

avec la protéine BMP4 (normalement localisée ventralement chez la *gastrula* des vertébrés, et possédant une fonction anti-neurale) entraîne une ventralisation de l'embryon d'amphioxus, ce qui démontre que du point de vue fonctionnel, l'établissement de l'axe dorso-ventral (D/V) est aussi conservé entre l'amphioxus et les vertébrés [6]. Ces résultats confortent d'autres résultats antérieurs obtenus par Tung et ses collaborateurs dans les années 1960 [7], qui démontrèrent par des expériences de transplantation de blastomères les capacités inductives de la partie dorsale du blastopore de la *gastrula* d'amphioxus. Ainsi, il semble désormais clair que l'ancêtre de tous les chordés établissait son plan d'organisation par l'intermédiaire de la fonction inductrice d'un organisateur au cours de la gastrulation et que cette fonction organisatrice a ensuite été perdue chez les ascidies. D'autres données laissent également penser qu'au moins une partie des mécanismes d'organisation devait déjà être présente avant l'apparition des chordés. En effet, chez les hémichordés, l'un des phylums le plus proche des chordés et qui partage avec

eux la présence de structures typiquement induites par l'organisateur telles que les fentes branchiales, le mésoderme du pharynx ou l'endostyle, on observe déjà une expression dorso-ventrale de BMP et de ses antagonistes (par exemple, la chordine) mais de manière inversée par rapport aux chordés [8]. Chez les protostomiens, tels que la drosophile, les orthologues de BMP/Chordine sont aussi exprimés dans l'axe D/V des embryons avec une orientation similaire à celle qui prévaut chez les hémichordés [9]. Ces résultats suggèrent que le plan d'organisation typique des vertébrés soit apparu spécifiquement chez l'ancêtre de tous les chordés, après l'inversion de l'axe D/V, inversion qui doit être étroitement liée à l'évolution fonctionnelle de l'organisateur.

Aujourd'hui, deux questions restent donc sans réponse. La première concerne les mécanismes moléculaires qui ont dû être modifiés pour permettre l'apparition fonctionnelle de l'organisateur à partir d'un ancêtre ayant un plan d'organisation possédant l'axe D/V inversé par rapport à celui des vertébrés. La deuxième est de savoir quelles sont les adaptations chez

les ascidies qui leur ont permis de garder un plan d'organisation de type chordé en l'absence d'un véritable organisateur. ♦

On the evolution of the chordates bodyplan...

RÉFÉRENCES

- Schubert M, Escriva H, Xavier-Neto J, Laudet V. Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems. *Trends Ecol Evol* 2006 ; 21 : 269-77.
- Spemann H, Mangold H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Dev Genes Evol* 1924 ; 100 : 599-638.
- Kourakis MJ, Smith WC. Did the first chordates organize without the organizer? *Trends Genet* 2005 ; 21 : 506-10.
- Imai KS, Hino K, Yagi K, et al. Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks. *Development* 2004 ; 131 : 4047-58.
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 2006 ; 439 : 965-8.
- Yu JK, Satou Y, Holland ND, et al. Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature* 2007 ; 445 : 613-7.
- Tung TC, Wu SC, Tung YF. Experimental studies on the neural induction in Amphioxus. *Scientia Sinica* 1962 ; XI : 805-20.
- Lowe CJ, Terasaki M, Wu M, et al. Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. *PLoS Biol* 2006 ; 4 : e291.
- Dorfman R, Shilo BZ. Biphasic activation of the BMP pathway patterns the Drosophila embryonic dorsal region. *Development* 2001 ; 128 : 965-72.

NOUVELLE

Hypermutation des gènes des immunoglobulines et polymérases mutagènes Quand l'erreur devient une qualité

Claude-Agnès Reynaud, Frédéric Delbos, Said Aoufouchi, Ahmad Faili, Jean-Claude Weill

► 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 précieusement mobilisés pour son élimination.

