



**HAL**  
open science

# Commutation ou extinction de l'expression du BCR et impact sur la cellule B

Nicolas Denis-Lagache

► **To cite this version:**

Nicolas Denis-Lagache. Commutation ou extinction de l'expression du BCR et impact sur la cellule B. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0071 . tel-01423873

**HAL Id: tel-01423873**

**<https://theses.hal.science/tel-01423873>**

Submitted on 1 Jan 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges  
Ecole Doctorale Biosanté n°524  
UMR CNRS 7276 – Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations (CRIBL)

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**

Disciplines : Biologie Sciences Santé  
Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue par  
**Nicolas DENIS-LAGACHE**

Le 12 décembre 2015

**Commutation ou extinction de l'expression du BCR et  
impact sur la cellule B.**

Thèse dirigée par : Pr. Michel COGNÉ (PU-PH)

**Membres du jury :**

Président du jury

**Pr. Jean-Claude ALDIGIER** (PU-PH), UMR CNRS 7276, Université de Limoges

Rapporteurs

**Pr. Karin TARTE** (PU-PH) U917 INSERM, Université de Rennes 1

**Pr. Thierry FEST** (PU-PH) U917 INSERM, Université de Rennes 1

Examineurs

**Pr. Jean-Claude LECRON** (PU-PH) MED - LITEC EA 4331, Université de Poitiers

## Résumé

Lors de la reconnaissance de leur antigène spécifique, les lymphocytes B vont s'activer et interagir avec les autres cellules des organes lymphoïdes secondaires (cellules folliculaires dendritiques, lymphocytes T, ...) pour former un centre germinatif où le locus IgH va être remanié afin d'accroître l'affinité des immunoglobulines pour l'antigène (grâce à l'hypermutation somatique des régions variables (SHM) et de décliner l'activité effectrice des anticorps selon plusieurs types de fonction grâce à la commutation de classe des régions constantes ou « switch u CSR», afin d'éliminer selon diverses stratégies l'antigène . Ces deux mécanismes sont initiés par l'Activation Induced Deaminase (AID) qui cible l'ADN au niveau des cytosines pour les changer en uracile, aboutissant à des cassures simple brin ou double brin lorsque que les mésappariements sont proches les uns des autres. Il a été montré qu'AID est capable de cibler la région régulatrice en 3' du locus IgH au niveau de régions LS, action qui aboutit à la délétion complète des gènes C du locus, à la perte de l'expression du BCR et à la mort cellulaire lors de la recombinaison suicide du locus (LSR). Dans notre étude, nous avons réalisé un modèle knock-in du gène C $\mu$  humain en aval de la dernière région LS dans le but de sauver les cellules B réalisant la LSR sur les dernières régions LS par l'expression d'un BCR humanisé (modèle LSR- $\mu$ KI). Notre modèle indique que l'insertion du gène C $\mu$  humain en aval de l'élément hs4 de la 3'RR permet en effet de remplacer certaines recombinaisons LSR par un switch vers l'expression d'IgM humanisée », et module en outre qualitativement certains aspects de la réponse immunitaire humorale. Notre modèle « rapporteur » de la LSR suggère aussi que l'évènement de LSR est un phénomène régulé qui augmente avec l'activation B. L'étude *ex vivo* de cellules B issues du modèle suggère que la LSR est possible lors d'une réponse T indépendante comme T dépendante. Elle se montre aussi inductible par les ligands TLR4 mais non TLR9. L'étude du répertoire des IgM humaines indique une utilisation biaisée des familles de V<sub>H</sub>, avec notamment surutilisation de la famille V<sub>H</sub>5 murine, suggérant donc que l'incidence de la LSR varie avec la structure des régions variables du BCR et pourrait donc être dépendante de l'affinité contre des antigènes/ligands qui restent à caractériser.

## Summary

After antigen recognition, B cells are activated and interact with other cells within secondary lymphoid organs (dendritic cells, T lymphocytes ...) to form a germinal center. In the GC, the IgH locus is reorganized in order to increase the affinity of immunoglobulins for antigen through somatic hypermutation (SHM) of V(D)J regions and to configure them into several forms harboring diversified modes of action after "class switc recombination" (CSR). Both mechanisms are initiated by Activation Induced Deaminase (AID) which targets DNA cytosines to convert them into uracil, then causing single or double strand breaks in DNA when the mismatches are located close to each other. It has been shown that AID can target the IgH locus 3' regulatory region on specific regions called LS, then leading to the total deletion of IgH locus C genes, loss of BCR expression and cell death by locus suicide recombination (LSR). In our study, we created a human C $\mu$  knock-in model distal to the hs4 element of the 3'RR, in an attempt to rescue cells after the LSR event. Our model showed that this insertion indeed succeeded into replacing LSR by "class switching to humanized IgM" and also qualitatively modulated some aspects of the humoral response. This new LSR reporter model additionally supports the hypothesis that LSR is regulated and increases with B cell activation. Studies of *ex vivo* B cells from the model suggest that LSR can occur in T dependent and independent manners, but is induced by triggering TLR4 but not TLR9. Studies of the human IgM repertoire showed a biased use of V<sub>H</sub> families, and notably the mouse V<sub>H</sub>5 family was used more frequently than in the control group. The BCR repertoire bias strongly suggests that LSR is at least in part a matter of affinity of the BCR variable regions for antigens and ligands that remain to be characterized.



Au cours de ces travaux de thèse j'ai bénéficié pendant les trois premières années d'un financement par la région Limousin.

Lors de ma quatrième et dernière année de doctorat j'ai bénéficié d'un financement par la Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer.



## Remerciements

*Je remercie le Pr. Michel Cogné, en tant que directeur de l'UMR CNRS 7276 pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et en tant que directeur de thèse pour m'avoir encadré et guidé au cours de ces quatre années de thèse.*

*Je voudrais ensuite remercier les membres du jury qui ont bien voulu être les juges de mon travail. Merci au Pr. Karin Tarte et au Pr. Thierry Fest qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Merci au Pr. Jean-Claude Lecron d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, et merci au Pr. Jean-Claude Aldigier d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.*

*Je souhaite également remercier tous les membres de l'UMR avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler ou simplement de discuter.*

*Merci aux membres de la LSR team, Sophie, Jeanne, Cendrine et Brice, pour m'avoir intégré si rapidement dans le labo et pour m'avoir épaulé. Cendrine, on se souviendra des semaines ELISA et des heures passées à l'animalerie, merci beaucoup pour ton aide. Brice, j'ai beaucoup apprécié d'avoir travaillé avec toi et ton humour, toujours mordant et vif, et je te souhaite de bien te régaler dans ton nouveau labo. Sophie et Jeanne, merci beaucoup pour votre présence et pour tout ce que vous m'avez apporté, professionnellement comme personnellement. We will keep in touch.*

*Merci aussi aux nouveaux membres de cette LSR team, Iman, Zeinab et Hend, mes nouvelles collègues de bureau. Je vous souhaite de réussir votre thèse, c'est vrai, mais surtout de vous éclater dans ce que vous faites, car c'est vraiment cela le plus important au laboratoire.*

*Merci à vous, Aurore, Christian, Yves, Éric, Laurent, Christophe, Anne, Stéphanie, Christelle, Marie C, Marie M, Estelle, Sandrine, Sébastien, Zeliha. Merci aussi à toute l'équipe « du second », même si cette appellation n'est plus tout à fait exacte. Merci également à Makiadi, Laurent et Séverine. Merci à Mylène et Claire pour votre aide avec la cytométrie et les marquages de lames, vous m'avez été d'une très grande aide, et vive la cytométrie pour les nuls !*

*Merci aux nouveaux docteurs, Fabien, Amélie, Faten, Armand ; et bon courage aux futurs docteurs Alexis, Nivine, Ophélie, Nour, Anderson, Omar. Je vous souhaite bon courage pour vos thèses et bonne chance pour ce qui viendra ensuite.*

*Merci à Rémi et Emilie, je vous ai bien embêté avec le NGS, et ça risque fort de continuer.*

*Merci Sylvie, Bernadette et David qui vivent avec nos souris.*

*Enfin, je voudrais remercier ma famille et mes proches, pour m'avoir soutenu jusqu'ici, et parce que je sais qu'ils me soutiendront encore longtemps.*

## Liste des abréviations

3'RR : Région régulatrice en 3' du locus IgH  
Ac : Anticorps  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
A-EJ : Alternative end-joining  
Ag : Antigène  
AID : Activation-induced cytidine deaminase  
ARN : Acide ribonucléique  
B FO : Lymphocyte B folliculaire  
B MZ : Lymphocyte B de la zone marginale  
BCR : Récepteur de la cellule B  
BER : Base excision repair  
B<sub>REG</sub> : Lymphocyte B régulateur  
CDR : Complementarity Determining Regions  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
C-NHEJ : Classical non-homologous end-joining  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes  
CSR : Recombinaison de classe  
DAG : Diacylglycerol  
FDC : Cellule folliculaire dendritique  
GC : Centre germinatif  
HSC : Cellules souches hématopoïétiques  
Ig : Immunoglobuline  
IP<sub>3</sub> : Inositol-1,4,5-triphosphate  
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif  
ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif  
LB : Lymphocyte B  
LPS : Lipopolysaccharide  
LS : Région like-switch  
LT : Lymphocyte T  
MARs : Matrix attachment regions  
MMR : ADN mismatch repair  
MPP : Progéniteurs hématopoïétiques  
NAb : Anticorps naturels  
PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate  
RE : Réticulum endoplasmique  
S : Région switch  
SHM : Hypermutation somatique  
SI : Système Immunitaire  
TCR : Récepteur de la cellule T  
T<sub>FH</sub> : Lymphocyte T folliculaire helper  
TLR : Récepteur Toll-like  
V : Région V



# Table des matières

Introduction générale.....	7
1. La réponse immunitaire adaptative humorale dans son contexte .....	7
1.1. Le système immunitaire .....	7
1.2. La réponse immunitaire innée .....	8
1.3. La réponse immunitaire « adaptative » ou « acquise » .....	8
2. Les immunoglobulines.....	9
3. Organisation et réorganisation du locus IgH.....	10
Chapitre I : Activation B.....	13
1. Le lymphocyte B .....	13
1.1. Les lymphocytes B-1.....	13
1.2. Les lymphocytes B de la zone marginale (MZ) .....	13
1.3. Les lymphocytes B folliculaires (FO) .....	14
1.4. Rôle du BCR dans la formation des B-1, MZ et FO. ....	14
1.5. Les lymphocytes B régulateurs (B <sub>REGS</sub> ).....	15
1.6. Signaux T-indépendants .....	15
2. Structure du BCR .....	19
2.1. Corécepteurs du BCR.....	19
2.2. Deux modèles d'activation du BCR .....	20
3. Interaction du BCR avec les protéines associées à la transduction du signal .....	20
3.1. Recrutement et Rôle de PLC $\gamma$ <sub>2</sub> .....	21
3.2. Régulation de PI3K .....	22
4. Fonctions spécifiques du BCR en fonction de la classe d'immunoglobuline.....	22
4.1. BCR à IgM/IgD.....	22
4.2. BCR à IgG .....	23
4.3. BCR à IgA.....	23
4.4. BCR à IgE.....	24
5. Localisation cellulaire du lymphocyte B .....	26
5.1. Localisation des B en développement et matures dans la moelle osseuse .....	26
5.2. Localisation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires.....	27
6. Les lymphocytes B extra-folliculaires .....	29

7. Activation des lymphocytes B folliculaires .....	29
7.1. Le centre germinatif (GC) : initiation .....	30
7.2. Dynamique du centre germinatif .....	31
7.3. Rôle des T <sub>FH</sub> dans la sélection des lymphocytes B de haute affinité. ....	32
7.4. Maintenance du centre germinatif .....	34
7.5. Régulation du phénotype des cellules B de la zone sombre .....	34
Chapitre II : Remodelage des gènes d'Ig par l'Activation induced deaminase (AID) .....	36
1. AID .....	36
1.1. Structure d'AID .....	36
1.2. Protéines interagissant avec AID .....	37
1.3. Activité catalytique d'AID .....	38
1.4. Régulation d'AID .....	39
1.5. Régulation d' <i>Aicda</i> .....	41
1.6. Expression aberrante d'AID .....	43
2. SHM .....	44
2.1. Mécanisme général de la SHM .....	44
2.2. Ciblage d'AID durant la SHM. ....	45
2.3. Réparation des mutations induites par AID .....	48
3. CSR .....	52
3.1. Mécanisme général de la CSR .....	52
3.2. Ciblage d'AID sur les régions S .....	53
3.3. Création des cassures double brin .....	55
3.4. Ligature des régions S .....	56
Chapitre III : L'apoptose dans les cellules B : <i>death by neglect</i> et <i>Activation induced cell death</i> .....	60
1. Apoptose durant le développement lymphocytaire .....	60
2. Rôle de l'apoptose dans le maintien de l'immunité périphérique .....	61
3. Régulation de la capacité à entrer en apoptose durant la réponse immune .....	62
3.1. Mort par négligence .....	62
3.2. Mort par induction : rôle du récepteur FAS .....	65
4. Le cas particulier du BCR à IgE .....	70
5. Recombinaison suicide du locus (LSR) .....	70

Résultats de la thèse .....	74
Discussion .....	88
Matériels et méthodes .....	93
Annexes .....	97
Bibliographie .....	102

# Introduction générale

---

## 1. La réponse immunitaire adaptative humorale dans son contexte

### 1.1. Le système immunitaire

Pour lutter contre les agressions extérieures comme intérieures, l'évolution a doté les organismes vivants de moyens de protection. Chez les mammifères, ce système est hautement différencié et adaptable, il s'agit du Système Immunitaire (SI). Il permet de se défendre contre les microorganismes (bactéries, champignons, virus, ...), certaines matières étrangères et/ou toxiques (venins, toxines), ainsi que les cellules de l'individu ayant échappé à leur homéostasie au sein du corps et étant devenues malignes. Cette protection permanente d'un organisme est possible grâce à la capacité du système immunitaire de différencier le soi (ce qui appartient à l'organisme) du non-soi (ce qui est extérieur à l'organisme). De plus, les réponses immunes sont limitées dans leur amplitude et leur durée via des mécanismes de régulation ou de rétro-contrôle, évitant alors des réponses démesurées. Ainsi, non content de distinguer le soi du non-soi, le système immunitaire peut discriminer le non-soi dangereux (comme une infection bactérienne ou virale, présence de toxines) du non-soi « neutre » (comme le pollen ou le passage de la nourriture dans le sang). Il reconnaît et attaque les cellules cancéreuses et parasitées, sans s'en prendre aux cellules saines (sauf cas de maladies auto-immunes). Cette capacité de supporter sans réagir des antigènes endogènes comme exogènes correspond au phénomène de tolérance immune. Le fait que le système s'active contre des antigènes étrangers principalement lorsque ceux-ci apparaissent dans un contexte d'agression de l'organisme (infection, traumatisme, plaie, lésion tissulaire...) répond à ce qu'on appelle la théorie du danger et traduit le fait que les réponses immunes mobilisent en parallèle plusieurs strates de l'immunité : d'une part un système très archaïque mais robuste capable de détecter les signaux de danger et appartenant à ce qu'on appelle l'immunité innée, d'autre part un système beaucoup plus élaboré et sophistiqué, reconnaissant la structure d'un antigène dans toute sa finesse mais incapable de savoir si celui-ci est dangereux ou pas : l'immunité adaptative (qui mobilise les lymphocytes B et T pour l'expression de récepteurs BCR et TCR puis la production d'anticorps antigènes-spécifiques). C'est essentiellement lorsque ces systèmes inné et adaptatif sont mobilisés simultanément que survient une réponse immune efficace. Chez l'Homme, la reconnaissance des cellules comme appartenant au « soi » et au programme génétique d'un individu donné repose principalement sur deux systèmes : le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et le système ABO/rhésus (groupes sanguins).

Malgré les nombreux avantages apportés par ce système (adaptation à l'environnement, rejet des agresseurs extérieurs comme intérieurs), il peut également être en défaut ou à l'origine de pathologies (immunodéficience, maladies auto-immunes, allergies, rejet de greffe).

Les éléments reconnus par le système immunitaire sont appelés les antigènes (Ag). Ce terme regroupe toutes les substances étrangères à l'organisme. Sont compris dedans les agents pathogènes (bactéries, virus, parasites), les allergènes (pollen, blanc d'œuf, ...) et les cellules d'une autre origine (transfusion, greffe). Au contact de l'organisme, les antigènes sont caractérisés par leur immunogénicité (capacité à induire une réponse immune adaptative) et leur antigénicité (capacité à se lier à un anticorps ou une cellule spécifique).

## 1.2. La réponse immunitaire innée

Lors du contact d'un antigène avec un organisme, le système immunitaire va répondre via deux voies : la réponse innée (dont le répertoire est très limité et ne distingue que grossièrement quelques catégories de molécules exogènes, notamment procaryotiques, telles que les ADN bactériens, les ARN viraux, les flagellines ou les endotoxines et lipopolysaccharides) puis la réponse adaptative avec l'utilisation d'anticorps (Ac ; aussi nommés immunoglobulines, Ig) spécifiques de l'antigène.

L'immunité innée est indépendante de la structure fine de l'antigène, immédiate, et ne permet guère la création d'une mémoire immunologique. Il s'agit de la stratégie défensive la plus ancienne. Celle-ci passe en premier par la barrière physique que sont la peau (impermeable à l'état normal, se débarrassant régulièrement de sa couche superficielle grâce à la desquamation, siège d'une compétition par la flore bactérienne locale, bénéficiant aussi d'une défense chimique par diverses substances présentes dans les sécrétions) et les muqueuses (mucus et cils vibratiles, desquamation, mécanismes chimiques, compétition par la flore bactérienne locale). Si l'antigène passe à travers la première ligne de défense physique, alors le système immunitaire inné possède une seconde ligne de défense passant par les facteurs humoraux (le système du complément, les médiateurs non spécifiques tels que les interférons et les interleukines et les systèmes enzymatiques anti-microbiens) et les facteurs cellulaires (cellules phagocytaires). La pénétration de l'antigène dans l'organisme déclenche ensuite si elle n'est pas contenue des signaux de danger et une réaction inflammatoire, mécanisme défensif non spécifique, qui grâce à la concertation des éléments tissulaires et humoraux aide la concentration des mécanismes de défense pour lutter contre l'infection et/ou permet la cicatrisation de tissus lésés. L'inflammation est caractérisée par la tétrade de Celsius, complétée par Virchow à savoir : rougeur, chaleur, tumeur, douleur, et perte de fonction. Le mécanisme inflammatoire se passe en deux étapes. Durant la phase vasculaire, le relargage de médiateurs permet la dilatation vasculaire et augmente la perméabilité des capillaires. Les leucocytes en circulation, s'accrochent aux parois des capillaires où a lieu l'inflammation, et pénètrent dans les tissus (phénomène de diapédèse). Les premiers arrivés sur les lieux sont les polynucléaires neutrophiles, suivis par les macrophages qui éliminent les résidus de la première réaction.

## 1.3. La réponse immunitaire « adaptative » ou « acquise »

A l'inverse de l'immunité innée, l'immunité adaptative permet de développer « sur mesure » et seulement en cas de premier contact et de besoin, un très large éventail de spécificités contre des millions de déterminants antigéniques. Par essence, elle est donc dépendante de l'antigène, n'est pas tout de suite active et est hautement spécifique de l'antigène. Une autre distinction majeure avec l'immunité innée consiste en l'existence d'une mémoire immunologique des réponses adaptatives.

Les réponses adaptatives dépendent des deux grandes lignées que sont les cellules lymphoïdes T et B. La lignée T a gardé les formes les plus rustiques des réponses adaptatives puisqu'elle ne permet de générer qu'un répertoire de récepteurs membranaires Ag-spécifiques, dont la forme est simplement dépendante des recombinaisons VDJ initiales et qui ne pourront en aucun cas augmenter leur affinité lors de contacts successifs avec l'antigène. La lignée B est par contre très diversifiée dans sa fonction (cellules cytotoxiques ou auxiliaires

de type Th1, Th2, Th9, Th17, Treg, T<sub>FH</sub>, T<sub>FR</sub>...) et va contrôler la polarité des réponses immunes grâce au choix des cytokines qu'elle produit.

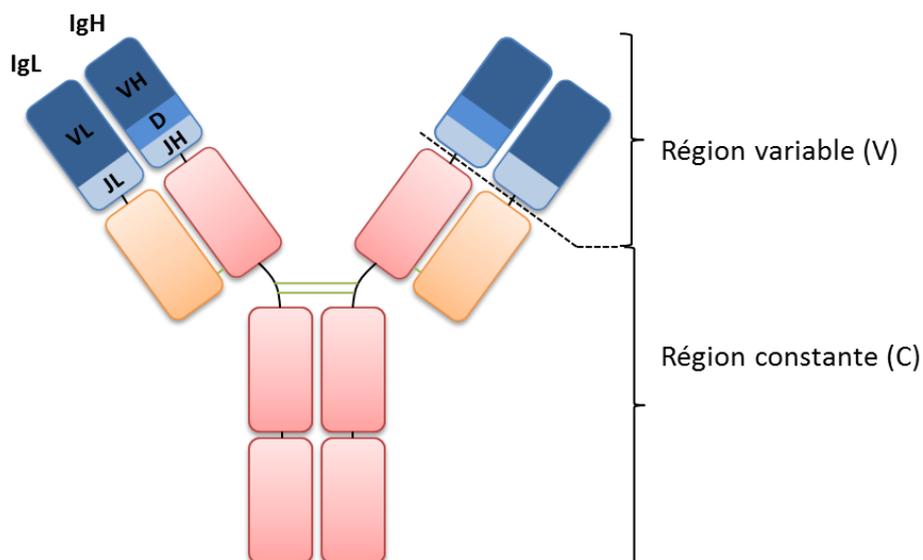
La lignée B représente un pas de plus dans l'évolution des réponses immunes vers plus de spécificité. En effet, outre le fait de pouvoir exprimer les molécules liant les antigènes d'abord comme des récepteurs membranaires, puis comme des immunoglobulines sécrétées et capables d'agir donc à distance, dans tout l'organisme (sous forme « d'anticorps »), la lignée B a développé la capacité de modeler sa réponse au-delà même du premier contact avec l'antigène, diversifiant ainsi la fonction des BCR et des Ig par la commutation de classe, et affinant ses capacités de liaison à l'antigène par l'hypermutation somatique.

Globalement, la réponse adaptative ne s'oppose bien sûr pas aux réponses innées mais les complète, les utilise, les module et les renforce. Plus lente à mettre en œuvre, elle prend place après la réaction inflammatoire initiale qui va orienter la réponse immunitaire vers une réponse plutôt humorale ou plutôt cellulaire en fonction d'un milieu spécifique en cytokines. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) présentes sur le lieu de l'infection vont internaliser les antigènes, migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et présenter les antigènes aux lymphocytes T (LT) et B (LB), provoquant une réponse immunitaire globale et le développement d'une mémoire immunitaire. Les lymphocytes T et B sont spécifiques d'un antigène unique. La reconnaissance de cet antigène provoquera leur activation et leur expansion clonale au sein de l'organe lymphoïde. Les lymphocytes B produisent les immunoglobulines générées lors d'une infection ou d'une vaccination.

## 2. Les immunoglobulines

Les immunoglobulines sont extrêmement diversifiées et peuvent être dirigées contre de nombreuses structures moléculaires différentes (protéiques, glucides, lipides). Sous leur forme monomérique (figure 1), elles sont composées de deux chaînes lourdes (H, encodées sur le locus IgH) identiques entre elles, et de deux chaînes légères (L, encodées le locus kappa [κ] ou lambda [λ]) également identiques entre elles. Il existe chez la souris huit régions constantes pour le locus IgH (C<sub>μ</sub>, C<sub>δ</sub>, C<sub>γ3</sub>, C<sub>γ1</sub>, C<sub>γ2b</sub>, C<sub>γ2a</sub>, C<sub>ε</sub>, C<sub>α</sub>) qui définissent l'isotype de l'immunoglobuline. Chaque isotype possède des fonctions effectrices différentes : les IgM peuvent activer la cascade du complément, les IgG aident les macrophages en opsonisant les pathogènes à éliminer, les IgA sont principalement retrouvées au niveau des muqueuses. Cette spécialisation dans l'activité des différentes classes d'immunoglobulines renforce la réponse du système immunitaire en cas d'infection.

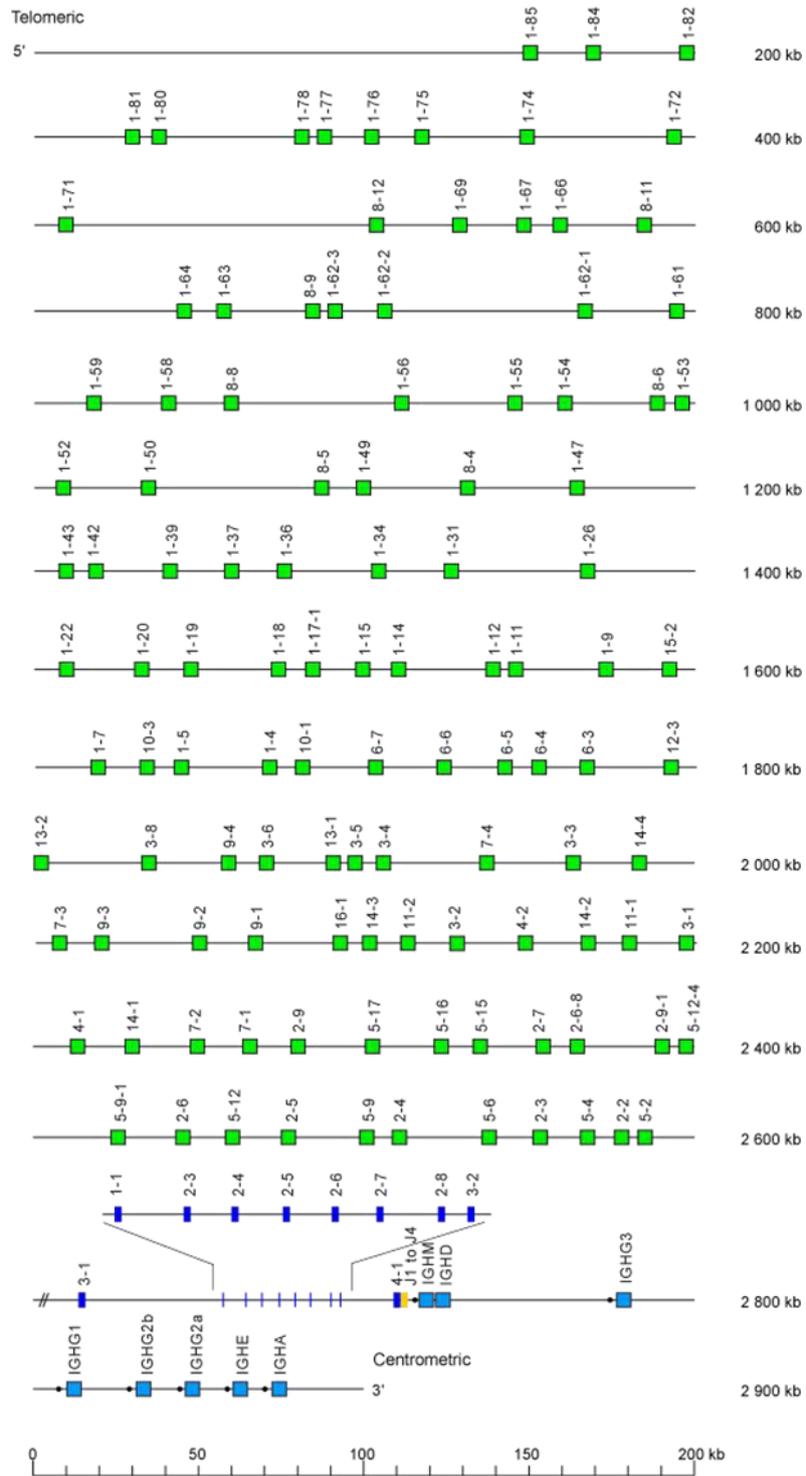
Chaque chaîne d'immunoglobuline est composée d'une région variable (V) et d'une région constante (C). L'association des régions V de la chaîne lourde et de la chaîne légère forme le site de fixation à l'antigène, donnant la spécificité de l'Ig. Le domaine constant, formé par l'association des régions C des deux chaînes lourdes, confère à l'Ig ses fonctions effectrices (fixation du complément, interaction avec les récepteurs Fc de différentes cellules).



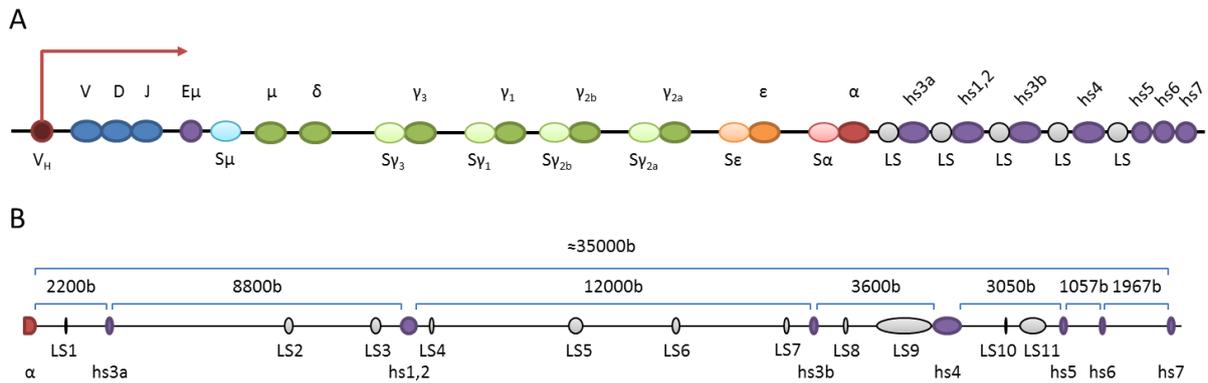
**Figure 1 : Représentation schématique d'une immunoglobuline.** L'immunoglobuline est constituée de deux chaînes lourdes (IgH) et de deux chaînes légères (IgL) identiques entre elles. Les régions constantes (fonctions effectrices) sont représentées en rouge (chaînes IgH) et orange (chaînes IgL), les régions variables (reconnaissance de l'antigène) sont représentées en bleu.

### 3. Organisation et réorganisation du locus IgH

Chez la souris, le locus IgH est localisé sur le chromosome 12 alors qu'il est sur le chromosome 14 chez l'humain. Le locus est constitué de différents segments variables ( $V_H$ ), de diversités (D), de jonctions ( $J_H$ ) et de segments constants ( $C_H$ ) et s'étend sur 2 900 kb chez la souris (1 250 kb pour l'humain). La souris possède près de 100 gènes  $V_H$  fonctionnels pour autant de non fonctionnels, 10 à 15 segments D en fonction de la souche murine, 4 segments  $J_H$  et les 8 régions constantes précédemment mentionnées codant pour les isotypes des immunoglobulines. Sur le locus, les éléments  $V_H$ , D,  $J_H$  et  $C_H$  sont séparés en amas et sont organisés dans la même direction  $5' \rightarrow 3'$  (figure 2). Plusieurs activateurs spécifiques des lymphocytes B sont également présents sur le locus. Il s'agit de l'activateur intronique  $E_\mu$ , situé entre les régions  $J_H$  et  $S_\mu$ , ainsi qu'une région activatrice de 30 kb située en  $3'$  du locus appelée IgH3'RR. Au sein de la 3'RR, des régions LS (pour Like Switch pour leurs similitudes avec les régions switch précédent chaque gène constant) sont distribuées de part et d'autre des éléments hs (figure 3).



**Figure 2 : Représentation du locus IgH murin d'après IMGT. Seuls les gènes fonctionnels sont indiqués (<http://www.imgt.org>).**



**Figure 3 : Représentation schématique du locus IgH murin.** A : emplacement des différents éléments principaux du locus après réarrangement VDJ. B : emplacement à l'échelle des éléments hs de la 3'RR ainsi que des régions LS.

Lors du développement B dans la moelle osseuse, les éléments  $V_H$ ,  $D$ , et  $J_H$  sont recombinés pour former le domaine de reconnaissance de l'antigène. Ces réarrangements se font grâce aux enzymes RAG1 et RAG2 qui, après reconnaissance des régions RSS encadrant les segments, procèdent à la formation de cassures double brin de l'ADN ainsi qu'à la ligature des segments appropriés *via* la voie de nonhomologous end-joining (NHEJ). La recombinaison VDJ se fait dans un ordre déterminé, D vers J puis V vers DJ, et est irréversible. La maturation de l'affinité (SHM) et la recombinaison de classe des immunoglobulines (CSR) sont des événements durant lesquels la structure du locus IgH est modifiée. Ils ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires après activation du LB lors de la reconnaissance avec son antigène spécifique. Ces événements seront vus dans un autre chapitre de cette thèse.

# Chapitre I : Activation B

---

## 1. Le lymphocyte B

Même si la façon de les définir peut varier d'une espèce à l'autre, il existe au moins quatre grands sous-ensembles de lymphocytes B « au repos »: les cellules B-1, les B de la zone marginale (MZ), les B folliculaires (FO) et les B régulateurs (B<sub>REGS</sub>). Les cellules B MZ et FO sont également regroupées sous la catégorie des cellules B-2. B1, FO et MZ sont généralement considérés comme 3 lignages différents, alors que les B<sub>REGS</sub> sont plutôt vus comme un compartiment hétérogène unifié par une « fonction suppressive ou régulatrice », et des B<sub>REGS</sub> peuvent apparemment se différencier à partir des 3 lignages B. Le phénotype, la localisation et les différences fonctionnelles entre ces différents compartiments indiquent que chaque groupe possède des fonctions spécialisées liées à la niche où ils résident.

### 1.1. Les lymphocytes B-1

Chez la souris, la population de cellules B-1 est la population majoritaire dans les cavités pleurale et péritonéale, à raison de 30 à 60% de la totalité des lymphocytes B présents (Baumgarth, 2013). Les cellules B-1 peuvent également être présentes dans la rate ou d'autres organes lymphoïdes mais leur population n'excède alors pas les 1%. Cette distribution est au moins due en partie par le BCR de ces cellules. Contrairement aux cellules B-2 qui sont générées dans la moelle et mises en circulation, les B-1 s'auto-renouvellent. Les cellules B-1 produisent des IgM ou IgG3 de faible affinité et sont facilement et rapidement activées par des processus T-indépendants (co-stimulation BCR/TLR par exemple). Une sous-catégorie de B-1, les B-1a, est capable de produire à l'avance des immunoglobulines (principalement des IgMs) poly-réactives et de faible affinité appelées « natural antibodies » ou NABs (Avrameas, 1991). Ces NABs aident à l'homéostasie des tissus et sont cruciaux dans la réponse immune innée (Briles et al., 1981; Ochsenein et al., 1999). Une incapacité à produire ces immunoglobulines accroît les risques d'infections. Les B-1b vont eux produire des immunoglobulines après exposition avec l'antigène permettant une protection sur le long terme (Haas et al., 2005).

Les B-1a, B-1b sont tolérants vis-à-vis des CDR-H3 hydrophobes (Vale et al., 2010).

### 1.2. Les lymphocytes B de la zone marginale (MZ)

Le nom des B MZ désigne leur localisation première dans la zone marginale de la rate, à l'interface entre la pulpe rouge et la pulpe blanche, où les cellules sont continuellement mises en contact avec les éléments circulants du sang (Martin and Kearney, 2002; Pillai et al., 2005). Les B MZ représentent 5 à 10% des lymphocytes B de la rate et leur localisation leur confère un avantage indéniable dans leur action de réponse rapide envers les particules antigéniques présentes dans le sang, où circulent d'ailleurs aussi des cellules de phénotype B MZ (Lopes-Carvalho and Kearney, 2004; Oliver et al., 1997). Les B MZ sont associés dans la zone marginale avec des macrophages riches en récepteurs impliqués dans l'élimination des antigènes étrangers ou du soi. Ils répondent rapidement aux stimuli par les TLR et participent

à la réponse humorale indépendante des lymphocytes T (Balázs et al., 2002; Martin et al., 2001). Dans la rate, les B MZ peuvent circuler entre la zone marginale et les follicules, pouvant même jouer le rôle de transporteur d'antigène à la jonction entre la zone T et la zone B du follicule (Attanavanich and Kearney, 2004), notamment par leur capacité à présenter des molécules lipidiques en association avec le CD1d.

Les B marginaux semblent volontiers arborer des BCR à CDR-H3 hautement chargés (Schelonka et al., 2007).

### **1.3. Les lymphocytes B folliculaires (FO)**

Les B FO forment le groupe le plus imposant des trois groupes de lymphocytes B. Ils représentent 80 à 90% des lymphocytes B dans la rate et les ganglions lymphatiques. Même s'ils portent le nom de lymphocytes B folliculaires, ils ne sont pas cantonnés au follicule, et on les retrouve dans la moelle osseuse, le sang et les autres organes lymphoïdes. Tout au long de la vie, ils sont continuellement formés dans la moelle osseuse à partir des précurseurs B. Sans activation antigénique, les B FO sont au repos et ont une demi-vie d'environ 4 mois chez la souris (Förster and Rajewsky, 1990). Ils sont programmés pour produire des immunoglobulines de haute affinité, et avec l'aide des lymphocytes T ces cellules B peuvent fortement proliférer et lancer les processus de SHM et de CSR au sein d'un centre germinatif. L'interaction entre un lymphocyte T et un lymphocyte B a lieu à zone charnière entre la zone T et la zone B du follicule. Cette interaction est grandement facilitée par la capacité des B FO à circuler dans la rate (Cyster, 2010).

Les B FO semblent intolérants vis-à-vis ces CDR-H3 hautement chargés et fortement hydrophobes (Schelonka et al., 2007).

### **1.4. Rôle du BCR dans la formation des B-1, MZ et FO.**

En l'absence d'une stimulation antigénique, un signal tonique semble être transmis depuis le BCR permettant ainsi à la cellule de survivre (Monroe, 2006). Ce signal tonique semble coopérer avec BAFF-R dans les B FO et semble passer par la voie canonique de NF- $\kappa$ B (BCR) ainsi que la non-canonique (BAFF-R), en fonction de l'activation de la kinase Syk, des récepteurs à motif ITAM et de la phosphoinositide kinase 3 (Schweighoffer et al., 2013; Stadanlick et al., 2008). En plus de son action sur la survie de la cellule B, la spécificité et la séquence du BCR oriente la cellule B dans la catégorie des B-1, MZ ou FO (Pillai and Cariappa, 2009). La densité des BCR à la surface de la cellule pourrait également être impliquée dans ce processus d'affectation ciblée (Li et al., 2002). Une forte signalisation constitutive du BCR et une activation de la voie classique de NF- $\kappa$ B semble nécessaire à la formation des cellules B-1 (Casola et al., 2004). La formation de cellules B-2 ne semble pas être dépendante de NF- $\kappa$ B, aucune réduction dans la population cellulaire des B-2 n'étant observée lorsque des activateurs en amont de NF- $\kappa$ B tels que Btk, Bcl-10, CARMA1 ne sont pas exprimés (Thome, 2004). Une forte signalisation constitutive de la voie du BCR et une activation canonique de NF- $\kappa$ B sont indispensables pour la survie des B-1 au-delà des stades transitionnels. Un principe général est alors proposé (Pillai et al., 2004) : une interaction de faible à moyenne affinité avec des auto-antigènes permet la maturation des B MZ, une interaction de plus forte affinité permet une maturation des B FO, et une interaction de très forte affinité permet une

affectation B-1. Ce principe est proposé dans des conditions où les modèles murins sont élevés en conditions EOPS, indiquant le rôle clé des auto-antigènes dans ces étapes de sélection. La présence des cellules B possédant un BCR capable de reconnaître des auto-antigènes va à l'encontre du dogme indiquant que les cellules auto-réactives sont éliminées. Les cellules arborant un BCR de ce type capable d'une reconnaissance croisée entre les auto-antigènes et les antigènes associés aux pathogènes, les B-1a, synthétisent des NABs ayant deux fonctions : participer à l'homéostasie cellulaire en aidant l'élimination des débris cellulaires et moléculaires et servir de première ligne de défense contre les pathogènes (Kaveri et al., 2012).

### **1.5. Les lymphocytes B régulateurs (B<sub>REGS</sub>)**

La place de la différenciation ou de la survie des B<sub>REGS</sub> dans ce contexte reste discuté, puisque ces cellules sont vues comme tolérogènes, productrices de cytokines anti-inflammatoires (notamment d'IL10, IL35 et/ou de TGFβ), et éventuellement nanties de BCRs auto-réactifs sans pour autant subir de délétion clonale, mais en participant au contraire à un mécanisme actif de tolérance. L'ambiguïté de leur mode de différenciation est qu'à la fois il nécessite l'activation spécifique du BCR et des conditions pro-inflammatoires (IL1, IL6, ...), mais peut aussi bénéficier de cytokines anti-inflammatoires (IL10, 35, TGFβ, ...). Ces B<sub>REGS</sub> sont en règle générale non « switchés » et correspondent pour certains d'entre eux à des cellules plasmoblastiques voire plasmocytaires. Ils sont volontiers vus comme des cellules de rétrocontrôle faisant le pendant des lymphocytes B producteurs d'anticorps et aptes à terminer la réponse immune après son développement. En ce sens, leur fonction suppressive s'oppose en quelque sorte aux TH17 pro-inflammatoires (Rosser and Mauri, 2015).

### **1.6. Signaux T-indépendants**

Les lymphocytes B localisés dans la zone marginale ont directement accès aux antigènes et autres particules circulant dans le sang. Les B-1, de par leur localisation, ont directement accès aux microbes des muqueuses intestinales et pulmonaires. Certains antigènes microbiens tels que le lipopolysaccharide (LPS), lipopeptides ou encore les flagellines sont reconnus par les TLRs et activent de façon robuste et T-indépendante les lymphocytes B-1 et de la zone marginale (Genestier et al., 2007). La capacité à répondre aux signaux envoyés par les TLRs affecte également la réponse humorale T-dépendante (Rawlings et al., 2012). Contrairement aux lymphocytes B folliculaires, la capacité des B<sub>MZ</sub> à présenter les antigènes est accrue lors d'une stimulation par du LPS (Oliver et al., 1999).

#### **1.6.1 Régulation de la réponse B par les récepteurs Toll-like (TLR)**

Les TLRs sont une famille de récepteurs antigéniques qui participent principalement à la réponse immunitaire innée grâce à leur capacité à reconnaître des constituants uniques aux microbes. Il existe chez la souris 12 TLRs différents, 10 pour l'homme. Tous les TLRs possèdent des caractéristiques structurales de base communes, à savoir une région extracellulaire riche en répétition de leucines, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR (Toll/Interleukin-1 receptor). Chaque TLR est spécialisé pour une signature microbienne particulière (tableau 1).

Récepteur	TLR 1/2 ou 2/6	TLR 3	TLR 4	TLR 5	TLR 7	TLR 9
Ligands	Lipopeptides	Poly I:C, ARN double brin	LPS	Flagelline	ARN simple brin, resiquimod, imiquimod, loxoribine	ADN non méthylé, ADN-CpG
Origine	Bactéries Gram+, champignons	Virus	Bactéries Gram-	Bactéries flagellaires	Virus	Bactéries

**Tableau 1 : TLRs et leurs ligands.** Pour chaque TLR (ou association de TLR), les ligands spécifiquement reconnus ainsi que leur origine microbienne sont indiqués.

Les TLRs qui reconnaissent les signatures bactériennes, 1/2-2/6-4-5, sont localisés sur la membrane plasmique et scannent l'environnement extracellulaire (Hayashi et al., 2001; Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 2001), alors que les TLRs reconnaissant les signatures à base d'acides nucléiques, 3-7-9, sont localisés sur les endosomes en interagissant avec la protéine membranaire UNC93B (Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008).

La plupart des lymphocytes B murins expriment les TLRs 1, 2, 4, 6, 7 et 9, mais le taux d'expression varie d'une population B à une autre (Genestier et al., 2007; Gururajan et al., 2007). Ainsi chez la souris, le TLR9 est fortement exprimé dans les cellules B-1 et dans les lymphocytes B des zones marginale et folliculaire, mais il est bien moins exprimé dans les cellules B présentes dans les plaques de Peyer. Et si les lymphocytes B n'expriment que très peu le TLR3, ils sont tout de même capables de reconnaître les ligands du TLR3 (Marshall-Clarke et al., 2007).

L'expression des TLRs est régulée par la signalisation du BCR et par l'action des cytokines. Les TLRs 3 et 7 sont fortement up-régulés lors d'une stimulation BCR/IFN- $\beta$  (Chang et al., 2007).

### 1.6.1.1. Signalisation des TLRs dans les lymphocytes B

La reconnaissance de son ligand par un TLR va activer une cascade de signalisation en utilisant plusieurs molécules interagissant avec les motifs TIR telles que MYD88, TRIF, TIRAP, TRAM et SARM (Barton and Medzhitov, 2003). Myd88 sert d'intermédiaire pour tous les TLRs sauf le TLR3 qui utilise TRIF. Le TLR4 utilise à la fois Myd88 et TRIF dans sa signalisation. TIRA, TRAM et SARM vont jouer des rôles accessoires ou régulateurs des voies de signalisation dépendantes de Myd88 et de TRIF (Carty et al., 2006; O'Neill and Bowie, 2007). L'activation des voies de signalisations dépendantes des TLRs aboutit à la transcription de gènes pro-inflammatoires et anti microbiens *via* des facteurs de transcriptions tels que NF- $\kappa$ B, le facteur régulateur d'interféron 3 et la protéine activatrice 1 (Medzhitov and Horng, 2009). Les TLRs permettent aussi l'up-régulation de la présentation de l'antigène par le CMH et l'up-régulation de molécules co-stimulatrices telles que CD80 et CD86 pour aider à une meilleure réponse T-dépendante (Medzhitov et al., 1997).

### 1.6.1.2. Réponse des cellules B lors d'une stimulation des TLRs *in vitro*

Dans la plupart des cas, la seule stimulation des lymphocytes B par les TLRs est suffisante pour induire l'expression et l'activation de marqueurs tels que CD69, CD80, CD86, le CMH, la prolifération, la CSR et la sécrétion d'immunoglobulines (Capolunghi et al., 2008; He et al., 2004; Jiang et al., 2007; Lutzker et al., 1988; Xu et al., 2008). La réponse spécifique des lymphocytes B lors d'une stimulation des TLRs dépend de la catégorie de cellule B et du TLR stimulé (Cognasse et al., 2008; Hanten et al., 2008). Ainsi, les lymphocytes B folliculaires répondent moins à une stimulation par le LPS que les lymphocytes B de la zone marginale (Meyer-Bahlburg et al., 2009). Les cellules B-1 et B de la zone marginale sont également plus promptes à se différencier en cellules productrices d'immunoglobulines que les lymphocytes B folliculaires (Genestier et al., 2007). Les TLRs peuvent en activant la cellule contribuer aux cascades activatrices qui déclenchent le changement de la classe des Ig (Class switch recombination ou CSR : le LPS seul va induire sur les B murins une commutation de classe vers IgG3 (Browne, 2012), la combinaison LPS/IL4 va induire une commutation vers IgG1 et IgE alors qu'une stimulation par de l'ADN-CpG va induire une commutation vers IgG2a, IgG2b et IgG3 tout en bloquant IgG1 et IgE (Lin et al., 2004b).

Les études *in vitro* ont permis de mettre en évidence une synergie entre la stimulation des TLRs et la stimulation du BCR par un antigène ou par une stimulation du CD40 par le CD40L (Boeglin et al., 2011; Jain et al., 2011). Cette coopération TCR/BCR assure que les lymphocytes B ne réagissent que dans un contexte d'infection et préviennent l'auto-immunité (Browne, 2012). De plus, en fonction du TLR présent dans le couple TLR/BCR ou TLR/CD40, la réponse peut être une activation et une prolifération des lymphocytes B (TLR 3, 4 et 9) ou une différenciation en cellules productrices d'immunoglobulines (TLR 1/2, 2/6, 4 et 7) (Boeglin et al., 2011).

### 1.6.1.3. Réponse des cellules B lors d'une stimulation des TLRs *in vivo*

La réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B *in vivo* est régulée par de nombreuses interactions cellulaires et moléculaires. Les TLRs sont exprimés par plusieurs types cellulaires impliqués dans cette régulation, permettant ainsi aux TLRs d'intervenir à plusieurs stades de la réponse B.

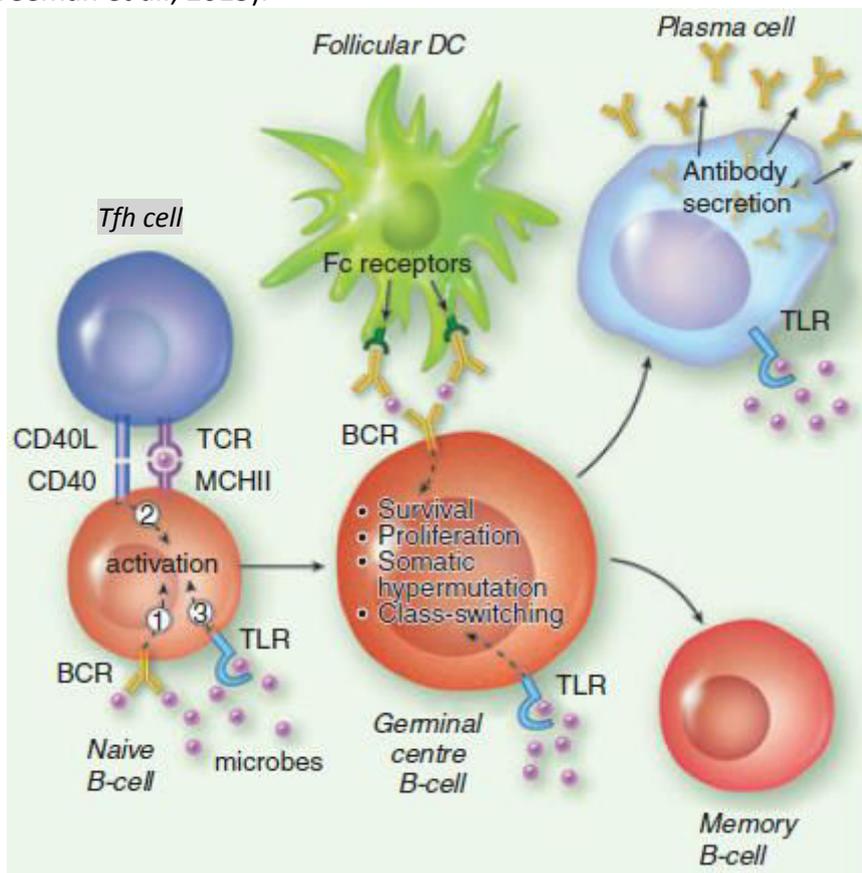
Dans les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques répondent à une stimulation des TLRs en présentant les peptides microbiens aux lymphocytes Th *via* leur CMH de classe II. Une up-régulation de molécules co-stimulatrices telles que CD80 et CD86 sur les cellules dendritiques promeut leurs interactions avec les lymphocytes T, et les cytokines sécrétées par les cellules dendritiques suite à une stimulation des TLRs permettent de diriger le développement des cellules Th en Th1 ou Th2 (Boonstra et al., 2003; Green and Marshak-Rothstein, 2011). L'expression de TLRs par les cellules non-hématopoïétiques peut également réguler l'activation des lymphocytes B : l'up-régulation du facteur d'activation des lymphocytes B par les cellules épithéliales des glandes salivaires lors d'une infection virale est dépendante des TLRs (Ittah et al., 2008).

Les premiers auteurs à avoir montré *in vivo* l'importance de la signalisation TLR intrinsèque au lymphocyte B dans la régulation de la production d'immunoglobulines sont Pasare et Medzhitov (Pasare and Medzhitov, 2005). Ils ont montré que la signalisation TLR4 dans les lymphocytes B murins permettait de promouvoir une production d'immunoglobulines contre de l'albumine humaine. D'autres études ont montré que la délétion de Myd88 dans les cellules

dendritiques réduisait d'un facteur 10 la réponse en IgG spécifiques suite à une immunisation par de l'ovalbumine ou de l'ADN-CpG (Hou et al., 2008). Il a également été montré que l'expression de Myd88 par les cellules B était nécessaire pour pouvoir répondre à des particules virales, alors que dans le cas d'une réponse suite à une immunisation par un antigène purifié et en présence d'un adjuvant, c'est dans les cellules dendritiques que Myd88 doit impérativement être exprimé (Hou et al., 2011).

En plus de réguler l'activation initiale des lymphocytes B, les TLRs participent à la promotion de la commutation de classe, de l'hypermutation somatique et du développement et maintien du centre germinatif (Aranburu et al., 2010; Bessa et al., 2010; Browne, 2011; Garin et al., 2010; Hou et al., 2011; Kasturi et al., 2011). Les lymphocytes B du centre germinatif sont donc plus sensibles aux ligands des TLRs, ce qui corrèle parfaitement avec leur augmentation de l'expression de Myd88, de Mal (Myd88 adapter like protein) et d'IRAK-M (interleukine 1 receptor associated kinase M) (Meyer-Bahlburg et al., 2007). De plus, dans un contexte d'immunisation, l'utilisation de nanoparticules agonistes des TLRs augmente significativement la taille des GC (Kasturi et al., 2011).

D'un point de vue plus mécanistique, il a été montré que les TLRs 4 et 9 sont capables d'accroître la signalisation du signal du BCR en activant la protéine cofiline (protéine responsable du désassemblage de l'actine filamentaire). Cela a pour effet d'accroître la mobilité du BCR sur la membrane, de former plus facilement des clusters et de mieux répondre lors d'une faible densité de capture de l'antigène. La double activation TLR/BCR donne également une indication à la cellule que l'antigène capturé appartient au monde microbien (Freeman et al., 2015).



**Figure 4 : Régulation de l'activation et du développement du lymphocyte B par les TLRs.** La reconnaissance par les TLRs de leur ligand en combinaison avec la stimulation antigénique du BCR et la stimulation du le CD40 par les T<sub>FH</sub> contribue à l'activation initiale spécifique de

l'antigène des lymphocytes B. Les cellules activées se développent au sein d'un GC où les réactions sont accrues en cas d'activation des TLR. Les plasmocytes sortant du GC expriment les TLR et l'activation de ces TLR accroît la sécrétion d'immunoglobulines (Browne, 2012).

## 2. Structure du BCR

L'expression du BCR est requise pour le développement normal et le maintien du pool de lymphocytes B. Chaque lymphocyte B possède environ 120k complexes de BCR sur sa membrane, chacun avec l'exact même site de reconnaissance pour l'antigène.

Toutes les classes de BCR (IgM, IgD, IgG, IgE et IgA) ont une structure semblable, à savoir une immunoglobuline de surface liée à l'hétérodimère  $Ig\alpha/Ig\beta$  (CD79a/CD79b) par lequel le signal du BCR est transduit (Laffleur et al., 2013; Wienands and Engels, 2001). Si l'hétérodimère est lié de façon covalente par un pont disulfure, le complexe  $Ig\alpha/Ig\beta$  est associé de façon non covalente à l'immunoglobuline membranaire (Schamel and Reth, 2000).  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  partagent un grand nombre de caractéristiques structurales : un domaine extracellulaire glycosylé, une région de liaison, une région transmembranaire hautement conservée, et une queue cytoplasmique dont la longueur varie en fonction de la protéine – 61 résidus aminés pour  $Ig\alpha$  et 48 pour  $Ig\beta$ . Entre outre, les séquences cytoplasmiques d' $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  possèdent une séquence commune très conservée D/Ex<sub>7</sub>D/ExxYxxLx<sub>7</sub>YxxL/I nommée ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Reth, 1989). Cet enchainement est retrouvé dans des protéines virale oncogéniques et la plupart des sous-unités de signalisation de la famille des récepteurs immuns (Cambier, 1995a, 1995b). Dans le cas du BCR, le motif ITAM permet l'interaction entre le récepteur et la voie de signalisation qui en découle (Johnson et al., 1995). Les deux tyrosines du motif servent à la fois à lier les tyrosines kinases et de substrat pour ces dernières (Flaswinkel and Reth, 1994; Flaswinkel et al., 1995). La mutation du motif ITAM d' $Ig\alpha$  ou d' $Ig\beta$  n'abroge pas la transmission du signal du BCR (Reichlin et al., 2004), contrairement à une mutation sur les deux motifs qui supprime le message du BCR (Kraus et al., 2001).

### 2.1. Corécepteurs du BCR

Pour permettre l'accroissement, l'inhibition ou encore la qualité du signal transmis par le BCR, celui-ci est associé à des corécepteurs à la surface de la cellule. CD19 (activateur) et CD22 (inhibiteur) en font partie.

#### 2.1.1 CD19

Le CD19 est associé avec CD21 (complement receptor 2) et CD81. La transduction du signal activateur vers le BCR passe par CD21 (Fearon and Carroll, 2000) et CD81 permet de lier le complexe à la surface membranaire au cytosquelette et est impliqué dans la régulation du BCR. La queue cytoplasmique de CD19 possède 9 résidus tyrosine dont le taux de phosphorylation augmente lors d'une liaison avec le BCR, qui se lie alors à *vav*, *lyn* et la PI3K P85. Le rôle principal de CD19 *in vivo* serait d'augmenter la signalisation de PI3K et de favoriser le clustering du BCR dans les rafts (Alt et al., 2015).

### 2.1.2 CD22

L'activité inhibitrice du CD22 est régulée par ses ligands, des acides sialiques liés en  $\alpha$ -6 (2,6Sia), qui influencent la relation BCR-CD22 (Collins et al., 2004). Ces 2,6Sia sont très représentés à la membrane des cellules comme par exemple les lymphocytes T et B, ce qui suggère une capacité du CD22 à être activé en *cis* ou comme en *trans* (Collins et al., 2004; Lanoue et al., 2002). Après activation du BCR, CD22 est rapidement phosphorylé, principalement par Lyn (Smith et al., 1998). Cette phosphorylation permet le recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1 au niveau du motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) (Doody et al., 1995) qui va en retour activer PMCA-4, une pompe à calcium, faisant chuter le taux de  $Ca^{2+}$  du cytoplasme (Chen et al., 2004).

### 2.2. Deux modèles d'activation du BCR

Le modèle de crosslinking : dans ce modèle, le complexe du BCR (immunoglobuline de surface et hétérodimère  $Ig\alpha/Ig\beta$ ) est à l'état monomérique lorsque le lymphocyte B est au repos, et c'est le crosslinking de deux monomères qui initie l'activation de la cellule par le BCR (Metzger, 1992). L'association de deux BCRs rapprocherait dans le même temps les kinases associées au BCR, qui s'entre-phosphoryleraient et s'activeraient.

Le modèle d'activation par dissociation (Yang and Reth, 2010a) : dans ce modèle, les BCRs formeraient spontanément des dimères à la surface de la cellule. Lorsque le lymphocyte B est au repos, le BCR serait régulé par des éléments du cytosquelette qui protégeraient les motifs ITAMs des protéines kinases liées au BCR. L'activation du BCR par reconnaissance d'un antigène désorganiserait cette structure multimérique libérant alors les motifs ITAMs ciblés par les kinases. Ce modèle est supporté par un test de complémentation quantitative par bifluorescence (Yang and Reth, 2010b).

### 3. Interaction du BCR avec les protéines associées à la transduction du signal

Deux tyrosines kinases sont impliquées dans l'activation du BCR et toutes deux ont une action différente. Lyn (de la famille des Src) qui phosphoryle plus souvent seulement la première tyrosine Y182 du motif ITAM, et Syk qui phosphoryle les deux tyrosines Y182 et Y193 du motif (Flaswinkel and Reth, 1994; Pao and Cambier, 1997; Schmitz et al., 1996). L'activité kinase de Syk est requise pour la formation du complexe BCR/Syk car les deux tyrosines du motif ITAM doivent être phosphorylées afin que Syk puisse s'y lier (Fütterer et al., 1998). Le modèle actuel suggère que Lyn interagit en premier avec le BCR lors de son activation puis laisse la place à Syk. Cependant, quand Syk est absente, la voie de signalisation du BCR est inerte alors qu'elle n'est que retardée quand Lyn est absente (Alt et al., 2015). Une étude (Rolli et al., 2002) a également montré que le couplage de Syk avec un peptide contenant le motif ITAM accroît drastiquement l'activité de la protéine kinase. La signalisation du BCR serait donc amplifiée par un rétrocontrôle positif du complexe BCR/Syk, kinase dominante du motif ITAM, et le rôle de Lyn pourrait être d'éliminer les éléments du cytosquelette et facteurs inhibiteurs empêchant une bonne interaction entre Syk et le BCR. Le schéma global d'activation du BCR serait alors le suivant : la liaison avec l'antigène provoque une perturbation sur les éléments proches du BCR. Cette perturbation est détectée par Lyn qui va alors phosphoryler les éléments du cytosquelette attachés au BCR, libérant ce dernier et rendant les motifs ITAMs accessibles à Syk. Syk phosphoryle les ITAMs et se lie à eux pour former un complexe BCR/Syk

potentialisant l'activité kinase de Syk qui va alors phosphoryler les motifs ITAMs des BCR voisins non activés par l'antigène, permettant l'amplification du signal du BCR malgré la présence réduite du nombre de molécules antigéniques (Alt et al., 2015).

Suite à cette activation du BCR, un rétrocontrôle négatif contre l'activité de Syk provenant de plusieurs sources s'opère. Ainsi, la phosphorylation de régulateurs tels que CD22 et CD74 possédant tous deux un motif ITIM permet le recrutement et l'activation de la phosphatase SHP-1 dont le rôle est de déphosphoryler les motifs ITAMs. Il a aussi été montré que Syk est capable de phosphoryler les sérines et les thréonines de la queue d'Ig $\alpha$  inhibant alors la voie de signalisation du BCR (Müller et al., 2000). Enfin, une internalisation rapide des BCRs activés est aussi un bon moyen d'opérer un rétrocontrôle négatif (Jang et al., 2010).

### 3.1. Recrutement et Rôle de PLC $\gamma_2$

PLC $\gamma_2$  est un composant cellulaire impliqué dans la réponse calcique et est nécessaire à la génération de seconds messagers lors de l'activation du BCR. Il dégrade le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP $_2$ ) en diacylglycerol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP $_3$ ) et est très important pour maturation et la maintenance des lymphocytes B (Hashimoto et al., 2000). Le PIP $_2$  est situé à la membrane plasmique et est ciblé par PLC $\gamma_2$  une fois activé et aiguillé par BLNK (= SLP65), lui-même activé par Syk lorsqu'elle est liée aux motifs ITAMs du BCR (Johnson et al., 1995).

Plusieurs modèles sont proposés pour le recrutement de BLNK au niveau du BCR : (1) *via* la phosphorylation de la tyrosine Y204 de la queue cytoplasmique d'Ig $\alpha$  qui lie le domaine SH2 de BLNK (Engels et al., 2001), (2) *via* le domaine N-terminal de BLNK qui est formé en gouttière à leucine permettant son interaction avec la membrane plasmique (Köhler et al., 2005), (3) le domaine SH2 de BLNK peut interagir avec Syk et être phosphorylé lorsque cette dernière est active (Miyazaki et al., 2012; Oellerich et al., 2011). Une fois recruté et activé au niveau du BCR, BLNK assure des sites de fixation pour Btk (Burton's tyrosine kinase) et PLC $\gamma_2$ . Ce rapprochement permet alors à Btk de phosphoryler PLC $\gamma_2$  sur les tyrosines Y753 et Y759 principalement, ce qui corrèle avec l'activité de lipase de PLC $\gamma_2$  (Kim et al., 2004). PLC $\gamma_2$  est également phosphorylé sur Y1217 de manière indépendante à Btk (Kim et al., 2004).

IP $_3$  libéré lors de l'action de PLC $\gamma_2$  sur PIP $_2$  va lier les récepteurs à IP $_3$  situés sur la membrane endoplasmique du réticulum endoplasmique (RE) et provoquer une libération du calcium stocké (Patterson et al., 2004) accroissant le taux de calcium cytoplasmique. La baisse calcique dans le RE est ressentie par STIM1 et STIM2 (Liou et al., 2005) et a pour conséquence l'ouverture des pompes calciques de la membrane cellulaire, accroissant alors encore plus le taux de calcium dans le cytoplasme (Alt et al., 2015). En l'absence de STIM1, la baisse du taux de calcium dans le RE suite à l'activation du BCR n'est pas sentie. En cas d'absence de STIM1 et de STIM2, la prolifération et la survie des lymphocytes B est réduite de façon drastique sans pour autant affecter la spécificité de la réponse. L'augmentation de calcium dans le cytoplasme des cellules B provoque la migration de molécules de la famille des NFAT vers le noyau. La suppression de NFATc1 empêche la prolifération induite par l'activation du BCR et promeut la mort cellulaire induite par l'activation (Bhattacharyya et al., 2011).

DAG libéré lors de l'action de PLC $\gamma_2$  sur PIP $_2$  associé au taux de calcium va activer PKC $\beta$ , une des kinases du complexe I $\kappa$ B responsable de la libération des facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B lorsque ceux-ci sont piégés par l'inhibiteur  $\kappa$ B (Häcker and Karin, 2006). La voie de NF- $\kappa$ B est cruciale pour maintenir la prolifération, la survie et la différenciation des cellules B.

### 3.2. Régulation de PI3K

En plus du PLC $\gamma_2$ , PIP $_2$  peut être prise en charge par PI3k afin de former du PIP $_3$ . Dans les lymphocytes B, l'activation de PI3K se fait principalement, mais pas uniquement, par le CD19, capable de lier l'enzyme sur la sous unité p85 $\alpha$  (Wang et al., 2002). L'adaptateur de PI3K dans les cellules B (BCAP) est fortement exprimé par ces dernières. Lors de l'activation du BCR, BCAP est phosphorylé et recrute p85 $\alpha$  (Okada et al., 2000). BCAP et CD19 semblent avoir un rôle complémentaire dans l'activation de PI3K, leur double extinction bloquant complètement la maturation des cellules B (Aiba et al., 2008).

Le PIP $_3$  membranaire produit par PI3K va être lié par les protéines de la famille des Vav (Vav1, Vav2 et Vav3), qui vont accroître l'activité de PI3K. L'activité de Vav est donc contrôlée par PI3K, qui subit en retour un retro contrôle positif, probablement par l'intermédiaire de Rac1 (Inabe et al., 2002; Vigorito et al., 2004). Des trois protéines Vav, Vav3 est fortement exprimée dans les lymphocytes périphériques et les cellules de la rate (Movilla and Bustelo, 1999; Zeng et al., 2000) et module l'expression de PI3K suite à l'activation du BCR (Inabe et al., 2002).

PI3K se distingue principalement pour son rôle majeur dans le signal de survie basal, aussi appelé signal tonique, indispensable à la survie des lymphocytes B périphériques : en cas d'absence de PI3K, le nombre de B2 de la rate chute de façon drastique, et le développement des B1 et des B de la zone marginal est presque complètement bloqué (Clayton et al., 2002). L'une des voies majeures de signalisation que PI3K exerce passe par l'activation d'AKT, suivie par la modulation des facteurs de transcription en aval. La voie PI3K/AKT dans les lymphocytes B est connue pour réguler les facteurs de transcription Foxo (Haftmann et al., 2012). Suite à l'activation du BCR, AKT est activée par PI3K et phosphoryle Foxo1 et Foxo3, diminuant alors leur capacité à lier l'ADN et provoquant leur exclusion du noyau par le biais de protéines chaperonne.

## 4. Fonctions spécifiques du BCR en fonction de la classe d'immunoglobuline

### 4.1. BCR à IgM/IgD

Les premiers BCRs exprimés par les lymphocytes B sont de classe IgM et IgD (figure 5). La chaîne lourde  $\mu$  membranaire joue donc plusieurs rôles, à savoir transmettre des signaux de différenciation durant les premiers stades de développement, des signaux de survie chez les lymphocytes B au repos et des signaux d'activation durant la maturation périphérique dépendante de l'antigène. IgM et IgD possèdent tous deux la même queue intracellulaire chargée positivement composée des résidus KVK. La signalisation dépendante d'un BCR à IgM serait semblable à celle d'un BCR à IgD (Lutz et al., 1998). Le principal changement phénotypique lors du remplacement de la chaîne  $\mu$  par une chaîne  $\delta$  serait un retard dans la maturation de l'affinité de la réponse immune humorale. Ces mêmes lymphocytes B dont la chaîne  $\mu$  a été remplacée présentent un blocage partiel lors de la transition du stade pro-B vers le stade pré-B (Ubelhart et al., 2010). Cela serait dû à l'absence du signal autonome du pré-BCR assuré par le domaine CH1 de la chaîne  $\mu$ .

Une déficience de la chaîne  $\delta$  provoque quant à elle une légère réduction du nombre de lymphocytes B dans la rate et les ganglions lymphatiques associés à une plus forte expression des IgM membranaires. La formation de GC et la réponse humorale après immunisation restent intactes (Nitschke et al., 1993). Il a par contre été montré que les IgD membranaires

semblent jouer un rôle dans la tolérance des lymphocytes B et limiteraient la différenciation des cellules B auto-réactives en plasmocytes (Guo et al., 2011).

#### 4.2. BCR à IgG

Les IgG membranaires possèdent une longue et conservée queue cytoplasmique (figure 5). Cette queue est nécessaire à la forte sécrétion des IgG solubles et à la survie des lymphocytes B mémoire IgG1 (Kaisho et al., 1997). Par comparaison avec la queue IgM lors de la reconnaissance d'un antigène spécifique, la queue IgG accroît la production de cellules plasmocytaires durant des réactions T-dépendantes en dehors du follicule (Martin and Goodnow, 2002). Il semblerait également que l'accroissement de la réponse calcique due à l'IgG accroisse la différenciation en B de la zone marginale, la prolifération extra-folliculaire et la différenciation en plasmocyte. Malgré une augmentation de la réponse calcique, les signaux transmis par la queue IgG sont plus faibles lors de l'activation du BCR, ce qui est concordant avec le fait que la différenciation en lymphocytes B de la zone marginale est favorisée dans des conditions qui atténuent la signalisation du BCR (Pillai et al., 2005). Cela pourrait aussi impliquer une plus faible induction de CCR7 lors de la reconnaissance de l'antigène par le BCR à IgG, CCR7 étant connu pour orienter les cellules B vers la zone T riche en CCL19/CCL21 plutôt que vers la zone marginale.

La queue intracellulaire des IgG membranaires peut lier l'adaptateur Grb2 lorsque celle-ci est phosphorylée sur une de ses tyrosines (figure 5). Grb2 va alors moduler la signalisation du BCR et augmenter la prolifération cellulaire (Engels et al., 2009). Grb2 est caractérisé par une fonction double : il peut diminuer la signalisation basale ainsi qu'augmenter la signalisation lors de l'activation du BCR (Belov and Mohammadi, 2012).

Dans le cas des IgG1 membranaires, la reconnaissance d'un antigène entraîne un plus fort recrutement de Syk et une plus forte mobilisation du calcium (Liu et al., 2010).

