné, M., et Pettersson S. (1999) Immunoglobulin heavy chain 3' HS1-4 directs correct spatial position independent expression of a linked transgene to B lineage cells. *J. Immunol.* **163**, 4637-4641.

Chen C., et Birshstein B.K. (1997) Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3' IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C α 1 and C α 2 genes. *J. Immunol.* **159**, 1310-1318.

Chen J., Young F., Bottaro A., Stewart V., Smith R.K., et Alt F.W. (1993) Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J.* **12**, 4635-4645.

Chen W.Y., et Townes T.M. (2000) Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 377-382.

Cherry S.R., et Baltimore D. (1999) Chromatin remodeling directly activates V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10788-10793.

Cherry S.R., Beard C., Jaenisch R., et Baltimore D. (2000) V(D)J recombination is not activated by demethylation of the kappa locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8467-8472.

Choi J.K., Shen C.P., Radomska H.S., Eckhardt L.A., et Kadesch T. (1996) E47 activates the Ig-heavy chain and TdT loci in non-B cells. *EMBO J.* **15**, 5014-5021.

Christensen S.M., Martin B.K., Tan S.S., et Weis J.H. (1992) Identification of sites for distinct DNA binding proteins including Oct-1 and Oct-2 in the Cr2 gene. *J. Immunol.* **148**, 3610-3617.

Chung J.H., Whiteley M., et Felsenfeld G. (1993) A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* **74**, 505-514.

Chung J.H., Bell A., et Felsenfeld G. (1997) Characterization of the chicken β -globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 575-580.

Cockerill P.N., Yuen M.H., et Garrard W.T. (1987) The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J. Biol. Chem.* **262**, 5394-5397.

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

Cook G.P., Meyer K.B., Neuberger M.S., et Pettersson S. (1995) Regulated activity of the IgH intron enhancer (E_{μ}) in the T lymphocyte lineage. *Int. Immunol.* **7**, 89-95.

Corcoran L.M., Karvelas M., Nossal G.J., Ye Z.S., Jacks T., et Baltimore D. (1993) Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival. *Genes Dev.* **7**, 570-582.

Corcoran L.M. et Karvelas M. (1994) Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity* **1**, 635-645.

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

Cortes M., Wong E., Koipally J., et Georgopoulos K. (1999) Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 167-171.

D'Apuzzo M., Rolink A., Loetscher M., Hoxie J.A., Clark-Lewis I., Melchers F., Baggiolini M. et Moser B. (1997) The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1788-1793.

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

Denizot Y., Pinaud E., Aupetit C., Le Morvan C., Magnoux E., Aldigier J.C., et Cogné M. (2001) Polymorphism of the human $\alpha 1$ immunoglobulin gene 3' enhancer hs1,2 and its relation to gene expression. *Immunology* **103**, 35-40.

Dirkes G., Köhler G., et Kottmann A.H. (1994) Sequence and structure of the mouse IgH DQ52 5' region. *Immunogenetics* **40**, 379.

Dorner T., Foster S.J., Farner N.L., et Lipsky P.E. (1998) Immunoglobulin κ chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **102**, 688-694.

Dreyfus M., Doyen N., et Rougeon F. (1987) The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *EMBO J.* **6**, 1685-1690.

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

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

Engler P., Roth P., Kim J.Y., et Storb U. (1991) Factors affecting the rearrangement efficiency of an Ig test gene. *J. Immunol.* **146**, 2826-2835.

Engler P., et Storb U. (1999) Hypomethylation is necessary but not sufficient for V(D)J recombination within a transgenic substrate. *Mol. Immunol.* **36**, 1169-1173.

Ernst P., et Smale S.T. (1995) Combinatorial regulation of transcription II: the immunoglobulin μ heavy chain gene. *Immunity* **2**, 427-438.

Eyquem S., Lagresle C., Fasseu M., Sigaux F., et Bories J-C. (2002) Disruption of the lineage restriction of TCR β gene rearrangements. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3256-3266.

Falkner F.G., et Zachau H.G. (1984) Correct transcription of an immunoglobulin κ gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* **310**, 71-74.

Fernandez L.A., Winkler M., et Grosschedl R. (2001) Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin μ enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 196-208.

