



HAL
open science

Maturation finale des lymphocytes B : de la commutation de classe aux conséquences pathologiques de la production d'immunoglobulines anormales

Amélie Bonaud

► **To cite this version:**

Amélie Bonaud. Maturation finale des lymphocytes B : de la commutation de classe aux conséquences pathologiques de la production d'immunoglobulines anormales. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0017 . tel-01186398

HAL Id: tel-01186398

<https://theses.hal.science/tel-01186398v1>

Submitted on 24 Aug 2015

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.

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Bio-Santé (n° 524)

Faculté des Sciences et Techniques

UMR CNRS 7276

"Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations" (CRIBL)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Amélie BONAUD

Le 20 Avril 2015

Maturation finale des lymphocytes B : de la commutation de classe aux conséquences pathologiques de la production d'immunoglobulines anormales

Directeur de thèse : Christophe SIRAC

Co-directeur : Eric PINAUD

Jury

Président :

Jean-Claude ALDIGIER, Professeur-Praticien Hospitalier, CHU, Limoges.

Rapporteurs :

Pierre Aucouturier, Professeur-Praticien Hospitalier, Inserm UMRS 938 - Hôpital Saint-Antoine, Paris.

Sandra Weller, Chargé de recherche Inserm, UMR 1019, Université de Lille

Examineurs :

Cyrille Garnier, Maître de Conférences Universitaire UMR-CNRS 6290, Université de Rennes 1

Guy Touchard, Professeur-Praticien Hospitalier, CHU, Poitiers

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Bio-Santé (n° 524)

Faculté des Sciences et Techniques

UMR CNRS 7276

"Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations" (CRIBL)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Amélie BONAUD

Le 20 Avril 2015

Maturation finale des lymphocytes B : de la commutation de classe aux conséquences pathologiques de la production d'immunoglobulines anormales

Directeur de thèse : Christophe SIRAC

Co-directeur : Eric PINAUD

Jury

Président :

Jean-Claude ALDIGIER, Professeur-Praticien Hospitalier, CHU, Limoges.

Rapporteurs :

Pierre Aucouturier, Professeur-Praticien Hospitalier, Inserm UMRS 938 - Hôpital Saint-Antoine, Paris.

Sandra Weller, Chargé de recherche Inserm, UMR 1019, Université de Lille

Examineurs :

Cyrille Garnier, Maître de Conférences Universitaire UMR-CNRS 6290, Université de Rennes 1

Guy Touchard, Professeur-Praticien Hospitalier, CHU, Poitiers

Je remercie l'association de « La Ligue contre le cancer » pour la confiance et le soutien apportés au travers du financement de ma 4^{ème} année de thèse



Résumé

« Maturation finale des lymphocytes B : de la commutation de classe aux conséquences pathologiques de la production d'immunoglobulines anormales »

La commutation de classe (CSR) est une étape clef de la réponse immunitaire. Ce phénomène va permettre de changer le type d'immunoglobuline (Ig) produite en réponse à un antigène donné. Ces Ig seront ensuite produites par les plasmocytes, qui constituent le stade ultime de la différenciation de la lignée cellulaire B. Lors de dérèglements de la prolifération de ces cellules, certaines Ig monoclonales anormales peuvent être produites et conduire à des situations pathologiques. La première partie de ce travail s'inscrit dans une logique de compréhension des éléments minima requis pour l'établissement de ce phénomène de CSR. Grâce à un modèle animal d'insertion dirigée dans le locus kappa murin, naturellement ciblé par l'enzyme AID responsable de ce phénomène, nous avons mis en évidence que la présence de deux régions « switch » transcrites et fortement mutées par AID, n'était pas suffisante pour permettre ce phénomène. Un modèle murin reproduisant une maladie due à une Ig anormale a aussi été établi. Ce modèle de HCDD (*Heavy Chain Deposition Disease*) nous a permis de mettre en évidence la nécessité de la délétion du CH1 des chaînes lourdes d'Ig pour la génération des dépôts et nous a également permis de montrer que l'efficacité des thérapies à base d'inhibiteur de protéasome observée chez les patients atteint de HCDD, était en partie due à l'Ig pathogène elle-même, qui induit une élévation du stress du réticulum endoplasmique (UPR) au sein des plasmocytes producteurs de ces Ig.

Mots clefs : Commutation de classe, immunoglobuline, plasmocytes, Maladie de dépôts de chaînes lourdes monoclonales (HCDD)

Abstract

« Final maturation of B lymphocytes: from class switch recombination to pathological consequences of abnormal immunoglobulin production »

Class Switch Recombination (CSR) is a key step during the immune response. CSR results in a switch to a more specific Ig isotype in response to a specific antigen. Plasma cells, the ultimate stage of B cell lineage differentiation, will synthesize this Ig. During plasma cell disorders, the production of an abnormal monoclonal Ig can lead to pathogenic situations. The aim of the first part of this study is to determine the minimal requirements for CSR induction with a mouse model in which we inserted a "switch cassette" composed of two transcribed S regions into a kappa locus which is naturally targeted by AID. However, despite efficient transcription and AID targeting of S regions, the "switch cassette" was not sufficient to induce effective CSR. We also developed a mouse model of HCDD (Heavy Chain Deposition Disease) which reproduced typical Randall-type renal lesions due to production of a pathogenic truncated heavy chain. This model demonstrated that the effective response to proteasome inhibitors observed in patients, is the consequence of the presence of a truncated HC that sensitizes plasma cells to this type of therapy through an elevated unfolded protein response (UPR).

Keywords: Class switch recombination, immunoglobulin, plasma cell, Heavy Chain Deposition Disease (HCDD)

Remerciements

En tout premier lieu je tiens à remercier Christophe Sirac sans qui tout ce travail n'aurait pas existé. Je te remercie pour tout le temps que tu m'auras consacré, tous tes conseils, idées, théories, avis mais également la confiance que tu m'as accordée. Merci également pour m'avoir offert l'occasion d'aller aux Etats-Unis pour un congrès international et d'avoir pu rencontrer tous ces grands noms en vrai !!

Merci à Michel Cogné de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse.

Je remercie Jean Claude Aldigier de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse, mais également pour votre gentillesse et toutes ces petites souris qui sont venues peupler mes cahiers de labo.

Je remercie également Pierre Aucouturier et Sandra Weller de me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je tiens ensuite à remercier Cyrille Garnier d'avoir accepté d'examiner ce travail. Enfin je remercie Guy Touchard d'examiner ce travail mais également pour ces conseils et analyses précieuses de tous nos échantillons envoyés à Poitiers.

Un grand merci également à tous les « Poitevins », Frank merci pour ton optimisme, tes discussions toujours constructives et « le cours » sur le rein qui nous aura permis de bien avancer. Vincent, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité mais aussi pour m'avoir appris cette fameuse technique de culture des PTC. Corinne merci pour tous les conseils, les allers retour (finalement on a réussi à trouver pourquoi on ne voyait pas la même chose) ta bonne humeur et ta présence malgré tout ce que tu traverses. Nathalie et Béatrice, merci pour tous ces organes techniqués, tous ces reins pourtant préparés au plus vite... mais pas exploitable, également pour les « peptides » qu'on ne voit pas mais que vous avez quand même réussi à trouver et pour tous vos conseils. Fleur et Patricia que je connais moins mais qui devraient recevoir des prélèvements de souris, merci d'avance. Merci également aux membres du centre de référence, Arnaud, pour vos conseils, Frederica et David, définitivement les stats sont différentes entre nos deux domaines mais tu nous en auras appris beaucoup sur cet art qu'est la statistique.

Je remercie l'équipe « du second » enfin qui est maintenant au premier étage (mais nous aussi), Jean, Chantal, Nathalie, Christelle, Magalie, Robin, Héloïse, Nicolas, Hazar, Racha et Oussama un ancien du troisième. Merci également à Cathy et Magalie pour toutes ces heures passées au trieur, à trier les fameux 0.1%... c'est peut-être pas plus mal que l'ARIA n'arrive que maintenant. Merci également à Amandine, qui à présent a pris son envol mais dont les conseils et la gentillesse auront toujours été les bienvenus.

Enfin un grand merci à toute l'équipe de Michel, parmi lesquels nombre sont bien plus que de simples collègues, j'espère n'oublier personne, si c'était le cas, pardon d'avance.

La « BGM team », mes anciens collègues de paillasse, Eric, merci pour tous tes précieux conseils, ta disponibilité mais aussi les conversations bricolages et « terroir locale » (c'est fou toutes ces différences entre le nord et le sud du département) m'auront permis des moments d'évasion entre deux manips. Armand, il est déjà loin le temps où nous partagions la paillasse accessoire de Fab, notre tour est arrivé, j'ouvre le bal donc bon courage c'est bientôt ton tour. Mylène merci pour tous ces bons moments de rigolades, qui aurait cru que j'approche un jour un american staff... et Ophélie la relève de la BGM team.

Merci également à l'équipe de Laurent, grâce à qui je redécouvre à chaque réunion de labo la surveillance des ARN mais grâce à qui la réponse UPR m'a parue beaucoup moins stressante... merci pour ton aide dans cette thématique. Nivine, Estelle et Omar mes compatriotes de bureau, de madeleines et de pâtisseries libanaise (je n'ai toujours pas réussi à déterminer lesquelles je préfère du sud ou du nord) ainsi que de craquages. Nivine un grand merci pour les week-end Q-PCR et Estelle pour ta solidarité dans les « vérif » nocturnes... on ne s'étalera pas sur ce sujet.

Brice mon compatriote de manip tardives... et d'apéro nocturnes au labo, merci pour tous tes conseils pour m'avoir notamment donné le secret « qu'un clonage avant 20h... ça ne marche pas ! » et passé le relais des 150 tubes de cyto... ah non ça pas merci. Merci pour tout et bon courage pour la suite je suis convaincu que tu es promis à un grand avenir. Nico, c'est bientôt ton tour à toi aussi, ta « zénitude » tout au long de ta thèse force mon admiration, courage, tu vas en avoir besoin pour cette dernière ligne droite. Jeanne merci pour toutes les corrections d'anglais ainsi que ta gentillesse et tes conseils. Iman et Hend bon courage pour la thèse.

Marie, « le hobby est pratique » restera une des phrases cultes. Je te joins à Cendrine dans ces remerciements, car un grand merci à vous 2 pour toutes ces heures passées au cryostat (parce que j'en ai besoin pour hier des lames...).

Merci « aux IgA », Anne, Anderson, Marie et Christelle. Anne merci pour les néphrectomies ainsi que pour tous tes conseils sur les reins, mais aussi pour ta bonne humeur et tout ce que tu fais pour nous tous. Christelle merci pour toutes les « purif » et les beaux western blot (c'est vraiment un art).

Merci également à la « Denizot team », Yves, pour vos anecdotes et opinions qui ont souvent animées les pauses café mais également pour les dépannages de certains réactifs, ainsi qu'Alexis et Faten c'est bientôt votre tour.

Enfin un grand, grand merci à Sandrine, Claire, Sophie, Steph et ZO mes confidentes, « conseilleuses », mamans du labo (non sœurs quand même vous n'êtes pas si vieilles...), sécheuses de larmes, reboosteuses. Sandrine nos nocturnes cytométrie et tous ces moments

sportifs d'évasion (j'ai couru 10km d'un coup grâce à toi (à cause ?) mais je reste convaincu que 20 en une fois c'est trop). ZO ancienne coloc de bureau et paillasse merci pour tous tes conseils, ton écoute, ta disponibilité et ta patience avec tous mes « ça marche pas ça m'énervé ». Steph la reine du mot croisé, merci de nous laisser toujours quelques minutes d'avance pour te les compliquer un peu en mettant des « boulettes », merci aussi pour ta patience notamment pour mes répét nocturnes à Oléron (et matinales aussi). Claire pour tous les conseils pour le confocale et la cytométrie, ta patience, ton écoute et les rires et oui tu as raison la thèse c'est « du sang, de la sueur, des larmes et de la joie ». Sophie tous les conseils scientifiques, les sourires d'Olivia remonte moral (et les futurs de votre deuxième poupée) les discussions évasions, merci les filles vous êtes toutes bien plus que des collègues.

Seb alias « killer mice », pardon Pr killer mice, promis le jour où on doit rendre des comptes là-haut je dirai que c'est ma faute. Merci pour toute ton aide, ta bonne humeur, tes remontages de moral mais parce que toi aussi tu es bien plus qu'un simple collègue, présent même quand tu es en vacances ou RTT (c'est possible d'en avoir autant ??). Il reste plein de manip à faire, d'ailleurs il y a 20 souris qui attendent tu m'aides ?

Merci aux animalières, Sylvie, Bernadette et David pour tous les prélèvements, accouplements etc fait. Merci également à Laurent et Makiadi en son temps pour toutes ces boîtes de cônes préparées et tout le matériel toujours prêt. Merci également à Christian et Aurore pour toutes les commandes passées (en urgence), ainsi qu'à François et Delphine et l'équipe de BCD (Marie, Aude, Cécile, Gaël et Armelle)

Et tous ceux qui sont partis mais sans qui ma thèse n'aurait pas été pareil, Virgo et Rada (vous m'aviez pourtant bien dit de pas faire ça...), Virginie tes cahiers de labo incroyablement précis et d'avoir retrouvé les vecteurs « BigJ » toutes ces années après en plus de ton courage d'avoir repris tes études force mon admiration. Rada « oh reine du WB », tu n'auras pas réussi à me convertir, ma Branda, mais sûrement parce que j'ai trop entendu le célèbre « Le Western c'est de la ... ». Pauline et Aurélien bravo pour votre réussite. Bien évidemment Fab, mon « mini-chef » grand frère de thèse, tous ces bons moments passés au labo ou en dehors, mais aussi Guillaume (je te re-prêterai Jerem pour le placo...) tu ne t'en souviens sûrement pas mais c'est avec toi que j'avais fait mes toutes premières mini prep (une centaine pr un début...).

Merci enfin à tous mes proches

Mes amies Cindy et Hélo votre patience pour tous les « je peux pas, j'ai trop de travail... », tous les moments d'évasion, les sessions remontage de moral, votre présence et parce que vous êtes mes meilleures amies tout simplement. On n'a pas parié sur le qui des 3 va passer sa thèse en premier... bon c'est plus la peine.

Ma famille, pour qui bien que ce que je fais reste un peu mystérieux me soutient contre vent et marée (je pense que vous avez plus confiance en moi que moi). Mes taties, mes tontons, mes cousins (en fait Flo à quelques centaines de kg les inséminations vaches ou souris c'est pareil tout compte fait). Pépé et mémé parce que vous êtes des grands parents en or qui savent toujours me redonner le sourire (et des stocks de chocolat), mémé garde ton dico de la science (qui te permet de me décoder) proche de toi pour la lecture de ton exemplaire et refais le stock de chocolat pour nos après-midi bavardage, ça y est la rédaction est finie je reviens. Enfin (c'est au moins le 3^{ème}...) merci Papy pour toutes nos discussions philosophiques et tes conseils orthographiques (comment ça ce n'est pas très académique ?).

Je garde ces dernières lignes pour les 3 personnes sans qui sans aucuns doutes je n'y serai jamais arrivé. Maman et papa (ou papa et maman, pas de jaloux), ma « principal source de revenus » comme vous avez été longtemps considérés par l'Université, mais qui est en vrai bien loin de la réalité. Papa ton remonte moral « la recherche si c'était facile, il y a longtemps que tout aurait été trouvé » restera toujours litigieux mais incontestablement mémorable. Et maman merci pour tout, ces heures de relectures et de compagnies pendant les rédactions nocturnes, mais aussi l'intendance et beaucoup plus... Merci pour tout ce que vous avez fait et faites pour moi, je n'aurai pu rêver avoir de meilleurs parents. Enfin merci Jérém, mon mari (je sais que tu ne t'en lasses pas), mais aussi mon meilleur stagiaire, pour ta patience, tes études comparatives des T-shirt qui absorbent le mieux les larmes, les pizzas livrées les soirs de « nocturnes », les répét écoutées 100 fois. Bref, rien que vous remercier tous les 3 une thèse entière n'y suffirait pas, mais vous savez très bien à quel point vous êtes mes essentiels.

Traditionnellement les remerciements sont limités à deux pages (j'ai à peine triché pour que ça passe), pourtant cette partie pourrait être bien plus longue, tant ma reconnaissance à l'égard de vous tous durant ces années à me supporter est grande.

Merci à tous.

A mes parents,

A mon mari.

Abréviations

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

AID : *Activation-Induced cytidine Deaminase*

AID-RPA : *Replication Protein A*

APE : Endonucléase APurinique/APyrimidique (1 et 2)

APOBEC : *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*

ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR : *ATM-Rad3-related*

Bcl6 : *B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 6*

BER : *Base Excision Repair*

BiP : *Immunoglobulin Binding Protein*

BCR : *B Cell Receptor*

CD40L : CD40 ligand

CDR : *Complementarity Determining Region*

CR : *Complement Receptor (1 ou 2)*

CSR : *Class Switch Recombination*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1 ou 2

CTCF : *CCCTC binding factor*

CTIP : *CTBP-interacting protein1*

CTP : Cellule Tubulaire Proximale

CXCR : *Chemokine C-X-C motif receptor (4 ou 5)*

DNA-PKcs : *DNA dependent serine/threonine Protein Kinase, catalytic subunit*

DRiPs : *Defective Ribosomal Product*

DDR : *DNA Damage Response*

DSB : *Double Strand Break*

DZ : *Dark Zone*

EBF : *Early B cell factor*

ERAD : *ER associated degradation*

FDC : *Cellules Dendritiques Folliculaires*

FLC : *Free Light Chain*

FR : *Framework regions*

Fo : *Folliculaire (lymphocyte B Fo)*

GC : *Germinal Center*

GN : *Glomérulonéphrites*

GOMMID : *glomérulopathies à dépôts microtubulaires d'Ig monoclonales*

Grp78 : *Glucose Regulated Protein-78*

H2AX : *histone 2A family member X*

HC : *Heavy Chain*

HCD : *Heavy Chain Disease*

HCDD : *Heavy Chain Deposition Disease*

HDAC : *Histone DeAcetylases*

HAT : *Histone AcetylTransferase*

ICOS : *Inducible Costimulator*

Ig : *Immunoglobuline*

IL : *Interleukine*

IMWG : *International Myeloma Working Group*

IRE1 α : *Inositol Requiring Enzyme 1 α*

IRF4 : *IFN induced regulatory factor 4*

LC : *Light Chain*

LCDD : *Light Chain Deposition Disease*

LHCDD : *Light and Heavy Chain Deposition Disease*

LMP2A : *Latent Membrane Protein 2A*

LS : *Like Switch*

LSR : *Locus Suicide Region*

LZ : *Light Zone*

MALT : *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

MAR : *Matrix Association Region*

MGRS : *Monoclonal Gammopathy of Renal Significance*

MGUS : *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MIDD : *Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease*

MM : *Myélome Multiple*

MMR : *MisMatch Repair*

MZ : *Zone Marginale*

NCM : *Néphropathie à Cylindres Myélomateux*

NES : *Séquence d'Exportation Nucléaire*

NHEJ : *Non Homologous End Joining (c pour Classical ou A pour Alternative)*

NLS : *Séquence de Localisation Nucléaire*

PALS : *PeriArteriolar Lymphoid Sheath*

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PARP-1 : *polyADP-ribose polymerase 1*

PAS : *Periodic Acid Schiff*

PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PDI : *Protein Disulfide Isomerases*

pI : *point Isoélectrique*

PKA : *Protéine Kinase A*

PKCδ : *Protéine Kinase Cδ*

PNA : *peanut agglutinin*

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

PTBP2 : *Polypyrimidine Tract Binding Protein 2*

RAG : *Recombination Activating Gene (1 et 2)*

RE : *Réticulum Endoplasmique*

RIDD : *Regulated IRE1 Dependent Decay*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

3'RR : *3' Regulatory Region*

RSS : *Recombination Sequence Signal*

SAP : *composant amyloïde P*

SF : *Syndrome de Fanconi*

S1P : *Sphingosine 1 phosphate*

SHM : *Somatic HyperMutation*

TACI : *transmembrane activator and calcium modulating and cyclophilin ligand interactor*

TBM : *Tingible-Body Macrophages*

TdT : *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*

Tfh : *Lymphocytes T folliculaire helper*

TLR : *Toll-Like Receptors*

TSS : *Transcription Start Site*

UNG : *Uracil-DNA glycosylases*

UPR : *Unfolded Protein Response*

Xbp1 : *X-box binding protein 1*

XRCC : *X-ray cross complementing defective repair in Chinese hamster cells (4 ou 5)*

YY1 : *Yin Yang 1*

Sommaire

Rappels Bibliographiques

Introduction générale.....	4
Chapitre 1. Les immunoglobulines, du gène à la protéine.....	6
1.1 Généralités sur les immunoglobulines.....	6
1.2 Structure des immunoglobulines.....	6
1.3 Les loci des gènes d'immunoglobulines : organisation et réarrangements.....	7
1.3.1 Présentation du locus des chaînes lourdes.....	7
1.3.2 Présentation du locus des chaînes légères.....	8
1.3.2.1 Locus kappa.....	8
1.3.2.2 Locus lambda.....	8
1.3.3 Génération du répertoire primaire ou pré-immun des immunoglobulines : les réarrangements V(D)J et leur régulation.....	8
1.4 Transcription des immunoglobulines.....	10
1.5 Régulation post traductionnelle et sécrétion d'immunoglobulines.....	11
1.5.1 Glycosylation des immunoglobulines.....	12
1.5.2 Assemblage et transport des immunoglobulines.....	12
Chapitre 2. Ontogénèse B et développement plasmocytaire.....	14
2.1 Développement indépendant de l'antigène : l'établissement du BCR.....	14
2.2 Phase dépendante de l'antigène.....	16
2.2.1 Le stade B transitionnel, la découverte des organes lymphoïdes secondaires.....	16
2.2.2 Les sous populations B.....	17
2.2.2.1 Les cellules B1.....	17
2.2.2.1 Les cellules B2.....	17
- Les cellules B de la Zone Marginale.....	17
- Les cellules B folliculaires.....	18
2.2.3 La réponse immune T-dépendante, l'établissement des centres germinatifs.....	19
2.2.3.1 Les différents acteurs du centre germinatif.....	20
- Les Cellules Folliculaires Dendritiques.....	20
- Les lymphocytes T folliculaires Helper.....	21
- Les cellules B de GC.....	21
2.2.3.2 Dynamique et mouvements cellulaires dans les centres germinatifs.....	22
2.2.3.3 Les mécanismes de sélection cellulaire dans les centres germinatifs.....	23
2.2.3.4 AID, l'enzyme maitresse du centre germinatif.....	24

2.2.3.5 L'hypermutation somatique	25
2.2.3.6 La commutation de classe	26
- Les régions S	26
- La transcription germinale et sa régulation	27
- Génération des cassures double-brin	28
2.2.3.7 Quelques mots sur le phénomène de « Recombinaison Suicide »	30
2.3 La sortie des centres germinatifs : plasmocytes et lymphocytes B mémoires	30
2.3.1 Les lymphocytes B mémoires	31
2.3.2 Les Plasmocytes.....	32
2.3.2.1 La différenciation plasmocytaire	32
- La régulation de la différenciation plasmocytaire.....	32
- Le « switch » du programme transcriptionnel	33
2.3.2.2 Les différentes populations de plasmocytes	35
2.3.2.3 Localisation et survie plasmocytaire	35
2.3.2.4 Implication de l'UPR dans la production des immunoglobulines.....	37
2.3.3 La chaîne J.....	38