Inserm U783, Développement du système immunitaire, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, Université Paris Descartes, 156, rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France. reynaud@necker.fr weill@necker.fr

Cette capacité de modification des gènes des immunoglobulines est restée pendant près de trente ans sans explication moléculaire, jusqu'à la découverte, par le groupe de Tasuku Honjo, de la protéine AID (*activation-induced cytidine deaminase*). L'inactivation du gène codant pour cette enzyme abolit tous les processus de modification des gènes des immunoglo-

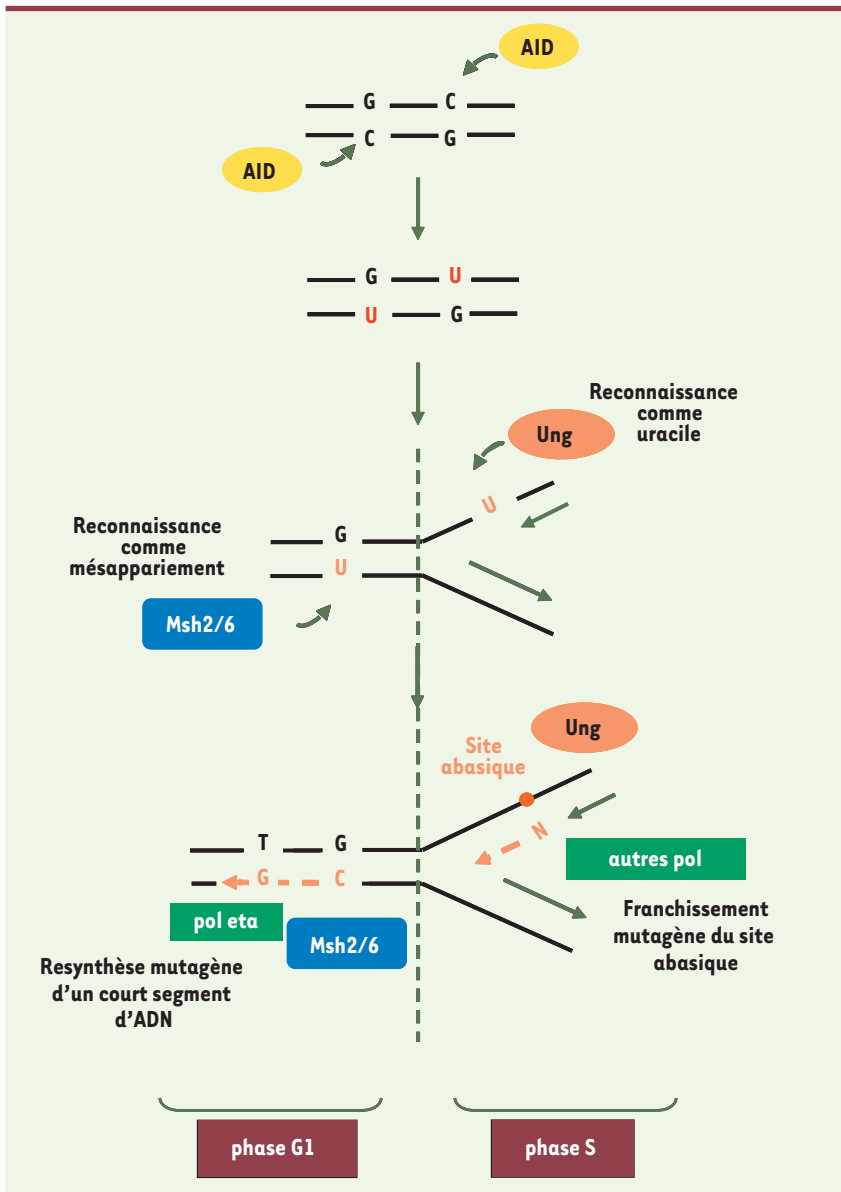


Figure 1. Vue schématisée du rôle des ADN polymérases translésionnelles dans le processus d'hypermutation des gènes des immunoglobulines. L'action de l'AID au locus des immunoglobulines désamine des cytosines en uraciles. Ces uraciles présents dans l'ADN double-brin vont être préférentiellement reconnus comme des mésappariements par le complexe MSH2-MSH6 (normalement en charge de la reconnaissance des mésappariements post-répliatifs), et empêcher ainsi le fonctionnement de la voie classique de réparation par l'uracile glycosylase UNG. Cette reconnaissance enclenche une réparation à fort taux d'erreur, par le recrutement de l'ADN polymérase eta. La signature moléculaire de cette enzyme est caractérisée par une mutagenèse sur les bases A/T, son taux d'erreurs de synthèse étant le plus fort en face d'une thymidine. Lors de la phase S, UNG pourra accéder aux uraciles exposés sur l'ADN en cours de répliation et produire des sites abasiques. La répliation de ces sites fait appel à d'autres polymérases translésionnelles (Rev1 et probablement d'autres comme pol zeta [10, 11]), dont l'action mutagène par incorporation d'une base quelconque (« N ») sera ciblée sur les bases G/C. Si le recrutement en phase S des polymérases translésionnelles correspond bien à leur rôle physiologique de franchissement des lésions bloquant la progression de la fourche de répliation, l'intervention du mismatch repair couplé à l'ADN polymérase eta apparaît, elle, comme un processus unique aux lymphocytes B engagés dans la réponse immunitaire (adapté de [8]).

bulines postérieurs à leur assemblage par recombinaison, c'est-à-dire non seulement les mutations somatiques, mais également la commutation isotypique et la conversion génique [1, 2]. L'AID, qui est une cytidine désaminase, déclenche ces processus par une désamination des cytosines en uraciles au locus des immunoglobulines, une modification potentiellement mutagène par elle-même.