Fitzsimmons D., Hodsdon W., Wheat W., Maira S-M., Wasylyk B., et Hagman J. (1996) Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. *Genes Dev.* **10**, 2198-2211.

Forrester W.C., van Genderen C., Jenuwein T., et Grosschedl R. (1994) Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene of nuclear matrix attachment regions. *Science* **265**, 1221-1225.

Forrester W.C., Fernandez L.A., et Grosschedl R. (1999) Nuclear matrix attachment regions antagonize methylation-dependent repression of long-range enhancer-promoter interactions. *Genes Dev.* **13**, 3003-3014.

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

Fulton R., et Van Ness B. (1994) Selective synergy of immunoglobulin enhancer elements in B-cell development: a characteristic of kappa light chain enhancers, but not heavy chain enhancers. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4216-4223.

Galy A., Travis M., Cen D., et Chen B. (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**, 459-73

Garrick D., Fiering S., Martin D.I., Whitelaw E. (1998) Repeat induced gene silencing in mammals. *Nat. Genet.* **18**, 56-59.

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

Gay D., Saunders T., Camper S., et Weigert M. (1993) Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* **177**, 999-1008.

Georgopoulos K., Bigby M., Wang J.H., Molnar A., Wu P., Winandy S., et Sharpe A. (1994) The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* **79**, 143-156.

Gerlinger P., LeMeur M., Irrmann C., Renard P., Wasylyk C. et Wasylyk B. (1986) B-lymphocyte targeting of gene expression in transgenic mice with the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Nucl. Acids Res.* **14**, 6565-6577.

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

Gilfillan S., Benoist C., et Mathis D. (1995) Mice lacking Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: adult mice with a fetal antigen receptor repertoire. *Immunol. Rev.* **148**, 201-219.

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

Gong S., et Nussenzweig M.C. (1996) Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* **272**, 411-414.

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

Goyenechea B., Klix N., Yélamos J., Williams G.T., Riddell A., Neuberger M.S., et Milstein C. (1997) Cells strongly expressing Ig κ transgenes show clonal recruitment of hypermutation: a role for both MAR and the enhancers. *EMBO J.* **16**, 3987-3994.

Grabstein K.H., Waldschmidt T.J., Finkelman F.D., Hess B.W., Alpert A.R., Boiani N.E., Namen A.E., et Morrissey P.J. (1993) Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **178**, 257-264.

Grawunder U., Leu T.M., Schatz D.G., Werner A., Rolink A.G., Melchers F., et Winkler T.H. (1995) Down-regulation of RAG-1 and RAG-2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* **3**, 601-608.

Gregor P.D., et Morrison S.L. (1986) Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1903-1916.

Grosschedl R., Weaver D., Baltimore D., et Constantini F. (1984) Introduction of a μ immunoglobulin gene into the mouse germ line: Specific expression in lymphoid cells and synthesis of functional antibody. *Cell* **38**, 647-658.

Grosschedl R., et Baltimore D. (1985) Cell-type specificity of immunoglobulin gene expression is regulated by at least three DNA sequence elements. *Cell* **41**, 885-897.

Hagman J., Lo D., Doglio L.T., Hackett J. Jr., Rudin C.M., Haasch D., Brinster R., et Storb U. (1989) Inhibition of immunoglobulin gene rearrangement by the expression of a lambda 2 transgene. *J. Exp. Med.* **169**, 1911-1929.

Hardy R.R., Carmack C.E., Shinton S.A., Kemp J.D., et 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.

Harris A.W., Pinkert C.A., Crawford M., Langon W.Y., Brinster R.L., et Adams J.M. (1988) The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J. Exp. Med.* **167**, 353-371.

Hebbes T.R., Clayton A.L., Thorne A.W., et Crane-Robinson C. (1994) Core histone hyperacetylation co-maps with generalized Dnase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* **13**, 1823-1830.

Hermanson G.G., Briskin M., Sigman D., et Wall R. (1989) Immunoglobulin enhancer and promoter motifs 5' of the B29 B-cell-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7341-7345.

Herrera J.E., Sakaguchi K., Bergel M., Trieschmann L., Nakatani Y., et Bustin M. (1999) Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PACF alters its interaction with nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3466-3473.