Chapitre 3. Les maladies de dépôts d'immunoglobulines monoclonales 41

3.1 Un bref aperçu des syndromes immunoprolifératifs B	41
3.2. Le myélome multiple et ses dérivés : classification et mécanismes moléculaires.....	42
3.3. Les gammopathies monoclonales	44
3.3.1 Quelques mots sur l'architecture et la fonction rénale	45
3.3.2. Les néphropathies liées aux dépôts d'immunoglobulines monoclonales.....	46
3.3.2.1 Néphropathies tubulaires liées à des fragments d'immunoglobulines monoclonales	47
- Néphropathie à cylindres myélomateux	47
- Syndrome de Fanconi	48
3.3.2.1 Glomérulopathies liées à des fragments d'immunoglobulines monoclonales	50
- Les amyloses AL et AH	50
- Maladies de dépôts d'Ig monoclonales de type Randall (LCDD, HCDD, LHCD)	52
3.4. Traitements aux inhibiteurs du protéasome.....	54
3.5. Modèles animaux de MGRS	55

Résultats

Article 1 : Switch regions per se trigger a long-range AID activity that is not sufficient for optimal class switch recombination.....	57
--	----

Article 2 : A mouse model recapitulating human monoclonal heavy chain deposition disease evidences the relevance of proteasome inhibitor therapy.....	61
---	----

Résultats préliminaires et Perspectives

1. Centres germinatifs et plasmocytes : analyse des plasmocytes dans ces structures	65
2. Etude des éléments minima requis pour la CSR.....	70
3. Modélisation des Maladies de Dépôts d'Ig Monoclonales (MIDD) chez la souris	73
3.1 Syndrome de Randall de type HCDD	74
3.2 Syndrome de Randall de type LCDD.....	76
3.3 Syndrome de Fanconi	78
3.4 Amylose AL	79
4. Stress UPR et traitements aux inhibiteurs du protéasome	84
Conclusion	86

Annexes

Annexe 1 : B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation	88
Annexe 2 : Disruption of Lysosomal Dynamics and Function Entails Monoclonal Light Chain Renal Fanconi Syndrome	89
Annexe 3 : Reassessment of immunoglobulin joining-chain expression during B cell development: an early marker of plasma cell differentiation in germinal centers	90
Références Bibliographiques	91

Rappels Bibliographiques

Introduction générale

Le système immunitaire et la défense de l'organisme passionne depuis des siècles nombre de scientifiques. Dès les années 400 avant Jésus Christ, l'historien Thucydide, suite à une épidémie de fièvre typhoïde, avait constaté que seules les personnes ayant déjà contractées et survécues à une telle infection pouvait s'occuper des malades. Sur le même principe en 6000 avant Jésus Christ, en Chine, des traces de transmissions volontaires de varioles en vue d'immunisation ont été retrouvées. Ce principe de variolisation fut repris et étendu à toute l'Europe durant le XVIIIe siècle avant que les travaux d'Edward Jenner, considérés comme le fondateur de l'immunologie, signe la naissance de la vaccination. Edward Jenner, médecin de campagne, avait constaté que les fermiers en contact avec la variole de la vache (vaccine), inoffensive pour l'homme, étaient épargnés lors d'épidémies de varioles. Suite à ces observations en 1796, E. Jenner a prélevé du pus contaminé par la vaccine et l'a injecté à un jeune garçon qui a été guérit de la maladie. Le virus de la vaccine est ainsi à l'origine des noms "vaccination" et "vaccin".

Le XIXe siècle fut un véritable tournant pour la vaccination, grâce à de grands noms de l'immunologie tels que Robert Koch, Louis Pasteur, Albert Calmette et Camille Guérin. Suite à la découverte de la toxine diphtérique par Emile Roux et Alexandre Yersin, Emil Adolf von Behring et Shibasaburo Kitasato, mettent en évidence dans le sérum de patients ayant survécus à la diphtérie une "anti-toxine". Les anticorps sont ainsi découverts et Emil Adolf von Behring est récompensé par l'obtention du prix Nobel de physiologie ou médecine en 1901 (Immunologie Fondamentale, Homborg JC, De Boeck Secundair, 1999).

Des avancées majeures ont ensuite eu lieu à partir des années 1960, considérées comme le début de l'ère de l'immunologie moderne, en particulier grâce aux travaux de Sir Mac Burnet et sa théorie de la sélection clonale ouvrant la voie au modèle de la reconnaissance du "soi" ou du "non-soi". Ce modèle a par la suite été approfondi et remis en question grâce aux travaux respectifs de Charles Janeway et sa théorie de non soi infectieux (Janeway, 1992) et Polly Matzinger et sa "théorie du danger" (Matzinger, 1994). Dans tous les cas, le système immunitaire durant son développement semble à même d'acquérir la capacité à tolérer les antigènes du soi « naturel » et à reconnaître ceux du non-soi ou du « soi anormal » afin de les éliminer. Pour cela, la réponse immunitaire peut être divisée en deux grandes parties : l'immunité innée et l'immunité acquise. La première fait appel à des mécanismes peu spécifiques, sans mémoires, mais capables de détecter les dangers ou anomalies et de déclencher l'immunité acquise. Cette dernière, en revanche, sera spécifique du type d'infection grâce aux lymphocytes T et B, et gardera une mémoire des antigènes impliqués dans l'agression. Parmi cette

immunité acquise, la lignée lymphocytaire B, objet de mon travail, est à l'origine de la réponse humorale, qui aboutit à la sécrétion d'anticorps par les plasmocytes. Ces anticorps en se liant aux antigènes permettent leur neutralisation et leur élimination. Cette sécrétion d'anticorps n'est possible que suite à la sélection et l'activation par l'antigène des lymphocytes B possédant un récepteur de surface (ou BCR pour « *B Cell Receptor* »), spécifique. Le BCR correspond à la forme membranaire de l'anticorps ou immunoglobuline (Ig) de surface. Cette activation par l'antigène va en outre provoquer la prolifération puis la différenciation plasmocytaire du clone cellulaire B mais va aussi, dans certaines conditions, conduire à de nombreux remaniements géniques permettant à ce BCR de « s'adapter » à l'antigène afin de produire, *in fine*, les anticorps les plus efficaces contre le pathogène. Parmi ces remaniements géniques, l'hypermutation somatique (ou SHM pour « *Somatic HyperMutation* ») va aboutir à une augmentation de l'affinité de l'anticorps pour sa cible. La recombinaison de classe (ou CSR pour « *Class Switch Recombination* »), quant à elle, va conduire au changement de classe de l'anticorps (IgM vers IgG, IgA ou IgE) offrant des capacités effectrices mieux adaptées à la réponse contre le pathogène. Ces remaniements, nécessitant une stricte régulation afin ne pas mettre en danger l'intégrité du génome, feront l'objet d'une partie du présent travail.

Ces modifications ont lieu dans des structures cellulaires particulières, les centres germinatifs, d'où vont sortir les cellules B mémoires et les plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Certaines situations pathologiques peuvent alors causer l'apparition de maladies auto-immunes par production d'anticorps auto-réactifs mais aussi des proliférations anormales et incontrôlées d'un clone plasmocytaire avec souvent de graves conséquences. Parmi elles, la production en excès d'immunoglobulines dites monoclonales peut être à l'origine de pathologies diverses, caractérisées par des dépôts tissulaires d'anticorps ou, plus souvent, de fragments d'anticorps anormaux. Cet ensemble de pathologies forment les maladies de dépôts d'immunoglobulines monoclonales, qui compliquent fortement des proliférations plasmocytaires souvent bénignes. Une partie importante du présent manuscrit portera sur l'étude de ces pathologies.

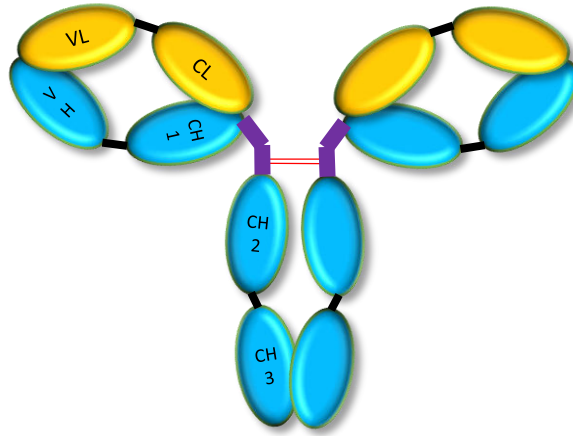


Figure 1 : **Structure globale d'une Immunoglobuline.** L'immunoglobuline schématisée est une IgG. Elle est constituée de deux chaînes lourdes, représentées en bleu, composées d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3). Les domaines CH1 et CH2 sont séparés par la région charnière (en violet) qui permettra l'association des deux chaînes lourdes ensemble grâce à des ponts disulfures (en rouge). A ces chaînes lourdes sont associées deux chaînes légères, représentées en jaune, composées d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant (CL).

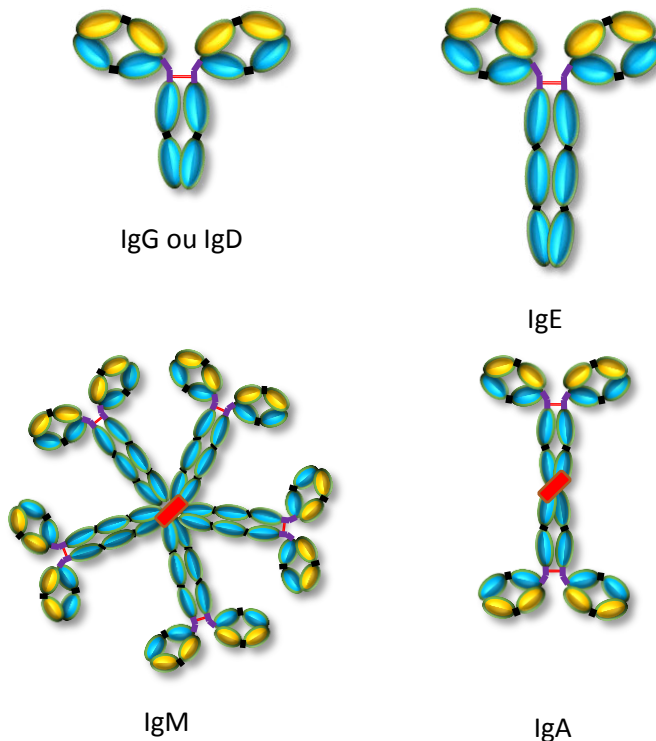


Figure 2 : **Les différentes classes d'Immunoglobulines.** Représentation schématique de la composition des différents isotypes d'Ig. Brièvement, les chaînes légères de tous les isotypes sont toujours constituées d'un domaine variable et d'un domaine constant. Les chaînes lourdes peuvent varier selon l'isotype, ainsi on retrouvera constamment un domaine variable, associé à trois domaines constants pour les IgG, IgD et IgA ou quatre domaines constants pour les IgE et IgM. Les IgM ont la capacité de former des pentamères, notamment grâce à la chaîne J (schématisée en rouge). De même les IgA sont retrouvées sous formes dimériques grâce à la chaîne J et ce principalement dans les muqueuses.

Chapitre 1. Les immunoglobulines, du gène à la protéine

1.1 Généralités sur les immunoglobulines

L'immunoglobuline (Ig) forme l'identité de la lignée lymphocytaire B. Sa forme membranaire constitue, avec ses co-récepteurs, le BCR (*B cell Receptor*), dont la signalisation est nécessaire à la survie et la sélection des cellules B, tandis que sa forme sécrétée, produite par les plasmocytes, va constituer les effecteurs de l'immunité humorale : les anticorps. Quelle que soit leur forme, les Ig sont toujours formées de deux chaînes lourdes identiques (HC pour *Heavy Chain*) et deux chaînes légères identiques (LC pour *Light Chain*), associées entre elles par des ponts disulfures. L'ensemble forme un hétérodimère d'environ 150kDa (**Figure 1**) (Edelman, 1970; Porter, 1973).

Il existe deux types de chaînes légères, kappa (κ) et lambda (λ), et cinq classes de chaînes lourdes: *mu* (μ), *delta* (δ), *gamma* (γ), *alpha* (α) et *epsilon* (ϵ), donnant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgA et IgE (**Figure 2**). Les IgM sont les premières produites, majoritairement sous forme pentamérique, grâce à la chaîne J qui permet l'oligomérisation des sous unités et dont nous parlerons dans un prochain chapitre. La structure pentamérique de l'IgM permet d'agglutiner les micro-organismes, mais également de recruter le complément qui induira la lyse de ces derniers. Les IgD sont retrouvées à bas niveau dans le sérum et sembleraient impliquées dans les réponses anti-bactériennes bien que leur rôle ne soit pas encore clairement défini. Les IgA sont sécrétées sous forme monomérique ou dimérique associées par la chaîne J, et jouent un rôle essentiel dans l'immunité mucoale. Les IgE, présentes en quantité infime, sont surtout impliquées dans la défense anti-parasitaire et sont également connues pour leur rôle dans la réponse allergique. Enfin, la dernière classe, les IgG, constituent 75% des Ig sériques, et est sous divisée en quatre sous-classes IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 chez la souris (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 chez l'homme) qui se distinguent par leurs fonctions : pour les réponses anti-virales les IgG1, IgG2a ou IgG2b seront principalement retrouvées, pour les réponses anti-parasitaires les IgG1 et pour les réponses anti-bactériennes les IgG3 (Vidarsson et al., 2014).

1.2 Structure des immunoglobulines

Chaque chaîne légère est composée d'un domaine constant (C) et d'un domaine variable (V). Les chaînes lourdes possèdent un domaine variable et une région constante composée de trois ou quatre domaines constants, appelés CH1, CH2, CH3 et, le cas échéant, CH4. A l'exception des IgM et IgE, les domaines CH1 et CH2 sont séparés par une région plus ou moins longue appelée région charnière (H

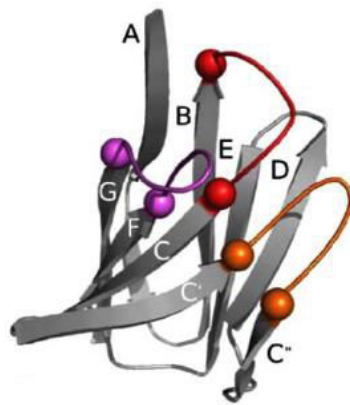


Figure 3 : **Structure d'un domaine Immunoglobuline (Ig)**. Les domaines d'Ig sont constitués de deux types de régions, 8 régions dites « charpentes » (ou FR pour *Framework Regions*) et 3 régions hypervariables (Régions déterminant la complémentarité ou CDR pour *Complementary Determining Region*). Les domaines FR sont constitués de feuillets beta-plissés anti-parallèles reliés par les boucles d'acides aminés contenant les régions CDR. L'association des domaines VH et VL permet le rapprochement des 6 CDR, nécessaires pour former le site de reconnaissance de l'antigène (d'après Kaas et Lefranc 2007).

pour « *Hinge* »), qui permet à la fois de conférer la flexibilité des Ig et la liaison des deux chaînes lourdes, grâce à des ponts disulfures.

Ces domaines, initialement caractérisés chez les Ig mais présents dans de nombreuses protéines, ont été nommés "domaines Ig". Chaque domaine compte environ 110 acides aminés organisés en structure dite en "tonneau bêta", composé de deux feuillets β -plissés de sept à neuf brins bêta anti-parallèles. Chaque domaine Ig présente un rôle particulier, le domaine CH3 par exemple participe à la stabilisation de la liaison des chaînes lourdes entre elles grâce à des interactions entre les domaines CH3. Le CH2 porteur d'au moins une N-glycosylation permet l'interaction avec les récepteurs Fc, conférant donc les fonctions effectrices de l'anticorps, mais ne participe que peu aux interactions entre chaînes lourdes. Le CH1 quand à lui interagit avec le domaine constant des chaînes légères. Enfin, l'architecture des domaines variables est maintenue grâce à quatre régions très conservées, les régions charpentes ou "framework regions" (FR1, FR2, FR3, FR4). Les trois régions qui séparent ces FR sont, quant à elles, hypervariables, spatialement proches et forment le paratope, site de reconnaissance à l'antigène. Il s'agit des régions déterminantes de la complémentarité à l'antigène, CDR1, CDR2, CDR3 (pour *Complementarity Determining Region*) (**Figure 3**) (Schroeder and Cavacini, 2010).

1.3 Les loci des gènes d'immunoglobulines : organisation et réarrangements

Nous verrons conjointement dans cette partie l'organisation générale des loci des chaînes lourdes et légères, chez l'homme et la souris. Leur organisation est similaire, trois loci sur trois chromosomes pour les deux espèces et des mécanismes de réarrangements similaires. De ce fait la souris est un excellent modèle animal pour l'étude des immunoglobulines (Jhunjunwala et al., 2009). L'ensemble des informations sur l'organisation des gènes d'Ig sont issues de la base IMGT (Lefranc et al., 2009).

Nous verrons dans cette partie uniquement la génération du répertoire primaire, qui a lieu dans la moelle osseuse.

1.3.1 Présentation du locus des chaînes lourdes

Les gènes codant pour les chaînes lourdes d'Ig sont situés sur le chromosome 14 pour l'homme et le chromosome 12 pour la souris. Dans les deux espèces, le locus IgH peut être divisé en quatre segments qui codent, du télomère vers le centromère, pour les segments variables (VH), les segments de diversité (DH), spécifiques à la chaîne lourde, les segments de jonctions (JH) et enfin les régions constantes (CH). Dès 1975, la cartographie des gènes codant les Ig humaines a débuté notamment grâce à l'équipe de Susumu Tonegawa (Tonegawa et al., 1978). Sur le locus humain, 123 à 129 gènes VH sont retrouvés selon les haplotypes (dont 38 à 44 fonctionnels et appartenant à 6 ou 7 sous-



Figure 4 : **Représentation du locus murin des chaînes lourdes d'Ig dans leur configuration germinale.** Représentation des différents gènes codant pour les segments V pour Variable (en bleu), D pour les segments de Diversité (en vert) et J pour les segments de Jonction (en gris). En orange les gènes codant pour les différents types de domaines constants des Ig.

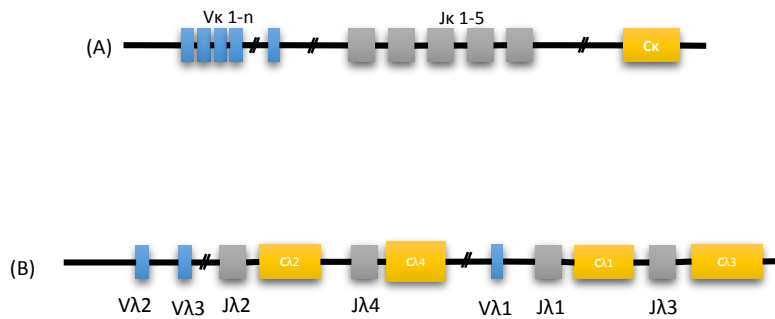


Figure 5 : **Représentation des loci murin des chaînes légères d'Ig dans leurs configurations germinales.** (A) locus kappa (B) locus lambda. Représentation des différents gènes codant pour les segments V pour Variable (en bleu) et J pour les segments de Jonction (en gris). En orange les gènes codant pour les domaines constants des chaînes légères d'Ig.

groupes), 27 segments DH (23 fonctionnels, répartis en 7 sous-groupes), 9 gènes JH (6 fonctionnels) et 9 CH fonctionnels. Le locus murin est composé de 216 segments VH, dont 181 fonctionnels regroupés en 15 familles, 21 segments DH fonctionnels regroupés en 4 familles et 4 segments JH. La partie constante des chaînes lourdes murines est codée quant à elle par huit gènes codant les régions constantes des huit classes et sous-classes d'Ig précédemment décrites (**Figure 4**).

1.3.2 Présentation du locus des chaînes légères

1.3.2.1 Locus kappa

Les gènes codant les chaînes légères kappa (κ) sont situés sur le chromosome 2 chez l'homme et sur le chromosome 6 chez la souris. Chez l'homme ce locus est constitué de 76 gènes $V\kappa$ (dont 34 à 38 fonctionnels, classés en 5 sous-groupes d'homologie). Les gènes $J\kappa$ sont au nombre de 5, suivi d'un seul gène codant pour le domaine constant. Chez la souris, ce locus qui compose le récepteur de surface d'environ 95% des cellules B, est constitué de 161 segments $V\kappa$ (dont 91 à 92 sont fonctionnels et répartis en 20 sous-groupes d'homologies). Ces segments $V\kappa$ peuvent être positionnés dans le même sens ou en sens inverse des 5 segments géniques $J\kappa$ (dont 4 fonctionnels) et du seul gène codant la partie constante $C\kappa$ (**Figure 5A**).

1.3.2.2 Locus lambda

Les gènes codant pour les chaînes légères lambda (λ) se trouvent sur le chromosome 22 chez l'homme et sur le chromosome 16 chez la souris. Le locus lambda humain comporte 73 à 74 gènes $V\lambda$ (dont 29 à 30 sont fonctionnels, classés en 10 sous-groupes) et de 7 à 11 gènes $C\lambda$ (4 fonctionnels) qui donnent lieu aux 4 isotypes de chaînes λ , chacun précédés d'un gène $J\lambda$. Les locus κ et λ humain contiennent donc un nombre comparable de segments variables, pourtant les chaînes légères sont retrouvées dans un rapport 1/3, en faveur des chaînes légères κ (Lefranc et al., 1999). Chez la souris le locus $Ig\lambda$ est très peu représenté et formé par 4 familles composées chacune d'un $J\lambda$ et d'un $C\lambda$, numérotées de 1 à 4 dans les deux cas. Cependant les $J\lambda 4$ et $C\lambda 4$ sont défectifs. Les segments $V\lambda$ ne sont que trois, avec une association préférentielle du $V\lambda 1$ sur les $J\lambda 1$ et $J\lambda 3$ et des segments $V\lambda 2$ et $V\lambda 3$ sur le $J\lambda 2$. Ainsi très peu de diversité est induite sur le locus $Ig\lambda$ murin, ce qui explique probablement la sous-représentation de lymphocytes B exprimant une chaîne légère λ (**Figure 5B**) (Lefranc, 2005).