#### 4.3. BCR à IgA

L'activation des BCRs à IgA (figure 5) provoque l'augmentation de la concentration du calcium intra cellulaire ce qui permet aux lymphocytes B IgA<sup>+</sup> localisés dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (MALT) de réaliser une réponse IgA lors d'immunisations locales (Brandtzaeg et al., 1999; Leduc et al., 1997). De la même façon que pour IgG, la région d'encrage à la membrane  $\alpha$  est nécessaire pour la différenciation des cellules B sécrétrices d'IgA *in vivo* (Amin et al., 2012). Il a été montré que les progéniteurs des cellules B peuvent réaliser une CSR vers IgA, survivre avec ce BCR et se différencier en cellules productrices d'immunoglobulines (Hasan et al., 2002). Un pré-BCR  $\alpha$  est en revanche moins efficace que son homologue  $\mu$  pour les réarrangements V(D)J lors de la construction d'un pré-BCR ou BCR fonctionnel (Duchez et al., 2010). Il est intéressant de noter que les cellules B IgA<sup>+</sup> se différencient plus fortement en CD138<sup>+</sup> que les autres (Laffleur et al., 2013). Tout comme le BCR à IgM, le BCR à IgA est sensible à l'inhibition par le CD22 (Sato et al., 2007).

#### 4.4. BCR à IgE

Les cellules B présentant un BCR à IgE sont les moins représentées des cellules switchées. La production d'IgE est très finement régulée, ce qui se justifie sans doute par leur action à double tranchant : si les IgE interviennent dans la réponse protectrice anti parasitaire ou encore contre des venins et toxines, ils peuvent également provoquer des chocs anaphylactiques dramatiques et sont les anticorps de l'allergie immédiate.

Après la CSR, le passage par des lymphocytes B exprimant une IgE membranaire est obligatoire avant de passer aux cellules sécrétrices d'IgE. La suppression de l'exon de membrane de la chaîne lourde d'IgE réduit le nombre de cellules IgE<sup>+</sup> de près de 95%, et le remplacement de la queue cytoplasmique IgE par une queue IgM (bien plus courte) réduit de 50% l'expression d'IgE soluble (Laffleur et al., 2013). Chez l'Homme, le BCR à IgE possède deux iso-formes, une longue et une courte. Les deux se différencient par la longueur du domaine membranaire extracellulaire proximal (EMPD) : 66 acides aminés pour l'iso-forme longue, 14 pour la courte. Si les deux formes sont fonctionnelles, la forme courte est plus facilement transportée à la membrane cellulaire (Batista et al., 1996). Tout comme le BCR à IgG, la queue intracellulaire des IgE membranaires peut lier l'adaptateur Grb2, et la protéine HAX-1 semble s'y associer au motif YANIL, pouvant alors influencer l'internalisation de l'antigène médiée par le BCR et la présentation de l'antigène aux cellules T (figure 5). Le progéniteur hématopoïétique kinase 1 (HPK1) peut également interagir avec la queue cytoplasmique et affecter la signalisation du récepteur (Laffleur et al., 2013).

Un programme de maturation séquentiel a été proposé pour la formation des plasmocytes à IgE : la SHM et la maturation d'affinité se déroulerait dans un premier temps avec des cellules de classe  $\gamma 1$ , puis changeraient de classe vers IgE où elles se différencieraient rapidement en plasmocytes (Erazo et al., 2007). Ce modèle serait valable pour les IgE de haute affinité, alors que la CSR de  $\mu$  vers  $\epsilon$  se ferait directement sans passage par  $\gamma 1$  pour les IgE de faible affinité (Xiong et al., 2012). Par ailleurs, si les lymphocytes B IgE<sup>+</sup> peuvent se différencier au sein d'un GC et rapidement se différencier en plasmocytes lors d'une primo infection, ces derniers ont sans doute une courte durée de vie (Yang et al., 2012).



## 5. Localisation cellulaire du lymphocyte B

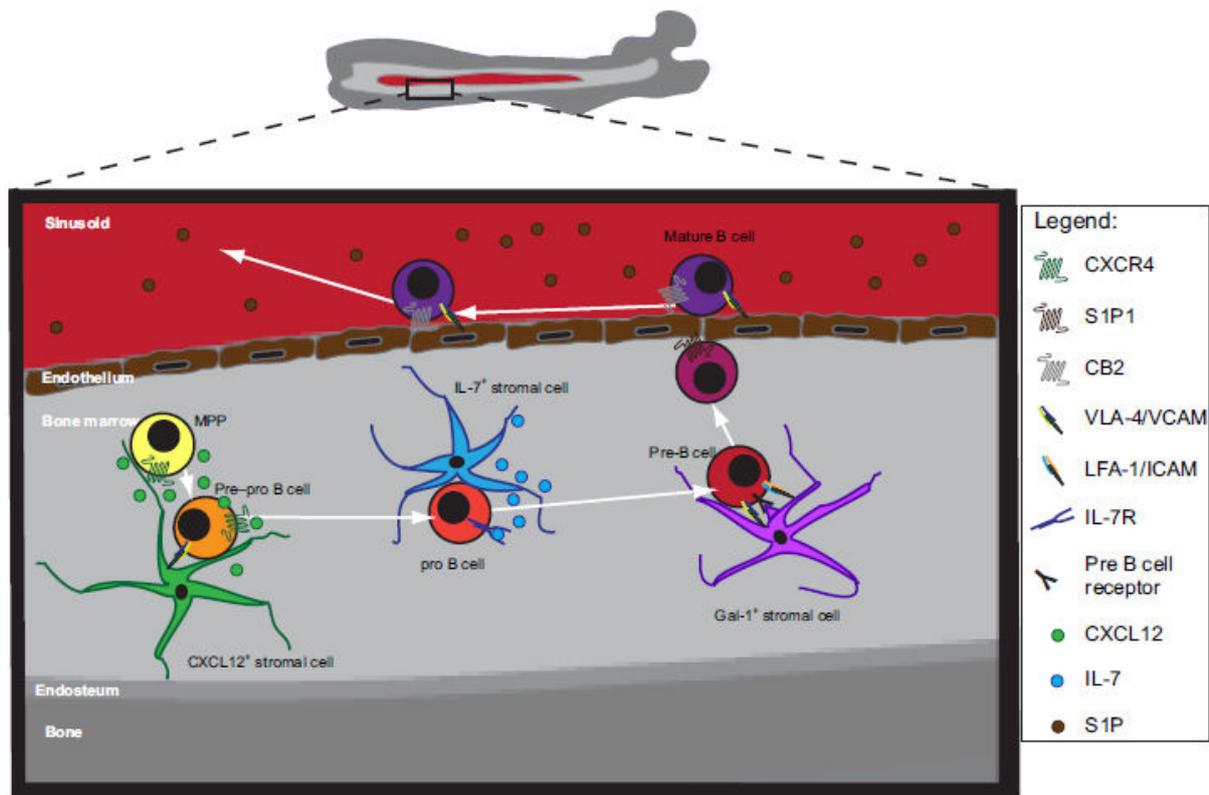
### 5.1. Localisation des B en développement et matures dans la moelle osseuse

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont décrites comme logées à proximité des ostéoblastes, cellules marquant la séparation entre la partie dure de l'os et la moelle (figure 6). Les ostéoblastes régulent la réserve de cellules souches : une augmentation du nombre d'ostéoblastes est concomitante avec une augmentation du nombre d'HSC (Zhang et al., 2003b). La prolifération des HSC est stimulée par Jagged1, produit par les ostéoblastes, qui active la voie de Notch1 (Calvi et al., 2003). De plus, ces cellules osseuses régulent l'homéostasie des HSC par l'expression de thrombopoïétine, d'angiopoïétine et de CXCL12 (reconnu par le récepteur CXCR4). Les cellules endothéliales localisées dans la niche des HSC participent au maintien du stock d'HSC par l'expression du facteur SCF (stem cell factor) (Ding et al., 2012).

Les pro-B se localisent au niveau des cellules stromales productrices d'IL7 et ne sont plus en contact avec les cellules arborant CXCL12 (figure 6) (Tokoyoda et al., 2004). Ces cellules quittent ensuite la niche IL7+ lors du stade pre-B pour se diriger vers une nouvelle niche où les cellules expriment la galactine-1 (Gal1) à leur surface (Mourcin et al., 2011). En effet, la Gal1 sert de ligand pour le pré-BCR et induit la formation de cluster de pré-BCR contenant également VLA4 (une intégrine connue sous le nom de very late antigen 4) et de LFA1 (lymphocyte function-associated antigen-1). Le contact synaptique entre ce cluster et Gal1 active les tyrosines kinases intracellulaires et permet la transduction du signal du pré-BCR, indispensable à la prolifération et à la différenciation des cellules au stade pré-BII (Espeli et al., 2009). Le développement B est donc contrôlé par des niches cellulaires au sein de la moelle osseuse au travers desquelles les lymphocytes B en développement circulent. Les lymphocytes B achevant leur maturation dans la moelle vont en sortir par la circulation sanguine. Les cellules B sont attirées au niveau des veines ; les hématies circulantes produisent du sphingosine-1-phosphate (S1P) (Pappu et al., 2007) qui est reconnu via le récepteur S1P1 et provoque la migration des cellules B dans la circulation sanguine. Les lymphocytes B ne quittent cependant pas directement l'os et restent dans les vaisseaux sanguins, indiquant que ces derniers constituent en eux même une niche et pas seulement une voie de sortie.

Des lymphocytes B matures sont également présents dans la moelle osseuse (figure 6). Ils sont situés dans des niches péri-sinusoïdales, à l'interface entre le tissu et la circulation sanguine (Cariappa et al., 2005). Cette situation semblable à la zone marginale de la rate contient des cellules capables de répondre à des antigènes T-indépendants. Cette population B est dépendante des cellules dendritiques exprimant le récepteur CX3CR1. En effet, ces cellules dendritiques sécrètent une cytokine, le facteur d'inhibition de migration des macrophages, qui active la voie anti-apoptotique d'Akt en interagissant avec le complexe de récepteurs CD74-CD44 (Sapoznikov et al., 2008).

Enfin, certains plasmocytes réintègrent la moelle après leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires.



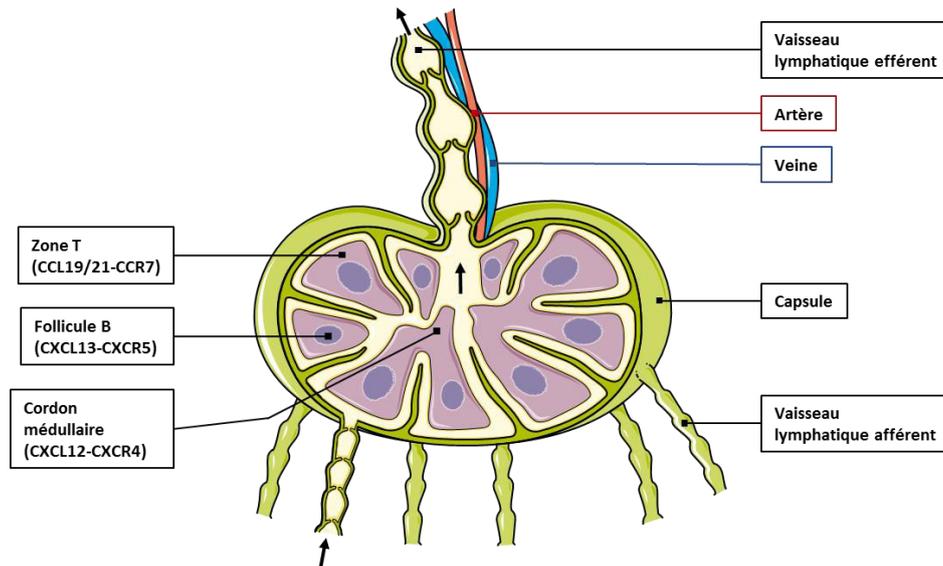
**Figure 6 : Localisation des cellules B dans la moelle osseuse durant le développement B.** Les progéniteurs hématopoïétiques (MPP) sont au contact des cellules stromales qui expriment le CXCL12, tout comme les lymphocytes pré-pro B. Les cellules pro-B sont localisées près des cellules stromales exprimant de l'IL7, et les cellules pré-B forment une synapse avec les cellules stromales Gal-1+ par les couples pré-BCR/Gal-1, LFA-1/ICAM, VLA4/VCAM. La migration des lymphocytes B vers la circulation sanguine se fait par la liaison entre le récepteur S1P1 avec le S1P très abondant dans le sang. Les lymphocytes restent quelque temps adhérents à l'épithélium avant de devenir circulants (Alt et al., 2015).

## 5.2. Localisation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires

### 5.2.1 Les ganglions lymphatiques

Les organes lymphoïdes secondaires possèdent une architecture unique qui les compartimente (figure 7). Chaque compartiment est spécialisé pour une population de cellules immunitaires précise par l'action de cellules stromales. Cette organisation permet une réponse immune adéquate lors d'une stimulation antigénique. Les lymphocytes B sont regroupés dans la zone corticale du ganglion lymphatique et sont caractérisés par l'expression de CXCR5, un récepteur reconnaissant CXCL13, chemokine très fortement exprimées par les cellules dendritiques folliculaires (FDCs) (Cyster et al., 2000) présentes dans les zones B du ganglion et principalement dans le centre des follicules. A la base du follicule et vers le centre du ganglion, la zone B est adjacente avec la zone T. Cette région frontalière est un lieu privilégié pour les interactions T-B (Okada et al., 2005). La zone T n'est pas recouverte de lymphocytes B, ces derniers sont plutôt regroupés en follicules et sont cernés par les lymphocytes T. C'est dans cette région inter-folliculaire que les cellules B et T spécifiques d'un

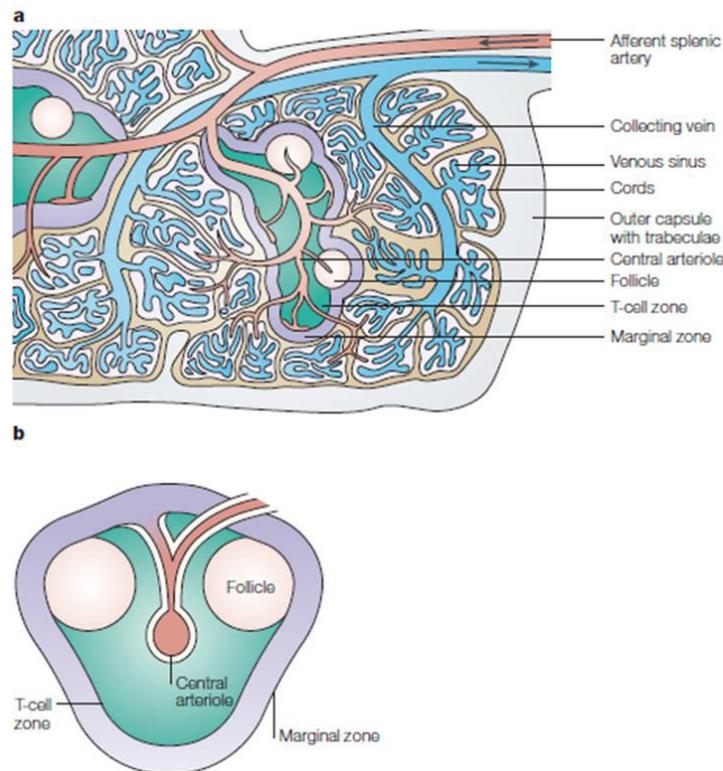
antigène s'associent en paire (Kerfoot et al., 2011). Les fibroblastes de la zone T séquestrent les lymphocytes T en exprimant du CCL19 et 21 reconnus par le CCR7 des cellules T.



**Figure 7 : Représentation schématique d'un ganglion lymphatique.**

### 5.2.2 La rate

Le rôle de la rate est de filtrer le sang, et cela en fait un organe lymphoïde secondaire différent des autres (figure 8). Les vaisseaux sanguins, les artéριοles, dans la rate, sont entourés par la pulpe blanche composée de zones T et de follicules B. Les artéριοles peuvent déboucher sur la zone marginale, une région charnière entre la pulpe rouge et la pulpe blanche de la rate et caractérisée par la présence de macrophages et des lymphocytes B de la zone marginale qui éprouvent les antigènes circulants dans le sang (Mebius and Kraal, 2005). Les lymphocytes B de la rate sont sédentaires à contrario des lymphocytes B folliculaires circulants.



**Figure 8 : Structure de la rate.** A) Représentation schématique de la rate. La pulpe blanche est composée des zones T et B. B) Représentation schématique de la pulpe blanche chez la souris (Mebius and Kraal, 2005).

## 6. Les lymphocytes B extra-folliculaires

Certains lymphocytes B situés en dehors des zones B dans les organes lymphoïdes secondaires, et nommés B entra-folliculaires, suivent une route différente de leurs homologues des zones B. Ils se différencient rapidement en cellules productrices d'immunoglobulines. Lors de leur différenciation en plasmablastes, leur expression de CXCR5 est sous-réglée (Wehrli et al., 2001) ce qui les empêche de migrer vers les zones B en sentant le CXCL13 (Hauser et al., 2002). Ils vont cependant exprimer le CXCR4 ce qui provoque leur déplacement vers les cellules exprimant le CXCL12, à savoir les cellules stromales du cordon médullaire des ganglions et la pulpe rouge de la rate (Hargreaves et al., 2001). CXCL12 est aussi fortement exprimé dans la zone sombre du centre germinatif (Allen et al., 2004). Les plasmocytes extra-folliculaires ont une courte durée de vie (Smith et al., 1996) et sont responsables de la première vague d'immunoglobulines, principalement des IgM, lors d'une réponse immune.

## 7. Activation des lymphocytes B folliculaires

Au sein du ganglion lymphatique, les lymphocytes B folliculaires peuvent rencontrer les antigènes de trois façons différentes. Les petits antigènes solubles (<70kDa) sont transportés vers les zones B grâce à des micro-canaux présents au sein de l'organe lymphoïde (Rozenaal et al., 2009). Les antigènes trop larges pour passer dans ces canaux sont récupérés par les macrophages et transférés aux cellules B du follicule (Junt et al., 2007). Enfin,

les lymphocytes B peuvent rencontrer les antigènes en dehors du follicule, dans les régions encadrant les vénules endothéliales, cellules formant de micro-vaisseaux spécialisés dans les ganglions. Les cellules dendritiques sont capable de directement présenter les antigènes aux lymphocytes B présents dans ces zones (Qi et al., 2006).

### **7.1. Le centre germinatif (GC) : initiation**

Après activation du BCR, les cellules B vont exprimer plus de CCR7 à leur surface, récepteur des chémokines de la zone T, provoquant la migration du lymphocyte B vers la région frontalière avec la zone T. C'est dans cette région que les premières interactions apparenté se réalisent (Garside et al., 1998), et aboutissant à la formation d'un couple T/B stable. Suite aux interactions avec les cellules T, une partie des lymphocytes B sélectionnés va migrer vers le cordon médullaire où ils vont se différencier en plasmablastes à courte durée de vie (De Silva and Klein, 2015). Il semblerait qu'à ce stade, les lymphocytes B ayant une haute affinité pour l'antigène sont plus prompts à se différencier en plasmablastes (O'Connor et al., 2006; Paus et al., 2006) et que certains se différencient en cellules mémoires non modifiées (Taylor et al., 2012). Les autres lymphocytes B dont les BCR sont suffisamment spécifiques pour l'antigène sur-régulent Bcl6 (De Silva and Klein, 2015) et s'orientent vers le centre germinatif. Cette migration est possible suite au remaniement par la cellule B de ses propriétés migratoires (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2009). Les cellules T ayant participées aux interactions B/T sur-régulent également Bcl6, et expriment lors du second jour post immunisation les marqueurs des T helpers (CXCR5, PD1, GL7) avec l'intervention des cellules dendritiques (Choi et al., 2011), médian alors leur migration vers le centre du follicule pour déclencher la formation du GC au troisième jour. Le quatrième jour, les lymphocytes B sélectionnés pour former le centre germinatif migrent vers le centre du follicule (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2009) avec les lymphocytes T ayant acquis les caractéristiques des T<sub>FH</sub>. Les cellules B se divisent rapidement durant les jours 5 et 6 et peuplent la niche de FDCs au centre du follicule, repoussant alors les cellules IgM+IgD+ qui vont former un manteau autour du GC. Le GC va continuer à croître jusqu'à maturation au septième jour puis va être polarisé en deux microenvironnements : la zone sombre et la zone claire. La zone sombre est composée d'une forte densité de cellules B en division, et la zone claire est composée de cellules B, de cellules T<sub>FH</sub>, de cellules dendritiques et de macrophages (De Silva and Klein, 2015).

#### **7.1.1 Facteurs moléculaires principaux impliqués dans l'initialisation du GC**

##### **7.1.1.1. Bcl6**

La protéine Bcl6 doit impérativement être exprimée par les lymphocytes B pour entrer dans le GC (Kitano et al., 2011). Les cellules n'exprimant pas Bcl6 sont également incapables de down-réguler EB12 pour permettre la migration des cellules B candidates au GC (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2009). Bcl6 permet en outre la sur-régulation de CXCR4, récepteur exprimé dans la zone sombre du GC (Allen et al., 2004; Caron et al., 2009), et la down-régulation de S1PR1 (récepteur de type 1 de la sphingosine-1-phosphate) dont l'expression est normalement minimale au sein du GC (Green et al., 2011). Bcl6 contrôle donc le programme de transcription qui permet aux cellules de migrer au centre du follicule.

### **7.1.1.2. MEF2B**

Tout comme Bcl6, MEF2B est fortement transcrit dans les cellules B du GC et active directement la transcription du Bcl6 (Ying et al., 2013). L'expression de MEF2b précède légèrement celle de Bcl6 dans les cellules B précurseurs du GC, semblant indiquer qu'il est responsable de l'induction de l'expression de Bcl6 (Ying et al., 2013).

### **7.1.1.3. IRF4**

Il a été montré qu'IRF4 régule la différenciation des cellules T en T<sub>FH</sub>, et son absence dans les lymphocytes B empêche la formation de GC suite à une immunisation (Bollig et al., 2012). En début de GC, IRF4 induirait l'expression de Bcl6 et d'Aicda (Ochiai et al., 2013).

### **7.1.1.4. MYC**

Dans les cellules, MYC supporte une robuste prolifération cellulaire en régulant plusieurs mécanismes dont la progression du cycle cellulaire, le métabolisme et la maintenance des télomères (Dang, 2012). Lors du quatrième jour post immunisation, les blastes du très jeune GC sont MYC+Bcl6+ (Calado et al., 2012) démontrant l'implication de MYC lors de la formation du GC. Ces cellules transcrivent en plus de la cycline D3 (comme les cellules MYC-BCL6+) la cycline D2 (Calado et al., 2012), cycline D spécifique de la zone sombre du GC, et mettent en place dans un premier temps un programme de prolifération dépendant de la cycline D2 avant de passer au programme classique de prolifération dépendant de la cycline D3. Après l'établissement du GC lors du quatrième jour, MYC n'est plus exprimé par les lymphocytes B jusqu'au septième jour où il est de nouveau exprimé par certaines cellules B de la zone claire (De Silva and Klein, 2015).

### **7.1.1.5. MCL1**

Il a récemment été montré que la protéine anti-apoptotique MCL1 est le principal régulateur de la survie des cellules B lors de la formation du GC (Vikstrom et al., 2010), et ce pendant toute la phase d'initialisation.

## **7.2. Dynamique du centre germinatif**

Les lymphocytes B de la zone sombre du GC prolifèrent rapidement et mutent leurs gènes d'immunoglobulines afin de diversifier leurs immunoglobulines. Se retrouvent donc dans le GC (figure 9) des cellules avec un spectre très large quant à l'affinité de leur BCR pour l'antigène responsable de la réponse immunitaire. En quittant la zone sombre pour la zone claire, les cellules B dont le BCR possède une forte affinité pour l'antigène sont sélectionnées positivement et renvoyées dans la zone sombre pour une nouvelle étape de prolifération et de mutation. Ce processus permet de sélectionner et de générer des plasmocytes et des cellules B mémoires très affines pour l'antigène (De Silva and Klein, 2015).

### 7.2.1 Déplacements au sein du GC

Les deux zones du GC sont organisées pour exprimer des récepteurs de chémokines et des marqueurs d'activations différents. Ainsi, CXCR4 est exprimé dans la zone sombre et CXCR5 est exprimé dans la zone claire (Allen et al., 2004). Si l'on se réfère uniquement à CXCR4 et aux marqueurs de l'activation, les cellules B peuvent être identifiées de la sorte : CXCR4<sup>hi</sup>CD83<sup>low</sup>CD86<sup>low</sup> pour les lymphocytes B de la zone sombre, et CXCR4<sup>low</sup>CD83<sup>hi</sup>CD86<sup>hi</sup> pour les lymphocytes B de la zone claire (De Silva and Klein, 2015). Le jeu d'expression de ces marqueurs permet le passage des lymphocytes B entre les deux zones du GC. Il semblerait que les variations d'expressions de ces marqueurs ne soient pas dues à des causes environnementales mais plutôt à un mécanisme chronométré intrinsèque à la cellule. La polarisation du GC est également cruciale pour que ce dernier puisse fonctionner de manière optimale. En l'absence de polarisation, une sélection prématurée et inappropriée des lymphocytes B peut avoir lieu (De Silva and Klein, 2015).

### 7.3. Rôle des T<sub>FH</sub> dans la sélection des lymphocytes B de haute affinité.

La sélection dans la zone claire du GC est promue par les cellules T<sub>FH</sub> (Victoria et al., 2010). Les lymphocytes B capturent l'antigène via le BCR et le présentent au CMH de cellules T<sub>FH</sub>. Plus l'affinité du BCR est forte, plus les antigènes capturés sont nombreux ce qui forme à la surface de la cellule B une forte densité de complexe CMH/peptide (Victoria et al., 2010). Les lymphocytes T<sub>FH</sub> forment des contacts plus larges et plus longs avec ces cellules B (Shulman et al., 2014), leurs apportant une aide plus importante. Cette interaction T/B est passagère, ce qui permet à la cellule T<sub>FH</sub> de tester continuellement les lymphocytes B de la zone claire et de sélectionner ceux ayant la plus forte affinité possible pour l'antigène.

Il a également été montré que la transduction du signal BCR dans les lymphocytes B du GC, qu'elle soit spontanée ou induite par la liaison avec l'antigène, est inhibée (Khalil et al., 2012). Ainsi, le BCR n'aurait pour rôle que la capture et l'internalisation de l'antigène dans ce cas précis. Plus la capacité de capture du BCR est forte et plus la cellule B reçoit de l'aide de la part des T<sub>FH</sub>. Les cellules qui reçoivent le plus d'aide sont programmées pour se diviser encore plus de fois en réentrant dans la zone sombre (Gitlin et al., 2014), et donc à relancer le processus d'hypermutation somatique (décrit dans une autre partie de cette thèse) et accroître encore plus l'affinité du BCR pour l'antigène. Les lymphocytes B du GC avec la plus forte affinité répètent plusieurs fois ce cycle et finissent par dominer la population B du GC (figure 9).

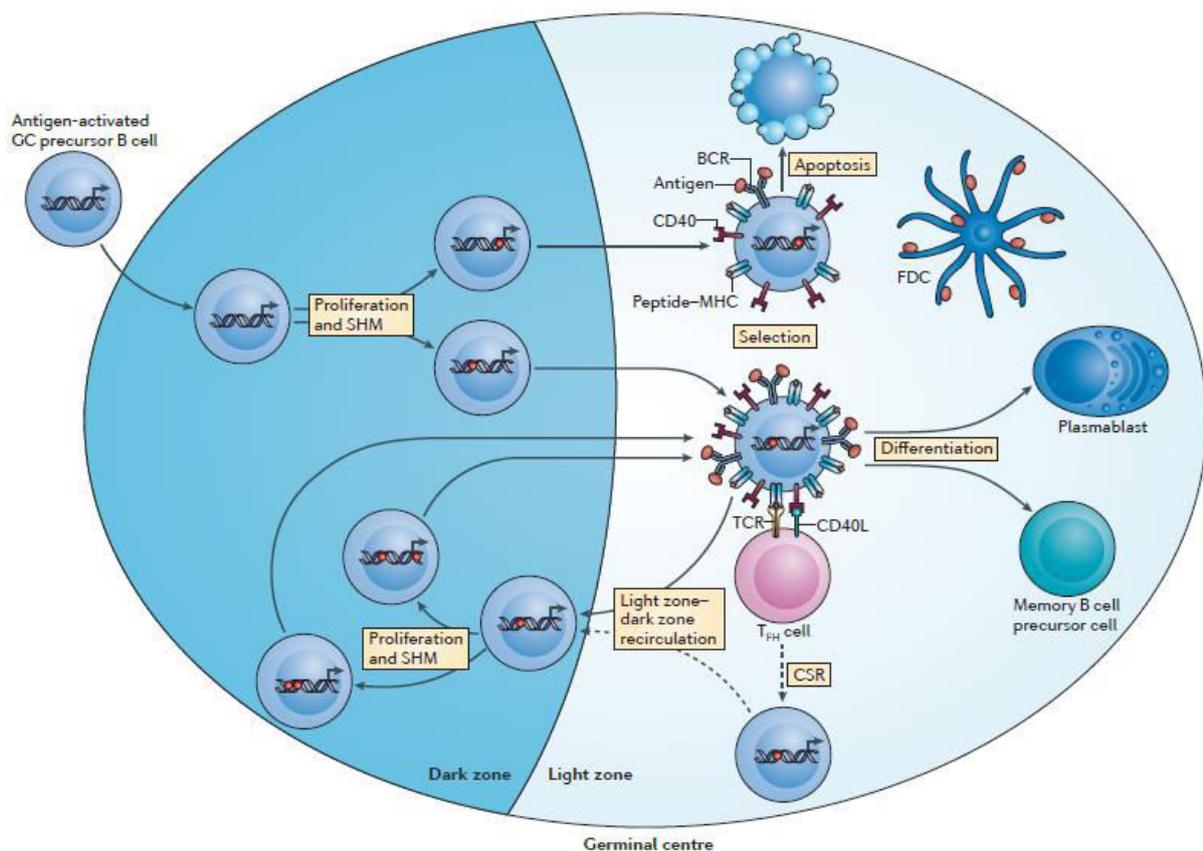
Le contact entre les cellules B du GC et les T<sub>FH</sub> induit chez les lymphocytes T<sub>FH</sub> une augmentation de la voie de signalisation du calcium ainsi qu'une co-expression d'IL4 et d'IL21 (Shulman et al., 2014). Le ligand ICOSL exprimé par les cellules B promeut le duo passionnel mais transitoire avec les cellules T exprimant le récepteur de surface ICOS, et stimule l'expression de CD40L sur les T<sub>FH</sub> qui stimule en retour les lymphocytes B de façon dépendante au CD40 (Liu et al., 2015). Cette stimulation par le CD40 induit l'expression d'ICOSL chez la cellule B du duo, bouclant ainsi la boucle.

#### 7.3.1 Autres facteurs permettant la sélection des lymphocytes B de haute affinité

Une autre façon de sélectionner les lymphocytes B dans le GC peut se faire en limitant l'accès aux antigènes présentés par les FDC (Zhang et al., 2013). Les antigènes sont masqués par les immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes générés au début de la réponse

immune, et seules les cellules B avec un BCR plus affiné pour l'antigène peuvent rentrer en compétition pour la capture de l'antigène. L'immunoglobuline sécrétée étant de plus en plus spécifique pour l'antigène au cours du temps, la sélection des lymphocytes B est de plus en plus drastique. Ces immunoglobulines peuvent également infiltrer les GC voisins, établissant alors une communication dont le but est de promouvoir la production d'immunoglobulines avec la plus forte affinité possible (De Silva and Klein, 2015).

Avec le processus aléatoire de la SHM, des clones de cellules B au BCR auto réactif peuvent voir le jour. Ces cellules sont éliminées quand l'auto-antigène est exprimé de façon ubiquitaire par les cellules de l'environnement du GC mais peuvent être sélectionnées si l'auto-antigène est rare ou spécifique d'un autre tissu (Chan et al., 2012).



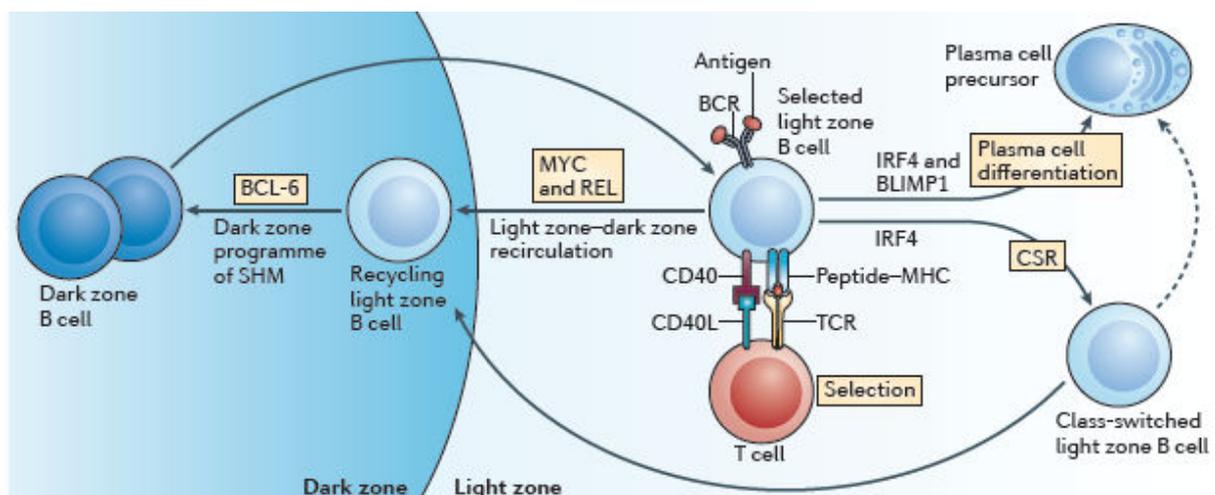
**Figure 9 : Représentation de la dynamique des cellules au sein du centre germinatif et de la sélection des lymphocytes B de haute affinité.** Les cellules B de la zone sombre prolifèrent et subissent le processus de SHM qui introduit des mutations dans la région V(D)J de l'immunoglobuline (point rouge). Les lymphocytes B migrent ensuite dans la zone claire où leur nouveau BCR est mis à l'épreuve par les cellules T<sub>FH</sub> et les cellules dendritiques. Les cellules sélectionnées négativement sont éliminées par apoptose et celles qui sont sélectionnées positivement retournent proliférer et muter dans la zone sombre. La CSR pourrait avoir lieu entre la sélection positive et le retour dans la zone sombre. Ce phénomène de recirculation, mutation et sélection permet la génération de cellules B mémoires et de plasmocytes de haute affinité (De Silva and Klein, 2015).

#### 7.4. Maintenance du centre germinatif

Si MYC n'est exprimé normalement qu'en début et fin de la phase d'initialisation du GC, il a été montré qu'une petite sous-catégorie de lymphocytes B dans la zone claire du GC, séparée dans les zones sombre et claire au septième jour post immunisation, expriment MYC (De Silva and Klein, 2015; Dominguez-Sola et al., 2012). Cette expression coïncide au moment où les cellules B de haute affinité sont sélectionnées. Ces cellules MYC<sup>+</sup> ont un phénotype activé, avancent plus rapidement dans le cycle cellulaire et ont plus de mutations accroissant l'affinité de leur BCR que les cellules MYC<sup>-</sup> (Dominguez-Sola et al., 2012). Cette expression de MYC par les lymphocytes B de la zone claire est induite par les cellules T qui sélectionnent les cellules B de forte affinité (figure 10).

De la même façon que pour MYC, NF- $\kappa$ B est réprimé dans les lymphocytes B qui se divisent fortement dans la zone sombre du GC, mais est retrouvé activé dans certaines populations B de la zone claire du GC (Basso et al., 2004). De plus, la signature NF- $\kappa$ B est aussi présente dans les populations MYC<sup>+</sup> et l'inactivation d'au moins l'un des deux conduit à la désolidarisation du GC (Dominguez-Sola et al., 2012; Heise et al., 2014).

Enfin, d'autres facteurs tels que CD45, EBF1 et SPIB semblent jouer un rôle dans la maintenance du GC (De Silva and Klein, 2015).



**Figure 10 : Maintenance du centre germinatif.** BCL6 est indispensable pour la mise en place du programme d'expression des gènes associés à la zone sombre et permettre à la SHM d'avoir lieu. MYC et REL sont requis pour la recirculation des cellules B entre la zone sombre et la zone claire et pour la maintenance du GC. IRF4 est associé à la down-régulation du programme associé à la zone sombre. S'il n'est pas nécessaire à la maintenance du GC, il l'est pour la CSR et la production de plasmocytes sortant du GC. BLIMP1 est aussi nécessaire pour la différenciation plasmocytaire (De Silva and Klein, 2015).

#### 7.5. Régulation du phénotype des cellules B de la zone sombre

Le phénotype de la zone sombre est régulé par plusieurs acteurs : une régulation épigénétique, une régulation médiée par Bcl6, une régulation médiée par des micro-ARN et une régulation médiée par la transcription.

Les complexes répresseurs PRC1 et PRC2 sont des régulateurs épigénétiques qui modulent la répression génique. La composante catalytique de PRC2 est l'activateur d'EZH2, une histone méthyltransférase responsable de la marque H3K27me3, corrélée avec une chromatine

fermée. L'expression d'EZH2 est induite dans les lymphocytes B du GC et un haut taux est maintenu jusqu'à la sortie du GC (Velichutina et al., 2010). De plus, EZH2 contribue à la formation de domaines chromatiniens bivalents (Bernstein et al., 2006), ce qui convient parfaitement à la dynamique du GC où des changements de décision rapides sont à faire.

Bcl6 recrute plusieurs facteurs de transcription répresseurs sur certains de ses gènes cibles. Cet effet est contre balancé par les complexe p300, aboutissant à une balance équilibrée pouvant basculer rapidement d'un côté comme de l'autre en fonction de l'avancement de la cellule B dans le GC (De Silva and Klein, 2015).

Le micro-ARN miR-155 a été identifié comme participant durant la réaction du GC : les souris déficientes pour ce micro-ARN ne peuvent former de GC et ne montrent pas de maturation de l'affinité des immunoglobulines (Thai et al., 2007; Vigorito et al., 2007). La transcription de miR-155 par les lymphocytes B du GC est réprimée par Bcl6 (Basso et al., 2012) et est activée par une stimulation *via* le CD40 ou le BCR *in vitro*. Le miR-125b, exprimé très fortement dans les cellules B en division de la zone sombre du GC, pourrait directement inhiber la différenciation en plasmablaste en down régulant l'expression de BLIMP1 et d'IRF4 (Gururajan et al., 2010). La découverte d'autres micro-ARN pouvant intervenir dans le développement des lymphocytes B du GC souligne leur rôle de régulateur post-transcriptionnel.

## Chapitre II : Remodelage des gènes d'Ig par l'Activation induced deaminase (AID)

---

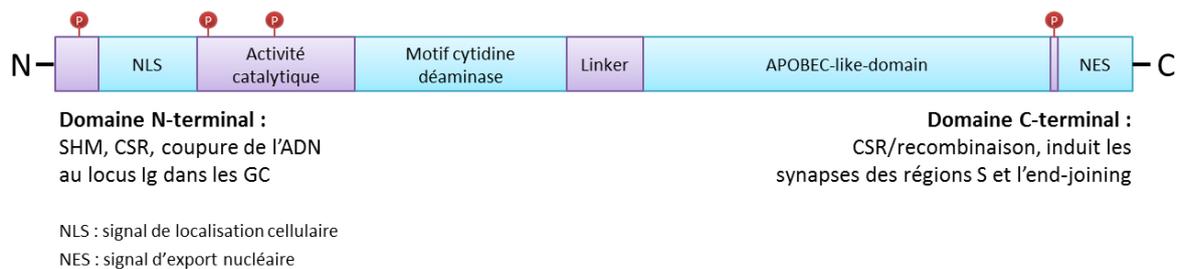
Nous avons vu dans l'introduction générale que le locus IgH murin d'un lymphocyte B est organisé de l'exon VDJ suivit par les gènes constants (le tout dans l'ordre suivant : 5'-VDJ- $\mu$ - $\delta$ - $\gamma$ 3- $\gamma$ 1- $\gamma$ 2b- $\gamma$ 2a- $\epsilon$ - $\alpha$ -3') ainsi que de différents élément activateurs ( $E\mu$ , 3'RR). Dans la configuration initiale du locus, la transcription initiée par le promoteur  $V_H$  va permettre l'expression d'une chaîne IgH VDJ- $\mu$  ou VDJ- $\delta$  via un épissage alternatif. Sans stimulation antigénique, les lymphocytes B vont exprimer exclusivement des IgM et des IgD, qui plus est membranaires (Alt et al., 1980)(Rogers et al., 1980). Ces immunoglobulines de surface forment alors le BCR pour la reconnaissance de l'antigène.

### 1. AID

Après la reconnaissance de son antigène cible, le lymphocyte B va remanier les gènes codant pour les immunoglobulines de façon à augmenter l'affinité des immunoglobulines contre l'antigène, et à changer la classe des immunoglobulines en fonction du type d'agresseur. Les deux phénomènes à l'origine de ces remaniements sont l'hypermutation somatique (SHM) et la recombinaison de classe (CRS). Même s'il a été initialement pensé que les mécanismes responsable des cassures de le l'ADN (cassure simple brin pour la SHM et double brin pour la CRS) étaient distinct (Weill and Reynaud, 1996), il s'est avéré qu'une seule enzyme, l'activation-induced cytidine deaminase (AID), était responsable de la SHM et de la CRS (Muramatsu et al., 2000).

#### 1.1. Structure d'AID

L'enzyme AID en elle-même est une petite protéine de 26kDa avec 198 résidus (figure 11). La partie centrale d'AID est composée d'un domaine catalytique désaminant les cytidines ainsi que d'un linker (Ta et al., 2003). Dans le but de déterminer la localisation des fonctions effectrices d'AID, différents mutants de la protéine ont été étudiés. A l'aide de mutants d'AID dans la partie N-terminale (Shinkura et al., 2004), il a été montré que ces mutants ne permettaient pas ni une SHM ni une CRS normale, mais avec une atteinte de la SHM beaucoup plus sévère que de la CRS. Le mécanisme par lequel AID provoque des lésions de l'ADN dans les régions V et les régions SWITCH est donc le même et la fonction de clivage est située dans la partie N-terminale de la molécule. L'analyse de mutants sur la partie C-terminale d'AID a montré une incapacité de l'enzyme à induire la CRS, sans modifier sa capacité à induire la SHM (Ta et al., 2003), amplifiant même parfois la capacité à induire des cassures de l'ADN (Doi et al., 2009). AID a donc deux rôles distincts : (a) induire des cassures de l'ADN dans les régions V et S du locus IgH via son domaine N-terminal et (b) induire la recombinaison de classe en rapprochant les régions candidates à la ligature, via son domaine C-terminal.



**Figure 11 : Structure générale et fonctions associées d'AID.** La partie N-terminale est porteuse de l'activité catalytique d'AID et de la fonction de déamination. La partie C-terminale est porteuse du domaine de type APOBEC et est indispensable à la CSR. AID peut être phosphorylée en quatre points, trois dans la partie N-terminale dont deux dans la zone à activité catalytique, et un dans la région C-terminale.

Malgré ses activités de coupure-ligature de l'ADN, ayant lieu uniquement dans le noyau de la cellule, AID est préférentiellement localisée dans le cytoplasme. La mobilité d'AID est due aux signaux de localisation cellulaire (motif NLS) et d'export cellulaire (motif NES) localisés respectivement aux extrémités N et C terminales (Ito et al., 2004; McBride et al., 2004). Il est également possible que la région N-terminale toute entière joue un rôle dans le transport d'AID vers le noyau.

## 1.2. Protéines interagissant avec AID

AID a des interactions avec de nombreuses autres protéines, qui peuvent être divisées en différents groupes : (1) les protéines associées à la capture de l'ADN et à la transcription, (2) les protéines associées avec la transformation et l'épissage des ARNs, (3) les protéines associées au transport intracellulaire, (4) les protéines stabilisatrices et (5) les protéines de réparation de l'ADN.

(1) AID interagit avec l'ARN polymérase II (Nambu et al., 2003). Des co-immunoprécipitations avec AID ont permis l'identification de facteurs d'élongation de la transcription tels que SPT5, SPT6, TRIM28/KAP1, les complexes PAF et FACT (Jeevan-Raj et al., 2011; Okazaki et al., 2011; Pavri et al., 2010; Willmann et al., 2012). La partie N-terminale d'AID interagirait avec SPT6, et la partie C-terminale avec TRIM28. Deux autres protéines liant l'ADN ont été rapportées comme interagissant avec AID : RPA et PKA (Basu et al., 2005; Chaudhuri et al., 2004).

(2) Via sa partie NLS, AID interagit avec CTNNB1 (Conticello et al., 2008). Le facteur de splice PTBP2 a aussi été identifié comme interagissant avec AID (Nowak et al., 2011), tout comme le complexe exosome-ARN s'associe avec AID (Basu et al., 2011). D'autres études utilisant de l'immuno-précipitation ou d'autres méthodes ont isolé des protéines associées à l'épissage et à la transformation des ARNs, dont RNAPII, TFIID, snRNP8, snRNP200, PRP6, PRP9, DDX3X, DDX1, DDX15, Nucleolin, et SMN (Alt et al., 2015).

(3) AID interagit avec les importines  $\alpha/\beta$ , probablement impliquées dans le transport d'AID vers le noyau *via* le motif NLS. L'exportine CRM1 reconnaît quant à elle le motif NES (Doi et al., 2009; Ito et al., 2004). Le facteur d'élongation de la traduction eEF1A est impliqué dans la rétention cytoplasmique d'AID (Häsler et al., 2011) en interagissant directement avec la

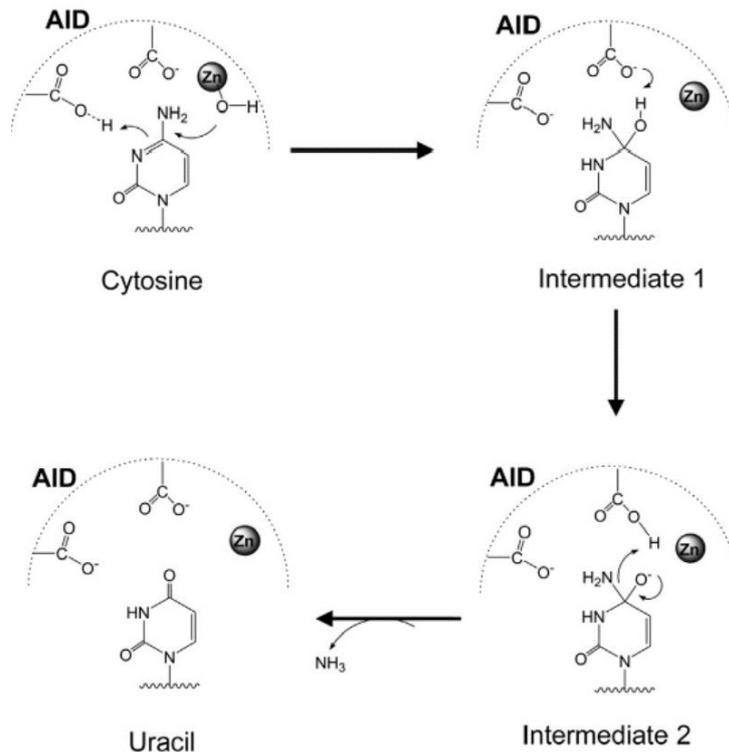
partie C-terminale d'AID. CTNNB1 et GANP influence également la localisation cellulaire d'AID. En effet, la surexpression de GANP (protéine nucléaire du centre germinatif) permet le passage d'AID du cytoplasme dans le noyau (Alt et al., 2015). Il a également été montré que la sur expression d'AID relocalisait les protéines de la famille Tet dans le cytoplasme (Arioka et al., 2012).

(4) Dans le cytoplasme, AID est associée à différentes protéines chaperonnes, HSP40, HSP70, HSP90, de la classe des protéines du choc thermique, ce qui la protège de la dégradation. La dégradation nucléaire d'AID peut se faire *via* des mécanismes dépendants et indépendant de l'ubiquitination, en interagissant avec deux protéines de la classe des E3 ubiquitine ligase MDM2 et RNF126 (Delker et al., 2013; MacDuff et al., 2006) ou REG- $\gamma$  (Cogné, 2013; Uchimura et al., 2011).

(5) AID est aussi associée à des facteurs de réparation de l'ADN tels que Rad51, FEN1, and RRM2 (Delker et al., 2013). Les lésions de l'ADN induisent l'interaction d'une enzyme de réparation suite à une excision de base, APE1, avec une forme phosphorylée d'AID (Vuong et al., 2013).

### 1.3. Activité catalytique d'AID

AID est une protéine de la large famille des APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic-component), dont le site catalytique est composé de deux résidus cystéines, un résidu histidine pour lier un ion  $Zn^{2+}$  et d'un résidu d'acide glutamique donneur de proton durant la déamination (figure 12). AID ne possède qu'un seul site catalytique (contrairement aux APOBEC3 qui en possèdent deux) ainsi qu'un domaine non caractérisé : APOBEC. Le rôle d'AID est de déaminer les cytosines de l'ADN et/ou ARN en uracile. Elle cible les régions variables des gènes d'immunoglobulines dans toutes les espèces animales possédant des lymphocytes B, à savoir les poissons à cartilage, osseux, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères (Conticello et al., 2005). Sa première identification en 1999 a été en tant que protéine spécifiquement exprimée dans les centres germinatifs (Muramatsu et al., 1999). Au-delà de son rôle au sein du lymphocyte B, AID est maintenant considérée comme un acteur important de la déméthylation des cytosines même dans les cellules non-différenciées où elle peut désaminer les 5-méthyl cytosines en thymine et les 5-hydroxyméthyl cytosines en 5-hydroxythymines (Cortellino et al., 2011; Popp et al., 2010).



**Figure 12 : Réaction enzymatique opérée au sein du site catalytique d'AID lors de la déamination d'une cytosine en uracile (Alt et al., 2015).**

AID a pour substrat aussi bien les cytosines de l'ADN (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003) que celles des ARNs (Liang et al., 2013) en *in vitro*. Dans des modèles procaryotes tels que *E. coli* ou la levure, une surexpression d'AID provoque des mutations dans un grand panel de gènes (Mayorov et al., 2005; Petersen-Mahrt et al., 2002).

## 1.4. Régulation d'AID

### 1.4.1 Régulation de l'expression d'AID

En condition normale, à savoir dans des tissus sains, AID est exprimée dans les lymphocytes B du GC et dans les régions extra-folliculaires des organes lymphoïdes secondaires où ont lieu la SHM et la CSR (Muramatsu et al., 2000; Muto et al., 2000). L'expression d'AID est également observée dans les B immatures et les pro/pre B à très faible taux, mais pas dans les B matures au repos (Crouch et al., 2007; Muramatsu et al., 2000; Ueda et al., 2007). Cette activation d'AID dans les B immature, permettant un faible niveau de SHM et de CSR (Han et al., 2007; Kuraoka et al., 2009; Mao et al., 2004) jouera peut être un rôle dans la diversification des immunoglobulines indépendantes de l'antigène ainsi dans les mécanismes de tolérance du soi (Kuraoka et al., 2011; Meyers et al., 2011). AID peut également être exprimée faiblement dans des cellules non B telles que les lymphocytes T, les oocytes, les cellules souches embryonnaires ou les testicules (Morgan et al., 2004; Qin et al., 2011; Schreck et al., 2006) où elle jouerait un rôle de régulation épigénétique.

La plupart des lymphomes B humain (folliculaire, Burkitt, ...) expriment AID de façon constitutive (Faili et al., 2002a; Greeve et al., 2003). AID est requise pour assurer le bon fonctionnement de la SHM, aussi bien sur les gènes des régions variables que sur les

oncogènes (Heintel et al., 2004; Pasqualucci et al., 2001, 2004; Smit et al., 2003). Dans les modèles animaux, AID affecte l'efficacité de l'hypermutation et/ou de la translocation des oncogènes (Kotani et al., 2007; Okazaki et al., 2003) et chez l'humain, les lymphomes et leucémies à AID sont associés à faible diagnostic (Heintel et al., 2004; McCarthy et al., 2003; Smit et al., 2003). AID semble donc impliqué dans l'avancement de la tumeur et de sa génotoxicité. De plus, AID a déjà été reporté présente dans des tumeurs non-lymphoïdes (Komori et al., 2008; Kou et al., 2007).

Certains virus sont capables d'induire l'expression d'AID. Le virus d'Epstein-Barr mime une stimulation constante au CD40 *via* sa protéine latente de membrane 1 (He et al., 2003). Le virus de l'hépatite C induit l'expression d'AID dans les lymphocytes B (Machida et al., 2004) et il en va de même lors de la transfection du génome viral dans les hépatocytes (Endo et al., 2007). Chez l'Homme, AID est exprimée dans des leucémies à lymphocytes T après que ces derniers se soient fait infecter par le virus T-lymphotropique humain 1 (HTLV1) (Ishikawa et al., 2011), et chez la souris des infections par des rétrovirus tels que le virus de la leucémie murine Abelson induisent l'expression d'AID dans les lymphocytes B (Gourzi et al., 2006). Toujours dans les pathogènes, certaines bactéries, comme *Helicobacter pylori* dans l'épithélium gastrique (Matsumoto et al., 2007), sont capable d'induire AID. Il n'est cependant pas certain qu'AID soit systématiquement induite par l'agent pathogène, son expression peut également être une réponse indirecte à l'inflammation provoquée.

#### 1.4.2 Régulation post-traductionnelle d'AID

AID peut être phosphorylée (par la PKC ou la PKA) en cinq points : la sérine 3, la thréonine 27, la sérine 38, la thréonine 140 et la tyrosine 184 (Gazumyan et al., 2011; McBride et al., 2008). Ces modifications post-traductionnelles, bien non totalement comprises, jouent un rôle dans l'activité d'AID. Ainsi, l'ajout du groupement phosphate sur la sérine 3 va diminuer l'activité d'AID (Gazumyan et al., 2011). La phosphorylation de la sérine 38 et de la thréonine 140 vont quant à elles accroître l'activité d'AID (McBride et al., 2008). La phosphorylation de la sérine 38 est supposée aider AID lors d'interaction avec d'autres protéines/complexes, comme par exemple pour lier RPA (Basu et al., 2005; McBride et al., 2008).

#### 1.4.3 Régulation de la localisation d'AID

AID est une protéine voyageant entre le cytoplasme et le noyau de la cellule (Ito et al., 2004; McBride et al., 2004). Dans le cytoplasme, AID est maintenue en inertie via son domaine C-terminal. AID est incluse dans un complexe > 300 kDa, l'empêchant d'atteindre son substrat dans le noyau (Cogné, 2013). L'état de phosphorylation d'AID semble avoir une certaine importance dans la dissociation du complexe de rétention et dans le transport d'AID vers le noyau (Häsler et al., 2011). Dans le noyau, AID interagit avec CTNNB1, la nucléoline, la protéine chaperonne nucléophosmine et probablement avec l'exosome d'ARN (Cogné, 2013). La protéine nucléaire associée au centre germinatif (GANP) s'associe également avec AID, favorisant son importation dans le noyau et le ciblage des régions V lors de la SHM (Maeda et al., 2010).

#### 1.4.4 Régulation de la stabilité d'AID

Dans le noyau, AID est stabilisée par des protéines chaperonnes, et tout particulièrement par la DnaJA1 (Orthwein et al., 2012). AID est très rapidement dégradée dans le noyau, et ce par deux mécanismes différents. Dans la première situation, AID est poly-ubiquitinylée et est ensuite dégradée par le protéasome (Aoufouchi et al., 2008; Delker et al., 2013). Dans la seconde situation, AID n'est pas ubiquitinylée et interagit avec REG- $\gamma$  avant sa dégradation (Uchimura et al., 2011).

#### 1.5. Régulation d'*Aicda*

*Aicda*, le gène codant pour AID, doit être régulé très finement pour pouvoir préserver l'intégrité du génome du potentiel génotoxique d'AID. Il doit notamment n'être régulé que par des promoteurs spécifiques des lymphocytes B, ces derniers étant les seuls à trouver un avantage à muter leur génome.

##### 1.5.1 Facteurs humoraux et facteurs de transcription

Lors de la rencontre du lymphocyte B avec l'antigène, le BCR va induire l'expression d'*Aicda*. Le BCR seul n'est cependant pas suffisant pour induire une production suffisante d'AID pour assurer le bon déroulement de la SHM et/ou de la CSR. Il agit de façon synergique avec d'autres stimuli tels que le CD40 ou les TLRs (Pone et al., 2012). La liaison entre CD40 (LB) et CD40L (=CD154 ; LT) va activer la voie de NF- $\kappa$ B et, en association avec les signaux envoyés par le BCR et les TLRs, accroître l'expression d'AID (Bombardieri et al., 2011). Les deux voies de NF- $\kappa$ B, canonique et non-canonique, interviennent dans la régulation d'*Aicda* (Pone et al., 2012; Tran et al., 2010). Les TLRs sont des récepteurs capables de reconnaître et lier des motifs moléculaires présents uniquement sur des agents microbiens (virus, bactéries, protozoaires, champignons) (Moresco et al., 2011). La voie de signalisation interne suite à une activation des TLRs (détaillée dans le chapitre I) abouti à la production de cytokines ainsi qu'à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (canonique et non-canonique) (Moresco et al., 2011). Enfin, les cytokines produites par les cellules associées au lymphocyte B interviennent dans la régulation de l'expression d'AID. Ainsi, le récepteur à l'IL4 va, en association avec la signalisation des TLRs ou du CD40, induire *Aicda* (Muramatsu et al., 1999). Il en va de même pour l'œstrogène qui induit *Aicda* indirectement en up-régulant HoxC4 (récepteur à l'œstrogène, voir plus bas) (Mai et al., 2010; Pauklin et al., 2009).

##### 1.5.2 Eléments régulateurs en *cis*

L'expression d'*Aicda* est régulée et modulée par quatre régions régulatrices où activateurs et répresseurs viennent se fixer (figure 13).

La région 1 est constituée du promoteur et de la région directement en amont de celui-ci. Le promoteur seul est actif de façon constitutive (Yadav et al., 2006). Il contient les séquences reconnues par Oct1 et/ou Oct2 (5'-ATTTGAAT-3'), la séquence reconnue par HoxC4 (5'-ATTT-3') ainsi que les motifs de reconnaissance de la voie non-canonique de NF- $\kappa$ B et de Sp1/Sp3 (Park et al., 2009). S'il a été montré qu'un knock-out de HoxC4 chez la souris diminue

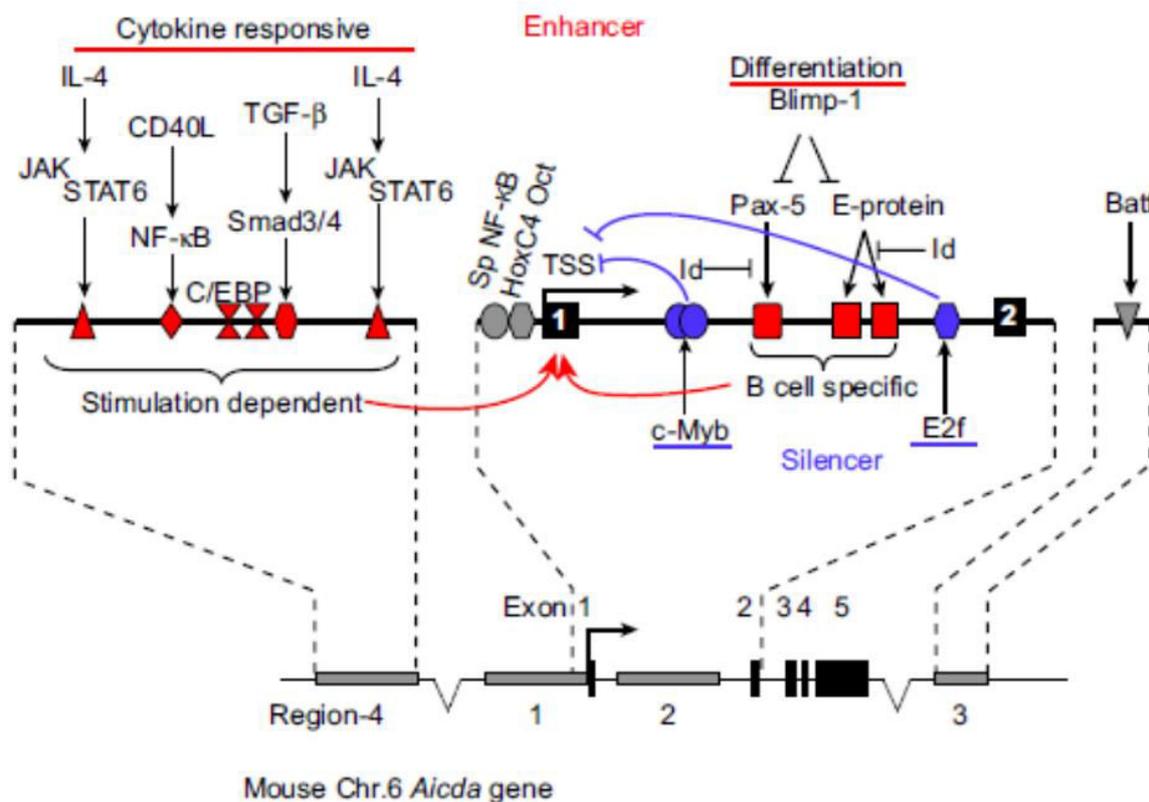
l'expression d'AID (Park et al., 2009), la région 1 à elle seule ne supporte pas une forte induction d'AID.

La région 2 est située dans le premier intron d'*Aicda*. Elle contient les sites de fixation pour Myb, Pax5, E2A et E2f. L'inhibition d'E2A par Id2 ou Id3 (Gonda et al., 2003; Sayegh et al., 2003) ou par un anti-cancéreux, l'Imatinab (Kawamata et al., 2012) réduit l'expression d'AID. A contrario, la délétion des motifs de fixation d'E2f et de c-Myb entraîne une diminution de l'expression d'AID *in vivo* (Huong et al., 2013). Ils ont donc un rôle répresseur dans la régulation d'*Aicda*.

La région 3 est localisée 7kb en aval de l'exon 5 d'*Aicda* chez la souris (24kb chez l'Homme). Elle contient le site de fixation de Batf, dont la délétion diminue dramatiquement l'expression d'*Aicda* (Ise et al., 2011).

La région 4 est placée 8kb en amont du site de départ de la transcription chez la souris (16kb chez l'Homme). Elle contient les séquences de reconnaissance de Stat6, Smad et NF-κB, protéines se trouvant à la fin des cascades d'activations suite à des stimulations par IL4, TGF-β et CD40L respectivement (Alt et al., 2015). De plus, un tandem de sites de liaison C/EBP est nécessaire à l'activité activatrice de cette région (Huong et al., 2013).

D'autres facteurs de transcriptions tels que Bach2, Bcl6, Blimps1 et IRF4 ont également été décrits comme important dans la régulation de l'expression d'AID (Basso et al., 2012; De Silva et al., 2012; Shaffer et al., 2002).



**Figure 13 : Représentation des éléments régulateurs en cis d'*Aicda*.** Les sites de fixation pour les facteurs de transcription induits suite à des réponses dépendantes des cytokines et de la différenciation sont indiqués en bleu (répresseurs) et rouge (activateurs)(Alt et al., 2015).

### 1.5.3 Régulation post-transcriptionnelle

Les micro-ARNs, ou miRs, sont de petits ARNs simple brin non codants dont le rôle est de réguler l'expression des protéines en liant leurs ARNm et en provoquant leur dégradation. Plusieurs miRs capables de cibler l'ARNm d'AID sur sa région 3'UTR ont été identifiés : miR155, miR181b, miR361 et miR93 (Borchert et al., 2011; Teng et al., 2008; de Yébenes et al., 2008). MiR181b est exprimée dans les cellules B au repos, et est réprimé lors d'une stimulation par du LPS ou de l'IL4 (de Yébenes et al., 2008). Il a pour fonction de maîtriser les ARNm codant pour AID si cette dernière n'est pas requise. L'expression de miR155 est quant à elle semblable à celle d'AID : faible dans les lymphocytes B au repos, et augmente lors d'une stimulation par du LPS et de l'IL4 (Teng et al., 2008). Son expression tout comme celle du miR361 est réprimée par Bcl6, ce qui contribue à induire l'expression d'AID dans les B du centre germinatif (Basso et al., 2012).

## 1.6. Expression aberrante d'AID

### 1.6.1 Dans les lignées myéloïdes

Depuis près de 30 ans, des études sur la cancérisation des lymphocytes B ont identifié des translocations d'oncogènes (*c-MYC*, *c-MAF*, *CYCLIN D1*, ...) au niveau des points de cassures de l'ADN situés sur les loci des immunoglobulines (Cogné, 2013). Dans un lymphocyte B sain, AID n'est exprimée que lors de l'entrée de la cellule dans le GC. Cependant certains pathogènes peuvent forcer l'expression d'AID en dehors des GC (Pérez-Durán et al., 2007). C'est le cas du virus d'Epstein-Barr (EBV), appartenant à la famille des *Herpes viridae* et associé au lymphome de Burkitt. Les cellules infectées par l'EBV expriment fortement AID et accumulent les mutations sur des proto-oncogènes comme *Bcl6* et *p53*, impliqués dans le développement de lymphomes (Epeldegui et al., 2007). Le virus est donc capable d'induire des modifications génétiques menant à la cancérisation de la cellule hôte par la dérégulation d'AID.

Si EBV est capable de déréguler et augmenter l'expression d'AID chez les lymphocytes B, les lymphocytes T infectés par HTLV1 produisent plus d'AID que les T sains (Ishikawa et al., 2011). Cette dérégulation d'AID se fait par une stimulation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B, et les mutations induites par AID participent à la tumorigénèse : les modèles murins où AID est constitutivement active développent des lymphomes T avec de nombreuses mutations dans des gènes autres que ceux des immunoglobulines tels que *c-MYC* ou les loci du TCR (Morisawa et al., 2008; Okazaki et al., 2003).

### 1.6.2 Dans les lignées épithéliales

Dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), souvent associé aux virus des hépatites B (HBC) et C (HCV), une inflammation persistante joue un rôle critique dans la cancérisation des hépatocytes. Une étude a montré qu'AID était produite non seulement par les lymphocytes infiltrant, mais aussi par hépatocytes infecté par HCV responsables de crises hépatiques et de cirrhoses (Kou et al., 2007). Les hépatocytes normaux n'expriment pas AID, l'inflammation et/ou l'infection virale sont responsable de l'expression d'AID. La sur-régulation d'AID dans les hépatocytes a pour conséquence l'accumulation de mutations dans les gènes non associés aux immunoglobulines tels que *p53* et *c-Myc*, accroissant le risque d'apparition de tumeurs

chez les cellules infectés par HCV (Kou et al., 2007). Dans des hépatocytes infectés par l'HBV, il a été montré que l'ADN viral présent dans la capsid des virions possède des mutations C/G vers T/A lorsque AID est sur exprimée en association avec le cycle de réplication du virus (Liang et al., 2013). Il est donc possible qu'AID ait un rôle de défense antivirale lors d'une infection par l'HBV, comme c'est le cas pour les protéines de la famille des APOBEC3 avec le matériel génétique que HIV-1 (Zhang et al., 2003a).

Lors d'une infection des tissus gastriques par *Helicobacter pylori*, ces derniers expriment AID de façon aberrante (Matsumoto et al., 2007). De plus, l'expression d'AID est associée avec le degré d'importance de la maladie. Cette sur expression d'AID aboutit à l'apparition de mutations dans le gène de *p53*.

Une étude a montré que dans le cancer du côlon (CAC) et les tissus enflammés de la muqueuse du côlon, AID était sur-exprimée (Endo et al., 2008), et cette sur-expression est très probablement la cause des mutations *p53* lors des premiers stades du développement des CAC (Brentnall et al., 1994).

Ces études permettent d'établir un lien entre inflammation et/ou une infection et cancer *via* AID (et d'autres protéines de la famille des APOBEC (Alt et al., 2015)) de la façon suivante :

Infection/inflammation → expression d'AID → cancérisation.

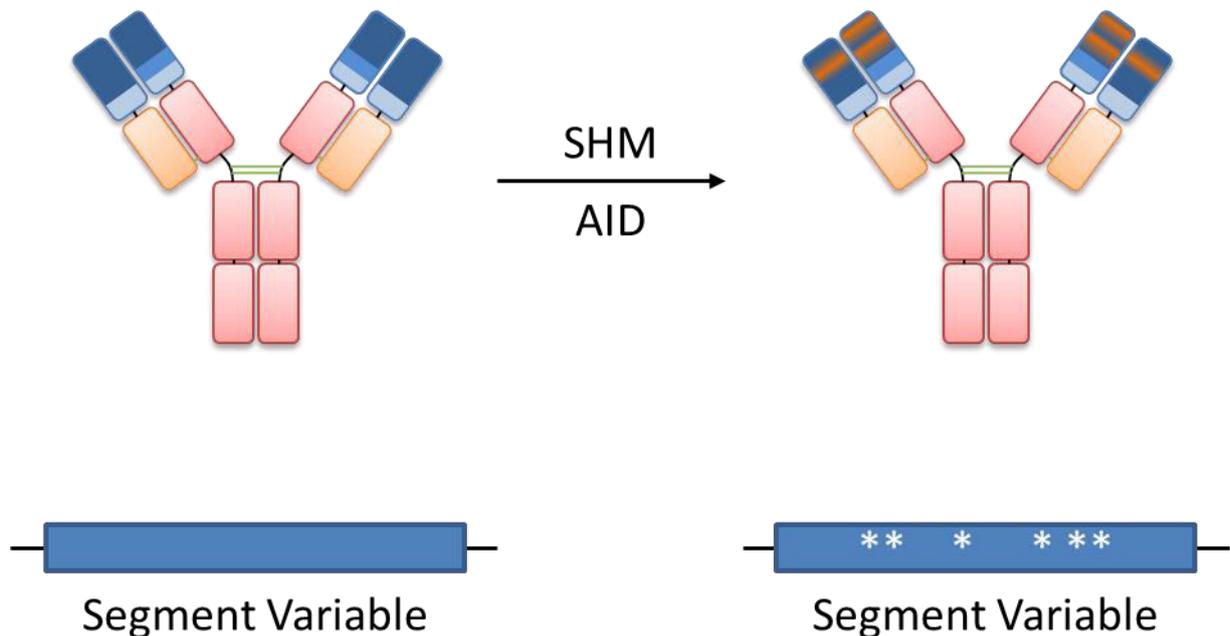
## 2. SHM

Malgré la capacité du système immunitaire à reconnaître un très grand nombre de motifs étrangers, *via* les réarrangements VJ sur les loci  $\kappa - \lambda$  et V(D)J sur le locus IgH, la protection apporté n'est pas suffisante pour contrer efficacement les pathogènes et substances toxiques. En cause, le manque d'affinité des immunoglobulines pour leur antigène cible. La nature étant bien faite, les lymphocytes B, après leur activation et entrée dans le centre germinatif (GC), performant une seconde diversification de leurs immunoglobulines afin d'accroître l'affinité de ces dernières pour leur cible antigénique. Le mécanisme permettant cette accroissement de l'affinité chez les mammifères est l'hyper mutation somatique (SHM).