Hertz J.M., Schell G., et Doerfler W. (1999) Factors affecting *de novo* methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 24232-24240.

Hesslein D., et Schatz D. (2001) Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv. Immunol.* **78**, 169-232.

Hofmeister R., Khaled A.R., Benbernou N., Rajnavolgyi E., Muegge K., et Durum S.K. (1999) Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 41-60.

Hsieh C.L. (2000) Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 224-228.

Hug B.A., Moon A.M., et Ley T.J. (1992) Structure and function of the murine beta-globin locus control region 5' HS-3. *Nucl. Acids Res.* **20**, 5771-5778.

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

Jenuwein T., Forrester W.C., Fernandez-Herrero L.A., Laible G., Dull M., et Grosschedl R. (1997) Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* **385**, 269-272.

Jones P.A., et Takai D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068-1070.

Jones P.L., Veenstra G.J., Wade P.A., Vermaak D., Kaas S.U., Landsberger N., Strouboulis J., et Wolffe A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**, 187-191.

Kadesch T., Zervos P., et Ruezinsky D. (1986) Functional analysis of the murine IgH enhancer: evidence for negative control of cell-type specificity. *Nucl. Acids Res.* **14**, 8209-8221.

Kaludov N.K., et Wolffe A.P. (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucl. Acids Res.* **28**, 1921-1928.

Karasuyama H., Rolink A., et Melchers F. (1993) A complex of glycoprotein is associated with VpreB/ λ 5 surrogate light chain on the surface of μ heavy chain-negative early precursor B cell lines. *J. Exp. Med.* **178**, 469-478.

Kee B.L., et Murre C. (1998) Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J. Exp. Med.* **188**, 699-713.

Kemler I., Schreiber E., Muller MM., Matthias P., et Schaffner W. (1989) Octamer transcription factors bind to two different sequence motifs of the immunoglobulin heavy chain promoter. *EMBO J.* **8**, 2001-2008.

Kenter A.L. (2003) Class-switch recombination: after the dawn of AID. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 190-198.

Khamlichi A.A., Pinaud E., Decourt C., Chauveau C., et Cogné M. (2000) The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv. Immunol.* **75**, 317-345.

Kim U., Qin X.F., Gong S., Stevens S., Luo Y., Nussenzweig M., et Roeder R.G. (1996) The B-cell specific transcription factor OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature* **383**, 542-547.

Kimura H., et Shiota K. (2003) Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J. Biol. Chem.* **278**, 4806-4812.

Kitamura D., Roes J., Kuhn R., et Rajewsky K. (1991) A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* **350**, 423-426.

Kitamura D., Kudo A., Schaal S., Muller W., Melchers F., et Rajewsky K. (1992a) A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* **69**, 823-831.

Kitamura D., et Rajewsky K. (1992b) Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* **356**, 154-156.

Klein S., Sablitzki F., et Radbruch A. (1984) Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of hybridoma IgD class switch variant. *EMBO J.* **3**, 2473-2476.

Kondo M., Weissman I.L., et Akashi K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-72.

Kottmann A.H., Brack C., Eibel H., et Kohler G. (1992) A survey of protein-DNA interaction sites within the murine immunoglobulin heavy chain locus reveals a particularly complex pattern around the DQ52 element. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2113-2120.

Kottmann A.H., Zevnik B., Welte M., Nielsen P.J., et Kohler G. (1994) A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* **24**, 817-821.

Kwon J., Imbalzano A.N., Matthews A., et 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.

Lebecque S., et Gearhart P. (1990) Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is ~1 kb from V(D)J gene. *J. Exp. Med.* **172**, 1717-1727.

LeBowitz J.H., Kobayashi T., Staudt L., Baltimore D., et Sharp P.A. (1988) Octamer-binding proteins from B or Hela cells stimulates transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter *in vitro*. *Genes Dev.* **2**, 1227-1237.

Le Morvan C., Pinaud E., Decourt C., Cuvillier A., et Cogné M. (2003) The immunoglobulin heavy chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* **102**, 1421-1427.