1.3.3 Génération du répertoire primaire ou pré-immun des immunoglobulines : les réarrangements V(D)J et leur régulation

Les différents loci d'immunoglobulines décrits précédemment ne sont pas transcrits tels quels. Ils nécessitent des réarrangements géniques pour donner lieu à des Ig fonctionnelles. Ces réarrangements vont permettre d'associer un segment V, à un D et un J (V et J pour les chaînes légères) afin de former le domaine variable final. Ces événements suivent le "modèle ordonné" décrit par Alt

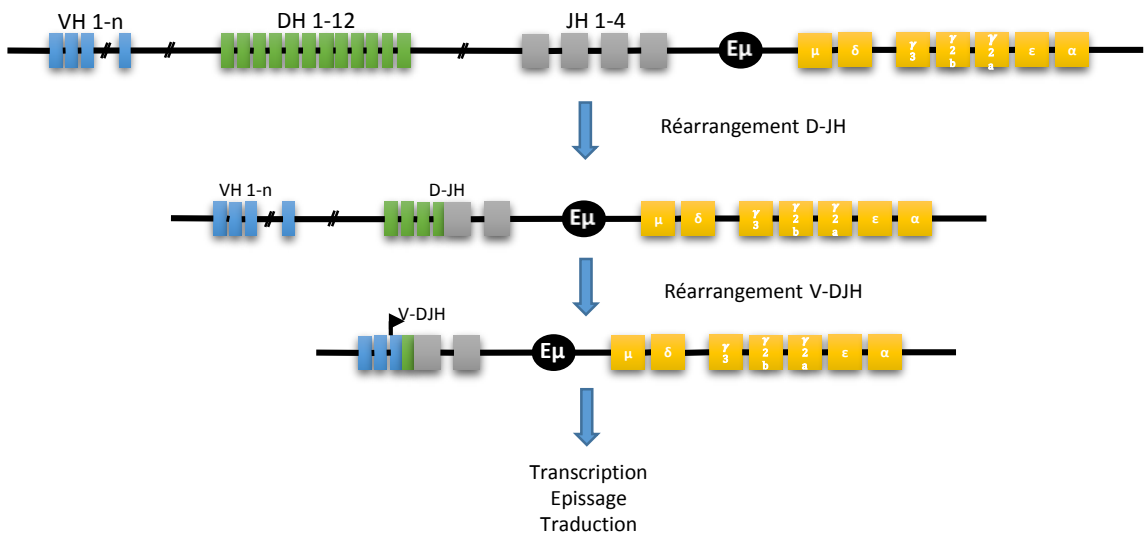


Figure 6 : **Modèle ordonné des réarrangements au locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines.** Représentation schématique du modèle ordonné de réarrangement des gènes d'Ig, décrit par Alt en 1984, ici présenté au niveau du locus des chaînes lourdes d'Ig. Les réarrangements D-JH précèdent les réarrangements V-DJH. Le locus sera ensuite transcrit et un épissage permettra l'expression d'un domaine constant, pour débiter il s'agira du domaine constant μ . Le principe au niveau des loci des chaînes légères d'Ig est similaire, à l'exception de l'absence de domaine D.

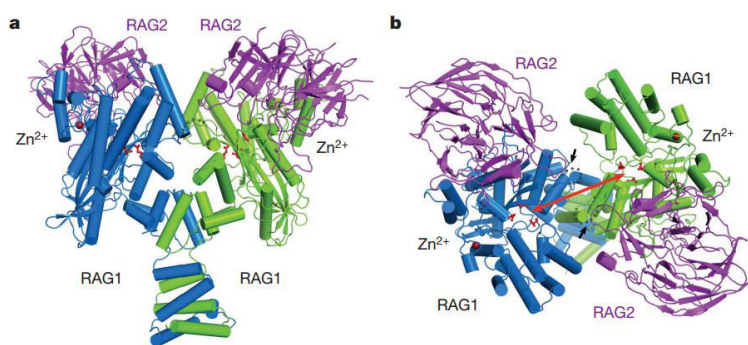


Figure 7 : **Structure cristalline des enzymes Rag1-Rag2.** (a) vu de face (b) vu de dessus. Les éléments en bleu et vert correspondent aux deux chaînes Rag1 et les deux sous-unités Rag2 sont représentées en mauve (Kim et al 2015).

et Baltimore en 1984, qui dit que les réarrangements au niveau du locus des chaînes lourdes se font avant ceux des chaînes légères. Ce modèle est également dit séquentiel, car les réarrangements D_H vers J_H se feront toujours avant les réarrangements V_H vers DJ_H (Alt et al., 1984). Ces réarrangements vont permettre de générer de la diversité, grâce à un grand nombre de combinaisons possibles des différents segments V(D)J, mais aussi grâce à différents mécanismes moléculaires qui introduisent par mutations ponctuelles, insertions et délétions de nucléotides un niveau supérieur de diversité au niveau des jonctions de recombinaison (**Figure 6**).

Ces réarrangements nécessitent deux grandes étapes : des cassures doubles brins de l'ADN (DSB pour *Double Strand Break*) et la réparation de ces cassures. Les DSB vont être générées par les enzymes Rag1 et Rag2 (*Recombination Activating Gene 1 et 2*) (**Figure 7**) (Kim et al., 2015; Oettinger et al., 1990). Ces cassures sont générées au niveau de séquences dite "RSS" (*Recombination Sequence Signal*), en 3' des segments V, de part et d'autre des segments D et en 5' des segments J (Stanhope-Baker et al., 1996). Les séquences RSS attaquées par les enzymes RAG suivent la règle de ciblage dite « 12/23 ». Cette dénomination découle de l'architecture des RSS constituées d'un heptamère palindromique (CACAGTG) et d'un nonamère riche en A (ACAAAAACC) séparés soit par 12 soit par 23 paires de bases (pb) (Schlissel, 2002; Tonegawa, 1983). Cette séparation de 12 ou 23 pb va guider les réarrangements, ces derniers ne pouvant se faire que d'un RSS12 avec un RSS23. Ainsi tous les segments V_H sont suivis d'un RSS23, les D_H sont encadrés par des RSS12 et les J_H précédés par des RSS23, ceci empêchant les réarrangements V-J au locus des chaînes lourdes (Early et al., 1980; Schatz and Swanson, 2011). Concernant les gènes des chaînes légères, les V sont suivis de RSS23 et les J précédés de RSS12 (Ramsden and Wu, 1991)

Rag1 va s'associer au niveau d'une RSS, Rag2 va interagir et maintenir le complexe Rag1-RSS puis capturer une deuxième RSS (Fugmann and Schatz, 2001; Swanson et al., 2004). Les enzymes Rag vont générer les DSB au niveau des deux séquences RSS et les extrémités clivées vont être maintenues au sein de complexes synaptiques qui permettront par la suite la réparation par la machinerie du système de réparation des extrémités non homologues (NHEJ pour *Non Homologous End Joining*), qui sera décrit dans le chapitre 2. Lors des réparations, de courtes délétions ou de petites insertions de séquences palindromiques nommées "Nucléotides P" (P pour palindromique) vont apparaître et ainsi induire de la diversité (Ma et al., 2002). Enfin, un niveau supplémentaire de diversité va être généré au locus IgH lors de la dernière étape de ce mécanisme, du fait de l'intervention de la TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*), qui va ajouter des nucléotides aux extrémités 3', appelés "Nucléotides N" (N pour *Non-germline nucleotide*) (**Figure 8**) (Bassing et al., 2002; Desiderio et al., 1984).

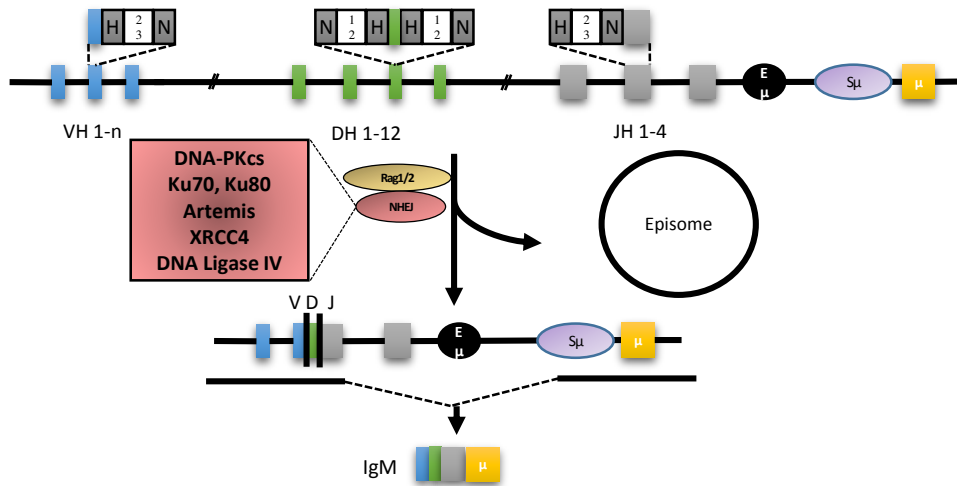


Figure 8 : **Schématisation des réarrangements VDJ au locus IgH au niveau moléculaire.** (Haut) Locus IgH dans sa configuration germinale. Les segments VH sont encadrés de régions palindromiques héptamériques (H) (CACAGTG) ou nonamériques (N) (ACAAAACC) séparées de 23 pb. De même les segments DH sont encadrés de régions N et H séparées de 12pb et les régions JH de régions H et N séparées comme les régions VH par 23pb. Les régions H et N forment les séquences signal de recombinaison (RSS). (Milieu) Les éléments moléculaires permettant les recombinaisons VDJ et l'excision de l'épisme, sont indiqués dans l'encadré. (Bas) Le locus IgH à l'issue des réarrangements VDH, les barres noires séparant les domaines V, D et J symbolisent les nucléotides P et N qui rajoutent de la diversité. La dernière partie de cette figure représente l'épissage du domaine VDJ, sur le domaine constant C μ , permettant la production d'une IgM fonctionnelle, une fois associée à ces chaînes légères (D'après Chaudhuri & Alt 2004).

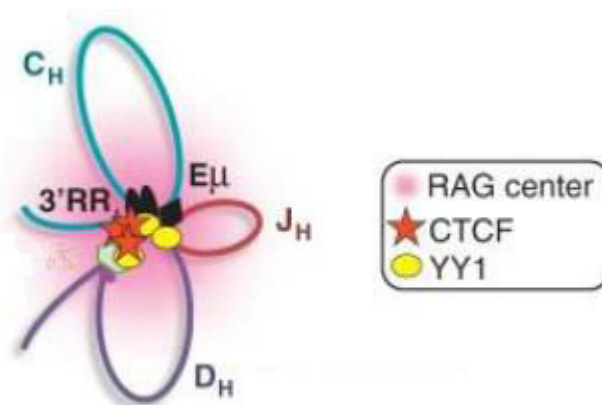


Figure 9 : **Représentation schématique de l'établissement des « boucles » au locus IgH.** Coopération entre la 3'RR, E μ et les segments DH et JH, avec la collaboration des éléments CTCF et YY1 (d'après Chaumeil J and Skok JA, 2012).

Ces réarrangements VDJ sont des évènements hautement contrôlés par de nombreux éléments de régulation. Tout d'abord, la transcription des loci d'Ig se fait séquentiellement, respectant la description du modèle ordonné. Ainsi, au locus IgH, les premiers transcrits germinaux D_H non-codants sont détectés avant les réarrangements D-J, de façon à rendre ce locus accessible au complexe Rag1/Rag2 (Bolland et al., 2007). De la même façon, une fois le réarrangement DJ_H effectué, des transcrits germinaux apparaissent au niveau des régions V_H pour permettre d'augmenter leur accessibilité à la machinerie de recombinaison (Stubington and Corcoran, 2013). La régulation de la transcription passe également par des modifications épigénétiques, traduisant l'activité ou non des différents loci. Ainsi par exemple, l'acétylation séquentielle des histones durant les réarrangements VDJ permettra les réarrangements D-J_H puis V-DJ_H (Chowdhury and Sen, 2004). Des marques de méthylation à proximité des séquences RSS sont également associées à l'initiation de la transcription, permettant une interaction entre les recombinases et l'ADN mais aussi leur activité enzymatique (Liu et al., 2007; Matthews et al., 2007; Ramon-Maiques et al., 2007; Shimazaki and Lieber, 2014). Outre l'accessibilité aux loci permise par la transcription et les modifications épigénétiques, un des pré-requis aux réarrangements va être l'établissement de boucles qui vont permettre la mise en contact des différents segments à recombinaison donnant lieu à une image du locus dite "en rosette" (Jhunjhunwala et al., 2009). Plusieurs facteurs sont essentiels pour la mise en place des boucles, en particulier CTCF (*CCCTC binding factor*), YY1 (*Yin Yang 1*) et Pax5 (Chaumeil and Skok, 2012). De nombreux sites de fixations de ces facteurs, accessibles selon l'état des marques épigénétiques, sont retrouvés le long des loci d'Ig. Ces différents facteurs et particulièrement CTCF en se liant aux cohésines, vont réguler la réorganisation et la contraction des loci d'Ig. Cette contraction/réorganisation permettra le rapprochement des différents segments géniques (en particulier les V distaux) et facilitera ainsi les réarrangements (**Figure 9**) (Donohoe et al., 2007; Ebert et al., 2011; Fuxa et al., 2004; Nakahashi et al., 2013; Seitan et al., 2012).

Enfin la position du locus dans le noyau va être déterminante pour ces évènements. Concernant le locus IgH, il va migrer de son emplacement par défaut en périphérie, vers le centre du noyau, ce qui va faciliter les réarrangements V_H-DJ_H proximaux (Kosak et al., 2002; Roldan et al., 2005; Sayegh et al., 2005).

1.4 Transcription des immunoglobulines

Comme de nombreux autres gènes, la transcription des Ig est contrôlée par des facteurs qualifiés de « *trans* » (*trans acting factors*) qui se fixeront sur des séquences nucléotidiques « *cis*-régulatrices ». Ces éléments *cis*-régulateurs sont : les promoteurs des gènes V, les activateurs transcriptionnels (ou *enhancers*), les atténuateurs (*silencers*) et les régions d'ancrage à la matrice (MAR : *Matrix*

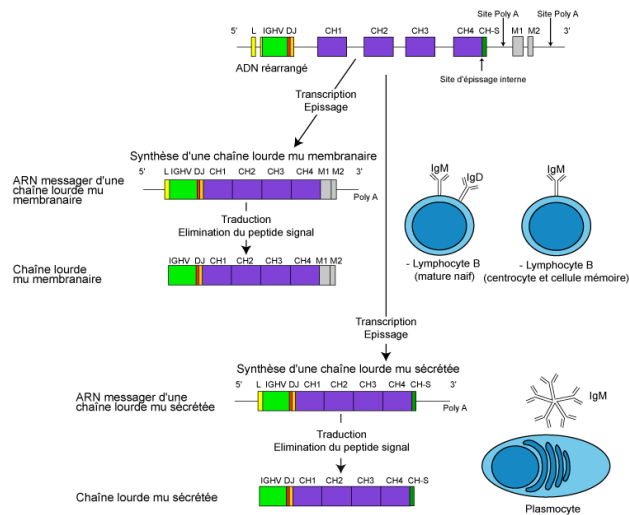


Figure 10 : **Epissage permettant la synthèse d'une chaîne lourde membranaire ou sécrétée.** Suite à l'épissage du pré-ARNm permettant l'expression d'une chaîne lourde d'Ig, celle-ci sera soit exprimée à la membrane des lymphocytes B (milieu), les segments transmembranaires étant conservés, soit sécrétée par les plasmocytes (bas) les segments transmembranaires étant excisés (d'après le site web de l'IMGT).

Association Region). La majorité des facteurs de transcription se fixant sur ces séquences ne sont pas spécifiques de la lignée cellulaire B, mais l'action concertée de plusieurs d'entre eux s'avère B-spécifique (Pinaud et al., 2011).

Les promoteurs des gènes V ont une activité intrinsèque faible, juste suffisante à induire l'accessibilité du locus. Cependant, après réarrangement du domaine V, le rapprochement du promoteur des autres activateurs transcriptionnels des loci, permet une augmentation drastique de son activité. L'ensemble promoteur/*enhancers* donne aussi la spécificité d'activité dans la lignée B et permet de réguler tout au long du développement B la force de transcription. Ces *enhancers* ont d'abord été identifiés suite à des délétions au sein de l'intron qui sépare les gènes J et C, entraînant un effondrement de la transcription et des taux de réarrangement V(D)J (Serwe et Sablitzky 1993, Chen 1993, Xu 1996, Sakai 1999 x2). De nombreux autres *enhancers/silencers* ont par la suite été découverts tout au long des loci d'Ig. Notre laboratoire a historiquement contribué à l'étude des *enhancers* du locus IgH révélant une complexité non soupçonnée lors de la découverte des premiers éléments régulateurs. D'abord considéré comme essentiel à toutes les étapes du développement B, le rôle de l'enhancer intronique $E\mu$, composé du « core activateur » ($cE\mu$) et des régions MAR qui l'entourent, apparaît aujourd'hui comme non indispensable aux phénomènes de CSR/SHM et son absence peut être partiellement compensée par d'autres *enhancers* du locus lors des réarrangements (Perlot et al., 2005). L'élément qui apparaît essentiel au contrôle de l'expression des chaînes lourdes est la « 3'RR » (*3' Regulatory Region*). Composée de quatre régions sensibles à la DNaseI (HS3a, HS1/2, HS3b et HS4) individuellement compensables entre elles, la 3'RR est active du stade proB aux plasmocytes (Vincent-Fabert et al., 2010a). Si son absence n'affecte pas les réarrangements primaires (Rouaud et al., 2012), elle abolit tous les événements de maturation secondaire, SHM et CSR (Pinaud et al., 2001, 2011; Rouaud et al., 2013; Vincent-Fabert et al., 2010b). En fait, son absence provoque une diminution globale de la transcription du locus IgH indispensable aux événements de recombinaison (comme nous le verrons dans le chapitre 2). De même, sa présence est requise pour permettre l'augmentation de transcription des gènes d'Ig lors de la différenciation plasmocytaire (Pinaud et al., 2011; Vincent-Fabert et al., 2010b).

1.5 Régulation post traductionnelle et sécrétion d'immunoglobulines

Les deux formes d'Ig existantes, membranaires et sécrétées sont issues des mêmes séquences d'ADN. C'est la nature de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde qui va déterminer le devenir, membranaire ou sécrété de l'Ig, grâce à un épissage alternatif du transcrit primaire et à la sélection du site de polyadénylation (**Figure 10**) (Danner and Leder, 1985).

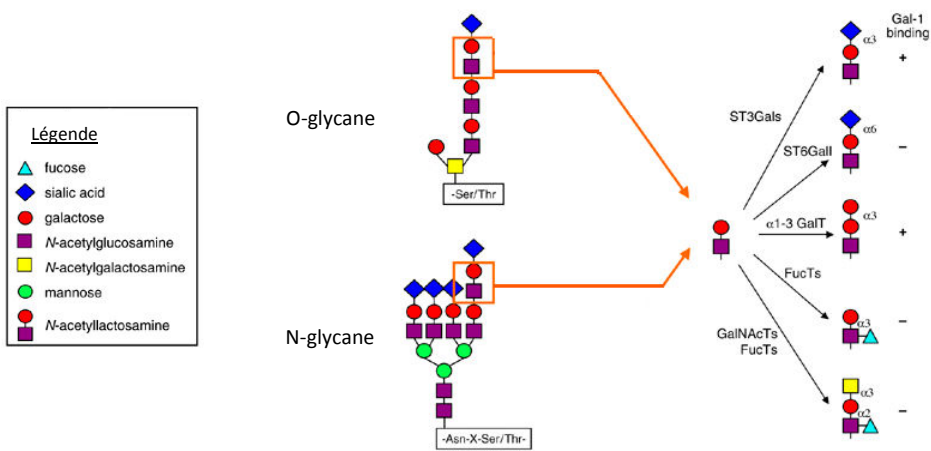


Figure 11 : **Représentation schématique de N et O glycans.** Les O-glycans sont synthétisés à partir de sérine ou thréonine. les N-glycans, riches en mannoses, sont eux synthétisés sur des motifs Asn-X-Ser/Thr (Asn = Asparagine, Ser = Sérine, Thr = Thréonine, X un acide aminé quelconque) (d'après Earl LA and Baum LG, 2008).

Que l'Ig soit sécrétée ou membranaire, l'association des chaînes lourdes et légères, le repliement de l'Ig et les diverses modifications post traductionnelles seront similaires.

1.5.1 Glycosylation des immunoglobulines

Les Ig sont des glycoprotéines. La glycosylation des Ig participe à l'assemblage intracellulaire, augmente la stabilité sérique de la protéine et joue un rôle essentiel dans les fonctions effectrices de l'anticorps. De ce fait la glycosylation des Ig fait l'objet d'une attention toute particulière pour les anticorps thérapeutiques (Kaneko et al., 2006; Monnet et al., 2014; Shinkawa et al., 2003; Sibénil et al., 2006).

Les N-glycosylations se font sur les résidus asparagine (Asn ou N) lorsque l'enzyme permettant la glycosylation reconnaît un motif NXS/T. D'une manière générale, les domaines CH2 sont glycosylés et les chaînes glucidiques occupent l'espace entre les deux domaines qui se trouvent ainsi éloignés l'un de l'autre. La N-glycosylation sur l'Asn297 des IgG, par exemple, joue un rôle critique sur la stabilité des protéines et permet de maintenir les deux chaînes lourdes dans une conformation dite "ouverte" qui permet une interaction avec les récepteurs Fc γ (Anthony and Ravetch, 2010). Les O-glycosylations se font sur des résidus sérine et thréonine, mais aucun motif n'a été identifié, elles restent donc difficiles à prévoir et peuvent varier d'une Ig à l'autre, y compris au sein d'un même clone. Ce second type de glycosylation est surtout retrouvé au niveau de la région charnière des chaînes lourdes IgD ou IgA1 (**Figure 11**) (Xue et al., 2013).

1.5.2 Assemblage et transport des immunoglobulines

Les Ig sont des hétéro-dimères composés de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères dont l'assemblage est hautement régulé par de nombreuses protéines intracellulaires. La structure et la nature des acides aminés qui composent les Ig contribuent à l'établissement de leur architecture typique. Deux acides aminés sont notamment essentiels pour cela : les prolines et les cystéines. Les prolines, vont permettre de positionner correctement les feuillets β de manière à avoir la structure typique de tonneau β (Brandts et al., 1977). Les prolines permettent aussi de resserrer les domaines entre eux et rendent ainsi les Ig plus résistantes à la protéolyse. En organisant le positionnement des feuillets β des domaines d'Ig, elles contribuent donc à limiter leur agrégation (Steward et al., 2002).

Les cystéines vont instaurer les ponts disulfures au sein et entre les différents domaines Ig (Bergman and Kuehl, 1979; Huber et al., 1976). Ces ponts disulfures, cruciaux pour la stabilité des Ig, sont établis par la PDI (*protein disulfide isomerases*) au sein du réticulum endoplasmique (RE) (Goto and Hamaguchi, 1981; Meunier et al., 2002). Les ponts disulfures doivent être établis rapidement car, il a été démontré au niveau des domaines constants des chaînes légères qu'ils permettaient l'accélération du repliement et donc l'inhibition de la voie de dégradation des protéines mal repliées (Feige et al.,

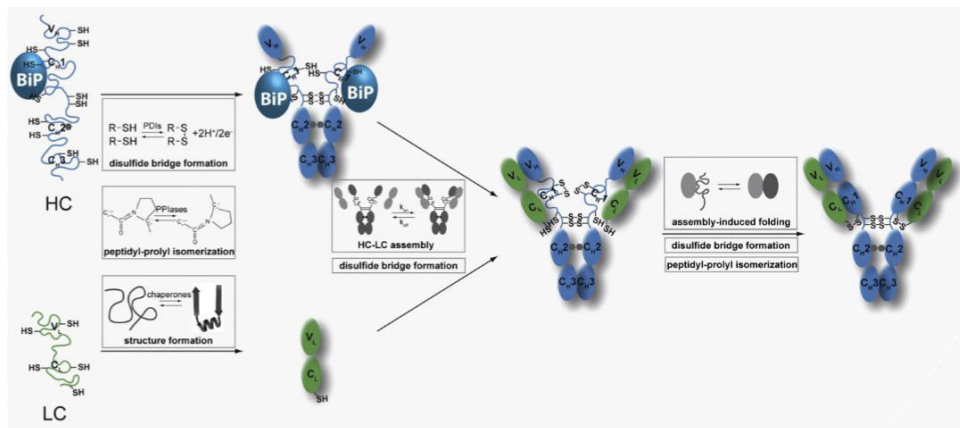


Figure 12 : **BiP et le repliement des immunoglobulines.** La protéine chaperonne BiP permet de stabiliser le domaine CH1 mal replié en absence de chaînes légères (LC). L'enzyme PDI permet la formation de ponts disulfures qui vont permettre l'assemblage de la BiP aux chaînes lourdes (HC). Enfin la chaîne légère prend la place de la BiP et induit dans le même temps le repliement correct du domaine CH1 (d'après Feige *et al.* 2014).