Mais l'action de l'AID ne suffit pas à expliquer à elle seule la mutagenèse des gènes des immunoglobulines [3]. La première raison en est que les mutations observées ne se réduisent pas aux seuls sites de désamination (les bases C), mais affectent en proportion égale les bases A/T et les bases G/C. La deuxième est que l'uracile est une lésion assez banale dans l'ADN, produite soit par désamination (métabolique) des cytosines (quelques centaines par jour dans le génome humain), soit par incorporation incorrecte d'uraciles (à la place de la thymidine) lors de la répliation (quelques milliers par cycle de répliation). La cellule eucaryote possède de nombreux systèmes de réparation dédiés à la reconnaissance et à l'élimination de cette base anormale, en premier lieu desquels les uraciles glycosylases (UNG, plus particulièrement impliquée lors de la répliation et SMUG, plutôt dirigée vers l'élimination des produits de désamination).

Dans l'hypermutation, la problématique est naturellement différente, puisqu'il s'agit bien de créer des mutations dans l'ADN après reconnaissance de l'uracile, et non de le réparer sans laisser de traces. Pour muter les gènes des immunoglobulines, il va falloir en premier lieu détourner ces systèmes de réparation de leur rôle de gardiens de l'information génétique. La mutagenèse induite par l'AID ne va donc pas fonctionner par saturation des capacités de réparation de la cellule (un processus sans doute trop dangereux, car pas assez précis), mais par modification des circuits habituellement mobilisés.

Trois facteurs principaux ont été décrits comme participant au processus d'hypermutation : l'uracile glycosylase (UNG), le *mismatch repair* (MSH2-MSH6) et l'ADN polymérase η [4-7]. L'uracile glycosylase enlève habituellement la base anormale, puis la chaîne d'ADN est incisée et la base manquante resynthétisée. Le *mismatch repair* est lui en charge des erreurs introduites lors de la réplication, et est composé d'un complexe reconnaissant les mésappariements (MSH2-MSH6), et d'un complexe effecteur (PMS2-MLH1) qui va diriger la resynthèse d'une portion d'ADN autour du mésappariement. Enfin, l'ADN polymérase η appartient à la famille des polymérases translésionnelles (qui inclut au moins quatre autres membres dont pol zeta et Rev1), polymérases qui permettent le franchissement des lésions de l'ADN bloquant la progression de la fourche de réplication. Leur recrutement, lors des accidents rencontrés pendant la réplication, est le plus souvent protecteur pour le génome des eucaryotes supérieurs. *In vitro* au contraire, ces polymérases sont très mutagènes quand elles copient un ADN normal.