Li Q., Peterson K.R., Fang X., et Stamatoyannopoulos G. (2002) Locus control regions. *Blood* **100**, 3077-3086.

Li Y.S., Wasserman R., Hayakawa K., et Hardy R.R. (1996) Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* **5**, 527-535.

Liao F., Giannini S.L., et Birshstein B.K. (1992) A nuclear DNA-binding protein expressed during early stages of B cell differentiation interacts with diverse segments within and 3' of the IgH chain gene cluster. *J. Immunol.* **148**, 2909-2917.

Lieberson R., Giannini S., Birshstein B.K., et Eckhardt L.A. (1991) An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucl. Acids Res.* **19**, 933-937.

Lin H., et Grosschedl R. (1995) Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* **376**, 263-267.

Löffert D., Ehlich A., Müller W., et Rajewsky K. (1996) Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* **4**, 133-144.

Madisen L., et 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.

Madisen L., Krumm A., Hebbes T.R., et Groudine M. (1998) The immunoglobulin heavy chain locus control region increases histone acetylation along linked c-myc genes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6281-6292.

Maës J., O'Neill L.P., Cavelier P., Turner B.M., Rougeon F., et Goodhardt M. (2001) Chromatin remodeling at the Ig loci prior to V(D)J recombination. *J. Immunol.* **167**, 866-874.

Maki K., Nagata K., Kitamura F., Takemori T., et Karasuyama H. (2000) Immunoglobulin β signaling regulates locus accessibility for ordered Immunoglobulin gene rearrangements. *J. Exp. Med.* **191**, 1333-1340.

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

Manis J.P., Tian M., et Alt F.W. (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* **23**, 31-39.

Maraskovsky E., O'Reilly L.A., Teepe M., Corcoran L.M., Peschon J.J., et Strasser A. (1997) Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in *rag*^{-/-} mice. *Cell* **89**, 1011-1019.

Maraskovsky E., Peschon J.J., McKenna H., Teepe M., Strasser A. (1998) Overexpression of Bcl-2 does not rescue impaired B lymphopoiesis in IL-7 receptor-deficient mice but can enhance survival of mature B cells. *Int. Immunol.* **10**, 1367-1375.

Mason J.O., Williams G.T., et Neuberger M.S. (1985) Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* **41**, 479-487.

Mather EL, Perry RP. (1983) Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4689-4693.

Mathieu N., Hempel W.M., Spicuglia S., Verthuy C., et Ferrier P. (2000) Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)- β gene enhancer during early T cell development: implication for the control of TCR- β locus recombination. *J. Exp. Med.* **192**, 625-636.

Matthias P., et Baltimore D. (1993) The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the α constant region. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1547-1553.

McBlane F., et Boyes J. (2000) Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation. *Curr. Biol.* **10**, 483-486.

McKean D., Huppi K., Bell M., Staudt L., Gerhard W., et Weigert M. (1984) Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 3180-3184.

McKercher S.R., Torbett B.E., Anderson K.L., Henkel G.W., Vestal D.J., Baribault H., Klemsz M., Feeney A.J., Wu G.E., Paige C.J., et Maki R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* **15**, 5647-5658.

McMurry M.T., et Krangel M.S. (2000) A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science* **287**, 495-498.

Meffre E., Fougereau M., Argenson J.N., Aubaniac J.M., et Schiff C. (1996) Cell surface expression of surrogate light chain (ψ L) in the absence of μ on human pro-B cell lines and normal pro-B cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2172-2180.

Melchers F., Karasuyama H., Haasner D., Bauer S., Kudo A., Sakaguchi N., Jameson B., et Rolink A. (1993) The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol. Today* **14**, 60-68.

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

Michaelson J.S., Singh M., et Birshstein B.K. (1996) B cell lineage-Specific Activator Protein (BSAP). A player at multiple stages of B cell development. *J. Immunol.* **156**, 2349-2351.

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

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

Milutinovic S., Zhuang Q., Niveleau A., et Szyf M. (2003) Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *J. Biol. Chem.* **278**, 14985-14995.

Mocikat R., Harloff C., et Kütemeier G. (1993) The effect of the rat immunoglobulin heavy chain 3' enhancer is position dependant. *Gene* **136**, 349-353.