2007). La fenêtre de temps pour l'action de la PDI est étendue en présence d'une protéine chaperonne spécifique, la BiP (pour *Immunoglobulin Binding Protein*) car son association à la chaîne d'Ig en cours de repliement permet de prévenir une dégradation trop précoce (**Figure 12**) (Mayer et al., 2000).

La protéine BiP est LA protéine chaperonne des Ig, aussi appelée Grp78 (*glucose regulated protein-78*). L'appellation « *immunoglobulin binding protein* » vient du fait que, lors de son identification, cette protéine était liée à la chaîne lourde des Ig (Haas and Wabl, 1983). La protéine BiP possède des motifs KDEL caractéristiques des protéines résidentes du RE. Elle reconnaît préférentiellement les motifs heptamériques riches en résidus hydrophobes du type HyXH₂HyXH₂Hy dans lesquels Hy est un résidu hydrophobe et X un acide aminé quelconque (Knarr et al., 1995). C'est une chaperonne à activité ATPase (domaine N-terminal) capable de fixer stablement une protéine à replier via son domaine C-terminal. Le transfert des protéines à replier et l'activité ATPase de la BiP sont régulés par de nombreux partenaires tels que ERdj3 et ERdj4 (Marcinowski et al., 2011; Shen et al., 2002).

La BiP s'associe de façon transitoire aux différents domaines Ig à l'exception de l'interaction avec le CH1 qui est plus stable (Hendershot et al., 1987) et perdurera jusqu'à ce que les chaînes légères viennent remplacer la BiP sur le domaine CH1 (Hendershot, 1990). Une chaîne lourde en absence de chaînes légères ne peut ainsi pas être sécrétée puisque retenue dans le RE du fait de son interaction avec la BiP (Feige et al., 2010; Hendershot et al., 1987). Aussi, l'ensemble des cas de sécrétion de chaînes lourdes décrits à ce jour, chez l'homme ou dans des modèles murins, in vitro ou in vivo, présente une délétion a minima du CH1 (Aucouturier et al., 1993a; Cogné et al., 1988a; Hendershot et al., 1987; Khamlichi et al., 1995a; Moulin et al., 1999a; Zou et al., 2007).

Il est à noter que pour supporter la quantité massive d'Ig produite par les plasmocytes, la protéine chaperonne BiP, ainsi que les chaperonnes associées, sera très fortement produite dans cette lignée, en particulier grâce à l'activation de la voie UPR (*Unfolded Protein Response*) que nous détaillerons dans la partie consacrée aux plasmocytes (Chapitre 2, point 2.3).

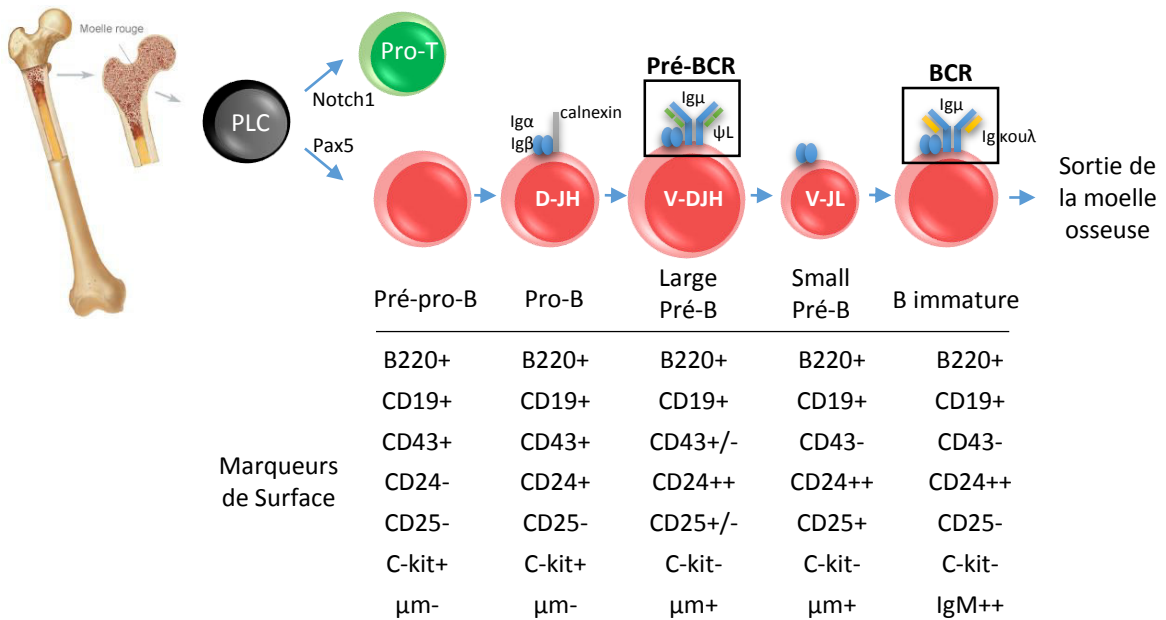


Figure 13 : **Développement indépendant de l'antigène.** Les principales étapes des réarrangements des gènes d'Ig sont représentées, ainsi que les marqueurs caractéristiques de chaque stade de l'ontogénèse B.

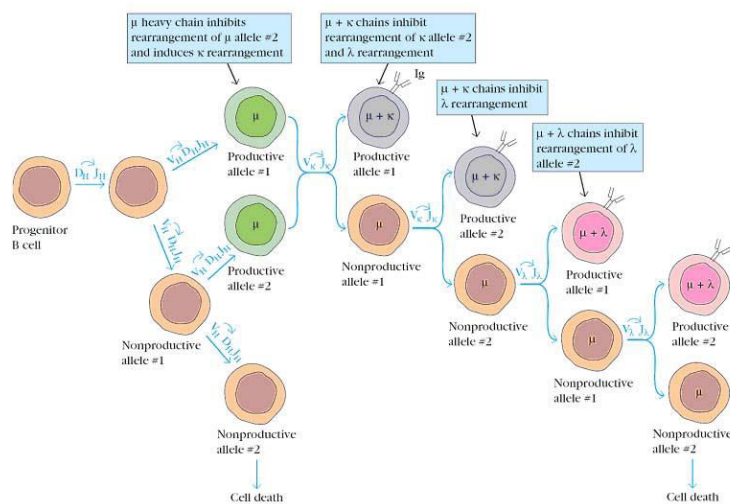


Figure 14 : **Modèle de réarrangement ordonné.** Durant le développement B l'établissement de l'Ig de membrane va se faire de manière séquentielle. Suite au réarrangement DH-JH, le réarrangement VH-DJH va avoir lieu sur un allèle, puis sur le second si le premier s'est avéré non productif. En cas de réarrangement non productif sur le second allèle, la cellule B sera vouée à l'apoptose. Dans le cas d'un réarrangement de chaîne lourde productif, les réarrangements VL-JL ont lieu, tout d'abord sur un allèle du locus kappa, puis comme précédemment sur le second allèle si le premier réarrangement est non productif. Dans le cas des chaînes légères si les deux allèles kappa donnent lieu à des réarrangements non productif, les locus lambda des chaînes légères sera alors sollicité, de manière séquentielle comme pour le locus kappa. Si aucuns réarrangements des chaînes légères n'aboutissent, la cellule B est alors amenée à mourir, puisqu'elle n'exprime pas d'Ig de surface complète. (d'après <http://biosiva.50webs.org/immunediversity.htm>)

Chapitre 2. Ontogénèse B et développement plasmocytaire

L'ontogénèse B peut être divisée en deux grandes parties, la phase indépendante de l'antigène, qui se déroule dans la moelle osseuse et la phase dépendante de l'antigène qui se déroule dans les organes lymphoïdes périphériques. La première phase va permettre de générer des lymphocytes B dits « naïfs » armés de BCR représentant l'ensemble du répertoire pré-immun. La seconde phase va voir ce répertoire pré-immun s'adapter à l'antigène suite à des étapes de maturation secondaire et aboutir à la génération de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité pour l'antigène.

2.1 Développement indépendant de l'antigène : l'établissement du BCR

L'entrée dans la lignée B à partir des progéniteurs lymphoïdes communs dépend, chez la souris, de l'IL7 (Interleukine 7) qui induit l'expression du facteur de transcription E2A. Celui-ci va à son tour induire l'expression de EBF (« *Early B cell Factor* »), le duo agissant de concert pour provoquer l'expression de gènes B spécifiques tels que Rag 1 et 2, mb1 et b29 qui codent pour les protéines de signalisation du BCR, ou encore CD19 et Pax5. Ils permettent aussi d'induire le début des réarrangements D-J via l'ouverture de la chromatine et donc l'accessibilité au locus. C'est cependant l'expression du facteur de transcription Pax5 qui va définitivement provoquer l'engagement et le maintien dans la lignée B (**Figure 13**) (Reth and Nielsen, 2014; Welinder et al., 2011). Pax5, une fois exprimé, va renforcer l'appartenance à la lignée B en induisant une boucle de régulation positive (Roessler et al., 2007).

Une fois l'engagement dans la lignée B clairement établi, la cellule va s'appliquer à élaborer son BCR. C'est durant le stade proB qu'ont lieu les réarrangements des gènes codant les chaînes lourdes d'Ig. Les réarrangements D-J_H ont lieu presque simultanément sur les deux allèles suivis des réarrangements V-DJ_H, qui eux se font de façon séquentielle sur un allèle, puis sur le second si le premier s'avère non productif (**Figure 14**). Cette exclusion allélique est permise par l'accessibilité et la démethylation de l'allèle actif, associée à une ségrégation nucléaire dans l'hétérochromatine de l'allèle inactif (Corcoran, 2005). Les réarrangements V-DJ séquentiels permettent à la cellule de n'exprimer qu'une unique chaîne lourde, assurant la monospécificité de l'anticorps produit par un clone B.

L'expression d'une chaîne lourde μ marque l'engagement dans le stade suivant du développement B, le stade Pré-B. En absence de chaîne légère, l'expression à la surface de la chaîne lourde est possible

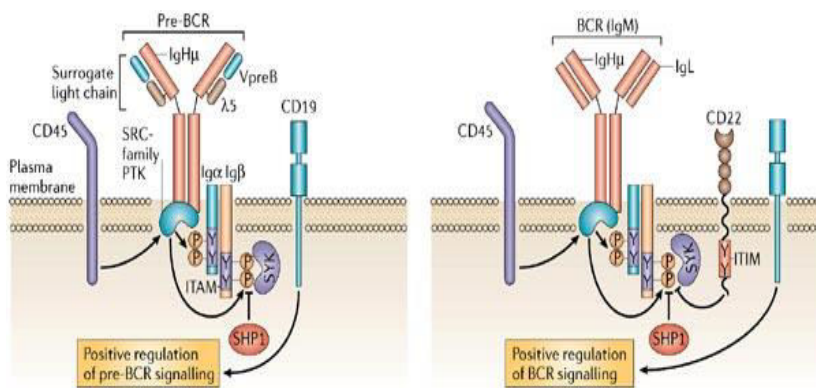
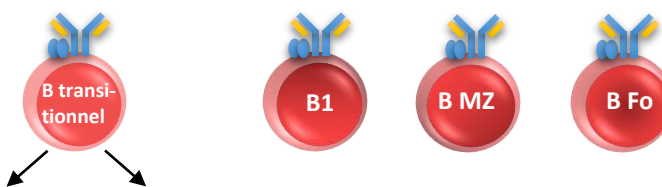


Figure 15 : **Représentation schématique des pré-BCR et BCR mature.** Les principales molécules composant ces structures sont représentées. (d'après Monroe JG *et al.*, 2006)

grâce à l'expression de la pseudo chaîne légère, formée de deux polypeptides associés de manière non covalente : le VpreB (1 et 2) mimant un domaine variable (VL) et le $\lambda 5$ (lambda-like chez l'homme) mimant un domaine constant (CL). L'assemblage de ces chaînes avec la chaîne lourde permet son transport à la surface qui associé aux hétérodimères CD79a/CD79b forme le récepteur pré-B ou pré-BCR (**Figure 15**) (Mårtensson et al., 2007). La présence d'un pré-BCR fonctionnel à la surface des cellules pré-B est un « *check-point* » incontournable du développement B. La signalisation induite par le pré-BCR permet dans un premier temps l'arrêt des réarrangements en réprimant l'expression des enzymes Rag, assurant le maintien de l'exclusion allélique (Vettermann and Schlissel, 2010). Le signal pré-BCR permet aussi la survie et l'expansion clonale des cellules dites « large pre-B ». Enfin, le pré-BCR exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre expression en inhibant la transcription des gènes codant les pseudos chaînes légères. Ainsi, suite à la prolifération, le pré-BCR, ne pouvant plus être exprimé, sera dilué et cessera donc sa signalisation. A ce stade, les cellules dites « small pre-B », vont alors ré-exprimer Rag-1 et Rag-2 nécessaires aux réarrangements des chaînes légères.

Chez la souris, les réarrangements des chaînes légères débutent toujours par le locus kappa. Ce n'est que si aucun réarrangement n'aboutit à un exon VJ fonctionnel que le locus lambda pourra être réarrangé (Mårtensson et al., 2010). De façon similaire au locus IgH, les différents allèles ne sont jamais réarrangés en même temps, assurant le maintien de l'exclusion allélique (Corcoran, 2005). A l'issue de ce stade de développement, la cellule B possède un BCR complet et fonctionnel, elle est dite B immature. La signalisation induite par le BCR constitue le dernier point de contrôle de l'ontogénèse B. Environ 90% des cellules B immatures exprimant une IgM de membrane vont être éliminées, avant d'avoir pu quitter la moelle (Osmond, 1991, 1993; Rolink et al., 1998). Cette sélection se fait en fonction du niveau d'activation de la cellule par son BCR, une activation trop intense est le reflet d'une réponse à un stimulus du soi, il est donc essentiel que cette cellule ne sorte pas de la moelle. A l'opposé une absence totale de signal reflèterait une mauvaise exportation du BCR à la surface. Dans les deux cas, les cellules vont procéder à une étape supplémentaire de réarrangements (dits secondaires) correspondant à l'*editing* du BCR (Casellas et al., 2001; Hertz and Nemazee, 1997; Melamed and Nemazee, 1997; Sandel and Monroe, 1999). Cette étape correspond à une chance supplémentaire pour la cellule B, d'abolir l'auto-réactivité de son BCR, fréquente à ce stade de développement (Wardemann et al., 2003). L'architecture du locus kappa permet d'éliminer le premier VJ lors de ces réarrangements secondaires. Lorsque toutes les possibilités sur le 1^{er} allèle sont épuisées, un dernier réarrangement dit kappa-RS a fréquemment lieu et invalide le locus kappa avant d'initier les réarrangements sur le second allèle (Edry and Melamed, 2004). Une fois de plus, ces mécanismes séquentiels permettent à la cellule de maintenir l'expression d'un unique BCR. Si cette étape est



	T1	T2	B1	MZ	Fo
IgM	+++	+++	+++	+++	+
IgD	+	+++	+/-	+	+++
CD21	+/-	+	-	+++	++
CD23	-	+++	-	+/-	+++
B220	+++	+++	+	+++	+++
Marqueurs spécifiques	AA4.1+	AA4.1+	B1a sont CD5+	CD1d+++	

Figure 16 : **Représentation des différentes populations de lymphocytes B matures.** On distingue 5 grandes populations de lymphocytes B à la sortie de la moelle osseuse, les lymphocytes B transitionnels (T1 ou T2), les cellules B1, les lymphocytes B de la Zone Marginale (MZ) et les lymphocytes B dit folliculaires (Fo). Leurs principaux marqueurs sont indiqués dans le tableau ci-dessus.

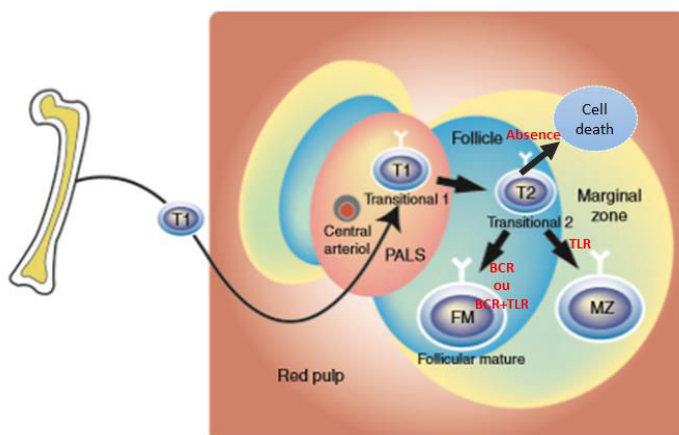


Figure 17 : **Du lymphocyte B transitionnel aux lymphocytes B MZ ou folliculaire.** Les cellules transitionnelles à la sortie de la moelle ont une durée de vie relativement limitée, ces cellules étant hautement sensibles à l'apoptose, on estime qu'environ 40% de ces cellules seront éliminées avant d'atteindre le stade T2. Les cellules T1 vont rejoindre la rate via la circulation sanguine et résider dans les PALS. Les lymphocytes T2, sont quand à eux des cellules très proliférantes qui donneront lieu, soit aux B MZ suite à une stimulation par leur TLR, soit aux B folliculaires suite à une stimulation par leur BCR, pouvant être associée à une stimulation du TLR. (En rouge sur le schéma, le type de stimulation permettant une différenciation en B folliculaires ou B MZ, une absence de stimulation aboutissant à la mort cellulaire) (d'après SuTT *et al.*, 2004)

infructueuse, alors la cellule est soit éliminée par des mécanismes d'apoptose (Hartley et al., 1993; Norvell et al., 1995) soit entre en anergie (Goodnow et al., 1988; Pike et al., 1982).

La cellule B immature représente le produit final de l'ontogénèse B précoce se déroulant dans la moelle : une cellule B exprimant un BCR fonctionnel et non auto-réactif. Cette cellule peut à présent rejoindre la circulation et les organes lymphoïdes secondaires.

2.2 Phase dépendante de l'antigène

Les organes lymphoïdes secondaires regroupent des structures encapsulées, situées sur le trajet sanguin tel que la rate, mais surtout positionnés au niveau des nœuds lymphatiques, les ganglions lymphatiques. Il existe aussi de nombreuses structures non encapsulées présentes tout au long des tissus épithéliaux et regroupées sous le terme tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou MALT (pour *Mucosae-Associated Lymphoid Tissue*). C'est au sein de ces différentes structures que les cellules B immatures vont terminer leur maturation, puis rencontrer les antigènes et établir les réponses immunitaires adaptées en collaboration avec les autres effecteurs du système immunitaire (**Figure 16**).

2.2.1 Le stade B transitionnel, la découverte des organes lymphoïdes secondaires

Durant leur parcours vers les organes secondaires, les cellules B immatures passent par un stade de cellules B dites "transitionnelles" dont trois sous-types ont été décrits sur la base de marqueurs phénotypiques : les T1 ($CD93^+ IgM^{high} IgD^{low} CD21^{low} CD23^{neg}$), les T2 ($CD93^+ IgM^{high} IgD^{high} CD21^{low} CD23^{high}$) et les LB T3, moins bien définis et encore controversés (**Figure 16**) (Chung et al., 2003). Ces derniers, anergiques et en grande majorité auto-réactifs, arriveraient rarement à maturité (Allman et al., 2001). D'une manière générale ce stade de développement représente un point critique pour l'élimination des cellules B auto-réactives. En effet, malgré les points de contrôle dans la moelle osseuse, il s'avère qu'environ 40% des cellules qui sortent de la moelle osseuse sont auto-réactives (Wardemann et al., 2003). En arrivant dans la rate, les LB sont dits T1 et sont majoritairement localisés dans les PALS (*PeriArteriolar Lymphoid Sheath*). Les T1 subissent une forte sélection négative et seront éliminés par apoptose s'ils sont auto-réactifs. Cette étape est notamment permise grâce à la Protéine Kinase C δ (PKC δ), qui va jouer un rôle de régulateur négatif du BCR, en induisant l'activation de la voie pro-apoptotique Ca²⁺-Erk (Limnander et al., 2014). Une fois ce point de contrôle passé, les lymphocytes vont migrer dans les follicules et devenir des lymphocytes B dit T2. Environ la moitié des clones B auto-réactifs sont éliminés à la transition T1-T2. Les T2, qui migrent dans les follicules B, en revanche sont moins sensibles à l'apoptose et au contraire l'engagement de leur BCR va induire une prolifération, un effet anti-apoptotique et des signaux qui vont permettre une sélection positive en cellules B de la zone marginal ou folliculaire (**Figure 17**) (Su et al., 2004).

2.2.2 Les sous populations B

2.2.2.1 Les cellules B1

Les cellules B1 ont été découvertes chez la souris en 1983, par l'équipe de Herzenberg (Hayakawa et al., 1983). A ce jour l'existence de ces cellules chez l'homme reste controversée, aussi dans cette partie je me limiterai à ce qui est connu chez la souris. Les lymphocytes B1 sont rencontrés dans la cavité péritonéale ou dans la plèvre. Ces cellules se distinguent des lymphocytes conventionnels, dit B2, par différents niveaux d'expression de nombres de protéines ($B220^{low}$, IgM^{high} , IgD^{low} , $CD23^{neg}$) (**Figure 16**). Un autre marqueur permet de différencier deux populations de B1, les B1-a ($CD5^+$) et les B1-b ($CD5^-$) (Sagaert and De Wolf-Peeters, 2003). Toutes ces différences sont à l'origine de deux hypothèses, à propos desquelles la communauté scientifique n'arrive pas à trancher. Une première hypothèse est que ces cellules auraient pour origine une lignée propre, différente des cellules B2. Cette hypothèse découle d'expériences de reconstitution de moelle qui ont permis de mettre en évidence leur capacité unique d'auto-renouvellement, par des progéniteurs différents de ceux se situant dans la moelle (foie foetal) (Herzenberg et al., 2000; Montecino-Rodriguez et al., 2006). La deuxième hypothèse va dans le sens d'une origine commune et d'un avenir distinct, basé sur la nature du BCR. En effet, les cellules B1 présentent majoritairement des réarrangements V_H11 ou V_H12 , ce qui suggère que ce type de BCR orienterait la différenciation de ces cellules en B1 plutôt qu'en B2 (Clarke and Arnold, 1998; Tornberg and Holmberg, 1995). Enfin des expériences menées par l'équipe de Klaus Rajewsky ont montré l'importance de la force du signal BCR pour l'orientation B1 ou B2, grâce en particulier au modèle de souris LMP2A (*Latent Membrane Protein 2A*). Dans ce modèle la protéine du virus de l'EBV, LMP2A, connue pour mimer le signal du BCR, a été insérée dans le locus IgH, à la place des exons J et mise soit sous le contrôle d'un promoteur fort, soit sous le contrôle d'un promoteur faible. Dans le premier cas, une grande quantité de B1 sont produit, alors qu'en présence d'un BCR faible, très peu de B1 sont retrouvés au profit de la population B2 (Casola et al., 2004).