### 2.1. Mécanisme général de la SHM

Durant la SHM, des mutations dues à l'action d'AID s'accumulent dans les régions V des chaînes légère et lourde avec une fréquence  $10^6$  supérieure à celles observées sur des gènes non impliqués (figure 14). Les mutations s'accumulent le plus dans des régions hypervariables (Complementarity Determining Regions = CDR), codant pour les résidus aminés directement en contact avec l'antigène. Le ciblage sur ces régions est facilité par la présence de séquences reconnues par AID (Jolly et al., 1996; Zheng et al., 2005). Les mutations identifiées sont le plus souvent des transitions (G vers A, C vers T) que des transversions (C vers A ou G, G vers C ou T). Le caractère aléatoire de ces mutations a pour conséquence une génération de nouvelles immunoglobulines soit plus affines pour l'antigène, sans changement d'affinité, ou encore moins affines qu'elles ne l'étaient avant la SHM. Il se peut également que les immunoglobulines générées ne soient pas fonctionnelles (Bemark and Neuberger, 2003; Zhang et al., 2001). Seules les mutations sur les allèles productifs ont une influence sur le BCR

et donc sur le destin de la cellule B (Neuberger, 2008). Les lymphocytes B où la SHM a conduit à la production d'immunoglobulines plus affines sont sélectionnés dans la zone claire du GC et entrent de nouveau dans la zone sombre pour proliférer et tenter d'accroître encore plus l'affinité de leur BCR (De Silva and Klein, 2015).



**Figure 14 : Représentation schématique de l'action d'AID lors de l'hypermutation somatique.** Les étoiles blanches représentent les mutations accumulées sur le gène codant pour le segment variable après la SHM.

Même si les mutations retrouvées après la SHM sont des mutations ponctuelles, des délétions et des insertions ont pu être identifiées (Goossens et al., 1998). Ces insertions et délétions sont référencées sous l'acronyme « indel » et sont la preuve de l'existence de cassures double brin durant la SHM.

## 2.2. Ciblage d'AID durant la SHM.

AID ne pouvant cibler l'ADN double brin, et l'association entre l'ARN polymérase II et AID ayant été démontrée (Nambu et al., 2003), la transcription de la région V à muter semble s'imposer pour permettre une bonne réalisation de la SHM. Cette idée est confortée par le fait que les mutations sont rares en amont du promoteur V (Both et al., 1990; Lebecque and Gearhart, 1990; Rada et al., 1994). De plus, la délétion du promoteur V abroge la SHM (Fukita et al., 1998). Cependant, la transcription à elle seule n'est pas suffisante pour permettre le ciblage exclusif d'AID sur les régions V, cette dernière étant capable de muter des gènes rapporteurs lorsque qu'ils sont fortement exprimés dans les cellules. Il doit donc exister des facteurs responsables de l'accumulation des mutations sur les régions V (Peled et al., 2008). Plusieurs hypothèses non exclusives les unes envers les autres existent pour expliquer le ciblage d'AID lors de la SHM et concernent l'accessibilité des régions V, la présence de séquences en *cis* recruteuses, la présence de protéines associées, l'avancée du cycle cellulaire.

### 2.2.1 L'accessibilité

Les changements épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones) sont souvent impliqués dans la régulation de la transcription, la réparation et la réplication de l'ADN. Ainsi, il a été montré que la SHM ciblait préférentiellement, et ce d'un facteur 10, l'allèle non méthylé du gène *Igk* comparé à son homologue méthylé (Fraenkel et al., 2007). De plus, les allèles méthylés et non méthylés ont le même taux de transcription. A l'inverse, la présence de CpG méthylé n'a aucun effet négatif sur l'action d'AID sur les cytosines proches (Larijani et al., 2005). Le rôle de la méthylation de l'ADN dans de ciblage d'AID est donc à éclaircir.

Les modifications de la conformation 3D de la chromatine en modifiant les histones permettent de libérer ou de bloquer l'accès aux complexes protéiques agissant sur l'ADN. Il a d'ailleurs été montré que les histones H3 et H4 associées aux régions V de la chaîne lourde sont plus acétylées que celles associées aux régions constantes (Woo et al., 2003) dans les cellules BL2 *in vitro*. Lors du traitement de ces cellules par une drogue inhibant les histones déacétylases (la trichostatin A = TSA) et provoquant une hyper acétylation des histones met en évidence une accumulation de mutations dans la région constante. L'acétylation des histones affecte donc le ciblage d'AID.

Une autre marque candidate dans le ciblage d'AID via la modification des histones est H3K4me. H3K4me, produite par l'histone méthylase Set1, persiste après la terminaison de la transcription et est une mémoire moléculaire de l'activité transcriptionnelle (Ng et al., 2003). Set1 est recrutée par la sous unité Paf1 du complexe de l'ARNpolIII, sous unité interagissant également avec AID grâce à son domaine N-terminal (Willmann et al., 2012). En cas de réduction du taux de H3K4me, le taux de mutations des régions V associées est lui aussi réduit (Begum et al., 2012). De plus, les gènes enrichis en H3K4me mais ne codant pas pour des immunoglobulines sont aussi ciblés par AID, confortant le rôle de ce marqueur dans le ciblage génétique d'AID.

Dans certains cas de modification des marques des histones, ces évènements ont lieu post-AID. C'est le cas de la phosphorylation de la sérine 14 de l'histone 2B (H2B-Ser14 → H2B-pSer14). Cette marque est présente dans les régions V des chaînes lourdes et légères, mais pas sur les régions constantes. Les modèles déficients pour AID ne présentant pas cette marque, elle ne joue donc pas de rôle dans le recrutement d'AID (Odegard et al., 2005).

### 2.2.2 Séquences en *Cis*

Les séquences activatrices en *Cis* possèderaient des motifs permettant le recrutement d'AID, de la même façon que les facteurs de transcription sont recrutés lors de la transcription. Certaines études sur les chaînes légères suggèrent que ces motifs recruteurs ne seraient pas situés directement sur l'exon codant pour la région V, mais plutôt sur la séquence du promoteur et/ou des régions activatrices (Peled et al., 2008). Cependant, plusieurs promoteurs indépendants des immunoglobulines permettent la réalisation de la SHM (promoteur de B29, de la  $\beta$ -globuline du poulet ou encore des promoteurs viraux (Betz et al., 1994; Martin and Scharff, 2002; Tumas-Brundage and Manser, 1997).

Dans le cas de la SHM sur la chaîne lourde, plusieurs promoteurs sont capables d'induire la SHM. Si la délétion de l'activateur intronique  $E_{\mu}$  provoque une légère baisse de la SHM, celle-ci n'est pas significative, ne faisant pas de ce dernier un acteur majeur dans le ciblage de la SHM (Perlot et al., 2005). Dans une étude sur hybridomes capables d'exprimer à fort taux la

chaîne lourde sans pour autant posséder l'activateur intronique (Ronai et al., 2005), les auteurs ont trouvé que la SHM avait lieu au même taux que dans le témoin WT lorsque  $E\mu$  et les motifs MARs (matrix attachment regions) l'encadrant étaient absents, et à un taux moindre lorsque seul l'un des éléments ( $E\mu^+$ /MAR- ou  $E\mu^-$ /MAR+) est absent. La région régulatrice en 3' du locus est aussi étudiée pour son influence durant la SHM. Si la délétion des éléments hs3b et hs4 n'a pas d'impact majeur sur la SHM (Morvan et al., 2003), l'ablation totale de cette région réduit la fréquence de la SHM avec seulement un effet mineur sur la transcription (Rouaud et al., 2013).

En *in vivo*, la présence de sites recruteurs pour des facteurs *trans* tels que E2A (E-box = CAGGTG), PU.1 et NF-EM5 altèrent les taux de SHM dans les régions V des chaînes légères et lourdes (Kodama et al., 2001; Michael et al., 2003). Ils ne semblent en revanche ne pas être les seuls régulateurs du ciblage de la SHM en raison de l'absence de motifs permettant leur recrutement sur certains gènes des chaînes légères et lourdes.

La structure de l'ADN simple brin en elle-même peut être capable de recruter AID. Des expériences de crosslinking entre les acides nucléiques et les protéines associées ont montré que les ADNs simple brin étaient plus présents sur les gènes supportant la SHM que sur ceux non ciblé par AID (Ronai et al., 2007).

### 2.2.3 Co-facteurs

Lors de la SHM, AID interagit avec plusieurs protéines/complexes pour cibler les régions V. L'ARNpolIII fut l'un des premiers cofacteurs à être identifié (Nambu et al., 2003). RPA (via S38 d'AID), MDM2, PKA et la DNA PKcs (Chaudhuri et al., 2004; MacDuff et al., 2006; Pasqualucci et al., 2006; Wu et al., 2005) ont également été identifiés comme s'associant avec AID. Ces protéines étant ubiquitaires et intervenant dans des fonctions cellulaires générales, il est peu probable qu'elles soient responsables du recrutement d'AID sur les gènes des immunoglobulines.

Les extrémités SHM (N-terminale) et CSR (C-terminale) spécifiques d'AID montrent la capacité de la cellule à micro-cibler l'action de AID en fonction des besoins en choisissant les facteurs à utiliser, adressant AID vers les régions V ou S.

### 2.2.4 Etat du cycle cellulaire

Le but des systèmes de réparation de l'ADN est de préserver l'intégrité de l'information génétique d'une cellule. Comment expliquer alors que dans le cas de la SHM (et de la CSR) ce soit des systèmes error-prone qui soient préférentiellement utilisés pour « corriger » la déamination d'AID ?

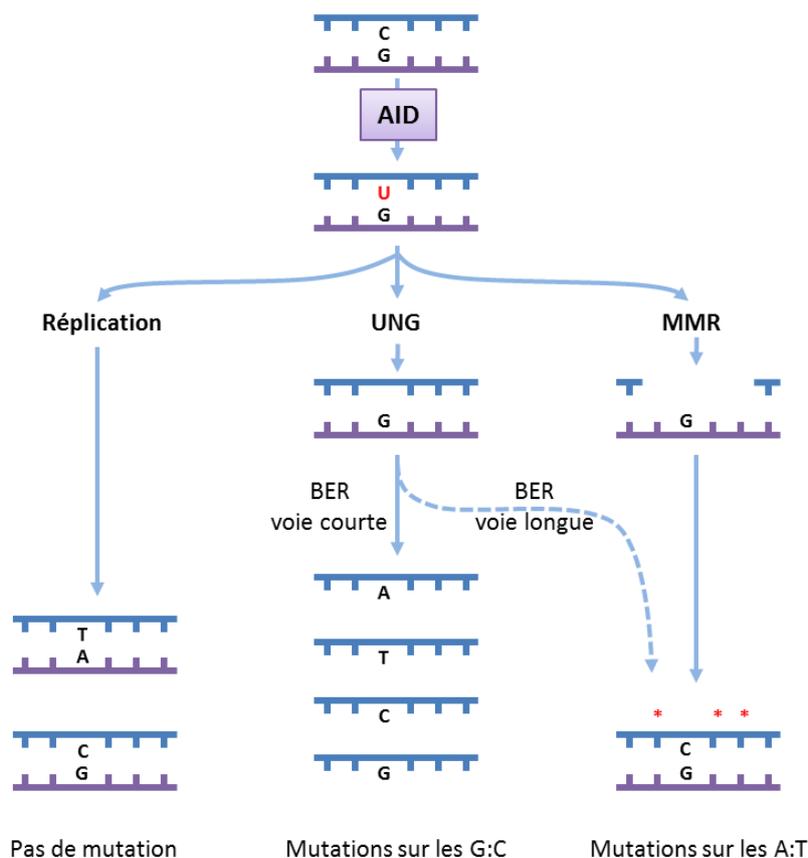
Une explication possible impliquerait que l'évènement de SHM ait lieu seulement lors de certaines phases du cycle cellulaire. En ayant lieu lors d'une phase non-répllicative, la cellule B pourrait séparer les systèmes de réparation de l'ADN error-free intervenant lors de la réplication de l'ADN en phase S, et alors privilégier les systèmes error-prone. Il a en effet été montré *in vitro* que lors d'une stimulation du BCR, des mutations dans les régions V étaient identifiées durant les phases G1 et G2 mais pas durant la phase de réplication S (Faili et al., 2002b). Il semblerait également que la localisation cellulaire d'AID change en fonction du cycle cellulaire (Cattoretti et al., 2006; Yang et al., 2005) et qu'il en soit de même pour la localisation sub-nucléaire des locus (Kosak et al., 2002).

### 2.3. Réparation des mutations induites par AID

Plusieurs mécanismes existent pour corriger le mésappariement G:U dû à l'activité d'AID (figure 15).

La réplication de l'ADN va générer des transitions C vers T sur un brin d'ADN, et G vers A sur le brin opposé. L'uracil DNA glycosylase (UNG), impliquée dans le mécanisme de base excision repair (BER) va retirer l'uracile de l'ADN, créant ainsi un site abasique pouvant être comblé par n'importe quelle base (A, T, C ou G). Le mécanisme de l'ADN mismatch repair (MMR) permet quant à lui la sélection de mutations sur les bases A:T.

Si BER et MMR sont normalement des mécanismes permettant la préservation de l'intégrité du génome, ils sont error-prone lors de la SHM, notamment avec l'utilisation de polymérases de faible affinité (Alt et al., 2015).



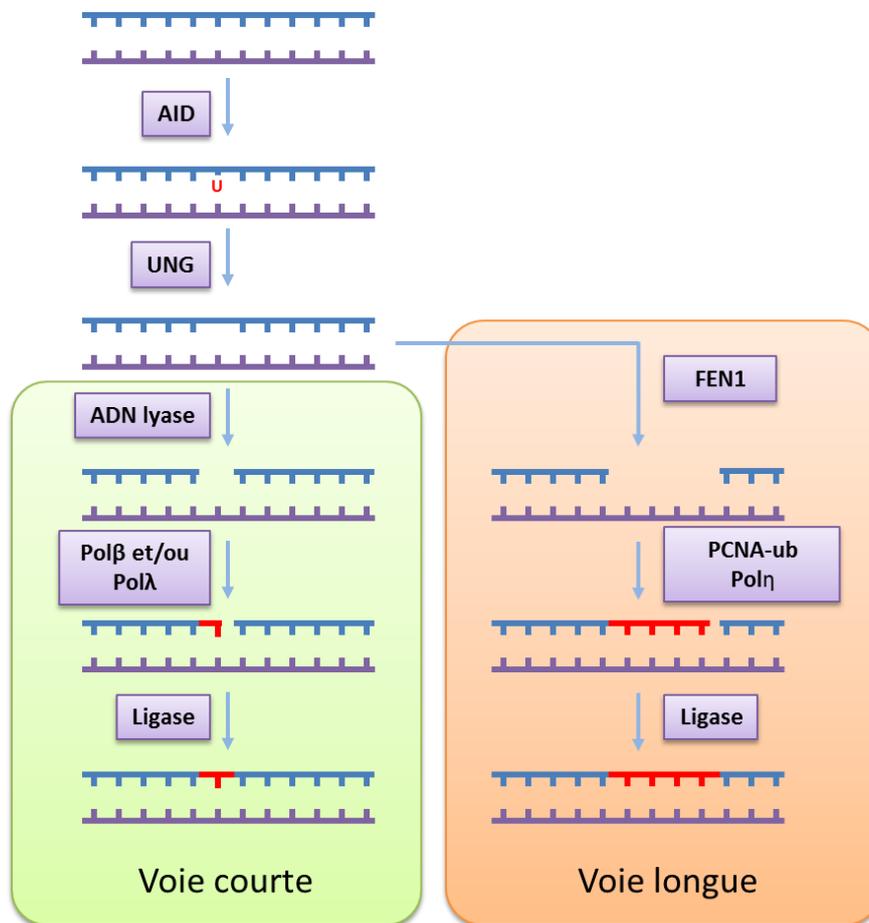
**Figure 15 : Mécanismes par lesquels la cellule corrige les mésappariements induits par AID et les types de mutations que ces derniers permettent.**

#### 2.3.1 Base Excision Repair (BER)

Dans le mécanisme de BER, les bases mutées/altérées de l'ADN sont éliminées par une ADN glycosylase. Dans le cas des mésappariements dus à AID, c'est l'uracil N-glycosylase (UNG) qui est recrutée (Krokan et al., 2002). La particularité d'UNG consiste en sa capacité à se lier tant sur les ADN simple brin que sur les ADN double brins. UNG est de ce fait capable de reconnaître des dU, dU:dG et dU:dA (Zharkov et al., 2010). L'excision de l'uracile crée un site abasique, et cet état intermédiaire peut être pris en charge par des endonucléases (APEs) formant alors des cassures simple brin de l'ADN. Ces cassures pourront à leur tour être prises

en charge par des polymérases non fidèles (BER non classique). Dans la voie courte de BER, l'ADN lyase excise 1 base et dans la voie longue de BER, la 5'-3' exonucléase FEN1 en excise plusieurs (2 à 10 bases) (Alt et al., 2015). La voie courte n'agit que sur la cytosine originellement ciblée par AID. La voie longue de BER participe aux mutations A:T au même titre que la MMR (figure 16).

Si la raison du choix courte/longue voie n'est pas connue, il semblerait que l'utilisation de Pol $\beta$  et/ou Pol $\lambda$  oriente vers la voie courte, et que la présence de PCNA mono-ubiquitylé sur les lésions de l'ADN recrute la Pol $\eta$  et oriente vers la voie longue (Alt et al., 2015; Peled et al., 2008). Le taux d'expression des différents facteurs rentrerait également en jeu lors du choix error-free ou error-prone. Ainsi, la Pol $\beta$ , polymérase de haute-fidélité, est sous régulée dans une lignée cellulaire humaine de type centroblaste (BL2) où les événements de SHM sont très présents (Poltoratsky et al., 2007).



**Figure 16 : Mécanisme de Base Excision Repair (BER) employé de façon « error-prone » dans le processus de SHM.** La voie courte permet une mutation sur la seule cytosine ciblée par AID, la voie longue permet des mutations sur les A:T encadrant la cytosine ciblée par AID.

### 2.3.2 Mismatch Repair (MMR)

Au sein de la cellule, le mécanisme de MMR fait intervenir plusieurs acteurs protéiques afin de réparer les dommages de l'ADN ainsi qu'accroître la fidélité de la réplication de l'ADN (figure 17)(Iyer et al., 2006; Jiricny, 2006). Les mésappariements de l'ADN sont identifiés par les hétérodimères MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$  ; reconnaissance des mésappariements de 1 base de long) et MSH2-MSH3 (MutS $\beta$  ; reconnaissance des mésappariements résultants d'insertions ou de délétions). Suite à la reconnaissance des mésappariements par les hétérodimères, une série d'évènements dépendant d'ATP permettent le recrutement de MLH1 et de PMS2, complexe recrutant les éléments capables de couper un des deux brins d'ADN au niveau du mésappariement (Kadyrov et al., 2006). S'il a par le passé été montré que l'activité catalytique de l'exonucléase 1 (EXO1) est responsable de l'élimination du mésappariement (Peled et al., 2008), des données plus récentes *in vivo* (Schaezlein et al., 2013) indiquent que EXO1 aurait un rôle structural et non catalytique durant la SHM. La place est ensuite faite aux polymérase  $\delta$  et  $\epsilon$  (Pol  $\delta$  et Pol  $\epsilon$ , de haute-fidélité) qui re-synthétisent le bout d'ADN éliminé avant l'intervention de l'ADN ligase I. Du fait de l'activité ATPase des hétérodimères, si ces derniers sentent une trop forte dégradation de l'ADN alors la cellule rentre en voie apoptotique (Lin et al., 2004a; Yang et al., 2004).

Lorsqu'il est utilisé par les centroblastes, ce mécanisme est court-circuité pour devenir error-prone au niveau des mésappariements induits par AID, et est responsable de 50% des mutations totales ainsi que de la plupart des mutations de transversion A:T (figure 17)(Di Noia and Neuberger, 2007; Jungnickel, 2006). La régulation du mécanisme doit donc être très fine : d'une part il est source de nombreuses mutations dans les régions V, et d'autre part il permet le maintien de l'intégrité du génome des centroblasts ayant une haute fréquence de division. Il a ainsi été montré que le complexe MutS $\alpha$  est responsable de la reconnaissance des mésappariements générés par AID, contrairement au complexe MutS $\beta$  qui est dispensable (Roa et al., 2010). Dans des lymphocytes B murins où MLH3 (pouvant s'associer avec PMS2) a été inactivé, la fréquence de mutations sur les gènes des immunoglobulines est augmentée et le spectre de mutations est différent de celui de lymphocytes B sauvages (Li et al., 2006), démontrant une compétition entre MLH1 et MLH3 lors de la formation des complexes agissant sur les gènes des immunoglobulines. La polymérase  $\eta$  (Pol $\eta$ ) a également été décrite comme acteur important dans la création des mutations A:T (Delbos et al., 2007; Zeng et al., 2001) : plus aucune mutations A:T n'est détectable dans des souris double KO pour MSH2 et Pol $\eta$ . D'autres études ont permis la mise en évidence de la coopération de Pol $\eta$  avec d'autres polymérase ( $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\iota$ ) pour l'aider à réparer l'ADN suite à l'action d'AID (Casali et al., 2006; Faili et al., 2002a; Masuda et al., 2007; Zan et al., 2001). Le recrutement de ces polymérase error-prone est rendu possible grâce au PCNA (homotrimère central pour la réplication de l'ADN) lorsque celui-ci a subi une ubiquitylation sur le résidu K164 (Garg and Burgers, 2005; Lehmann et al., 2007; Ulrich, 2006), modification permettant d'activer les mécanismes de réparation de l'ADN. La mono-ubiquitylation de PCNA est réalisée par les ubiquitines ligases Rad6-Rad8. Le niveau de PCNA-Ub est ensuite ajusté *via* l'action de débiquylation d'USP1. L'interaction entre PCNA et les différents facteurs impliqués dans la MMR (MSH3, MSH6, MLH1, EXO1, polymérase) est directe. L'importance de l'ubiquitylation de PCNA a été prouvée dans les cellules DT40 modifiées du poulet (Arakawa et al., 2006; Bachl et al., 2006) et dans les B de souris (Langerak et al., 2007; Roa et al., 2008) : l'incapacité des cellules à exercer cette modification est associée à une diminution de la SHM.

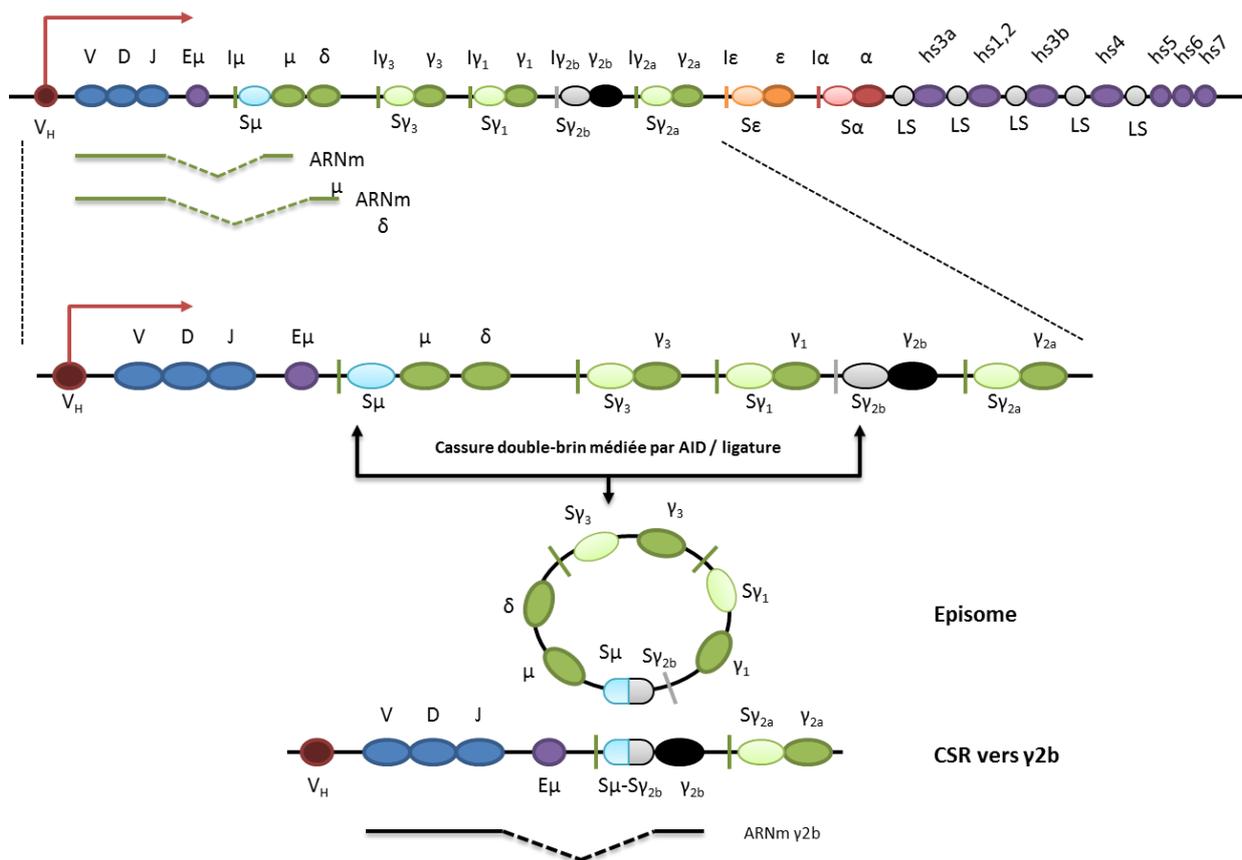


### 3. CSR

Si les régions V des immunoglobulines sont extrêmement variables et sont de fait responsable de la reconnaissance des antigènes, la partie constante, elle, interagit avec les autres composantes du système immunitaire. Chaque région constante définit une classe d'immunoglobuline, et chaque classe a une/des fonction(s) différente(s). La recombinaison de classe (CSR) est le mécanisme par lequel le lymphocyte B va remanier son génome pour changer la classe de ses immunoglobulines et ainsi répondre au mieux à la source antigénique (figure 18).

#### 3.1. Mécanisme général de la CSR

AID va cibler de longues régions répétitives (de 1 à 10 kb), appelée S, situées en amont de chaque région constante (à l'exception de C $\delta$  qui partage la même région S que C $\mu$ ). Durant l'évènement de CSR, la région S $\mu$ , considérée à chaque fois comme région donneuse, va subir l'action d'AID, et par un mécanisme de coupure-ligature, va être fusionnée à une autre région S accepteuse plus en amont (Kataoka et al., 1980). Ces coupures peuvent avoir lieu à de multiples localisations sur les régions S. La région S $\mu$  ayant subi une coupure double brin de l'ADN va être liée à la région S ayant elle aussi été coupée sous l'action d'AID par des voies de réparation de l'ADN que sont la classical non-homologous end-joining (C-NHEJ) mais également l'alternative end-joining (A-EJ). Ces deux systèmes de réparation de l'ADN sont des voies présentes dans tous les types cellulaires. Cette coupure-ligature au niveau du locus IgH aura pour conséquence la délétion totale et définitive de l'information génétique présente entre les deux régions S sous la forme d'un épisode (Matsuoka et al., 1990; von Schwedler et al., 1990) et permet au lymphocyte B d'exprimer une nouvelle classe d'immunoglobuline. De plus, pourvu que la CSR n'ait pas lié S $\mu$  avec S $\epsilon$  (dernier gène constant), de nouveaux évènements de CSR pourront avoir lieu avec les régions S plus en aval.



**Figure 18 : Mécanisme de CSR.** Dans l'exemple présent, une transcription germinale permet à AID de cibler les régions S $\mu$  et S $\gamma$ 2b, provoquant une cassure double brin de l'ADN. La ligature de la partie 5' de S $\mu$  avec la partie 3' de S $\gamma$ 2b permet le changement de classe de l'immunoglobuline IgM vers IgG2b. L'épisome est quant à lui éliminé lors des divisions successives du lymphocyte B.

### 3.2. Ciblage d'AID sur les régions S

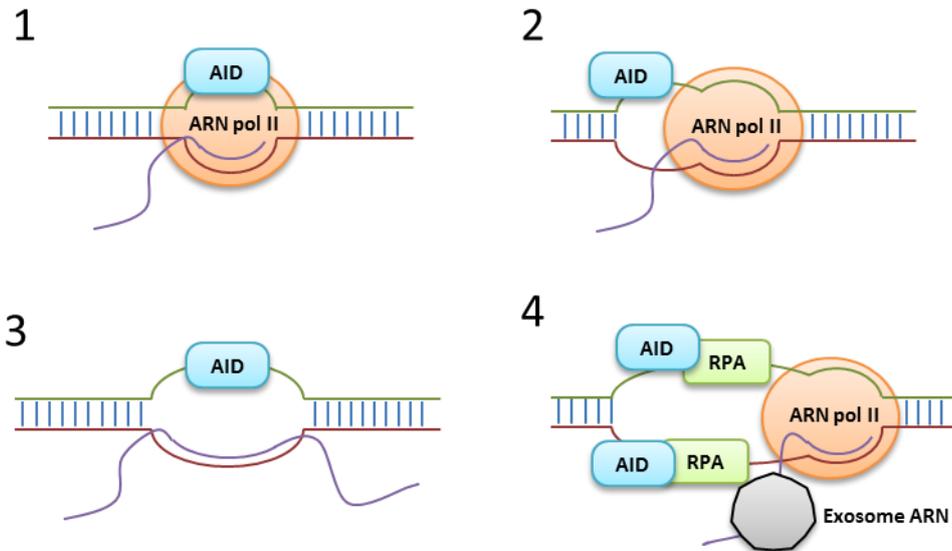
Pour permettre à AID d'exercer son action de coupure de l'ADN, celle-ci doit dans un premier temps avoir accès à la section d'ADN à sectionner. Cette approche est possible grâce à la transcription des régions S (Yancopoulos et al., 1986). Cette transcription permet d'une part d'écartier les obstacles d'AID, comme par exemple la chromatine, et de cibler une région S bien particulière afin de répondre au mieux à l'infection (Manis et al., 2002). Une autre preuve de l'importance de la transcription germinale dans le ciblage d'AID sur les régions S est le fait que AID est associée à l'ARN polymérase II durant la CSR (figure 19-1)(Nambu et al., 2003), présente en plus grande quantité sur les régions S transcrites que sur les régions voisines (Wang et al., 2009). Cette transcription est possible grâce à un promoteur I présent en amont de chaque région S (figure 18). L'unité transcrite est composée du promoteur I et de la région constante, la région S tenant place d'intron. C'est la transcription germinale (Gauchat et al., 1990). En cas de délétion du promoteur I, la CSR sur la région S correspondante ne peut plus avoir lieu (Jung et al., 1993).

Les cytokines régulent l'activité des promoteurs I, et la force des promoteurs régulent le ciblage de la CSR. Ainsi, une stimulation par du CD40/CD40L et IL4 dirigera la CSR vers IgG1 et IgE (Esser and Radbruch, 1989; Gauchat et al., 1990). Une stimulation par de l'IFN- $\gamma$  aboutira à la production d'IgG2a (Collins and Dunnick, 1993) et à des IgA lors d'une stimulation par du

TGF- $\beta$  (Lebman et al., 1990). Du fait de cette activation de la transcription sur une région S ciblée, la CSR a lieu sur les deux allèles du locus IgH (Radbruch et al., 1986). Ainsi, les cellules présentes dans l'environnement du lymphocyte B lors de son activation vont pouvoir diriger la CSR par la sécrétion de cytokines afin d'éliminer au mieux l'antigène. Il a également été montré que l'activité des promoteurs I était accrue sous l'influence de la région régulatrice en 3' du locus IgH. L'élimination partielle des éléments de cette région, à savoir hs3b et hs4, altère sérieusement la CSR sur toutes les régions S du locus, sans autant porter atteinte à la SHM (Pinaud et al., 2001). La délétion complète de la 3'RR elle des effets néfastes sur la CSR comme sur la SHM (Rouaud et al., 2013; Vincent-Fabert et al., 2010). Il a en effet été montré que la 3'RR interagissait de façon physique avec les promoteurs I (Ju et al., 2007, 2011; Pinaud et al., 2011), interaction qui faciliterait le ciblage d'AID (Blagodatski et al., 2009).

AID ayant une action de déamination de l'ADN uniquement sur les simples brins (Chaudhuri et al., 2003; Pham et al., 2003), la transcription des régions S prend une nouvelle fois son sens. En effet, lors de la transcription, 8 à 9 paires de bases de l'ADN sont désappariées, et seul le brin matrice est occupé par l'ARN en cours de synthèse. Le brin d'ADN non-codant est donc libre de subir l'action d'AID (figure 19-2)(Nudler, 2009). De plus, le passage de l'ARN polymérase II a pour conséquence la création de surenroulements négatifs facilitant le déroulement de l'ADN (Liu and Wang, 1987). Les brins non-transcrits sont riches en G, tout comme l'ARN généré. Le couple ARN-ADN matrice est plus stable que le ADN-ADN originel. Cette structure, nommée R-loop et détectée dans les régions S activement transcrites durant la CSR (Kao et al., 2013; Yu et al., 2003), laisse le brin non codant de la région S à l'état de simple brin sur de longues distances, pouvant être ciblé par AID (figure 19-3).

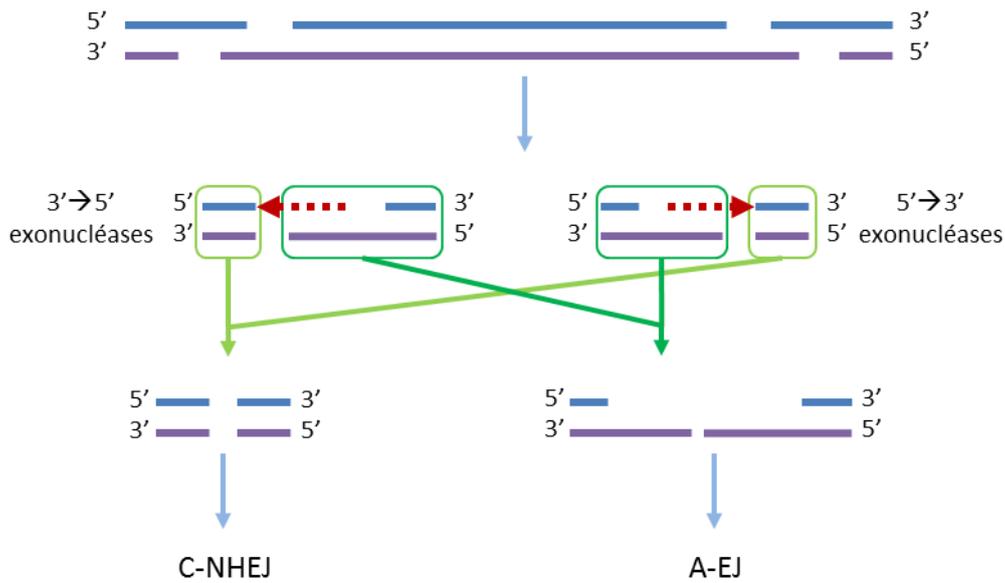
Les régions S sont également très riches en AGCT, un motif très ciblé par AID, ce qui permet de recruter AID s'il n'est pas possible de créer des motifs en R-loop lors de la transcription de la région S (Zarrin et al., 2004). Ainsi, la capacité à former des R-loops accroît le ciblage par AID mais n'est pas indispensable. En effet, il a été montré que la protéine de réplication A (RPA) facilitait la déamination des séquences transcrites ne formant pas de R-loop (Chaudhuri et al., 2004) en accrochant AID si celle-ci est phosphorylée sur sa sérine 38 (figure 19-4). Mais cela n'explique toujours pas comment AID fait pour désaminer le brin matrice, celui-ci étant occupé par l'ARN en cours de synthèse. C'est ici que rentre en jeu l'exosome d'ARN. Le model présenté est le suivant : une fois que l'exosome d'ARN libère la place sur le brin matrice par l'exclusion ou la destruction de l'ARN naissant, RPA lie et stabilise le simple brin d'ADN tout en recrutant AID pour permettre la déamination de l'ADN (Basu et al., 2011).



**Figure 19 : Ciblage d'AID sur les régions S grâce à la transcription.** Le brin non codant est représenté en vert, le brin codant en rouge. Dans le cas 1), AID accède au brin non codant grâce à la bulle de transcription. Dans le cas 2), AID accède au brin non codant grâce aux sur-enroulements négatifs générés après le passage de l'ARN polymérase II. Dans le cas 3), AID accède à l'ADN grâce au motif de R-loop. Dans le cas 4), AID accède à l'ADN grâce à l'action de RPA et de l'exosome à ARN.

### 3.3. Création des cassures double brin

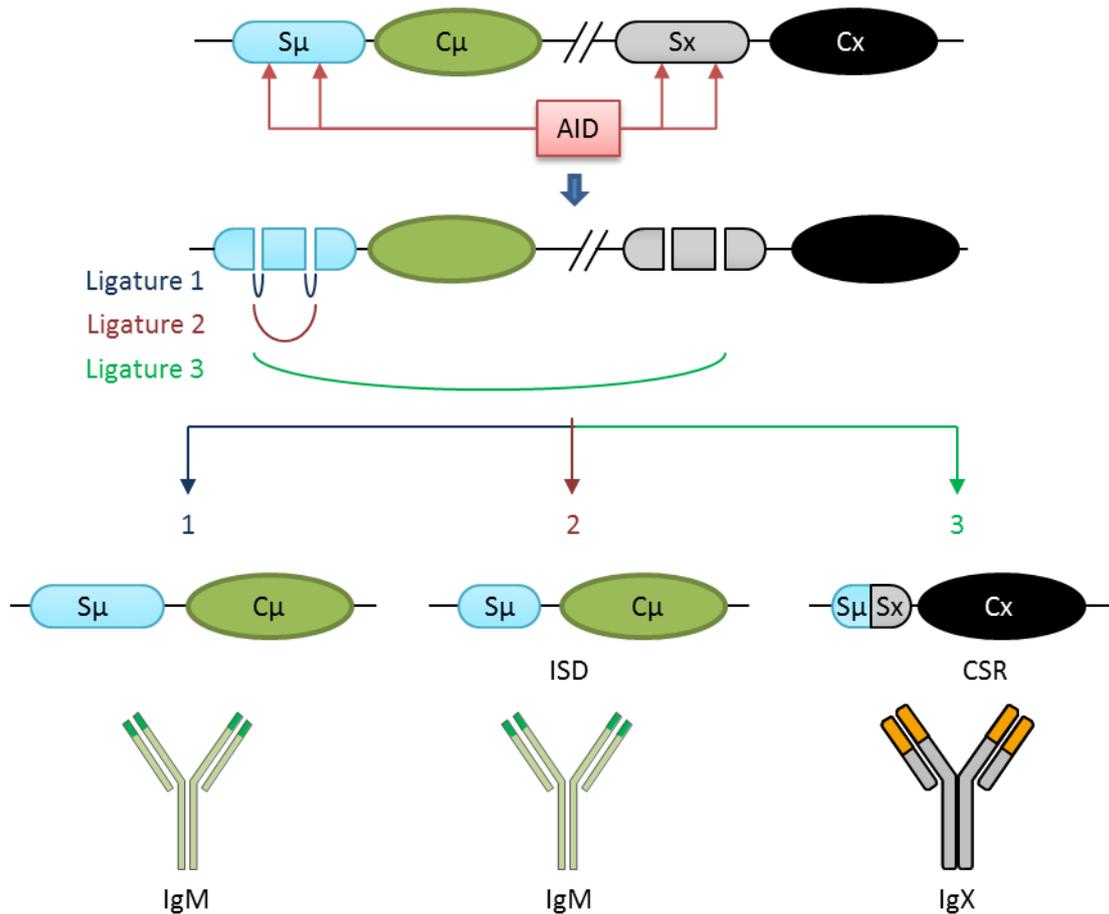
Après l'initiation du processus de CSR par AID, les mésappariements dU:dG sont reconnus par deux mécanismes de réparation de l'ADN vu précédemment dans le cas de la SHM : BER et MMR (Stavnezer et al., 2008). Ces deux mécanismes permettent l'élimination des mésappariements et la création de lésions simple brin de l'ADN. Les exonucléases 5'→3' et 3'→5' exploitent ces lésions et rognent l'ADN jusqu'à la lésion suivante, créant alors des cassures double brin de l'ADN prises en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN (figure 20).



**Figure 20 : Représentation schématique de la formation des cassures double brin de l'ADN lors de la CSR.** Les mésappariements générés par AID sont éliminés, provoquant des cassures simple brin de l'ADN. Des exonucléases 3'→5' et 5'→3' dégradent l'ADN d'une cassure simple brin à l'autre, provoquant des cassures double brin de l'ADN. Ces cassures double brin sont ensuite prises en charge par des mécanismes de réparation de l'ADN adaptés.

### 3.4. Ligature des régions S

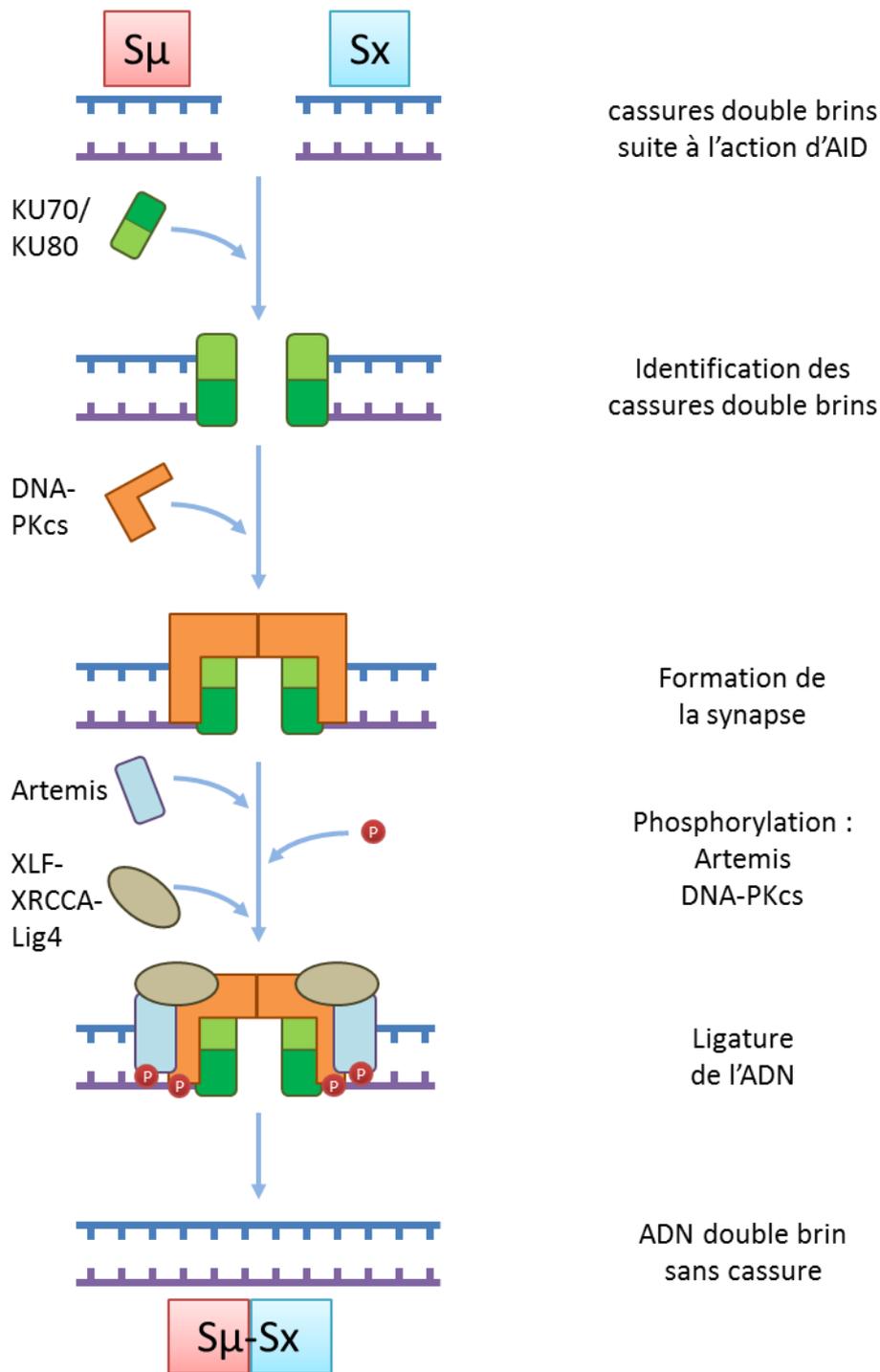
Pour que le lymphocyte B réarrange de façon productive le locus IgH durant la CSR, il faut que la région S $\mu$  ciblée par AID soit reliée à une région S également ciblée par AID située plus en aval sur le locus (figure 21). Cependant, lorsqu'AID cible une région S, il en résulte de nombreuses cassures de l'ADN, et la ligature effectuée peut alors avoir lieu au sein de la même région S. Deux cas sont alors envisageables. Le premier consiste en la ligature sur la même coupure de l'ADN et le second en la ligature de deux coupures différentes sur la région S formant alors une délétion interne (ISD) (Dudley et al., 2002). Les événements de CSR productifs doivent donc être capables de rentrer en compétition avec ces événements de re-ligature et d'ISD. Les deux régions S doivent être rapprochées physiquement pour former une synapse, puis subir l'action d'AID au même moment afin d'être liées ensemble (Wuerffel et al., 2007).



**Figure 21 : Représentation schématique des différentes ligatures de régions S possibles.** La ligature 1 ne provoque aucun changement et la ligature 2 aboutit à un raccourcissement de la région S $\mu$ . La ligature 3 permet le changement de classe de l'immunoglobuline.

### 3.4.1 Classical NonHomologous End-Joining (c-NHEJ)

La première voie identifiée pour la réparation des cassures de l'ADN au niveau des régions S est celle de la Classical NonHomologous End-Joining (C-NHEJ)(figure 22). En effet, les jonctions identifiées présentent peu ou pas de micro-homologies, ce qui est caractéristique des produits de la C-NHEJ (Lieber, 2010). Durant la phase G1 du cycle cellulaire, les sous-unités Ku70 et Ku80 sous forme dimérique identifient les coupures double brins de l'ADN et recrutent la DNA-PKcs, formant ainsi une synapse entre les brins d'ADN à ligaturer. Le recrutement d'Artemis, phosphorylé avec la DNA-PKcs, formant un complexe avec XLF (XRCC4-like complex), XRCC4 (X-ray-repair cross-complementing protein 4) et l'ADN liguase IV (Lig4) permet la ligature des extrémités d'ADN (Downs et al., 2007). Afin d'avoir une C-NHEJ plus efficace, les cassures double brins de l'ADN formées lors de la CSR vont activer une sérine/thréonine protéine kinase appartenant à la super famille des PI3K : ATM (Shiloh, 2003). ATM phosphoryle un grand nombre d'effecteurs protéiques permettant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Alt et al., 2015).



**Figure 22 : Représentation de la Classical NonHomologous End-Joining (c-NHEJ).**

### 3.4.2 Alternative End-Joining (A-EJ)

En cas d'absence de C-NHEJ, la CSR s'effectue toujours mais à 50% de son taux normal, indiquant par-là la présence de mécanismes alternatifs à la ligature des ADN suite à une cassure médiée par AID (Boboila et al., 2012; Deriano and Roth, 2013). Ces mécanismes alternatifs sont regroupés dans la dénomination d'Alternative EndJoining (A-EJ). Si de la même façon que pour la C-NHEJ, l'A-EJ utilise fréquemment les micro-homologies de séquence pour exercer son action de ligature, ces derniers sont plus grands (Yan et al., 2007). Le fait que l'on

retrouve des jonctions réalisées sur de longues micro-homologies dans des modèles capables de C-NHEJ indique que l'A-EJ n'est pas qu'un système de remplacement. Deux A-EJ sortent du lot : (a) l'A-EJ indépendant de Lig4 et (b) l'A-EJ indépendant de KU (Lieber, 2010). Dans le cas (a), la cellule utilise une autre ligase pour compléter l'action d'end-joining. Dans le cas (b), il faut remplacer tout le système de détection des cassures double brin de l'ADN. Il a été proposé que la poly ADP-ribose polymérase 1 (PARP1) soit impliquée en tant que senseur des cassures d'ADN, et que d'autres facteurs comme Mre11, CtIP, Lig1 et Lig3 soient également impliqués pour la formation du complexe de ligature de l'ADN (Alt et al., 2015). Si l'on sait que la C-NHEJ se passe en phase G1 du cycle cellulaire, cette question est pour l'instant sans réponse dans le cas de l'A-EJ.

## Chapitre III : L'apoptose dans les cellules B : *death by neglect* et *Activation induced cell death*

---

L'apoptose joue un rôle central dans les cellules lymphocytaires : une inhibition de l'apoptose conduit au développement de réactions auto-immunes et de lymphomes alors qu'une trop forte apoptose conduit à une immunodéficience. La régulation de la mort des lymphocytes B matures fait par deux voies majeures : « death-by-neglect » qu'on pourrait traduire par « mort par négligence » ou encore par « défaut d'interactions » et la mort induite par l'activation.

### 1. Apoptose durant le développement lymphocytaire

Durant les phases de développement, les lymphocytes doivent passer par divers points de contrôle qui d'une part éliminent les cellules ayant échoué à acquérir un récepteur pour l'antigène fonctionnel, et d'autre part préviennent la génération de cellules anormales. Et de fait, la majorité des lymphocytes en cours de développement sont éliminés. Les réarrangements des gènes d'immunoglobulines, V-D-J sur la chaîne lourde et V-J sur les chaînes légères (pour le BCR chez les lymphocytes B et TCR pour les lymphocytes T), se font aléatoirement de telle sorte que 2 recombinaisons sur 3 ne sont pas dans le cadre de lecture. Les cellules incapables de générer leur pré-récepteur à l'antigène ne reçoivent pas les signaux de survie et d'activation de celui-ci et quittent la voie de différenciation pour se diriger vers celle de l'apoptose (Melchers et al., 2000). Au check-point du pré-BCR, la sélection négative des cellules B ayant échoué dans le remaniement VH-DJH est médiée par BACH2 en passant par la voie apoptotique ARF/TP53 (Swaminathan et al., 2014). Les cellules qui réussissent à former et exprimer un récepteur à l'antigène vont ensuite subir une sélection positive et une sélection négative. Les cellules T dont le récepteur à l'antigène (TCR) n'est pas suffisamment averse pour les molécules du CMH ne bénéficient pas du signal de différenciation et entrent en apoptose. Celles ayant une affinité spontanée très forte pour le CMH sont éliminées par un phénomène de type « activation-induced cell death », qui évite donc l'auto-réactivité forte. Les cellules T interagissant avec le CMH de façon intermédiaire sont sélectionnées positivement (Rathmell and Thompson, 2002). De la façon similaire, les cellules B auto-réactives fixant précocement et de façon excessive les antigènes dès le stade immature font alors face à la sélection négative. On peut donc considérer que lorsqu'une cellule est immature, l'activation de son récepteur à l'antigène va préférentiellement induire la mort et non la prolifération et l'activation. Certaines preuves semblent indiquer que la sélection négative passe par l'induction du récepteur hormonal nucléaire stéroïdien Nur77 *via* Cabin1 et MEF2 (Youn and Liu, 2000) et son inhibition par Notch (Jehn et al., 1999). Nur77 participe à l'apoptose grâce à sa capacité à se transloquer sur les mitochondries et provoquer la libération du cytochrome c (Li et al., 2000). De plus, dans le cas des lymphocytes, la protéine Bim de la famille des protéines BH3 apparentées à Bcl-2 est nécessaire à une bonne sélection négative (Bouillet et al., 2002). Lors de la maturation réussie des pro-B en pré-B, le cluster de micro-ARNs miR17~92 cible BIM au niveau de sa région 3'UTR pour inhiber l'apoptose (Koralov et al., 2008; Ventura et al., 2008). Il est intéressant de noter que ce cluster de miR, et principalement miR19, cible également la protéine PTEN (Mu et al., 2009; Olive et al., 2009).

PTEN est une protéine pro-apoptotique qui cible et inactive PI3K lorsque les concentrations en PIP<sub>2</sub> sont élevées (Heinrich et al., 2015).

En plus des événements de sélection mentionnés ci-dessus, les lymphocytes ont besoin de signaux provenant des récepteurs de cytokines pour survivre (Baird et al., 1999). Les récepteurs qui possèdent la chaîne commune  $\gamma$  ainsi que la kinase Jak3 associée à cette chaîne semblent jouer un rôle très important : leur absence provoque une immunodéficience sévère touchant seulement les lymphocytes T chez l'Homme, et les lymphocytes T et B chez la souris. La chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'interleukine 7 (IL-7R $\alpha$ ) est également importante pour que le développement lymphocytaire puisse se dérouler normalement (Puel et al., 1998).

Il est également admis que les facteurs de transcription de la famille FoxO (FoxO1, FoxO3a, FoxO4, FoxO6) régulent négativement la survie des cellules. En effet, les membres de cette famille induisent d'une part les facteurs pro-apoptotiques p53, BIM et le ligand du récepteur de mort Fas (FasL). D'autre part, ils répriment l'expression de la cycline D, indispensable pour l'entrée dans le cycle cellulaire (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2002; van der Vos and Coffey, 2011).

## 2. Rôle de l'apoptose dans le maintien de l'immunité périphérique

Le nombre de lymphocytes est finement régulé, et malgré la prolifération (burst) lors d'une réponse immune, ce nombre reste constant. Les nouvelles cellules B issues de la moelle (et du thymus pour les lymphocytes T) remplacent donc les mortes en réalisant une certaine homéostasie de ces compartiments cellulaires. Les lymphocytes re-circulants ont une durée de vie quelques mois *in vivo*, et d'environ un jour en *in vitro*. Cette différence démontre l'absolue nécessité des signaux extrinsèques distribués par les cellules des niches pour la survie des lymphocytes (Rathmell and Thompson, 2002).

Le premier signal critique pour la survie des lymphocytes est celui provenant du récepteur à l'antigène. Les cellules T semblent avoir besoin d'interactions de faible affinité continues entre leur TCR et les complexes CMH même en l'absence d'antigènes (Marrack et al., 2000) et la délétion conditionnelle de la chaîne  $\alpha$  du TCR diminue la durée de vie des cellules T (Polic et al., 2001). En l'absence d'une stimulation antigénique, un signal tonique semble être transmis depuis le BCR permettant ainsi à la cellule B de survivre. L'élimination conditionnelle du BCR provoque une rapide élimination des lymphocytes B (Lam et al., 1997). De même, en l'absence de BAFF ou de son récepteur BAFFR, le nombre de B de la zone marginale et folliculaire est grandement diminué (Rolink et al., 2002; Schneider et al., 2001)(Rauch et al., 2009).

Les cytokines jouent également un rôle important en apportant des signaux extrinsèques permettant la survie des lymphocytes. Sans ces signaux, les lymphocytes meurent par « négligence » *i.e.* par manque d'interactions.

### 3. Régulation de la capacité à entrer en apoptose durant la réponse immune

Lors d'une réponse immune, les lymphocytes spécifiques pour l'antigène prolifèrent et il est vital que cette prolifération soit maîtrisée afin qu'aucune cellule auto-réactive ne voit le jour. La première contrainte qui assure que seuls les lymphocytes spécifiques de l'antigène soient activés et prolifèrent est la nécessité d'une co-stimulation. Lorsque la co-stimulation est absente ou insuffisante, les lymphocytes ne s'activent pas et meurent (Burr et al., 2001). La co-stimulation chez la cellule B passe par les TLRs, le complexe CD19/CD21 et CD40. Les signaux issus de cette co-stimulation sont de forts inducteurs de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et accroissent la production de cytokines qui favorisent l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire.

Les récepteurs de la famille des TNF (tumor necrosis factor) dont fait partie Fas jouent également un rôle important dans la prolifération et la survie des lymphocytes : l'absence de ne serait-ce que d'un seul des récepteurs de cette famille peut permettre un développement lymphoïde incontrôlé et des maladies auto-immunes ou des lymphomes (Krammer, 2000).

Suite à l'activation du lymphocyte B par l'antigène, celui-ci devient plus sensible à la mort cellulaire (Berard et al., 1999), suggérant que le programme d'activation cellulaire prépare également les cellules à la mort lors de la fin de la réponse immune. Cette élimination peut se faire suite à une négligence cellulaire ou être ordonnée. La mort sur commande passant par Fas peut permettre d'éliminer les cellules générées lors d'une réponse immune antérieure afin de libérer la place pour une nouvelle réponse immune (Rathmell and Thompson, 2002), et d'autres cellules mourraient par manque de signaux activateurs extérieurs après la clearance de l'antigène pour lequel elles répondent (Marrack et al., 2000).

#### 3.1. Mort par négligence

Les cellules qui meurent car elles n'ont pas accès aux signaux extérieurs permettant leur survie (cytokines, interactions cellulaires) sont dites négligées. C'est le cas des lymphocytes n'ayant pas généré de récepteur à l'antigène dans le cadre correct de lecture, de ceux qui ne sont pas arrivés au bon endroit ou qui ne sont pas capable de concourir pour l'activation par les cytokines ou l'antigène. Sont aussi concernés les lymphocytes B dont l'affinité du récepteur à l'antigène a diminué après l'évènement de SHM. Les lymphocytes activés peuvent également mourir par défaut d'interactions une fois toutes les cytokines et antigènes éliminés à la fin de la réaction immune. C'est donc une absence de signal et non pas un signal de mort qui provoque alors la mort des cellules. La mort cellulaire survient après la perte de l'intégrité des mitochondries (Rathmell and Thompson, 2002) et celle-ci peut se faire de plusieurs manières. En l'absence des signaux d'activation extrinsèques, les cellules s'atrophient. Leur taille et leur contenu protéique diminuent (Rathmell et al., 2000) et elles perdent leur ATP cellulaire (Vander Heiden et al., 1999; Whetton and Dexter, 1983). De plus, l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules négligées est retardée, probablement par manque d'énergie (Rathmell et al., 2000) et une caractéristique des cellules négligées (de quelque type cellulaire que ce soit), est la réduction du métabolisme du glucose. Cette baisse de régime est en partie due à la down-régulation de l'hexokinase et de la phosphofructokinase (Granziero et al., 2001; Vander Heiden et al., 2001) ainsi qu'à la perte du transporteur de glucose Glut1 (Rathmell et al., 2000). D'autres évènements comme une diminution du potentiel redox et l'incapacité à réguler la génération et l'activité des ROS (espèce oxygénée réactive) peuvent avoir lieu dans les cellules négligées. Tous ces évènements font que les mitochondries

souffrent de dommages irrémédiables et vident dans le cytoplasme le contenu de leur l'espace inter-membranaire, à savoir le cytochrome c pro-apoptotique, AIF (facteur d'induction d'apoptose), SMAC/DIABLO, l'endonucléase G et Omi/Htra2 (Li et al., 2001; Matsuyama and Reed, 2000; Suzuki et al., 2001). Dans le cytoplasme, le cytochrome c va activer les caspases qui vont initier les cascades protéolytiques. Cependant, les caspases ne sont pas indispensables pour l'apoptose des cellules négligées, leur inhibition ne permet pas de sauver les cellules (Hildeman et al., 1999; McCarthy et al., 1997; Xiang et al., 1996). C'est donc les dommages mitochondriaux, la perte de la phosphorylation oxydative, la diminution du taux d'ATP et du potentiel redox qui sont responsables de la mort des cellules négligées.

En revanche, la molécule anti-apoptotique Bcl-2 est capable de protéger la cellule de la mort par négligence en empêchant la production de ROS et en protégeant la mitochondrie (Desagher and Martinou, 2000). Cependant, Bcl-2 et son homologue Bcl-xL ne sont pas capables de contrer l'atrophie cellulaire qui accompagne les cellules négligées (Rathmell et al., 2000). Les lymphocytes négligés maintenus en vie par Bcl-xL sont plus petits, ont moins d'ATP, font beaucoup moins de glycolyse et sont lents à entrer dans le cycle cellulaire après une stimulation au mitogène. La capacité des membres de la famille de Bcl-2 à contrôler l'intégrité mitochondriale est contrôlée par les protéines de la famille BH3. Dans les cellules saines, les protéines de cette famille, Bad-Bim-Bax, sont soit séquestrées sous une forme inactive soit inexprimées. Dans les cellules négligées, elles sont induites ou activées.

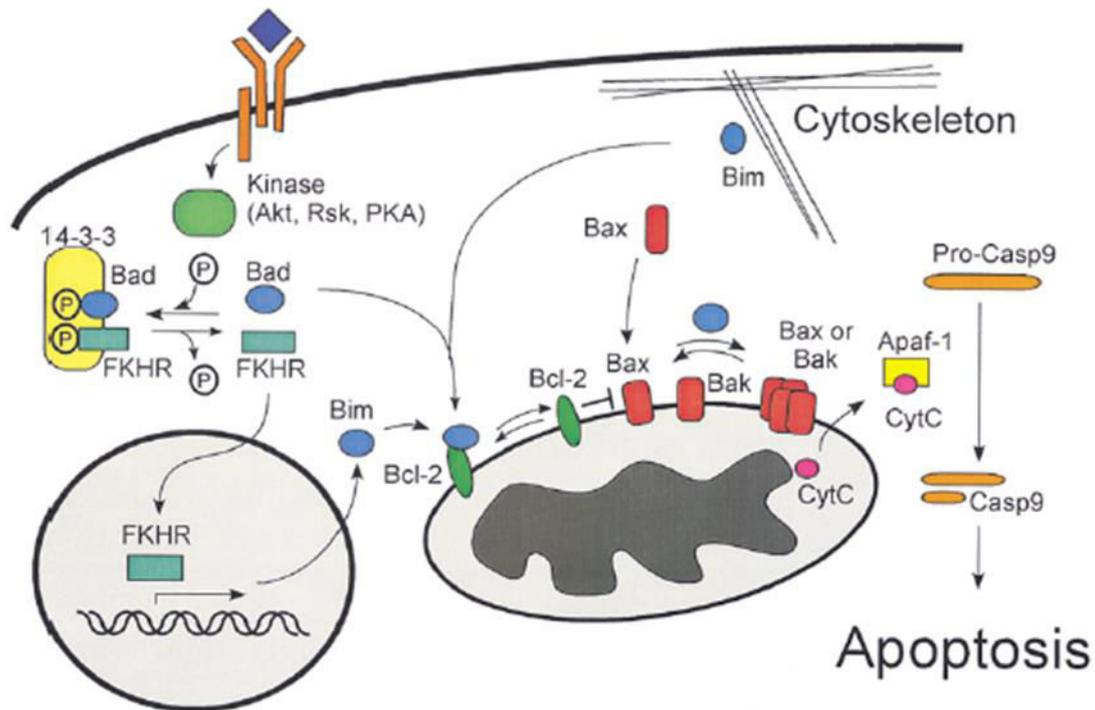
Bad est régulée par les cytokines. Lors celles-ci sont présentes dans le micro-environnement de la cellule, Bad est phosphorylée par des kinases telles qu'Akt, PKA et Rsk et est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (Huang and Strasser, 2000). Dès lors que la cellule est privée de cytokines, Bad est déphosphorylé et migre vers la membrane de la mitochondrie où il lie et inactive Bcl-2 (Li et al., 2004).

Bim est produite sous trois formes différentes par épissage alternatif Bim<sub>EL</sub>, Bim<sub>L</sub> et Bim<sub>S</sub> (O'Connor et al., 1998). Ces trois formes provoquent l'apoptose, mais Bim<sub>S</sub> qui est pro-apoptotique de façon constitutive est la plus puissante des trois. Bim<sub>L</sub> et Bim<sub>EL</sub> peuvent être exprimées dans les cellules saines et les lymphocytes au repos. Dans ce cas, elles sont liées au cytosquelette (Puthalakath et al., 1999). Les modèles murins Bim<sup>-/-</sup> présentent des hyperplasies lymphoïdes ainsi qu'une résistance à la mort par négligence (Bouillet et al., 1999). De plus, Bim régule la mort cellulaire pour des types de cellules autres que lymphocytaires (Bouillet et al., 2001). Pour jouer son rôle pro-apoptotique, Bim doit être localisé au niveau de la membrane intracellulaire pour réguler Bcl-2 et Bcl-xL, et ce par deux mécanismes. Lors de stimuli apoptotiques, Bim<sub>L</sub> et Bim<sub>EL</sub> sont libérées du cytosquelette, migrent vers les mitochondries et lient Bcl-2 (Puthalakath et al., 1999). Lorsque les cellules sont choyées, Akt phosphoryle et séquestre les facteurs de transcription de type Forkhead. Lorsque qu'elles deviennent négligées, Akt devient inactive, les facteurs de transcription de type Forkhead sont déphosphorylés, migrent dans le noyau et activent la transcription de plusieurs gènes dont Bim (Dijkers et al., 2000; Shinjyo et al., 2001). Il a été montré que le nématode *Caenorhabditis elegans* induit la transcription de gènes dépendants des facteurs de transcription de type Forkhead lorsque la nourriture vient à manquer afin de faire baisser son métabolisme et de survivre dans des conditions de famine (Vanfleteren and Braeckman, 1999). Ainsi, les cellules de vertébrés répondraient à un état de réduction métabolique et d'atrophie par l'apoptose.

Bax et Bak, deux homologues de Bcl-2, sont tous deux largement exprimés et promeuvent la mort des lymphocytes *in vitro* comme *in vivo* (Brady et al., 1996) en portant atteinte à l'intégrité mitochondriale. Dans les cellules saines, Bax est localisé dans le cytoplasme. Il migre vers les mitochondries sous l'influence des signaux apoptotiques tels que l'atrophie ou une

forte diminution du métabolisme caractéristique des cellules négligées (Gross et al., 1998; Nechushtan et al., 1999). L'activation de Bax semble être due à un changement de conformation de la molécule (Nechushtan et al., 1999) qui survient lorsque les cellules lymphoïdes sont privées de stimulation par les cytokines, de glucose ou encore qu'elles sont traitées avec du TNF $\alpha$  (Perez and White, 2000; Vander Heiden et al., 2001). En réponse à une stimulation apoptotique, Bak peut former des homo-oligomères et former des complexes avec Bcl-2 et Bcl-xL au niveau de la mitochondrie (Wei et al., 2001). C'est l'action conjointe de Bax et de Bak qui joue un rôle dans le développement et le maintien de l'homéostasie cellulaire (Lindsten et al., 2000). Dans les modèles déficients pour Bax et Bak, les souris ont un plus grand nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle et un nombre plus important de globules blancs circulant dans le sang. La rate et les ganglions lymphatiques sont plus gros d'un facteur 30 et accumulent des lymphocytes T et B qui expriment des marqueurs associés aux cellules mémoires. Ces souris développent également des infiltras lymphocytaires dans les organes tels que le foie et les reins. Si les lymphocytes sont toujours sensibles à la mort induite par les récepteurs de mort, ils sont résistants aux morts qui passent par la mitochondrie. De plus, l'induction de Bid, Bad et Bim ne permet pas de tuer les cellules Bax-/-Bad-/- (Cheng et al., 2001; Wei et al., 2001; Zong et al., 2001).

Ces informations indiquent comment les protéines des familles Bcl-2 et BH3 régulent l'intégrité de la mitochondrie dans les cellules immunitaires (figure 23). En premier lieu, les protéines Bax et Bak de la famille des BH3 sont nécessaires lors de l'induction de la mort cellulaire. En effet, l'inhibition de la protéine Bim, qui est la plus représentée de la famille BH3 dans la cellule, ne protège que partiellement de la mort lorsque les cellules sont négligées. En revanche, la double inhibition de Bax et Bak protège complètement de l'apoptose dans les mêmes conditions. Ensuite, Bad et Bim n'interagiraient pas avec Bax et Bak mais provoqueraient l'apoptose en liant et inhibant Bcl-2 et Bcl-xL. Le rôle de Bcl-2 et Bcl-xL dans le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie se ferait alors par l'inhibition de Bax et de Bak qui semblent jouer un rôle redondant dans la perturbation de l'intégrité mitochondriale (Rathmell and Thompson, 2002).



**Figure 23 : Régulation de l'intégrité mitochondriale par les molécules de la famille Bcl-2 et BH3.** Sous l'influence de signaux extrinsèques, BAD et FKHR sont phosphorylés et séquestrés par 14-3-3, BIM est lié au cytosquelette et BAX est cytoplasmique. Sans les signaux extrinsèques, BAD, FKHR et BIM sont libérés. FKHR migre dans le noyau et active la transcription de gènes dont celui codant pour BIM, BIM et BAD lient BCL-2 et BCL-xL sur la mitochondrie. BAX change de configuration et migre vers les mitochondries où il n'est plus inhibé par BCL-2 pour provoquer l'apoptose. L'expression de BAX ou BAK est nécessaire pour la libération du cytochrome c (Rathmell and Thompson, 2002).