Mocikat R., Kardinal C., et Klobeck H.G. (1995) Differential interactions between the immunoglobulin heavy chain μ intron and 3' enhancer. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3195-3198.

Mostoslavsky R., Singh N., Kirillov A., Pelanda R., Cedar H., Chess A., et Bergman Y. (1998) Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev.* **12**, 1801-1811.

Mucenski M.L., McLain K., Kier A.B., Swerdlow S.H., Schreiner C.M., Miller T.A., Pietryga D.W., Scott J.W.J., et Potter S.S. (1991) A functional *c-myb* gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**, 677-689.

Mundt C., Licence S., Shimizu T., Melchers F., et Mårtensson I-L. (2001) Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in *VpreB1/VpreB2* double-deficient mice. *J. Exp. Med.* **193**, 435-445.

Muramatsu M., Kinoshita K., Faragasan S., Yamada S., Shinkai Y., et Honjo T. (2000) Class switch recombination and hypermutation requires activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563.

Nabirochkin S., Ossokina M., et Heidmann T. (1998) A nuclear matrix/scaffold attached region co-localizes with the gypsy retrotransposon insulator sequence. *J. Biol. Chem.* **273**, 2473-2479.

Nagasawa T., Kikutani H. et Kishimoto T. (1994) Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2305-2309.

Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa S., Kitamura Y., Yoshida N., Kikutani H., et Kishimoto T. (1996) *Nature* **382**, 635-638.

Nagata K., Nakamura T., Kitamura F., Kuramochi S., Taki S., Campbell K.S., et Karasuyama H. (1997) The Ig α /Ig β heterodimer on μ -negative pro-B cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* **7**, 559-570.

Nan X., Ng H.H., Johnson C.A., Laherty C.D., Turner B.M., Eisenman R.N., et Bird A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.

Neuberger M.S., et Calabi F. (1983) Reciprocal chromosome translocation between *c-myc* and immunoglobulin $\gamma 2b$ genes. *Nature*. **305**, 240-243.

Ng H.H., et Bird A. (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 158-163.

Nitschke L., Kestler J., Tallone T., Pelkonen S., et Pelkonen J. (2001) Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J. Immunol.* **166**, 2540-2552.

Nutt S.L., Urbánek P., Rolink A., et Busslinger M. (1997) Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev.* **11**, 476-491.

Nutt S.L., Morrison A.M., Dörfler P., Rolink A., et Busslinger M. (1998) Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J.* **17**, 2319-2333.

Nutt S.L., Heavey B., Rolink A.G., et Busslinger M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556-562.

Oancea AE, Berru M, Shulman MJ (1997) Expression of the (recombinant) endogenous immunoglobulin heavy-chain locus requires the intronic matrix attachment regions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2658-2668.

Oettinger M.A., Schatz D.G., Gorka C., et Baltimore D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517-1523.

Ohnishi K., Shimizu T., Karasuyama H., et Melchers F. (2000) The identification of a nonclassical cadherin expressed during B cell development and its interaction with surrogate light chain. *J. Biol. Chem.* **275**, 31134-31144.

Ong, J., Stevens, S., Roeder, R. G. and Eckhardt, L. A. (1998) 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J. Immunol.* **160**, 4896-4903.

Osmond D.G. (1991) Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 179-185.

Parslow T.G., Blair D.L., Murphy W.J., et Granner D.K. (1984) Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **81**, 2650-2654.

Pelanda R., Schaal S., Torres R.M., et Rajewsky K. (1996) A prematurely expressed Ig κ transgene, but not V κ J κ gene segment targeted into the Ig κ locus, can rescue B cell development in λ 5-deficient mice. *Immunity* **5**, 229-239.

Peschon J.J, Morrissey P.J., Grabstein K.H., Ramsdell F.J., Maraskovsky E., Gliniak B.C., Park L.S., Ziegler S.F, Williams D.E., Ware C.B., et al. (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1955-1960.

Peters A., et Storb U. (1996) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* **4**, 57-65.

Pettersson S., Cook G.P., Brüggemann M., Williams G.T. et Neuberger M.S. (1990) A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* **344**, 165-168.