Malgré ces différences sur l'origine de ces cellules, tous s'accordent pour dire qu'elles produisent des anticorps poly-spécifiques peu affins (anticorps « naturels »), dirigés contre des épitopes partagés par de nombreux microorganismes. Cette faculté leur permet ainsi d'assurer une première ligne de défense, en amont de la réponse immunitaire conventionnelle (Herzenberg, 2000; Ochsenbein et al., 1999).

2.2.2.1 Les cellules B2

- Les cellules B de la Zone Marginale

Dans la rate, à l'interface entre la pulpe rouge et la pulpe blanche riche en cellules B, se trouve la zone marginale, riche en macrophages et qui contient une population, qui représente environ 5% des

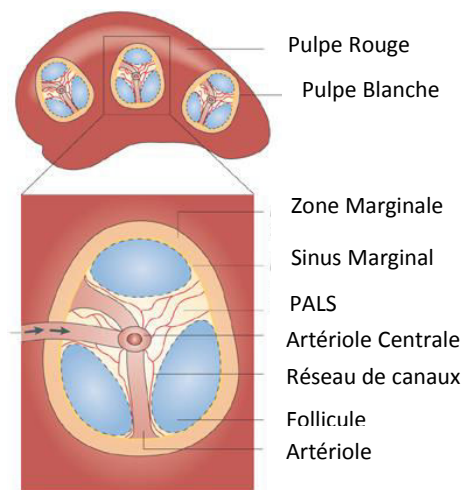


Figure 18: **Représentation schématique de l'architecture de la rate.** (Haut) Schéma d'une rate représentant les deux zones, la pulpe blanche et la pulpe rouge. (Bas) Zoom sur la pulpe blanche avec notamment, la localisation de la zone marginale, frontière entre les pulpes blanches et rouges, contenant les lymphocytes B de la zone marginale (MZ). Dans la pulpe blanche seront retrouvées également, des PALS (*Periarteriolar Lymphoid Sheath*), des follicules dans lesquels sont localisés les lymphocytes B dit folliculaires (Fo) ainsi qu'un réseau de canaux (d'après Batista & Harwood, 2009).

cellules B de la rate : les lymphocytes B dit MZ (pour *Marginal Zone*) (**Figure 18**) (Zouali and Richard, 2011).

Les lymphocytes B MZ murins sont caractérisés par l'expression de certains marqueurs de surface spécifiques (CD23^{low}, CD21^{high}, IgM^{high}, IgD^{low} et CD1d^{high}) et sont décrits comme des cellules exprimant des BCR très peu diversifiés, non mutés, leurs permettant, comme pour les cellules B1, de reconnaître un maximum de déterminants microbiens (Martin and Kearney, 2002; Pillai et al., 2005). Ces cellules se différencient rapidement en plasmocytes à courte durée de vie, producteurs d'anticorps essentiellement IgM (Martin et al., 2001). Certaines études encore controversées ont aussi montré qu'elles pouvaient participer à des réponses T-dépendantes contre certaines protéines membranaires ou lipides bactériens et produire alors des IgG ou IgA (Cerutti, 2010; Pone et al., 2012). Récemment, plusieurs études ont permis de démontrer un nouveau rôle majeur de ces cellules dans le transport des antigènes, sous forme de complexes immuns, vers les follicules B (Cinamon et al., 2008; Ferguson et al., 2004). Au contraire de la souris, les cellules B MZ humaines portent majoritairement des BCR mutés et ont longtemps été confondues avec les B mémoires du fait de leur présence dans la circulation et de leur expression du marqueur CD27, classiquement utilisé pour définir la population B mémoire (Weill et al., 2009). En effet, chez l'homme une forte proportion de cellules B mémoires présentant les caractères des cellules MZ possèdent des Ig hypermutées (Klein et al., 1998). Cependant, la présence de ces cellules chez des patients possédant une mutation CD40L (patients hyper-IgM) tend à montrer que leur développement se fait hors des centres germinatifs (GC) (Weller et al., 2004). En fait, des études chez le jeune enfant, ont permis de montrer une diversité du répertoire VDJ de ces cellules identique à celui de cellules B naïves (Weller et al., 2008). Ces données, en contradiction avec les expansions pseudo-clonales obtenues lors d'une réponse antigénique dans des centres germinatifs, tendent à montrer que l'acquisition des mutations a lieu précocement et en dehors des centres germinatifs. Une telle diversification précoce, observée dans d'autres espèces (Weill et al., 2004), pourrait être utile pour diversifier le répertoire pré-immun afin de répondre plus efficacement contre certaines bactéries encapsulées ne déclenchant pas de réponse T-dépendante (Weill et al., 2009).

- Les cellules B folliculaires

Les lymphocytes B folliculaires (Fo) sont rencontrés dans des structures de la rate ou des ganglions, nommées follicules d'où ils tirent leur nom. Comme décrit sur la **figure 18**, les follicules sont enchâssés entre les PALS, riche en lymphocyte T, aussi nommées zone T et les zones marginales dont nous venons de parler. Ces lymphocytes sont caractérisés par divers marqueurs de surface tels que B220, CD23^{high}, CD21^{low} et l'IgM^{low} et IgD^{high} (**Figure 16**). La perte d'expression de l'IgD permettra notamment de différencier les lymphocytes B Fo, des lymphocytes B des centres germinatifs (Pillai and Cariappa,

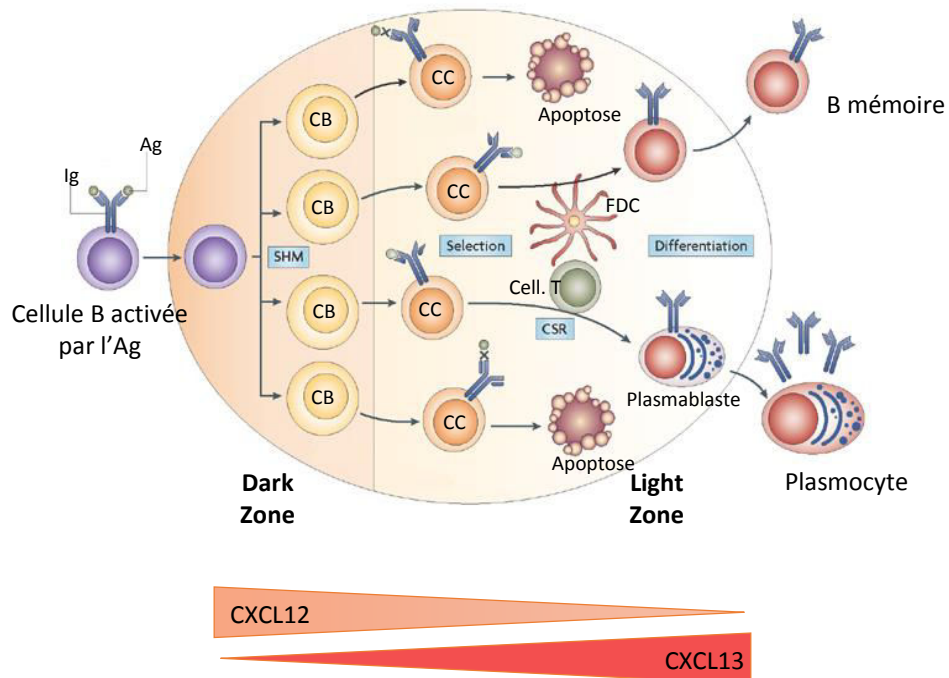


Figure 19 : **Schématisation d'un centre germinatif.** La cellule B activée par l'antigène va permettre la formation d'un CG, suite à la prolifération des cellules B. Selon le schéma empirique, les centroblastes (CB) subissent le processus d'hypermutation somatique (SHM) dans la zone sombre. Les centrocytes subissent quand à eux le phénomène de commutation de classe (CSR), dans la zone claire. De nombreuses cellules vont mourir par apoptose dans les centres germinatifs. La migration d'une zone à l'autre est notamment permise par des gradients de concentration de CXCL12 ou CXCL13 (d'après Klein & Favera, 2008).

2009). Ces cellules représentent la grande majorité des cellules B périphériques et vont être à l'origine des réponses T-dépendantes dans les centres germinatifs, qui seront détaillées dans le point suivant.

2.2.3 La réponse immune T-dépendante, l'établissement des centres germinatifs

Comme nous venons de le voir lors de la genèse des cellules B, grâce aux réarrangements VDJ au niveau des locus des chaînes lourdes et légères d'Ig une grande diversité d'Ig est créée permettant de reconnaître théoriquement l'ensemble des antigènes. Cependant, un autre mécanisme essentiel à une bonne défense immunitaire permet d'augmenter l'efficacité et la spécificité de reconnaissance des antigènes. Pour cela des mutations vont être générées, essentiellement au niveau des régions CDR des domaines variables et la classe d'Ig va pouvoir être adaptée à la nature de l'antigène, responsable de la réponse immune. Il s'agit des événements dit respectivement d'hypermutation somatique (SHM pour *Somatic HyperMutation*) et de recombinaison de classe (CSR pour *Class Switch Recombination*). Ces deux événements ont lieu dans des structures nommées centres germinatifs (GC pour *Germinal Center*) (**Figure 19**) (Victoria and Nussenzweig, 2012). *In fine*, ces structures vont créer l'environnement nécessaire pour produire des cellules B possédant des récepteurs plus affins et plus adaptés à un antigène donné qui pourront alimenter le réservoir de cellules B mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie.

Les premières descriptions anatomiques des GC, faites par Flemming en 1885, ont conduit à la description de deux zones : la zone sombre (DZ pour *Dark Zone*), marquée par une intense prolifération de cellules B (les centroblastes) et la zone claire (LZ pour *Light Zone*), où a lieu la sélection par l'antigène et où l'on retrouve en plus des cellules B (les centrocytes), les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et la majorité des Tfh (Lymphocytes T folliculaires *helper*). Cette organisation est permise en particulier grâce à l'expression différentielle par les cellules B des récepteurs aux chimiokines CXCR5 (*chemokine (C-X-C motif) receptor 5*) dans la LZ et CXCR4 dans la DZ. Ainsi, les souris déficientes pour CXCR4 montrent des GC complètement désorganisés et les cellules B issus d'animaux CXCR5^{-/-} sont dans l'incapacité de s'accumuler dans la LZ (Allen et al., 2004). Ce sont en particulier les FDC qui produisent le ligand du CXCR5 (CXCL13) qui vont permettre la mise en place du GC et le recrutement des populations cellulaires peuplant la LZ (MacLennan, 1994). L'orientation des GC est toujours similaire, la DZ est constamment proche de la zone dans laquelle se situent les cellules T et la LZ à proximité de la zone marginale de la rate. Cette orientation a longtemps donné lieu au dogme selon lequel les cellules B ne feraient que « passer » dans les centres germinatifs avec un cycle de prolifération/mutation dans la DZ, puis sélection du nouveau BCR dans la LZ, avant de sortir de ces structures et s'accumuler dans les zones marginales sous forme de cellules B mémoires et plasmocytes.

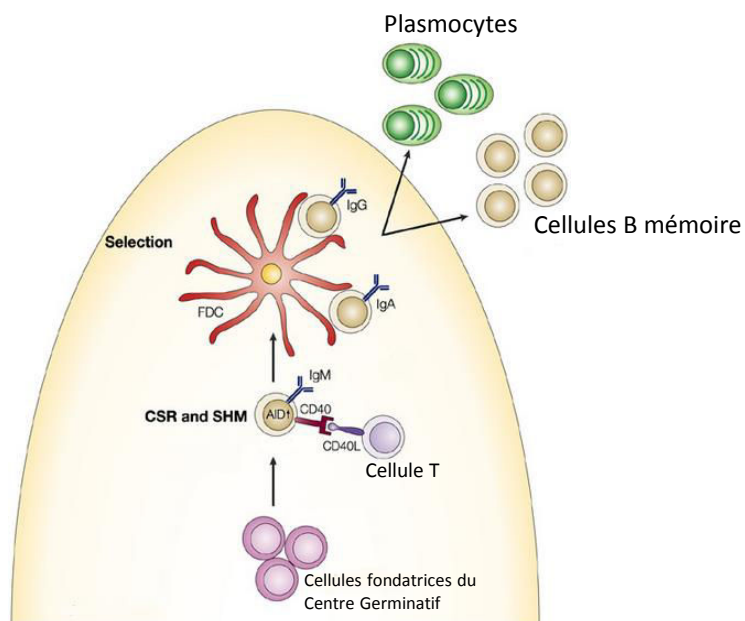


Figure 20 : **Les différentes populations cellulaires du centre germinatif.** Les cellules B folliculaires activées par l'antigène vont être à l'origine de l'élaboration du centre germinatif. Dans ces structures les lymphocytes B subiront les phénomènes de SHM et CSR et seront sélectionnées avec l'aide des FDC et des cellules T présentes également dans les centres germinatifs. Une fois ces phénomènes de maturation effectués la cellule B va pouvoir devenir soit une cellule B mémoire, soit un plasmocyte (d'après Jean-Pierre de Villartay *et al.*, 2003).

Nous allons voir dans les paragraphes suivants que ce mouvement unidirectionnel est aujourd'hui controversé.

L'établissement du GC est permis suite à une réponse immune dite T-dépendante, dans laquelle des cellules B folliculaires et des cellules T CD4+ vont collaborer avec l'aide d'un 3^{ème} acteur essentiel, dans la mise en place et le fonctionnement des GC, les cellules dendritiques. Cette dernière population a un rôle clef puisque elle va détecter et phagocyter l'Ag, puis migrer dans les organes lymphoïdes secondaires où elle présentera un complexe peptide-CMHII (pour Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II) aux lymphocytes T. Cette interaction va entraîner la prolifération et l'activation des lymphocytes T spécifiques. Simultanément, les lymphocytes B dans les zones folliculaires seront activés par l'Ag qu'ils reconnaîtront, soit sous forme soluble à la surface des macrophages ou des cellules dendritiques, soit sous forme de complexes immuns à la surface des FDC. Les cellules T et B activées par le même Ag vont alors pouvoir interagir dans les follicules et une fois ce lien établi, les cellules B vont se recentrer et former les GC. Les lymphocytes B naïfs non activés vont être repoussés sur le pourtour de ces structures et devenir les lymphocytes B dit du manteau (MacLennan, 1994).

Le temps nécessaire pour que cette structure se mette en place, grossisse, devienne fonctionnelle et permette la création de plasmocytes ou de B mémoires dépend du type d'immunisation mais aussi du fait que ce soit une immunisation primaire ou secondaire. D'une manière générale dès 48h après l'immunisation les cellules B de GC apparaissent et ces structures transitoires seront au maximum de leurs capacités 1 à 2 semaines après (Zotos and Tarlinton, 2012). Ces structures perdureront environ 21 jours avant de se dissoudre (Victoria, 2014).

2.2.3.1 Les différents acteurs du centre germinatif

- Les Cellules Folliculaires Dendritiques

Les cellules folliculaires dendritiques (FDC) de la LZ du centre germinatif (**Figure 20**) forment un réseau de cellules exprimant à leur surface les récepteurs au complément CR1 (*complement receptor 1*, ou CD35) et CR2 (CD21) qui vont leur permettre de fixer des complexes immuns liés au complément, formés lors de la réponse primaire et mettant en jeu les anticorps de type IgM produits par les cellules B1 et MZ (Boes et al., 1998; Ehrenstein et al., 1998). Cette rétention de l'antigène par les récepteurs au complément semble essentielle à la maturation d'affinité, puisqu'il a été montré qu'en absence de CR2 la maturation d'affinité normale n'est possible qu'en présence de très fortes doses d'Ag (Chen et al., 2000). Les FDC expriment aussi le FcγRIIB qui va leur permettre de fixer directement les IgG par leur partie constante (Kosco-Vilbois et al., 1993). Lors de la sélection, les centrocytes sont mis en compétition pour l'Ag présenté par les FDC. Ces dernières fournissent des signaux de survie suite à la

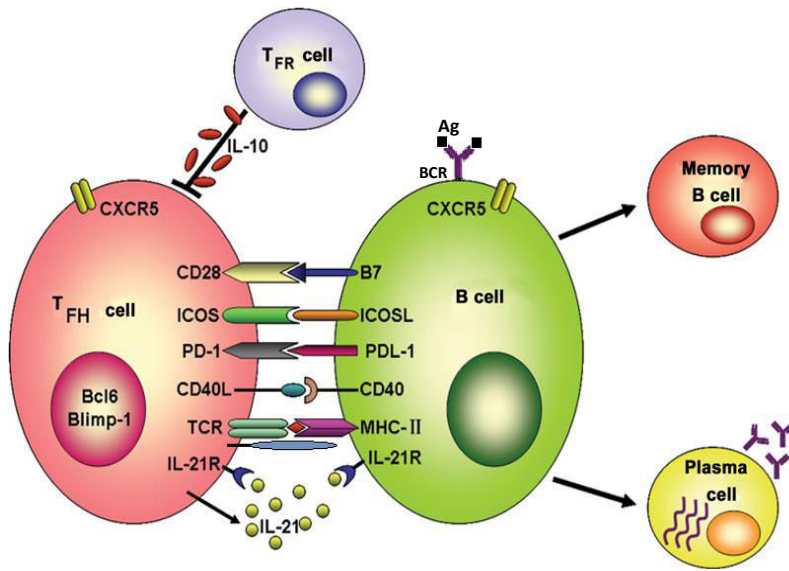


Figure 21 : **Représentation schématique d'une interaction T-B dans les centres germinatifs.** Les différentes interactions entre les cellules T et B se font suite à une interaction BCR-Ag. L'Ag sera processé et présenté via le CMHII aux cellules T qui le reconnaîtront via le TCR, cette interaction sera complétée par une liaison du CD4. Des régulations vont également se faire par les interactions entre le CD28 et B7 (aussi appelé CD86) et le CD40 et CD40L. D'autres interactions notables sont faites via ICOS et ICOSL ainsi que PD-1 et PDL-1 (d'après Sudhanshu Shekhar and Xi Yang, 2012).

liaison forte avec l'Ag : les cellules B échouant à interagir de manière suffisante avec celles-ci mourront par apoptose (Peperzak et al., 2012). Ces lymphocytes B sont également en compétition pour l'interaction avec les Tfh qui vont assurer non seulement leur survie mais aussi leur prolifération et différenciation (Vinuesa et al., 2010). Les différentes hypothèses pour cette sélection seront discutées dans le paragraphe 2.2.3.3.

- Les lymphocytes T folliculaires Helper

Même s'ils ne constituent qu'une petite fraction des cellules du centre germinatif (**Figure 20**), les lymphocytes T folliculaires *Helper* (Tfh) sont nécessaires à leur formation. Cette sous-population de lymphocytes T se différencie des autres cellules T auxiliaires par l'expression du CXCR5 (Haynes et al., 2007), permettant leur migration dans le follicule et leur maintien dans le centre germinatif, ainsi que par une forte expression des molécules ICOS (*inducible costimulator*), CD40L (*CD40 ligand*) ou encore OX40, toutes impliquées dans la synapse immunitaire formée avec le lymphocyte B (**Figure 21**). Les Tfh par leur interaction avec les lymphocytes B vont permettre leur survie, prolifération et différenciation (Fazilleau et al., 2009). En particulier, le signal fournit aux cellules B par la liaison CD40/CD40L permet leur survie et prolifération (Ma et al., 2012). Le facteur de transcription Bcl6 (*B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 6*), longtemps considéré comme spécifique de la lignée B, s'avère être l'un des acteurs principaux de la différenciation Tfh (Nurieva et al., 2009). Ces cellules sont également caractérisées par leur sécrétion d'IL21, dont le rôle reste encore controversé. En effet, cette cytokine permet le maintien des GC via l'expression de Bcl6 mais est également importante pour la différenciation des cellules B en plasmocytes via l'expression de Blimp1 dont nous reparlerons du rôle ultérieurement (Kuchen et al., 2007; Zotos et al., 2010).

- Les cellules B de GC

Enfin, les cellules B du GC présentent certaines particularités qui les différencient des autres cellules B. Certains marqueurs spécifiques, tels que le glycané sialilé 2,6-linked N acetylneuraminic acid reconnu par l'anticorps monoclonale GI7 (Naito et al., 2007) ou leur faculté à se lier à la PNA (*peanut agglutinin*), sont classiquement utilisés pour les détecter. Elles présentent aussi une perte totale de l'expression de l'IgD membranaire. Les cellules B des GC sont hautement sensibles à l'apoptose et un très grand nombre d'entre elles vont être éliminées lors de la sélection et phagocytées par des macrophages présents sur le pourtour des GC dit macrophages à corps tingibles (TBM pour *tingible-body macrophages*).

Ainsi les cellules B de GC présentent une très forte expression du récepteur pro-apoptotique Fas (CD95) associée à une faible expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Saito et al., 2009). Ces cellules subissant des mutations sur leur BCR doivent être éliminées au plus vite en cas de récepteur devenu auto-immun, déficient ou tout simplement insuffisamment affin pour l'Ag. Seule une réception efficace

des signaux de survie fournis par les FDC et les Tfh permet leur survie. En parallèle, Bcl6 va réprimer p53 et ATR de manière à permettre à l'enzyme AID (*Activation-induced cytidine deaminase*), enzyme essentielle dans la réaction du GC et dont nous reparlerons dans les prochains paragraphes, d'induire les mutations sur l'ADN permettant les phénomènes de SHM et de CSR (Muramatsu et al., 1999, 2000; Phan and Dalla-Favera, 2004; Ranuncolo et al., 2007). Bcl-6 maintient aussi l'identité du GC, via la répression de Blimp1, en évitant une différenciation trop précoce des cellules B en plasmocytes (**Figure 20**) (Shaffer et al., 2000). Tous ces rôles font de Bcl-6 un acteur essentiel dans la cellule B du GC. Des travaux menés par différentes équipes ont montrés que son absence induisait une incapacité des lymphocytes B à proliférer et à induire la formation de GC et donc à générer des anticorps de haute affinité (Dent et al., 1997; Ye et al., 1997).