### 3.2. Mort par induction : rôle du récepteur FAS

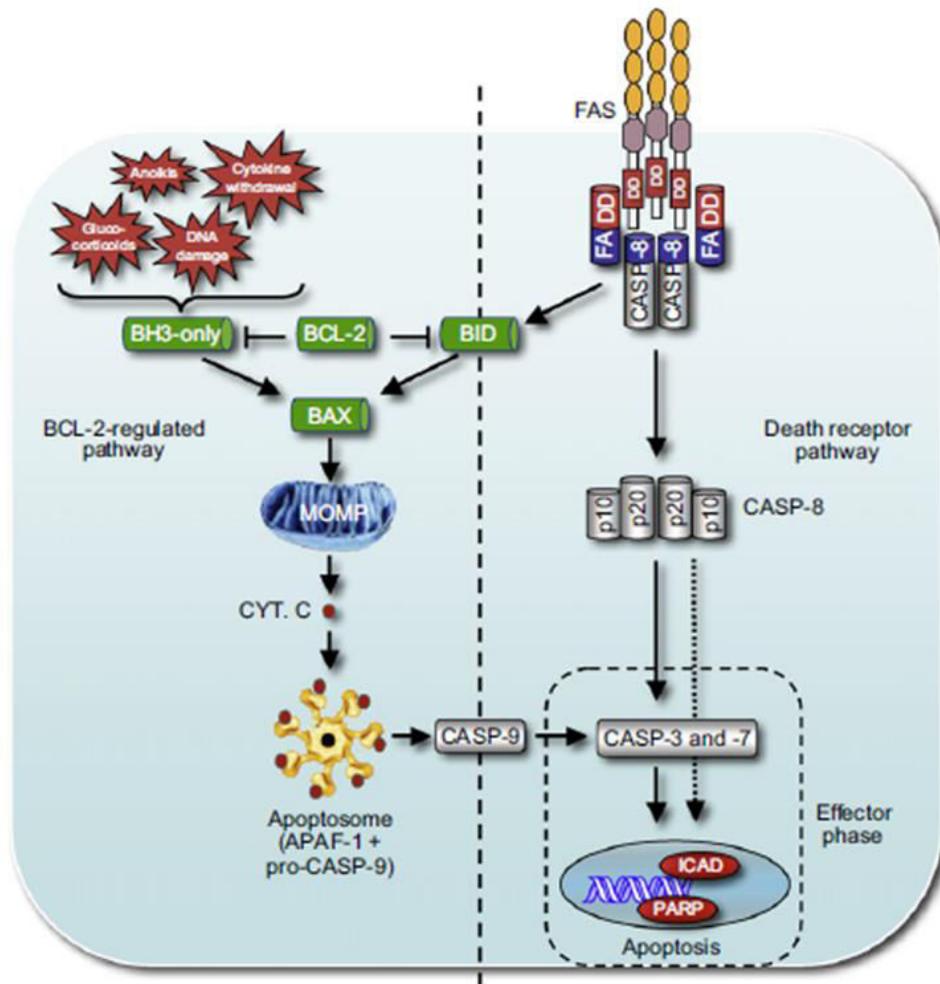
#### 3.2.1 Mécanisme d'induction de l'apoptose par FAS

Le récepteur FAS appartient au groupe des TNF-R (tumor necrosis factor receptor) qui possèdent tous un domaine de mort (DD) intracellulaire. Le ligand physiologique de FAS est FASL et leur interaction provoque l'apoptose de la cellule (Krammer, 2000; Nagata, 1997). Il a en effet été montré que les lymphocytes T cytotoxiques, qui expriment FASL à leur surface, sont capables de tuer les cellules FAS+, et cette action meurtrière est neutralisée lors de l'utilisation d'un anticorps anti-FASL. Un problème dans la signalisation FASL-FAS résultant de mutations dans les gènes codant pour FAS et FASL provoque chez l'Homme et la souris des lymphadénopathies et des maladies auto-immunes (Krammer, 2000; Nagata, 1997; Strasser et al., 2009). Des études biochimiques ont montré que la reconnaissance de FAS provoque l'assemblage rapide d'un complexe intracellulaire, le DISC (death-inducing signaling complex) (Kischkel et al., 1995). Ce complexe est formé de la caspase 8 (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996), de son adaptateur/activateur FADD (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995) et de son modulateur/inhibiteur c-FLIP (Irmler et al., 1997). L'interaction entre FAS et FADD se fait par leur domaine commun DD (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995) et le recrutement de la caspase 8 par FADD est réalisée via les domaines DED (death effector domains) présent

sur chacune des protéines (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Des études ont montré que l'activation de l'activité protéolytique de la caspase 8 par FADD est essentielle pour induire l'apoptose médiée par FAS dans la lignée lymphoïde, *in vitro* comme *in vivo* (Kang et al., 2004, 2008; Salmena et al., 2003; Varfolomeev et al., 1998). L'activation de la caspase 8 par le complexe DISC se fait en deux étapes. Tout d'abord, le recrutement de FADD au niveau de la région intracellulaire de FAS provoque la dimérisation et le changement conformationnel de la caspase 8 au sein du complexe, lui permettant d'acquérir son activité enzymatique (Boatright et al., 2003). L'enzyme active va s'auto-protéolyser, se décrocher du DISC et va alors avoir accès à ses substrats dans les différents compartiments cellulaires (Boatright et al., 2003). Dans les lignées lymphoïdes, la capacité de la caspase 8 à être son propre substrat est essentielle pour le phénomène d'apoptose induite par FAS (Kang et al., 2008). Parmi les substrats de la caspase 8 se trouvent des activateurs d'autres caspases, comme par exemple ceux des caspases 3 et 7, mais il se peut également que l'action de la caspase 8 sur certains éléments de la cellule soit suffisante pour provoquer l'apoptose. Au final, les caspases lysent les protéines vitales à la survie cellulaire, comme les composantes structurales que sont les lamines et les gelsolines, et peuvent même activer des mécanismes de dégradation des composantes non-protéiques de la cellule (Salvesen and Dixit, 1997).

La protéine c-FLIP, qui tout comme la caspase 8 possède un domaine DED mais n'a pas d'activité protéolytique, module l'apoptose induite par FAS en fonction de son taux d'expression. A faible concentration de c-FLIP, l'activité de la caspase 8 est accrue, et à haute concentration, c-FLIP réduit l'activité de la caspase 8, probablement en entrant en compétition avec cette dernière pour lier FADD (Boatright et al., 2003).

L'un des substrats les plus importants de la caspase 8 est la protéine BID de la famille des BH3. En subissant l'action protéolytique, BID est activée sous sa forme tronquée tBID. tBID migre vers la membrane mitochondriale et va exercer son action apoptotique (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Cette action de la caspase 8 sur BID est essentielle pour l'apoptose induite par FAS dans plusieurs types cellulaires, à savoir les hépatocytes (Kaufmann et al., 2007; Yin et al., 1999), les cellules  $\beta$  du pancréas (McKenzie et al., 2008), mais n'est pas indispensable pour l'apoptose induite par FAS dans les cellules lymphoïdes (Kaufmann et al., 2007, 2009). Les raisons de ces différences entre la signalisation de l'apoptose induite par FAS dans les cellules de type 1 (comme les lymphocytes) et les cellules de type 2 (comme les hépatocytes) pourraient être dues à des différences dans l'agrégation de FAS, dans l'internalisation, dans l'étendue de l'activation de la caspase ou encore la quantité minimale de protéines à lyser pour provoquer la mort cellulaire (Strasser et al., 2009).



**Figure 24 : Signalisation apoptotique médiée par l'induction de FAS et les protéines régulées par Bcl-2.** Sont indiquées les deux voies distinctes mais complémentaires de l'apoptose dans les cellules de mammifères. L'activation de FAS de la famille des TNF-R transmet le signal à FADD qui active la caspase 8. L'autolyse de la caspase 8 provoque la formation d'une protéine hétérotétramérique capable d'activer les effecteurs des caspases 3 et 7, provoquant le démantèlement de protéines vitales. La caspase 8 active également la protéine BID qui participe à la perméabilisation de la mitochondrie et à la libération du cytochrome c, activateur de la caspase 9 (Strasser et al., 2009).

### 3.2.2 Rôle de FAS dans l'apoptose des lymphocytes

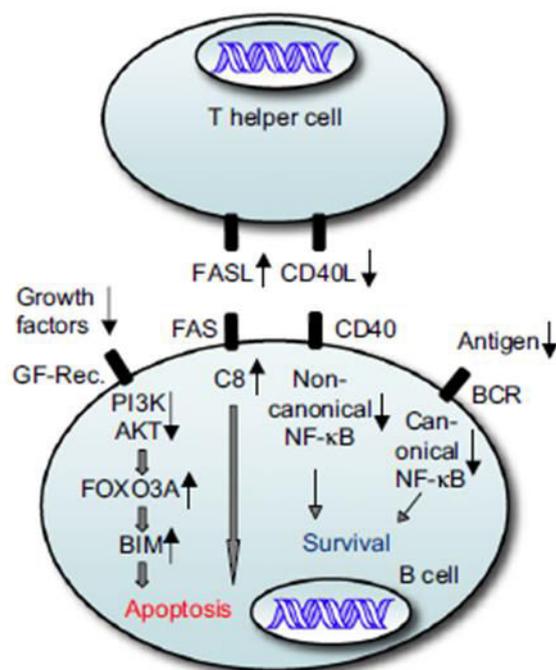
Les modèles murins déficients pour FAS ou FASL ont des lymphadénopathies progressives et accumulent les lymphocytes T et B (Krammer, 2000; Nagata, 1997). La conclusion selon laquelle la signalisation dépendante de FAS-FASL joue un rôle critique dans l'homéostasie du système lymphoïde en éliminant les cellules indésirables lors de checkpoints s'impose d'elle-même. L'hypothèse selon laquelle l'apoptose induite par FAS serait critique pour l'élimination lymphocytes B immature auto-réactifs dans la moelle (de même pour les thymocytes) a même été posée (Strasser et al., 2009). Seulement, des expériences plus définitives ont montré en utilisant des modèles transgéniques de souris pour le BCR et le TCR que l'apoptose médiée par FAS n'est pas indispensable pour l'élimination des lymphocytes auto-réactifs (Rubio et al., 1996; Sidman et al., 1992).

Chez les lymphocytes T, l'induction de l'apoptose par FAS nécessite une stimulation par le TCR. Or durant la phase terminale de la réponse immune, les cellules T meurent après l'élimination des antigènes, il n'y a donc plus de stimulation du TCR. L'apoptose induite par FAS va plutôt prouver son utilité dans le cas de réponses immunes chroniques, où les lymphocytes T d'ores et déjà activés sont stimulés de façon répétée par leur TCR. Les conséquences sont alors une sur-régulation de FAS et une mort apoptotique ou fratricide médiée par FAS (Strasser et al., 2009). Cependant, la protéine BIM de la famille des protéines BH3 est également requise dans l'apoptose des lymphocytes T lors d'une réponse immune chronique (Hughes et al., 2008; Hutcheson et al., 2008; Weant et al., 2008). Le suicide des cellules T est donc médié par FAS, grâce à une stimulation répétée des TCR, et par BIM.

Les lymphocytes B expriment le récepteur FAS à leur surface et peuvent être tués lors d'un traitement par du FASL ou des anticorps agonistes spécifiques de FAS (Krammer, 2000; Nagata, 1997). Les conséquences de l'activation de FAS chez les lymphocytes B sont très fortement influencées par l'activité des autres voies de signalisation de la cellule. Ainsi, une activation du BCR ou une stimulation par le CD40 protègent de l'apoptose induite par FAS, et c'est encore plus particulièrement vrai quand le BCR et le CD40 sont activés en même temps (figure 25)(Rothstein et al., 1995). Cette protection semble être permise grâce à l'activation des facteurs de transcription REL de la voie NF- $\kappa$ B qui activent l'expression de c-FLIP (Hennino et al., 2001). De plus, sous l'action combinée de BCR et CD40 activés, l'activation de FAS pourrait contribuer à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Strasser et al., 2009). Lors de la réaction du centre germinatif, FAS et FASL ont également leur rôle à jouer dans la survie des lymphocytes B (Krammer, 2000; Nagata, 1997). Les lymphocytes B dont le BCR n'est pas assez spécifique pour l'antigène sont éliminés lorsque l'interaction FAS-FASL avec les lymphocytes T est plus forte que les signaux de survie transmis par le BCR et le CD40. Dans cette apoptose, en plus de la mort médiée par FAS, les protéines de la famille des BH3 participent en dérégulant Bcl-2 (Rathmell et al., 1995). En faveur de la collaboration entre les deux voies apoptotiques, il a été montré que lors d'une surexpression de Bcl-2 (Strasser et al., 1995) ou une perte de BIM (Hughes et al., 2008; Hutcheson et al., 2008; Weant et al., 2008) dans des souris déficientes pour FAS ou FASL accélère et potentialise l'apparition d'auto-immunité et de lymphadénopathies.

Il a également été récemment montré que l'apoptose médiée par FAS était associée la production de cytokines et de chémokines, dont IL-6, IL-8, CXCL1, MCP-1 et GM-CSF. MCP-1 et IL-8 orientent les cellules phagocytaires vers les cellules apoptotiques, et serviraient donc de signal « par ici ». La stimulation de FAS promeut en outre la sécrétion de facteurs et de protéines qui peuvent influencer la réponse immune contre les cellules mourantes (Cullen et al., 2013).

Ainsi, si l'apoptose médiée par FAS ne joue aucun rôle dans l'élimination des lymphocytes T et B durant leur développement, elle est par contre cruciale, seule ou en binôme avec la voie des protéines de la famille des BH3, lors de l'élimination des lymphocytes activés durant une réponse immune.



**Figure 25 : Signal apoptotique médié par FAS dans les lymphocytes B activés.** FAS présent à la surface des lymphocytes B peut être induit par FASL présent à la surface des T<sub>FH</sub>. Ce signal provoque l'apoptose lorsque les signaux reçus par le CD40 et le BCR sont plus faibles, ce qui est le cas quand les lymphocytes B activés ne sont pas assez affins pour l'antigène et ne sont pas sélectionnés par les T<sub>FH</sub>. Une réduction quantitative des facteurs de croissance reçus provoque une sur-régulation de BIM ce qui potentialise l'apoptose. Les flèches noires dirigées vers le haut indiquent une sur-régulation des éléments correspondants, et les flèches noires dirigées vers le bas une sous-régulation (Strasser et al., 2009).

### 3.2.3 Activité non-apoptotique des récepteurs de la famille des TNF-R

Certains membres de la famille des TNF-R et leurs ligands exercent une activité non-apoptotique (activation, prolifération, différenciation ou encore migration cellulaire...), soit exclusive soit en surplus de leur fonction de récepteur de mort (Krammer, 2000; Nagata, 1997). C'est le cas du récepteur FAS où plusieurs études ont identifié des fonctions non-apoptotiques de différentes natures en fonction du type cellulaire : facteur de croissance pour les fibroblastes, facteur de maturation pour les cellules dendritiques, régénération accélérée du foie (Strasser et al., 2009). Les mécanismes par lesquels FAS stimule la prolifération et/ou l'activation cellulaire impliqueraient les voies de signalisation des MAP kinases et de REL/NF-κB (Peter et al., 2007). Il a également été montré que FADD joue un rôle important dans la prolifération des lymphocytes B induite par les TLRs (Pellegrini et al., 2005).

En fonction du type de signal voulu (activateur ou apoptotique), FADD et la caspase 8 doivent subir des modifications post-traductionnelles différentes et doivent être localisées dans différents sous compartiments cellulaires (O'Reilly et al., 2004). Ainsi, il a été démontré que la présence d'un acide aminé de FADD est indispensable pour l'action de prolifération cellulaire mais n'a aucun rôle dans l'action apoptotique (Hua et al., 2003). Il a également été montré chez les lymphocytes T que sous l'influence d'un signal apoptotique médié par FAS, la caspase 8 est présente en grande quantité dans le cytoplasme, alors qu'elle est présente en plus petite

quantité et est concentrée dans des foyers à la membrane plasmique lorsque FAS produit des signaux de prolifération (Koenig et al., 2008).

#### 4. Le cas particulier du BCR à IgE

Chez les mammifères, la réponse IgE intervient contre les pathogènes et les toxines (Marichal et al., 2013; Palm et al., 2013) mais provoque également des allergies sévères. Il est donc crucial pour l'organisme de contrôler la réponse immune IgE et de limiter la production d'IgE circulantes. *In vitro*, les cellules changent massivement de classe vers IgE sous l'influence de l'IL4 (Anand et al., 1997; Coffman et al., 1986), alors que les lymphocytes B IgE<sup>+</sup> sont rares *in vivo* et l'expression du BCR IgE est faible (Karnowski et al., 2006). Pour expliquer cette faible fréquence des lymphocytes B IgE<sup>+</sup>, il a été suggéré que l'activation des caspases dans les cellules IgE<sup>+</sup> est plus forte que pour les cellules IgG<sup>+</sup> au sein du centre germinatif (He et al., 2013; Talay et al., 2012). Il a également été proposé que les lymphocytes B IgE<sup>+</sup> disparaissent rapidement lors d'une différenciation accélérée en plasmocytes et sont plus apoptotiques et moins mobiles que les cellules IgG<sup>+</sup> (Yang et al., 2012), et il a été montré que l'activation d'une IgE membranaire transfectée induit l'apoptose (Poggianella et al., 2006). Ces explications ne sont pas mutuellement exclusives. Les lymphocytes B possédant un BCR IgE ne sont observés que de façon éphémère et seulement en terme de minutes après une activation des cellules B *in vivo*, et jamais sous l'état de cellules mémoires si bien qu'au final, la production d'IgE circulantes est 10k à 100k fois inférieure à celle des autres classes d'immunoglobulines.

Il a récemment été suspecté que c'est l'expression de l'IgE membranaire en elle-même qui module le destin des lymphocytes B (Laffleur et al., 2015). Pour démontrer cela, des lymphocytes B en culture ont été transfectés avec une construction VDJ-C $\epsilon$ . Les cellules transfectées IgE<sup>+</sup> sont instables lors d'une culture prolongée et montrent de multiples changements fonctionnels et morphologiques. Leur mobilité médiée par les chimiokines est déficiente, le taux de phosphorylation des tyrosines intracellulaires est diminué, les cellules deviennent plus arrondis, les BCR se regroupent dans les rafts lipidiques et l'apoptose est potentialisée. Des changements transcriptionnels modulent l'expression des récepteurs impliqués dans les interactions lymphocytes T-B, ainsi que le métabolisme et favorisent l'apoptose. Cette expérience a également montré que la protéine anti-apoptotique Haw1 est relocalisée suite à l'expression membranaire d'IgE. De plus, l'expression endogène d'un BCR IgE par les lymphocytes B *in vitro* comme *ex vivo* est transitoire et ce dernier est rapidement internalisé. Ces cellules survivent moins longtemps que les autres lorsqu'elles sont transférées dans des souris immunodéficientes. Le phénotype imposé par l'expression du BCR à IgE est prioritaire à toute rencontre antigénique et expliquerait la courte durée de vie et la rareté *in vivo* des lymphocytes B IgE<sup>+</sup>. Les rares plasmocytes sécréteurs d'IgE qui survivent ont une longue durée de vie et assurent à eux seuls la mémoire IgE à long terme. Ce sont probablement eux qui sont aussi les responsables des allergies immédiates médiées par les IgE (Laffleur et al., 2015).

#### 5. Recombinaison suicide du locus (LSR)

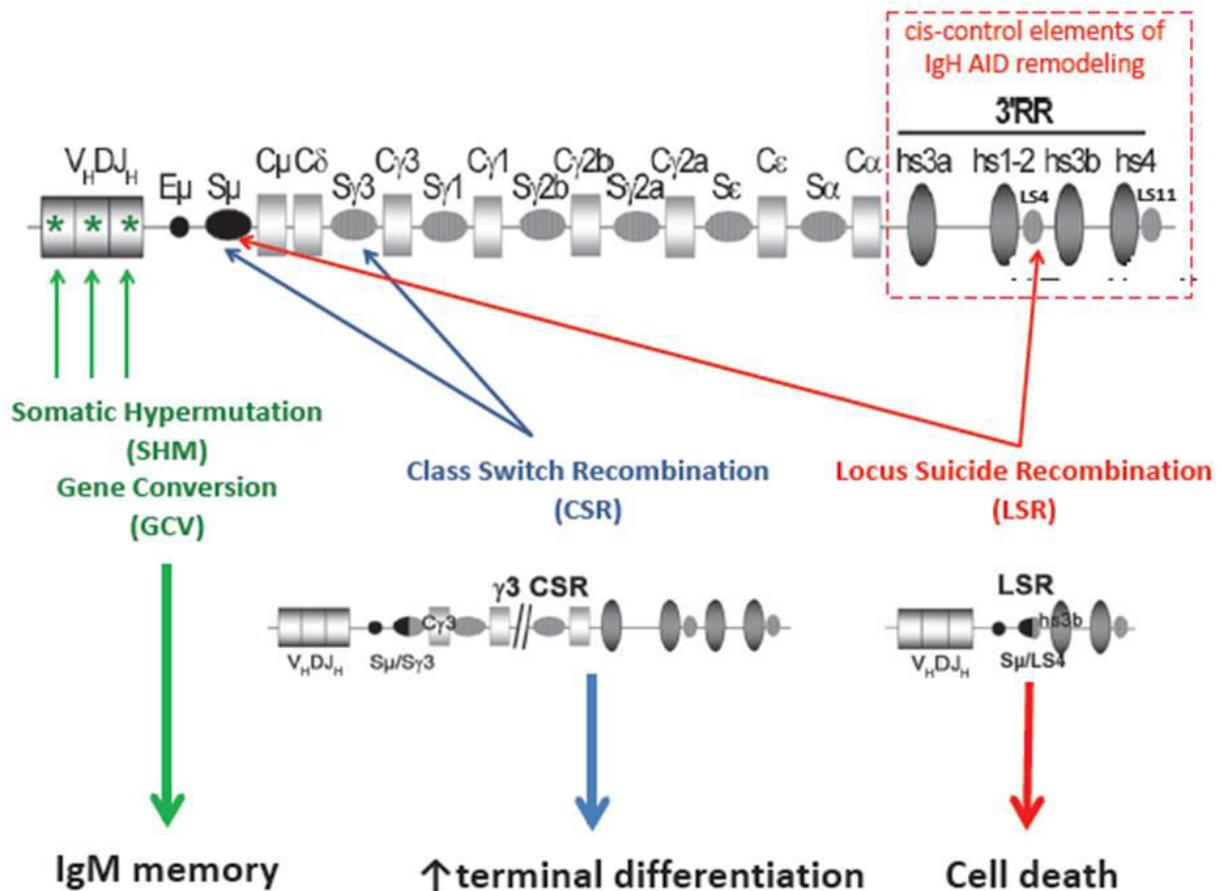
Le devenir des lymphocytes B peut être radicalement modifié sous l'action d'AID durant un évènement qui ressemble à la CSR, mais s'en distingue en éliminant l'intégralité des

gènes constants du locus IgH, provoquant la mort des cellules. C'est la recombinaison suicide du locus (=LSR)(figure 26)(Péron et al., 2012a).

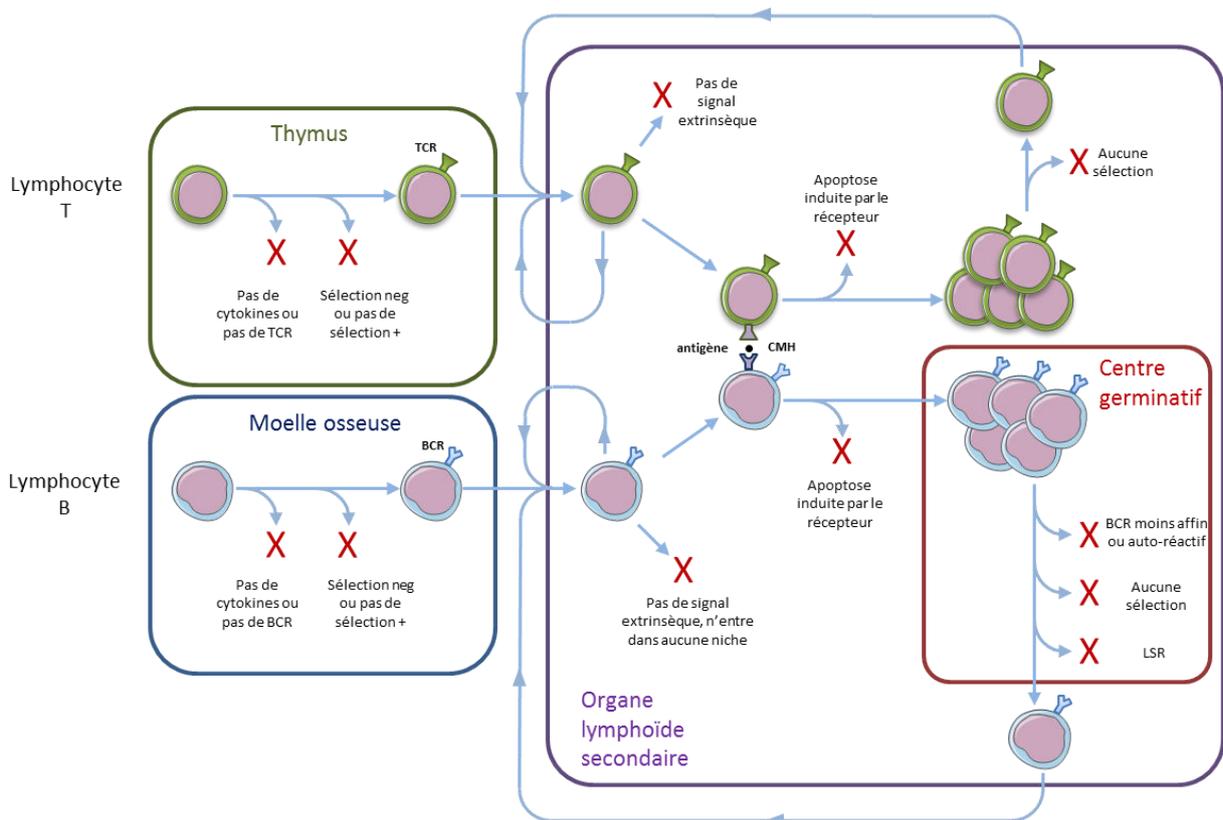
Au sein du centre germinatif, les lymphocytes B sont en compétition quant à leur affinité pour l'antigène. A ce stade, leurs gènes d'immunoglobulines sont mutés, et ce grâce à l'action d'AID. Si certains lymphocytes B de haute affinité pour l'antigène sont sélectionnés positivement, tous les autres sont en contrepartie destinés à être éliminés. Même si des mutations des gènes V créées lors de la SHM peuvent être néfastes pour l'affinité du BCR vis-à-vis de l'Ag, et provoquer l'apoptose (Goodnow et al., 2010), les signaux de survie et de prolifération très abondants dans le microenvironnement du GC pourraient vraisemblablement maintenir ces cellules en vie voire en prolifération. Sont concernées les cellules B dont les mutations aléatoires des V produisent un BCR « inutile » (sans affinité pour l'Ag), ou au pire dangereux pour l'organisme (spécifique d'auto-antigènes ou d'allergènes...). De plus, les commutations de classe se produisant au sein du GC sont de potentiels acteurs de l'auto-immunité et/ou de l'hypersensibilité en permettant la production de classe d'anticorps plus pro-inflammatoires que les IgM (Laffleur et al., 2013). Dans ce contexte, il paraît donc important que des mécanismes puissent empêcher l'amplification de clones B « switchés » et non désirables quant à leur spécificité.

La région 3'RR du locus IgH, en plus de contenir des activateurs spécifique de la lignée B, possède pour toutes les espèces de mammifères étudiées des séquences d'ADN répétées similaires aux régions S (Chauveau and Cogné, 1996; Chauveau et al., 1998; Pinaud et al., 1997; Sepulveda et al., 2005), formées de répétitions de 5 paires de bases et parfois des répétitions de séquences plus longues (49 paires de bases). Ces régions nommées LS (like switch) encadrent chacun des éléments activateurs de la région 3'RR et, de la même façon que les régions S sont transcrites juste avant l'évènement de CSR, les régions LS sont transcrites par l'ARN polymérase II dans les lymphocytes B activés (Yamane et al., 2011). La 3'RR régule les évènements médiés par AID, la SHM et la CSR, en interagissant physiquement avec les promoteurs IgH ciblés par AID (Dunnick et al., 2009; Pinaud et al., 2011; Rouaud et al., 2013; Vincent-Fabert et al., 2010; Wuerffel et al., 2007). Comme les éléments activateurs et les régions LS sont eux même transcrits, il est logique de trouver qu'eux même subissent des coupures et des mutations de l'ADN. Dans les lymphocytes B activés, AID initie des jonctions entre S $\mu$  et les régions LS de la 3'RR, provoquant l'excision complète des gènes constants du locus IgH et par la même empêchant l'expression d'un BCR – ou la sécrétion d'immunoglobulines dans le cas où les cellules seraient engagées dans la différenciation plasmocytaire. L'expression du BCR étant indispensable pour la survie des lymphocytes B, cet évènement de recombinaison suicide du locus provoque la mort des cellules.

Dans le contexte du centre germinatif, la LSR pourrait contribuer à la régulation de l'homéostasie cellulaire. Les lymphocytes B ne recevant pas suffisamment de signaux d'activations subiraient la LSR et seraient ensuite éliminés, alors que ceux sélectionnés par les T<sub>FH</sub> avec des signaux activateurs adéquats s'engageraient dans la CSR et la survie. La LSR pourrait donc aider à la création du répertoire des lymphocytes B périphériques et de s'assurer de la sélection des BCR avec une haute spécificité pour l'antigène (figure 27).



**Figure 26 : Ciblage d'AID sur le locus IgH.** Lors de l'activation des lymphocytes B, AID est exprimée et remodèle les gènes des immunoglobulines des régions V *via* la SHM pour générer des BCR plus spécifiques pour l'antigène. AID initie également le changement de classe du BCR (CSR). Lorsqu'AID cible la région  $S_{\mu}$  et une des régions LS située dans la 3'RR, tous les gènes constants du locus IgH sont éliminés rendant l'expression du BCR impossible, dirigeant les cellules vers l'apoptose (Laffleur et al., 2013).



**Figure 27 : Apoptose des compartiments lymphocytaires.** Les lymphocytes T et B peuvent entrer en apoptose (croix rouges) à de nombreuses reprises au cours de leur développement et de leur activation. Les lymphocytes meurent s'ils ne reçoivent pas les bonnes cytokines, s'ils ne sont pas localisés au bon endroit, s'ils n'arrivent pas à former un TCR/BCR fonctionnel, s'ils ne sont pas sélectionnés lors des checkpoints. Lors de la rencontre avec l'antigène, les lymphocytes B qui lient et présentent l'antigène aux lymphocytes T *via* le CMH peuvent recevoir l'ordre d'entrer en apoptose. Durant le centre germinatif, les lymphocytes B dont le BCR n'est pas affiné pour l'antigène ou est auto-réactif sont éliminés. Il en va de même pour tous ceux qui ne sont pas sélectionnés avant la clearance de l'antigène (modifié depuis (Rathmell and Thompson, 2002)).

## Résultats de la thèse

---

### Position du problème abordé

Chez la souris (et vraisemblablement chez l'homme), AID et la 3'RR jouent des rôles majeurs dans la maturation des lymphocytes B en contrôlant la transcription germinale des régions constantes du locus IgH, la SHM, la CSR. Elles permettent ainsi l'émergence de cellules B avec un BCR de haute affinité et de classe diversifiée pour pouvoir lutter par diverses stratégies ou au niveau de divers sites (tissulaires ou muqueux) contre un antigène donné. Il a été montré au laboratoire (Péron et al., 2012a) que la 3'RR elle-même est spécifiquement transcrite dans les lymphocytes B activés. La transcription en ARN de quelques autres activateurs (eRNA) avait déjà été montrée et corrélée avec l'activité des promoteurs contrôlés par ces activateurs (Kim et al., 2010). Dans le cas de la 3'RR, la transcription de la région permet aussi à AID de la cibler et d'attaquer ses cytosines, comme c'est le cas avec la transcription des gènes constants qui précède la CSR. Si durant la CSR AID cible les régions S lors de l'interaction entre la 3'RR et les régions S, l'enzyme est également capable de muter et provoquer des cassures au sein même de la 3'RR au niveau des régions LS. Le choix d'effectuer une recombinaison  $S\mu$ -LS de LSR entre donc alors vraisemblablement en compétition avec le choix d'un switch  $S\mu$ -SX de la CSR.

*Quelles hypothèses peut-on faire sur les modalités de survenue de la LSR ?*

Comment l'éventuelle balance CSR/LSR serait-elle régulée *in vivo* reste à déterminer. Quelle est l'importance fonctionnelle du phénomène de LSR ? Quel pourcentage précis de cellules élimine-t'il ? Comment se positionne-t-il par rapport aux autres modalités d'élimination des cellules B matures ? Concerne-t-il spécifiquement des cellules dangereuses (auto-réactives ? portées vers des réactions immuno-allergiques) ? Ou des cellules d'affinité médiocre ou nulle pour l'antigène et présentes de façon « bystander » dans les tissus lymphoïdes stimulés ? Beaucoup de questions sur la LSR restent en suspens !

Les régions conservées LS pourraient peut-être aussi servir de d'autres fonctions que la LSR, qui pourrait cibler en priorité les allèles non-fonctionnels ? Cette dernière hypothèse est cependant peu probable car la LSR sur l'allèle non-fonctionnel n'aurait que très peu d'implications fonctionnelles et l'évolution n'aurait alors sans doute pas conservé les régions LS. L'hypothèse la plus probable serait donc que la LSR ciblerait l'allèle fonctionnel (ou éventuellement de façon bi-allélique, comme c'est le cas pour la CSR) des lymphocytes B matures.

Une hypothèse raisonnable pourrait faire de la LSR une sorte de contrôle de qualité des conditions de stimulation B dans le contexte du centre germinatif, où la LSR pourrait contribuer à la régulation de l'homéostasie cellulaire en contribuant à provoquer la mort de la cellule lorsque que les conditions de stimulations ne sont pas « optimales ». Au contraire dans des conditions optimales de stimulations et de mise en route d'une réponse immune humorale, c'est plutôt une CSR classique qui aurait lieu. La LSR pourrait également aider à la formation du répertoire périphérique si elle est régulée par la spécificité du BCR pour l'antigène.

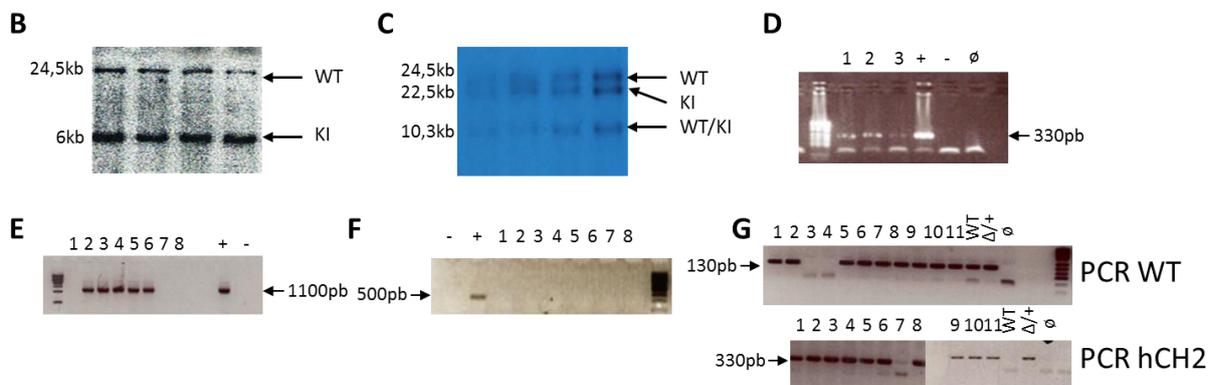
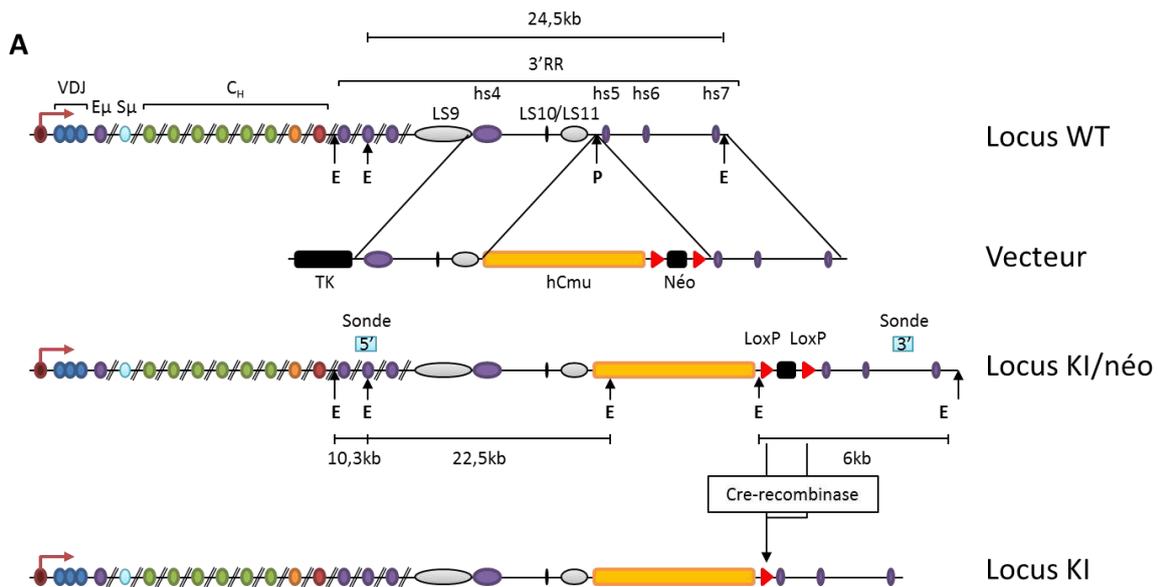
Cependant, le frein majeur dans l'analyse du phénomène de LSR est la perte d'expression du BCR et la mort cellulaire qui l'accompagnent. Par définition les cellules qui meurent échappent

très rapidement à l'analyse et notre hypothèse est donc que la LSR est dans ces conditions par essence sous-estimée quant à sa fréquence. Nous avons donc décidé de créer un modèle murin transgénique (LSR- $\mu$ KI) pour étudier la LSR dans des conditions où les cellules concernées puissent au moins transitoirement échapper à la mort. Notre modèle se caractérise par l'insertion du gène humain IgH C $\mu$  complet en aval d'une des régions répétitives sur lesquelles le phénomène de LSR à lieu, à savoir la région LS11 dans la partie distale de la 3'RR murine. Ce modèle a donc été construit dans le but de permettre que des événements de LSR sur la 3'RR ne conduisent pas systématiquement à la perte du BCR et la mort cellulaire mais autorisent au contraire la survie de ces cellules. Ce modèle est donc un système « rapporteur », qui vise donc à quantifier la LSR et se donner un outil permettant de tester les conditions de son induction.

### **Création du modèle : addition du gène humain C $\mu$ au locus IgH murin**

Un vecteur de ciblage a permis l'ajout du gène C $\mu$  humain et du gène de sélection Néo flanqué de sites LoxP au niveau de site de restriction PmlI (CACGTG) en aval de la région LS11 et en amont de la région Hs5 immédiatement consécutive à la 3'RR (figure 1A). Cette construction permet l'intégration du gène C $\mu$  immédiatement en aval de la région LS la plus aval, sans porter atteinte à l'intégrité des éléments Hs et LS de la région 3'RR. La transfection du vecteur dans des cellules ES murines TC1 a permis l'obtention de clones résistants à la néomycine et au gancyclovir. L'ADN génomique de chaque clone est préparé puis testé par southern blot à l'aide de sondes situées en 5' et 3' du lieu d'introduction de la construction. La construction apportant des sites de reconnaissance par EcoRI (GAATTC), la restriction enzymatique par EcoRI avant la vérification par southern blot permet l'identification de clones ayant correctement incorporé le gène C $\mu$ . La sonde 3' génère sur l'allèle WT un fragment de 24,5kb et un fragment de 6kb sur l'allèle KI (figure 1B), alors que la sonde 5' qui se fixe de chaque côté de la structure palindromique de Hs1,2 génère un fragment de 24,5kb et un second de 10,3kb sur l'allèle WT, et un fragment de 22,5kb et un second de 10,3kb sur l'allèle KI (figure 1C). Nous avons identifié plusieurs clones positifs (6/224). Un de ces clones a été micro-injecté dans des blastocystes de souris afin de générer des animaux chimériques porteurs du gène C $\mu$  humain et de la cassette Néo dans leur lignée germinale (figure 1D-E). Une lignée de souris knock-in a été générée à partir de ces animaux chimériques et a été croisée avec des animaux transgéniques exprimant la recombinase *cre* sous la dépendance du promoteur CMV (cytomégalovirus) afin d'éliminer le gène de sélection *néo* et d'obtenir une lignée d'animaux porteurs du gène humain C $\mu$  seul en aval de la région LS11 (figure 1F). Les souris générées sont identifiables par PCR (figure 1G).

Un vecteur d'expression constitué de la même construction et avec l'ajout d'un VDJ réarrangé à la place de la cassette TK a permis de vérifier l'expression de l'IgM humaine sur une analyse des ARN totaux après une transfection dans des cellules SP2-0 (figure 2).



**Figure 1** : Insertion du gène humain C<sub>μ</sub> en aval de l'élément LS11 de la 3'RR murine. **A**) carte de la région 3'RR murine et stratégie de knock-in. E = site de digestion par EcoRI ; P = site de digestion par PmlI. **B**) Southern blot avec la sonde 3' sur l'ADN génomique de clones ES après digestion enzymatique par EcoRI. **C**) Southern blot avec la sonde 5' sur l'ADN génomique de clones ES après digestion enzymatique par EcoRI. **D**) PCR ciblant le CH2 du C<sub>μ</sub> humain sur les souris chimériques à partir d'ADN extrait des cellules circulantes dans le sang. Le contrôle positif est de l'ADN humain, le contrôle négatif de l'ADN de souris WT. **E**) PCR ciblant la cassette Néo chez les souris F1 issues de l'accouplement chimère/WT. **F**) PCR ciblant la cassette Néo chez les souris F2 issues de l'accouplement des F1 avec les souris transgéniques exprimant la cre recombinase. **G**) PCR de génotypage du modèle LSR-μKI. La bande WT correspond à la région allant de LS11 à Hs5, avec le site d'insertion PmlI en son centre.



**Figure 2** : Expression d'IgM humaine par des cellules SP2-0 transfectées avec la construction de knock-in en aval d'un VDJ réarrangé. Les PCR1 et 2 utilisent deux couples d'amorces différents et ciblent le CH1 du gène C<sub>μ</sub> humain de la construction. Les PCR sont réalisées sur des ADNc totaux.

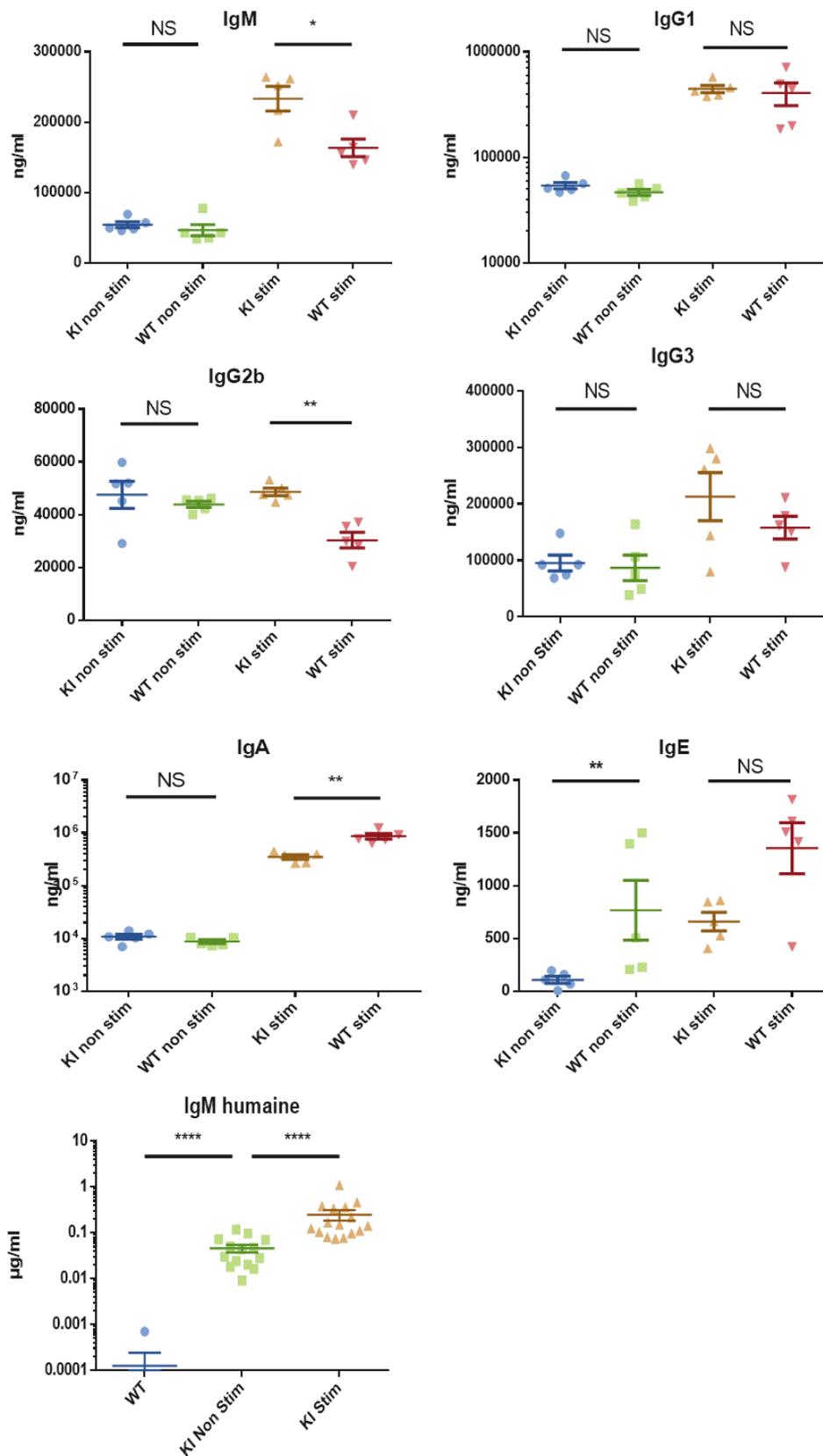
### Dosage sérique des immunoglobulines (figure 3)

Pour déterminer la capacité des souris LSR- $\mu$ KI à répondre de façon normale à une stimulation antigénique, un groupe de 5 individus ainsi qu'un groupe contrôle ont été immunisés avec des hématies de moutons. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant l'injection et 8 jours après. Les immunoglobulines circulantes ont été dosées par la technique ELISA.

Des variations de la production des immunoglobulines endogènes (murines) apparaissent. Non stimulés, c'est-à-dire en condition d'hébergement E.O.P.S. (« exempt d'organisme pathogène spécifique »), les deux groupes sécrètent dans la circulation sanguine des taux sans différence significative avec la normale d'IgM murine, d'IgG1, d'IgG2b, d'IgG3 et d'IgA. La production d'IgE circulantes par les LSR- $\mu$ KI est cependant près de 7 fois inférieure à celle du même groupe contrôle sans pour autant être nulle.

Après stimulation immunitaire (immunisation par des hématies de mouton), les deux groupes sécrètent dans la circulation sanguine des taux sans différence significative avec la normale d'IgG1, d'IgG3 et d'IgE. Les LSR- $\mu$ KI sécrètent en moyenne 1,6 fois plus d'IgM que le groupe contrôle, 1,6 fois plus d'IgG2b, 2,5 fois moins d'IgA et (même si l'analyse statistique n'est pas significative) 2 fois moins d'IgE. Hormis pour la sécrétion d'IgA et d'IgE (issus des deux gènes les plus distaux et télomériques du locus IgH), les souris LSR- $\mu$ KI semblent donc produire *quantitativement* autant si ce n'est plus d'immunoglobulines circulantes que leurs homologues du groupe contrôle.

Le dosage des IgM humaines circulantes indique que leur production augmente d'un facteur supérieur à 5 lors d'une immunisation par des hématies de mouton (aucune IgM humaine n'est bien sûr trouvée dans le sérum de souris contrôle). La production d'IgM humaine est donc détectable spontanément avant toute immunisation, et majorée par une stimulation immune, ce qui corrèle avec l'hypothèse que l'évènement de LSR ait lieu sous l'action d'AID dans les lymphocytes B activés et augmente naturellement en cas de stimulation immune.



**Figure 3** : Dosage des immunoglobulines présentes dans le sérum d'animaux transgéniques et contrôles, qu'ils soient immunisés ou non. t test utilisé : Mann-Whitney non-parametric two-tailed test (\* :  $P = 0,0159$  ; \*\* :  $P = 0,0079$  ; \*\*\*\* :  $P < 0,0001$ ).

#### Stimulation *in vitro* (figure 4)

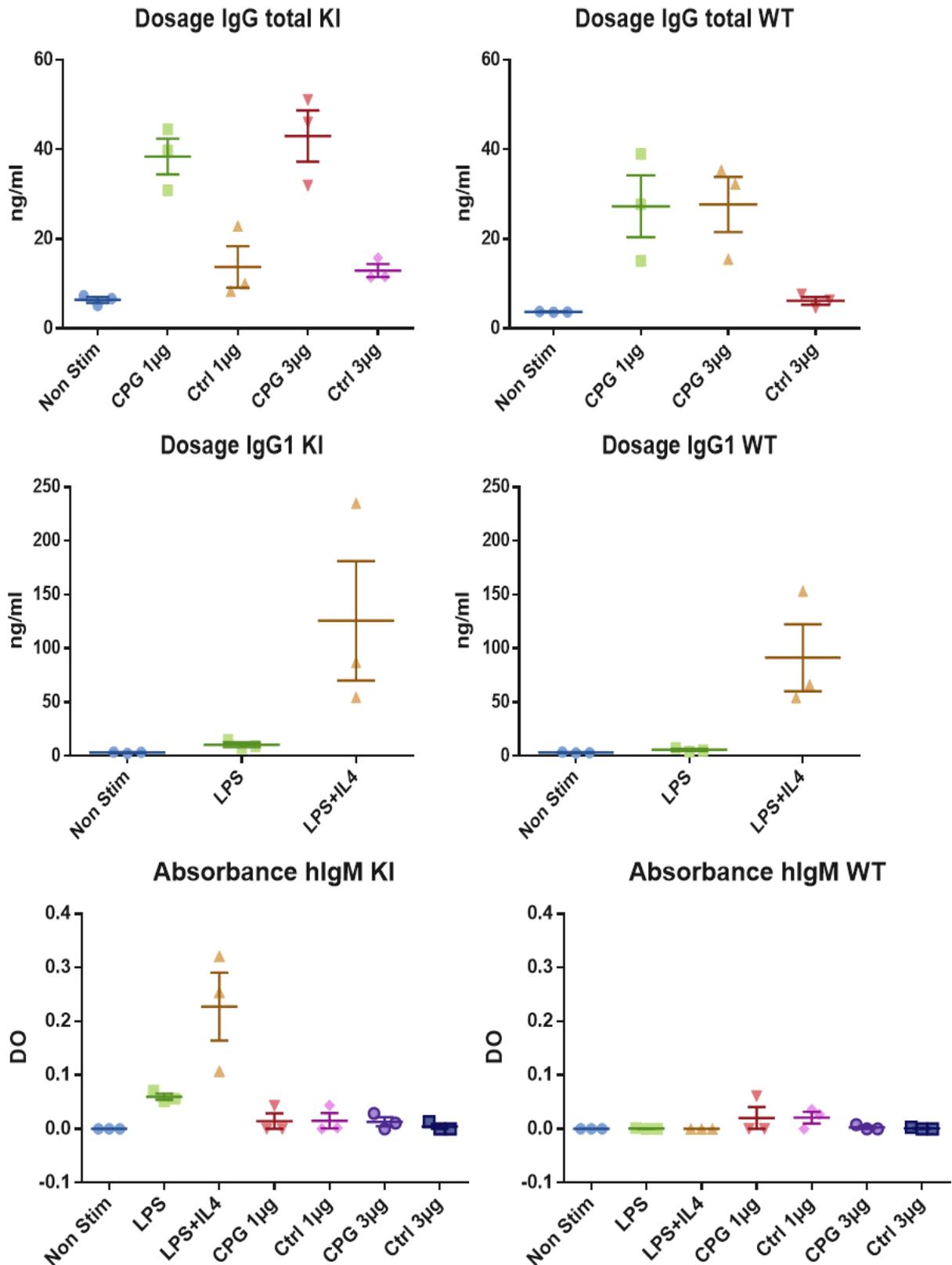
Pour déterminer les conditions de stimulations à l'origine de l'évènement de LSR, des splénocytes totaux sont cultivés *in vitro* en présence ou non de molécules stimulatrices.

Sans stimulation, et donc sans transcription d'AID, les lymphocytes B *in vitro* ne sécrètent pas d'IgM humaine à un taux détectable.

Une stimulation des splénocytes par de l'ODN-CpG, connu pour stimuler les cellules en passant par la voie du TLR9, augmente la production d'IgG par les lymphocytes B en culture d'un facteur 6 par rapport aux cellules cultivées sans stimulation (et ce pour les cellules issues de souris LSR- $\mu$ KI comme pour les cellules issues de souris WT). L'ODN-CpG permet bien l'activation des lymphocytes B et promeut la transcription d'AID et le mécanisme de CSR. La production d'IgM humaine reste cependant inchangée lors de la stimulation par l'ODN-CpG. Le mécanisme de LSR ne semble donc pas promu par une stimulation du TLR9 dans ces conditions.

Une stimulation par du LPS, connu pour activer le TLR4, active en revanche la production d'IgM humaine par les lymphocytes B en culture. Cette production est encore augmentée d'un facteur 4 lorsque de l'IL4 est ajouté au milieu de culture en plus du LPS. En tant que contrôle parallèle, le dosage des IgG1 sécrétées dans le milieu par les cellules stimulées avec du LPS+IL4 atteste de l'activation des lymphocytes B et de la CSR initiée par AID. *In vitro*, le switch vers IgG1 des lymphocytes B des souris LSR- $\mu$ KI est semblable à celui des lymphocytes B des souris WT.

L'évènement de LSR a donc lieu lors d'une stimulation du TLR4 et de façon plus forte lors d'une stimulation croisée avec de l'IL4.



**Figure 4 :** Dosage des immunoglobulines présentes dans le surnageant de culture de splénocytes de rates stimulés ou non.

## Phénotypage lymphocytaire (figure 5)

Pour déterminer l'incidence de l'insertion du gène C $\mu$  humain en aval de l'élément Hs4 de la 3'RR, nous quantifions les différentes populations de cellules B lors en développement dans la moelle osseuse et en attente dans la rate par cytométrie en flux. Ces expériences sont réalisées sur des animaux élevés en conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifique et n'ayant jamais rencontrés des antigènes autres que des auto-antigènes.

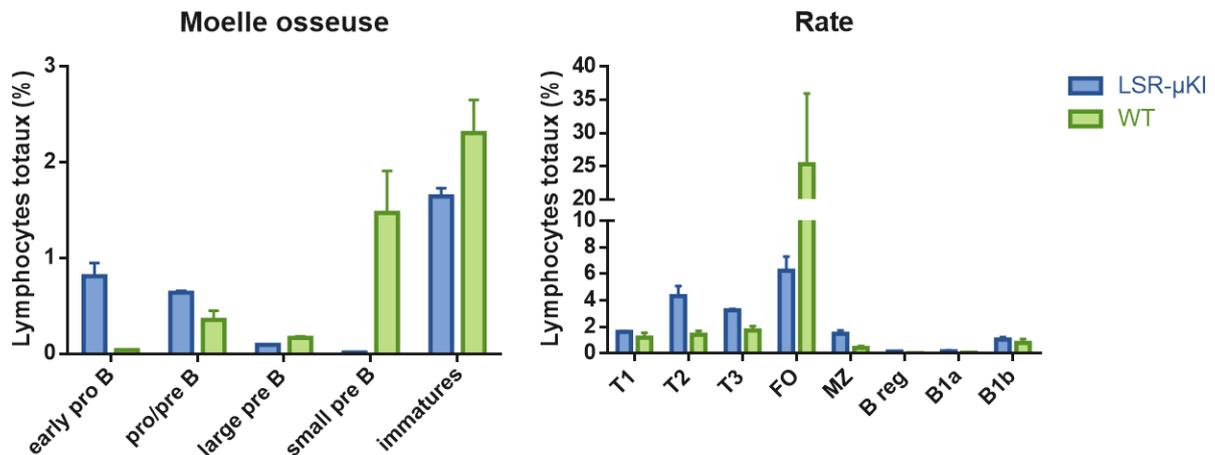
	early Pro-B	Pro/Pré-B	large Pré-B	Small Pré-B	B immature			
B220	+	+	+	+	+			
CD19	-	+	+	+	+			
C-kit	+	+	-	-	-			
CD43	+	+	+	-	-			
CD25	-	-	+	+	-			
CD24	-	+	++	++	++/+++			
IgM	-	-	-	-	+/++			
	T1	T2	T3	B FO	B MZ	B1a	B1b	Breg
CD19	+/+++	+/+++	+/+++	++	++	+++	+++	+++
IgM	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++
IgD	-/+	+	+	+++	-/+	-/+	-/+	+
CD21	-/+	++	++	+/+++	+++	+	+	++/+++
CD23	-/+	++	++	++	-/+	-	-	-/+
CD5	-	-	-	-	-	-	+	+

**Tableau 1** : Panels de marquage des populations B dans la moelle osseuse (bleu) et dans la rate (vert).

Lors du développement B dans la moelle osseuse, les animaux LSR- $\mu$ KI affichent des populations pro-B et pro/pré-B plus importantes que celles d'animaux sauvage (0,81% contre 0,04% et 0,64% contre 0,35% respectivement). Si la représentativité de la population large pré-B est semblable entre les deux cohortes (0,1% pour les LSR- $\mu$ KI contre 0,16% pour les contrôles), celle de small pré-B des animaux LSR- $\mu$ KI est quasi inexistante (0,01%) alors qu'elle atteint les 1,5% chez animaux sauvages. Cette accumulation des cellules aux stades précoces de développement suggère un blocage lors du passage entre les différents stades. Les populations de B immatures entre les deux cohortes sont semblables, avec une légère augmentation chez les animaux sauvages vis-à-vis des LSR- $\mu$ KI (2,3% et 1,7% respectivement). Dans la rate, les populations de lymphocytes B transitionnelles (T1, T2 et T3) sont plus importantes chez les animaux LSR- $\mu$ KI que chez les animaux sauvages (1,63%, 4,34% et 3,26% contre 1,2%, 1,42% et 1,74% respectivement). (Ces résultats sont préliminaires et non validés statistiquement. Ils ne se prêtent pas à une interprétation simple puisque le knock-in ne s'exprime qu'aux stades tardifs. Nous devons les vérifier par des expériences répétées).

En revanche, la population de lymphocytes B folliculaires est bien plus importante chez les animaux sauvages (25,23%) que chez les LSR- $\mu$ KI (6,25%). L'accumulation des cellules B transitionnelles et le peu de cellules B folliculaires suggère un blocage qui limiterait la différenciation en B FO ou leur prolifération. Les populations des lymphocytes B1a, B1b et B de la zone marginale sont plus importantes dans les animaux LSR- $\mu$ KI que chez les animaux sauvages de facteurs allant de 1,3 à 3 (respectivement : 1,48% contre 0,43% pour les B MZ ;

0,17% contre 0,06% pour les B1a ; 1,06% contre 0,8% pour les B1b). Il en est de même pour la population de lymphocytes B régulateurs qui est 4 fois plus importante chez les LSR- $\mu$ KI (0,16%) que chez les contrôles (0,04%).



**Figure 5** : Taille des populations B dans la rate et la moelle d'animaux LSR- $\mu$ KI et WT élevés en zone EOPS. Les populations sont déterminées à partir de la population lymphocytaire totale de l'organe étudié (qui correspond à 100%) et sont identifiées par cytométrie en flux.

## Répertoire V (figure 6)

Nous avons souhaité établir dans le laboratoire une technique permettant d'apprécier de façon non biaisée par un quelconque usage de primers ou de méthode d'hybridation le répertoire des régions variables de chaînes lourdes d'immunoglobulines. Cette technique repose sur l'amplification d'ADNc via une première étape de RACE-PCR. Le fait d'amplifier les ARNm à partir d'une simple ancre 3' complémentaire d'une région de l'exon CH1, en utilisant pour la partie 5' non pas des amorces « leader V » ou « V », débarrasse de tout biais d'hybridation différentielle entre primers et supprime les risques qu'une séquence échappe à l'analyse simplement parce qu'elle présente de l'hypermutation somatique.

Nous avons souhaité développer ces méthodes pour explorer deux questions :

- 1) évaluer d'une part si l'insertion d'un gène supplémentaire  $C\mu$  en 3' du locus IgH modifiait les phénomènes de sélection des cellules B et pouvait avoir un impact sur le répertoire et la maturation de l'affinité pour ces cellules avant l'expression d'AID (une partie sans SHM des transcrits IgM) ou après l'expression d'AID (transcrits IgG).
- 2) explorer le répertoire VDJ des cellules B ayant effectivement réalisé une recombinaison de type LSR et ayant donc commuté à la production d'IgM chimériques à chaînes lourdes  $\mu$  humaines.

Nous souhaitons ainsi pouvoir comparer les 3 répertoires des cellules non switchées / switchées classiquement (vers IgG) / et « post-suicide attempt » (commutées vers IgM humaine). Notre hypothèse est que l'existence d'un biais de répertoire de ces dernières cellules par rapport à des cellules switchées classiques, attesterait du fait qu'elles sont issues d'un processus de sélection spécifique, et ne sont donc pas de simples « accidents de switch ».

Cette méthode ayant un coût et une complexité élevés, il importe de minimiser le nombre d'échantillons traités et d'en tirer le maximum d'informations significatives. Afin d'avoir en une expérience une représentativité correspondant à une sorte de moyenne du répertoire V des immunoglobulines produites par une population définie de lymphocytes B, les cellules CD43- triées à partir de splénocytes de rates de 5 animaux immunisés par du SRBC (5 LSR- $\mu$ KI ou 5 WT) sont réunies et nous procédons à une extraction des ARN totaux. Une RACE PCR est alors réalisée et permet de retro-transcrire spécifiquement les ARN codant pour les classes choisies d'immunoglobulines en ADNc qui sont alors séquencés après plusieurs étapes d'amplification et de purification.

Au cours de cette expérience, l'amplification parallèle de 8 aliquots indépendants à partir de chaque lot d'ADNc et leur réassemblage après amplification est une procédure permettant de « moyenniser » et niveler d'éventuels biais d'amplification qui pourraient affecter l'un ou l'autre amplifiat. Ceci vise à garantir le maximum de diversité et de représentation de toute l'hétérogénéité interne des échantillons. L'identification des réarrangements  $V_H D J_H$  est réalisée avec l'outil IMGT/HighV-QUEST. Lors de l'analyse des séquences, nous avons choisi que chaque séquence avec un assemblage  $V_H D J_H$  unique ne soit comptabilisée qu'une seule fois, quelle que soit la taille du clone correspondant. Nous mesurons donc ici non pas simplement le taux d'utilisation des familles V au sein d'une population B (qui pourrait être biaisée par d'éventuelles petites populations monoclonales ou oligoclonales), mais vraiment le spectre global d'utilisation des V parmi tous les clones B en présence dans le tissu lymphoïde étudié.

#### *Analyse du répertoire des souris LSR- $\mu$ KI*

L'analyse du répertoire des IgM murines des animaux immunisés permet de connaître les segments  $V_H$  sélectionnés lors de la réponse immune sans que la CSR ait lieu, donc pour partie sans activation d'AID. Cela cumule en effet des B naïfs et des B mémoires IgM+. Dès le répertoire IgM, nous observons une différence entre les animaux de notre modèle et des animaux wild-type. Les IgM des souris LSR- $\mu$ KI utilisent moins les  $V_H1$  (34,5%) que les souris WT (49,5%), mais utilisent plus le  $V_H2$  (14,4% contre 5,7%). Les autres familles de  $V_H$  sont utilisées de façon semblable entre les IgM des souris LSR- $\mu$ KI et les souris WT.

L'analyse du répertoire des IgG2b des animaux immunisés permet de connaître les segments  $V_H$  sélectionnés lors de la réponse immune après CSR sous l'influence d'AID. Comme les IgM, les IgG2b des souris LSR- $\mu$ KI utilisent à nouveau moins les  $V_H1$  (38,3%) que les souris WT (57,9%). De même, les familles  $V_H6$  (1,1% contre 2,3%) et  $V_H10$  (0,2% contre 1,5%) sont moins utilisées chez les souris LSR- $\mu$ KI. En retour, le pourcentage d'utilisation des familles  $V_H2$ ,  $V_H3$ ,  $V_H5$ ,  $V_H8$ ,  $V_H9$  et  $V_H14$  est compris entre 1,5 à 2 fois plus chez les souris LSR- $\mu$ KI que chez les souris WT. Il est également intéressant de noter que sur 597 assemblages  $V_H D J_H$  uniques, aucun segment  $V_H7$  et aucun segment  $V_H10$  ne sont utilisés par les IgG2b chez les souris contrôles.

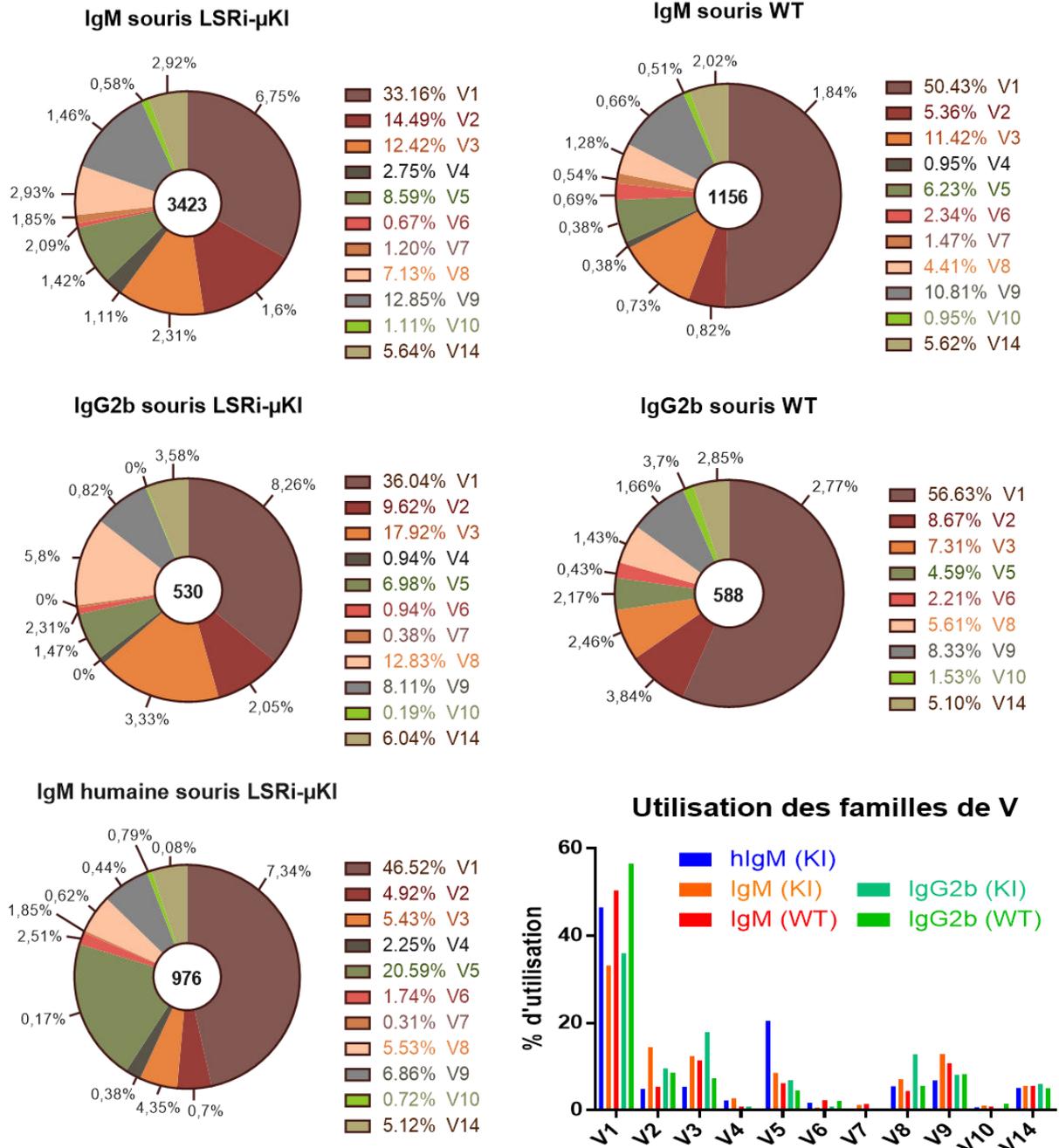
Sachant que l'évènement de LSR est dépendant d'AID, il est ensuite intéressant de comparer chez les souris LSR- $\mu$ KI, le répertoire des IgG post-switch avec le répertoire des IgM humaines post-tentative de suicide LSR : la comparaison du pourcentage d'utilisation des familles de  $V_H$  avec entre hIgM et IgG2b indique une très claire augmentation de l'utilisation des  $V_H5$  par les IgM humaines d'un facteur 3 à 5 (22% d'utilisation contre 8,2% par les IgG2b de LSR- $\mu$ KI et 4,5% d'utilisation par les IgG2b WT). Cette différence dans l'utilisation de la famille des  $V_H5$  pourrait indiquer que cette famille de  $V_H$  soit plus représentée parmi les cellules B

normalement destinées à la mort par LSR... Ce qui ouvre diverses interprétations ! Régions variables utilisées par des Ig polyréactives et de faible affinité ? Régions variables portées par des B auto-réactifs ? Structures de domaines variables intrinsèquement plus aptes à provoquer l'apoptose par LSR pour une raison encore inconnue ?

Il est intéressant de noter que des biais d'utilisation des répertoires  $V_H$  ont été rapportés chez l'homme au cours de diverses pathologies. ]. La famille des  $V_{H5}$  murins est associée à la famille des  $V_{H3}$  humains (de Bono et al., 2004)(<http://www.imgt.org>). Ces derniers, sont surutilisés dans le cas de certaines pathologies chez l'Homme, à savoir les leucémies et les lymphomes (Arons et al., 2006; Bahler et al., 1991; Donisi et al., 2006; Fält et al., 2005). Si le taux d'utilisation de la famille  $V_{H3}$  par les lymphocytes B malins varie en fonction du type de lymphome étudié, il est en revanche toujours plus élevé que dans une population polyclonale. De façon intéressante chez l'homme, la littérature a également rapporté une surutilisation du sous-groupe  $V_{H5}$  par les IgE et les IgA présentes dans les muqueuses nasales de patients faisant des rhinites allergiques, ainsi que les IgE du sang, des muqueuses pulmonaires et de la rate des patients asthmatiques, ou encore les IgE du sang de patients atteints de dermatose atopique (Coker et al., 2005; Snow et al., 1995, 1997, 1999; van der Stoep et al., 1993).

#### *Taux de mutation des régions variables dans les souris LSR- $\mu$ KI*

Lorsque l'on se concentre sur le pourcentage de mutation des CDR1 et 2 de chaque famille de  $V_H$ , nous remarquons que les IgM murines des souris LSR- $\mu$ KI sont plus en moyenne mutées que les IgM des souris WT. Le taux de mutation semble logiquement augmenter dans les IgG2b des deux types murins, attestant de l'action d'AID. Dans le cas des animaux sauvages, les IgG2b sont ainsi plus mutées (2,61%) que les IgM (1,35%). Il est très intéressant de noter que les familles de  $V_H$  utilisées par les IgM humaines dans les souris LSR- $\mu$ KI sont moins mutées que celles utilisées par les IgG2b. La famille de  $V_{H5}$  murine utilisée par les IgM humaines des souris LSR- $\mu$ KI est l'une des moins mutée (0,17%). Lorsque l'on regarde le taux global de mutation (calculé suivant la formule suivante :  $\sum [\text{taux mutation de } V_n \times \text{fréquence de } V_n \text{ en \%}] / 100$ ), on remarque que les  $V_H$  des IgM humaines semble autant mutés (3,85%) que les IgM murines (3,51%) et moins que les IgG2b (4,92%) dans les animaux LSR- $\mu$ KI est également intéressant de noter que les IgM et les IgG2b des souris LSR- $\mu$ KI sont deux fois plus mutées que celles des souris sauvages.