Pfisterer P., Annweiler A., Ullmer C., Corcoran L.M., et Wirth T. (1994) Differential transactivation potential of Oct-1 and Oct-2 is determined by additional B cell-specific activities. *EMBO J.* **13**, 1654-1663.

Picard D., et Schaffner W. (1985) Cell-type preference of immunoglobulin κ and λ gene promoters. *EMBO J.* **4**, 2831-2838.

Pierani A., Heguy A., Fujii H., et Roeder R.G. (1990) Activation of octamer-containing promoters by either octamer binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B cell-specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6204-6215.

Pikaart M.J., Recillas-Targa F., et Felsenfeld G. (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* **12**, 2852-2862.

Pinaud E., Aupetit C., Chauveau C., et Cogné M. (1997) Identification of a homolog of the C α 3'/*hs3* enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH *hs1,2* enhancer downstream the human immunoglobulin α 1 gene. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2981-2985.

Pinaud E., Khamlichi A.A., Le Morvan C., Drouet M., Le Bert M., et Cogné M. (2001) Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**, 187-199.

Poellinger L., Yoza B.K., et Roeder R.G. (1989) Functionnal cooperativity between protein molecules bound at distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy chain promoter. *Nature* **337**, 573-576.

Polack A., Feederle R., Klobecg G., et Hortnagel K. (1993) Regulatory elements in the immunoglobulin kappa locus induce c-myc activation and the promoter shift in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* **12**, 3913-3920.

Radic M.Z., Erikson J., Litwin S., et Weigert M. (1993) B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp. Med.* **177**, 1165-1173.

Recillas-Targa F., Pikaart M.J., Burgess-Beusse B., Bell A.C., Litt M.D., West A.G., Gaszner M., et Felsenfeld G. (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken β -globin insulator are separable activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6883-6888.

Reik W., Williams G.T., Barton S., Norris M., Neuberger M.S., et Surani M.A. (1987) Provision of the immunoglobulin heavy chain enhancer downstream of a test gene is sufficient to confer lymphoid-specific expression in transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* **17**, 465-469.

Reya T., O'Riordan M., Okamura R., Devaney E., Willert K., Nusse R., et Grosschedl R. (2000) Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* **13**, 15-24.

Rinkenberger J.L., Wallin J.J., Johnson K.W., et Koshland M.E. (1996) An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene. *Immunity* **5**, 377-386.

Rivella S., Callegari J.A., May C., Tan C.W., et Sadelain M. (2000) The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J. Virol.* **74**, 4679-4687.

Rolink A., Grawunder U., Winkler T.H., Karasuyama H., et Melchers F. (1994) IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int. Immunol.* **6**, 1257-1264.

Rolink A., ten Boekel E., Melchers F., Fearon D.T., Krop I., et Andersson J. (1996a) A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* **183**, 187-94.

Rolink A., Haasner D., Melchers F., et Andersson J. (1996b) The surrogate light chain in mouse B-cell development. *Int. Rev. Immunol.* **13**, 341-356.

Rolink A.G., Nutt S.L., Melchers F., et Busslinger M. (1999) Long-term *in vivo* reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* **401**, 603-606.

Rolink A.G., Winkler T., Melchers F. et Andersson J. (2000a) Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J. Exp. Med.* **191**, 23-31.

Sadhu A., Shen M-L., Hackbarth M., Hume E., et McKeithan T.W. (1997) CpG-rich sequences close to the site of duplication within the human IgH constant region. *Immunogenetics* **45**, 365-370.

Sagara S., Sugaya K., Tokoro Y., Tanaka S., Takano H., Kodama H., Nakauchi H., et Takahama Y. (1997) B220 expression by T lymphoid progenitor cells in mouse fetal liver. *J. Immunol.* **158**, 666-676.

Sakai E., Bottaro A., Davidson L., Sleckman B.P., et Alt F.W. (1999a) Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1526-1531.

Sakai E., Bottaro A., et Alt F.W. (1999b) The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int. Immunol.* **11**, 1709-1713.

Saleque S., Singh M., et Birshstein B.K. (1999) Ig heavy chain expression and class switching *in vitro* from an allele lacking the 3' enhancers DNase I-hypersensitive hs3A and hs1,2. *J. Immunol.* **162**, 2791-2803.