L'obtention de souris déficientes en *mismatch repair* et en ADN polymérase η nous a récemment permis de proposer un schéma simplifié du processus d'hypermutation (Figure 1) [6, 8] : les bases A/T sont produites par l'action du *mismatch repair* recrutant l'ADN polymérase η , et les mutations G/C créées pour l'essentiel par la réplication des sites abasiques produits par l'uracile glycosylase. Dans l'hypermutation, tout fonctionne donc « de travers » et concourt à l'accumulation d'erreurs introduites en cascade dans la gestion d'une lésion banale de l'ADN. L'uracile est reconnu en première intention comme un mésappariement G/U par un des composants du système de réparation normalement en charge des erreurs de la réplication (le

complexe MSH2-MSH6). Ce complexe va recruter l'ADN polymérase η pour « réparer » cette lésion en resynthétisant un court segment d'ADN, introduisant de ce fait de nouvelles mutations, essentiellement sur les bases A/T qui représentent la signature de cette enzyme. L'activité de l'uracile glycosylase se trouve ainsi confinée à la phase S du cycle cellulaire sur l'ADN simple brin, et son intervention, qui va créer des sites abasiques à l'approche de la fourche de réplication, sera tout naturellement mutagène, un site abasique ne portant pas d'information pour les polymérases translésionnelles capables de le franchir.

On retrouve donc les ADN polymérases dites translésionnelles à l'origine de toutes les mutations induites par l'AID, soit dans leur fonction spécifique (franchissement des sites abasiques), soit dans un rôle inhabituel et qui semble restreint aux cellules B (pour l'ADN polymérase η). On observe ainsi curieusement, au cours du processus d'hypermutation, une résurgence du rôle mutagène des polymérases translésionnelles, tel qu'il a été proposé pour la réponse SOS chez *E. coli* [9], et l'on peut évidemment trouver quelque analogie entre la mutagenèse qu'entraîne une réponse au stress chez la bactérie et la variabilité induite sur le récepteur de la cellule B lors de la réponse à l'agression par un agent pathogène.

Une telle dérive des systèmes de maintenance de l'ADN est impressionnante, et la question se pose bien évidemment de savoir quels sont les signaux spécifiques au lymphocyte B qui permettent, lors de la réponse immunitaire, cette gestion non orthodoxe d'une lésion ubiquitaire de l'ADN. Plus généralement se pose également la question du ciblage de l'AID au locus des immunoglobulines, question difficile puisque l'hypermutation, au contraire de la recombinaison des gènes des immunoglobulines, n'implique pas la reconnaissance de signaux

spécifiques. S'il est probable que la cellule tolère un certain degré de non-spécificité, le processus d'hypermutation ciblant un ou deux kilobases en aval d'un promoteur actif et la majorité des gènes ne comptant pas ou peu d'exons codants sur une telle distance, le locus des immunoglobulines constitue clairement la cible préférentielle du processus. Conformation spécifique du locus, dialogue particulier entre promoteur et *enhancer*, relocalisation dans le noyau à des sites constituant des *mutation factories*, beaucoup d'hypothèses sont ouvertes et restent à tester. \diamond

Immunoglobulin gene hypermutation: when error becomes a quality

RÉFÉRENCES

1. Muramatsu M, K. Kinoshita S, Fagarasan S, et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000 ; 102 : 553-63.
2. Revy P, Muto T, Levy Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000 ; 102 : 565-75.
3. Reynaud CA, Aoufouchi S, Faili A, Weill JC. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome ? *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 631-8.
4. Zeng X, Winter DB, Kasmer C, et al. DNA polymerase η is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol* 2001 ; 2 : 537-41.
5. Faili A, Aoufouchi S, Weller S, et al. DNA polymerase η is involved in hypermutation occurring during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2004 ; 199 : 265-70.
6. Delbos F, De Smet A, Faili A, et al. Contribution of DNA polymerase η to immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* 2005 ; 201 : 1191-6.
7. Rada C, Di Noia JM, Neuberger MS. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* 2004 ; 16 : 163-71.
8. Delbos F, Aoufouchi S, Faili A, et al. DNA polymerase η is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 17-23.
9. Friedberg EC, Wagner R, Radman M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* 2002 ; 296 : 1627-30.
10. Jansen JG, Langerak P, Tsaalbi-Shtylik A, et al. Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 319-23.
11. Diaz M, Verkoczy LK, Flajnik MF, Klinman NR. Decreased frequency of somatic hypermutation and impaired affinity maturation but intact germinal center formation in mice expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *J Immunol* 2001 ; 167 : 327-35.