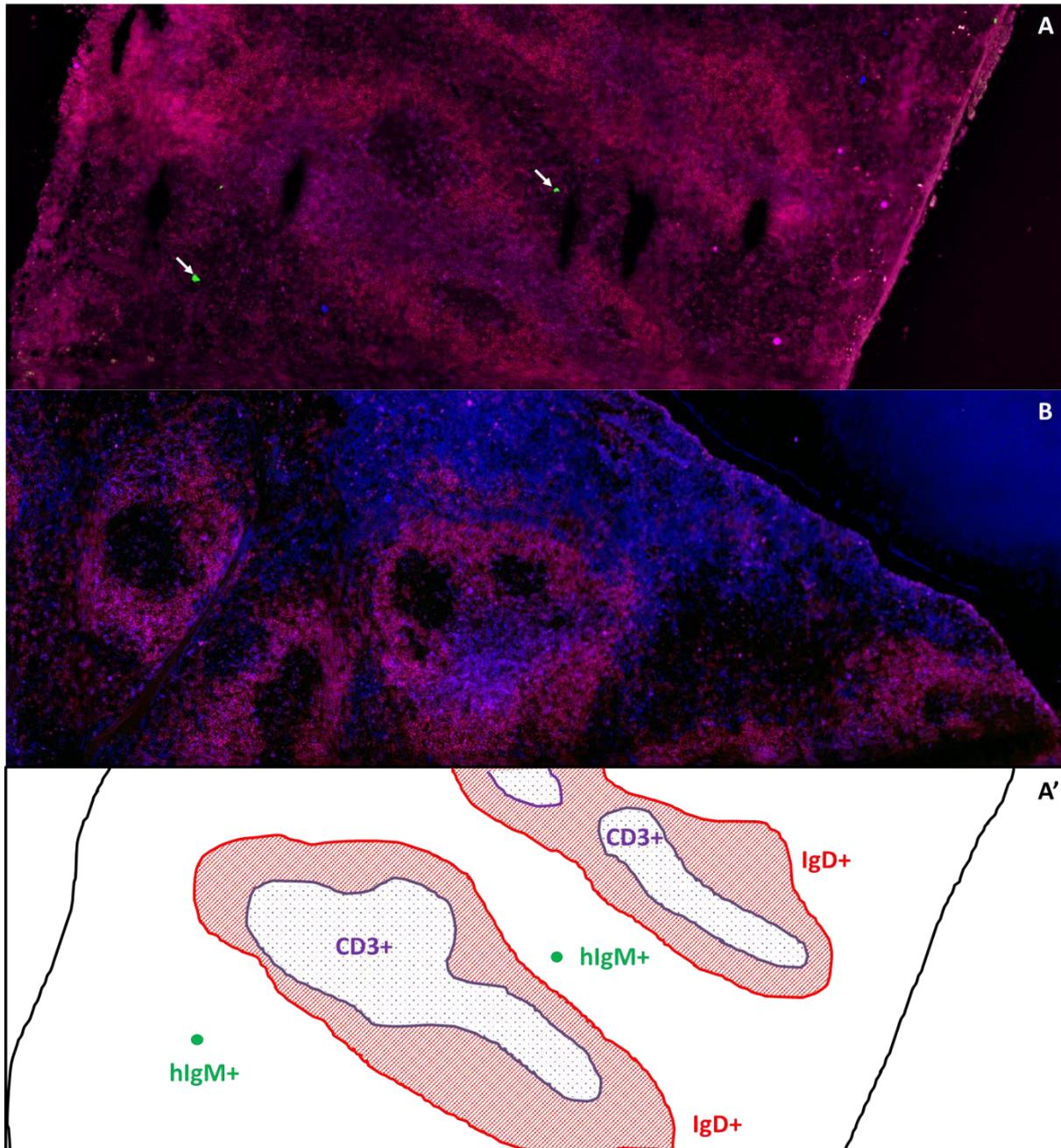


**Figure 6** : Utilisation des différentes familles de segments V<sub>H</sub> par les cellules CD43 négatives de la rate après une stimulation par des hématies de mouton durant 8 jours. Le nombre total de séquences uniques prises en compte est indiqué sur chaque camembert. Le pourcentage d'utilisation de chaque famille de V<sub>H</sub> est indiqué dans la légende des camemberts et dans l'histogramme. Les pourcentages liés par des droites aux camemberts indiquent le pourcentage moyen de mutation des CDR1 et 2 pour chaque famille de V<sub>H</sub>.

## **Localisation des cellules produisant de l'IgM humaine après évènement LSR-like (Marquage confocal (figure 7))**

Des coupes de rates d'animaux LSR- $\mu$ KI et WT isolées en PFA ont été marquées avec des anticorps anti IgD (identification des lymphocytes B non switchés et encadrant les centres germinatifs), anti CD3 (identification des zones T) et anti IgM humaine (identification des lymphocytes B sauvés après l'évènement de LSR). Les animaux élevés en conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques ont été immunisés avec des hématies de mouton pendant 8 jours avant le sacrifice.

Les marquages IgD et CD3 permettent bien d'identifier les centres germinatifs sur les différentes coupes de rates (figure 6), attestant l'efficacité de la stimulation. Le marquage des IgM humaines (hIgM) permet d'identifier sur les portions de coupes présentées deux cellules hIgM<sup>+</sup>. Ces cellules ne semblent cependant pas faire partie d'un centre germinatif. Les populations principales de lymphocytes B dans la rate sont les cellules B de la zone marginale (MZ) et folliculaires (FO). Les cellules B MZ n'expriment virtuellement pas AID contrairement aux cellules B FO dans le cadre d'un centre germinatif (Mabbott and Gray, 2014; Willenbrock et al., 2005). Les rares cellules hIgM<sup>+</sup> identifiées semblent donc hors des centres germinatifs, dans la pulpe rouge, là où s'accumulent les plasmocytes après la réaction du GC. Leur fort marquage et leur morphologie les apparentent aussi à des plasmocytes. Malheureusement dans les conditions que nous avons utilisées jusqu'ici, nous ne sommes pas parvenus à identifier le stade précédent, celui de la cellule B à Ig de membrane. Le marquage est forcément plus ténu à ce stade, et on peut aussi craindre que l'expression de l'IgM humaine sans 3'RR flanquante ne vienne encore diminuer l'expression. Nous avons donc à travailler sur des conditions de marquage hyper-sensible si nous voulons avoir une chance d'identifier et de localiser les cellules post-LSR de phénotype lymphocytaires, et non pas seulement les quelques plasmocytes qui en dérivent.



**Figure 7** : Coupe de rate. Rate de LSR- $\mu$ KI (A) et rate WT (B) 8 jours après immunisation au SRBC. Le marquage rouge correspond aux cellules IgD+, le marquage violet aux cellules CD3+, et le marquage vert aux cellules IgM humaine positives (hIgM). Les cellules exprimant l'IgM humaine sont indiquées par une flèche blanche. A') Dessin d'indentification des GC présents sur la coupe A et localisation des cellules hIgM+.

## Discussion

---

Lors d'une réponse immune, le lymphocyte B activé par l'antigène va remanier les gènes codant pour leur immunoglobuline membranaire, aussi nommé BCR (B cell receptor). Ces remaniements se font par les différents mécanismes que sont l'hypermutation somatique (SHM) et la recombinaison de classe (CSR). Si le premier touche les gènes V et les mute dans la perspective d'accroître l'affinité du BCR pour l'antigène, le second permet la diversification de la fonction des immunoglobulines par commutation d'IgM vers IgG, IgA ou IgE. Cette commutation s'accompagne de la délétion de tout le matériel génétique compris entre la région switch donneuse et la région switch accepteuse sur le locus IgH (Péron et al., 2012a). SHM et CSR sont toutes les deux dépendante d'une enzyme, AID (activation-induced deaminase) (Muramatsu et al., 2000). AID cible l'ADN au niveau des cytosines pour les changer en uracile, alors reconnue et éliminée par les systèmes de surveillance de l'ADN. Les régions switch (S) du locus IgH sont des régions très répétitives situées juste en amont des gènes codant pour les régions constantes des immunoglobulines. Leur ciblage par AID aboutit à des mismatches dont la réparation pourra générer des cassures d'abord simple brin. La nature répétitive des régions S les expose à être criblées de lésions simple brin échelonnées, susceptible d'évoluer alors en cassure double brin de l'ADN et de permettre ainsi la recombinaison du locus. Pour les deux mécanismes où AID est impliquée, SHM et CSR, la transcription des régions cibles est nécessaire. Cette transcription est contrôlée par des activateurs situés dans la région régulatrice 3' du locus IgH (3'RR) (Pinaud et al., 2011; Vincent-Fabert et al., 2010). Chez la souris, cette région est composée de quatre activateurs transcriptionnels, hs3a, hs1-2, hs3b et hs4. Si individuellement ces activateurs sont faibles, leur action de groupe est forte (Chauveau et al., 1998) et leur potentiel activateur surpasse celui des autres éléments activateurs situés plus en amont sur le locus. La 3'RR est impliquée dans la régulation tardive de la maturation des lymphocytes B, lors des réponses immunes et de la formation de centres germinatifs (Pinaud et al., 2011).

Il y a peu, il a été observé que les activateurs transcriptionnels au sein de la 3'RR sont eux même transcrits et ciblés par AID dans les lymphocytes B activés (Péron et al., 2012a). Ces régions, nommées régions LS, sont répétitives et leur position est phylogénétiquement conservée au sein des espèces de mammifères dont la séquences du locus IgH est connue (Péron et al., 2012b). Ce trio de caractéristiques est identique à celui des régions S, et il a en effet été mis en évidence l'existence de cassures doubles brins de l'ADN médiées par AID au niveau des séquences LS dans un processus proche de la CSR (Péron et al., 2012a). Les recombinaisons mises en jeu associent la région  $S_{\mu}$  (donneuse) située en amont du gène  $C_{\mu}$  aux sites LS distribué dans la 3'RR tout en aval du locus IgH. Une recombinaison de ce type provoque une délétion totale des gènes constants, ce qui revient à éteindre le locus IgH. Une telle inactivation stoppe l'expression d'un BCR membranaire et le « signal tonique » qu'il induit, provoquant la mort des lymphocytes B concernés. Cette recombinaison apoptotique a été dénommée la recombinaison suicide du locus (LSR) (Péron et al., 2012b).

Le frein majeur dans l'analyse du phénomène de LSR est la perte d'expression du BCR et la mort cellulaire qui l'accompagnent. L'estimation de la fréquence de cet évènement dans des cellules B sauvages est donc très difficile. Cette possibilité de stopper de façon définitive l'expression du récepteur majeur impliqué dans la survie de la cellule B pourrait être aussi bien un évènement rare qu'une voie importante dans la régulation de l'homéostasie de la

cellule B. Nous avons donc décidé de créer un modèle murin transgénique (LSR- $\mu$ KI) qui se caractérise par l'insertion du gène complet humain IgH C $\mu$  en aval d'une des régions répétitives sur lesquelles le phénomène de LSR a lieu, la région LS11, dans la partie distale de la région 3'RR murine. Même si on se doute bien que les recombinaisons survenant en amont de la 3'RR (i.e. jusqu'à 20 kb du gène C $\mu$  inséré), auront peu de chance de permettre l'expression de ce gène, notre stratégie repose sur le fait que les cellules B réalisant l'évènement de LSR dans les régions les plus 3' de la 3'RR, par exemple au niveau de la région LS11, pourraient alors épisser le VDJ sur le CH1 de notre knock-in et exprimer de ce fait une IgM humaine fonctionnelle. Si c'est le cas, ces cellules seront sauvées par le « signal tonique » induit par ce nouveau BCR, échapperont donc au destin fatal normalement associé à la LSR. La première observation satisfaisante à propos de notre modèle LSR $\mu$ KI, c'est qu'effectivement la stratégie espérée fonctionne et que le KI résulte en la production d'une quantité faible mais mesurable de chaîne lourde  $\mu$  chimérique humaine.

L'analyse de la sécrétion des différentes classes d'immunoglobulines par les animaux LSR- $\mu$ KI indique que l'insertion du gène C $\mu$  humain en aval de l'élément hs4 de 3'RR semble moduler qualitativement certains aspects de la réponse immunitaire humorale, et notamment l'abondance relative des diverses classes et sous-classes d'Ig. Ainsi, on note une légère diminution de la réponse IgA et IgE basale, avant toute immunisation (IgE), et plus encore 8 jours après immunisation avec des hématies de mouton (IgA et IgE). Les animaux LSR- $\mu$ KI possèdent également dans leur sérum des IgM humaines, taux qui augmente d'un facteur 5 après immunisation. Cet accroissement de la production d'IgM humaines nous confirme au moins que la LSR est un phénomène régulé qui augmente avec l'activation B, et donc on peut naturellement penser qu'il dépend d'une part de l'accessibilité de la 3'RR aux recombinaisons (préférentiellement aux régions switch dans certaines cellules ?), et d'autre part de l'implication d'AID, normalement exprimée uniquement par les lymphocytes B lors du centre germinatif (Mabbott and Gray, 2014). Cependant, la présence d'un taux basal de sécrétion des IgM humaines dans le sérum des animaux LSR- $\mu$ KI élevés en zone exempte d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) nous indique que le mécanisme de LSR peut survenir à bas bruit même dans ces conditions de quasi-repos du système immunitaire, et aboutir à la différenciation de plasmocytes (dont la durée de vie restera à apprécier ?). En plus d'avoir une action sur l'homéostasie de la cellule B durant une réponse immune, la LSR pourrait d'ailleurs aussi être un moyen d'éliminer les lymphocytes B exprimant de façon intempestive ou dérégulée AID en dehors du contexte du centre germinatif. Il a en effet été montré qu'AID peut être exprimée dans les lymphocytes B en développement, certes à faible taux mais de façon significative étant donné que des évènements de CSR et de SHM sont détectables dans de telles conditions (Robbiani and Nussenzweig, 2013).

Des stimulations de lymphocytes B *ex vivo* nous ont permis de démontrer que, dans des conditions où la reconnaissance d'ODN-CpG par le TLR9 provoquait bien une activation des lymphocytes B et la CSR, la LSR n'était quant à elle pas stimulée. Ce type de signal est plutôt lié physiologiquement aux infections virales ou microbiennes intracellulaires, et on le pense aussi impliqué dans le maintien de stimulations antigène-indépendantes des cellules B mémoires ; quel qu'en soit le contexte, nos expériences préliminaires suggèrent que ce stimulus ne serait pas inducteur de LSR.

En revanche, une stimulation *in vitro* par le LPS (et la voie TLR4) induit dans notre modèle la LSR (manifestée pour nous par la sécrétion d'IgM humaine dans le milieu de culture). Les infections bactériennes extracellulaires pourraient donc par la même voie être capables

d'induire une recombinaison suicide dans les lymphocytes B. L'évènement de LSR induit par le LPS est par ailleurs potentialisé avec l'ajout d'IL4 dans le milieu, mimant à la fois un contexte infectieux, et la présence d'une cytokine dont on sait qu'elle peut être d'origine T ( $T_{FH}$  principalement) mais aussi éventuellement produite par les mastocytes stimulés, voire les cellules dendritiques placées en condition TH2). La réponse au LPS seul ou avec de l'IL4 suggère que la LSR est possible lors d'une réponse T indépendante comme T dépendante. Si la réponse T dépendante semble potentialiser la fréquence de LSR, il est également possible que les signaux d'activation reçus par les lymphocytes B soient plus forts, provoquant une prolifération cellulaire et des clusters plus importants, et dès lors augmentant la probabilité d'apparition de la LSR.

Nos expériences en ce domaine restent pour l'instant très préliminaires puisqu'elles ne modélisent pas l'activation du récepteur d'activation central de la cellule B : le BCR. Il nous restera à étudier comment les cellules B se comportent comparativement lors d'une stimulation BCR seule (mimant l'antigène), BCR + TLR4, versus TLR4 seule.

Par ailleurs et de façon pour l'instant totalement inexplicée, nous observons dans notre modèles des anomalies du développement B précoces qui restent à explorer plus en détail. L'analyse des compartiments B de la moelle osseuse nous indique une accumulation des cellules B aux stades pro-B et pro/pré-B dans les souris LSR- $\mu$ KI en comparaison avec des souris sauvages (0,81% contre 0,04% et 0,64% contre 0,35% respectivement). Si le stade large pré-B est légèrement moins représenté dans les animaux transgéniques (0,1% pour les LSR- $\mu$ KI contre 0,16% pour les contrôles), il n'existe que très peu de cellules au stade small pré-B (0,01%) alors que cette population représente 1,5% du total de lymphocytes de la moelle osseuse. La littérature nous indique que l'élément *hs4* de la 3'RR est actif dès le stade pro-B (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995), l'insertion du gène *C $\mu$*  humain en aval de *hs4* pourrait-elle limiter son action lors du développement B, ralentissant le passage des cellules B au stade large pré-B et essentiellement au stade small pré-B ? La population de B immatures dans les souris LSR- $\mu$ KI (1,7%) est lui légèrement plus faible que celui des souris sauvages (2,3%), mais il indique qu'aucun frein n'est présent lors du passage du stade small pré-B au stade immature. Le même phénomène est observé dans la rate. Les populations de lymphocytes B transitionnels T1, et de façon plus marquée pour les T2 et T3, sont plus importantes et peu de cellules semblent se différencier en lymphocytes B folliculaires, faisant chuter le taux des B FO (LSR- $\mu$ KI  $\rightarrow$  T1 = 1,63%, T2 = 4,34%, T3 = 3,26%, FO = 6,25% ; sauvage  $\rightarrow$  T1 = 1,2%, T2 = 1,42%, T3 = 1,74%, FO = 25,23%). Est-ce la construction génétique qui provoque cette répartition cellulaire ou l'évènement de LSR en lui-même qui empêche les cellules transitionnelles de se différencier en lymphocytes folliculaires ? Y a-t'il au contraire en aval un défaut de prolifération des cellules folliculaires ? Ces questions sont pour l'heure sans réponse. Les populations des lymphocytes B1a, B1b et B de la zone marginale, toutes spécialisées dans la réponse humorale rapide et de façon T-indépendante et productrices d'IgM murines principalement, sont plus importantes dans les animaux LSR- $\mu$ KI que chez les animaux sauvages de facteurs allant de 1,3 à 3 (respectivement : 1,48% contre 0,43% pour les B MZ ; 0,17% contre 0,06% pour les B1a ; 1,06% contre 0,8% pour les B1b). Ces données peuvent expliquer le fait que les souris LSR- $\mu$ KI produisent plus d'IgM murine suite à une réponse immune que les souris sauvages (figure 3). La population de lymphocytes B<sub>REGS</sub> qui est 4 fois plus importante chez les LSR- $\mu$ KI (0,16%) que chez les contrôles (0,04%). Le fait que la population de B<sub>REGS</sub> croit lorsque le mécanisme apoptotique de la LSR est en partie annulé

semble indiquer que la recombinaison suicide peut également jouer un rôle dans la régulation des B<sub>REGS</sub>.

L'étude du répertoire V<sub>H</sub> des IgM humaines nous a surpris par son utilisation différente des familles de V<sub>H</sub> et principalement en ce qui concerne la famille V<sub>H</sub>5. Celle-ci n'est utilisée que de 4,5% à 9,5% par les IgM et IgG2b des souris LSR- $\mu$ KI et WT contre 22% par les IgM humaines des souris LSR- $\mu$ KI. La diminution du pourcentage d'utilisation des autres familles de V<sub>H</sub> par les IgM humaines est une conséquence directe de la surutilisation des V<sub>H</sub>5, les proportions d'utilisation des familles entre elles étant inchangées. Il existe 9 segments VH5 fonctionnels sur le locus IgH murin, et tous sont situés dans la partie distale du cluster des gènes V<sub>H</sub>, entre 2 300 et 2 600kb de la partie télomérique 5' du locus IgH. Cependant, les autres gènes V<sub>H</sub> présents dans cette portion du locus qui constituent la famille des VH2 sont moins utilisés dans les IgM humaines que dans les IgM et IgG2b de souris LSR- $\mu$ KI et WT. La surutilisation des V<sub>H</sub>5 n'est donc vraisemblablement pas due à leur localisation sur le locus mais plutôt aux propriétés de liaison des antigènes (ou à d'autres caractères physico-chimiques ?) qu'ils confèrent aux immunoglobulines. Il est intéressant de noter un autre biais des répertoires V<sub>H</sub> déjà rapporté chez l'Homme. Par exemple, la famille des VH5 est surutilisée par les IgE et les IgA présentes dans les muqueuses nasales de patients atteints des rhinites (Coker et al., 2005), ainsi que par les IgE présentes dans le sang, les muqueuses des poumons et la rate de patients asthmatiques (Snow et al., 1995, 1997, 1999). Les V<sub>H</sub>5 sont aussi surabondants dans le sang de patients atteints de dermatose atopique (van der Stoep et al., 1993). Cependant, bien qu'elles portent la même numérotation, les familles V<sub>H</sub>5 murine et humaine ne regroupent pas les mêmes immunoglobulines. Ainsi, la famille V<sub>H</sub>5 murine est plutôt homologue à la famille V<sub>H</sub>3 humaine (de Bono et al., 2004)( <http://www.imgt.org>). Or si les V<sub>H</sub>3 ne semblent pas revêtir une importance quelconque dans les allergies, Il a été montré qu'elles étaient surutilisées par les lymphocytes malins. Différentes études sur différents groupes ethniques ont montré que la famille humaine des V<sub>H</sub>3 est la plus utilisée par les leucémies lymphoïdes chroniques, la macroglobulinémie de Waldenström et certains lymphomes B tels que les lymphomes du MALT (Arons et al., 2006; Bahler et al., 1991; Donisi et al., 2006; Fält et al., 2005), jusqu'à 67% dans une de ces études. Et si le pourcentage d'utilisation est plus faible dans les autres études, il n'en reste pas moins le plus élevé vis-à-vis des autres familles V<sub>H</sub>. De plus, l'utilisation des VH3 est associée à un faible pronostic. Bien sûr, ce n'est à ce stade qu'une conjecture, mais si la famille V<sub>H</sub>3 humaine et la famille V<sub>H</sub>5 de la souris partageaient un même talon d'Achille d'engager les cellules B dans des réponses immunes délétères « pro-lymphomogène », la LSR pourrait donc jouer un rôle dans l'élimination de cellules potentiellement exposées à la transformation tumorale (cellules impliquées dans des stimulations chroniques ? cellules à BCR canoniques spécifiques d'épitopes communs à des auto-antigènes et des Ag microbiens ?).

L'analyse des taux de mutations des CDR1 et 2 des immunoglobulines nous apporte de nouvelles informations associées à de nouvelles interrogations. Globalement, les IgG2b des deux groupes d'animaux, LSR- $\mu$ KI et sauvage, sont plus mutées que les IgM murines (4,92% contre 3,51%, et 2,61% contre 1,35% respectivement). Cette augmentation est cohérente, les IgG2b étant sécrétées par des plasmocytes après transité dans un GC, où les cellules B sont ciblées par AID durant les événements de SHM et de CSR. Les Ig des LSR- $\mu$ KI sont par contre deux fois plus mutées que celles des contrôles. Le seul changement entre les souris sauvages et les LSR- $\mu$ KI consiste en l'insertion du gène C $\mu$  humain en aval de l'élément hs4 de la 3'RR, or si la délétion les éléments hs3b et hs4 n'a pas d'impact majeur sur la SHM (Morvan et al.,

2003), l'ablation totale de la 3'RR réduit la fréquence de la SHM avec seulement un effet mineur sur la transcription (Rouaud et al., 2013). L'insertion du gène C $\mu$  humain pourrait-elle modifier la façon dont la 3'RR interagit avec les gènes du locus IgH à muter lors de la SHM, facilitant le ciblage d'AID et favorisant la SHM ?

La comparaison du taux de mutations des IgM humaines (3,85%) avec celui des IgM murines (3,51% - avant GC) et des IgG2b (4,92% - après GC) des souris LSR- $\mu$ KI le place entre le deux. Ce résultat semble indiquer que les cellules B candidates à la LSR passent bien au sein d'un centre germinatif, où l'évènement de SHM a lieu dans la zone sombre (De Silva and Klein, 2015), avant d'être sélectionnées pour la LSR dans la zone claire. Etant donné la proximité du taux de mutations des IgM humaines avec celui des IgM murines, il est probable que les lymphocytes B qui réalisent la LSR ne restent pas longtemps dans le centre germinatif et sont sélectionnés dès les premiers passages dans la zone claire. Concernant la famille des V<sub>H5</sub>, il est étonnant de constater que celle-ci est bien moins mutée chez les IgM humaines (0,17%) que chez les IgM murines (1,42%) et les IgG2b (1,47%). Le BCR dans sa configuration native soumettrait la cellule B à la sélection par la LSR, et non pas forcément un BCR muté après l'action d'AID et la SHM.

L'évènement de LSR est peut-être rare, et il est à coup sûr fugitif puisque rapidement conclu par la mort cellulaire. En outre, notre modèle ne peut « sauver » que les cellules B où la recombinaison LSR a lieu sur la ou les dernières régions LS. Cette rareté rend la détection des cellules exprimant un BCR à IgM humaine (hIgM) très hasardeuse. Nous n'avons jusqu'ici pu voir en imagerie directe que de rares plasmocytes remplis d'IgM humaines (et attestant de l'accessibilité de notre gène  $\mu$ KI) sur une coupe de rate provenant d'animaux élevés en conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques et immunisés 8 jours avec des hématies de mouton. L'évènement de LSR étant dépendant d'AID, enzyme normalement transcrite qu'au sein des centres germinatifs (Mabbott and Gray, 2014), nous nous attendons à identifier les cellules post LSR dans les GC ou en périphérie de ces GC. A ce jour, nos moyens d'imagerie ne nous permettent pas de dire où se passe l'évènement de LSR et où apparaissent les cellules à BCR IgM humain. Les quelques plasmocytes observés laissent la porte ouverte à toutes les interprétations. Si la LSR est utilisée comme moyen d'élimination des cellules non sélectionnées dans la zone blanche du GC, sont-elles alors été éjectées du GC car elles ne reçoivent pas les instructions nécessaires à un retour dans la zone sombre pour un nouveau cycle de prolifération ? Ces cellules ont-elles achevé leur différenciation en plasmocytes ce qui a provoquer leur sortie du centre germinatif ?

Une autre hypothèse, non exclusive et pouvant rendre compte de l'emplacement de ces cellules hIgM+, serait que AID ait été exprimée de façon aberrante par les lymphocytes B en dehors du GC (Robbiani and Nussenzweig, 2013). La LSR, dépendante d'AID, pourrait aussi être un moyen d'élimination de telles cellules à pouvoir oncogénique parce que stimulées chroniquement par des auto-antigènes. Cette hypothèse serait plus en accord avec le taux basal de production d'IgM humaines dans des animaux LSR- $\mu$ KI élevés en conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques et jamais immunisés par autre chose que leurs propres auto-antigènes !

## Matériels et méthodes

---

### Southern blot

Les southern blots de l'ADN génomique de cellules ES ont été réalisés comme suit : 20µg d'ADN génomique ont été digérés par EcoRI-HF (New England Biolabs) à 37°C durant 16h avant de subir une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% en TAE (20V, 16h). L'ADN a été transféré sur une membrane de nylon (MPBiomedicals, PALL Life Sciences) par transfert passif et est crosslinké par un rayonnement UV. Les sondes 5' et 3' sont marquées au <sup>32</sup>P et sont générées à partir de fragments de Klenow (New England Biolabs).

La sonde 3' est un fragment de 0,6kb issue de la digestion EcoRI-HF du plasmide BEC25.1. La sonde 5' est un fragment de 0,4kb issue de la digestion XbaI du plasmide PA53. Elle contient la partie 3' en aval de l'élément Hs1,2 de la souris.

### Génotypage des animaux LSR-µKI par PCR

La PCR de vérification de la présence/absence de la cassette Néo lors du croisement avec la lignée transgénique se fait par PCR en utilisant les amorces spécifiques 5'néolox 5'-GCCAAGCTAGCTTGGCTGCAGGTCGAGCAGTGTG-3' et 3'néolox 5'-CCGAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTC-3' localisées sur la cassette Néo. L'ADN est dénaturé 5 minutes à 94°C et subit ensuite 32 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation de 45 secondes à 58°C et d'une étape d'élongation d'1 minute à 72°C avant une étape finale d'élongation de 7 minutes à 72°C. Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose 1,2% en TBE et ont une taille attendue de 1100pb.

Les PCR de vérification du statut homozygote/hétérozygote du gène Cµ humain dans la lignée LSR-µKI sont réalisées en utilisant les amorces spécifiques hCmuCH2Fw 5'-CTCCCAAAGTGAGCGTCTTC-3' et hCmuCH2Rev 5'-TTGATGGTCAGTGTGCTGGT-3' pour identifier la présence de Cµ humain, et les amorces spécifiques mLSR-KIwtF2 5'-ACTCCAGCTCTGACTTGTGT-3' et mLSR-KIwtR2 5'-TGCCTCAGAGAGCATGTGTT-3' pour identifier l'absence du gène Cµ humain. L'ADN est dénaturé 2 minutes à 94°C et subit ensuite 32 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 59°C et d'une étape d'élongation de 30 secondes à 68°C avant une étape finale d'élongation de 5 minutes à 68°C. Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose 2% en TBE et ont une taille attendue de 300pb pour la PCR Cµ et 130pb pour la PCR WT.

### Immunsation des souris par des hématies de mouton

Les souris reçoivent une injection intra-péritonéale de 200µL d'hématies de mouton à 50% (Biomérieux). Un prélèvement sanguin a été réalisé à J0 et à J8 après l'immunsation sur chaque animal et le sérum a été isolé.

## Quantification des immunoglobulines sériques murines par dosage ELISA

Les immunoglobulines de différentes classes présentes dans les sérums des souris sont quantifiées par ELISA dans des plaques 96 puits en polycarbonate (Maxisorp Nunc). Les plaques sont traitées la nuit à 4°C à raison de 100µl par puits avec l'anticorps primaire (Southern Biotec, Cell Lab) approprié dilué dans du tampon Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05M (1µg/ml IgG total ; 2µg/ml IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b ; 3µg/ml IgG3 ; 4µg/ml IgA, IgE). La plaque est ensuite vidée et bloquée avec du PBS-BSA 3% (Euromedex) pendant 1h à 37°C. 50µl de sérum dilué au 1/50 dans du PBS-BSA 1% (pur pour les surnageants de culture) est déposé en duplicate dans le premier puits est dilué en cascade de 6 en 6. Le standard (Southern Biotec, Cell Lab) est préparé de telle sorte que le premier puits soit à 400ng/ml puis est dilué en cascade au demi. Les sérums et standards sont incubés 2h à 37°C. Après 3 lavage dans du PBS+Tween20 0,05% (Sigma), 100µl/puits d'anticorps secondaire approprié conjugué à la phosphatase alcaline (Southern Biotec, Cell Lab) dans du PBS-BSA 1% sont ajoutés à la plaque (1µg/ml IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG total ; 2µg/ml IgA, IgE) qui est alors mise à incubée 1h à 37°C. Après deux lavages au PBS+Tween20 0,05% et un lavage au PBS, l'activité de la phosphatase alcaline est mesurée par l'ajout de 100µl/puits de son substrat (suivant les doses recommandées par le fournisseur, Sigmafast p-Nitrophenyl phosphatase Tablets, Sigma) et la réaction est bloquée par l'ajout de 30µl de NaOH 3M. La densité optique est mesurée à 405nm (Multiskan FC, Thermo Scientific).

## Quantification des IgM humaines par dosage ELISA

Les produits plastiques et réactifs sont les mêmes que ceux mentionnés dans le paragraphe « quantification des immunoglobulines sériques murines par dosage ELISA ». Les différences protocolaires sont les suivantes : les sérums sont dilués initialement au 1/10 dans du PBS-BSA 1% et la gamme est issue d'un sérum humain dont le taux en IgM a été préalablement dosé. L'anticorps primaire anti IgM humain (Southern Biotec, clone SA-DA4) est utilisé à 2µg/ml et l'anti corps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (Southern Biotec, clone SA-DA4) est utilisé à 1µg/ml. La lecture optique se fait grâce à 405nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific).

## Stimulation *in vitro*

Les cellules de la rate de souris âgées de 9 mois sont débarrassées de leurs hématies par traitement avec de l'ACK. Elles sont cultivées dans du RPMI (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Lonza), du sodium pyruvate (Lonza), des acides aminés non-essentiels (Lonza), du β-mercaptoéthanol (Sigma), 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de stréptavidine (Gibco). Les splénocytes (1.10<sup>6</sup> cellules/ml) sont stimulées en milieu complet avec du LPS (InvivoGen), IL4 (Prepotech), 1 ou 3µg/ml ODN-CpG (InvivoGen), 1 ou 3µg/ml ODN-CpG contrôle (InvivoGen).

## Marquage en cytométrie en flux

Les différents organes à étudier sont broyés et passés sur tamis cellulaire de 40µm (Fisherbrand, Fisher Scientific). Les hématies sont déplétées par lyse à l'ACK. Les marquages se font sur  $1.10^6$  cellules dans 100µl de milieu RPMI 1640 additionné de 10% de sérum de veau foetal et 2mM d'EDTA avec les panels suivants : I) Marqueurs des cellules B de la moelle osseuse : B220-PC5 (CD45R), CD19-APCH7, CD24-FITC, CD25-APC, CD43-PE, C-kit-BV421, IgM-PECy7 et le 7AAD comme marqueur de viabilité. II) Marqueurs des cellules B de la rate : CD19-APCH7, IgD-V450, CD5-FITC, CD21-PE, CD23-PECy7, IgM-APC et le 7AAD comme marqueur de viabilité. Le marquage se fait pendant 30 minutes à 4°C dans le noir. Les cellules sont ensuite rincées avec 3ml de PBS-EDTA 2mM, centrifugée 5 minutes à 900g, et remises en suspension dans 500µl de PBS-EDTA 2mM. Les cellules sont passées sur le cytomètre LSR II Fortessa (Becton Dickinson) et l'analyse des populations est réalisée à l'aide du logiciel FACS Diva™ (Becton Dickinson).

## Marquage confocal

Les marquages d'immunofluorescence sont réalisés sur des coupes d'organes de 8 microns congelées à -80°C. Les lames sont décongelées et séchées pendant 2h à température ambiante avant d'être fixées à l'acétone froide (-20°C) pendant 20 minutes à -20°C. L'acétone est séchée pendant 10 minutes sous sorbonne. Les coupes sont saturées par un anticorps de chèvre anti IgM de souris, adsorbé sur l'humain (southern Biotech ref 1020-01) dilué au 1/100<sup>ème</sup> en PBS durant la nuit à 4°C. Après deux rinçages rapides et deux rinçages de 5 minutes en PBS, les coupes sont saturées à l'aide d'un anti CD16/32 (fc block, clone 24G2 Becton Dickinson) dilué au 1/50<sup>ème</sup> en PBS durant 10 minutes à température ambiante. Sans rincer, l'anticorps de souris anti IgM humain couplé à l'alexa Fluor 488 (Southern Biotech, clone SA-DA4) dilué au 1/50<sup>ème</sup> en PBS durant 45 minutes à 37°C. Les lames sont ensuite rincées deux fois rapidement puis deux fois 5 minutes en PBS.

## Analyse du répertoire V

Deux groupes KI et WT de 5 animaux immunisés par du SRBC et sacrifiés à J8. Les cellules CD43- sont isolées par tri magnétique (CD43 Microbeads, Miltenyibiotec) et mélangées au sein du groupe. Les ARNs totaux sont extraits par Trizol Reagent (Ambion RNA, Life Technologies). La transcription inverse est réalisée avec le kit SMARTer RACE 5'/3' (Clontech) sur 1µg d'ARN en utilisant des amorces spécifiques des classes d'immunoglobulines (IgM humaine : 5'-CGGGTACTGCTGATGTCAGA-3' ; IgM souris : 5'-CAGGTGAAGGAAATGGTGCT-3' ; IgG2b souris : 5'-GTCCAGACTGCAGGAGAGCT-3') à la place d'oligonucléotides dT. Les ADNc sont ensuite dilués avec 100µl d'eau ultra pure.

Les ADNc sont amplifiés dans une « first round PCR » en utilisant la Taq Phusion (New England Biolabs). L'amorce For universelle est fournie dans le kit de RACE PCR et l'amorce Rev est spécifique des classes d'immunoglobulines et est biotinylée en 5' (IgM humaine : 5'-BIO-ACAAAGTGATGGAGTCGGGA-3' ; IgM souris : 5'-BIO-CTTATCAGACAGGGGGCTCTC-3' ; IgG2b souris : 5'-BIO-TGGACAGGGATCCAGAGTTC-3'). Chaque réaction d'amplification est réalisée 8 fois à partir d'un unique mélange initial avec le protocole suivant : une phase initiale de dénaturation de l'ADN pendant 30 secondes à 98°C et 25 cycles composés d'une étape de dénaturation de 10 secondes à 98°C, un étape d'hybridation de 30 secondes à 70°C et une

étape d'élongation de 30 secondes à 72°C. La réaction se termine par une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les 8 produits PCR d'un même échantillon sont mélangés et purifiés sur colonne (Nucleospin Gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel) et sont mis à migrer sur gel d'agarose 1,2% en tampon TBE. La bande située entre 500 et 700pb est prélevée et purifiée sur colonne.

Les produits PCR purifiés sur gel sont ensuite purifiés en utilisant des billes magnétiques couplées à la streptavidine (Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen). Les billes sont rincées trois fois avec du tampon B&W (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2M NaCl). Les fragments PCR sont incubés avec les billes pendant 1h à température ambiante sous agitation dans le tampon B&W. Les billes sont de nouveau rincées trois fois avec le tampon B&W et l'élution des fragments PCR purifiés se fait pendant 30 minutes à 65°C dans 100µl du tampon d'élution (950µl formamide, 20µl 0,5M EDTA, 30µl H<sub>2</sub>O ultra pure). La fraction d'élution est récupérée et diluée avec 100µl d'eau ultra pure avant d'être purifiée sur colonne.

Les fragments PCR purifiés sont amplifiés dans une « second round PCR » en utilisant la Taq Phusion avec des amorces nichées contenant les adaptateurs « A » et « B » ainsi qu'une séquence de reconnaissance de 10 bases. L'amorce universelle (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-[séquence de reconnaissance unique]-ACGACTACTATAGGGCAAGCAG-3') est utilisée avec les amorces spécifiques des classes d'immunoglobulines (IgM humaine : 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-[séquence de reconnaissance unique]-CTCGTATCCGACGGGAATT-3' ; IgM souris : 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-[séquence de reconnaissance unique]-GGGAAGACATTTGGGAAGGA-3' ; IgG2b souris : 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-[séquence de reconnaissance unique]-CCCAGAGTCACAGAGGAACC-3'). Chaque réaction d'amplification est réalisée 8 fois à partir d'un unique mélange initial avec le protocole suivant : une phase initiale de dénaturation de l'ADN pendant 30 secondes à 98°C et 20 cycles composés d'une étape de dénaturation de 10 secondes à 98°C, un étape d'hybridation de 30 secondes à 65°C et une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C. La réaction se termine par une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les 8 produits PCR d'un même échantillon sont mélangés et purifiés sur colonne et sont mis à migrer sur gel d'agarose 1,2% en tampon TBE. La bande située entre 500 et 700pb est prélevée et purifiée sur colonne.

Le séquençage se fait sur le GS Junior System (454 Life Sciences) suivant les recommandations du fournisseur. Les séquences obtenues sont tronquées à 400pb en amont du gène constant et les combinaisons V<sub>H</sub>D<sub>J</sub>H sont identifiées grâce à l'outil IMGT/HighV-QUEST (<http://www.imgt.org>).

## Annexes

---

### Annexe 1 :

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

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

Science 2012, volume 336, numéro 6083, pages 931-934.

### Annexe 2 :

#### **Recombinaisons suicides du locus IgH, quand le lymphocyte B dépose les armes !**

Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, Cook-Moreau J, Filloux M, Cogné M.

Médecine/Sciences (Paris) 2012, volume 28, numéro 5, pages 551-554.

### Annexe 3 :

#### **AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate.**

Laffleur B, Denis-Lagache N, Péron S, Sirac C, Moreau J, Cogné M.

Oncotarget 2014, volume 5, numéro 5, pages 1118-1131.

### Annexe 4 :

#### **Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression.**

Laffleur B, Duchez S, Tarte K, Denis-Lagache N, Péron S, Carrion C, Denizot Y, Cogné M.

Cell Reports 2015, volume 10, numéro 6, pages 900-909.

## **Annexe 1**

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

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

Science 2012, volume 336, numéro 6083, pages 931-934.

Dans cet article, nous montrons que la région régulatrice en 3' du locus IgH est transcrite et mutée sous l'action d'AID. Des recombinaisons ont également lieu au niveau de régions d'ADN dites LS. Ces régions LS sont conservées (chez les mammifères dont le génôme est disponible) et répétées. Ces recombinaisons, nommées les recombinaisons suicides du locus (LSR), éliminent l'intégralité des gènes constants du cluster et rendent impossible l'expression d'une immunoglobuline à la surface de la cellule B, pourtant cruciale pour sa survie. La fréquence de cet évènement est proche de celui de CSR, ce qui en fait un potentiel régulateur de l'homéostasie des cellules B.

National Institute of Child Health and Human Development (HD008776-06: C.H.L.), the NSFC project (30810103906: S.T. and M.J.). The authors declare no competing financial interests. Supplementary materials accompany the paper on Science Online. **Author contributions:** Project initiation: M.J.; genetics: T.J.W., O.L., C.H.L., R.C.H., C.J.O'K., X.L.; electrophysiology: X.L., M.J., R.C.H., T.J.W.; behavior: S.D., M.M.C., T.J.W., M.J.,

S.T.; imaging: O.L., T.J.W., S.D., M.J.; electronmicroscopy: T.J.W.; immunohistochemistry: C.Y.T.; wrote the paper: M.J., with contributions from all authors.

**Supplementary Materials**  
www.sciencemag.org/cgi/content/full/336/6083/925/DC1  
Materials and Methods

Supplementary Text  
Figs. S1 to S14  
Tables S1 and S2  
References (43–105)

14 October 2011; accepted 13 April 2012  
10.1126/science.1215317

# AID-Driven Deletion Causes Immunoglobulin Heavy Chain Locus Suicide Recombination in B Cells

Sophie Péron, Brice Laffleur, Nicolas Denis-Lagache, Jeanne Cook-Moreau, Aurélien Tinguely, Laurent Delpy, Yves Denizot, Eric Pinaud, Michel Cogné\*

Remodeling of immunoglobulin genes by activation-induced deaminase (AID) is required for affinity maturation and class-switch recombination in mature B lymphocytes. In the immunoglobulin heavy chain locus, these processes are predominantly controlled by the 3' cis-regulatory region. We now show that this region is transcribed and undergoes AID-mediated mutation and recombination around phylogenetically conserved switchlike DNA repeats. Such recombination, which we term locus suicide recombination, deletes the whole constant region gene cluster and thus stops expression of the immunoglobulin of the B cell surface, which is critical for B cell survival. The frequency of this event is approaching that of class switching and makes it a potential regulator of B cell homeostasis.

Immunoglobulin (Ig) production relies on selection of B cells harboring antigen-specific B cell receptors (BCRs). During antigen-driven

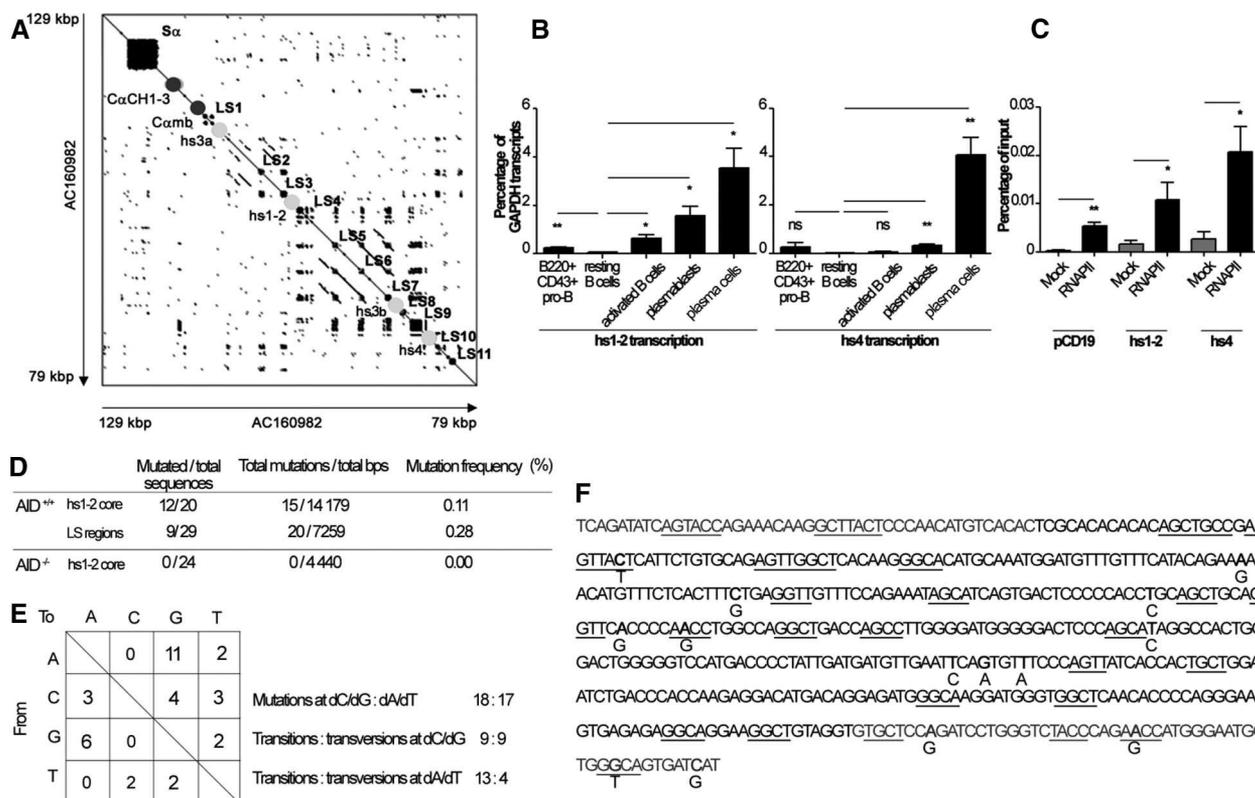
responses, Ig genes are reshaped by activation-induced deaminase (AID)-dependent modifications. After somatic hypermutation (SHM) within

germinal centers (GCs), B cells with the highest affinity Ig variable (V) domains preferentially capture interactions with T cells. In parallel, AID-dependent class-switch recombination (CSR) diversifies Ig classes. CSR affects the Ig heavy chain (IgH) locus by joining repetitive switch (S) regions that precede Ig isotype-determining constant (C) genes.

Besides the selected winners of random AID-mediated SHM, many cells are obviously losers or undesired responders deserving elimination. Although some unfavorable mutations can promote apoptosis (1), abundant survival signals within the GC environment and ligands for nuclear factor  $\kappa$ B-activating surface receptors might also activate bystander cells

Limoges University, CNRS, 2 rue Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: cogné@unilim.fr



**Fig. 1.** The IgH 3'RR contains LS sequences targeted by AID. (A) LS repeats within the mouse 3'RR. (B) Real-time quantitative PCR (qPCR) evaluated hs1-2 and hs4 transcripts in pro-B cells ( $n = 2$ ), resting B cells ( $n = 3$ ), in vitro activated B cells ( $n = 7$  for hs1-2 and  $n = 3$  for hs4), plasmablasts ( $n = 3$ ), and plasma cells ( $n = 5$ ). (C) RNAPII binding. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed without (mock) or with antibodies against RNAPII in vitro

LPS-stimulated B cells ( $n = 3$ ). Enrichment of hs1-2 and hs4 sequences was assessed by real-time qPCR. CD19 promoter (pCD19) was a positive control. (D) Hs1-2 mutation frequency in wild-type (WT) and *Aicda*<sup>-/-</sup> B cells. (E) Hs1-2 mutation spectrum. Number and nature of mutations are depicted. (F) Location of mutations. RGYW and WRCY motifs are underlined. For (B) and (C), results are expressed as mean  $\pm$  SEM. ns, not significant; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (unpaired two-tailed  $t$  test).

with useless BCRs or yield harmful clones that bind self or environmental antigens after random remodeling of the BCR repertoire. Because class-switched antibodies are potent actors of autoimmunity and/or hypersensitivity, means for restricting CSR and reentry of class-switched cells into SHM would help ensure the specificity of immune responses. Yet, how the post-GC repertoire is controlled remains poorly understood.

The mouse IgH locus 3' regulatory region (3'RR) contains four enhancers (hs3a, 1-2, 3b, and 4) with strong B-lineage specificity (2, 3). It undergoes chromatin remodeling after B cell activation and physical interactions with distant promoters, thus controlling germline transcription and CSR to most C genes and contributing to SHM (4–15). Both the mouse and human 3'RRs include inverted repeats and multiple stretches of repetitive DNA (16–19). We analyzed lengths and locations of 3'RR DNA repeats, looking for sequences similar to S regions, which are known to be functionally important (20, 21). In  $S\gamma$ , 5–base pair (bp) repeats are arranged within higher-order 49-bp repeats. Dot-plot analysis of the mouse 3'RR revealed 11 0.5- to 1-kb-long “like- $S\gamma$ ” stretches (LS regions) where 49-bp repeats appeared with a threshold set above 60% iden-

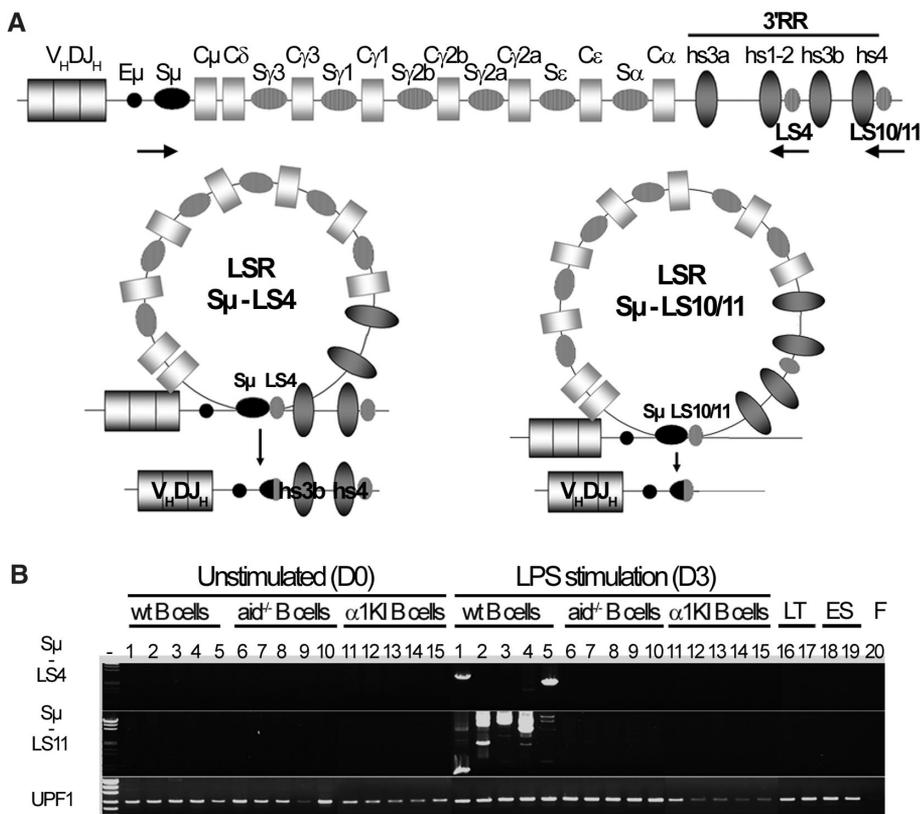
tity (Fig. 1A). LS1 precedes hs3a; six stretches (LS2 to LS7) are included in the palindrome flanking hs1-2, two blocks (LS8 and LS9) follow hs3b, and another two (LS10 and LS11) follow hs4. We performed similar analyses on human, rabbit, and dog, for which complete IgH locus sequences are available. In all four species, LS regions flank both sides of the 3'RR and are interspersed with enhancers. Human LS repeats are better defined, with greater than 80% identity, whereas rabbit and dog LS regions are highly clustered (rabbit LS4 and dog LS3 are longer than  $S\alpha$ ) (fig. S1).

Interspecies conservation of LS repeats suggests that they may have a functional role. Besides their structure, a major feature of S regions is germline transcription before CSR. We thus evaluated mouse 3'RR primary transcription around hs1-2 and hs4 (Fig. 1B). Transcripts were barely detectable in resting B cells but readily appeared upon activation with lipopolysaccharide (LPS). In parallel, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments confirmed that RNA polymerase II (RNAPII) was associated with 3' enhancers in activated B cells (Fig. 1C), a finding that was not commented on but recently appeared in a genome-wide analysis of RNAPII load (22).

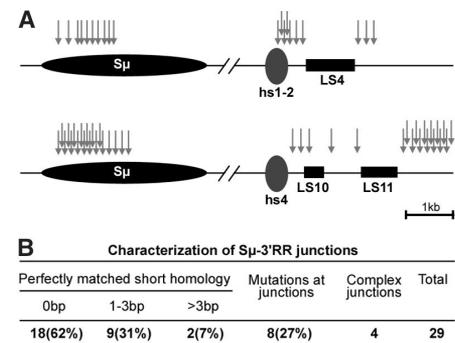
Transcription in activated B cells can result in AID recruitment. V(D)J regions targeted by AID undergo high rates of SHM (above 2% mutations in GC B cells). A much lower off-target rate of AID-mediated mutations affects other non-Ig genes transcribed in B cells (23). The 3'RR elements regulate AID-mediated CSR by physically interacting with AID-targeted IgH promoters (2, 6, 11, 12). We wondered whether transcribed 3'RR elements could also be targeted by AID and undergo SHM. In hs1-2 sequences from activated B cells, we found 0.11% SHM (compared with 1.96% for  $V\kappa J\kappa$  SHM in the same samples) (Fig. 1D). Hs1-2 SHM was restricted to AID-sufficient mice and showed no preference for dA/dT or dC/dG residues (Fig. 1E). AID preferentially targets RGYW and WRCY (where R indicates purine; G, guanine; C, cytosine; Y, pyrimidine; W, adenine or thymine) motifs, whereas the base excision repair and mismatch repair processes generate additional mutations. Like V regions, only one-fourth of 3'RR mutations segregated within RGYW or WRCY (Fig. 1F). SHM appeared higher within LS repeats (0.28%) than within core enhancers, approximating the rate observed for  $S\mu$  in the same cells (0.42%) (Fig. 1E).

Besides trans-acting factors induced by B cell activation, CSR cis requirements include repetitive DNA, transcriptional accessibility, and AID recruitment (24). We thus wondered whether the 3'RR by itself might constitute a substrate for CSR-like recombination and designed primers flanking potential junctions between  $S\mu$  and 3'RR LS regions (Fig. 2A). To avoid the multiple tandem or inverted repeats within the 3'RR and to prevent polymerase chain reaction (PCR) artifacts, we focused on two unique regions following the well-defined LS4 and LS10-LS11 stretches (Fig. 2B and table S1). We were able to detect junctions readily and specifically in activated B cells but not in AID-deficient B cells nor in B cells lacking  $S\mu$  [ $\alpha 1KI$  mice (25)].

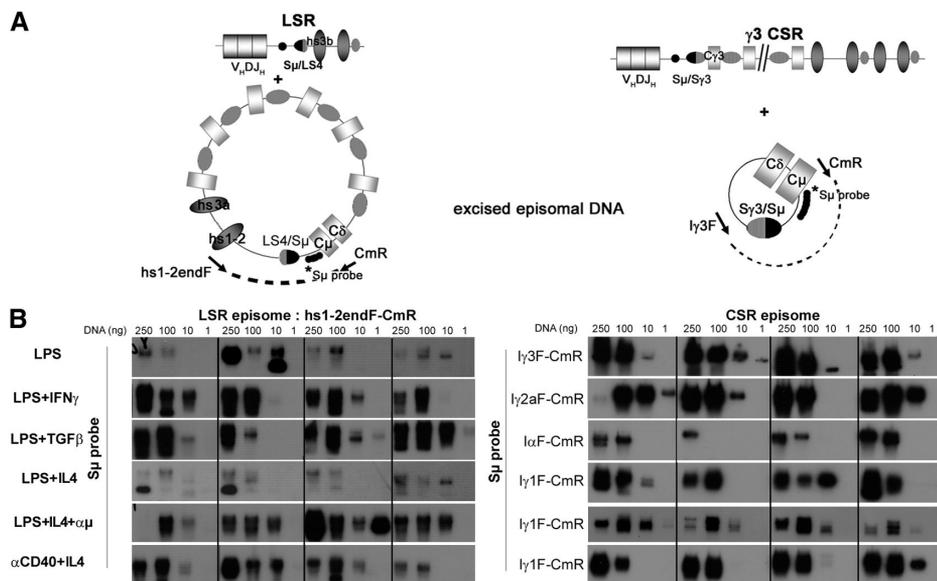
$S\mu$ -to-LS recombination breakpoints were cloned and sequenced (Fig. 3 and fig. S2). By linking the 3'RR and  $S\mu$ , the complete C gene



**Fig. 2.** LSR induction in B cells activated in vitro is AID-dependent. **(A)** LSR between  $S\mu$  and LS4 or LS10-LS11. **(B)** LSR was studied by using nested PCR on splenocytes before and after 3 days of LPS activation from the indicated strains of mice (the experiment was repeated 20 times on WT cells, 7 times on  $AID^{-/-}$  cells, and 5 times on  $\alpha 1KI$  cells).  $\alpha 1KI$  B cells have a deletion of  $S\mu$ . UPF1 amplification is a DNA quality control. D0, day 0; D3, day 3; LT, T lymphocytes; ES, embryonic stem cells; F, fibroblasts.



**Fig. 3.** Characterization of LSR junctions. **(A)** Locations of LSR junction breakpoints (arrows) on  $S\mu$  and 3'RR sequences. **(B)** Characterization of  $S\mu$ -3'RR junctions.



**Fig. 4.** LSR circles in in vitro and in vivo stimulated B cells. **(A)** Amplified CSR and LSR circles. **(B)** DNA dilutions from stimulated WT B cells (from four representative independent experiments) were submitted to a single PCR designed to amplify circles from LSR to the LS4 region or CSR to various C genes. **(C)** Detection of LSR junctions in B cells from unimmunized ( $n = 3$ ) or SRBC- ( $n = 3$ ) or LPS-immunized ( $n = 3$ ) mice.

cluster is deleted, thereby eliminating BCR expression (or Ig secretion for cells engaged in plasma cell differentiation). Given the importance of BCR expression for B cell survival, we call this process locus suicide recombination (LSR). As for CSR, short junctional microhomologies were occasionally observed. Several complex junctions were characterized: In 2 out of 20 Sμ-LS10-LS11 junctions, an intra-Sμ deletion occurred, whereas another case featured a junction from Sμ to Sγ2b and then from Sγ2b to LS10-LS11. Among 13 Sμ-LS4 junctions sequenced, 1 showed a sequential recombination from Sμ to Sγ3 and then to LS4 (fig. S2).

Because LSR deletes the C gene cluster and is thus expected to compromise B cell survival, comparing frequencies of past lethal LSR versus viable CSR events likely underestimates LSR. Instead, we quantified ongoing recombination by amplifying the circles excised from the IgH locus as by-products of AID-mediated chromosomal deletions (Fig. 4). Such circles are devoid of replication origin, and CSR circles are thus not expected to be amplified with proliferation of class-switched cells. To evaluate LSR frequency, we comparatively amplified CSR circles (joining Cμ to a downstream I promoter) and LSR circles (joining Cμ to hs1-2), in serial dilutions of B cell DNA. In activated B cells, we were able to systematically detect LSR circles in 10 ng of DNA (~2000 cells) or occasionally in 1 ng (~200 cells). By using this approach, we found that, in DNA samples from B cells stimulated under a variety of conditions, LSR circles that contained LS4 were detectable in amounts similar to CSR circles (Fig. 4B). Moreover, LSR is likely underestimated because multiple LS stretches are dispersed throughout the mouse 3'RR and not only downstream of hs1-2. Although we did not find LSR junctions in several commonly used cell lines, including mature

B cell and plasma cell lines, they were readily detected in three out of eight IgG class-switched hybridomas, showing that in some cases LSR can only occur on the nonfunctional IgH allele (fig. S3A).

Besides comparing various in vitro B cell stimulation conditions on splenocytes (Fig. 4B), we assayed in vivo stimulated B cells after mouse immunization with LPS or sheep red blood cells (SRBCs) (Fig. 4C). LSR was found in all conditions of in vivo or in vitro B cell activation, and neither cytokines nor BCR cross-linking changed its in vitro occurrence. It was also detected both in marginal zone and follicular B cells sorted from spleens of immunized mice (fig. S3B). Lastly, it was possible by cell cytometry to show one of the likely consequences expected from in vivo occurring LSR, that is, the presence in the spleen of immunized animals of a small proportion of B cells losing BCR expression upon activation (fig. S4). These BCR-negative cells were specifically engaged into apoptosis and significantly differed from BCR-positive cells with regard to annexin V staining (fig. S4B).

AID and the IgH 3'RR are major players in B cell maturation by controlling germline transcription, SHM, and CSR and finally yielding high-affinity BCR and Ig of different isotypes (2). We show that the 3'RR itself undergoes germline transcription specifically in activated B cells. Transcription of RNAs from other enhancers ("eRNAs") was recently reported and correlated with enhancer activity (26). Similarly to C gene germline transcription, 3'RR eRNAs likely promote AID accessibility. Although the IgH locus forms loops through interactions between the 3'RR and S regions before CSR (12, 13), we show that AID also mutates or breaks the 3'RR itself. DNA synapses may thus either join broken S regions for CSR or Sμ and 3'RR, initiating LSR as a competing process. IgH loops

are most likely modulated by costimulatory signals and T-dependent cytokines influencing B cell fate (12). Although LSR frequency varied in some in vitro experiments, it was neither stimulated nor inhibited when interleukin 4 (IL4), transforming growth factor-β (TGFβ), or interferon γ (IFNγ) were added, nor by BCR ligation, as far as we can judge by our semiquantitative genetic assay.

How the CSR/LSR balance is finely regulated in vivo remains to be determined. Conserved LS repeats could also serve unknown functions other than LSR, whereas LSR could preferentially target nonfunctional alleles. However, the latter hypothesis is unlikely because LSR on the nonfunctional allele would have little functional implications and is unlikely to justify the evolutionary conservation of LS sequences. Inactivation of one allele in GC B cells lacking recombination activating gene (RAG) activity cannot allow BCR editing either, and we favor the hypothesis that LSR eliminates some mature B cells by targeting the functional allele (eventually being biallelic upon parallel accessibility to recombination). Beyond IgH locus accessibility, cellular interactions within the GC are the fine modulators selecting high-affinity class-switched clones. In this context, LSR might contribute to B cell homeostasis and lead to B cell death when stimulation is suboptimal, whereas efficient cytokine-dependent germline transcription of C genes in an optimal microenvironment would promote CSR and survival of selected antigen-specific B cell clones. LSR could also help shape the peripheral B cell repertoire if it is regulated by BCR antigen specificity.

**References and Notes**

1. C. C. Goodnow, C. G. Vinuesa, K. L. Randall, F. Mackay, R. Brink, *Nat. Immunol.* **11**, 681 (2010).
2. E. Pinaud et al., *Adv. Immunol.* **110**, 27 (2011).

3. W. Kim, S. Kook, D. J. Kim, C. Teodorof, W. K. Song, *J. Biol. Chem.* **279**, 8333 (2004).
4. V. Giambra *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6123 (2008).
5. F. E. Garrett *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1511 (2005).
6. W. A. Dunnick *et al.*, *J. Exp. Med.* **206**, 2613 (2009).
7. M. Cogné *et al.*, *Cell* **77**, 737 (1994).
8. J. P. Manis *et al.*, *J. Exp. Med.* **188**, 1421 (1998).
9. A. G. Bébin *et al.*, *J. Immunol.* **184**, 3710 (2010).
10. E. Pinaud *et al.*, *Immunity* **15**, 187 (2001).
11. C. Vincent-Fabert *et al.*, *Blood* **116**, 1895 (2010).
12. R. Wuerffel *et al.*, *Immunity* **27**, 711 (2007).
13. Z. Ju *et al.*, *J. Biol. Chem.* **282**, 35169 (2007).
14. H. Duan, H. Xiang, L. Ma, L. M. Boxer, *Oncogene* **27**, 6720 (2008).
15. M. Gostissa *et al.*, *Nature* **462**, 803 (2009).
16. C. Chauveau, M. Cogné, *Nat. Genet.* **14**, 15 (1996).
17. C. Chauveau, E. Pinaud, M. Cogne, *Eur. J. Immunol.* **28**, 3048 (1998).
18. M. A. Sepulveda, F. E. Garrett, A. Price-Whelan, B. K. Birshtein, *Mol. Immunol.* **42**, 605 (2005).
19. E. Pinaud, C. Aupetit, C. Chauveau, M. Cogné, *Eur. J. Immunol.* **27**, 2981 (1997).
20. A. A. Khamlichii *et al.*, *Blood* **103**, 3828 (2004).
21. R. Shinkura *et al.*, *Nat. Immunol.* **4**, 435 (2003).
22. A. Yamane *et al.*, *Nat. Immunol.* **12**, 62 (2011).
23. M. Liu *et al.*, *Nature* **451**, 841 (2008).
24. J. Stavnezer, J. E. Guikema, C. E. Schrader, *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 261 (2008).
25. S. Duchez *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3064 (2010).
26. T. K. Kim *et al.*, *Nature* **465**, 182 (2010).

**Acknowledgments:** We thank T. Honjo for providing  $AID^{-/-}$  mice and F. Lechouane for sorted B cells DNA samples.

We are indebted to the cell sorting facility of Limoges University for excellent technical assistance in cell sorting. This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Institut National du Cancer, and Région Limousin. The data presented in this paper are tabulated here and in the supplementary materials.

#### Supplementary Materials

[www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1218692/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1218692/DC1)  
Materials and Methods  
Figs. S1 to S4  
Tables S1 and S2  
References (27–30)

4 January 2012; accepted 27 March 2012

Published online 26 April 2012;

10.1126/science.1218692

# Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution

Michael J. Booth,<sup>1\*</sup> Miguel R. Branco,<sup>2,3\*</sup> Gabriella Ficiz,<sup>2</sup> David Oxley,<sup>4</sup> Felix Krueger,<sup>5</sup> Wolf Reik,<sup>2,3†</sup> Shankar Balasubramanian<sup>1,6,7†</sup>

5-Methylcytosine can be converted to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) in mammalian DNA by the ten-eleven translocation (TET) enzymes. We introduce oxidative bisulfite sequencing (oxBS-Seq), the first method for quantitative mapping of 5hmC in genomic DNA at single-nucleotide resolution. Selective chemical oxidation of 5hmC to 5-formylcytosine (5fC) enables bisulfite conversion of 5fC to uracil. We demonstrate the utility of oxBS-Seq to map and quantify 5hmC at CpG islands (CGIs) in mouse embryonic stem (ES) cells and identify 800 5hmC-containing CGIs that have on average 3.3% hydroxymethylation. High levels of 5hmC were found in CGIs associated with transcriptional regulators and in long interspersed nuclear elements, suggesting that these regions might undergo epigenetic reprogramming in ES cells. Our results open new questions on 5hmC dynamics and sequence-specific targeting by TETs.

5-Methylcytosine (5mC) is an epigenetic DNA mark that plays important roles in gene silencing and genome stability and is found enriched at CpG dinucleotides (1). In metazoa, 5mC can be oxidized to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) by the ten-eleven translocation (TET) enzyme family (2, 3). 5hmC may be an intermediate in active DNA demethylation but could also constitute an epigenetic mark per se (4). Levels of 5hmC in genomic DNA can be quantified with analytical methods (2, 5, 6) and mapped through the enrichment of 5hmC-containing DNA frag-

ments that are then sequenced (7–13). Such approaches have relatively poor resolution and give only relative quantitative information. Single-nucleotide sequencing of 5mC has been performed by using bisulfite sequencing (BS-Seq), but this method cannot discriminate 5mC from 5hmC (14, 15). Single-molecule real-time sequencing (SMRT) can detect derivatized 5hmC in genomic DNA (16). However, enrichment of 5hmC-containing DNA fragments is required, which causes loss of quantitative information (16). Furthermore, SMRT has a relatively high rate of sequencing errors (17), and the peak calling of modifications is imprecise (16). Protein and solid-state nanopores can resolve 5mC from 5hmC and have the potential to sequence unamplified DNA (18, 19).

We observed the decarbonylation and deamination of 5-formylcytosine (5fC) to uracil (U) under bisulfite conditions that would leave 5mC unchanged (Fig. 1A and supplementary text). Thus, 5hmC sequencing would be possible if 5hmC could be selectively oxidized to 5fC and then converted to U in a two-step procedure (Fig.

1B). Whereas BS-Seq leads to both 5mC and 5hmC being detected as Cs, this “oxidative bisulfite” sequencing (oxBS-Seq) approach would yield Cs only at 5mC sites and therefore allow us to determine the amount of 5hmC at a particular nucleotide position by subtraction of this readout from a BS-Seq one (Fig. 1C).

Specific oxidation of 5hmC to 5fC (table S1) was achieved with potassium permanganate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). In our reactivity studies on a synthetic 15-nucleotide oligomer single-stranded DNA (ssDNA) containing 5hmC, we established conditions under which K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> reacted specifically with the primary alcohol of 5hmC (Fig. 2A). Fifteen-nucleotide oligomer ssDNA that contained C or 5mC did not show any base-specific reactions with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (fig. S1, A and B). For 5hmC in DNA, we only observed the aldehyde (5fC) and not the carboxylic acid (20), even with a moderate excess of oxidant. The K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> oxidation can oxidize 5hmC in samples presented as double-stranded DNA (dsDNA), with an initial denaturing step before addition of the oxidant; this results in a quantitative conversion of 5hmC to 5fC (Fig. 2B).

To test the efficiency and selectivity of the oxidative bisulfite method, three synthetic dsDNAs containing either C, 5mC, or 5hmC were each oxidized with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and then subjected to a conventional bisulfite conversion protocol. Sanger sequencing revealed that 5mC residues did not convert to U, whereas both C and 5hmC residues did convert to U (fig. S2). Because Sanger sequencing is not quantitative, to gain a more accurate measure of the efficiency of transforming 5hmC to U, Illumina (San Diego, California) sequencing was carried out on the synthetic DNA containing 5hmC (122-nucleotide oligomer) after oxidative bisulfite treatment. An overall 5hmC-to-U conversion level of 94.5% was observed (Fig. 2C and fig. S14). The oxidative bisulfite protocol was also applied to a synthetic dsDNA that contained multiple 5hmC residues (135-nucleotide oligomer) in a range of different contexts that showed a similarly high conversion efficiency (94.7%) of 5hmC to U (Fig. 2C and fig. S14). Last, the K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> oxidation was carried out on genomic DNA and showed through mass spectrometry a quantitative conversion of 5hmC to

<sup>1</sup>Department of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge CB2 1EW, UK. <sup>2</sup>Epigenetics Programme, Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK. <sup>3</sup>Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EG, UK. <sup>4</sup>Proteomics Research Group, Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK. <sup>5</sup>Bioinformatics Group, Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK. <sup>6</sup>School of Clinical Medicine, University of Cambridge, Cambridge CB2 0SP, UK. <sup>7</sup>Cancer Research UK, Cambridge Research Institute, Li Ka Shing Centre, Cambridge CB2 0RE, UK.