2.2.3.2 Dynamique et mouvements cellulaires dans les centres germinatifs

Comme nous l'avons vu précédemment les centres germinatifs sont scindés en deux grandes zones, la zone claire (LZ) et la zone sombre (DZ). Les cellules B de la DZ sont appelées centroblastes et sont de grosses cellules proliférantes contrairement aux cellules B de la LZ, les centrocytes qui sont de petites cellules qui supportent la quiescence. Une migration interzone est essentielle puisque les antigènes sont présentés dans la LZ et les cellules prolifèrent dans la DZ. Un des modèles proposés est que les cellules subissent d'abord les mutations dans la DZ, durant la phase intense de prolifération puis migrent vers la LZ où le nouveau BCR sera testé pour son affinité à l'Ag. Cependant, il ne s'agit pas d'un mouvement unidirectionnel, contrairement à ce qui a été pensé pendant longtemps (Meyer-Hermann and Maini, 2005). Il faut considérer cette dynamique comme un cycle dans lequel les cellules vont de la DZ vers la LZ, puis si elles sont sélectionnées, retournent dans la DZ afin de subir un autre cycle de mutations et encore augmenter l'affinité du BCR pour son Ag. Très tôt, les chercheurs se sont rendus compte que le grand nombre de mutations subit par les cellules dans les GC nécessitait plusieurs cycles de mutations, ce phénomène est appelé : "cyclic re-entry" (Kepler and Perelson, 1993). Mais ce n'est qu'en 2010, grâce à un modèle de cellules photoactivables, que l'équipe de Michel Nussenzweig a pu visualiser ce phénomène et déterminer qu'environ 50% des lymphocytes B de la DZ passent dans la LZ en 4h et que 10% font le chemin inverse, ce qui va bien dans le sens de la théorie du « cyclic re-entry ». Des extrapolations mathématiques de ces données ont permis de montrer que 30% des B du GC ré-entrent dans la DZ après avoir été dans la LZ (Victora, 2014; Victora et al., 2010).

Il est donc à présent acquis que le schéma empirique, centroblaste, puis centrocyte, puis B mémoire ou plasmocyte est obsolète et que le schéma de maturation des cellules B dans le GC n'est pas linéaire.

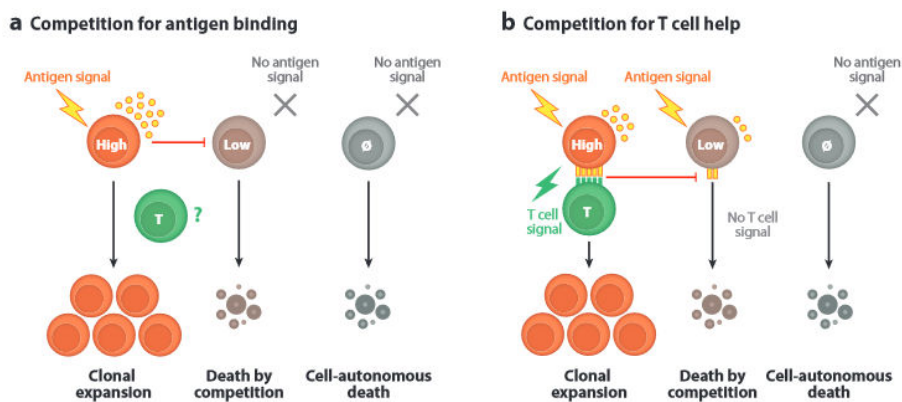


Figure 22 : **Modèle de compétition dans les centres germinatifs.** (a) Compétition par la signalisation BCR. Plus le BCR sera affiné plus la signalisation qu'il induira permettra l'expansion clonale. En revanche les cellules avec un BCR peu ou pas affiné, captent pas ou peu d'antigène et mourront du fait de l'absence de signalisation induite par le BCR. (b) Compétition induite par la collaboration avec les cellules TFH. Les cellules B possédant les meilleurs BCR captent un maximum d'Ag qu'ils pourront présenter via leur CMHII aux cellules TFH. Les cellules TFH leur procureront les signaux nécessaires à l'expansion clonale (d'après Victora GD, 2012).

2.2.3.3 Les mécanismes de sélection cellulaire dans les centres germinatifs

La sélection dans le GC est au centre du fonctionnement de cette structure. Elle implique à la fois la survie, l'expansion clonale et les décisions sur le devenir des cellules B. Elle va permettre en outre d'augmenter l'affinité de l'Ig pour son Ag à partir d'un clone initial. A partir de cette observation, faite dès les années 60/70 (Eisen and Siskind, 1964; McKean et al., 1984; Weigert et al., 1970), l'hypothèse principale de la sélection clonale a été basée sur la théorie d'une compétition pour l'Ag, permettant de sélectionner les clones ayant le plus d'affinité (**Figure 22**). Ainsi, la quantité d'Ag portée par les FDC serait limitante et les cellules B, nouvellement mutées dans la DZ, entreraient donc en compétition pour ces niches antigéniques. Les cellules possédant le BCR de meilleure affinité surclasseraient celles dont l'affinité est moindre. Les signaux de survie fournis par les FDC ainsi que l'induction de la signalisation du BCR suffiraient à maintenir en vie et faire proliférer les cellules sélectionnées, les autres entrants en apoptose (Brachtel et al., 1996). De nombreuses études ont, en ce sens, montrées qu'un défaut de signalisation du BCR ou de ses co-récepteurs diminuait l'efficacité de la sélection clonale, soit suite à une diminution des GC (nombre, taille, maintien), soit suite à une diminution de l'affinité des Ig pour l'Ag (Ahearn et al., 1996; Jou et al., 2002; Randall et al., 2009; Wang and Carter, 2005). Cependant, la fixation du BCR sur son ligand peut provoquer deux événements non exclusifs : une signalisation conduisant à la prolifération/différenciation/mort cellulaire (selon les co-signaux et le contexte micro environnemental) mais aussi une endocytose du BCR avec son ligand, ce dernier pouvant alors être apprêté et présenté via le CMHII aux cellules T auxiliaires (Tfh dans le GC). Il reste donc difficile de séparer ses deux fonctions. Cependant, un faisceau d'évidence tend à remettre en cause une sélection ne passant que par une compétition pour l'Ag. Tout d'abord, la mutation du co-récepteur CD45, qui diminue la signalisation du BCR sans altérer ses capacités d'endocytose, n'induit pas de défaut de maturation d'affinité et de sélection (Huntington et al., 2006). D'autre part, selon cette théorie, des cellules B ayant acquis des mutations rendant leur BCR autoréactif, pourraient être sélectionnées si l'Ag est présent dans le GC, ce qui a clairement été invalidé par une étude de l'équipe de Robert Brink (Chan et al., 2012). Ensuite, des études plus récentes de microscopie multiphotonique intravitale ont montrées que les interactions entre cellules B et FDC étaient de très courte durée et n'expliqueraient donc pas une sélection par saturation des sites antigéniques (Allen et al., 2007; Schwickert et al., 2007). Aussi, une autre théorie, potentiellement complémentaire à la première, a émergé durant la dernière décennie en particulier grâce aux connaissances accrues sur les cellules Tfh qui peuplent les GC. La sélection clonale dans le GC passerait par une compétition pour la présentation de l'Ag aux cellules Tfh qui en retour fourniraient les signaux de survie, de prolifération et/ou de différenciation nécessaires aux cellules B. Ainsi, les cellules B présentant un BCR de forte affinité pour l'Ag seraient plus aptes à endocyter l'Ag et à le présenter aux Tfh spécifiques du même Ag ce qui

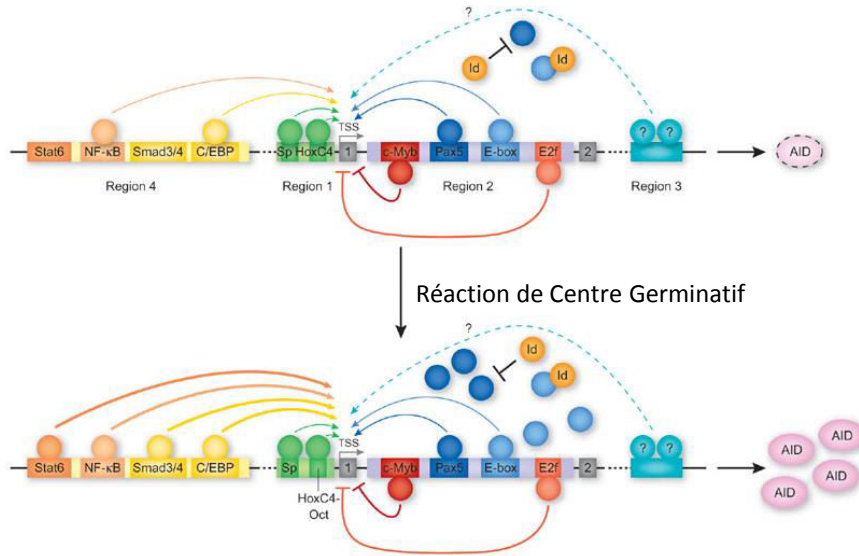


Figure 23 : **Régulation de l'expression de AID.** (Haut) Représentation schématique des principaux éléments permettant d'inhiber l'expression d'AID. (Bas) Représentation schématique des sites d'actions des différents éléments activateurs de l'expression d'AID, suite à une stimulation GC dépendante (d'après Lee-Theilen & Chaudhuri, 2010).

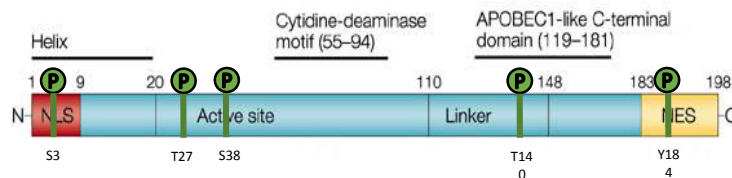


Figure 24 : **Représentation de la structure protéique d'AID.** Les quatre domaines fonctionnels d'AID sont représentés, NLS (Séquence de Localisation Nucléaire), le site catalytique de déamination, le site APOBEC like et le NES (Séquence d'Exportation Nucléaire). Les cinq sites de phosphorylation de la protéine AID sont indiqués (trait vert surmonté d'un P) (d'après Chaudhuri & Frederick W. Alt, 2004).

expliquerait, par la même, l'élimination des BCR autoréactifs dans le GC (Victora and Nussenzweig, 2012).

2.2.3.4 AID, l'enzyme maitresse du centre germinatif

C'est en 1999 que l'équipe de Tasuku Honjo découvre l'expression de AID, dans les cellules B du GC ou stimulées in vitro (Muramatsu et al., 1999) puis démontre son implication dans les phénomènes de SHM et de CSR (Muramatsu et al., 2000).

AID appartient à la famille des déaminases APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) impliquées dans le phénomène d'édition de certains ARN (Di Noia and Neuberger, 2007). Cette enzyme de 198 acides aminés est composée d'une séquence de localisation nucléaire (NLS), d'un domaine catalytique, d'un domaine dit *APOBEC-like* et d'une séquence d'exportation nucléaire (NES). L'expression comme la rétention d'AID dans le cytoplasme sont des évènements hautement contrôlés, AID devant être transportée dans le noyau pour exercer son action. Le contrôle drastique de l'expression d'AID est notamment réalisé par la liaison de nombreux facteurs de transcription ubiquitaires ou B spécifiques tels que Pax5, STAT6, SP1 ou C/EBP (**Figure 23**) (Dedeoglu et al., 2004; Oppezio et al., 2005). De plus, la stabilité de son ARN est également hautement surveillée par la liaison des miRNAs, miR155 et miR181b dans la région 3' non traduite. Enfin, au niveau protéique, AID est maintenue dans le cytoplasme grâce à divers éléments qui interagissent avec la région NLS, provoquant la création d'un complexe protéique beaucoup trop important (>300kDa) pour être importé dans le noyau. La dissociation de ce complexe n'est pas très bien établie, mais est certainement due à des modifications de phosphorylation de AID. En effet AID est aussi régulée par différents sites de phosphorylation, qui peuvent induire une inhibition (Ser3), une stimulation (Ser38, Thr124 ou 140) ou pas d'effets apparents (Ser41 ou 43, Tyr124) (**Figure 24**) (Vuong and Chaudhuri, 2012). Toutes ces phosphorylations ne sont pas bien comprises pour l'instant, cependant la phosphorylation de la sérine 38 a été intensément étudiée. Cette phosphorylation par la PKA (*Protéine Kinase A*), est essentielle pour l'interaction AID-RPA (pour *Replication Protein A*), qui permettra la stabilisation de l'ADN simple brin dans les boucles de transcription, de façon à ce que AID puisse exercer son action (Cheng et al., 2009). Enfin dans le noyau, AID est retrouvée de manière transitoire liée à CTNBL1, la nucléoline, la nucléophosmine ou encore le RNA exosome lors de la CSR (Hu et al., 2013).

Le mode d'action d'AID est de déaminer les cytidines en uraciles et donc d'induire des mutations soit par erreurs de réplifications, soit par réparation par excision de base (BER pour *base excision repair*) ou par réparations des mésappariements (MMR pour *MisMatch Repair*) (pour la SHM). La déamination par AID va cibler les régions variables des Ig au niveau des chaînes lourdes et légères (SHM) et les régions répétitives switch (S) au locus des chaînes lourdes d'Ig (CSR). Dans ce dernier cas, les mutations

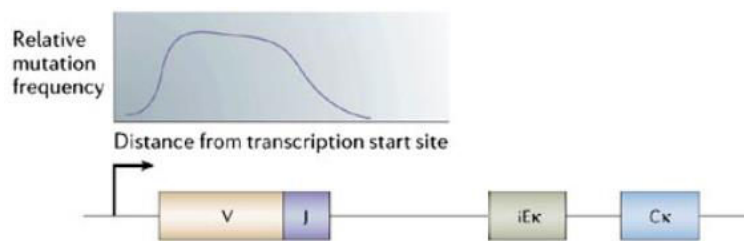


Figure 25 : **Profil d'hypermutation induites par AID.** Les hypermutations générées par AID ont lieu dans une région située après le début du TSS (*Transcription Start Site*) entre environ 100pb et 1,5kb. Ici l'exemple du locus κ avec la répartition des mutations le long de l'exon VJ. L'enhancer $iE\kappa$ et la partie constante $C\kappa$ sont hors de portée de la région ciblée (modifié d'après Odegard and Schatz, 2006).

sur les deux brins (sens et anti-sens) dans des régions S riches en GC, vont conduire fréquemment à des cassures double-brin décalées (« *Staggered double strand breaks* ») qui seront alors prises en charge par les mécanismes de réparations de la C-NHEJ (*classical non-homologous end joining*) ou de l'A-NHEJ (*Alternative Non-Homologous End Joining*) dont nous reparlerons ultérieurement (Boboila et al., 2012). AID et ses co-facteurs ciblent uniquement des régions transcrites. Ainsi AID se fixe sur des portions très courtes d'ADN simple brin des régions V pour la SHM ou sur des structures appelées R-loops des régions S pour la CSR et dont l'établissement sera détaillé dans le point 2.2.3.6. Les brins transcrits d'ADN sont accessibles à AID grâce à l'hétéroduplexe ARN/ADN et au complexe ARN exosome capté par la RNAPolIII et les facteurs de transcription Spt5/Spt6 (Basu et al., 2011). AID se lie à l'ADN par l'intermédiaire de la RNAPolIII dans sa forme au repos. La RNAPolIII s'accroche à l'ADN juste après le site de démarrage de la transcription (TSS) et est accompagnée par la liaison de Spt5 qui stimule le recrutement de AID sur la RNAPolIII (Pavri and Nussenzweig, 2011; Yamane et al., 2011). Les régions variables et S sont des cibles privilégiées de AID en partie grâce à la RNAPolIII dite "en pause". Cette RNAPolIII "en pause" n'est pas retrouvée sur les régions constantes ce qui explique qu'elles ne soient pas ciblées par AID. Les "pauses" de la RNAPolIII sont dues à l'enrichissement en H3K4me3 (et H3K9 acétylé) qui permet le recrutement de HAT (*Histone AcetylTransferase*) et HDAC (*Histone DeAcetylases*) (Wang et al., 2009). Une fois AID fixée sur les régions variables ou les régions S, les phénomènes de SHM et de CSR vont respectivement pouvoir avoir lieu (Matthews et al., 2014). Le mécanisme d'action de AID est donc directement dépendant de la transcription des régions cibles, domaines V ou régions S. Aussi, nous verrons que différentes régions régulatrices en *cis* peuvent réguler l'accessibilité et l'activité de AID. Parmi elles, la région régulatrice 3'RR du locus IgH semble prépondérante pour les deux phénomènes de SHM et CSR, qui sont presque totalement inexistant en son absence (Rouaud et al., 2013; Vincent-Fabert et al., 2010b).

2.2.3.5 L'hypermutation somatique

Les mécanismes d'hypermutation somatique (SHM) sont responsables d'une augmentation drastique du nombre de mutations, estimée à 10^6 fois plus que la normale. Durant cette phase, les mutations se distribuent sur environ 1.5kb, en commençant environ 120pb après le TSS (pour *Transcription Start Site*) et culminent au niveau des jonctions VDJ (Kenter, 2012). La fréquence des mutations n'est pas constante tout du long du locus transcrit. Elle est maximale au niveau des régions codantes, qui reconnaissent l'antigène et diminue de manière exponentielle de façon à ne pas affecter la partie constante des Ig (**Figure 25**) (Rada and Milstein, 2001). La première phase de la SHM consiste à générer des erreurs de mésappariements G:U, grâce à l'action de l'enzyme AID qui va déaminer les cytidines en uracile sur des motifs dit "WRC" (W=A/T, R=A/G) (Kohli et al., 2009) et donc induire des transitions C vers T et par conséquent G vers A sur le brin complémentaire (Di Noia and Neuberger, 2007).

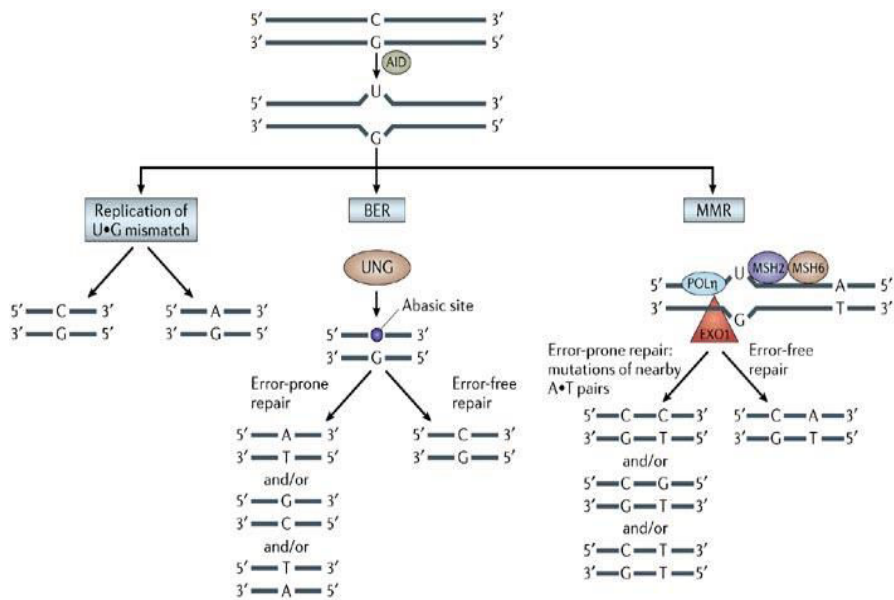


Figure 26 : **Induction des hypermutations somatiques par AID.** AID initie les hypermutations somatiques par déamination des cytidines sur un brin de l'ADN. La déamination d'une cytosine conduit à l'apparition d'un uracile, donnant lieu à un mésappariement G:U. Ce mésappariement sera résolu soit lors de la réplication, soit par le mécanisme du BER (*Base Excision Repair*), soit par MMR (*MisMatch Repair*). (UNG, *Uracil DNA Glycosylase* ; EXO1, exonuclease 1; MSH, homologue of *Escherichia coli* MutS ; POLη, polymérase (DNA directed)-η) (d'après Odegard & Schatz, 2006).

La seconde phase de la SHM consiste à réparer ces erreurs (**Figure 26**). C'est cette prise en charge et les différents mécanismes de réparations qui vont entrer en jeu pour éliminer les uraciles apparus sur l'ADN, qui vont générer les mutations à l'origine de la maturation d'affinité grâce à des réparations imparfaites. Les uraciles générés vont, soit être ignorés par la polymérase qui va les considérer comme un T et ainsi insérer un A et donc créer une transition C:T, soit être excisés par l'UNG (*Uracil-DNA glycosylases*). Dans ce second cas, des sites abasiques vont être générés et pris en charge par le mécanisme du BER qui grâce à l'action de polymérases peu fidèles, telles que REV1, pol β , pol η , vont remplacer le site abasique par une base aléatoirement choisie A, C, T ou G (Chahwan et al., 2012; Weller et al., 2008) et donc induire des transitions (remplacement d'une purine par une purine ou d'une pyrimidine par une pyrimidine) ou des transversions (purine remplacée par pyrimidine ou pyrimidine par purine). Les bases entourant le site abasique peuvent également être la cible de ces polymérases, dans ce cas les mutations induites seront dite "long-patch repair" (Peled et al., 2008). Enfin, une dernière possibilité peut résoudre ces sites abasiques, il s'agit du MMR. Dans le cas du MMR, les mésappariements sont reconnus par l'hétérodimère MSH2/MSH6, les changements conformationnels médiés par l'ATP promeuvent le recrutement de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et de l'exonucléase EXO1, qui vont exciser le mésappariement ainsi que les 20 à 30 nucléotides voisins de la cassure. Des polymérases infidèles seront alors recrutées pour combler ces lésions et particulièrement la polymérase η (Peled et al., 2008).

2.2.3.6 La commutation de classe

La CSR est essentielle pour une réponse optimale du système immunitaire en permettant la production par les cellules B de l'Ig dont l'isotype est le mieux adapté à l'antigène rencontré. Elle conduit à la formation de cassures double-brin de l'ADN et donc, plus encore que les mutations provoquées lors de la SHM, expose la cellule à la survenue de recombinaisons illégitimes tels que des translocations pouvant être à l'origine de tumeurs. La CSR nécessite donc une régulation étroite permettant de limiter ces effets potentiellement délétères.

- Les régions S

Au cours de la CSR, les cassures double-brin de l'ADN vont survenir simultanément dans deux régions S et permettre ainsi un réarrangement entre une région S donneuse (S_{μ}) et une région S acceptrice (variant selon l'environnement cytokinique). L'excision de la région comprise entre ces deux régions S se fait sous forme d'un épisode (Chaudhuri et al., 2007). Ces régions S sont situées en amont de chaque gène constant à l'exception de C δ et sont composées de séquences répétées riches en G, dont la taille varie entre 1 et 12kb. De nombreux travaux ont mis en lumière l'importance de l'orientation, de la longueur et du caractère répétitif des régions S notamment pour l'établissement des structures appelées « boucles R » (ou R-loop) (Khamlichi et al., 2004; Luby et al., 2001; Shinkura et al., 2003; Zarrin

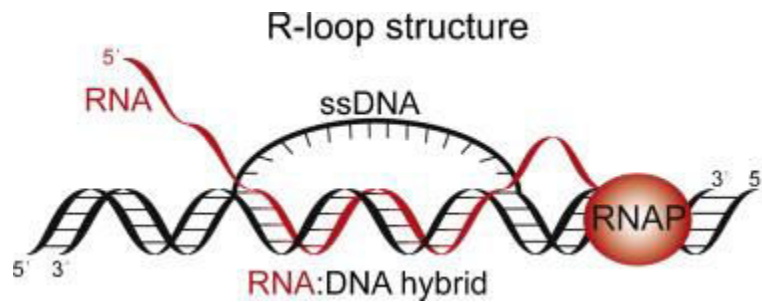


Figure 27 : **Représentation schématique d'une boucle R.** Lors de la transcription d'une région switch, des duplexes ARN/ADN peuvent se stabiliser en une structure appelée R-loop ou boucle R, laissant l'ADN non matrice sous forme simple brin, ainsi accessible à AID (d'après Hamperl S and Cimprich KA, 2014).

et al., 2005, 2008). En effet, lors de la transcription de ces régions S, des hybrides ADN-ARN vont se former et stabiliser ces « *R-loops* » dans lesquelles le brin non-matrice d'ADN va être isolé et rendu accessible à AID (**Figure 27**) (Odegard and Schatz, 2006). La richesse en G du brin matrice est essentielle pour maintenir ces structures stables (Zhang et al., 2014) d'où l'importance de l'orientation des régions S, une inversion de celle-ci conduisant à une inhibition de la CSR (Daniels and Lieber, 1995; Kinoshita et al., 1998; Yu et al., 2003; Zarrin et al., 2004).