Sawchuk D., Weis-Garcia F., Malik S., Besmer E., Bustin M., Nussenzweig M., et Cortes P. (1997) V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J. Exp. Med.* **185**, 2025-2032.

Schaniel C., Bruno L., Melchers F., et Rolink A.G. (2002a) Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted *Pax5*-deficient pre-B I-cell clones. *Blood* **99**, 472-478.

Schaniel C., Gottar M., Roosnek E., Melchers F. et Rolink A.G. (2002b) Extensive in vivo self-renewal, long-term reconstitution capacity, and hematopoietic multipotency of *Pax5*-deficient precursor B-cell clones. *Blood* **99**, 2760-2766.

Schatz D.G., Oettinger M.A., et Baltimore D. (1989) The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**, 1035-1048.

Schlissel M.S., Corcoran L.M., et Baltimore D. (1991a) Virus transformed pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription. *J. Exp. Med.* **173**, 711-720.

Schlissel M., Voronova A., et Baltimore D. (1991b) Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germline Ig heavy chain gene transcription and rearrangement in a pre-T cell line. *Genes Dev.* **5**, 1367-1376.

Schmidt E.V., Pattengale P.K., Weir L., et Leder P. (1988) Transgenic mice bearing the human *c-myc* gene activated by an immunoglobulin enhancer: a pre-B-cell lymphoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6047-6051.

Schubart D.B., Rolink A., Kosco-Vilbois M.H., Botteri F., et Matthias P. (1996) B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* **383**, 538-542.

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

Scott E.W., Simon M.C., Anastasi J., et Singh H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573-1577.

Sharpe M.J., Milstein C., Jarvis J.M., et Neuberger M.S. (1991) Somatic hypermutation of immunoglobulin kappa may depend on sequences 3' of C kappa and occurs on passenger transgenes. *EMBO J.* **10**, 2139-2145.

Serwe M., et Sablitzky F. (1993) V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J.* **12**, 2321-2327.

Sideras P., Nilsson L., Islam K.B., Quintica I.Z., Freihof L., Rosen G.J., Hammarstrom L., et Smith C.I. (1992) Transcription of unrearranged IgH chain genes in human B cells malignancies. Biased expression of genes encoded within the first duplication unit of the IgH chain locus. *J.Immunol.* **149**, 244.

Spangrude G.J., Heimfeld S., et Weissam I.R. (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cell. *Science* **241**, 58-62.

Staudt L.M., et Lenardo M.J. (1991) Immunoglobulin gene transcription. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 373-398.

Stavnezer J. (1996) Antibody class switching. *Adv. Immunol.* **61**, 79-146.

Storb U., et Arp B. (1993) Methylation patterns of immunoglobulin genes in lymphoid cells: correlation of expression and differentiation with undermethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6642-6646.

Storb U., Pinkert C., Arp B., Engler P., Gollahon K., Manz J., Brady W., et Brinster R.L. (1986) Transgenic mice with μ and κ genes encoding antiphosphorylcholine antibodies. *J. Exp. Med.* **164**, 627-641.

Struhl K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**, 599-606.

Svigvardsson M., O'Riordan M., et Grosschedl R. (1997) EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous Ig surrogate light chain genes. *Immunity* **7**, 25-36.

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

Tachibana K., Hirota S., Iizasa H., Yoshida H., Kawabata K., Kataoka Y., Kitamura T., Matsushima K., Yoshida N., Nishikawa S.I., et al. (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**, 591-594.

ten Boekel E., Melchers F., et Rolink A. (1995) The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int. Immunol.* **7**, 1013-1019.

ten Boekel E., Melchers F., Rolink A.G. (1997) Changes in the V(H) gene repertoire of developing precursor B lymphocytes in mouse bone marrow mediated by the pre-B cell receptor. *Immunity* **7**, 357-368.

Terauchi A., Hayashi K., Kitamura D., Kozono Y., Motoyama N., et Azuma T. (2001) A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J. Immunol.* **167**, 811-820.

Thevenin C., Lucas B.P., Kozlow E.J., et Kehrl J. (1993) Cell type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter. *J. Biol. Chem.* **268**, 5949-5956.