\*These authors contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: wolf.reik@babraham.ac.uk (W.R.); sb10031@cam.ac.uk (S.B.)

**Annexe 2 :**

**Recombinaisons suicides du locus IgH, quand le lymphocyte B dépose les armes !**

Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, Cook-Moreau J, Filloux M, Cogné M.

Médecine/Sciences (Paris) 2012, volume 28, numéro 5, pages 551-554.

Cet article présente l'évènement de recombinaison du locus IgH des immunoglobulines (LSR), décrit pour la première fois dans la revue medecine/sciences (Péron et al., 2012a).



## Recombinaisons suicides du locus IgH

### Quand le lymphocyte B dépose les armes !

Sophie Péron, Brice Laffleur, Nicolas Denis-Lagache, Jeanne Cook-Moreau, Matthieu Filloux, Michel Cogné

Université de Limoges ; CNRS UMR 7276, contrôle de la réponse immune B et lymphoproliférations (CRIBL), 2, rue Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

[cogne@unilim.fr](mailto:cogne@unilim.fr)

#### Commutation de classe et hypermutation somatique, événements majeurs contrôlés par AID

Lors d'une réponse immune, les lymphocytes B mûrs activés par l'antigène recombinent les gènes codant leur immunoglobuline (Ig) membranaire (*B cell receptor* ou BCR). Cette recombinaison de *class switch* (CSR) - ou commutation de classe - délète le gène  $C\mu$  du locus codant la chaîne lourde d'Ig sous l'action de l'enzyme AID (*activation-induced deaminase*) et permet de diversifier la fonction des Ig par commutation d'IgM (chaîne lourde  $\mu$ ) vers IgG, IgA ou IgE<sup>1</sup> [1-3]. AID attaque l'ADN au niveau des cytosines et peut ainsi déclencher soit le processus d'hypermutation somatique

(SHM) des régions variables (V)<sup>2</sup> pour améliorer leur affinité pour l'antigène, soit la recombinaison de CSR, grâce à des cassures d'ADN double-brin au voisinage de régions cibles très répétitives du locus IgH (H pour *heavy chain* ou chaîne lourde), les régions *switch* (S). Ces événements diversifient dans les deux cas les effecteurs de la réponse immunitaire. Les deux événements, SHM comme CSR, nécessitent la transcription des régions cibles sous le contrôle d'activateurs situés à l'extrémité 3' du locus IgH, dans la région 3' régulatrice (3'RR) [4, 5]. Des activateurs (*enhancers*) transcriptionnels s'y trouvent, au nombre de 4 chez la souris (hs3a, hs1-2, hs3b et hs4) et de 3 chez l'homme (hs3, hs1-2 et hs4, mais avec deux copies de la 3'RR en aval du gène  $C\alpha1$  et du gène  $C\alpha2$ ) (Figure 1). Alors que ces activateurs sont individuellement faibles et en partie redondants, il existe entre eux une forte synergie [6]. Ensemble, ils donnent à la

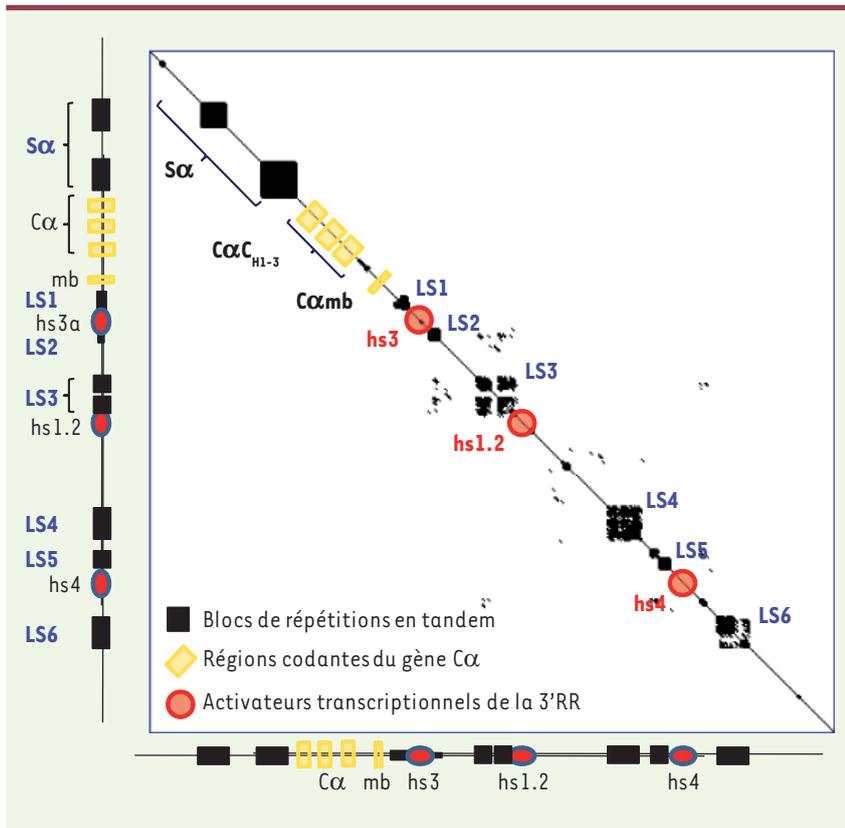
3'RR une spécificité B très stringente et un potentiel activateur surpassant celui des éléments situés en amont sur le locus (régions intergéniques V-D, *enhancer* DQ52, *enhancer*  $\epsilon\mu$ , etc.). On peut aussi considérer que les éléments 5' ont une action qui est restreinte aux étapes précoces du développement B et au contrôle des réarrangements VDJ. À l'inverse, la 3'RR se cantonne (mais avec un rôle dominant) à la régulation des événements génétiques tardifs de la maturation B, lors des réponses immunes [4].

#### Une nouvelle cible de AID : les régions LS de la région 3'RR entraînant des recombinaisons suicides du locus IgH

De façon inattendue, nous avons récemment observé que les activateurs transcriptionnels de la 3'RR sont eux-mêmes transcrits et mutés par l'enzyme AID dans les cellules B activées [7]. Cette notion mérite d'être considérée au regard du caractère très particulier de la 3'RR : les activateurs 3' du locus IgH sont flanqués de séquences répétitives ressemblant aux régions S [8, 9] (que nous avons dénommées régions LS), présentes à des positions phylogénétiquement conservées chez les espèces de mammifères pour lesquelles la séquence du locus IgH est disponible. Finalement, la triade « transcription + structure répétitive + ciblage par AID »

<sup>1</sup> « Les immunoglobulines M (IgM) qui portent une chaîne lourde  $\mu$ , représentent la première classe d'anticorps synthétisée par les lymphocytes B quand ils se différencient en plasmocytes. Dans le gène codant pour les immunoglobulines, les régions constantes (définissant les différents isotypes) sont organisées de telle façon que l'exon  $\mu$  est le premier en 5', suivi de l'exon  $\delta$ , puis  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , et finalement  $\alpha$ . La commutation isotypique consiste en la substitution de la chaîne lourde (H) de l'IgM par celle d'un autre isotype (IgG, IgA, IgE) sans que la spécificité antigénique (portée par la région variable [V] des immunoglobulines) soit modifiée. Cet événement nécessite la recombinaison somatique entre deux régions S (*switch*) situées en amont de chaque région constante  $C_H$  (*constant heavy*) des chaînes lourdes des immunoglobulines. Un autre événement, l'introduction de mutations somatiques dans la région V, est un préalable nécessaire à la sélection positive des cellules B présentant un récepteur de l'antigène (BCR) de forte affinité. Les cellules B exprimant un récepteur de faible affinité sont sélectionnées négativement et meurent par apoptose. » (repris de *m/s* 2003, vol 19, n° 2, pp. 139-41) [12].

<sup>2</sup> « La maturation de l'affinité des anticorps au cours de la réponse immunitaire correspond à la sélection, dans la population des lymphocytes B à mémoire, des cellules présentant la meilleure affinité contre l'agent infectieux, ce qui permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une nouvelle rencontre avec ce pathogène. Ce processus bien connu fonde la démarche vaccinale. La modification du répertoire des gènes des immunoglobulines au cours de l'activation des lymphocytes B représente cependant, en termes moléculaires, un mécanisme biologique unique chez les eucaryotes supérieurs. Elle consiste en effet en une mutagenèse localisée, induite par l'agent infectieux, aboutissant à l'évolution accélérée des acteurs précisément mobilisés pour son élimination. » (repris de *m/s* 2007, vol 23, n° 5 ; pp. 470-2) [13].



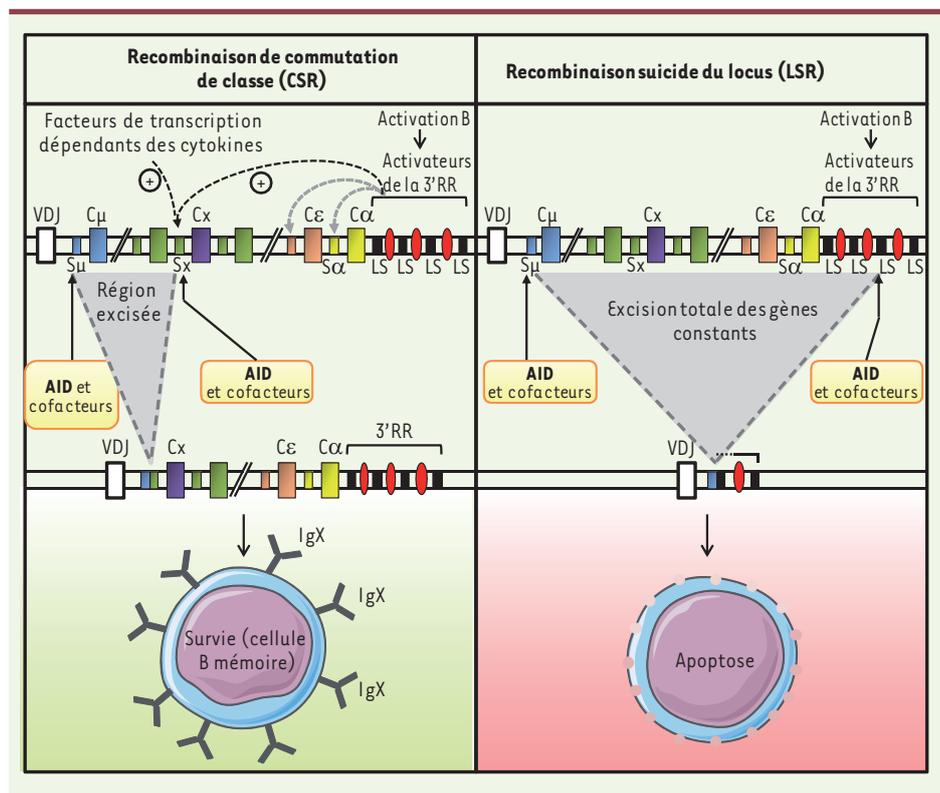
**Figure 1. Mise en évidence par un diagramme dot plot de séquences répétitives.** Les séquences LS (de structure voisine de celle des régions S du locus IgH) parsèment la région 3' régulatrice (3'RR) en aval du gène *Cα2* humain. La séquence (incluant la région *Sα*, le gène *Cα* et la totalité de la 3'RR) est analysée par blocs successifs de 49 bases sur l'axe horizontal, et comparée avec elle-même sur l'axe vertical. Chaque point noir dans le diagramme marque la présence d'un bloc de 49 bases, répété avec une homologie  $\geq 80\%$ , les séquences hautement répétitives prennent donc l'aspect de carrés. La position du gène codant la chaîne lourde de l'IgA2 est indiquée (en jaune), de même que celle des 3 activateurs de la 3'RR (cercles rouges).

correspond à trois pré-requis de l'accessibilité des régions S aux recombinaisons. En effet, nous avons pu mettre en évidence au niveau de la 3'RR l'occurrence de cassures double brin au voisinage des séquences LS selon un processus voisin de la CSR [7]. Les recombinaisons ainsi suscitées associent alors la région S la plus en amont du locus (région  $S\mu$  en amont du gène  $C\mu$ ) aux sites LS situés au sein de la 3'RR, complètement en aval du locus. Ces recombinaisons provoquent donc une délétion complète de l'ensemble des gènes constants qui revient à inactiver le locus IgH. L'expression membranaire du BCR et le « signal tonique » de survie qu'il induit étant indispensables au lymphocyte B, une telle inactivation du locus

IgH fonctionnel a pour corollaire la mort de la cellule B concernée. Nous avons donc dénommé ces délétions géniques « recombinaisons suicides du locus IgH » (*locus suicide recombination* ou LSR). Ces événements sont détectables dans les cellules B seulement lors de leur activation, et sont absents chez des animaux déficients pour l'enzyme AID, ou dont la région  $S\mu$  a été remplacée par une séquence non répétitive [7]. Ces pré-requis confirment la parenté entre deux recombinaisons contrôlées par AID : CSR assurant le changement de classe du BCR et ainsi la survie de lymphocytes B mémoires, et LSR induisant l'élimination vraisemblable des cellules B qu'elle affecte (Figure 2).

## Fréquence des recombinaisons suicides

Dans une première approche de détection directe des recombinaisons LSR sur le locus IgH lui-même, les jonctions LSR nous sont apparues comme 10 à 100 fois plus rares que les jonctions CSR. Cependant, il était clair que les cellules activées étudiées ne bénéficient pas du même destin selon qu'elles subissent une commutation de classe autorisant survie et prolifération ou bien une recombinaison suicide probablement rapidement fatale. Nous avons donc cherché à quantifier non pas le produit final, mais plutôt un sous-produit transitoire de ces recombinaisons : l'épissome circularisé sous la forme duquel sont excisées les séquences délétées sous l'action d'AID. Dans cette deuxième approche, nous observons, en étudiant des dilutions successives d'ADN de différentes populations de cellules B activées, que des épisomes de LSR sont souvent détectables dans des quantités d'ADN de l'ordre du nanogramme (l'équivalent d'environ 200 cellules), c'est-à-dire à une fréquence approchant celle des épisomes de CSR au sein des mêmes échantillons d'ADN. Les méthodes de PCR à longue distance nous ont aussi permis de cloner et séquencer les jonctions de LSR : elles sont observées surtout entre les régions  $S\mu$  et 3'RR. Seule une faible fraction des événements observés correspond à des jonctions complexes de  $S\mu$  sur une région  $S\gamma$ , puis de cette région  $S\gamma$  sur la région 3'RR. Certains hybridomes révèlent des événements de LSR qui coexistent avec l'expression d'une Ig fonctionnelle et qui impliquent donc un allèle non fonctionnel. Cependant, de même que la CSR cible le plus souvent le même gène codant la région constante symétriquement sur les 2 allèles IgH, il est probable que la LSR soit, elle aussi, majoritairement bi-allélique. *In vivo*, nous avons objectivé des événements LSR aussi bien dans les cellules B folliculaires que dans celles de



**Figure 2. Recombinaisons initiées par AID sur le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines.** Les recombinaisons de commutation de classe et les « recombinaisons suicides » du locus ont les mêmes pré-requis avec la transcription des régions cibles de structure répétitive, puis avec une attaque de ces régions initiée par la déméthylation des cytosines par AID. Leur issue est cependant totalement différente : la commutation de classe est notamment associée à la sélection des cellules B mémoires, tandis que les recombinaisons suicides conduisent à l'élimination des cellules concernées.

la zone marginale<sup>3</sup>, et nous avons aussi observé que l'activation B se traduit, *in vivo* comme *in vitro*, par l'apparition fugitive d'une population de cellules ayant perdu l'expression du BCR et, de ce fait, engagées dans un processus d'apoptose.

### Conclusion : comment se fait le choix entre CSR et recombinaison suicide ?

Au final, ces observations montrent que deux acteurs majeurs du *switch* et de l'hypermutation somatique, l'enzyme AID comme facteur « *trans*-activateur » et la 3'RR comme facteur « *cis*-activateur », sont non seulement capables de partenariat pour agir sur les régions S ou V, mais aussi d'interactions directes qui définissent la 3'RR comme une nouvelle cible d'AID. La transcription de

séquences *enhancers* est, pour sa part, un phénomène potentiellement général et des eARN issus d'autres *enhancers* ont été récemment caractérisés. Ceci révèle sans doute simplement la parenté entre promoteurs et activateurs transcriptionnels et le fait que la transcription peut n'être qu'un témoin de l'accessibilité d'une région chromatinienne [10]. Au contraire, le contexte particulier du locus IgH, son exposition à l'action d'AID dans les centres germinatifs et la conservation interspécies de régions LS suggèrent ensemble une fonction des eARN de la 3'RR, et posent de nombreuses questions : comment est régulé le choix entre CSR et LSR ? Existe-t-il, comme c'est le cas pour la CSR vers les divers gènes codant les régions constantes des chaînes lourdes, un contrôle T-dépendant des interactions entre les régions ciblées par AID et susceptibles de former « une synapse » pour recombiner entre elles [11] ? La qualité de la reconnaissance par le BCR de l'antigène présenté au niveau des cellules folliculaires den-

dritiques pourrait-elle plutôt entraîner les cellules B les plus affines vers des événements de CSR et d'hypermutation somatique ? Une reconnaissance sous-optimale de l'antigène et/ou une co-stimulation sous-optimale par le micro-environnement du centre germinatif conduirait-elle plutôt d'autres cellules B vers la LSR, ce qui aboutirait à leur élimination ? Clairement, ces questions méritent maintenant d'être étudiées. Alors que les modalités de contrôle du répertoire préimmunitaire des cellules B sont aujourd'hui bien connues, la description du phénomène de LSR offre une nouvelle piste pour la régulation potentielle du répertoire secondaire des cellules B, au-delà du centre germinatif. ♦

### IgH locus suicide recombination, or when B cells surrender!

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par l'ARC (Association pour la recherche sur le cancer), la Ligue nationale contre le cancer, le Cancéropôle Grand Sud-Ouest, l'INCa (Institut national du cancer) et la région Limousin.

<sup>3</sup> Les cellules B folliculaires sont dans les centres germinatifs des ganglions et de la pulpe blanche de la rate ; la zone marginale, à la frontière de cette pulpe blanche, représente un lieu stratégique de détection et de contrôle précoce des antigènes véhiculés par le sang.



### **Annexe 3 :**

#### **AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate.**

Laffleur B, Denis-Lagache N, Péron S, Sirac C, Moreau J, Cogné M.

Oncotarget 2014, volume 5, numéro 5, pages 1118-1131.

Dans cette revue, nous décrivons l'importance que joue AID dans le destin du lymphocyte B au travers de plusieurs points.

- 1) La fonction d'AID et ces cibles d'action.
- 2) La descriptions des existances possibles du lymphocyte B en fonction du type de BCR sélectionné lors de la CSR, en décrivant tout particulièrement le cas particulier du BCR IgE.
- 3) L'élimination des lymphocytes B durant l'évènement de LSR.
- 4) Le développement et les caractéristiques des lymphocytes B mémoires.
- 5) L'implication d'AID et du signal du BCR dans les mécanismes de lymphomagénèse.

# AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate

Brice Laffleur<sup>1,2</sup>, Nicolas Denis-Lagache<sup>1,2</sup>, Sophie Péron<sup>1,2</sup>, Christophe Sirac<sup>1,2</sup>, Jeanne Moreau<sup>1,2</sup> and Michel Cogné<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Limoges University, Limoges France ;

<sup>2</sup> Centre National de la Recherche Scientifique,

<sup>3</sup> Institut Universitaire de France, Limoges, France

**Correspondence to:** Michel Cogné, **email:** [cogne@unilim.fr](mailto:cogne@unilim.fr)

**Keywords:** AID; B cell fate; BCR, immunoglobulin genes

**Received:** October 28, 2013

**Accepted:** December 12, 2013

**Published:** December 14, 2013

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## ABSTRACT:

**Survival and phenotype of normal and malignant B lymphocytes are critically dependent on constitutive signals by the B cell receptor (BCR) for antigen. In addition, either antigen ligation of the BCR or various mitogenic stimuli result in B cell activation and induction of activation-induced deaminase (AID). AID activity can in turn mediate somatic hypermutation (SHM) of immunoglobulin (Ig) V regions and also deeply remodel the Ig heavy chain locus through class switch recombination (CSR) or locus suicide recombination (LSR). In addition to changes linked to affinity for antigen, modifying the class/isotype (i.e. the structure and function) of the BCR or suddenly deleting BCR expression also modulates the fate of antigen-experienced B cells.**

## 1. AID FUNCTION AND SITES OF ACTION

Activation-induced deaminase (AID), an ancestral AID/APOBEC family member, deaminates DNA cytidines into uridines within immunoglobulin (Ig) variable (V) regions in all vertebrate species carrying B cells, thus supporting their Ag-driven diversification through gene conversion (GCV) and/or somatic hypermutation (SHM) [1]. It also diversifies expression of Ig heavy chain (IgH) constant (CH) regions in frogs, birds and mammals, who have developed class switch recombination (CSR) of CH genes.

AID was first identified as specifically expressed during the antigen-driven B cell maturation that mostly occurs in germinal centers (GC) of peripheral lymphoid organs [2]. It is mandatory for SHM and CSR [3] while its defect in patients results in hyper-IgM immune deficiency [4]. Its random mutagenic activity alters V domain complementarity determining regions, and thus modulates BCR (and later on antibody) binding affinity in a selection process where SHM is coordinated with cell competition for optimal intra-GC interactions with antigen-presenting cells [5]. In some mammals, especially in cattle, AID-mediated SHM can also begin in fetal gut associated lymphoid tissues prior to any contact with exogenous

antigens [6].

Biochemically, G:U mismatches created through AID deamination can be processed in several ways, preferentially leading to mutations rather than repair within Ig genes. In « phase 1 » mutations, direct replication across a G:U mismatch can generate transitions from G:C to A:T base pairs. Base excision repair (BER) and uracil removal by uracil N-glycosylase (UNG) instead generate abasic sites, which subsequently undergo DNA nicking by apurinic/apyrimidinic endonuclease, and are repaired during replication by error-prone DNA polymerases as both transitions and transversions. G:U mismatches can also be processed by the mismatch repair (MMR) pathway involving MSH2/MSH6, with associated error-prone DNA polymerases and then result in patches of « phase 2 » mutations at both G:C and (preferentially) A:T base pairs around targeted cytosines.

Primary regulation of AID activity in B cells relies on its strictly controlled tissue-specific and stage-specific expression upon cell activation, due to control of the level of AID transcripts by both ubiquitous and lymphoid-specific transcription factors (Pax-5, STAT6, SP1, C/EBP) and miRNAs (miR155 and miR181b). This ensures high AID expression only in activated B cells with appropriate signals, as occurring within GCs upon interaction with

follicular dendritic cells and T follicular helper cells. In addition, AID can appear at low levels in some bone marrow developing B cells upon stimulation of toll like receptors (TLR) [7, 8].

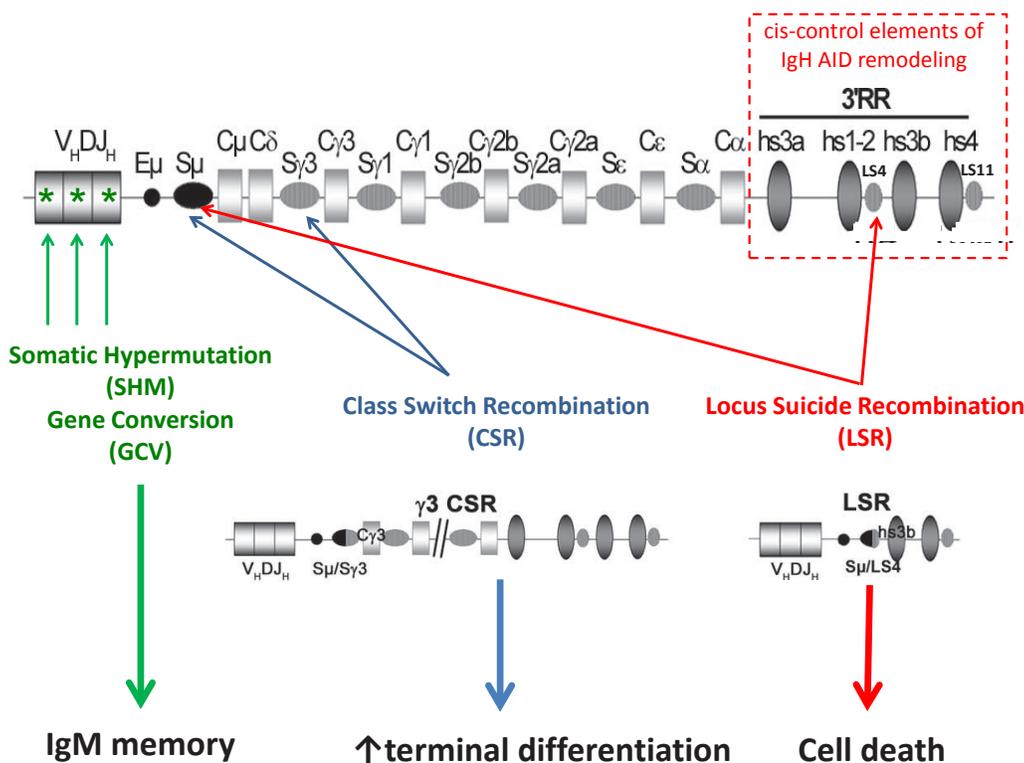
AID requires transcription of target regions and also preferentially deaminates cytosine into uracil within WRC motifs (W = A/T, R = A/G) [9]. Besides potential constraints concerning the “accessibility” of target DNA, another major link between AID targeting and transcription is that AID loading onto Ig genes requires physical interaction with stalled RNAPII and bound Spt5 that occurs immediately downstream from transcription start sites [10]. The RNAPII associated polymerase associated factor (PAF) complex also helps recruit AID [11]. CH regions are protected from AID attack due to the absence of RNAPII pausing. Switch (S)-region transcription before AID recruitment is under the control of cytokine-dependent germline promoters preceding CH regions and a series of B cell activation-dependent transcriptional enhancers located in the 3’ regulatory region (3’RR) of the IgH locus [12–15]. While AID generates mutations in V regions, it initiates DNA breaks (DSBs) in S regions, thereby promoting large deletions [16, 17]. DSBs activate the ubiquitous DNA damage response, which is then resolved through classical (C-) or alternative non-homologous end joining

(A-NHEJ). Recruitment of 53BP1 and Rif1 [18] to broken DNA ends (and subsequent formation of  $\gamma$ H2AX foci) is required for protection of DNA ends from resection before repair and ligation by C-NHEJ rather than A-NHEJ [19, 20]. AID recruitment to both V and S regions (and S-S region synapses, likely favored by IgH locus DNA loops) requires IgH 3’RR enhancer activity elements [13] [15] [14] [21] [22]. Multiple 3’RR genetic alterations affected transcription of AID targeted regions [12–15]. However, transcription was often partially reduced while being associated with complete CSR and/or SHM blockades. In addition to boosting transcription, the 3’RR thus likely promotes AID activity through epigenetic changes of targets, or by attracting and recruiting AID and/or AID partners. Figure 1 resumes the different targets of AID in the IgH locus.

## 2. CSR AND BCR CLASS-SPECIFIC CONTROL OF B CELL FATE

### 2.1. Structure and function of the B Cell Receptor

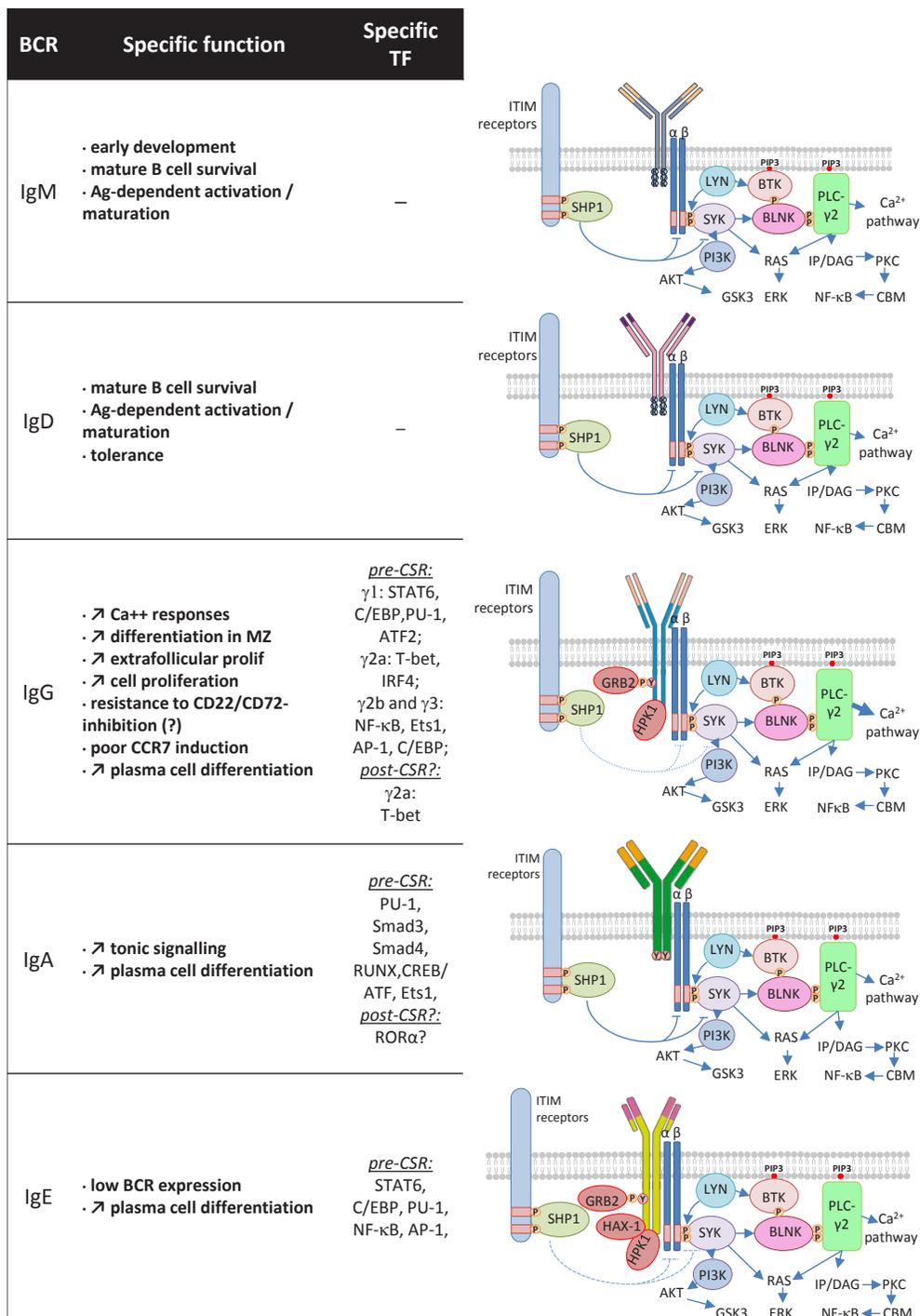
The B cell receptor is composed of a membrane-bound immunoglobulin (mIg) associated with the



**Figure 1: AID targeting of the IgH locus.** Upon B cell activation, induced AID expression remodels Ig gene V regions through SHM or eventually gene conversion (GCV), generating B cell receptors of improved affinity for antigen. B cells, in parallel or later, diversify the BCR class through class switch recombination (CSR). Locus suicide recombination (LSR) eventually joins the switch  $\mu$  region (S $\mu$ ) with one of the like-switch (LS) repetitive regions located within the 3’ regulatory region (3’RR), then deletes all IgH constant genes and switches off BCR expression, thus leading to B cell death.

disulfide-linked heterodimer transducing module CD79A / CD79B (Iga / Igβ). The mIg is composed of two heavy (H) and two light (L) chains, each including a variable (V) domain encoded after RAG-mediated recombination of Ig gene segments (for review [23]). Within mIgs, constant (C) regions carry additional transmembrane and cytoplasmic

domains which support interactions with Iga/β and then accessory receptors and downstream intracellular signaling cascades including the src kinases Syk, Lyn and adaptor proteins such as BLNK for interactions with PLCγ2, PI3K, calcium and glucose transporters. IgH C domains confer their class specific effector functions to the corresponding



**Figure 2: BCR class and signaling cascades.** Some specific functions of the various BCR classes are indicated (left). Specific transcription factors expressed before CSR to a given class (and eventually after CSR) are mentioned (middle). Each BCR class is represented as a membrane Ig associated with the Iga/β signaling modules (right). The three amino acids (KVK) of the IgM and IgD BCR and longer intra-cytoplasmic tails of other classes are shown. The main signaling proteins and pathways that are common or most likely specific to these BCR classes are represented (right).

secreted Ig.

## 2.2. IgM/IgD BCR

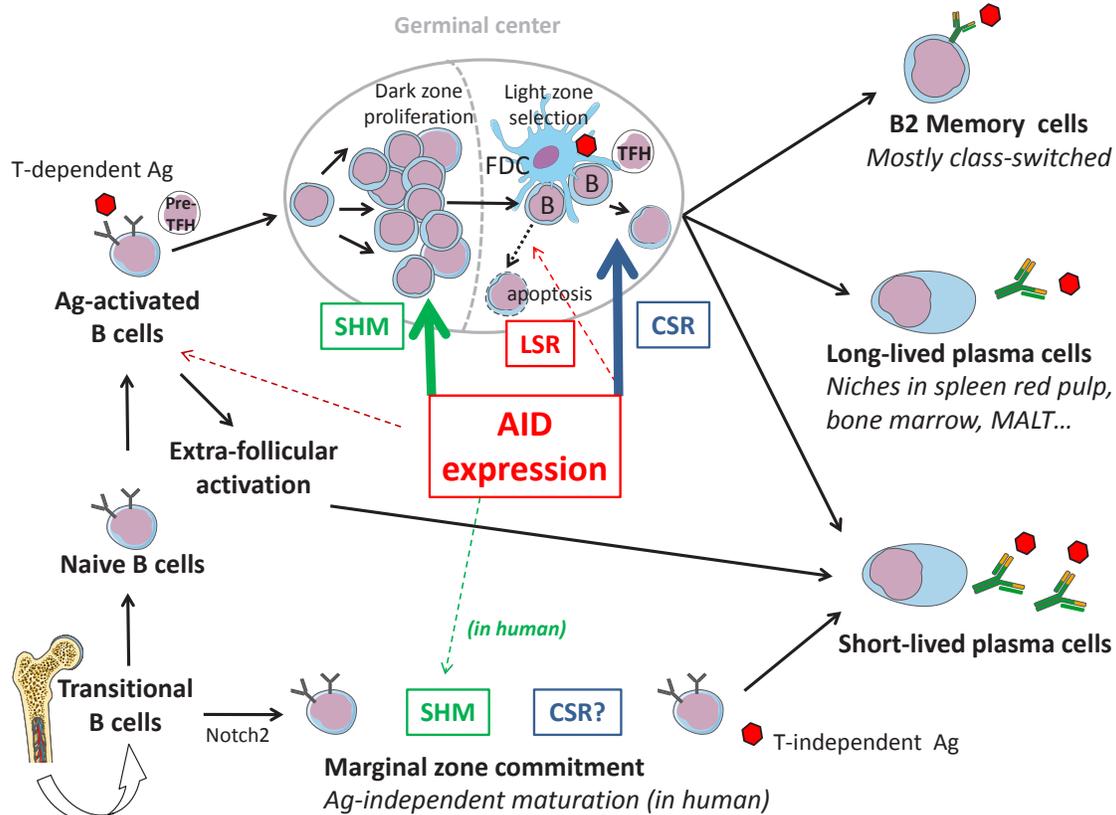
While all mIg associate with the Iga/β complex to constitute the BCR, signaling from this complex has mostly been studied for IgM [24][25]. The membrane μ HC has multiple roles by first providing differentiation signals during early development, survival signals in resting B cells and activation signals during peripheral antigen-dependent maturation (Figure 2). IgM and IgD have an identical intracellular positively charged short tail (including residues KVK). Replacement of μ by δ HC expression resulted in a modest phenotype and suggested that IgM and IgD can signal in a roughly similar manner [26]. This replacement completely deleted both mIgM expression and secretion of soluble IgM. The main feature of the resulting phenotype was delayed affinity maturation of immune humoral responses, i.e. a phenotype similar to mice simply lacking the secreted form of IgM [26][27]. It was also shown later that, despite their roughly normal

peripheral B cell compartments, mice in which μ HC was replaced by δ HC expression had a partial blockage of pro-B to pre-B transition due to lack of autonomous pre-BCR signaling normally provided by a glycosylation site within the μ chain CH1 domain [28].

IgD-deficient mice have also been generated through gene targeting and only showed slightly reduced B-cell spleen and lymph node compartments with higher mIgM expression than wt B cells. Early and late B cell differentiation, GC formation and humoral responses to immunization were unaffected [29]. However, a later study showed autoantibodies accumulating in IgD-deficient/lpr mice, suggesting that mIgD plays a role in B cell tolerance and limits auto-reactive B cell differentiation into plasma cells [30].

## 2.3. mIgG BCR

There are clear qualitative differences in BCR signaling and responses to antigen that are conferred by IgG vs IgM HC tails [31] (Figure 2). IgG carry longer



**Figure 3: AID-modulation of B cell fate in the context of lymphoid tissues.** After V(D)J recombination and IgM expression, recently emerged B cells circulate as transitional cells and can be committed to various compartments depending upon BCR signalling (Notch2 expression and weak BCR tonic signaling commit B cells to a marginal zone fate). After maturation into IgM+, IgD+ cells, naïve B cells encounter T-dependent Ag and undergo cognate interactions with pre-TFH cells. B cells then initially activate in extra-follicular foci and differentiate into short-lived plasma cells, or participate with TFH in the formation of GCs where their BCRs will be deeply remodeled by SHM (mostly in the proliferating dark zone) or CSR (mostly in the GC light zone), or eventually LSR. The GC reaction will yield both memory cells and plasma cells, some being long-lived and surviving after their migration to several protective niches (spleen red pulp, bone marrow, MALT...).

and highly conserved cytoplasmic tails. Deletion or replacement of the IgG tail with an IgM tail in mice resulted, for unexplained reasons, in lower levels of membrane expression and also strikingly disturbed IgG1 memory, showing that the IgG tail is necessary for high-titer IgG secretion and IgG1-switched memory cell survival [32]. In contrast, studies in transgenic mice carrying IgM, IgG or IgM/G (IgM with an IgG tail) BCRs of identical antigen specificity for hen-egg lysozyme, showed that the IgG tail increased production of plasma cells during extra-follicular T cell-dependent antibody reactions [33]. It was also observed in B cell transfectants that signaling through the mIgG BCR, but not through mIgM nor mIgD, was resistant to CD22-mediated signal inhibition [34]. However, this CD22-independence was not confirmed by other detailed studies in primary cells from transgenic or knock-in mice [31][35]. Rather, it was then suggested that IgG enhancement of intracellular calcium responses did not reflect independence from CD22 inhibition or changes in tyrosine phosphorylation, ERK signaling, or global gene induction, but increased differentiation into marginal zone cells, extrafollicular proliferation, and plasma cell differentiation. Despite increased Ca<sup>2+</sup> responses, several BCR ligation response genes showed lower induction by the IgG tail, in agreement with the observation that marginal zone B cell differentiation is favored by conditions that decrease BCR signaling [36]. This includes poor CCR7 induction by antigen ligation of the IgG BCR, while before entry into follicles, CCR7 is known to attract B cells to CCL19/CCL-21-rich T-zones rather than towards the marginal zone.

Premature expression of IgG rather than IgM in B cell progenitors also resulted in abnormal pre-BCR signaling and partial blockage of pro-B to pre-B cell transition, emphasizing that mIgM is optimal for early B cell maturation. In contrast, maintenance of mIgG+ cells might be less dependent on Iga/β than mIgM+ cells [35]. These observations led Goodnow's group to propose a "less-is-more" hypothesis where decreased induction of some BCR response genes might increase plasma cell formation, and to globally conclude that signaling differences between IgG and IgM BCR classes were qualitative rather than quantitative [31].

In comparison to IgM, another specific signaling feature of mIgG (shared with mIgE), is recruitment of the adaptor Grb2, which can bind to a tyrosine of the mIgG intracellular tail upon phosphorylation, and then modulate signaling and increase cell proliferation [37]. Interestingly, Grb2 is a modulator of cell signaling by tyrosine kinase receptors, with the dual function, in some instances, to decrease basal signaling while increasing signals emanating from receptor ligation [38].

Another feature of the mIgG1 cytoplasmic tail was demonstrated: enhancing early BCR oligomerization

that immediately follows ligation of membrane bound antigen leading to increased Syk recruitment and calcium mobilization [39]. Importantly, a recent study has shown that the strong tendency of mIgG1 cells to differentiate into plasma cells is restricted to those Ag-experienced cells and then translated into Bach2 repression, thus clearly involving more than just mIgG intracellular tail structure [40].

## 2.4. mIgA BCR

Few studies have explored a potential role for mIgA in conferring specific properties to memory mIgA+ B cells in comparison to naive mIgM+ cells (Figure 2). mIgA cross-linking raises intracellular calcium concentrations so that mIgA+ B cells residing in mucosa associated lymphoid tissues (MALT) can mediate IgA responses to local immunization [41][42]. As for IgG, it was also shown by targeted deletion in the mouse, that the C<sub>α</sub> membrane anchoring region allowing mIgA expression, is necessary for differentiation of IgA secreting cells in vivo [43]. The μMT mutation removing C<sub>μ</sub> membrane exons and IgM/IgD expression did not result in a complete B cell defect but resulted in accumulation of IgA+ plasma cells in MALT, also suggesting that B cell progenitors can undergo CSR to mIgA, survive under expression of this BCR and then differentiate into ASCs [44]. That early B cell development can be ensured by expression of membrane α HC has been shown in the α1KI model where the S<sub>μ</sub> region of the mouse IgH locus was replaced with an Ig HC α1 gene [45].

In α1KI mice, a partial defect in pre-B cells was, however, noticed, indicating that the α-class pre-BCR was less efficient than μ-class pre-BCR for signaling completion of V(D)J rearrangement upon assembly of a functional pre-BCR or BCR complex. This was reminiscent of data in mice with premature expression of membrane γ HC instead of μ/δ [35].

Despite this developmental defect, B cells accumulated in lymphoid organs of α1KI mice including spleen follicles, marginal zone, lymph nodes, Peyer's patches and the peritoneal B1 compartment. Splenic marginal zone and follicular B cell numbers were affected in the same proportion, in contrast to the increased marginal zone differentiation reported in mice expressing an IgG BCR [31, 35]. As mentioned in a previous study [32], BCR density appeared lower in α1KI than in wt mice, despite normal association of mIgA1 with Iga/β. Another feature of mIgA-driven B cell differentiation in α1KI mice was the abundance of plasma cells, affecting to the same extent long-lived (accumulated) and short-lived (recently differentiated) plasma cells. Rather than just compensatory plasma cell accumulation in response to B cell lymphopenia, the α1KI intrinsic commitment to plasma cell differentiation was also manifested in vitro by

higher differentiation of B cells activated by BCR cross-linking or mitogens into CD138+ cells.

Interestingly, normal human blood mIgA+ cells also include a high proportion of CD38 expressing cells, a marker of engagement in plasma cell differentiation [46]. It should also be noticed that the IgA BCR has been shown to be sensitive to CD22 inhibition as for IgM [47]. In addition, a recent study demonstrated a specific transcriptional program for mIgA+ memory cells, notably depending upon high ROR $\alpha$  expression, while mIgG2a+ cells were intrinsically dependent upon high expression of T-bet [48].

## 2.5. mIgE BCR

Secreted IgE is the least prevalent Ig class in blood, with only nanograms per milliliter compared to micrograms for IgD and milligrams for other classes in healthy populations. Maintaining low IgE levels is controlled by stringent mechanisms in order to restrict the very potent effects and side-effects of IgE immune responses. The IgE molecule is evolutionarily conserved and present in all mammalian species studied. In contrast to its active role in immune responses against parasites, IgE can also be deleterious and mediate atopic diseases of various intensities (eventually lethal in the case of anaphylactic shock).

Production of the double-sworded IgE antibody thus requires tight regulation, for which multiple mechanisms might be at work. IgE expression was first postulated to be restrained at the CSR level. Whereas IgG1 and IgE class switching can be both induced by IL4 in mice, *in vitro* experiments most often show lower switching frequency to IgE than to IgG1 [49]. Preferential CSR to C $\gamma$ 1 might thus reflect intrinsic differences between the 10kb-long S $\gamma$ 1 and the much shorter S $\epsilon$  region. Furthermore, IgE class switching is often a sequential process with an IgG1 intermediate [50]. Interestingly, direct CSR to IgE (without prior IgG1 CSR) occurs preferentially in immature B cells, and this feature may reflect epigenetic marks modulating accessibility of the IgH locus during B cell differentiation [51].

Beyond IgE CSR, it is clear that expression of mIgE BCR is mandatory for further differentiation into IgE secreting plasma cells (Figure 2). Mice deleted for IgE membrane exons have reduced (by more than 95 percent) serum IgE levels and fail to develop antigen specific IgE responses [52]. To a milder extent, replacement of the IgE tail with the much shorter IgM tail also decreased (~50%) IgE secretion [52]. It was also shown that treatment of mice with an antibody specifically targeting a mIgE-specific epitope on mIgE+ cells efficiently inhibited secreted IgE production [53][54], further suggesting that mIgE+ B cells are a necessary step for differentiation of IgE secreting plasma cells.

In this regard, a structural feature of the C $\epsilon$  gene

was postulated to restrain the production of membrane-type C $\epsilon$  transcripts which drive mIgE expression. Whereas all documented Ig genes have classical polyA sites (AATAAA) after both their secretory (CH3 or CH4) and membrane (M1/M2) exons, human and mouse C $\epsilon$  genes carry an atypical polyA site downstream from the M2 exon [55]. By comparing the sequence of C $\epsilon$  genes in the IMGT data base (<http://www.imgt.org>), we observed that a canonical AATAAA sequence downstream from C $\epsilon$  M2 was absent in all published mammalian IgH loci. This conserved suboptimal polyA site may down-regulate the ratio of membrane- vs secreted-form C $\epsilon$  mRNA transcripts during alternative splicing of murine (and human) C $\epsilon$  primary transcripts [56] and thus limit mIgE BCR expression. In an utmost form, C $\epsilon$  gene membrane exons are lacking in one lineage of primates, the tarsiers [55].

Despite these limitations, mIgE expression can be characterized *in vitro* in human or mouse stimulated B cells and has also been characterized in a B lymphoma cell line [57]. Exploring mIgE expression requires rigorous staining protocols eliminating passive binding of soluble IgE to Fc $\epsilon$ R2 receptors (whose expression is strongly induced in the presence of IL4) [58].

While present in a single (short) form in most mammalian species, mIgE is additionally present in humans and apes as a long isoform generated through alternate splicing of the M1 exon, and including either a long (66 amino acids) or a short (14 amino acids) extracellular membrane proximal domain (EMPD) between CH4 and the transmembrane domain. Both human mIgE isoforms have been expressed as functional BCRs in transfected B cells, showing that the short isoform was more efficiently transported to the cell surface and that its ligation resulted in growth inhibition of the WEHI immature B cell line, similar to mIgM BCR [59]. The EMPD domain was shown to be necessary for B cell activation through mIgE ligation in transfectants from the mature B cell line A20, while its deletion yielded a form of mIgE with proapoptotic activity upon ligation [60].

Another particularity of the IgE BCR is the intracellular tail structure, and phage display experiments identified 2 proteins interacting with the IgE tail. HS1-associated protein X-1 (HAX-1) notably seems to be associated with the IgE specific YANIL motif (where Y is a potentially phosphorylated tyrosine) of the intra-cellular tail and may influence BCR mediated Ag-internalization and cognate Ag-presentation to T cells [61]. Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) was also shown to interact with mIgE and mIgG (but not mIgM) tails and could differentially affect signaling from these receptors [62]. IgE committed B cells were also shown to be exquisitely sensitive to inhibition through ligation of LXR receptors, potentially due to increased CD23 expression and in turn down-regulating IgE production [63].

In order to study IgE responses *in vivo*, different mouse models have been developed and characterized.

Xiong et al used T and B monoclonal mice (with anti-chicken ovalbumin (OVA) T cell receptor transgenes and anti-influenza hemagglutinin (HA) knock-in B cell receptor genes on a RAG1-deficient background), immunized with OVA-HA and OVA-PEP1 (a variant of HA) and a classical model of helminth infection in wt mice. They showed that IgE<sup>+</sup> cells were found outside the GC (in contrast to IgG1 cells) and displayed a plasma cell transcriptional program. They also showed that IgEs accumulate hypermutation and affinity selection (and are able to bind the PEP1 Ag) and proposed a sequential maturation program: a pre-IgE phase with SHM and affinity maturation in IgG1<sup>+</sup> cells and a post-IgE-switching phase where IgE<sup>+</sup> rapidly differentiate into plasma cells [64]. In another study this team used the same T/B monoclonal model and immunized wt or hMT mice (which are deficient for IgG1 populations) with NP19KLH Ag. They demonstrated that high affinity IgE Abs responsible for anaphylactic reactions were generated through the sequential  $\mu/\gamma1/\epsilon$  CSR pathway (and were absent in hMT mice), with IgG1 intermediate cells supporting SHM and affinity selection. In contrast, low affinity IgE producing cells were generated through direct  $\mu/\epsilon$  CSR, were less mutated, and may play a beneficial role during anaphylaxis, by competing with high affinity Ab for Fc $\epsilon$ R1 binding [65].

Two transgenic models were created to study rare IgE<sup>+</sup> cells in vivo. The first model used a GFP reporter system by inserting a bi-cistronic GFP reporter gene downstream from the mouse IgE M2 exon. The long human EMPD domain was introduced upstream to the IgE M1 exon, resulting in a chimeric IgE BCR with an additional EMPD domain (allowing specific detection of these cells but denaturing the natural architecture of this receptor). This model was subjected to helminth infection by *N. brasiliensis* and TNP-OVA immunization. In contrast to previous models, this strategy demonstrated IgE<sup>+</sup> cells in GC and suggested the existence of IgE<sup>+</sup> memory and plasma cells [66]. In another model, the T2A strategy tagged IgE<sup>+</sup> cells by linking the C $\epsilon$  M2 exon with Venus (a derivative of yellow fluorescent protein) and used a viral 2A sequence enabling expression of 2 proteins from a single ORF. Translation of Venus was thus linked to translation of a nearly normal mIgE (except for an additional 17 amino acid peptide). These mice and wt mice were immunized with NP-KLH and infected with *N. brasiliensis*. This model suggested that IgE<sup>+</sup> cells can differentiate into GC B cells during primary immune responses and confirmed a strong propensity of these cells to differentiate rapidly into plasma cells which were mostly short-lived [67]. In agreement with this conclusion, another model where membrane IgE exons were replaced by membrane IgG1 exons suggested that IgE<sup>+</sup> plasma cells have an intrinsically lower chance than IgG1<sup>+</sup> cells to migrate towards the chemokine CXCL12 and thus to contribute to the long-lived plasma cell pool [68].

### 3. LSR ELIMINATION OF B CELLS

B cell fate can also be more dramatically modified by AID after CSR-like events resulting in complete deletion of the IgH CH gene cluster and thus inducing B cell death through locus suicide recombination (LSR) (Figure 1) [16].

During AID-mediated competition that occurs among B cells within germinal centers, a few with high affinity are selected (Figure 3). Besides these winners, many cells are losers or undesired responders deserving elimination. Although some unfavorable mutations of V regions can promote apoptosis [69], abundant survival signals from the GC microenvironment might also activate or maintain bystander cells with useless or eventually harmful BCRs (the latter having, for example, acquired specificity for self or environmental antigens after random remodeling of V sequences). Since class-switched antibodies are potent actors of auto-immunity and/or hypersensitivity, means for restricting CSR and reentry of class-switched cells into SHM would help ensure the specificity of immune responses. Yet, how the post-GC repertoire is controlled remains poorly understood.

The 3'RR contains several enhancers with strong B-lineage specificity [70,71] undergoing chromatin remodeling upon B cell activation and controlling V region SHM as well as germline transcription and CSR to most C genes [72–83]. In all mammalian species studied, the 3'RR also features inverted repeats and stretches of repetitive DNA with structures similar to that of S regions [84–87], showing multiple 5bp repeats eventually arranged within higher order (49bp) repeats. Such “like S” stretches (LS regions) flank both sides of the 3'RR and are also interspersed with 3' enhancers. Similarly to the germline transcription of S regions preceding CSR, the 3'RR is transcribed by RNA polymerase II in activated B cells [88].

3'RR elements regulate AID-mediated SHM and CSR by physically interacting with AID-targeted IgH promoters [70, 74, 79, 80, 89]. Since 3'RR enhancer elements and LS regions are themselves transcribed, it was logically found that they also undergo SHM and DNA breaks. AID-initiated junctions then occur in activated B cells between S $\mu$  and 3'RR LS regions and delete the complete C gene cluster, thereby eliminating BCR expression (or Ig secretion for cells engaged in plasma cell differentiation). Given that BCR expression is mandatory for B cell survival, this process termed “locus suicide recombination” (LSR) necessarily leads to B cell death.

How the CSR/LSR balance is finely regulated in vivo remains to be determined. Beyond IgH locus accessibility, intra-GC interactions govern the selection of high affinity class-switched cells. In this context, LSR might contribute to B cell homeostasis and lead to death of suboptimally stimulated cells, while optimal stimulation would promote CSR and survival of selected

antigen-specific B cell clones. LSR could then help shape the peripheral B cell repertoire and ensure BCR antigen specificity.

#### 4. DEVELOPMENT AND FEATURES OF MEMORY B CELLS

B cell responses to T-dependent antigens involve germinal center reactions featuring B cell proliferation and expression of AID for SHM and CSR in parallel interactions with follicular dendritic cells and T follicular helper cells that will help select those B cells with the highest affinity for Ag. GC reactions peak after 7 days and wane after a few weeks, once having generated long-lived plasma cells and memory B cells with an affinity matured BCR. Besides intra-GC competition between B cells for limited antigen, soluble antibody feedback also ensures inter-GC communication concerning access to antigen [90]. Secreted antibodies were thus shown to inhibit or even terminate GC proliferation with an efficiency directly correlated with their affinity for antigen [90]. Interestingly in the absence of T cell help, soluble antigen might also inhibit GC development [91].

Regarding the prolonged maintenance (eventually lifelong) of GC-born memory B cells, it was shown that Ag-persistence within lymphoid organs is unnecessary [92]. Rather, further reintroduction of Ag into the organism will trigger memory cell differentiation into plasma cells, with or without parallel formation of new GC [93]. A recent study by Reynaud and colleagues followed Ag-specific memory B cells for up to 1 year in mice and showed that while GCs waned a few weeks after immunization by a soluble antigen, they persisted up to 10 months after immunization with a particulate Ag [94]. Several types of memory cells were demonstrated in the latter model: either IgM+IgD+, or IgM-only, or class-switched (and then mostly mIgG1+). Ag-experienced cells were located in the spleen T cell zone, red pulp, and follicles, with very few in the marginal zone. Upon transfer into pre-immunized recipient animals, the mIgM+ subset gave rise to centroblasts, part of them switching to IgG1, and to a small proportion of Ag-specific IgM+ plasma cells. The mIgG1 subset yielded Ag-specific IgG1 plasma cells and maintenance of a mIgG1+ memory pool. While the average number of mutations was stable in persisting memory B cells, it was increased upon differentiation of mIgM+ memory cells into centroblasts, showing that such cells can reenter new cycles of AID-mediated affinity maturation.

In another model, two layers of Ag-specific B memory cells were demonstrated, either mIgM+ or having undergone class switching (swIg+ memory cells). The mIgM+ memory cells were very stable and long-lived, able to form GC when transferred into a naïve animal but inhibited upon the presence of soluble Ag-specific Ig (then inhibiting GC formation). The swIg+ memory cells

persisted for a shorter time, and mostly differentiated into plasmablasts upon activation but kept the ability to be activated even in the presence of preexisting antibodies. This led to the proposition that memory 1) initially relies on swIg+ cells, able to be rapidly activated and yield antibodies even in the presence of preexisting serum antibodies, and 2) later relies on long-lived mIgM+ memory cells, able to form new GC once initial antibodies have vanished [93]. If this model can be generalized, “early” memory responses would classically overwhelmingly involve class-switched antibodies, while “late” memory responses would be expected to recapitulate the kinetics of the primary response, first with IgM (albeit with low affinity) then followed with high affinity class-switched antibodies. Interestingly, it was recently shown in a model of bacterial infection that *in vivo* depletion of the mIgM memory B cells abrogated the IgG recall responses to specific Ag challenge, demonstrating that mIgM cells were then required for humoral memory, and underwent CSR and plasma cell differentiation upon Ag re-challenge [95].

Upstream of GC reactions, some specific functions have been reported during immune responses for B cells with low affinity BCRs. For example, mouse B1 cells show polyreactivity and bind multiple exogenous antigens or auto-antigens with low affinity, being responsible for generation of natural antibodies that preexist prior to any antigenic challenge and play an innate function. Some tissue B cells binding antigens with low affinity (notably in lung, with intra-nasally administered antigens) have also been demonstrated to shuttle and carry antigens towards spleen follicles, then initiating GC formation by resident B cells with higher affinities [96]. BCR independent Ag-binding by B cells was also reported for marginal zone B cells recognizing particulate antigens within immune complexes through complement or Fc receptors, which were also postulated to carry antigens towards FDCs within follicles [97]. Human and mouse MZ B cells might somehow differ although they both respond to T-independent antigens. While mouse MZ B cells have mostly unmutated BCRs and do not recirculate, human IgM+IgD+CD21<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> B cells recirculate in blood and carry mutated Ig and Bcl6 genes. Their V(D)J repertoire is very large without clonal restrictions and hallmarks of antigen-induced activation, similar to naïve cells and in contrast to GC mIgM+ cells, suggesting that MZ B cells provide a GC-independent IgM memory layer [98]. MZ B cells likely differentiate through an innate extracellular TLR-dependent pathway allowing AID induction outside GC, as demonstrated in both mouse and humans for immature B cells then undergoing CSR and SHM [99][7]. A helper role for neutrophils in the induction of MZ B cell CSR, SHM and plasma cell differentiation was also demonstrated during T-independent responses to bacterial antigens [100].

## 5. LYMPHOMAGENESIS AND BCR SIGNALS

AID also induces mutations and breaks in numerous non-Ig genes, many of which (but not all) are transcribed in B cells, and many of which overlap with translocation or recombination sites found in B cell lymphomas or correspond to repetitive DNA sequences. [101,102]. Studies of B cell malignancies since the early 1980s also identified a number of translocations linking oncogenes such as c-MYC, c-MAF, CYCLIN D1, and BCL2 to breakpoints located within Ig loci. Some of these events were recurrently identified as the clonal driving forces of lymphomagenesis. This pointed to a major role of errors in the processes of antibody gene diversification in tumorigenesis. Recently, it was also shown that breakpoints located outside Ig loci constitute frequent side targets of AID attacks in activated B cells. It is thus now clear that in B cell malignancies as in normal B cells, AID-induced mutations accumulate on multiple loci including those of Ig (with the higher level of error-prone repair after AID deamination), BCL6 and a large list of oncogenes and tumor suppressors.[101] Precise characterization of translocation breakpoints and development of whole genome sequencing showed that mutations and recombinations detected in activated B cells and in tumors with mature B cell phenotypes all carry hallmarks of WRC sequence-specific AID on-target and off-target attacks. [103,104] In addition, more than half of translocations seen in immature B cell malignancies also show breakpoints at sites of AID deamination corresponding to mCG dinucleotides and might imply the combined action of AID, RAG and ARTEMIS. [105,106] However, this issue can still be debated and it is noteworthy that lymphoma breakpoints targeting CG dinucleotides were also recently identified by A. Nussenzweig and colleagues, as early replicating fragile sites susceptible to AID-independent genomic instability [107].

Besides the role of translocations, it is important to note that BCR signals most likely play a crucial role in lymphomagenesis. These signals might vary with SHM of V regions, which probably modulate interactions of malignant cells with various endogenous ligands. Indeed, N-glycosylation sites carrying high-mannose glycans and created by SHM within V domains are a frequent feature of follicular lymphoma cells, and may promote B cell interactions with lectins such as DC-SIGN [108]. The BCR Ig class might also somehow control the phenotype of B cell malignant proliferations. Indeed, it is well known that plasmacytic lymphomas overwhelmingly express mIgM (in striking contrast with myelomas, where the secreted Ig is always a non-IgM class). In diffuse large B cell lymphomas, it was recently shown that ABC cases mostly express mIgM, while GC cases overwhelmingly express IgG or IgA [109].

Autonomous BCR signaling in chronic lymphocytic

leukemia cases was also recently demonstrated, but appeared independent from the mutated or unmutated BCR status [110].

Finally a number of AID-mediated mutations affecting proteins of BCR- or TLR-signaling cascades and resulting in constitutive B cell activation have been observed in many different types of lymphoproliferation [111,112].

## 6. CONCLUSIONS

Early B cell differentiation is optimally driven through expression of germinally encoded and diversified IgM molecules. This generates transitional B cells that are affected to the various mature B cell compartments and then express variable levels of IgM and IgD. Such cells can then undergo either Ag-dependent (within B cell follicles) or Ag-independent (for splenic marginal zone B cells), AID remodeling of their Ig V regions through SHM or GCV. Cell survival, fate and phenotype are all highly dependent at that time on constitutive signals provided by the BCR. Either antigen ligation of the BCR and/or stimulation by various TLR ligands can additionally result in B cell activation and rapid AID induction. By improving BCR affinity for antigen by SHM, AID will help select follicular cells having the strongest interactions with antigen exposed at the surface of FDC along the process of SHM, as winners of the competition for activation and survival signals provided by FDC and TFH cells within the GC. In parallel, these interactions further stimulate expression and accessibility of the IgH locus then resulting in CSR for expression of a new BCR with conserved Ag-specificity but new signaling functions. Finally in some instances, another dramatic IgH remodeling event implying complete deletion of the IgH locus C region through a “sterile CSR” (also defined as “locus suicide recombination” or LSR), can occur and result in loss of BCR expression and B cell death.

## ACKNOWLEDGMENTS

Our work mentioned in this review was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR), Ligue contre le Cancer and Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant SL220100601332).