- La transcription germinale et sa régulation

La transcription des régions S joue un rôle essentiel pour le recrutement de AID (Stavnezer-Nordgren and Sirlin, 1986). Cette transcription dite « germinale » a lieu à partir d'un promoteur I dont l'activité ne sera enclenchée qu'en présence des cytokines requises. Les Tfh présents dans le GC vont ainsi orienter la CSR en sécrétant les cytokines requises. Par exemple, l'IFN γ entraîne l'activation de STAT1, STAT2 et T-bet qui promeuvent la transcription de l'unité γ 2a (Xu et al., 2012). En même temps, l'IFN γ , cytokine à profil Th1, inhibe la production d'IL4, cytokine Th2, par les Tfh (Schroder et al., 2004). Cela conduit à une CSR vers IgG2a au détriment d'autres isotypes. A contrario, l'IL4 inhibe la CSR vers IgG3, IgG2a et IgG2b au profit d'IgG1 et IgE (Berton et al., 1989; Snapper and Paul, 1987) en induisant l'activation de STAT6 qui activera directement le promoteur I γ 1 et lèvera l'inhibition exercée par Bcl6 sur le promoteur I ϵ (Oettgen, 2000; Xu et al., 2012). Cette transcription germinale, initiée par le promoteur I, s'étend jusqu'à l'exon codant la chaîne lourde. Les transcrits matures générés suite à l'épissage des transcrits primaires vont refléter l'activité d'une unité transcriptionnelle. Ces transcrits non codants sont probablement éliminés rapidement par les mécanismes de surveillance des ARN (Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). Cependant, l'épissage de ces transcrits a été montré comme essentiel pour la CSR puisqu'en l'absence du site donneur d'épissage le switch isotypique est aboli (Hein et al., 1998; Lorenz et al., 1995). Le recrutement de la machinerie d'épissage serait un élément indispensable puisque des travaux ont montrés que PTBP2 (*polypyrimidine tract binding protein 2*), le régulateur de l'épissage, en plus d'interagir avec AID permet son recrutement au niveau des régions S (Nowak et al., 2011). La transcription initiée au niveau des promoteurs I va être aussi permise grâce à une série d'éléments *cis*-régulateurs dépendant de l'activation des cellules B. Si l'enhancer E μ a longtemps été soupçonné d'être essentiel à la transcription de la région donneuse S μ , il est maintenant démontré que son influence n'est que limitée (Perlot et al., 2005; Pinaud et al., 2001). Par contre, la région régulatrice 3'RR apparait aujourd'hui comme le principal élément *cis*-régulateur du locus IgH au cours de la CSR (Pinaud et al., 2001). Cette grande région, très étudiée au sein de notre laboratoire est composée de quatre *enhancers* (hs3a, hs1,2, hs3b et hs4) et trois *isolateurs* (hs5, hs6, hs7) qui contrôlent l'expression des chaînes lourdes et plus particulièrement la transcription du locus IgH. Des KO des différents éléments la composant ont été réalisés mais n'ont montrés que peu d'effets

individuellement (Bébin et al., 2010; Cogne et al., 1994; Manis et al., 1998; Morvan et al., 2003; Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009). Par contre, l'action synergique des quatre enhanceurs est nécessaire pour les événements de CSR et de SHM (Pinaud et al., 2011). En effet, les souris pour lesquelles plusieurs éléments ou la totalité de la 3'RR ont été délétés présentent un défaut de CSR et/ou de SHM (Pinaud et al., 2001; Rouaud et al., 2013; Vincent-Fabert et al., 2010b). Cette absence de CSR peut s'expliquer par l'effet délétère de l'absence de la 3'RR sur la transcription du locus IgH en général et des transcrits germinaux en particulier. Excepté pour I γ 1 qui reste détectable, associé à une faible CSR vers IgG1, tous les autres transcrits germinaux sont drastiquement réduits (Vincent-Fabert et al., 2010b). Cependant, l'absence de SHM est plus complexe à comprendre, la transcription des régions V n'étant que faiblement diminuée malgré une absence totale de SHM (Rouaud et al., 2013). Cela révèle qu'au-delà de l'effet sur la transcription, la 3'RR pourrait jouer un rôle dans le recrutement de la machinerie de réparation et/ou l'organisation tridimensionnelle du locus, facilitant le phénomène de SHM et possiblement, celui de CSR (Wuerffel et al., 2007). L'article 1 de ce manuscrit, actuellement en révision dans *Nature Communications*, décrit un modèle qui permet d'apporter une lumière nouvelle sur le rôle de la transcription et des éléments *cis*-régulateurs dans l'induction de la CSR.

- Génération des cassures double-brin

Une fois la transcription induite et les *R-loops* en place, les régions S vont être accessibles à AID. Selon le même mécanisme que pour la SHM, AID va transformer des C en U par déamination, ce qui va générer des mutations. Ces mutations qui ont lieu sur les deux brins sur des régions riches en G et C peuvent générer des DSB nécessaire à la CSR. Les motifs géniques sont cependant différents de ceux reconnus dans la SHM. Il s'agit essentiellement de motifs RGYW, sur-représentés dans les régions switch. Une fois les mésappariements induits, la principale voie de prise en charge de ces erreurs va se faire par le BER, en commençant par éliminer les uraciles nouvellement générés par UNG (Schrader et al., 2005). Contrairement à ce que précédemment décrit pour la SHM, cette fois-ci les sites abasiques vont être les cibles des endonucléases APE1 et APE2 (APurinic/APyrimidic) qui vont convertir les cassures simples brins. Les deux brins d'ADN étant ciblés, lorsque deux cassures sont assez proches, elles peuvent former une DSB, dans un premier temps qualifiée de décalée, qui sera ensuite convertie en franche (Guikema et al., 2007). Cependant, si les cassures sont trop éloignées et de façon minoritaire, la voie du MMR va pouvoir entrer en jeu (Stavnezer and Schrader, 2006). Comme pour la SHM, le complexe MSH2/MSH6 va reconnaître le mésappariement et recruter l'hétérodimère MLH1/PMS2 et EXO1, qui vont respectivement éliminer l'uracile et induire une cassure simple brin jusqu'à en trouver une autre qui permettra ainsi la génération de DSB.

L'émergence de ces DSB induit la mise en place de mécanismes de réparations ubiquitaires grâce à la "réponse aux dommages à l'ADN" dit DDR (*DNA Damage Response*), qui va permettre le recrutement

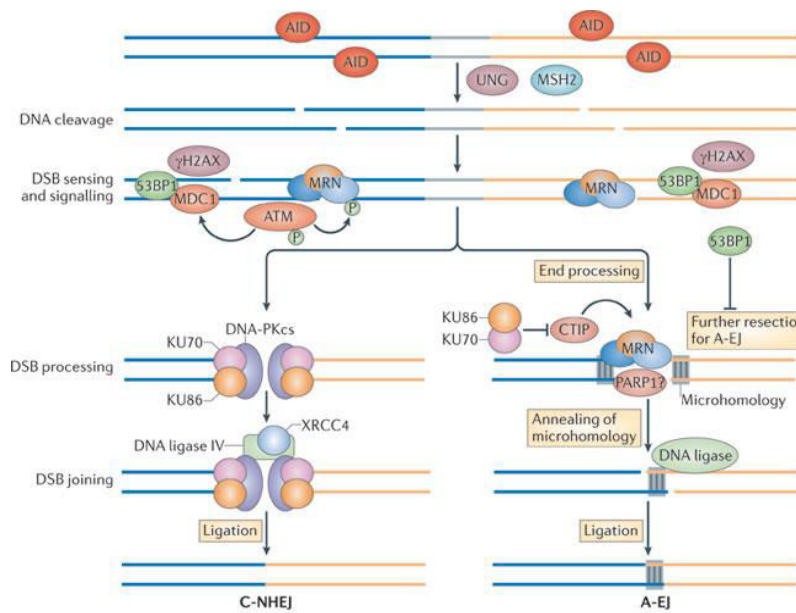


Figure 28 : **Représentation schématique du mécanisme de CSR.** AID induit les cassures doubles brins dans les régions switches à rapprocher. Une fois les cassures créées, la machinerie de réparation va se mettre en place, soit par le mécanisme de C-NHEJ (gauche du schéma), soit par le mécanisme de A-EJ (droite du schéma) (d'après Casali *et al.*, 2012).

des acteurs des machineries de réparation du C-NHEJ ou du A-EJ (**Figure 28**). Le premier point est donc la prise en charge des DSB par la machinerie DDR. Un des acteurs principaux de cette voie est H2AX (*histone 2A family member X*), et plus particulièrement sa forme activée suite à la phosphorylation de sa sérine139, nommée γ H2AX, qui forme des foci au niveau des DSB, de part et d'autre de la cassure (Franco et al., 2006). Cette phosphorylation est réalisée par les kinases suivantes ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM-Rad3-related*), et DNA-PKcs (*DNA-dependent serine/threonine protein kinase, catalytic subunit*) (Manis et al., 2002; Pan-Hammarstrom et al., 2005; Reina-San-Martin et al., 2004). Ces kinases sont elles-mêmes activées par le complexe MRN (*Mre11, Rad50, Nbs1*) (Dinkelman et al., 2009; Peterson et al., 2001). Ce complexe MRN aurait également un rôle dans la formation de la synapse entre les deux régions S (Celeste et al., 2003; Reina-San-Martin et al., 2003). L'apparition des foci γ H2AX va permettre la formation de foyers de réparation qui vont stabiliser ces DSB et recruter les molécules des voies de réparations du NHEJ. Principalement c'est la voie du NHEJ classique, commune aux réarrangements V(D)J, qui va permettre la recombinaison entre deux régions S sans utiliser d'homologies de séquences (ou dans certains cas de petites microhomologies de 1 à 3pb) au niveau des cassures. Quatre éléments ont été montrés comme étant les clefs de ces mécanismes de réparation, Ku70, Ku80, DNA Ligase IV (LigIV) et XRCC4 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4*), leur absence pouvant diminuer de 50% la CSR (Boboila et al., 2010). En effet, le complexe XRCC4/LigIV va être recruté au niveau de la synapse S-S et ligaturer les deux brins (Stavnezer et al., 2008), mais cette résolution n'est possible que grâce à la protection des extrémités par l'hétérodimère Ku70/Ku80 (Nussenzweig et al., 1996). Ces deux protéines vont interagir avec la kinase DNA-PKcs, et ainsi former l'holoenzyme DNA-PK qui va phosphoryler d'une part Ku70 et Ku80 et d'autre part XRCC4. Cependant, les données concernant l'importance de l'activité kinase de DNA-PKcs durant la CSR ne sont pas consensuelles. En effet, des études utilisant le modèle de souris *scid* (*severe combined immunodeficiency*), dans lequel le domaine kinase de DNA-PKcs est non-fonctionnel, ne montrent pas les mêmes pourcentages de diminution de CSR, ces derniers étant globalement moins important que pour le modèle de délétion (Bosma et al., 2002; Cook et al., 2003). Malgré tout la DNA-PKcs pourrait avoir un rôle pour le recrutement de facteurs indispensables à la recombinaison. Une voie supplémentaire existe est pourrait expliquer en partie la compensation de l'absence d'activité de la DNA-PK comme des quatre acteurs clefs cités précédemment (Boboila et al., 2010; Han and Yu, 2008; Nijnik et al., 2009; Soulas-Sprauel et al., 2007), il s'agit de l'A-EJ (Yan et al., 2007). Les recombinaisons des régions S sont dans ce cas résolus grâce à la présence de microhomologies, cependant les mécanismes moléculaires entrant en jeu sont pour l'instant mal connus, même s'il semble être dépendant du complexe MRN (Xu et al., 2012), mais aussi de PARP-1 (*polyADP-ribose polymerase I*), XRCC1 (*X-ray cross complementing 1*), CTIP (*CTBP-interacting protein1*) et des ligases I et III (Audebert et al., 2004; Robert et al., 2009; Saribasak et al., 2011; Lee-Theilen et

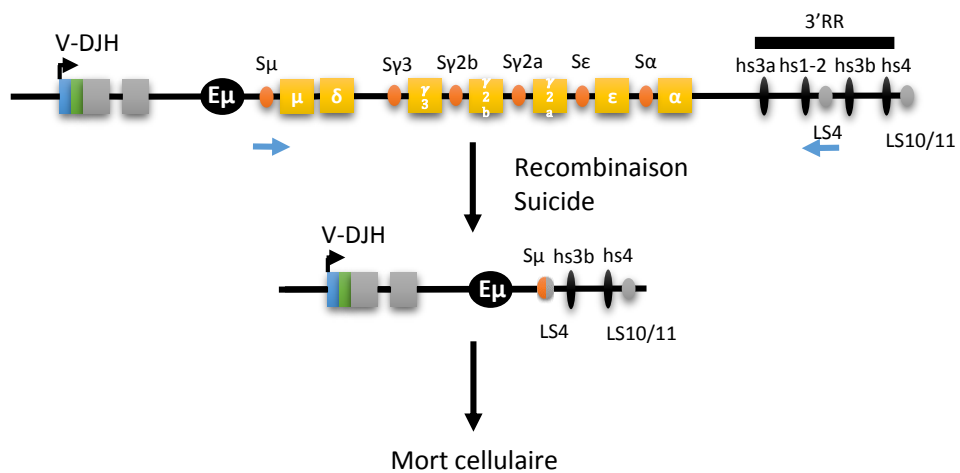


Figure 29 : **Représentation schématique d'une recombinaison suicide entre les régions Sμ et LS4.** La recombinaison suicide, a lieu dans l'exemple ci-dessus, entre les régions Sμ et LS4 (schématisé par les flèches bleu). Cette recombinaison induit la perte de toutes les régions constantes du locus des chaînes lourdes d'Ig, aboutissant ainsi à la perte de l'Ig de surface et donc à la mort cellulaire.

al., 2011). Enfin l'A-EJ serait le mécanisme de recombinaison préférentiellement mis en jeu lors des translocations impliquant le locus des chaînes lourdes de l'Ig (Yan et al., 2007).

2.2.3.7 Quelques mots sur le phénomène de « Recombinaison Suicide »

Récemment, un nouveau mécanisme a été découvert, il s'agit de la "LSR" (pour *Locus Suicide Recombination*). Tout d'abord, des séquences répétitives ressemblant aux régions S et ciblées par AID ont été identifiées dans la 3'RR et ont été nommées région LS (*Like-Switch*) (Chauveau et al., 1998; Sepulveda et al., 2005). Il s'avère qu'un processus similaire à celui observé dans la CSR est possible entre la séquence S μ et ces séquences LS situées dans la 3'RR (**Figure 29**). Ces recombinaisons induisent la délétion complète de l'ensemble des gènes constants de la cellule B rendant l'expression d'une chaîne lourde d'Ig impossible. Ainsi, les cellules B privées de leur BCR complet sont vouées à une mort certaine, du fait de l'absence de signal constitutif de la part du BCR (Péron et al., 2012). Pour l'instant, les mécanismes conduisant à la LSR ne sont pas identifiés, cependant il est possible que des mutations, rendant par exemple le BCR autoréactif, puissent pousser la cellule B à se suicider par ce mécanisme.

2.3 La sortie des centres germinatifs : plasmocytes et lymphocytes B mémoires

Deux grandes populations de la lignée B vont émerger lors d'une réponse immunitaire, les cellules B mémoires et les plasmocytes.

Les plasmocytes représentent le stade ultime de différenciation de la lignée B. Ils sont les effecteurs de l'immunité humorale grâce à leur capacité à produire les anticorps. Ils se distinguent des autres cellules de la lignée B en perdant l'expression des marqueurs B spécifiques tels que le B220 et le CD19 et en exprimant des marqueurs qui leurs sont spécifiques comme le CD138 (ou syndecan 1). Leurs exceptionnelles capacités de sécrétion d'anticorps sont permises grâce à un réticulum endoplasmique (RE) particulièrement surdéveloppé, qui va faire de ces cellules des usines de production d'Ig. Les plasmocytes seront pour la grande majorité à courte durée de vie (durée estimée à quelques jours), mais certains perdureront plusieurs années dans des niches de la moelle osseuse et participeront à la mémoire humorale en sécrétant constamment des anticorps.

Le second type de cellules B qui participe à la mémoire, sont les cellules B dites "mémoires". Ces cellules présentent des BCR à leur surface, très affins vis-à-vis d'un antigène et vont perdurer de nombreuses années dans l'organisme. En cas de réinfection par l'antigène dont elles sont spécifiques, ces cellules vont rapidement se réactiver et participer à la réponse immunitaire.

Les mécanismes à l'origine du choix entre différenciation B mémoires ou plasmocytes ne sont pas à ce jour réellement élucidés, mais deux grands points semblent critiques pour la prise de cette décision : la résistance à l'apoptose et l'affinité de l'Ig pour son ligand.

2.3.1 Les lymphocytes B mémoires

La définition précise des cellules B mémoires est encore à ce jour relativement floue. Pendant longtemps, les cellules B mémoires étaient considérées comme des cellules à longue durée de vie, exprimant un isotype différent de l'IgM et possédant des traces d'une maturation d'affinité acquise dans les GC. Puis le marqueur cellulaire, CD27 chez l'homme en particulier, a permis de montrer qu'une part non négligeable de B mémoires exprimaient une IgM mutée dont une partie n'est pas passée par des GC (Weill et al., 2009). Il semble de plus que le CD27, considéré pendant longtemps comme spécifique des cellules B mémoires chez l'homme, ne permette pas de toutes les identifier (pour revue : Good-Jacobson and Shlomchik, 2010). Chez la souris, une complexité supplémentaire vient s'ajouter puisqu'aucun marqueur membranaire fiable ne permet de différencier ces cellules du pool de cellules B naïves. Ainsi, la majorité des études menées sur les cellules B mémoires ont longtemps été basées sur la simple apparition de cellules IgG+ capables de lier un Ag modèle (NP, OVA ou HEL entre autres) suite à une immunisation.

Pendant, ces modèles ont permis d'élucider certaines questions sur l'origine de ces cellules. Les cellules B mémoires sont ainsi sélectionnées sur leur capacité à résister à l'apoptose, après une sélection positive dans le GC. Des travaux ont montré qu'une expression renforcée de Bcl2 permet d'avoir environ vingt fois plus de cellules B mémoire que la normale, sans variation du nombre de plasmocytes à longue durée de vie (Smith et al., 2000). Deuxièmement, l'affinité du BCR pour l'Ag semble également contrôler cette prise de décision. Le même modèle de surexpression de Bcl2 a permis de mettre en évidence que les plasmocytes possèdent des Ig plus affines que les lymphocytes B mémoires (Smith et al., 2000). Les résultats de l'équipe de Robert Brink vont dans ce sens également avec diverses immunisations HEL (pour *Hen Egg Lysozyme*), induisant une réponse immune T-dépendante, qui ont permis de voir que seules les cellules B présentant la meilleure affinité possible peuvent se différencier en plasmocytes (Phan et al., 2006). Plus récemment, des modèles de traçages cellulaires ont non seulement confirmés ces données, en montrant que les cellules mémoires présentaient majoritairement des affinités moindres que les plasmocytes, mais aussi mis en évidence un ensemble de sous-populations de cellules B mémoires dont les fonctionnalités divergent (Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011). Ainsi, des cellules B mémoires IgM+ ayant subi peu de mutations sont retrouvées accompagnées de cellules switchées possédant majoritairement plus de mutations et d'affinité pour leur Ag. Suite à une seconde immunisation, les cellules mémoires IgM+ vont essentiellement reformer rapidement des GC au sein desquels elles vont subir un nouveau *round* de maturation d'affinité et de CSR. Les cellules B mémoires switchées vont quant à elles se différencier rapidement en plasmocytes sans reformation apparente de nouveaux GC (Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011). Tandis que le pool de cellules B mémoires switchées semble diminuer avec le temps, les cellules B mémoires IgM+ formeraient un réservoir de cellules prêtes à reformer rapidement des GC

lors d'une immunisation secondaire (Pape et al., 2011). Une autre donnée intrigante vient de l'analyse de la polyréactivité des Ig issues de cellules B mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie. Si les derniers présentent très peu d'Ig auto- ou poly-réactives, les Ig des cellules B mémoires sont beaucoup plus fréquemment associées à de la poly- ou auto-réactivités que celles des plasmocytes à longue durée de vie (Scheid et al., 2011).

Toutes ces données vont dans le sens que ces cellules B mémoires n'auraient pas reçues tous les signaux nécessaires à leur différenciation en plasmocytes, mais ont malgré tout réussi à conserver la capacité de se réactiver et de se différencier ultérieurement en plasmocytes, en réponse à une autre stimulation. Ainsi, si le contrôle de la différenciation plasmocytaire est relativement bien élucidé (et détaillé dans le prochain paragraphe), celui de la différenciation en B mémoires est encore totalement inconnu et pourrait n'être en fait qu'un évènement stochastique de cellules ayant reçu les signaux suffisants pour sortir du GC et survivre mais pas suffisant pour induire leur différenciation en plasmocytes.

2.3.2 Les Plasmocytes

2.3.2.1 La différenciation plasmocytaire

Dans cette partie nous aborderons la régulation de la différenciation plasmocytaire dans le GC ainsi que le « switch » du programme transcriptionnel permettant le passage de la cellule B aux plasmocytes.

- La régulation de la différenciation plasmocytaire

Comme nous venons de la voir, la différenciation plasmocytaire dans les GC ne concerne qu'un petit nombre de cellules ayant acquis des BCR non autoréactifs de hautes affinités pour l'Ag. Le contrôle de cette différenciation passe très certainement par une combinaison de signaux fournis entre autres par les FDC, les Tfh mais aussi par le signal optimal du BCR ainsi qu'un ensemble de cytokines sécrétées par tous ces acteurs (Shlomchik and Weisel, 2012).