Thompson A., Timmers E., Schuurman R.K., et 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., et Nemazee D. (1993) Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* **177**, 1009-1020.

Tonegawa S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-581.

Tsukada S., Sugiyama H., Oka Y., et Kishimoto S. (1990) Estimation of D segment usage in initial D to Jh joining in a murine immature B cell line. *J. Immunol.* **144**, 4053-4059.

Tumas-Brundage K., et Manser T. (1997a) The transcriptional promoter regulates hypermutation of the antibody heavy chain locus. *J. Exp. Med.* **185**, 239-250.

Tumas-Brundage K.M., Vora K.A., et Manser T. (1997b) Evaluation of the role of the 3'α heavy chain enhancer [3'αE(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol. Immunol.* **34**, 367-378.

Udvardy A., Maine E., et Schedl P. (1985) The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *J. Mol. Biol.* **185**, 341-358.

Urbánek P., Wang Z-Q., Fetka I., Wagner E.F., et Busslinger M. (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79**, 901-912.

van Gent D.C., Ramsden D.A., et Gellert M. (1996) The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* **85**, 107-113.

van Gent D.C., Hiom K., Paull T., et Gellert M. (1997) Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO J.* **16**, 2665-2670.

Venkitaraman A.R., et Cowling R.J. (1994) Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the alpha chain of the interleukin-7 receptor. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2168-2174.

von Freeden-Jeffrey U., Solvason N., Howard M., et Murray R. (1997) The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**, 147-154.

Wabl M., et Burrows P.D. (1984) Expression of immunoglobulin heavy chain at high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2452-2455.

Walters M.C., Fiering S., Bouhassira E.E., Scalzo D., Goeke S., Magis W., Garrick D., Whitelaw D., et Martin D.I. (1999) The chicken β -globin 5'HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3714-3726.

Wasylyk C., et Wasylyk B. (1986) The immunoglobulin heavy-chain B-lymphocyte enhancer efficiently stimulates transcription in non-lymphoid cells. *EMBO J.* **5**, 553-560.

West A.G., Gaszner M., et Felsenfeld G. (2002) Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* **16**, 271-288.

Wiest D.L., Kears K.P., Shores E.W., et Singer A. (1994) Developmentally regulated expression of CD3 components independent of clonotypic T cell antigen receptor complexes on immature thymocytes. *J. Exp. Med.* **180**, 1375-1382.

Wiest D.L., Burgess W.H., McKean D., Kears K.P., et Singer A. (1995) The molecular chaperone calnexin is expressed on the surface of immature thymocytes in association with clonotype-independent CD3 complexes. *EMBO J.* **14**, 3425-3433.

Wiest D.L., Bhandoola A., Punt J., Kreibich G., McKean D., et Singer A. (1997) Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocytes as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1884-1889.

Winandy S., Wu L., Wang J.H., et Georgopoulos K. (1999) Pre-T cell receptor (TCR) and TCR-controlled checkpoints in T cell differentiation are set by Ikaros. *J. Exp. Med.* **190**, 1039-1048.

Wirth T., Staudt L., et Baltimore D. (1987) An octamer oligonucleotide up-stream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature* **329**, 174-178.

Xu L., Kim M.G., et Marcu K.B. (1992) Properties of B cell stage specific and ubiquitous nuclear factors binding to immunoglobulin heavy chain gene switch regions. *Int. Immunol.* **4**, 875-887.

Zaller D.M., et Eckhardt L.A. (1985) Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5088-509.

Zhou J., Ashouian N., Delepine M., Matsuda F., Chevillard C., Riblet R., Schildkraut C.L., et Birshstein B.K. (2002) The origin of a developmentally regulated *Igh* replicon is located near the border of regulatory domains for *Igh* replication and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13693-13698.

Zhuang Y., Soriano P., et Weintraub H. (1994) The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**, 875-884.

Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., et Littman D.R. (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and cerebellar development. *Nature* **393**, 595-599.

Zwollo P., Arrieta H., Ede K., Molinder K., Desiderio S., et Pollock R. (1997) The Pax5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J. Biol. Chem.* **272**, 10160-10168.