## REFERENCES

1. Conticello SG, Thomas CJ, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Molecular Biology and Evolution*. 2005; 22:367–377.
2. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel

- member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274: 18470–18476.
3. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000; 102:553–563.
  4. Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Labeolusse R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. 2000; 102: 565–575.
  5. Pavri R, Nussenzweig MC. AID targeting in antibody diversity. *Advances in Immunology*. 2011; 110: 1–26.
  6. Liljavirta J, Ekman A, Knight JS, Pernthaner A, Iivanainen A, Niku M. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is strongly expressed in the fetal bovine ileal Peyer's patch and spleen and is associated with expansion of the primary antibody repertoire in the absence of exogenous antigens. *Mucosal Immunology*. 2013.
  7. Han JH, Akira S, Calame K, Beutler B, Selsing E, Imanishi-Kari T. Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity*. 2007; 27: 64–75.
  8. Kuraoka M, Holl TM, Liao D, Womble M, Cain DW, Reynolds AE, Kelsoe G. Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 11560–11565.
  9. Maul RW, Gearhart PJ. AID and somatic hypermutation. *Advances in Immunology*. 2010; 105:159–191.
  10. Pavri R, Gazumyan A, Jankovic M, Di Virgilio M, Klein I, Ansarah-Sobrinho C, Resch W, Yamane A, Reina San-Martin B, Barreto V, Nieland TJ, Root DE, Casellas R, Nussenzweig MC. Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell*. 2010; 143: 122–133.
  11. Willmann KL, Milosevic S, Pauklin S, Schmitz KM, Rangam G, Simon MT, Maslen S, Skehel M, Robert I, Heyer V, Schiavo E, Reina-San-Martin B, Petersen-Mahrt SK. A role for the RNA pol II-associated PAF complex in AID-induced immune diversification. *Journal of Experimental Medicine*. 2012; 209: 2099–2111.
  12. Cogné M, Lansford R, Bottaro A, Zhang J, Gorman J, Young F, Cheng HL, Alt FW. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell*. 1994; 77: 737–747.
  13. Pinaud E, Khamlichi AA, Le Morvan C, Drouet M, Nalesso V, Le Bert M, Cogné M. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*. 2001; 15: 187–199.
  14. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Advances in Immunology*. 2011; 110: 27–70.
  15. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. 2010; 116: 1895–1898.
  16. Peron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, Cook-Moreau J, Tinguely A, Delpy L, Denizot Y, Pinaud E, Cogne M. AID-Driven Deletion Causes Immunoglobulin Heavy Chain Locus Suicide Recombination in B Cells. *Science*. 2012; 336: 931–934.
  17. Vuong BQ, Chaudhuri J. Combinatorial mechanisms regulating AID-dependent DNA deamination: Interacting proteins and post-translational modifications AID Insights Immune Diversif Cancer 2012, 24, 264–272
  18. Di Virgilio M, Callen E, Yamane A, Zhang W, Jankovic M, Gitlin AD, Feldhahn N, Resch W, Oliveira TY, Chait BT, Nussenzweig A, Casellas R, Robbiani DF, Nussenzweig MC. Rfl1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science*. 2013; 339: 711–715.
  19. Jankovic M, Feldhahn N, Oliveira TY, Silva IT, Kieffer-Kwon KR, Yamane A, Resch W, Klein I, Robbiani DF, Casellas R, Nussenzweig MC. 53BP1 Alters the Landscape of DNA Rearrangements and Suppresses AID-Induced B Cell Lymphoma. *Molecular Cell*. 2013; 49: 623–31.
  20. Bothmer A, Robbiani DF, Di Virgilio M, Bunting SF, Klein IA, Feldhahn N, Barlow J, Chen HT, Bosque D, Callen E, Nussenzweig A, Nussenzweig MC. Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Molecular Cell*. 2011; 42: 319–329.
  21. Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, Alt F W, Cogne M, Pinaud E, Kenter A. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity*. 2007; 27: 711–722.
  22. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210: 1501–1507.
  23. Nishana M, Raghavan SC. Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunity*. 2012; 137: 271–281.
  24. Venkitaraman AR, Williams GT, Dariavach P, Neuberger MS. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature*. 1991; 352: 777–781.
  25. Reth M, Wienands J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annual Review of*

- Immunology. 1997; 15: 453–479.
26. Lutz C, Ledermann B, Kosco-Vilbois MH, Ochsenbein AF, Zinkernagel RM, Köhler G, Brombacher F. IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature*. 1998; 393: 797–801.
  27. Ehrenstein MR, O’Keefe TL, Davies SL, Neuberger MS. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95: 10089–10093.
  28. Übelhart R, Bach MP, Eschbach C, Wossning T, Reth M, Jumaa H. N-linked glycosylation selectively regulates autonomous precursor BCR function. *Nature Immunology*. 2010; 11: 759–765.
  29. Nitschke L, Kosco MH, Köhler G, Lamers MC. Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90: 1887–1891.
  30. Guo L, Tian J, Guo Z, Zheng B, Han S. The absence of immunoglobulin D B cell receptor-mediated signals promotes the production of autoantibodies and exacerbates glomerulonephritis in murine lupus. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011; 164: 227–235.
  31. Horikawa K, Martin SW, Pogue SL, Silver K, Peng K, Takatsu K, Goodnow CC. Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204: 759–769.
  32. Kaisho T, Schwenk F, Rajewsky K. The Roles of  $\gamma 1$  Heavy Chain Membrane Expression and Cytoplasmic Tail in IgG1 Responses. *Science*. 1997; 276: 412–415.
  33. Martin SW, Goodnow CC. Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nature Immunology*. 2002; 3: 182–188.
  34. Wakabayashi C, Adachi T, Wienands J, Tsubata TA. Distinct Signaling Pathway Used by the IgG-Containing B Cell Antigen Receptor. *Science*. 2002; 298: 2392–2395.
  35. Waisman A, Kraus M, Seagal J, Ghosh S, Melamed D, Song J, Sasaki Y, Classen S, Lutz C, Brombacher F, Nitschke L, Rajewsky K. IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on  $Ig\alpha/\beta$ . *Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204: 747–758.
  36. Pillai S, Cariappa A, Moran S T Marginal zone B cells. *Annual Review in Immunology*. 2005; 23: 161–196.
  37. Engels N, König LM, Heemann C, Lutz J, Tsubata T, Griep S, Schrader V, Wienands J. Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature Immunology*. 2009; 10: 1018–1025.
  38. Belov AA, Mohammadi M. Grb2 a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. *Science Signaling*. 2012; 5: 49.
  39. Liu W, Meckel T, Tolar P, Sohn HW, Pierce S K. Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling *Immunity*. 2010. 32: 778–789.
  40. Kometani K, Nakagawa R, Shinnakasu R, Kaji T, Rybouchkin A, Moriyama S, Furukawa K, Koseki H, Takemori T, Kurosaki T. Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B Cells toward Plasma Cell Differentiation. *Immunity*. 2013; 39: 136–147.
  41. Leduc I, Drouet M, Bodinier M C, Helal A, Cogné M. Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study *Immunology*. 1997; 90: 330–336.
  42. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen F E, Nilsen E M, Yamanaka T. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunology Today*. 1999; 20: 141–151.
  43. Amin R, Carrion C, Decourt C, Pinaud E, Cogné M. Deletion of the  $\alpha$  immunoglobulin chain membrane-anchoring region reduces but does not abolish IgA secretion. *Immunology* 2012; 136: 54–63.
  44. Hasan M, Polic B, Bralic M, Jonjic S, Rajewsky K Incomplete block of B cell development and immunoglobulin production in mice carrying the muMT mutation on the BALB/c background. *European Journal of Immunology*. 2002; 32: 3463–3471.
  45. Duchez S, Amin R, Cogné N, Delpy L, Sirac C, Pascal V, Corthésy B, Cogné M. Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 3064–3069.
  46. Irsch J, Irlenbusch S, Radl J, Burrows PD, Cooper MD, Radbruch AH. Switch recombination in normal IgA1+ B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*. 1994; 91: 1323–1327.
  47. Sato M, Adachi T, Tsubata T. Augmentation of signaling through BCR containing IgE but not that containing IgA due to lack of CD22-mediated signal regulation. *Journal of Immunology*. 2007; 178: 2901–2907.
  48. Wang NS, McHeyzer-Williams LJ, Okitsu SL, Burris TP, Reiner SL, McHeyzer-Williams MG. Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR $\alpha$ . *Nature Immunology*. 2012; 13: 604–611.
  49. Siebenkotten G, Esser C, Radbruch A, Wabl M. The murine IgG1/IgE class switch program. *European Journal of Immunology*. 1992; 22: 1827–1834.
  50. Jung S, Siebenkotten G, Radbruch A. Frequency of immunoglobulin E class switching is autonomously determined and independent of prior switching to other

- classes. *Journal of Experimental Medicine*. 1994; 179: 2023.
51. Wesemann DR, Magee JM, Boboila C, Calado DP, Gallagher MP, Portuguese AJ, Manis JP, Zhou X, Recher M, Rajewsky K, Notarangelo LD, Alt FW. Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S to S recombination. *Journal of Experimental Medicine*. 2011; 208: 2733–2746.
  52. Achatz G, Nitschke L, Lamers MC. Effect of Transmembrane and Cytoplasmic Domains of IgE on the IgE Response. *Science*. 1997; 276: 409–411.
  53. Chen JB, Wu PC, Hung AFH, Chu CY, Tsai TF, Yu HM, Chang HY, Chang TW. Unique epitopes on C epsilon mX in IgE-B cell receptors are potentially applicable for targeting IgE-committed B cells. *Journal of Immunology*. 2010; 184: 1748–1756.
  54. Brightbill HD, Jeet S, Lin Z, Yan D, Zhou M, Tan M, Nguyen A, Yeh S, Delarosa D, Leong SR, Wong T, Chen Y, Ultsch M, Luis E, Ramani SR, Jackman J et al. Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120: 2218–2229.
  55. Wu PC, Chen JB, Kawamura S, Roos C, Merker S, Shih CC, Hsu BD, Lim C, Chang TW. The IgE gene in primates exhibits extraordinary evolutionary diversity. *Immunogenetics*. 2012; 64: 279–287.
  56. Karnowski A, Achatz-Straussberger G, Klockenbusch C, Achatz G, Lamers MC. Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. *European Journal of Immunology*. 2006; 36: 1917–1925.
  57. Sitia R. Biosynthesis of membrane and secreted epsilon-chains during lipopolysaccharide-induced differentiation of an IgE+ murine B-lymphoma. *Molecular Immunology*. 1985; 22: 1289–1296.
  58. Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ APG, Urban JF Jr, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity*. 2007; 26: 191–203.
  59. Batista FD, Anand S, Presani G, Efremov DG, Burrone OR. The Two Membrane Isoforms of Human IgE Assemble into Functionally Distinct B Cell Antigen Receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 1996; 184: 2197–2206.
  60. Poggianella M, Bestagno M, Burrone OR. The extracellular membrane-proximal domain of human membrane IgE controls apoptotic signaling of the B cell receptor in the mature B cell line A20. *Journal of Immunol*. 2006; 177: 3597–3605.
  61. Oberndorfer I, Schmid D, Geisberger R, Achatz-Straussberger G, Cramer R, Lamers M, Achatz G. HS1-Associated Protein X-1 Interacts with Membrane-Bound IgE: Impact on Receptor-Mediated Internalization. *Journal of Immunology*. 2006; 177: 1139–1145.
  62. Geisberger R, Prlic M, Achatz-Straussberger G, Oberndorfer I, Luger E, Lamers M, Cramer R, Appenzeller U, Wienands J, Breitenbach M, Ferreira F, Achatz G. Phage Display Based Cloning of Proteins Interacting with the Cytoplasmic Tail of Membrane Immunoglobulins. *Developmental Immunology*. 2002; 9: 127–134.
  63. Heine G, Dahten A, Hilt K, Ernst D, Milovanovic M, Hartmann B, Worm M. Liver X receptors control IgE expression in B cells. *Journal of Immunology*. 2009; 182: 5276–5282.
  64. Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ APG, Urban JF Jr, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity*. 2007; 26: 191–203.
  65. Xiong H, Dolpady J, Wabl M, Lafaille MAC, de Lafaille JJ. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *Journal of Experimental Medicine*. 2012; 209: 353–364.
  66. Talay O, Yan D, Brightbill HD, Straney EEM, Zhou M, Ladi E, Lee WP, Egen JG, Austin CD, Xu M, Wu LC. IgE+ memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nature Immunology*. 2012; 13: 396–404.
  67. Yang Z, Sullivan BM, Allen CDC. Fluorescent In vivo Detection Reveals that IgE+ B Cells Are Restrained by an Intrinsic Cell Fate Predisposition. *Immunity*. 2012; 36: 857–872.
  68. Achatz-Straussberger G, Zaborsky N, Konigsberger S, Luger EO, Lamers M, Cramer R, Achatz G. Migration of antibody secreting cells towards CXCL12 depends on the isotype that forms the BCR. *European Journal of Immunology*. 2008; 38: 3167–3177.
  69. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. *Nature Immunology*. 2010; 11: 681–688.
  70. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Advances in Immunology*. 2011; 110: 27–70.
  71. Kim W, Kook S, Kim DJ, Teodorof C, Song WK. The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 8333–8342.
  72. Giambra V, Volpi S, Emelyanov AV, Pflugh D, Bothwell ALM, Norio P, Fan Y, Ju Z, Skoultchi AI, Hardy RR, Frezza D, Birshtein BK. Pax5 and linker histone H1 coordinate DNA methylation and histone modifications in the 3' regulatory region of the immunoglobulin heavy chain locus. *Molecular and Cellular Biology*. 2008; 28: 6123–6133.
  73. Garrett FE, Emelyanov AV, Sepulveda MA, Flanagan P, Volpi S, Li F, Loukinov D, Eckhardt LA, Lobanenkova VV, Birshtein BK. Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone

- modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25: 1511–1525.
74. Dunnick WA, Collins JT, Shi J, Westfield G, Fontaine C, Hakimpour P, Papavasiliou FN. Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *Journal of Experimental Medicine*. 2009; 206: 2613–2623.
  75. Cogné M, Lansford R, Bottaro A, Zhang J, Gorman J, Young F, Cheng H L, Alt FW. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell*. 1994; 77: 737–747.
  76. Manis JP, van der Stoep N, Tian M, Ferrini R, Davidson L, Bottaro A, Alt FW. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *Journal of Experimental Medicine*. 1998; 188: 1421–1431.
  77. Bébin AG, Carrion C, Marquet M, Cogné N, Lecardeur S, Cogné M, Pinaud E. In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *Journal of Immunology*. 2010; 184: 3710–3717.
  78. Pinaud E, Khamlichi AA, Le Morvan C, Drouet M, Nalesso V, Le Bert M, Cogné M. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*. 2001; 15: 187–199.
  79. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a hs12 hs3b and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. 2010; 116: 1895–1898.
  80. Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, Alt FW, Cogné M, Pinaud E, Kenter AL. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity*. 2007; 27: 711–722.
  81. Ju Z, Volpi SA, Hassan R, Martinez N, Giannini SL, Gold T, Birshtein BK. Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 35169–35178.
  82. Duan H, Xiang H, Ma L, Boxer LM. Functional long-range interactions of the IgH 3' enhancers with the bcl-2 promoter region in t(1418) lymphoma cells. *Oncogene*. 2008; 27: 6720–6728.
  83. Gostissa M, Yan CT, Bianco JM, Cogné M, Pinaud E, Alt FW. Long-range oncogenic activation of Igh-c-myc translocations by the Igh 3' regulatory region. *Nature*. 2009; 462: 803–807.
  84. Chauveau C, Cogné M. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nature Genetics*. 1996; 14: 15–16.
  85. Chauveau C, Pinaud E, Cogné M. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *European Journal Immunology*. 1998; 28: 3048–3056.
  86. Sepulveda MA, Garrett FE, Price-Whelan A, Birshtein BK. Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Molecular Immunology*. 2005; 42: 605–615.
  87. Pinaud E, Aupetit C, Chauveau C, Cogné M. Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs12 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *European Journal of Immunology*. 1997; 27: 2981–2985.
  88. Yamane A, Resch W, Kuo N, Kuchen S, Li Z, Sun H, Robbiani DF, McBride K, Nussenzweig MC, Casellas R. Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nature Immunology*. 2011; 12: 62–69.
  89. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210: 1501–1507.
  90. Zhang Y, Meyer-Hermann M, George LA, Figge MT, Khan M, Goodall M, Young SP, Reynolds A, Falciani F, Waisman A, Notley CA, Ehrenstein MR, Kosco-Vilbois M, Toellner KM. Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210: 457–464.
  91. Savel'yeva N, Shipton M, Suchacki A, Babbage G, Stevenson FK. High-affinity memory B cells induced by conjugate vaccines against weak tumor antigens are vulnerable to nonconjugated antigen. *Blood*. 2011; 118: 650–659.
  92. Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*. 2000; 407: 636–642.
  93. Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science*. 2011; 331: 1203–1207.
  94. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégrét J, Storck S, Reynaud C-A, Weill J-C. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature Immunology*. 2009; 10: 1292–1299.
  95. Yates JL, Racine R, McBride KM, Winslow GM. T Cell-Dependent IgM Memory B Cells Generated during Bacterial Infection Are Required for IgG Responses to Antigen Challenge. *Journal of Immunology*. 2013; 191: 1240–1249.
  96. Bessa J, Zabel F, Link A, Jegerlehner A, Hinton HJ, Schmitz N, Bauer M, Kündig TM, Saudan P, Bachmann MF. Low-affinity B cells transport viral particles from the lung to the spleen to initiate antibody responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109: 20566–20571.
  97. Link A, Zabel F, Schnetzler Y, Titz A, Brombacher F, Bachmann MF. Innate immunity mediates follicular transport of particulate but not soluble protein antigen.

Journal of Immunology. 2012; 188: 3724–3733.

98. Weller S, Mamani-Matsuda M, Picard C, Cordier C, Lecoeuche D, Gauthier F, Weill JC, Reynaud CA. Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *Journal of Experimental Medicine*. 2008; 205: 1331–1342.
99. Weller S, Bonnet M, Delagreverie H, Israel L, Chrabieh M, Maródi L, Rodriguez-Gallego C, Garty BZ, Roifman C, Issekutz AC, Zitnik SE, Hoarau C, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Rodrigo C, Arkwright PD et al. IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-MyD88- and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood*. 2012; 120: 4992–5001.
100. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W, Magri G, Knowles DM, Tam W, Chiu A, Bussel JB, Serrano S, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology*. 2012; 13: 170–180.
101. Liu M, Duke JL, Richter DJ, Vinuesa CG, Goodnow CC, Kleinstein SH, Schatz DG. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*. 2008; 451: 841–845.
102. Staszewski O, Baker RE, Ucher AJ, Martier R, Stavnezer J, Guikema JEJ. Activation-induced cytidine deaminase induces reproducible DNA breaks at many non-Ig Loci in activated B cells. *Molecular Cell*. 2011; 41: 232–242.
103. Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, Lewis SM, Molinie B, Ho YJ, Myers DR, Choi VW, Compagno M, Malkin DJ, Neuberg D, Monti S, Giallourakis CC, Gostissa M, Alt FW. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell*. 2011; 147: 107–119.
104. Gu X, Shivarov V, Strout MP. The role of activation-induced cytidine deaminase in lymphomagenesis. *Current Opinion in Hematology*. 2012; 19: 292–298.
105. Tsai AG, Lu H, Raghavan SC, Muschen M, Hsieh CL, Lieber MR. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell*. 2008; 135: 1130–1142.
106. Cui X, Lu Z, Kurosawa A, Klemm L, Bagshaw A, Tsai AG, Gemmel N, Muschen M, Adachi N, Hsieh CL, Lieber MR. Both CpG Methylation and AID are Required for the Fragility of the Human Bcl-2 Major Breakpoint Region: Implications for the Timing of the Breaks in the t(1418). *Molecular and Cellular Biology*. 2011; 33: 947–57.
107. Barlow JH, Faryabi RB, Callén E, Wong N, Malhowski A, Chen HT, Gutierrez-Cruz G, Sun HW, McKinnon P, Wright G, Casellas R, Robbani DF, Staudt L, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig. A Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell*. 2013; 152: 620–632.
108. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, Emará M, Potter KN, Johnson P, Packham G, Martinez-Pomares L, Stevenson FK. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 18587–18592.
109. Ruminy P, Etancelin P, Couronné L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S, Bohers E, Burgot C, Cornic M, Bertrand P, Lenormand B, Picquenot J-M, Jardin F, Tilly H, Bastard C. The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2011; 25: 681–688.
110. Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, Hofmann D, Surova E, Follo M, Köhler F, Wardemann H, Zirlik K, Veelken H, Jumaa H. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signaling. *Nature*. 2012; 489: 309–312.
111. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser P B, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer A L, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010 ; 463 : 88–92.
112. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, Devesa M, Delage-Corre M, Coste V, Laforêt MP, de Mascarel A, Merlio JP, Bouabdhalia K, Milpied N, Soubeyran P, Schmitt A et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*. 2013; 27: 183–189.

#### **Annexe 4 :**

##### **Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression.**

Laffleur B, Duchez S, Tarte K, Denis-Lagache N, Péron S, Carrion C, Denizot Y, Cogné M.

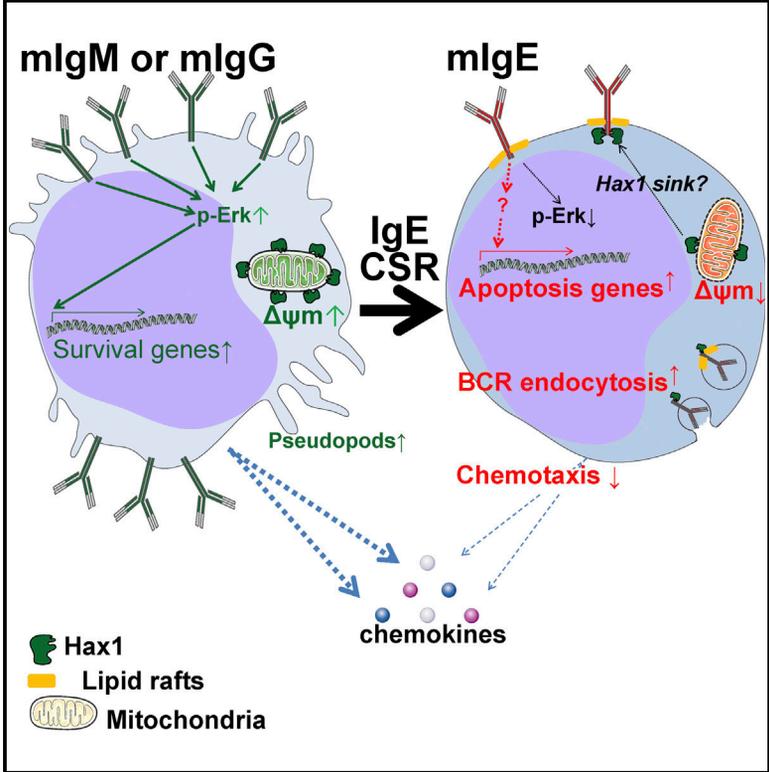
Cell Reports 2015, volume 10, numéro 6, pages 900-909.

Dans cet article, nous démontrons l'existence d'un stade de développement des lymphocytes B IgE+ autocontrôlé par les IgE membranaires. Les cellules IgE+ primaires ou transfectées leur BCR dans les rafts lipidiques pour une internalisation spontanée, sont moins mobiles et changent de morphologie. Nous suggérons que la combinaison de ces mécanismes proapoptotiques, impliquant potentiellement Hax1, évite l'accumulation de lymphocytes mémoires IgE+. Nous montrons également que ces caractéristiques sont indépendantes de la stimulation des lymphocytes B et résultent de l'expression d'une IgE de membrane. Par conséquent, peu de cellules survivent à une CSR vers IgE, ce qui minimise la quantité de cellules B pouvant se différencier en plasmocytes.

# Cell Reports

## Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression

### Graphical Abstract



### Authors

Brice Laffleur, Sophie Duchez, ..., Yves Denizot, Michel Cogné

### Correspondence

cogne@unilim.fr

### In Brief

IgE responses may convey severe allergy and thus need tight control. Laffleur et al. demonstrate a self-restrained B cell stage where membrane IgE expression impacts the phenotype, shape, and mobility of B lymphocytes, promotes apoptosis, and severely shortens IgE<sup>+</sup> B cell fate.

### Highlights

- Membrane IgE appears transiently and is then internalized
- The IgE B cell receptor (BCR) spontaneously co-localizes with lipid rafts
- IgE BCR expression restrains mobility responses to chemokines
- mIgE promotes apoptosis of IgE<sup>+</sup> cells, severely impacting their fate

### Accession Numbers

GSE64130

# Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression

Brice Laffleur,<sup>1,2</sup> Sophie Duchez,<sup>1,2</sup> Karin Tarte,<sup>3</sup> Nicolas Denis-Lagache,<sup>1,2</sup> Sophie Péron,<sup>1,2</sup> Claire Carrion,<sup>1,2</sup> Yves Denizot,<sup>1,2</sup> and Michel Cogne<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Limoges, 87000 Limoges, France

<sup>2</sup>CNRS UMR 7276, Institut Universitaire de France, Limoges 87000, France

<sup>3</sup>INSERM U917, Université de Rennes, Rennes 35000, France

\*Correspondence: [cogne@unilim.fr](mailto:cogne@unilim.fr)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.023>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

## SUMMARY

Among immunoglobulins (Igs), IgE can powerfully contribute to antimicrobial immunity and severe allergy despite its low abundance. IgE protein and gene structure resemble other Ig classes, making it unclear what constrains its production to thousand-fold lower levels. Whether class-switched B cell receptors (BCRs) differentially control B cell fate is debated, and study of the membrane (m)IgE class is hampered by its elusive *in vivo* expression. Here, we demonstrate a self-controlled mIgE<sup>+</sup> B cell stage. Primary or transfected mIgE<sup>+</sup> cells relocate the BCRs into spontaneously internalized lipid rafts, lose mobility to chemokines, and change morphology. We suggest that combined proapoptotic mechanisms possibly involving Hax1 prevent mIgE<sup>+</sup> memory lymphocyte accumulation. By uncoupling *in vivo* IgE switching from cytokine and antigen stimuli, we show that these features are independent from B cell stimulation and instead result from mIgE expression *per se*. Consequently, few cells survive IgE class switching, which might ensure minimal long-term IgE memory upon differentiation into plasma cells.

## INTRODUCTION

In mammals, IgE contributes to immunity against pathogens and toxins (Marichal et al., 2013; Palm et al., 2013). It also yields severe allergies, making it crucial to restrain IgE production and control IgE immune memory. Since IgE<sup>+</sup> cells are scarce *in vivo*, it is unclear whether, as for other Igs, cells with an IgE B cell receptor (BCR) become memory lymphocytes. Globally, humoral memory relies on the dual ability of B cells to either differentiate into long-lived plasma cells (PCs) or survive as memory B lymphocytes. The BCR, providing both tonic and ligation-induced signals, includes membrane-anchored Igs (mIgs) differing from secreted Igs by inclusion of an extracellular membrane-proximal domain, a transmembrane segment, and a cytoplasmic tail varying between heavy chain (HC) classes (Venkiteman et al.,

1991). Human mIgE exists with either a long (“m<sub>L</sub>IgE”) or a short (“m<sub>S</sub>IgE”) membrane-proximal domain (Batista et al., 1995).

Mouse mIgE was studied in the abundant mIgE<sup>+</sup> B cells appearing *in vitro* after class switch recombination (CSR) in the presence of interleukin-4 (IL-4) (Anand et al., 1997; Coffman et al., 1986). Such mIgE<sup>+</sup> B cells are rare *in vivo*, except in T/B monoclonal or hyper-T<sub>H</sub>2 LAT<sub>Y136F</sub> mice (Aguado et al., 2002; Genton et al., 2006; Erazo et al., 2007). A single spontaneous mIgE<sup>+</sup> lymphoma cell line was reported (Sitia, 1985). In mIgE<sup>+</sup> cells, BCR expression is weak (Karnowski et al., 2006). That mIgE<sup>+</sup> B cells are mandatory for generating IgE PCs (similar to mIgG and mIgA) was proven by knocking out membrane exons (Achatz et al., 1997; Amin et al., 2012; Kaisho et al., 1997). To avoid Fcε receptor-mediated artifacts, IgE<sup>+</sup> B cells can be characterized by intracellular rather than surface staining (Wesemann et al., 2011). After tagging mIgE or knocking in an IRES-GFP cassette downstream from C<sub>ε</sub>, it was suggested that within germinal centers, caspase activation was higher in IgE<sup>+</sup> than in IgG1<sup>+</sup> cells (Talay et al., 2012; He et al., 2013). However, the IRES-GFP strategy monitors not only mIgE but also germline C<sub>ε</sub> transcription. It was also proposed that among antigen-activated cells, mIgE<sup>+</sup> cells vanished through accelerated differentiation into PCs and were more apoptotic and less mobile than IgG<sup>+</sup> cells (Yang et al., 2012). These observations did not provide an explanation for the increased ratio of PCs versus activated B lymphocytes in the IgE<sup>+</sup> compartment, and more importantly with regard to long-term immunity, they gave no clue about the status of memory B cells.

In immature mouse B cells, transfected IgE expression resulted in BCR ligation-inducible growth inhibition as with IgM (Batista et al., 1996). In mature cells binding antigen, it is unknown whether class-switched and naive IgM<sup>+</sup> cells are differentially stimulated or eventually undergo activation-induced cell death (Guzman-Rojas et al., 2002; Figgitt et al., 2013; Péron et al., 2012). Cross-linking of a transfected mIgE was reported to induce apoptosis (Poggianella et al., 2006). *In vivo*, the rarity of mIgE<sup>+</sup> cells could involve either a specific influence of cytokines and cell interactions promoting IgE CSR or specific signals from the mIgE BCR. Globally, mIgE<sup>+</sup> cells have only been observed transiently and in minute amounts *in vivo* after B cell activation, but never as resting memory B cells. These peculiar restrictions of IgE synthesis prompted us to look for a putative mIgE-BCR-dependent and B cell intrinsic self-control. To explore mIgE

specificities, we designed models uncoupling mIgE expression from immune activation, and we evaluated the potential changes of B cell fate resulting from mIgE expression per se. We checked whether mIgE can mimic mIgM and support B cell survival, as shown for other HCs (Duchez et al., 2010; Horikawa et al., 2007; Lutz et al., 1998). We show that, independent of stimulation, mIgE expression per se alters the B cell phenotype in multiple regards, with notably a short lifespan.

## RESULTS

### Premature C $\epsilon$ Expression Ablates Mature B Cells

While abundant in vitro upon stimulation in the presence of IL-4, mIgE<sup>+</sup> cells barely appear in vivo. We forced mIgE expression and set up the  $\epsilon$ KI mutation replacing S $\mu$  with a human C $\epsilon$  encoding both secreted IgE and mIgE (Figures S1A and S1B). Human IgE weakly binding mouse Fc $\epsilon$  receptors was chosen to prevent nonspecific staining (Wesemann et al., 2011). Heterozygous wt/ $\epsilon$ KI mice were derived, but no B cell expressing IgE appeared (Figure S1C). This culminated in complete B cell lymphopenia in  $\epsilon$ KI/ $\epsilon$ KI animals, with bone marrow expansion of CD43<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup> pro-B (16.5% to 94.7% of all B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> cells,  $p < 0.0001$ ) but lack of CD25<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> pre-B cells (43.4% to 0.05% of all B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> cells,  $p < 0.0001$ ), while both follicular and marginal zone B cells were absent (Figure S1D). Neither murine Ig nor human IgE were detected in blood (Figure S1E). This did not involve defective association of human  $\epsilon$  HC with mouse surrogate light chains since a transfected human  $\epsilon$  HC efficiently reached the surface of mouse 18–81 pre-B cells (Figure S1F).

### Apoptosis and Poor Survival of Primary mIgE<sup>+</sup> Cells

We set up a staining protocol that removed bound soluble IgE from the cell surface (Figure S1G) and confirmed that true mIgE<sup>+</sup> cells appear in vitro under anti-CD40/IL-4 stimulation of wt mouse B cells. They proved more prone to spontaneous or cytokine-deprivation induced apoptosis than mIgG1<sup>+</sup> cells (Figures 1A and 1B). Decreased  $\Delta\Psi$ m potential suggested mitochondrial apoptosis, although use of bcl2 transgenic cells preserved a difference between mIgG1<sup>+</sup> and mIgE<sup>+</sup> cells (Figures 1A and 1B).

LAT<sub>Y136F</sub> mutant mice overproducing T<sub>H</sub>2 cytokines (Genton et al., 2006) generated [B220<sup>+</sup>, IgE<sup>+</sup>] cells in vivo, expressing CD138 much more frequently than IgM<sup>+</sup> or IgG<sup>+</sup> cells and thus likely engaged in PC differentiation (Figure 1C). Two days after bromodeoxyuridine (BrdU) injection, these cells stained as short-lived BrdU<sup>+</sup> cells (Figure 1D).

To compare survival according to Ig class, we transferred LAT<sub>Y136F</sub> splenocytes into RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice. Cell survival was estimated by monitoring levels of  $\mu$ ,  $\gamma$ 1, and  $\epsilon$  HC transcripts in spleen 48-hr post-transfer compared with their “input” amount in transferred cells. Differences appeared between persisting  $\mu$  expression, falling  $\gamma$ 1 levels, and still more strongly vanishing  $\epsilon$  expression. The faster disappearance of  $\epsilon$  versus  $\gamma$ 1 and  $\mu$  transcripts affected not only membrane but also secreted Ig transcripts, refuting the hypothesis that mIgE<sup>+</sup> cells disappeared by differentiating into PCs (Figure 1E).

Convergent observations were made with in vitro CD40L/IL4-stimulated human cells grafted to RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice: tran-

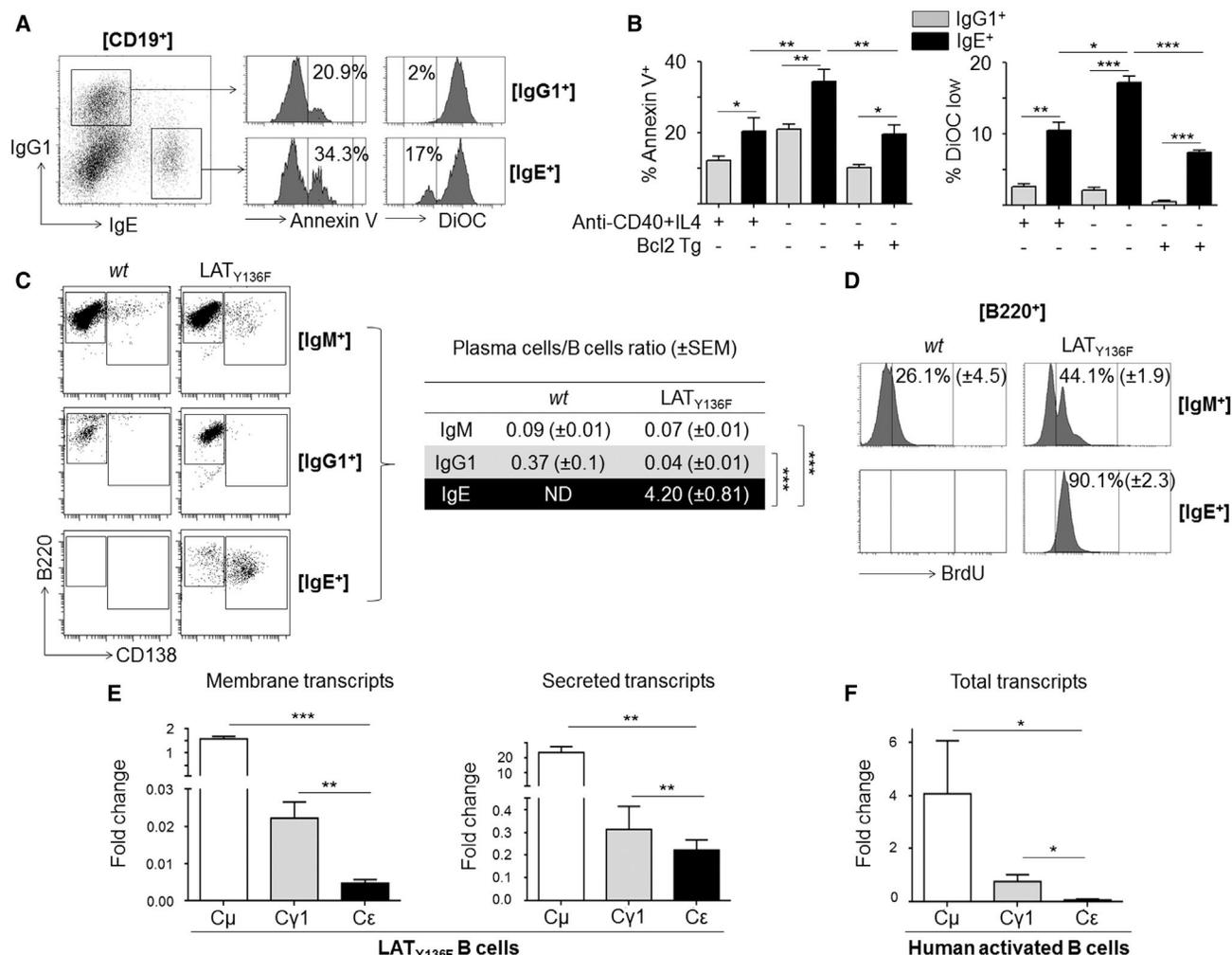
scripts evaluated after 48 hr indicated collapsed IgE production compared with IgM (Figure 1F).

### mIgE-Dependent Changes in B Cells

The short lifespan of IgE-switched wt or LAT<sub>Y136F</sub> cells might relate to either mIgE expression per se or a short-lived program promoted by T<sub>H</sub>2 stimuli. We designed models for mIgE expression in B cells without prior stimulus by transiently transfecting human or murine cell lines. Expression vectors encoded either the short or long (m<sub>S</sub> or m<sub>L</sub>) form of human mIgE, or mIgM as a control. In all cases, cytometry showed increased early apoptosis (with annexin V staining) specific to mIgE<sup>+</sup> cells. Decreased  $\Delta\Psi$ m potential confirmed mitochondrial apoptosis (Figures 2A and 2B). Accordingly, apoptosis was inhibited by cyclosporin A or caspase inhibitor Q-VD-OPh (Figure 2B). Thus, mIgE expression promotes apoptosis independently of B cell stimulation in cell lines. The 28 amino acid long mIgE tail was reported to interact with Hax1, putatively through a conserved tyrosine-based DYANILQ motif in mouse IgE (found as DYTNLVQ in human IgE, but absent in tails of all other Ig classes) (Oberndorfer et al., 2006). It was recently shown that Hax1 is an apoptosis inhibitor binding mitochondria and that the vpr protein triggers apoptosis by relocating Hax1 (Simmen, 2011). We wondered whether mIgE expression could also relocate Hax1 and carried out flow imaging of BL41 transfectants. While transfection with control vectors preserved homogeneous Hax1 staining, mIgE expression associated with Hax1 relocation and heterogeneous staining (quantified by flow-imaging bright detail evaluation) (Figures 2C and 2D). Mouse IgE<sup>+</sup> primary cells also featured increased heterogeneous Hax1 staining (Figures 2D and S2A). Co-localization experiments of Hax1 and mitochondria-targeted DsRed showed mitochondrial Hax1 depletion in mIgE<sup>+</sup> cells (Figure 2E). Finally, Hax1 staining globally increased in mIgE<sup>+</sup> cells (mean fluorescence intensity 36,824 for mIgG1<sup>+</sup> versus 68,864 for mIgE<sup>+</sup> mouse primary B cells and 145,667 for empty vector-transfected versus 332,353 for mIgE-transfected BL41 cells). This might result from lowered Hax1 catabolism upon binding IgE, since Hax1 normally undergoes rapid proteosomal degradation (Li et al., 2012).

We also inserted a VDJ segment upstream of C $\epsilon$  in the  $\epsilon$ KI construct, checking that it supported mIgE expression in transfected murine A20 cells. While a C $\mu$  control construct readily yielded stable mIgM<sup>+</sup> transfectants, mIgE expression first appeared transient. Obtaining stable transfectants required repeated sorting of mIgE<sup>+</sup> cells. Both transiently transfected and sorted/stabilized mIgE<sup>+</sup> cells constantly showed higher apoptosis than untransfected cells or mIgM<sup>+</sup> transfectants (Figure S2B). We looked for transcriptional changes between untransfected, stable mIgM<sup>+</sup> and two independent stable mIgE<sup>+</sup> A20 transfectants. Unsupervised analysis clustered both  $\epsilon$ HC transfectants together, while the  $\mu$ HC transfectant clustered with untransfected A20. The strongest (over 3-fold) changes in mIgE<sup>+</sup> cells fell into four major categories (Figure 3A; Table S1):

- Apoptosis: several *pro-apoptotic genes* were strongly up-regulated including Phlda3, Card12, and two inducers of mitochondrial apoptosis (Map3K9 and Bim), while some



**Figure 1. Primary Class-Switched IgE<sup>+</sup> B Cells Are Short Lived and Sensitive to Apoptosis**

(A and B) After stimulation of splenocytes from wt (n = 8) or bcl2 transgenic mice (n = 6), apoptosis was determined after 24 hr cytokine deprivation (data are means ± SEM, three experiments, unpaired t test between mice and paired t test between isotypes).

(C) Splenocytes split by flow cytometry into B lymphocytes (B220<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>) and PCs (CD138<sup>+</sup>). Ratios were quantified for each Ig class.

(D) Amounts of recently divided (BrdU<sup>+</sup>) and long lived (BrdU<sup>-</sup>) cells from wt or LAT<sub>Y136F</sub> mice (data are means ± SEM, n = 7, three experiments, paired t test).

(E) Lymphocytes from LAT<sub>Y136F</sub> mice were transferred into RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice. C $\mu$ , C $\gamma$ 1, and C $\epsilon$  membrane and secreted transcripts were quantified by qPCR, estimating survival of the corresponding B cells (data are means ± SEM, n = 6, three experiments, paired t test).

(F) Human lymphocytes were stimulated and transferred into RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice. C $\mu$ , C $\gamma$ 1, and C $\epsilon$  total transcripts were quantified by qPCR (data are means ± SEM, n = 4, four experiments, Mann-Whitney test).

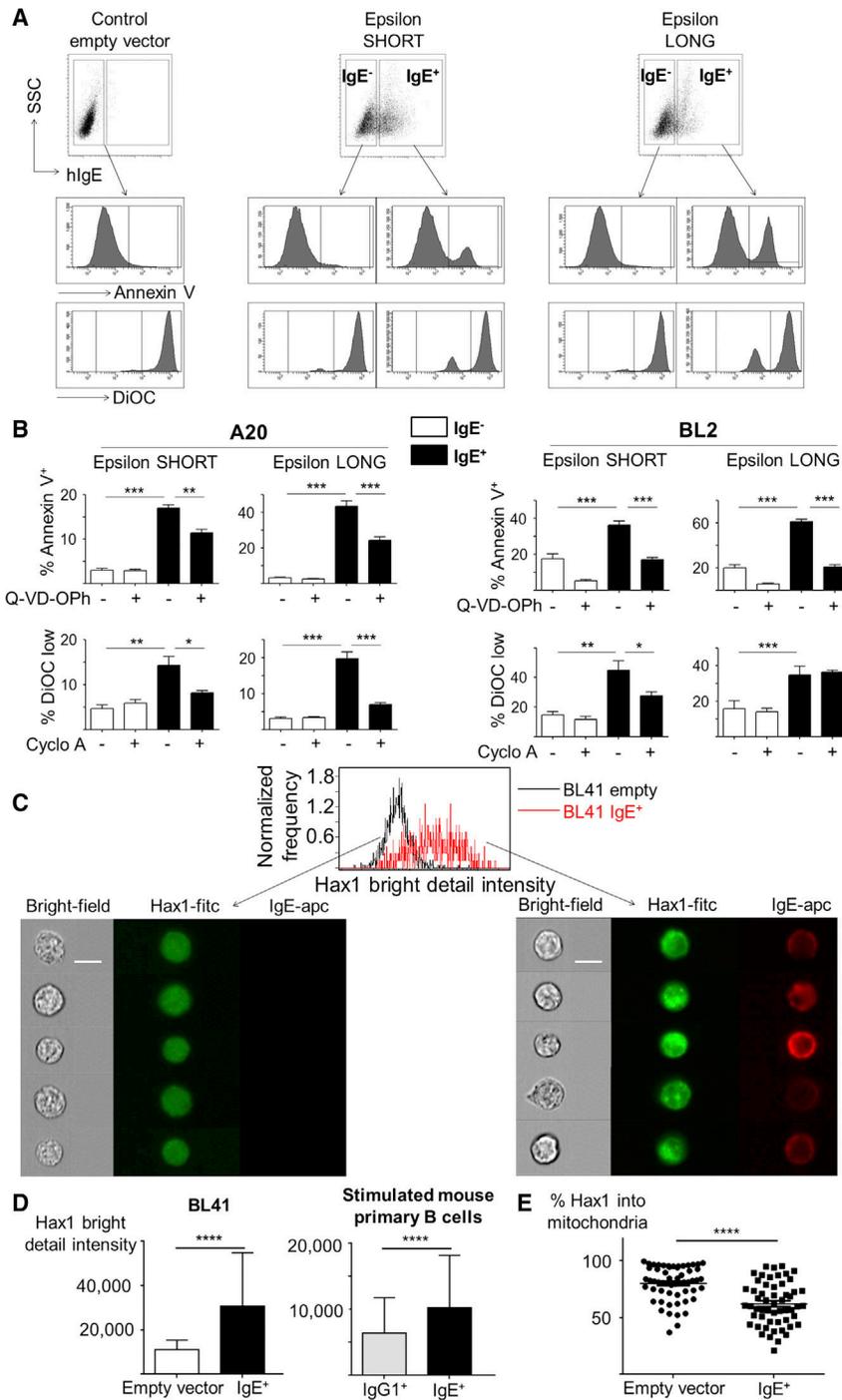
See also Figure S1.

*anti-apoptotic genes* were underexpressed, including Bcl3 and Cdkn1a.

- **Metabolism:** upregulation of DecR1, a fatty acid catabolism enzyme inhibiting cell proliferation; Slc16a3, which extracts lactate; and Bhd1, a ketone pathway regulator.
- **Signaling and mobility:** two transporters extracting cytosolic Ca<sup>2+</sup>, Slc24a3, and Npc111 were upregulated. The Rgs13 inhibitor of small GTP protein-coupled receptors (GPCRs) known to reduce intra-GC B cell mobility (Hwang et al., 2013) was overexpressed, which might alter cytoskeleton reorganization and responses to che-

mokines. Finally, downregulation affected the  $\gamma$ c chain of IL-2-4-7-21 receptors (major receptors for B cell activation), the semaphorin receptor plexin D1 that normally promotes B cell mobility (Holl et al., 2011), S1pR1, promoting lymphoid egress from GCs, and the CXCL13 receptor CXCR5.

- **Other surface receptors:** these included underexpressed integrins and receptors involved in adhesion to laminins or glycosaminoglycans (Itga6, Vsig1, CD97...) and in B-T cell interactions or cytokine responses (CD70, CD69, IL2R $\gamma$ ) and increased expression of the IgG/IgE-receptor Fc $\gamma$ R4.



**Figure 2. Membrane IgE Induces Apoptosis and Hax1 Relocalization in B Cells**

(A and B) Transient transfection of A20 and BL2 B cell lines with expression vectors for SHORT or LONG mIgE. Annexin V and DiOC<sub>6</sub> staining were compared between mIgE<sup>+</sup> and mIgE<sup>-</sup> cells in the absence (-) or presence (+) of Q-VD-OPh or cyclosporine A (Cyclo A) (data are means  $\pm$  SEM, n = 6, three experiments, paired t test).

(C and D) Hax1 staining patterns compared by flow imaging between BL41 mIgE<sup>-</sup> and mIgE<sup>+</sup>. Increased width of “bright detail intensity” peak indicates increased heterogeneity of staining and was quantified in transfected BL41 (n = 3, two experiments each evaluating  $\sim$ 1,000 IgE<sup>+</sup> cells) or stimulated mouse splenocytes (n = 4, two experiments each evaluating  $\sim$ 1,800 IgE<sup>+</sup> cells) (scale bar represents  $\sim$ 20  $\mu$ m; data are means  $\pm$  SD).

(E) Hax1 colocalization to mitochondria in BL41 cells (three experiments evaluating  $\sim$ 60 IgE<sup>+</sup> cells, unpaired t test).

See also Figure S2.

din labeling) and increased circularity by flow imaging (Figure 3B). Increased circularity also marked primary cells induced in vitro to  $\epsilon$  compared with  $\gamma$ 1 CSR (Figure S3A).

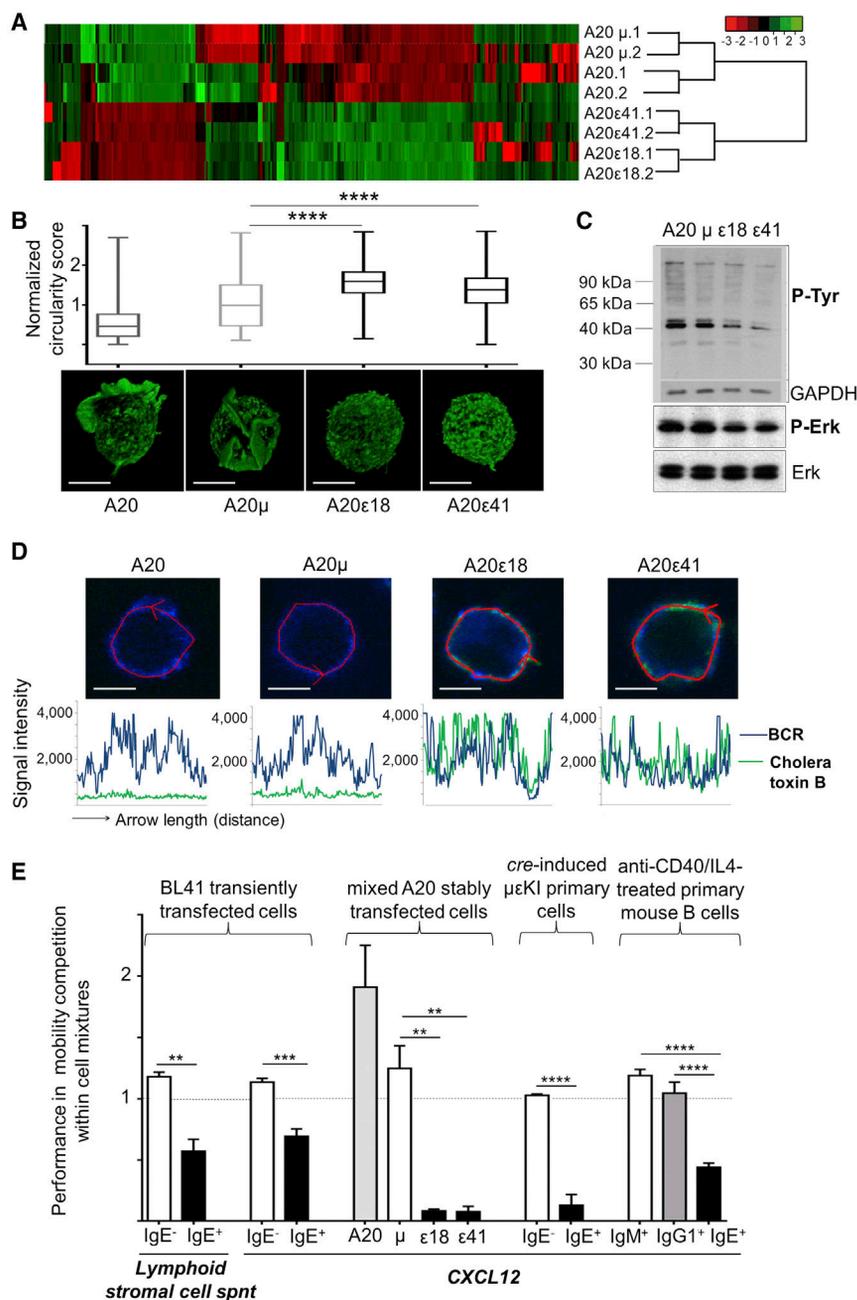
Basal intracellular tyrosine phosphorylation and phospho-ERK levels were decreased in mIgE<sup>+</sup> A20 transfectants (Figure 3C). In addition, mIgE<sup>+</sup> cells showed spontaneous BCR co-localization with lipid rafts (Figure 3D) and increased abundance of rafts both in transfected A20 and mIgE<sup>+</sup> activated primary B cells compared with mIgM<sup>+</sup> or mIgG1<sup>+</sup> cells from the same culture (Figure S3B).

In mIgE<sup>+</sup> transfectants, the aforementioned increased Fc $\gamma$ R4 transcription correlated with increased surface expression and binding of fluorescently labeled IgE (Figure S3C). Since genes connected to mobility showed variations, we assayed responses to chemokines of primary and transfected mIgE<sup>+</sup> cells. In all cases, mIgE<sup>+</sup> cells proved less reactive to either CXCL12, CXCL13, or mixed chemokines produced by lymphoid stromal cells (Figures 3E and S3D).

### mIgE<sup>+</sup> cre-Switched B Cells Internalize mIgE BCR, Lose Mobility, and Are Short Lived

Since  $\epsilon$ KI mice were B-less, we generated  $\mu\epsilon$ KI animals whose B cells initially express C $\mu$  and can later be cre-deleted toward C $\epsilon$  expression. The C $\epsilon$  gene encoded both secreted IgE and mIgE

Variations of apoptosis-related genes fitted with the observed ongoing apoptosis of mIgE<sup>+</sup> cells. Other changes likely to impact cell fate related to signaling, cell adhesion, mobility, and thus optimal interactions with the microenvironment, notably due to underexpressed plexin D1 and/or increased RGS13 and GPCR inhibition thereof. A20 mIgE<sup>+</sup> transfectants indeed showed actin cytoskeleton reorganization and loss of pseudopods by confocal microscopy (after phalloi-



**Figure 3. Phenotypic Changes Induced by Membrane IgE**

(A) Unsupervised clustering split  $\text{mIgE}^+$  transfectants and untransfected or  $\text{mIgM}^+$  A20.

(B) (Top) Circularity was quantified for A20 cells and IgM or IgE transfectants by flow imaging (data are represented as boxplot with whiskers from min to max,  $\sim 5,000$  cells, two experiments, unpaired t test) and parallel confocal microscopy (bottom, representative cells).

(C) (Top) Phosphorylation of proteins from A20 and transfectants; GAPDH is a loading control (two experiments). (Bottom) Erk-phosphorylation (two experiments).

(D) BCR (in blue) and lipid rafts stained by cholera toxin (green) show increased co-localization (i.e., superimposition of curves) in IgE $^+$  cells (representative cells, three experiments) (quantification followed red arrows along cell contours; scale bar represents  $\sim 5 \mu\text{m}$ ).

(E) Cell mobility experiments in response to gradients of (left) a mix of chemokines produced by human stromal cells, and (right) recombinant CXCL12 (data are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$  to 8, five experiments, paired t test).

See also Figure S3.

with IgE expression remaining below 4% and vanishing within 4 weeks after *cre* induction (Figure 4C).  $\text{C}\mu$  deletion and subsequent  $\text{mIgE}$  “*cre*-CSR” were thus counterselected in B cells and did not yield long-lived  $\text{mIgE}^+$  cells. Also, similar to normal primary  $\text{mIgE}^+$  cells (and to transfected cells), *cre*-switched cells showed reduced chemokine-induced mobility (Figure 3E). Feeding mice with BrdU for 10 days, 20 days after tamoxifen induction, distinguished nonproliferating “long-lived” cells from recently divided “short-lived” cells: IgE $^+$  cells overwhelmingly scored as BrdU $^+$ , i.e., short lived (Figure 4D), in agreement with transient  $\text{mIgE}$  expression in blood or spleen lymphocytes. In serum, human IgE peaked at the same time as IgE $^+$  cells, but persisted at levels around 1,000 KU/l after

(Karnowski et al., 2006) (Figure 4A). In homozygous mice, the  $\mu\epsilon$ KI mutation and associated  $\text{S}\mu$  deletion homogeneously imposed human IgM expression instead of any mouse Ig (Figure 4B). Mating with *creERT2* mice yielded tamoxifen-inducible IgE expression. In vivo, *cre* deletion was efficient at the DNA level in spleen (Figure S4A). It also massively occurred in vitro in immortalized IgM $^+$  hybridomas from  $\mu\epsilon$ KI/*creERT2* mice (Figure S4B). While inducible in primary B cells in vivo and in vitro, IgE detection required intracellular staining, reminiscent of requirements for staining  $\text{mIgE}^+$  primary cells (Wesemann et al., 2011). Contrasting with massive *cre* deletion at the DNA level in spleen, most primary B cells retained IgM expression in vivo,

IgE $^+$  cells completely vanished from blood and spleen, over 5 months after tamoxifen induction. Memory of *cre* switching was thus only attested to by a few remaining IgE secreting cells (Figure 4C).

Direct  $\text{mIgE}$  staining has been documented as weak or absent on primary B cells (Karnowski et al., 2006; Wesemann et al., 2011). Since it was also virtually absent in  $\mu\epsilon$ KI B cells, we wondered whether this could reflect spontaneous  $\text{mIgE}$  internalization. To preserve membrane receptor trafficking, B cells were stained at 37°C instead of 4°C, with fluorescently labeled anti-IgE antibodies. This clearly and specifically stained tamoxifen-induced IgE $^+$   $\mu\epsilon$ KI cells, showing that  $\text{mIgE}$  BCRs do reach the

membrane but are then internalized, eventually together with a labeling antibody (Figures 4E and 4G).

Similarly, in CD40L-stimulated human primary B cells, IgE expression appeared faint after staining at 4°C but strongly increased by staining at 37°C and was restricted to IL-4-exposed cells (Figures 4F and 4G).

## DISCUSSION

Class-specific variations of BCR functions are incompletely understood (Laffleur et al., 2014). Compared with IgM, cross-linking of class-switched BCRs more strongly boosts PC differentiation (Horikawa et al., 2007; Pogue and Goodnow, 2000; Sato et al., 2007; Waisman et al., 2007; Wakabayashi et al., 2002). Specific mIgG or mIgE interactions were reported with Grb2 (Engels et al., 2009). The mIgE tail also interacts with Hax1, which binds the Syk target Hs1 (Batista et al., 1996; Oberndorfer et al., 2006). However, transfected cells reacted similarly to mIgE or mIgM cross-linking (Poggianella et al., 2006).

Independent of cross-linking, it is unknown whether constitutive signals from the various HC classes differentially support B cell survival. Rare primary class-switched mIgE<sup>+</sup> lymphocytes are mandatory precursors of IgE PCs (Achatz et al., 1997; Brightbill et al., 2010). The elusive nature of the mIgE<sup>+</sup> stage in vivo has been attributed to accelerated PC differentiation, increased apoptosis, or poor S<sub>e</sub> efficacy during CSR, three non-mutually exclusive explanations (He et al., 2013; Misaghi et al., 2013; Wu and Zarrin, 2014; Yang et al., 2012). The T<sub>H</sub>2 context yielding mIgE<sup>+</sup> cells might also shorten their survival, similar to some T cells in which Socs-1 induction by IL-4, IL-13, and Stat6 promotes activation-induced cell death (Alexander, 2002; Hebenstreit et al., 2003; Oh et al., 2012). Whatever the mechanisms involved, altogether they limit IgE production in vivo to levels 10,000- to 100,000-fold lower than other classes.

Since mIgE<sup>+</sup> cells abundantly arise in vitro from B cell stimulation, we suspected that one basis for their in vivo rarity might be that mIgE expression per se modulates B cell fate. To assay such a potential mIgE effect independently of any antigen-dependent cross-linking and T cell help, we first forced mIgE expression in mice by replacing S<sub>μ</sub> with a C<sub>ε</sub> Ig gene. Early in vivo *ε* expression instead of *μ* HC in homozygous *ε*KI mice abrogated B cell lymphopoiesis. Tonic signals successively provided by the pre-BCR and BCRs support B cell development (Mårtensson et al., 2007; Rossi et al., 2006). Albeit with variable efficiencies, tonic signals provided by *δ*, *γ*, or *α* HCs can replace *μ* during lymphopoiesis (Duchez et al., 2010; Horikawa et al., 2007; Lutz et al., 1998). The *ε*KI lymphopenia shows that *ε* differs from other HCs in this regard.

We explored mIgE expression in [VDJ-C<sub>ε</sub>]-transfected cells and found it unstable in prolonged cultures. Additionally and reminiscent of the *ε*KI B cell defect, mIgE<sup>+</sup> transfected cells showed multiple functional and morphologic changes, with defective chemokine-triggered mobility, decreased intracellular tyrosine phosphorylation, increased circularity, BCR clustering into lipid rafts, and finally increased apoptosis. Associated transcriptional changes had the potential to inhibit responses to chemokines (with modified RGS13, integrins, and plexin D1 expression), modulate receptors involved in T-B interactions, affect

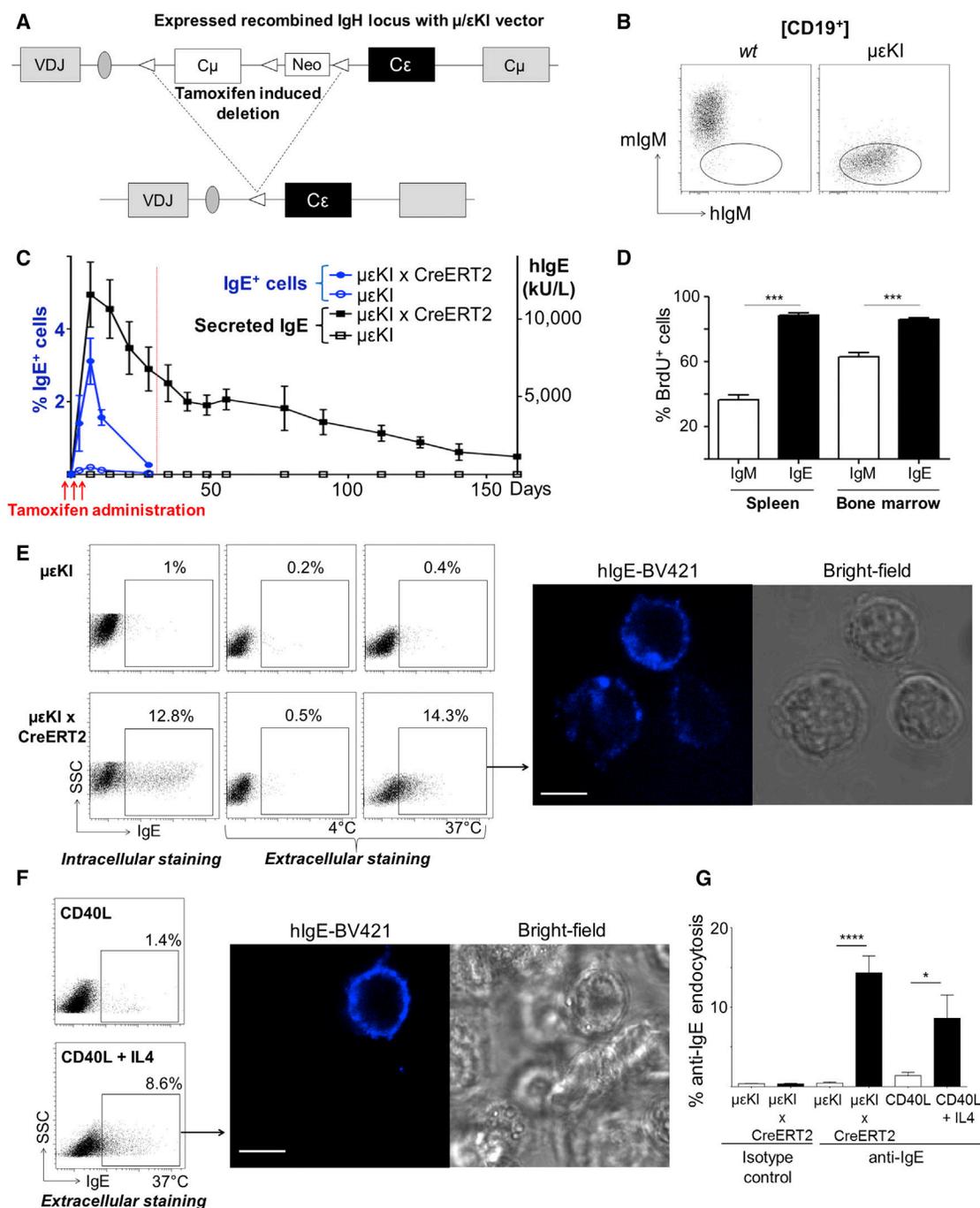
metabolism, and promote apoptosis. Multiple phenotypic alterations were common to various mIgE<sup>+</sup> cells (transfected cells, primary cells, and knock-in models). Interestingly, mIgE expression induced relocalization of the Hax1 anti-apoptotic protein, suggesting that the mIgE intracellular tail could be a sink for Hax1.

Endogenous mIgE expressing B cells obtained in vitro (after stimulation of human or wt mouse B cells) or ex vivo showed mIgE to be transiently expressed and internalized. These mIgE<sup>+</sup> cells, recently divided, survived less than other B cells upon transfer into immunodeficient mice.

To characterize mIgE function in primary B cells independently of immune stimulation, we studied *μ*εKI B cells expressing mIgE upon *creERT2* induction. It is known from previous studies that *creERT2* has no major toxicity in B cells (Dogan et al., 2009). In *μ*εKI mice, the *cre* deletion was counter-selected in B cells, and rare mIgE<sup>+</sup> B cells were again short lived both in vivo and in vitro. Similar to transfectants or classical switched B cells, they expressed low levels of a rapidly internalized IgE BCR. They also poorly responded to CXCL12 and easily underwent apoptosis. In contrast, IgE secretion lasted for months in *μ*εKI mice after induction, indicating long-term survival of IgE PCs.

Altogether, our data suggest an immobile, reprogrammed, and rapidly apoptotic phenotype of mIgE<sup>+</sup> cells notably involving Hax1 sequestration by mIgE and inhibition of responses to chemokines. This phenotype directly imposed by mIgE expression prior to any antigen encounter may explain the short lifespan and in vivo rarity of mIgE<sup>+</sup> cells. It is thus questionable whether, among IgE<sup>+</sup> cells, the high ratio of PCs represents boosted PC differentiation or accelerated death of non-PC cells. Since the mIgE<sup>+</sup> stage is mandatory for PC differentiation (Achatz et al., 1997), it appears as a bottleneck limiting IgE memory (prohibiting survival of mIgE<sup>+</sup> memory B lymphocytes, but allowing a few to escape deletion, reach the mIgE stage, and survive as PCs). Existence of long-lived PCs is consistent with the common observation of long-term IgE atopy. Noticeably, PCs deriving from cells with a mIgE BCR poorly respond to CXCL12 (Achatz-Straussberger et al., 2008), possibly accounting for their absence in bone marrow (He et al., 2013). This suggests that part of the mIgE<sup>+</sup> phenotype is durably imprinted into PC differentiation afterward.

Altogether, a reasonable picture of IgE responses in light of our data and previous studies is that multiple mechanisms concur to restrict IgE production to minute amounts. IgE CSR is less efficient than IgG CSR; it yields mIgE<sup>+</sup> cells only appearing transiently in both humans and mice, poorly effecting migrations associated with maturation within lymphoid organs and thus quickly eliminated by spontaneous and activation-induced apoptosis without survival as mIgE<sup>+</sup> memory cells. Only few IgE PCs might eventually survive this pathway, become long-lived, and solely ensure true long-term IgE memory. Given the short half-life of IgE, such rare long-lived IgE PCs are likely responsible for immediate IgE allergy, while mIgM<sup>+</sup> or mIgG<sup>+</sup> memory cells can eventually generate new IgE cells after CSR. Direct or sequential CSR was indeed documented as providing new IgE<sup>+</sup> cells from either Ag-experienced mIgM<sup>+</sup> or mIgG<sup>+</sup> cells (Xiong et al., 2012).



**Figure 4.  $\mu\epsilon$ KI Mutant Mice**

(A) (Top) Targeted IgH locus (not to scale) with floxed human C $\mu$  gene, neo<sup>r</sup> cassette, and C $\epsilon$  gene. (Bottom) The  $\mu\epsilon$ KI locus normally undergoes V(D)J rearrangement, expressed with human C $\mu$ ; after breeding with CreERT2 mice, C $\epsilon$  is expressed upon cre deletion of C $\mu$ .

(B) B cells from  $\mu\epsilon$ KI mice express human IgM BCR (n = 20, five experiments).

(C)  $\mu\epsilon$ KI x CreERT2 mice were sacrificed 1 day to 5 months after tamoxifen administration. IgE B cells among splenocytes were quantified by cell cytometry after intracellular staining (mean  $\pm$  SEM, n = 3 to 7 mice per group, four experiments); human IgE was evaluated in sera.

(D) BrdU was injected 10 days before sacrifice, 20 days after tamoxifen treatment, and incorporation was evaluated (mean  $\pm$  SEM, n = 5, two experiments, paired t test).

(E) Cell cytometry (left) of IgE expression among [CD19<sup>+</sup>] cells in  $\mu\epsilon$ KI x CreERT2 mice 24 hr after cre induction, readily detects IgE after permeabilization but not by surface labeling at 4°C. In contrast, 6-hr incubation at 37°C with fluorescent anti-IgE antibodies stains cells specifically from mice expressing cre (n = 9, four experiments, paired t test). Confocal imaging of internalized fluorescent antibodies (right; scale bar represents ~10  $\mu$ m).

(legend continued on next page)

This multifaceted restriction of IgE responses most likely attests to the beneficial accumulation throughout evolution of multiple means to both keep on producing the most powerful magic bullet of adaptive immunity while maintaining its hazardous production under tight control. Each of these specific constraints on the IgE B cell compartment will clearly deserve in-depth molecular analysis in the future.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Mice

RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> (Colucci et al., 1999), AID<sup>-/-</sup> (Muramatsu et al., 2000), and LAT<sub>Y136F</sub> (Aguado et al., 2002; Genton et al., 2006) mice were used. *eKl* mice carried an inserted human C $\epsilon$  gene replacing S $\mu$ ,  *$\mu$ eKl* mice carried a floxed human C $\mu$  followed by C $\epsilon$  (expressed upon *cre* deletion of C $\mu$ ). Detailed methods are described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

### B Cell Transfectants

Expression of rearranged Ig chains was in A20, BL2, and BL41 cell lines. Detailed methods are described in the [Supplemental Experimental Procedures](#).

### Transcription Analysis

RNA was analyzed by qPCR for expression of  $\mu$ ,  $\gamma$ , and  $\epsilon$  Ig HC secreted and membrane forms. Microarray analyses were with Agilent chips. Detailed methods are described in the [Supplemental Experimental Procedures](#).

### Cell Cultures

Sorted B cells were stimulated for IgE CSR in the presence of IL-4. In transfer experiments, cells were injected intravenously into RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice. Detailed methods are described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

### Cytometry, Confocal Microscopy, and Flow Imaging

Proliferation was monitored by BrdU incorporation. Apoptosis was monitored by Annexin V and DiOC<sub>6</sub> staining. Detailed methods are described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

### Cell Mobility

Evaluation was done using transwells and recombinant or natural chemokines. The detailed method is described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

### Statistical Analyses

Student's *t* test or Mann-Whitney tests were used (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, \*\*\*\**p* < 0.0001).

## ACCESSION NUMBERS

Microarray data have been deposited to the GEO database under accession number GSE64130.

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, four figures, and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.023>.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.C. designed experiments and wrote the manuscript. B.L. and M.C. performed the experiments, analyzed data, and prepared the figures. S.D., N.D.-L., S.P., C.C., and Y.D. participated in the experiments. K.T. discussed the data and contributed useful reagents. M.C. obtained financial grants and agreements to perform the study.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of our transgenic facility and cell imaging facilities; Mylène Brousse and Sandrine Lecardeur for technical assistance; Tasuku Honjo, Bernard Malissen, Marie-Christine Birling, and James Di Santo for respectively providing AID<sup>-/-</sup>, LAT<sub>Y136F</sub>, ubiquitous creERT2, and RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice; Patrick Smith for anti-Fc $\gamma$ RIV antibody; and Jeanne Cook-Moreau for critical reading of the manuscript. This work was supported by Ligue Nationale Contre le Cancer, Association pour la Recherche sur le Cancer (grant SL220100601332), Institut Universitaire de France, and Conseil Régional du Limousin. B.L. and S.D. PhD fellowships were from CNRS, Région Limousin and Association pour la Recherche sur le Cancer.

Received: September 8, 2014

Revised: October 21, 2014

Accepted: January 8, 2015

Published: February 12, 2015

## REFERENCES

- Achatz, G., Nitschke, L., and Lamers, M.C. (1997). Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* 276, 409–411.
- Achatz-Straussberger, G., Zaborsky, N., Königsberger, S., Luger, E.O., Lamers, M., Cramer, R., and Achatz, G. (2008). Migration of antibody secreting cells towards CXCL12 depends on the isotype that forms the BCR. *Eur. J. Immunol.* 38, 3167–3177.
- Aguado, E., Richelme, S., Nuñez-Cruz, S., Miazek, A., Mura, A.-M., Richelme, M., Guo, X.-J., Sainty, D., He, H.-T., Malissen, B., and Malissen, M. (2002). Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science* 296, 2036–2040.
- Alexander, W.S. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 410–416.
- Amin, R., Carrion, C., Decourt, C., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). Deletion of the  $\alpha$  immunoglobulin chain membrane-anchoring region reduces but does not abolish IgA secretion. *Immunology* 136, 54–63.
- Anand, S., Batista, F.D., Tkach, T., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1997). Multiple transcripts of the murine immunoglobulin  $\epsilon$  membrane locus are generated by alternative splicing and differential usage of two polyadenylation sites. *Mol. Immunol.* 34, 175–183.
- Batista, F.D., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1995). Characterization and expression of alternatively spliced IgE heavy chain transcripts produced by peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 154, 209–218.
- Batista, F.D., Anand, S., Presani, G., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1996). The two membrane isoforms of human IgE assemble into functionally distinct B cell antigen receptors. *J. Exp. Med.* 184, 2197–2205.
- Brightbill, H.D., Jeet, S., Lin, Z., Yan, D., Zhou, M., Tan, M., Nguyen, A., Yeh, S., Delarosa, D., Leong, S.R., et al. (2010). Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2218–2229.

(F) Cell cytometry (left) of IgE expression among stimulated human B cells, incubated 6 hr at 37°C with fluorescent anti-IgE. Confocal imaging of internalized fluorescent antibodies (right; scale bar represents ~10  $\mu$ m) (*n* = 6, three experiments, Mann-Whitney test).

(G) Quantification of endocytosis from data of (E) and (F). BCR endocytosis was quantified in mouse primary cells with the 37°C IgE staining procedure, using either  $\mu$ eKl or  $\mu$ eKl  $\times$  creERT2 cells treated with tamoxifen, and in human B cells stimulated for 4 days with either CD40L or CD40L + IL4. Data are means  $\pm$  SEM. See also Figures S1A and S4.

- Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A., and Paul, W.E. (1986). B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* *136*, 4538–4541.
- Colucci, F., Soudais, C., Rosmaraki, E., Vanes, L., Tybulewicz, V.L., and Di Santo, J.P. (1999). Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model: investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation. *J. Immunol.* *162*, 2761–2765.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* *10*, 1292–1299.
- Duchez, S., Amin, R., Cogné, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthésy, B., and Cogné, M. (2010). Premature replacement of mu with  $\alpha$  immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 3064–3069.
- Engels, N., König, L.M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Schrader, V., and Wienands, J. (2009). Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat. Immunol.* *10*, 1018–1025.
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P.G., Urban, J.F., Jr., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2007). Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* *26*, 191–203.
- Figgett, W.A., Fairfax, K., Vincent, F.B., Le Page, M.A., Katik, I., Deliyanti, D., Quah, P.S., Verma, P., Grumont, R., Gerondakis, S., et al. (2013). The TACI receptor regulates T-cell-independent marginal zone B cell responses through innate activation-induced cell death. *Immunity* *39*, 573–583.
- Genton, C., Wang, Y., Izui, S., Malissen, B., Delsol, G., Fournié, G.J., Malissen, M., and Acha-Orbea, H. (2006). The Th2 lymphoproliferation developing in LatY136F mutant mice triggers polyclonal B cell activation and systemic autoimmunity. *J. Immunol.* *177*, 2285–2293.
- Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J.C., Rangel, R., and Martinez-Valdez, H. (2002). Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* *107*, 167–175.
- He, J.-S., Meyer-Hermann, M., Xiangying, D., Zuan, L.Y., Jones, L.A., Ramakrishna, L., de Vries, V.C., Dolpady, J., Aina, H., Joseph, S., et al. (2013). The distinctive germinal center phase of IgE<sup>+</sup> B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response. *J. Exp. Med.* *210*, 2755–2771.
- Hebenstreit, D., Luft, P., Schmiedlechner, A., Regl, G., Frischauf, A.-M., Aberger, F., Duschl, A., and Horejs-Hoock, J. (2003). IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site. *J. Immunol.* *171*, 5901–5907.
- Holl, E.K., O'Connor, B.P., Holl, T.M., Roney, K.E., Zimmermann, A.G., Jha, S., Kelsoe, G., and Ting, J.P.-Y. (2011). Plexin-D1 is a novel regulator of germinal centers and humoral immune responses. *J. Immunol.* *186*, 5603–5611.
- Horikawa, K., Martin, S.W., Pogue, S.L., Silver, K., Peng, K., Takatsu, K., and Goodnow, C.C. (2007). Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *J. Exp. Med.* *204*, 759–769.
- Hwang, I.-Y., Hwang, K.-S., Park, C., Harrison, K.A., and Kehrl, J.H. (2013). Rgs13 constrains early B cell responses and limits germinal center sizes. *PLoS ONE* *8*, e60139.
- Kaisho, T., Schwenk, F., and Rajewsky, K. (1997). The roles of  $\gamma$  1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* *276*, 412–415.
- Karnowski, A., Achatz-Straussberger, G., Klockenbusch, C., Achatz, G., and Lamers, M.C. (2006). Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1917–1925.
- Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Péron, S., Sirac, C., Moreau, J., and Cogné, M. (2014). AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* *5*, 1118–1131.
- Li, B., Hu, Q., Xu, R., Ren, H., Fei, E., Chen, D., and Wang, G. (2012). Hax-1 is rapidly degraded by the proteasome dependent on its PEST sequence. *BMC Cell Biol.* *13*, 20.
- Lutz, C., Ledermann, B., Kosco-Vilbois, M.H., Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., Köhler, G., and Brombacher, F. (1998). IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* *393*, 797–801.
- Marichal, T., Starkl, P., Reber, L.L., Kalesnikoff, J., Oettgen, H.C., Tsai, M., Metz, M., and Galli, S.J. (2013). A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity* *39*, 963–975.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007). The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 137–142.
- Misaghi, S., Senger, K., Sai, T., Qu, Y., Sun, Y., Hamidzadeh, K., Nguyen, A., Jin, Z., Zhou, M., Yan, D., et al. (2013). Polyclonal hyper-IgE mouse model reveals mechanistic insights into antibody CSR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 15770–15775.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553–563.
- Oberdorfer, I., Schmid, D., Geisberger, R., Achatz-Straussberger, G., Cramer, R., Lamers, M., and Achatz, G. (2006). HS1-associated protein X-1 interacts with membrane-bound IgE: impact on receptor-mediated internalization. *J. Immunol.* *177*, 1139–1145.
- Oh, J., Kim, S.-H., Ahn, S., and Lee, C.-E. (2012). Suppressors of cytokine signaling promote Fas-induced apoptosis through downregulation of NF- $\kappa$ B and mitochondrial Bfl-1 in leukemic T cells. *J. Immunol.* *189*, 5561–5571.
- Palm, N.W., Rosenstein, R.K., Yu, S., Schenten, D.D., Florsheim, E., and Medzhitov, R. (2013). Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity* *39*, 976–985.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* *336*, 931–934.
- Poggianella, M., Bestagno, M., and Burrone, O.R. (2006). The extracellular membrane-proximal domain of human membrane IgE controls apoptotic signaling of the B cell receptor in the mature B cell line A20. *J. Immunol.* *177*, 3597–3605.
- Pogue, S.L., and Goodnow, C.C. (2000). Gene dose-dependent maturation and receptor editing of B cells expressing immunoglobulin (Ig)G1 or IgM/IgG1 tail antigen receptors. *J. Exp. Med.* *191*, 1031–1044.
- Rossi, B., Espeli, M., Schiff, C., and Gauthier, L. (2006). Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocation and activation. *J. Immunol.* *177*, 796–803.
- Sato, M., Adachi, T., and Tsubata, T. (2007). Augmentation of signaling through BCR containing IgE but not that containing IgA due to lack of CD22-mediated signal regulation. *J. Immunol.* *178*, 2901–2907.
- Simmen, T. (2011). Hax-1: a regulator of calcium signaling and apoptosis progression with multiple roles in human disease. *Expert Opin. Ther. Targets* *15*, 741–751.
- Sitia, R. (1985). Biosynthesis of membrane and secreted epsilon-chains during lipopolysaccharide-induced differentiation of an IgE<sup>+</sup> murine B-lymphoma. *Mol. Immunol.* *22*, 1289–1296.
- Talay, O., Yan, D., Brightbill, H.D., Straney, E.E.M., Zhou, M., Ladi, E., Lee, W.P., Egen, J.G., Austin, C.D., Xu, M., and Wu, L.C. (2012). IgE<sup>+</sup> memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat. Immunol.* *13*, 396–404.
- Venkiteswaran, A.R., Williams, G.T., Dariavach, P., and Neuberger, M.S. (1991). The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* *352*, 777–781.
- Waisman, A., Kraus, M., Seagal, J., Ghosh, S., Melamed, D., Song, J., Sasaki, Y., Classen, S., Lutz, C., Brombacher, F., et al. (2007). IgG1 B cell receptor

- signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta. *J. Exp. Med.* 204, 747–758.
- Wakabayashi, C., Adachi, T., Wienands, J., and Tsubata, T. (2002). A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science* 298, 2392–2395.
- Wesemann, D.R., Magee, J.M., Boboila, C., Calado, D.P., Gallagher, M.P., Portuguese, A.J., Manis, J.P., Zhou, X., Recher, M., Rajewsky, K., et al. (2011). Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S $\mu$  to S $\epsilon$  recombination. *J. Exp. Med.* 208, 2733–2746.
- Wu, L.C., and Zarrin, A.A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 247–259.
- Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2012). Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J. Exp. Med.* 209, 353–364.
- Yang, Z., Sullivan, B.M., and Allen, C.D.C. (2012). Fluorescent in vivo detection reveals that IgE(+) B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity* 36, 857–872.

## Bibliographie

---

- Aiba, Y., Kameyama, M., Yamazaki, T., Tedder, T.F., and Kurosaki, T. (2008). Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood* *111*, 1497–1503.
- Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* *5*, 943–952.
- Alt, F.W., Bothwell, A.L., Knapp, M., Siden, E., Mather, E., Koshland, M., and Baltimore, D. (1980). Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* *20*, 293–301.
- Alt, F.W., Honjo, T., Andreas, R., and Reth, M. (2015). *Molecular Biology of B Cells* (Elsevier).
- Amin, R., Carrion, C., Decourt, C., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). Deletion of the  $\alpha$  immunoglobulin chain membrane-anchoring region reduces but does not abolish IgA secretion. *Immunology* *136*, 54–63.
- Anand, S., Batista, F.D., Tkach, T., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1997). Multiple transcripts of the murine immunoglobulin epsilon membrane locus are generated by alternative splicing and differential usage of two polyadenylation sites. *Mol. Immunol.* *34*, 175–183.
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J. Exp. Med.* *205*, 1357–1368.
- Arakawa, H., Moldovan, G.-L., Saribasak, H., Saribasak, N.N., Jentsch, S., and Buerstedde, J.-M. (2006). A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol.* *4*, e366.
- Aranburu, A., Ceccarelli, S., Giorda, E., Lasorella, R., Ballatore, G., and Carsetti, R. (2010). TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 7293–7301.
- Arioka, Y., Watanabe, A., Saito, K., and Yamada, Y. (2012). Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. *PLoS One* *7*, e45031.
- Arons, E., Sunshine, J., Suntum, T., and Kreitman, R.J. (2006). Somatic hypermutation and VH gene usage in hairy cell leukaemia. *Br. J. Haematol.* *133*, 504–512.
- Attanavanich, K., and Kearney, J.F. (2004). Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 803–811.
- Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies: from “horror autotoxicus” to “gnothi seauton.” *Immunol. Today* *12*, 154–159.
- Bachl, J., Ertongur, I., and Jungnickel, B. (2006). Involvement of Rad18 in somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12081–12086.
- Bahler, D.W., Campbell, M.J., Hart, S., Miller, R.A., Levy, S., and Levy, R. (1991). Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* *78*, 1561–1568.
- Baird, A.M., Gerstein, R.M., and Berg, L.J. (1999). The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 157–166.

- Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* *17*, 341–352.
- Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science* *300*, 1524–1525.
- Basso, K., Klein, U., Niu, H., Stolovitzky, G.A., Tu, Y., Califano, A., Cattoretti, G., and Dalla-Favera, R. (2004). Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood* *104*, 4088–4096.
- Basso, K., Schneider, C., Shen, Q., Holmes, A.B., Setty, M., Leslie, C., and Dalla-Favera, R. (2012). BCL6 positively regulates AID and germinal center gene expression via repression of miR-155. *J. Exp. Med.* *209*, 2455–2465.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* *438*, 508–511.
- Basu, U., Meng, F.-L., Keim, C., Grinstein, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wasserman, C.R., Wesemann, D.R., et al. (2011). The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. *Cell* *144*, 353–363.
- Batista, F.D., Anand, S., Presani, G., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1996). The two membrane isoforms of human IgE assemble into functionally distinct B cell antigen receptors. *J. Exp. Med.* *184*, 2197–2205.
- Baumgarth, N. (2013). Innate-like B cells and their rules of engagement. *Adv. Exp. Med. Biol.* *785*, 57–66.
- Begum, N.A., Stanlie, A., Nakata, M., Akiyama, H., and Honjo, T. (2012). The histone chaperone Spt6 is required for activation-induced cytidine deaminase target determination through H3K4me3 regulation. *J. Biol. Chem.* *287*, 32415–32429.
- Belov, A.A., and Mohammadi, M. (2012). Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. *Sci. Signal.* *5*, pe49.
- Bemark, M., and Neuberger, M.S. (2003). By-products of immunoglobulin somatic hypermutation. *Genes. Chromosomes Cancer* *38*, 32–39.
- Berard, M., Casamayor-Pallejà, M., Billian, G., Bella, C., Mondière, P., and Defrance, T. (1999). Activation sensitizes human memory B cells to B-cell receptor-induced apoptosis. *Immunology* *98*, 47–54.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* *125*, 315–326.
- Bessa, J., Kopf, M., and Bachmann, M.F. (2010). Cutting edge: IL-21 and TLR signaling regulate germinal center responses in a B cell-intrinsic manner. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *184*, 4615–4619.
- Betz, A.G., Milstein, C., González-Fernández, A., Pannell, R., Larson, T., and Neuberger, M.S. (1994). Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* *77*, 239–248.

Bhattacharyya, S., Deb, J., Patra, A.K., Thuy Pham, D.A., Chen, W., Vaeth, M., Berberich-Siebelt, F., Klein-Hessling, S., Lamperti, E.D., Reifenberg, K., et al. (2011). NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. *J. Exp. Med.* *208*, 823–839.

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

Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., et al. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* *11*, 529–541.

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

Boeglin, E., Smulski, C.R., Brun, S., Milosevic, S., Schneider, P., and Fournel, S. (2011). Toll-like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells. *PLoS One* *6*, e25542.

Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* *270*, 7795–7798.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803–815.

Bollig, N., Brüstle, A., Kellner, K., Ackermann, W., Abass, E., Raifer, H., Camara, B., Brendel, C., Giel, G., Bothur, E., et al. (2012). Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 8664–8669.

Bombardieri, M., Kam, N.-W., Brentano, F., Choi, K., Filer, A., Kyburz, D., McInnes, I.B., Gay, S., Buckley, C., and Pitzalis, C. (2011). A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 1857–1865.

de Bono, B., Madera, M., and Chothia, C. (2004). VH gene segments in the mouse and human genomes. *J. Mol. Biol.* *342*, 131–143.

Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.-J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* *197*, 101–109.

Borchert, G.M., Holton, N.W., and Larson, E.D. (2011). Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155. *BMC Cancer* *11*, 347.

Both, G.W., Taylor, L., Pollard, J.W., and Steele, E.J. (1990). Distribution of mutations around rearranged heavy-chain antibody variable-region genes. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 5187–5196.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Köntgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* *286*, 1735–1738.

Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L.C., Strasser, A., and Adams, J.M. (2001). Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev. Cell* 1, 645–653.

Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.-C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922–926.

Brady, H.J., Gil-Gómez, G., Kirberg, J., and Berns, A.J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J.* 15, 6991–7001.

Brandtzaeg, P., Baekkevold, E.S., Farstad, I.N., Jahnsen, F.L., Johansen, F.E., Nilsen, E.M., and Yamanaka, T. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol. Today* 20, 141–151.

Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4102–4107.

Brentnall, T.A., Crispin, D.A., Rabinovitch, P.S., Haggitt, R.C., Rubin, C.E., Stevens, A.C., and Burner, G.C. (1994). Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 107, 369–378.

Briles, D.E., Nahm, M., Schroer, K., Davie, J., Baker, P., Kearney, J., and Barletta, R. (1981). Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *J. Exp. Med.* 153, 694–705.

Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.-M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 177, 265–275.

Browne, E.P. (2011). Toll-like receptor 7 controls the anti-retroviral germinal center response. *PLoS Pathog.* 7, e1002293.

Browne, E.P. (2012). Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* 136, 370–379.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.

Burr, J.S., Savage, N.D., Messah, G.E., Kimzey, S.L., Shaw, A.S., Arch, R.H., and Green, J.M. (2001). Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 5331–5335.

Calado, D.P., Sasaki, Y., Godinho, S.A., Pellerin, A., Köchert, K., Sleckman, B.P., de Alborán, I.M., Janz, M., Rodig, S., and Rajewsky, K. (2012). The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat. Immunol.* 13, 1092–1100.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.

Cambier, J.C. (1995a). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 3281–3285.

Cambier, J.C. (1995b). New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol. Today* *16*, 110.

Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., et al. (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 800–808.

Cariappa, A., Mazo, I.B., Chase, C., Shi, H.N., Liu, H., Li, Q., Rose, H., Leung, H., Cherayil, B.J., Russell, P., et al. (2005). Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity* *23*, 397–407.

Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Tarte, K., and Fest, T. (2009). CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 7595–7602.

Carty, M., Goodbody, R., Schröder, M., Stack, J., Moynagh, P.N., and Bowie, A.G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.* *7*, 1074–1081.

Casali, P., Pal, Z., Xu, Z., and Zan, H. (2006). DNA repair in antibody somatic hypermutation. *Trends Immunol.* *27*, 313–321.

Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* *5*, 317–327.

Cattoretti, G., Büttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., and Niedobitek, G. (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* *107*, 3967–3975.

Chan, T.D., Wood, K., Hermes, J.R., Butt, D., Jolly, C.J., Basten, A., and Brink, R. (2012). Elimination of germinal-center-derived self-reactive B cells is governed by the location and concentration of self-antigen. *Immunity* *37*, 893–904.

Chang, W.L.W., Coro, E.S., Rau, F.C., Xiao, Y., Erle, D.J., and Baumgarth, N. (2007). Influenza virus infection causes global respiratory tract B cell response modulation via innate immune signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 1457–1467.

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

Chaudhuri, J., Khuong, C., and Alt, F.W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* *430*, 992–998.

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

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

Chen, J., McLean, P.A., Neel, B.G., Okunade, G., Shull, G.E., and Wortis, H.H. (2004). CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity. *Nat. Immunol.* *5*, 651–657.

Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 8, 705–711.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505–512.

Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932–946.

Clayton, E., Bardi, G., Bell, S.E., Chantry, D., Downes, C.P., Gray, A., Humphries, L.A., Rawlings, D., Reynolds, H., Vigorito, E., et al. (2002). A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J. Exp. Med.* 196, 753–763.

Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A., and Paul, W.E. (1986). B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 136, 4538–4541.

Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Chavarin, P., Pozzetto, B., Richard, Y., and Garraud, O. (2008). Identification of two subpopulations of purified human blood B cells, CD27<sup>-</sup> CD23<sup>+</sup> and CD27<sup>high</sup> CD80<sup>+</sup>, that strongly express cell surface Toll-like receptor 9 and secrete high levels of interleukin-6. *Immunology* 125, 430–437.

Cogné, M. (2013). Activation-induced deaminase in B lymphocyte maturation and beyond. *Biomed. J.* 36, 259–268.

Coker, H.A., Harries, H.E., Banfield, G.K., Carr, V.A., Durham, S.R., Chevretton, E., Hobby, P., Sutton, B.J., and Gould, H.J. (2005). Biased use of VH5 IgE-positive B cells in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 445–452.

Collins, J.T., and Dunnick, W.A. (1993). Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. *Int. Immunol.* 5, 885–891.

Collins, B.E., Blixt, O., DeSieno, A.R., Bovin, N., Marth, J.D., and Paulson, J.C. (2004). Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6104–6109.

Coticello, S.G., Thomas, C.J.F., Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2005). Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol. Biol. Evol.* 22, 367–377.

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

Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., et al. (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146, 67–79.

Crouch, E.E., Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montañó, C., Feigenbaum, L., Wilson, P., Janz, S., Papavasiliou, F.N., et al. (2007). Regulation of AID expression in the immune response. *J. Exp. Med.* 204, 1145–1156.

- Cullen, S.P., Henry, C.M., Kearney, C.J., Logue, S.E., Feoktistova, M., Tynan, G.A., Lavelle, E.C., Leverkus, M., and Martin, S.J. (2013). Fas/CD95-induced chemokines can serve as “find-me” signals for apoptotic cells. *Mol. Cell* *49*, 1034–1048.
- Cyster, J.G. (2010). B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat. Immunol.* *11*, 989–996.
- Cyster, J.G., Ansel, K.M., Reif, K., Ekland, E.H., Hyman, P.L., Tang, H.L., Luther, S.A., and Ngo, V.N. (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* *176*, 181–193.
- Dang, C.V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell* *149*, 22–35.
- Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2007). DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J. Exp. Med.* *204*, 17–23.
- Delker, R.K., Zhou, Y., Strikoudis, A., Stebbins, C.E., and Papavasiliou, F.N. (2013). Solubility-based genetic screen identifies RING finger protein 126 as an E3 ligase for activation-induced cytidine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 1029–1034.
- Deriano, L., and Roth, D.B. (2013). Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.* *47*, 433–455.
- Desagher, S., and Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* *10*, 369–377.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 137–148.
- De Silva, N.S., Simonetti, G., Heise, N., and Klein, U. (2012). The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunol. Rev.* *247*, 73–92.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol. CB* *10*, 1201–1204.
- Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W.-F., Thomas, N.S.B., Lammers, J.-W.J., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J. Cell Biol.* *156*, 531–542.
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* *481*, 457–462.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.
- Doi, T., Kato, L., Ito, S., Shinkura, R., Wei, M., Nagaoka, H., Wang, J., and Honjo, T. (2009). The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2758–2763.
- Dominguez-Sola, D., Vitorica, G.D., Ying, C.Y., Phan, R.T., Saito, M., Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat. Immunol.* *13*, 1083–1091.

- Donisi, P.M., Di Lorenzo, N., Riccardi, M., Paparella, A., Sarpellon, C., Zupo, S., Bertoldero, G., Minotto, C., and Stracca-Pansa, V. (2006). Pattern and distribution of immunoglobulin VH gene usage in a cohort of B-CLL patients from a Northeastern region of Italy. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* *15*, 206–215.
- Doody, G.M., Justement, L.B., Delibrias, C.C., Matthews, R.J., Lin, J., Thomas, M.L., and Fearon, D.T. (1995). A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* *269*, 242–244.
- Downs, J.A., Nussenzweig, M.C., and Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* *447*, 951–958.
- Duchez, S., Amin, R., Cogné, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthésy, B., and Cogné, M. (2010). Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3064–3069.
- Dudley, D.D., Manis, J.P., Zarrin, A.A., Kaylor, L., Tian, M., and Alt, F.W. (2002). Internal IgH class switch region deletions are position-independent and enhanced by AID expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 9984–9989.
- Dunnick, W.A., Collins, J.T., Shi, J., Westfield, G., Fontaine, C., Hakimpour, P., and Papavasiliou, F.N. (2009). Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J. Exp. Med.* *206*, 2613–2623.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Morisawa, T., Sakurai, T., Okazaki, I.-M., Watashi, K., Shimotohno, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene* *26*, 5587–5595.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kou, T., Nakase, H., Fujii, S., Fujimori, T., Kinoshita, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2008). Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology* *135*, 889–898, 898.e1–e3.
- Engels, N., Wollscheid, B., and Wienands, J. (2001). Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2126–2134.
- Engels, N., König, L.M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Schrader, V., and Wienands, J. (2009). Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat. Immunol.* *10*, 1018–1025.
- Epeldegui, M., Hung, Y.P., McQuay, A., Ambinder, R.F., and Martínez-Maza, O. (2007). Infection of human B cells with Epstein-Barr virus results in the expression of somatic hypermutation-inducing molecules and in the accrual of oncogene mutations. *Mol. Immunol.* *44*, 934–942.
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P.G., Urban, J.F., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2007). Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* *26*, 191–203.
- Espeli, M., Mancini, S.J.C., Breton, C., Poirier, F., and Schiff, C. (2009). Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions. *Blood* *113*, 5878–5886.
- Esser, C., and Radbruch, A. (1989). Rapid induction of transcription of unrearranged S gamma 1 switch regions in activated murine B cells by interleukin 4. *EMBO J.* *8*, 483–488.

- Faill, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Guéranger, Q., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2002a). Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase  $\iota$ . *Nature* *419*, 944–947.
- Faill, A., Aoufouchi, S., Guéranger, Q., Zober, C., Léon, A., Bertocci, B., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2002b). AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat. Immunol.* *3*, 815–821.
- Fält, S., Merup, M., Tobin, G., Thunberg, U., Gahrton, G., Rosenquist, R., and Wennborg, A. (2005). Distinctive gene expression pattern in VH3-21 utilizing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *106*, 681–689.
- Fearon, D.T., and Carroll, M.C. (2000). Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 393–422.
- Flaswinkel, H., and Reth, M. (1994). Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig- $\alpha$  protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J.* *13*, 83–89.
- Flaswinkel, H., Barner, M., and Reth, M. (1995). The tyrosine activation motif as a target of protein tyrosine kinases and SH2 domains. *Semin. Immunol.* *7*, 21–27.
- Förster, I., and Rajewsky, K. (1990). The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4781–4784.
- Fraenkel, S., Mostoslavsky, R., Novobrantseva, T.I., Pelanda, R., Chaudhuri, J., Esposito, G., Jung, S., Alt, F.W., Rajewsky, K., Cedar, H., et al. (2007). Allelic “choice” governs somatic hypermutation in vivo at the immunoglobulin kappa-chain locus. *Nat. Immunol.* *8*, 715–722.
- Freeman, S.A., Jaumouillé, V., Choi, K., Hsu, B.E., Wong, H.S., Abraham, L., Graves, M.L., Coombs, D., Roskelley, C.D., Das, R., et al. (2015). Toll-like receptor ligands sensitize B-cell receptor signalling by reducing actin-dependent spatial confinement of the receptor. *Nat. Commun.* *6*, 6168.
- Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* *9*, 105–114.
- Fütterer, K., Wong, J., Grucza, R.A., Chan, A.C., and Waksman, G. (1998). Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J. Mol. Biol.* *281*, 523–537.
- Garg, P., and Burgers, P.M. (2005). Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases  $\eta$  and REV1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18361–18366.
- Garin, A., Meyer-Hermann, M., Contie, M., Figge, M.T., Buatois, V., Gunzer, M., Toellner, K.-M., Elson, G., and Kosco-Vilbois, M.H. (2010). Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* *33*, 84–95.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., and Jenkins, M.K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* *281*, 96–99.
- Gatto, D., Paus, D., Basten, A., Mackay, C.R., and Brink, R. (2009). Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. *Immunity* *31*, 259–269.

- Gauchat, J.F., Lebman, D.A., Coffman, R.L., Gascan, H., and de Vries, J.E. (1990). Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J. Exp. Med.* *172*, 463–473.
- Gazumyan, A., Timachova, K., Yuen, G., Siden, E., Di Virgilio, M., Woo, E.M., Chait, B.T., Reina San-Martin, B., Nussenzweig, M.C., and McBride, K.M. (2011). Amino-terminal phosphorylation of activation-induced cytidine deaminase suppresses c-myc/IgH translocation. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 442–449.
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7779–7786.
- Gitlin, A.D., Shulman, Z., and Nussenzweig, M.C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* *509*, 637–640.
- Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.* *198*, 1427–1437.
- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., and Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nat. Immunol.* *11*, 681–688.
- Goossens, T., Klein, U., and Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2463–2468.
- Gourzi, P., Leonova, T., and Papavasiliou, F.N. (2006). A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity* *24*, 779–786.
- Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., and Caligaris-Cappio, F. (2001). Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *97*, 2777–2783.
- Green, N.M., and Marshak-Rothstein, A. (2011). Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. *Semin. Immunol.* *23*, 106–112.
- Green, J.A., Suzuki, K., Cho, B., Willison, L.D., Palmer, D., Allen, C.D.C., Schmidt, T.H., Xu, Y., Proia, R.L., Coughlin, S.R., et al. (2011). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P<sub>2</sub> maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* *12*, 672–680.
- Greeve, J., Philipsen, A., Krause, K., Klapper, W., Heidorn, K., Castle, B.E., Janda, J., Marcu, K.B., and Parwaresch, R. (2003). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* *101*, 3574–3580.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* *17*, 3878–3885.
- Guo, L., Tian, J., Guo, Z., Zheng, B., and Han, S. (2011). The absence of immunoglobulin D B cell receptor-mediated signals promotes the production of autoantibodies and exacerbates glomerulonephritis in murine lupus. *Clin. Exp. Immunol.* *164*, 227–235.

- Gururajan, M., Jacob, J., and Pulendran, B. (2007). Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PloS One* 2, e863.
- Gururajan, M., Haga, C.L., Das, S., Leu, C.-M., Hodson, D., Josson, S., Turner, M., and Cooper, M.D. (2010). MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers. *Int. Immunol.* 22, 583–592.
- Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., and Tedder, T.F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7–18.
- Häcker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2006, re13.
- Haftmann, C., Stittrich, A.-B., Sgouroudis, E., Matz, M., Chang, H.-D., Radbruch, A., and Mashreghi, M.-F. (2012). Lymphocyte signaling: regulation of FoxO transcription factors by microRNAs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1247, 46–55.
- Han, J.-H., Akira, S., Calame, K., Beutler, B., Selsing, E., and Imanishi-Kari, T. (2007). Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity* 27, 64–75.
- Hanten, J.A., Vasilakos, J.P., Riter, C.L., Neys, L., Lipson, K.E., Alkan, S.S., and Birmachu, W. (2008). Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol.* 9, 39.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 194, 45–56.
- Hasan, M., Polic, B., Bralic, M., Jonjic, S., and Rajewsky, K. (2002). Incomplete block of B cell development and immunoglobulin production in mice carrying the muMT mutation on the BALB/c background. *Eur. J. Immunol.* 32, 3463–3471.
- Hashimoto, A., Takeda, K., Inaba, M., Sekimata, M., Kaisho, T., Ikehara, S., Homma, Y., Akira, S., and Kurosaki, T. (2000). Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 1738–1742.
- Häsler, J., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2011). Cytoplasmic activation-induced cytidine deaminase (AID) exists in stoichiometric complex with translation elongation factor 1 $\alpha$  (eEF1A). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18366–18371.
- Hauser, A.E., Debes, G.F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2002). Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 1277–1282.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103.
- He, B., Raab-Traub, N., Casali, P., and Cerutti, A. (2003). EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 5215–5224.

He, B., Qiao, X., and Cerutti, A. (2004). CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 4479–4491.

He, J.-S., Meyer-Hermann, M., Xiangying, D., Zuan, L.Y., Jones, L.A., Ramakrishna, L., de Vries, V.C., Dolpady, J., Aina, H., Joseph, S., et al. (2013). The distinctive germinal center phase of IgE<sup>+</sup> B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response. *J. Exp. Med.* *210*, 2755–2771.

Heinrich, F., Chakravarthy, S., Nanda, H., Papa, A., Pandolfi, P.P., Ross, A.H., Harishchandra, R.K., Gericke, A., and Lösche, M. (2015). The PTEN Tumor Suppressor Forms Homodimers in Solution. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *23*, 1952–1957.

Heintel, D., Kroemer, E., Kienle, D., Schwarzinger, I., Gleiss, A., Schwarzmeier, J., Marculescu, R., Le, T., Mannhalter, C., Gaiger, A., et al. (2004). High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGHV gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* *18*, 756–762.

Heise, N., De Silva, N.S., Silva, K., Carette, A., Simonetti, G., Pasparakis, M., and Klein, U. (2014). Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- $\kappa$ B transcription factor subunits. *J. Exp. Med.* *211*, 2103–2118.

Hennino, A., Bérard, M., Krammer, P.H., and Defrance, T. (2001). FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J. Exp. Med.* *193*, 447–458.

Hildeman, D.A., Mitchell, T., Teague, T.K., Henson, P., Day, B.J., Kappler, J., and Marrack, P.C. (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* *10*, 735–744.

Hou, B., Reizis, B., and DeFranco, A.L. (2008). Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity* *29*, 272–282.

Hou, B., Saudan, P., Ott, G., Wheeler, M.L., Ji, M., Kuzmich, L., Lee, L.M., Coffman, R.L., Bachmann, M.F., and DeFranco, A.L. (2011). Selective utilization of Toll-like receptor and MyD88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. *Immunity* *34*, 375–384.

Hua, Z.C., Sohn, S.J., Kang, C., Cado, D., and Winoto, A. (2003). A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity* *18*, 513–521.

Huang, D.C., and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* *103*, 839–842.

Hughes, P.D., Belz, G.T., Fortner, K.A., Budd, R.C., Strasser, A., and Bouillet, P. (2008). Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* *28*, 197–205.

Huong, L.T., Kobayashi, M., Nakata, M., Shioi, G., Miyachi, H., Honjo, T., and Nagaoka, H. (2013). In vivo analysis of Aicda gene regulation: a critical balance between upstream enhancers and intronic silencers governs appropriate expression. *PLoS One* *8*, e61433.

Hutcheson, J., Scatizzi, J.C., Siddiqui, A.M., Haines, G.K., Wu, T., Li, Q.-Z., Davis, L.S., Mohan, C., and Perlman, H. (2008). Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity* *28*, 206–217.

- Inabe, K., Ishiai, M., Scharenberg, A.M., Freshney, N., Downward, J., and Kurosaki, T. (2002). Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J. Exp. Med.* *195*, 189–200.
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190–195.
- Ise, W., Kohyama, M., Schraml, B.U., Zhang, T., Schwer, B., Basu, U., Alt, F.W., Tang, J., Oltz, E.M., Murphy, T.L., et al. (2011). The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat. Immunol.* *12*, 536–543.
- Ishikawa, C., Nakachi, S., Senba, M., Sugai, M., and Mori, N. (2011). Activation of AID by human T-cell leukemia virus Tax oncoprotein and the possible role of its constitutive expression in ATL genesis. *Carcinogenesis* *32*, 110–119.
- Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., and Honjo, T. (2004). Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1975–1980.
- Ittah, M., Miceli-Richard, C., Gottenberg, J.-E., Sellam, J., Eid, P., Lebon, P., Pallier, C., Lepajolec, C., and Mariette, X. (2008). Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1058–1064.
- Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P.L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev.* *106*, 302–323.
- Jain, S., Chodiseti, S.B., and Agrewala, J.N. (2011). CD40 signaling synergizes with TLR-2 in the BCR independent activation of resting B cells. *PLoS One* *6*, e20651.
- Jang, C., Machtaler, S., and Matsuuchi, L. (2010). The role of Ig- $\alpha/\beta$  in B cell antigen receptor internalization. *Immunol. Lett.* *134*, 75–82.
- Jeevan-Raj, B.P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J.H., Cammas, F., Alt, F.W., Losson, R., and Reina-San-Martin, B. (2011). Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* *208*, 1649–1660.
- Jehn, B.M., Bielke, W., Pear, W.S., and Osborne, B.A. (1999). Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 635–638.
- Jiang, W., Lederman, M.M., Harding, C.V., Rodriguez, B., Mohner, R.J., and Sieg, S.F. (2007). TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur. J. Immunol.* *37*, 2205–2213.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 335–346.
- Johnson, S.A., Pleiman, C.M., Pao, L., Schneringer, J., Hippen, K., and Cambier, J.C. (1995). Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 4596–4603.
- Jolly, C.J., Wagner, S.D., Rada, C., Klis, N., Milstein, C., and Neuberger, M.S. (1996). The targeting of somatic hypermutation. *Semin. Immunol.* *8*, 159–168.

- Ju, Z., Volpi, S.A., Hassan, R., Martinez, N., Giannini, S.L., Gold, T., and Birshtein, B.K. (2007). Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J. Biol. Chem.* *282*, 35169–35178.
- Ju, Z., Chatterjee, S., and Birshtein, B.K. (2011). Interaction between the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region and the IgH transcription unit during B cell differentiation. *Mol. Immunol.* *49*, 297–303.
- Jung, S., Rajewsky, K., and Radbruch, A. (1993). Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* *259*, 984–987.
- Jungnickel, B. (2006). False moves for survival: error-prone DNA repair in adaptive immunity. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 2856–2861.
- Junt, T., Moseman, E.A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* *450*, 110–114.
- Kadyrov, F.A., Dzantiev, L., Constantin, N., and Modrich, P. (2006). Endonucleolytic function of MutL $\alpha$  in human mismatch repair. *Cell* *126*, 297–308.
- Kaisho, T., Schwenk, F., and Rajewsky, K. (1997). The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* *276*, 412–415.
- Kang, T.-B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E.E., Pewzner-Jung, Y., Yogeve, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., et al. (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 2976–2984.
- Kang, T.-B., Oh, G.-S., Scandella, E., Bolinger, B., Ludewig, B., Kovalenko, A., and Wallach, D. (2008). Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2522–2532.
- Kao, Y.-P., Hsieh, W.-C., Hung, S.-T., Huang, C.-W., Lieber, M.R., and Huang, F.-T. (2013). Detection and characterization of R-loops at the murine immunoglobulin  $\alpha$  region. *Mol. Immunol.* *54*, 208–216.
- Karnowski, A., Achatz-Straussberger, G., Klockenbusch, C., Achatz, G., and Lamers, M.C. (2006). Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1917–1925.
- Kasturi, S.P., Skountzou, I., Albrecht, R.A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H.I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., et al. (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* *470*, 543–547.
- Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N., and Honjo, T. (1980). Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 919–923.
- Kaufmann, T., Tai, L., Ekert, P.G., Huang, D.C.S., Norris, F., Lindemann, R.K., Johnstone, R.W., Dixit, V.M., and Strasser, A. (2007). The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell* *129*, 423–433.

Kaufmann, T., Jost, P.J., Pellegrini, M., Puthalakath, H., Gugasyan, R., Gerondakis, S., Cretney, E., Smyth, M.J., Silke, J., Hakem, R., et al. (2009). Fatal hepatitis mediated by tumor necrosis factor TNF $\alpha$  requires caspase-8 and involves the BH3-only proteins Bid and Bim. *Immunity* 30, 56–66.

Kaveri, S.V., Silverman, G.J., and Bayry, J. (2012). Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 939–945.

Kawamata, T., Lu, J., Sato, T., Tanaka, M., Nagaoka, H., Agata, Y., Toyoshima, T., Yokoyama, K., Oyaizu, N., Nakamura, N., et al. (2012). Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through down-regulation of AID: its potential efficacy as an AID suppressor. *Blood* 119, 3123–3127.

Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34, 947–960.

Khalil, A.M., Cambier, J.C., and Shlomchik, M.J. (2012). B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science* 336, 1178–1181.

Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D.A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al. (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465, 182–187.

Kim, Y.J., Sekiya, F., Poulin, B., Bae, Y.S., and Rhee, S.G. (2004). Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C- $\gamma$ 2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9986–9999.

Kim, Y.-M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.-E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452, 234–238.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.

Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34, 961–972.

Kodama, M., Hayashi, R., Nishizumi, H., Nagawa, F., Takemori, T., and Sakano, H. (2001). The PU.1 and NF-EM5 binding motifs in the I $\kappa$ gkappa 3' enhancer are responsible for directing somatic hypermutations to the intrinsic hotspots in the transgenic V $\kappa$  gene. *Int. Immunol.* 13, 1415–1422.

Koenig, A., Russell, J.Q., Rodgers, W.A., and Budd, R.C. (2008). Spatial differences in active caspase-8 defines its role in T-cell activation versus cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1701–1711.

Köhler, F., Storch, B., Kulathu, Y., Herzog, S., Kuppig, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2005). A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65. *Nat. Immunol.* 6, 204–210.

Komori, J., Marusawa, H., Machimoto, T., Endo, Y., Kinoshita, K., Kou, T., Haga, H., Ikai, I., Uemoto, S., and Chiba, T. (2008). Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47, 888–896.

Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merkenschlager, M., Rajewsky, N., et al. (2008). Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 132, 860–874.

- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296, 158–162.
- Kotani, A., Kakazu, N., Tsuruyama, T., Okazaki, I., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Nagaoka, H., Yabe, D., and Honjo, T. (2007). Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1616–1620.
- Kou, T., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Okazaki, I.-M., Ueda, Y., Kodama, Y., Haga, H., Ikai, I., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 120, 469–476.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789–795.
- Kraus, M., Pao, L.I., Reichlin, A., Hu, Y., Canono, B., Cambier, J.C., Nussenzweig, M.C., and Rajewsky, K. (2001). Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail. *J. Exp. Med.* 194, 455–469.
- Krokan, H.E., Drabløs, F., and Slupphaug, G. (2002). Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21, 8935–8948.
- Kuraoka, M., Liao, D., Yang, K., Allgood, S.D., Levesque, M.C., Kelsoe, G., and Ueda, Y. (2009). Activation-induced cytidine deaminase expression and activity in the absence of germinal centers: insights into hyper-IgM syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3237–3248.
- Kuraoka, M., Holl, T.M., Liao, D., Womble, M., Cain, D.W., Reynolds, A.E., and Kelsoe, G. (2011). Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11560–11565.
- Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Péron, S., Sirac, C., Moreau, J., and Cogné, M. (2013). AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* 5, 1118–1131.
- Laffleur, B., Duchez, S., Tarte, K., Denis-Lagache, N., Péron, S., Carrion, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2015). Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression. *Cell Rep.*
- Lam, K.P., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073–1083.
- Langerak, P., Nygren, A.O.H., Krijger, P.H.L., van den Berk, P.C.M., and Jacobs, H. (2007). A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J. Exp. Med.* 204, 1989–1998.
- Lanoue, A., Batista, F.D., Stewart, M., and Neuberger, M.S. (2002). Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? *Eur. J. Immunol.* 32, 348–355.
- Larijani, M., Frieder, D., Sonbuchner, T.M., Bransteitter, R., Goodman, M.F., Bouhassira, E.E., Scharff, M.D., and Martin, A. (2005). Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination. *Mol. Immunol.* 42, 599–604.

- Lebecque, S.G., and Gearhart, P.J. (1990). Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J. Exp. Med.* *172*, 1717–1727.
- Lebman, D.A., Lee, F.D., and Coffman, R.L. (1990). Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *144*, 952–959.
- Leduc, I., Drouet, M., Bodinier, M.C., Helal, A., and Cogné, M. (1997). Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study. *Immunology* *90*, 330–336.
- Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, P.L., and Green, C.M. (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* *6*, 891–899.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491–501.
- Li, H., Kolluri, S.K., Gu, J., Dawson, M.I., Cao, X., Hobbs, P.D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., et al. (2000). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* *289*, 1159–1164.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.
- Li, W.Q., Jiang, Q., Khaled, A.R., Keller, J.R., and Durum, S.K. (2004). Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J. Biol. Chem.* *279*, 29160–29166.
- Li, Y., Li, H., and Weigert, M. (2002). Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* *195*, 181–188.
- Li, Z., Peled, J.U., Zhao, C., Svetlanov, A., Ronai, D., Cohen, P.E., and Scharff, M.D. (2006). A role for Mlh3 in somatic hypermutation. *DNA Repair* *5*, 675–682.
- Liang, G., Kitamura, K., Wang, Z., Liu, G., Chowdhury, S., Fu, W., Koura, M., Wakae, K., Honjo, T., and Muramatsu, M. (2013). RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 2246–2251.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 181–211.
- Lin, D.P., Wang, Y., Scherer, S.J., Clark, A.B., Yang, K., Avdievich, E., Jin, B., Werling, U., Parris, T., Kurihara, N., et al. (2004a). An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. *Cancer Res.* *64*, 517–522.
- Lin, L., Gerth, A.J., and Peng, S.L. (2004b). CpG DNA redirects class-switching towards “Th1-like” Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *Eur. J. Immunol.* *34*, 1483–1487.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* *6*, 1389–1399.

Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr. Biol.* *15*, 1235–1241.

Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7024–7027.

Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* *517*, 214–218.

Liu, W., Meckel, T., Tolar, P., Sohn, H.W., and Pierce, S.K. (2010). Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling. *Immunity* *32*, 778–789.

Lopes-Carvalho, T., and Kearney, J.F. (2004). Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* *197*, 192–205.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481–490.

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

Lutzker, S., Rothman, P., Pollock, R., Coffman, R., and Alt, F.W. (1988). Mitogen- and IL-4-regulated expression of germ-line Ig gamma 2b transcripts: evidence for directed heavy chain class switching. *Cell* *53*, 177–184.

Mabbott, N.A., and Gray, D. (2014). Identification of co-expressed gene signatures in mouse B1, marginal zone and B2 B-cell populations. *Immunology* *141*, 79–95.

MacDuff, D.A., Neuberger, M.S., and Harris, R.S. (2006). MDM2 can interact with the C-terminus of AID but it is inessential for antibody diversification in DT40 B cells. *Mol. Immunol.* *43*, 1099–1108.

Machida, K., Cheng, K.T.-N., Sung, V.M.-H., Shimodaira, S., Lindsay, K.L., Levine, A.M., Lai, M.-Y., and Lai, M.M.C. (2004). Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4262–4267.

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

Maeda, K., Singh, S.K., Eda, K., Kitabatake, M., Pham, P., Goodman, M.F., and Sakaguchi, N. (2010). GANP-mediated recruitment of activation-induced cytidine deaminase to cell nuclei and to immunoglobulin variable region DNA. *J. Biol. Chem.* *285*, 23945–23953.

Mai, T., Zan, H., Zhang, J., Hawkins, J.S., Xu, Z., and Casali, P. (2010). Estrogen receptors bind to and activate the HOXC4/HoxC4 promoter to potentiate HoxC4-mediated activation-induced cytosine deaminase induction, immunoglobulin class switch DNA recombination, and somatic hypermutation. *J. Biol. Chem.* *285*, 37797–37810.

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

- Mao, C., Jiang, L., Melo-Jorge, M., Puthenveetil, M., Zhang, X., Carroll, M.C., and Imanishi-Kari, T. (2004). T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype. *Immunity* 20, 133–144.
- Marichal, T., Starkl, P., Reber, L.L., Kalesnikoff, J., Oettgen, H.C., Tsai, M., Metz, M., and Galli, S.J. (2013). A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity* 39, 963–975.
- Marrack, P., Bender, J., Hildeman, D., Jordan, M., Mitchell, T., Murakami, M., Sakamoto, A., Schaefer, B.C., Swanson, B., and Kappler, J. (2000). Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat. Immunol.* 1, 107–111.
- Marshall-Clarke, S., Downes, J.E., Haga, I.R., Bowie, A.G., Borrow, P., Pennock, J.L., Grecis, R.K., and Rothwell, P. (2007). Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* 282, 24759–24766.
- Martin, A., and Scharff, M.D. (2002). Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12304–12308.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323–335.
- Martin, S.W., and Goodnow, C.C. (2002). Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat. Immunol.* 3, 182–188.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629.
- Masuda, K., Ouchida, R., Hikida, M., Kurosaki, T., Yokoi, M., Masutani, C., Seki, M., Wood, R.D., Hanaoka, F., and O-Wang, J. (2007). DNA polymerases eta and theta function in the same genetic pathway to generate mutations at A/T during somatic hypermutation of Ig genes. *J. Biol. Chem.* 282, 17387–17394.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I.-M., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat. Med.* 13, 470–476.
- Matsuoka, M., Yoshida, K., Maeda, T., Usuda, S., and Sakano, H. (1990). Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 62, 135–142.
- Matsuyama, S., and Reed, J.C. (2000). Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ.* 7, 1155–1165.
- Mayorov, V.I., Rogozin, I.B., Adkison, L.R., Frahm, C., Kunkel, T.A., and Pavlov, Y.I. (2005). Expression of human AID in yeast induces mutations in context similar to the context of somatic hypermutation at G-C pairs in immunoglobulin genes. *BMC Immunol.* 6, 10.
- McBride, K.M., Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., and Nussenzweig, M.C. (2004). Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J. Exp. Med.* 199, 1235–1244.

- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Schwickert, T.A., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2008). Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J. Exp. Med.* *205*, 2585–2594.
- McCarthy, H., Wierda, W.G., Barron, L.L., Cromwell, C.C., Wang, J., Coombes, K.R., Rangel, R., Elenitoba-Johnson, K.S.J., Keating, M.J., and Abruzzo, L.V. (2003). High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *101*, 4903–4908.
- McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S., and Evan, G.I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J. Cell Biol.* *136*, 215–227.
- McKenzie, M.D., Carrington, E.M., Kaufmann, T., Strasser, A., Huang, D.C.S., Kay, T.W.H., Allison, J., and Thomas, H.E. (2008). Proapoptotic BH3-only protein Bid is essential for death receptor-induced apoptosis of pancreatic beta-cells. *Diabetes* *57*, 1284–1292.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 606–616.
- Medzhitov, R., and Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 692–703.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394–397.
- Melchers, F., ten Boekel, E., Seidl, T., Kong, X.C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A.G., and Andersson, J. (2000). Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol. Rev.* *175*, 33–46.
- Metzger, H. (1992). Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *149*, 1477–1487.
- Meyer-Bahlburg, A., Khim, S., and Rawlings, D.J. (2007). B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J. Exp. Med.* *204*, 3095–3101.
- Meyer-Bahlburg, A., Bandaranayake, A.D., Andrews, S.F., and Rawlings, D.J. (2009). Reduced c-myc expression levels limit follicular mature B cell cycling in response to TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *182*, 4065–4075.
- Meyers, G., Ng, Y.-S., Bannock, J.M., Lavoie, A., Walter, J.E., Notarangelo, L.D., Kilic, S.S., Aksu, G., Debré, M., Rieux-Laucat, F., et al. (2011). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11554–11559.
- Michael, N., Shen, H.M., Longrich, S., Kim, N., Longacre, A., and Storb, U. (2003). The E box motif CAGGTG enhances somatic hypermutation without enhancing transcription. *Immunity* *19*, 235–242.
- Michaelson, J.S., Giannini, S.L., and Birshtein, B.K. (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* *23*, 975–981.
- Miyazaki, A., Yogosawa, S., Murakami, A., and Kitamura, D. (2012). Identification of CMTM7 as a transmembrane linker of BLNK and the B-cell receptor. *PLoS One* *7*, e31829.

- Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 283–294.
- Moresco, E.M.Y., LaVine, D., and Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Curr. Biol.* *CB 21*, R488–R493.
- Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W., and Petersen-Mahrt, S.K. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J. Biol. Chem.* *279*, 52353–52360.
- Morisawa, T., Marusawa, H., Ueda, Y., Iwai, A., Okazaki, I., Honjo, T., and Chiba, T. (2008). Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *123*, 2735–2740.
- Morvan, C.L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A., and Cogné, M. (2003). The immunoglobulin heavy-chain locus *hs3b* and *hs4 3'* enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* *102*, 1421–1427.
- Mourcin, F., Breton, C., Tellier, J., Narang, P., Chasson, L., Jorquera, A., Coles, M., Schiff, C., and Mancini, S.J.C. (2011). Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood* *117*, 6552–6561.
- Movilla, N., and Bustelo, X.R. (1999). Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7870–7885.
- Mu, P., Han, Y.-C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogradowski, P., de Stanchina, E., D'Andrea, A., Sander, C., and Ventura, A. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.* *23*, 2806–2811.
- Müller, R., Wienands, J., and Reth, M. (2000). The serine and threonine residues in the Ig-alpha cytoplasmic tail negatively regulate immunoreceptor tyrosine-based activation motif-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8451–8454.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 18470–18476.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553–563.
- Muto, T., Muramatsu, M., Taniwaki, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2000). Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* *68*, 85–88.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* *85*, 817–827.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* *88*, 355–365.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* *302*, 2137–2140.

- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* *18*, 2330–2341.
- Neuberger, M.S. (2008). Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol. Cell Biol.* *86*, 124–132.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell* *11*, 709–719.
- Nitschke, L., Kosco, M.H., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1993). Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 1887–1891.
- Nowak, U., Matthews, A.J., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* *12*, 160–166.
- Nudler, E. (2009). RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 335–361.
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner, A.R., Singh, H., et al. (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* *38*, 918–929.
- Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* *286*, 2156–2159.
- O'Connor, B.P., Vogel, L.A., Zhang, W., Loo, W., Shnider, D., Lind, E.F., Ratliff, M., Noelle, R.J., and Erickson, L.D. (2006). Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 7723–7732.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., and Huang, D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* *17*, 384–395.
- Odegard, V.H., Kim, S.T., Anderson, S.M., Shlomchik, M.J., and Schatz, D.G. (2005). Histone modifications associated with somatic hypermutation. *Immunity* *23*, 101–110.
- Oellerich, T., Bremes, V., Neumann, K., Bohnenberger, H., Dittmann, K., Hsiao, H.-H., Engelke, M., Schnyder, T., Batista, F.D., Urlaub, H., et al. (2011). The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85. *EMBO J.* *30*, 3620–3634.
- Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K., and Kurosaki, T. (2000). BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity* *13*, 817–827.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* *3*, e150.
- Okazaki, I., Hiari, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2003). Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J. Exp. Med.* *197*, 1173–1181.

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

Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.-J., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and He, L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* *23*, 2839–2849.

Oliver, A.M., Martin, F., Gartland, G.L., Carter, R.H., and Kearney, J.F. (1997). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2366–2374.

Oliver, A.M., Martin, F., and Kearney, J.F. (1999). IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 7198–7207.

O'Neill, L.A.J., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 353–364.

O'Reilly, L.A., Divisekera, U., Newton, K., Scalzo, K., Kataoka, T., Puthalakath, H., Ito, M., Huang, D.C.S., and Strasser, A. (2004). Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death Differ.* *11*, 724–736.

Orthwein, A., Zahn, A., Methot, S.P., Godin, D., Conticello, S.G., Terada, K., and Di Noia, J.M. (2012). Optimal functional levels of activation-induced deaminase specifically require the Hsp40 DnaJ1. *EMBO J.* *31*, 679–691.

Palm, N.W., Rosenstein, R.K., Yu, S., Schenten, D.D., Florsheim, E., and Medzhitov, R. (2013). Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity* *39*, 976–985.

Pao, L.I., and Cambier, J.C. (1997). Syk, but not Lyn, recruitment to B cell antigen receptor and activation following stimulation of CD45- B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 2663–2669.

Pappu, R., Schwab, S.R., Cornelissen, I., Pereira, J.P., Regard, J.B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.-W., Huang, Y., Cyster, J.G., et al. (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* *316*, 295–298.

Park, S.-R., Zan, H., Pal, Z., Zhang, J., Al-Qahtani, A., Pone, E.J., Xu, Z., Mai, T., and Casali, P. (2009). HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat. Immunol.* *10*, 540–550.

Pasare, C., and Medzhitov, R. (2005). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* *438*, 364–368.

Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* *412*, 341–346.

Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., Polakiewicz, R., Chaganti, R.S.K., and Dalla-Favera, R. (2004). Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood* *104*, 3318–3325.

- Pasqualucci, L., Kitaura, Y., Gu, H., and Dalla-Favera, R. (2006). PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 395–400.
- Patterson, R.L., Boehning, D., and Snyder, S.H. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 437–465.
- Pauklin, S., Sernández, I.V., Bachmann, G., Ramiro, A.R., and Petersen-Mahrt, S.K. (2009). Estrogen directly activates AID transcription and function. *J. Exp. Med.* *206*, 99–111.
- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* *203*, 1081–1091.
- Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V., et al. (2010). Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* *143*, 122–133.
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 481–511.
- Pellegrini, M., Bath, S., Marsden, V.S., Huang, D.C.S., Metcalf, D., Harris, A.W., and Strasser, A. (2005). FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells. *Blood* *106*, 1581–1589.
- Pereira, J.P., Kelly, L.M., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2009). EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* *460*, 1122–1126.
- Perez, D., and White, E. (2000). TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol. Cell* *6*, 53–63.
- Pérez-Durán, P., de Yebenes, V.G., and Ramiro, A.R. (2007). Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis* *28*, 2427–2433.
- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., and Pinaud, E. (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14362–14367.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012a). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* *336*, 931–934.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Filloux, M., and Cogné, M. (2012b). [IgH locus suicide recombination, or when B cells surrender!]. *Médecine Sci. MS* *28*, 551–554.
- Peter, M.E., Budd, R.C., Desbarats, J., Hedrick, S.M., Hueber, A.-O., Newell, M.K., Owen, L.B., Pope, R.M., Tschoop, J., Wajant, H., et al. (2007). The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* *129*, 447–450.
- Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S., and Neuberger, M.S. (2002). AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* *418*, 99–103.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* *424*, 103–107.

- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2004). Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol. Rev.* *197*, 206–218.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 161–196.
- Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C., and Cogné, M. (1997). Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2981–2985.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* *15*, 187–199.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* *110*, 27–70.
- Poggianella, M., Bestagno, M., and Burrone, O.R. (2006). The extracellular membrane-proximal domain of human membrane IgE controls apoptotic signaling of the B cell receptor in the mature B cell line A20. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 3597–3605.
- Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., and Rajewsky, K. (2001). How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8744–8749.
- Poltoratsky, V., Prasad, R., Horton, J.K., and Wilson, S.H. (2007). Down-regulation of DNA polymerase beta accompanies somatic hypermutation in human BL2 cell lines. *DNA Repair* *6*, 244–253.
- Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., White, C.A., Li, G., Sakakura, J.K., Patel, P.J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z., et al. (2012). BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway. *Nat. Commun.* *3*, 767.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* *463*, 1101–1105.
- Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H., and Leonard, W.J. (1998). Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat. Genet.* *20*, 394–397.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* *3*, 287–296.
- Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y.C., and Germain, R.N. (2006). Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* *312*, 1672–1676.
- Qin, H., Suzuki, K., Nakata, M., Chikuma, S., Izumi, N., Huong, L.T., Maruya, M., Fagarasan, S., Buslinger, M., Honjo, T., et al. (2011). Activation-induced cytidine deaminase expression in CD4+ T cells is associated with a unique IL-10-producing subset that increases with age. *PLoS One* *6*, e29141.
- Rada, C., González-Fernández, A., Jarvis, J.M., and Milstein, C. (1994). The 5' boundary of somatic hypermutation in a V kappa gene is in the leader intron. *Eur. J. Immunol.* *24*, 1453–1457.

- Radbruch, A., Müller, W., and Rajewsky, K. (1986). Class switch recombination is IgG1 specific on active and inactive IgH loci of IgG1-secreting B-cell blasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 3954–3957.
- Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* *109 Suppl*, S97–S107.
- Rathmell, J.C., Cooke, M.P., Ho, W.Y., Grein, J., Townsend, S.E., Davis, M.M., and Goodnow, C.C. (1995). CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* *376*, 181–184.
- Rathmell, J.C., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2000). In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol. Cell* *6*, 683–692.
- Rauch, M., Tussiwand, R., Bosco, N., and Rolink, A.G. (2009). Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells. *PLoS One* *4*, e5456.
- Rawlings, D.J., Schwartz, M.A., Jackson, S.W., and Meyer-Bahlburg, A. (2012). Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 282–294.
- Reichlin, A., Gazumyan, A., Nagaoka, H., Kirsch, K.H., Kraus, M., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M.C. (2004). A B cell receptor with two Igalpha cytoplasmic domains supports development of mature but anergic B cells. *J. Exp. Med.* *199*, 855–865.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* *338*, 383–384.
- Roa, S., Avdievich, E., Peled, J.U., Maccarthy, T., Werling, U., Kuang, F.L., Kan, R., Zhao, C., Bergman, A., Cohen, P.E., et al. (2008). Ubiquitylated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class-switch recombination and is required for meiotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16248–16253.
- Roa, S., Li, Z., Peled, J.U., Zhao, C., Edelman, W., and Scharff, M.D. (2010). MSH2/MSH6 complex promotes error-free repair of AID-induced dU:G mispairs as well as error-prone hypermutation of A:T sites. *PLoS One* *5*, e11182.
- Robbiani, D.F., and Nussenzweig, M.C. (2013). Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Annu. Rev. Pathol.* *8*, 79–103.
- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L., and Wall, R. (1980). Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* *20*, 303–312.
- Rolink, A.G., Tschopp, J., Schneider, P., and Melchers, F. (2002). BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells. *Eur. J. Immunol.* *32*, 2004–2010.
- Rolli, V., Gallwitz, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W.W.A., Zürn, C., and Reth, M. (2002). Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol. Cell* *10*, 1057–1069.
- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Shulman, M.J., and Scharff, M.D. (2005). Complex regulation of somatic hypermutation by cis-acting sequences in the endogenous IgH gene in hybridoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11829–11834.

- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Li, Z., Martin, A., and Scharff, M.D. (2007). Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *204*, 181–190.
- Roosendaal, R., Mempel, T.R., Pitcher, L.A., Gonzalez, S.F., Verschoor, A., Mebius, R.E., von Andrian, U.H., and Carroll, M.C. (2009). Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* *30*, 264–276.
- Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* *42*, 607–612.
- Rothstein, T.L., Wang, J.K., Panka, D.J., Foote, L.C., Wang, Z., Stanger, B., Cui, H., Ju, S.T., and Marshak-Rothstein, A. (1995). Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* *374*, 163–165.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2013). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* *210*, 1501–1507.
- Rubio, C.F., Kench, J., Russell, D.M., Yawger, R., and Nemazee, D. (1996). Analysis of central B cell tolerance in autoimmune-prone MRL/lpr mice bearing autoantibody transgenes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 65–71.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y.B., Berry, D.M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., et al. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* *17*, 883–895.
- Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* *91*, 443–446.
- Sapozhnikov, A., Pewzner-Jung, Y., Kalchenko, V., Krauthgamer, R., Shachar, I., and Jung, S. (2008). Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nat. Immunol.* *9*, 388–395.
- Sato, M., Adachi, T., and Tsubata, T. (2007). Augmentation of signaling through BCR containing IgE but not that containing IgA due to lack of CD22-mediated signal regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2901–2907.
- Sayegh, C.E., Quong, M.W., Agata, Y., and Murre, C. (2003). E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat. Immunol.* *4*, 586–593.
- Schaetzlein, S., Chahwan, R., Avdievich, E., Roa, S., Wei, K., Eoff, R.L., Sellers, R.S., Clark, A.B., Kunkel, T.A., Scharff, M.D., et al. (2013). Mammalian Exo1 encodes both structural and catalytic functions that play distinct roles in essential biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E2470–E2479.
- Schamel, W.W., and Reth, M. (2000). Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* *13*, 5–14.
- Schelonka, R.L., Tanner, J., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Zemlin, M., and Schroeder, H.W. (2007). Categorical selection of the antibody repertoire in splenic B cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1010–1021.
- Schmitz, R., Baumann, G., and Gram, H. (1996). Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display. *J. Mol. Biol.* *260*, 664–677.

- Schneider, P., Takatsuka, H., Wilson, A., Mackay, F., Tardivel, A., Lens, S., Cachero, T.G., Finke, D., Beermann, F., and Tschoop, J. (2001). Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J. Exp. Med.* *194*, 1691–1697.
- Schreck, S., Buettner, M., Kremmer, E., Bogdan, M., Herbst, H., and Niedobitek, G. (2006). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is expressed in normal spermatogenesis but only infrequently in testicular germ cell tumours. *J. Pathol.* *210*, 26–31.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C.J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* *274*, 17406–17409.
- von Schwedler, U., Jäck, H.M., and Wabl, M. (1990). Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* *345*, 452–456.
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Nys, J., Cantrell, D., McCleary, S., Smithers, N., and Tybulewicz, V.L.J. (2013). The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway. *Immunity* *38*, 475–488.
- Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A., and Birshstein, B.K. (2005). Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol. Immunol.* *42*, 605–615.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltneane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* *17*, 51–62.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 155–168.
- Shinjyo, T., Kuribara, R., Inukai, T., Hosoi, H., Kinoshita, T., Miyajima, A., Houghton, P.J., Look, A.T., Ozawa, K., and Inaba, T. (2001). Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 854–864.
- Shinkura, R., Ito, S., Begum, N.A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H., and Honjo, T. (2004). Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* *5*, 707–712.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* *345*, 1058–1062.
- Sidman, C.L., Marshall, J.D., and Von Boehmer, H. (1992). Transgenic T cell receptor interactions in the lymphoproliferative and autoimmune syndromes of *lpr* and *gld* mutant mice. *Eur. J. Immunol.* *22*, 499–504.
- Smit, L.A., Bende, R.J., Aten, J., Guikema, J.E.J., Aarts, W.M., and van Noesel, C.J.M. (2003). Expression of activation-induced cytidine deaminase is confined to B-cell non-Hodgkin's lymphomas of germinal-center phenotype. *Cancer Res.* *63*, 3894–3898.

- Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur. J. Immunol.* *26*, 444–448.
- Smith, K.G., Tarlinton, D.M., Doody, G.M., Hibbs, M.L., and Fearon, D.T. (1998). Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J. Exp. Med.* *187*, 807–811.
- Snow, R.E., Chapman, C.J., Frew, A.J., Holgate, S.T., and Stevenson, F.K. (1995). Analysis of Ig VH region genes encoding IgE antibodies in splenic B lymphocytes of a patient with asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 5576–5581.
- Snow, R.E., Chapman, C.J., Frew, A.J., Holgate, S.T., and Stevenson, F.K. (1997). Pattern of usage and somatic hypermutation in the V(H)5 gene segments of a patient with asthma: implications for IgE. *Eur. J. Immunol.* *27*, 162–170.
- Snow, R.E., Djukanovic, R., and Stevenson, F.K. (1999). Analysis of immunoglobulin E VH transcripts in a bronchial biopsy of an asthmatic patient confirms bias towards VH5, and indicates local clonal expansion, somatic mutation and isotype switch events. *Immunology* *98*, 646–651.
- Stadanlick, J.E., Kaileh, M., Karnell, F.G., Scholz, J.L., Miller, J.P., Quinn, W.J., Brezski, R.J., Trembl, L.S., Jordan, K.A., Monroe, J.G., et al. (2008). Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BlyS signaling. *Nat. Immunol.* *9*, 1379–1387.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 261–292.
- van der Stoep, N., van der Linden, J., and Logtenberg, T. (1993). Molecular evolution of the human immunoglobulin E response: high incidence of shared mutations and clonal relatedness among epsilon VH5 transcripts from three unrelated patients with atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* *177*, 99–107.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H., and Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* *14*, 6136–6147.
- Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* *30*, 180–192.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* *8*, 613–621.
- Swaminathan, S., Duy, C., and Müschen, M. (2014). BACH2-BCL6 balance regulates selection at the pre-B cell receptor checkpoint. *Trends Immunol.* *35*, 131–137.
- Ta, V.-T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., et al. (2003). AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat. Immunol.* *4*, 843–848.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* *13*, 933–940.
- Talay, O., Yan, D., Brightbill, H.D., Straney, E.E.M., Zhou, M., Ladi, E., Lee, W.P., Egen, J.G., Austin, C.D., Xu, M., et al. (2012). IgE<sup>+</sup> memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat. Immunol.* *13*, 396–404.

- Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* *209*, 597–606.
- Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., and Papavasiliou, F.N. (2008). MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* *28*, 621–629.
- Thai, T.-H., Calado, D.P., Casola, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frenthewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J.L., et al. (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* *316*, 604–608.
- Thome, M. (2004). CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 348–359.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* *20*, 707–718.
- Tran, T.H., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N.A., Shinkura, R., Fagarasan, S., Honjo, T., and Nagaoka, H. (2010). B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress *Aicda* by overcoming the effects of silencers. *Nat. Immunol.* *11*, 148–154.
- Tumas-Brundage, K., and Manser, T. (1997). The transcriptional promoter regulates hypermutation of the antibody heavy chain locus. *J. Exp. Med.* *185*, 239–250.
- Ubelhart, R., Bach, M.P., Eschbach, C., Wossning, T., Reth, M., and Jumaa, H. (2010). N-linked glycosylation selectively regulates autonomous precursor BCR function. *Nat. Immunol.* *11*, 759–765.
- Uchimura, Y., Barton, L.F., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2011). REG- $\gamma$  associates with and modulates the abundance of nuclear activation-induced deaminase. *J. Exp. Med.* *208*, 2385–2391.
- Ueda, Y., Liao, D., Yang, K., Patel, A., and Kelsoe, G. (2007). T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 3593–3601.
- Ulrich, H.D. (2006). Deubiquitinating PCNA: a downside to DNA damage tolerance. *Nat. Cell Biol.* *8*, 303–305.
- Vale, A.M., Tanner, J.M., Schelonka, R.L., Zhuang, Y., Zemlin, M., Gartland, G.L., and Schroeder, H.W. (2010). The peritoneal cavity B-2 antibody repertoire appears to reflect many of the same selective pressures that shape the B-1a and B-1b repertoires. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 6085–6095.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Schumacker, P.T., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell* *3*, 159–167.
- Vander Heiden, M.G., Plas, D.R., Rathmell, J.C., Fox, C.J., Harris, M.H., and Thompson, C.B. (2001). Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5899–5912.
- Vanfleteren, J.R., and Braeckman, B.P. (1999). Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol. Aging* *20*, 487–502.

- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., et al. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267–276.
- Velichutina, I., Shaknovich, R., Geng, H., Johnson, N.A., Gascoyne, R.D., Melnick, A.M., and Elemento, O. (2010). EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* 116, 5247–5255.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., et al. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875–886.
- Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605.
- Vigorito, E., Bardi, G., Glassford, J., Lam, E.W.-F., Clayton, E., and Turner, M. (2004). Vav-dependent and vav-independent phosphatidylinositol 3-kinase activation in murine B cells determined by the nature of the stimulus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 3209–3214.
- Vigorito, E., Perks, K.L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P.P., Miska, E.A., Rodriguez, A., Bradley, A., et al. (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 27, 847–859.
- Vikstrom, I., Carotta, S., Lüthje, K., Peperzak, V., Jost, P.J., Glaser, S., Busslinger, M., Bouillet, P., Strasser, A., Nutt, S.L., et al. (2010). Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science* 330, 1095–1099.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116, 1895–1898.
- van der Vos, K.E., and Coffey, P.J. (2011). The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 579–592.
- Vuong, B.Q., Herrick-Reynolds, K., Vaidyanathan, B., Pucella, J.N., Ucher, A.J., Donghia, N.M., Gu, X., Nicolas, L., Nowak, U., Rahman, N., et al. (2013). A DNA break- and phosphorylation-dependent positive feedback loop promotes immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 14, 1183–1189.
- Wang, L., Wuerrffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A.A., and Kenter, A.L. (2009). S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J. Exp. Med.* 206, 1817–1830.
- Wang, Y., Brooks, S.R., Li, X., Anzelon, A.N., Rickert, R.C., and Carter, R.H. (2002). The physiologic role of CD19 cytoplasmic tyrosines. *Immunity* 17, 501–514.
- Weant, A.E., Michalek, R.D., Khan, I.U., Holbrook, B.C., Willingham, M.C., and Grayson, J.M. (2008). Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. *Immunity* 28, 218–230.

- Wehrli, N., Legler, D.F., Finke, D., Toellner, K.M., Loetscher, P., Baggiolini, M., MacLennan, I.C., and Acha-Orbea, H. (2001). Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* *31*, 609–616.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727–730.
- Weill, J.C., and Reynaud, C.A. (1996). Rearrangement/hypermutation/gene conversion: when, where and why? *Immunol. Today* *17*, 92–97.
- Whetton, A.D., and Dexter, T.M. (1983). Effect of haematopoietic cell growth factor on intracellular ATP levels. *Nature* *303*, 629–631.
- Wienands, J., and Engels, N. (2001). Multitasking of Ig-alpha and Ig-beta to regulate B cell antigen receptor function. *Int. Rev. Immunol.* *20*, 679–696.
- Willenbrock, K., Jungnickel, B., Hansmann, M.-L., and Küppers, R. (2005). Human splenic marginal zone B cells lack expression of activation-induced cytidine deaminase. *Eur. J. Immunol.* *35*, 3002–3007.
- Willmann, K.L., Milosevic, S., Pauklin, S., Schmitz, K.-M., Rangam, G., Simon, M.T., Maslen, S., Skehel, M., Robert, I., Heyer, V., et al. (2012). A role for the RNA pol II-associated PAF complex in AID-induced immune diversification. *J. Exp. Med.* *209*, 2099–2111.
- Woo, C.J., Martin, A., and Scharff, M.D. (2003). Induction of somatic hypermutation is associated with modifications in immunoglobulin variable region chromatin. *Immunity* *19*, 479–489.
- Wu, X., Gerald, P., Platt, J.L., and Cascalho, M. (2005). The double-edged sword of activation-induced cytidine deaminase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 934–941.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and Kenter, A.L. (2007). S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* *27*, 711–722.
- Xiang, J., Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 14559–14563.
- Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2012). Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J. Exp. Med.* *209*, 353–364.
- Xu, W., Santini, P.A., Matthews, A.J., Chiu, A., Plebani, A., He, B., Chen, K., and Cerutti, A. (2008). Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 276–287.
- Yadav, A., Olaru, A., Saltis, M., Setren, A., Cerny, J., and Livák, F. (2006). Identification of a ubiquitously active promoter of the murine activation-induced cytidine deaminase (AICDA) gene. *Mol. Immunol.* *43*, 529–541.
- Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H., Robbiani, D.F., McBride, K., Nussenzweig, M.C., and Casellas, R. (2011). Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* *12*, 62–69.

- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* *449*, 478–482.
- Yancopoulos, G.D., DePinho, R.A., Zimmerman, K.A., Lutzker, S.G., Rosenberg, N., and Alt, F.W. (1986). Secondary genomic rearrangement events in pre-B cells: VHDJH replacement by a LINE-1 sequence and directed class switching. *EMBO J.* *5*, 3259–3266.
- Yang, J., and Reth, M. (2010a). The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Lett.* *584*, 4872–4877.
- Yang, J., and Reth, M. (2010b). Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells. *Nature* *467*, 465–469.
- Yang, G., Scherer, S.J., Shell, S.S., Yang, K., Kim, M., Lipkin, M., Kucherlapati, R., Kolodner, R.D., and Edelman, W. (2004). Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Cell* *6*, 139–150.
- Yang, G., Obiakor, H., Sinha, R.K., Newman, B.A., Hood, B.L., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., and Mage, R.G. (2005). Activation-induced deaminase cloning, localization, and protein extraction from young VH-mutant rabbit appendix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17083–17088.
- Yang, Z., Sullivan, B.M., and Allen, C.D.C. (2012). Fluorescent in vivo detection reveals that IgE(+) B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity* *36*, 857–872.
- de Yébenes, V.G., Belver, L., Pisano, D.G., González, S., Villasante, A., Croce, C., He, L., and Ramiro, A.R. (2008). miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J. Exp. Med.* *205*, 2199–2206.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* *400*, 886–891.
- Ying, C.Y., Dominguez-Sola, D., Fabi, M., Lorenz, I.C., Hussein, S., Bansal, M., Califano, A., Pasqualucci, L., Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2013). MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Immunol.* *14*, 1084–1092.
- Youn, H.D., and Liu, J.O. (2000). Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity* *13*, 85–94.
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* *4*, 442–451.
- Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M.F., Diaz, M., and Casali, P. (2001). The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity* *14*, 643–653.
- Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L., and Tian, M. (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* *5*, 1275–1281.

- Zeng, L., Sachdev, P., Yan, L., Chan, J.L., Trenkle, T., McClelland, M., Welsh, J., and Wang, L.H. (2000). Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 9212–9224.
- Zeng, X., Winter, D.B., Kasmer, C., Kraemer, K.H., Lehmann, A.R., and Gearhart, P.J. (2001). DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat. Immunol.* *2*, 537–541.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C., and Gao, L. (2003a). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* *424*, 94–98.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003b). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* *425*, 836–841.
- Zhang, W., Bardwell, P.D., Woo, C.J., Poltoratsky, V., Scharff, M.D., and Martin, A. (2001). Clonal instability of V region hypermutation in the Ramos Burkitt's lymphoma cell line. *Int. Immunol.* *13*, 1175–1184.
- Zhang, Y., Meyer-Hermann, M., George, L.A., Figge, M.T., Khan, M., Goodall, M., Young, S.P., Reynolds, A., Falciani, F., Waisman, A., et al. (2013). Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J. Exp. Med.* *210*, 457–464.
- Zharkov, D.O., Mechetin, G.V., and Nevinsky, G.A. (2010). Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition. *Mutat. Res.* *685*, 11–20.
- Zheng, N.-Y., Wilson, K., Jared, M., and Wilson, P.C. (2005). Intricate targeting of immunoglobulin somatic hypermutation maximizes the efficiency of affinity maturation. *J. Exp. Med.* *201*, 1467–1478.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R., and Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* *15*, 1481–1486.