Certaines cytokines peuvent moduler la différenciation en plasmocytes. Cependant, il est difficile de déterminer avec précision le rôle de chacune d'entre elles *in vivo*. Dans un modèle de culture de cellules de GC humaines, il a été montré que l'IL10 promeut la différenciation en plasmocytes plutôt qu'en cellules B mémoires (Choe and Choi, 1998). L'IL21, sécrétée par les Tfh, est cruciale pour la réaction du GC et semble aussi impliquée dans la différenciation plasmocytaires puisque le blocage de l'IL21R *in vivo* résulte en une diminution du nombre de plasmocytes (Kuchen et al., 2007). De même, en utilisant un modèle de reconstitution avec des lymphocytes B IL21R^{-/-}, il a été montré que l'IL21 semble également agir directement sur les cellules B du GC pour promouvoir leur différenciation en plasmocytes plutôt qu'en B mémoires (Zotos et al., 2010). Dans un modèle de génération *in vitro* de

plasmocytes à partir de lymphocytes B de sang humain, l'équipe de Thierry Fest a aussi montré que la prolifération induite par l'IL2 était requise pour la différenciation (Le Gallou et al., 2012).

Le signal du BCR joue aussi un rôle dans la différenciation plasmocytaire. Si de nombreux travaux ont mis en évidence que des isotypes autres que IgM facilitaient, ou du moins, accélèrent la différenciation plasmocytaire (Dogan et al., 2009; Duchez et al., 2010; Martin and Goodnow, 2002; Pape et al., 2011) les raisons de ce phénomène sont encore mal comprises. L'étude de la signalisation du BCR « switché » a conduit à des résultats quelques peu contradictoires, certains montrant que la partie intracellulaire des IgG ou IgA augmentait le signal basal du BCR (Duchez et al., 2010), d'autres au contraire qu'elle entraînait une activation moindre des gènes répondant à la liaison du BCR (Horikawa et al., 2007). Les données de ce dernier modèle ont fait émerger l'hypothèse du "*less-is-more*" selon laquelle un signal moindre du BCR permettrait une meilleure différenciation plasmocytaire. Récemment, il a également été montré que la transduction du signal BCR des lymphocytes B du GC est inhibée par une forte activité de phosphatases et ce, même après liaison du BCR, contredisant le fait qu'une forte signalisation était nécessaire pour la différenciation plasmocytaire (Khalil et al., 2012). Toujours sur ce même principe de « *less-is-more* », nous avons récemment publié des travaux montrant, dans un modèle dans lequel le BCR est remplacé par la protéine de l'EBV LMP2A, connue pour mimer le signal BCR, qu'un faible signal BCR basal favorisait la différenciation plasmocytaire tandis qu'un signal basal fort bloquait totalement la différenciation (Lechouane et al., 2013). Ce blocage de la différenciation par une signalisation BCR soutenue avait préalablement été montrée dans un modèle d'exposition constante à un antigène (Grandien et al., 1993; Rui et al., 2006) et est aussi observé lors de stimulation *in vitro* utilisant un anti-BCR. En fait, une signalisation trop forte et soutenue du BCR correspond aux conditions rencontrées lors de la formation d'un BCR auto-réactif et serait donc un signal négatif de différenciation (Rui et al., 2006).

Ainsi, il est difficile de conclure sur le rôle précis du signal BCR dans la différenciation plasmocytaire. Les données actuelles semblent en apparence contradiction avec d'un côté, la nécessité d'une forte affinité et de l'autre, le rôle inhibiteur d'une stimulation du BCR. Il semble évident que le lieu, la durée de la stimulation ainsi que l'environnement cellulaire et cytokinique sont déterminants dans ce processus. Les signaux requis pour la différenciation en plasmocyte sont ainsi loin d'être déterminés, le rôle individuel de chacun d'entre eux étant difficile à établir de part la complexité des interactions qui participent à la réponse immunitaire B.

- Le « switch » du programme transcriptionnel

Comme nous l'avons vu précédemment, les plasmocytes perdent les caractéristiques B au cours de leur différenciation, tels que l'expression du BCR de surface, du B220 ou du CD19. Cette perte d'expression est causée par une modification du programme transcriptionnel et notamment une

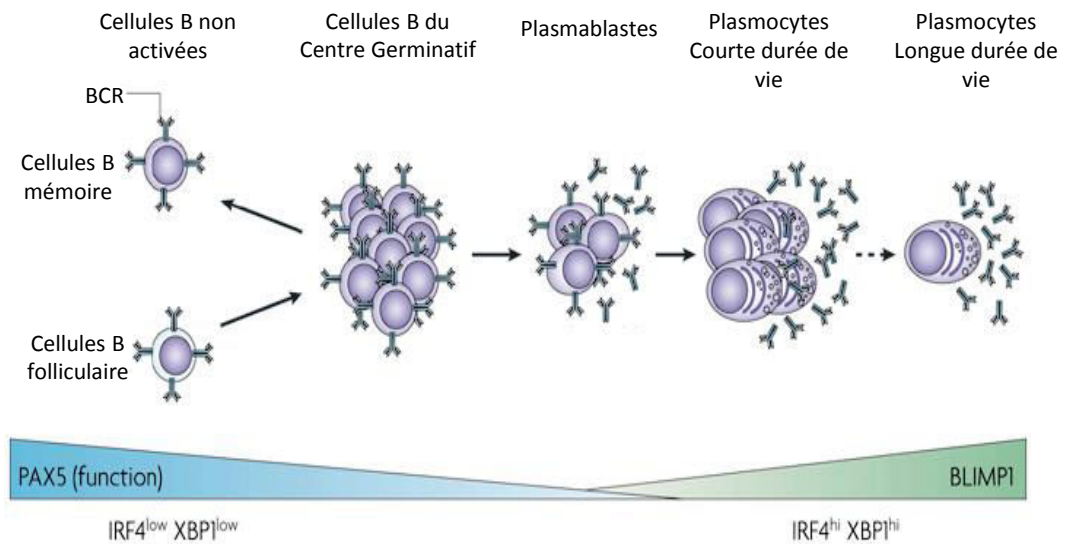


Figure 30 : **De la cellule B aux plasmocytes.** Les différents intermédiaires de la cellule B aux plasmocytes. Les cellules B folliculaire, une fois activées, vont former les centres germinatifs. A l'issue des différents processus du centre germinatif la cellule va devenir soit une cellule B mémoire, soit un plasmablaste. Ce plasmablaste deviendra dans un premier temps un plasmocyte à courte durée de vie, et parmi ceux-là certains deviendront des plasmocytes à longue durée de vie. Tout au long de cette différenciation l'expression de Pax5 diminue, à l'inverse de celle de Irf4, Xbp1 et Blimp1 qui augmente jusqu'à l'établissement du plasmocyte en tant que tel (d'après Kallies *et al.*, 2007).

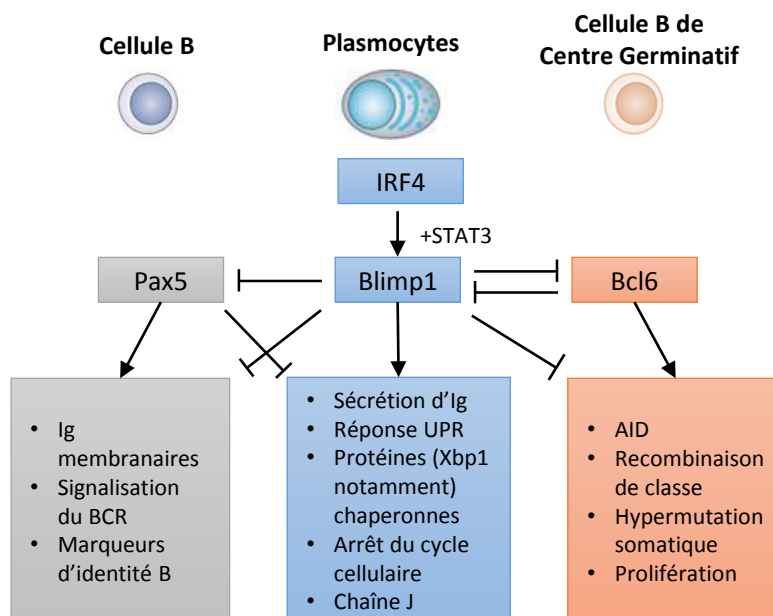


Figure 31 : **Représentation schématique des principales modifications transcriptionnelles lors de la différenciation plasmocytaire.** Blimp1, le master régulateur des plasmocytes, est réprimé par les cellules B ainsi que dans les centres germinatifs, respectivement par Pax5 et Bcl6. Une fois le choix de la différenciation plasmocytaire fait, IRF4, hautement exprimé, en association avec STAT3, va permettre l'expression de Blimp1 qui induira l'expression des principaux marqueurs plasmocytaires, tout en inhibant l'expression des principaux marqueurs B et de centre germinatif.

diminution drastique de l'expression du facteur de transcription principal des cellules B, Pax5 (Nera et al., 2006), associée à l'induction du facteur de transcription Blimp1, considéré comme le facteur essentiel du plasmocyte. Ces deux facteurs de transcription sont connus pour s'exclure mutuellement, la différenciation plasmocytaire dépendra donc de la balance entre ces deux programmes (**Figure 30**). L'inhibition de Pax5 lève la répression de la transcription du locus IgH (Linderson et al., 2004), exercée en particulier sur la 3'RR, celle du locus Igk (Roque et al., 1996), mais aussi celle de l'expression de la chaîne J (Rinkenberger et al., 1996) et de Xbp1 (Reimold et al., 1996), deux protéines spécifiques de la lignée plasmocytaire et dont nous reparlerons. Ainsi, la simple répression de Pax5 a été montrée comme suffisante pour permettre la sécrétion d'IgM dans divers travaux (**Figure 31**) (Delogu et al., 2006; Lin et al., 2002; Nera et al., 2006). Il semble que l'inhibition de Pax5 soit l'évènement primaire de la différenciation plasmocytaire, puisqu'elle arrive avant toutes autres modifications transcriptionnelles (Kallies and Nutt, 2007). Cependant les signaux conduisant à cette diminution de Pax5 ne sont pas connus.

Parallèlement à l'inhibition de Pax5, Blimp1 va être induit et permettre de progresser dans le processus de différenciation plasmocytaire. Blimp1 est LE facteur de transcription des plasmocytes (Angelin-Duclos et al., 2000; Kallies et al., 2004), dont l'expression va être permise par différentes cytokines (IL2, IL6, IL21 notamment) et facteurs de transcription tel que IRF4 (**Figure 31**) (Cattoretti et al., 2006; Klein et al., 2006; Shaffer et al., 2000; Tunyaplin et al., 2004). La présence de Blimp1 est essentielle pour l'établissement du plasmocyte mature et pour la sécrétion d'Ig qui lui est associée (Shapiro-Shelef et al., 2003, 2005). Des études ont montrées que la surexpression de Blimp1 dans des lymphocytes B était suffisante pour induire la sécrétion d'IgM (Turner et al., 1994). En effet Blimp1 réprime l'expression de Pax5 (Lin et al., 2002; Nera et al., 2006), du CMH, de c-myc et de Bcl6 (Calame et al., 2003), ce qui provoque une perte de l'identité B et un arrêt de la prolifération (Shaffer et al., 2002a). De plus, Blimp1 induit aussi l'expression du facteur de transcription Xbp1 (*X-box binding protein 1*), permise par ailleurs par la levée d'inhibition due à la perte de Pax5. Cette expression va permettre la production et la sécrétion de très grandes quantités d'anticorps (Shaffer et al., 2004) notamment grâce à la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*), à laquelle une partie de ce chapitre sera consacrée. Bien que l'absence de Xbp1 ait dans un premier temps été décrite comme délétère pour la différenciation plasmocytaire (Hu et al., 2009; Reimold et al., 1996), des travaux plus récents ont démontrés que l'établissement des plasmocytes était possible en absence de Xbp1. Cependant ces plasmocytes présentent un RE anormalement peu développé et ainsi une quasi absence de sécrétion d'Ig (Taubenheim et al., 2012).

2.3.2.2 Les différentes populations de plasmocytes

Dans le paragraphe précédent, nous avons décrit la différenciation plasmocytaire à l'issue d'une réponse immunitaire induisant un centre germinatif. Mais tous les plasmocytes ne sont pas issus d'une telle structure. Les plasmocytes générés suite à une réponse immune dite T-indépendante, seront alors dit producteur d'anticorps de faibles affinités et auront une durée de vie limitée. Ces plasmocytes à courte durée de vie sont générés suite à une activation du BCR d'une cellule B, par un Ag ou suite à l'activation d'un lymphocyte B par un récepteur innée dit PRR (*Pattern Recognition Receptor*) qui reconnaît des motifs très conservés de pathogènes (Lanzavecchia and Sallusto, 2007). Une réponse rapide se met en place suite à cette activation et le lymphocyte B prolifère et se différencie en plasmocytes sécréteurs d'Ig peu affines. Cette population de plasmocytes est principalement retrouvée dans la cavité péritonéale et dans la pulpe rouge de la rate. Cependant des plasmocytes à courte durée de vie sont également générés lors de réponses T-dépendantes dans les premiers jours de la réponse immunitaire pour combler le laps de temps nécessaire à l'établissement de plasmocytes producteurs d'anticorps de hautes affinités. Ces plasmocytes sont retrouvés hors des GC, dans des foci extrafolliculaires de la rate ou des ganglions lymphatiques et seront capables de produire des IgM ou des IgG (Jacob et al., 1991; Smith et al., 1996).

La migration de ces plasmocytes vers les sites d'infections est permise grâce à divers récepteurs aux cytokines exprimés à la surface des plasmocytes. Par exemple, certains plasmocytes vont être conduits vers les sites d'inflammation grâce à l'IFN γ , qui induit l'expression de CXCR3. Les plasmocytes producteurs d'IgA, issus des ganglions mésentériques ou des plaques de Peyer expriment le CCR9 ou le CCR10, ce qui leur confère leur capacité de migration vers les muqueuses (pour revue : Moser et al., 2006). Ces plasmocytes à IgA, dont le switch est permis grâce à de fort taux de TFG β et d'APRIL, constituent la grande majorité des plasmocytes des MALT (Cerutti and Rescigno, 2008).

Enfin, on distingue une dernière population de plasmocytes, les plasmocytes mémoires. Ils sont générés à la suite d'une réponse immunitaire T-dépendante, ayant induit la mise en place d'un centre germinatif. Ces plasmocytes survivent plusieurs années dans des niches spécifiques de la moelle osseuse, que nous détaillerons dans le point suivant. Cependant la capacité d'accueil des plasmocytes dit "mémoires" dans la moelle osseuse semble limitée, puisque cette population n'excède jamais un certain seuil (de l'ordre du million chez la souris) impliquant probablement une compétition entre les plasmocytes résidents et les nouveaux entrants issus d'une immunisation récente (Radbruch et al., 2006).

2.3.2.3 Localisation et survie plasmocytaire

Dans cette partie nous allons surtout nous intéresser aux plasmocytes issus des GC pouvant devenir des plasmocytes mémoire, dont la survie à long terme sera possible dans des niches spécifiques (**Figure**

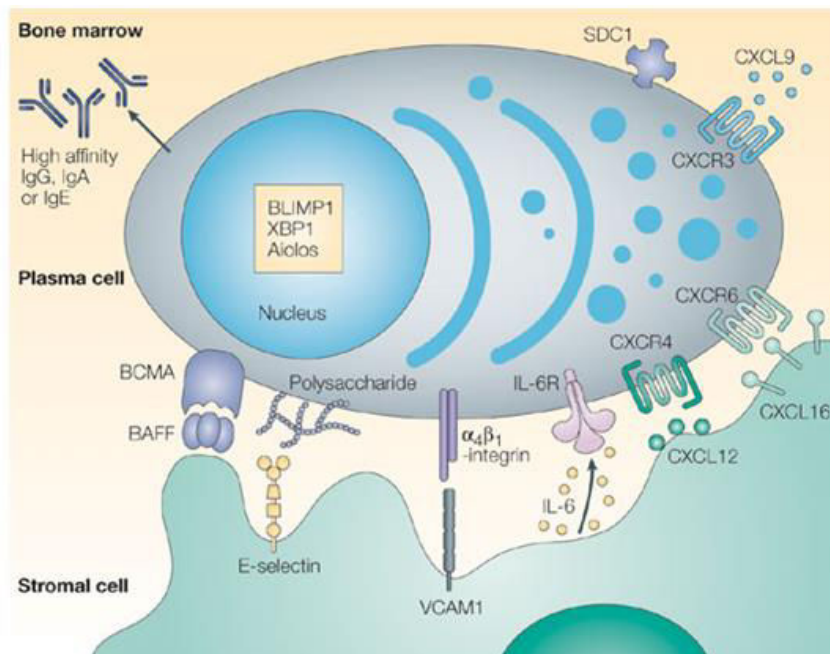


Figure 32 : **Niche de survie plasmocytaire dans la moelle osseuse.** Les plasmocytes issus de GC migrent vers la moelle osseuse, notamment grâce à l'augmentation de l'expression du CXCR4, le récepteur du CXCL12 produit par les cellules stromales. Les E-sélectines et VCAM1 exprimées à la surface des cellules stromales aident à la rétention des plasmocytes dans ces niches. De plus de l'IL6 est produite dans ces niches et facilite la survie des plasmocytes en association avec l'interaction BAFF/BCMA (d'après Shapiro-Shelef M and Calame K, 2005).

32). En pathologie humaine ce sont principalement ces plasmocytes médullaires qui sont impliqués dans la production d'Ig pathogènes, qui font l'objet du chapitre 3.

Majoritairement les plasmocytes sont retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (pour revue : Roth et al., 2014). Très peu de plasmocytes sont détectés dans les GC (Angelin-Duclos et al., 2000). Ils sont alors décrits comme étant localisés de manière adjacente aux GC, à la frontière entre la zone sombre et la zone T. La présence de plasmocytes en très petit nombre dans les GC a aussi été détectée grâce à un modèle de cellules B photoactivables (Victoria et al., 2010). Ce modèle a permis de voir que les plasmocytes semblent générés dans la zone sombre des GC, mais qu'ils regagnent rapidement l'extérieur de ces structures (Meyer-Hermann et al., 2012). A l'heure actuelle, il est admis que le stade plasmablaste précède le stade de plasmocyte mature. Ce stade plasmablaste correspond à un niveau intermédiaire entre la cellule B et le plasmocyte tel que précédemment décrit. Les plasmablastes ont encore la capacité de proliférer et conservent leur capacité de mobilité. Ces cellules commencent à sécréter des anticorps, mais à des niveaux restreints par rapport aux plasmocytes (pour revue : Tarlinton et al., 2008). Ce stade intermédiaire serait caractérisé par un niveau d'expression de Blimp1 graduel. En effet, plus Blimp1 est exprimé et moins les plasmocytes sont mobiles, ainsi seuls les plasmablastes sont capables de se mouvoir (Fooksman et al., 2010). Cette capacité à migrer explique que les plasmocytes, qualifiés de mémoires, soient retrouvés dans la moelle osseuse, donc loin de leur site de genèse, dans des niches qui permettent leur survie. Les plasmocytes mémoires peuvent être issus de réponses T-dépendantes mais aussi T-indépendantes (Bortnick et al., 2012). Cependant la majorité des plasmocytes mémoire, retrouvés dans la moelle osseuse, sont passés par un GC et produisent des anticorps de hautes affinités. Il semble que l'hypothèse la plus réaliste quant à la survie des plasmocytes dans la moelle osseuse ne soit pas due à une capacité intrinsèque de quelques plasmocytes à survivre, mais plutôt à une acquisition de survie dans un contexte d'interaction cellulaire (pour revue : Roth et al., 2014).

Le maintien dans la moelle osseuse est permis grâce à des niches spécifiques qui vont fournir un microenvironnement propice à leur survie à long terme (pour revue : Tangye, 2011). Parmi les facteurs essentiels à leur survie on distingue notamment APRIL et l'IL6 sécrétés par les cellules stromales et certaines cellules de la lignée hématopoïétique tels que les éosinophiles (Chu and Berek, 2012; Chu et al., 2011), les mégacaryocytes (Winter et al., 2010), les neutrophiles (Huard et al., 2008) ou les basophiles (Rodriguez Gomez et al., 2010). APRIL est considéré comme le facteur de survie clef des plasmocytes. En effet, il a été montré que son absence provoque une diminution drastique du nombre de plasmocytes dans la moelle osseuse (O'Connor et al., 2004). Ce microenvironnement est favorisé par la présence des grandes chaînes d'héparanes sulfates qui entourent les plasmocytes et piègent les diverses molécules nécessaires à leur survie (Moreaux et al., 2009).

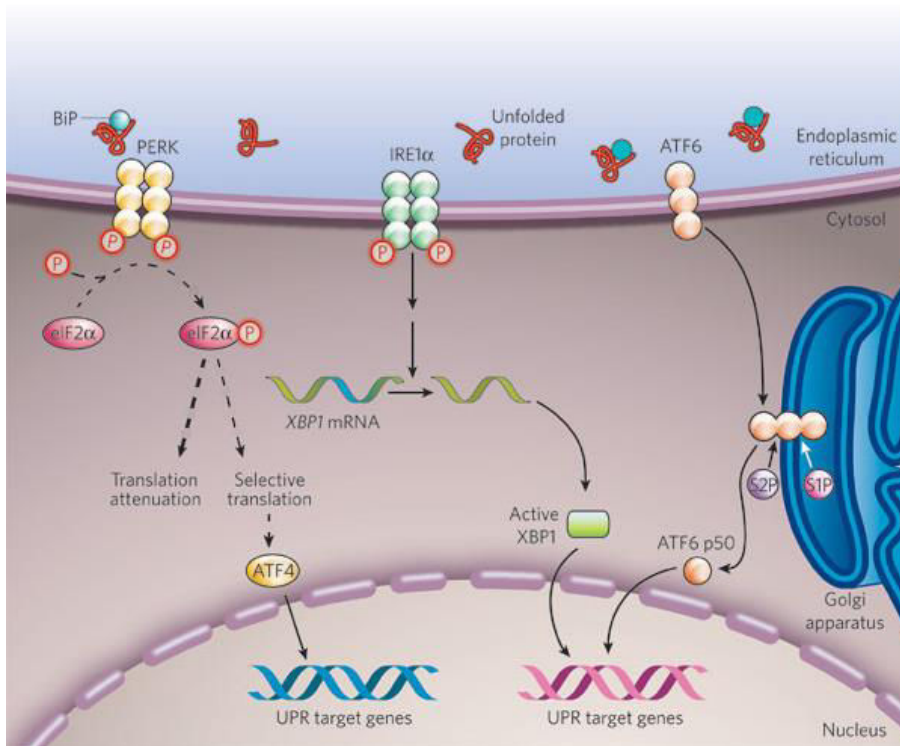


Figure 33 : **La réponse UPR.** Les trois principales voies de l'UPR, ATF6, IRE1 et PERK sont activées suite à la libération de la protéine chaperonne BiP. ATF6 libérée de BiP va être clivée par S1P et S2P, le facteur de transcription ATF6p50 résultant de ce clivage va permettre l'expression de Xbp1 et de diverses protéines chaperonnes (UPR target gene représenté en rose). Parallèlement IRE1, activé va permettre la génération de Xbp1-s, par clivage et re-ligation de l'ARNm de Xbp1, une version plus stable et plus active que son précurseur non clivé. Enfin PERK, voie minoritaire chez les plasmocytes et représentée ici en pointillés, activée va phosphoryler eIF-2α qui sera donc moins actif. La diminution globale de la traduction protéique, va induire une augmentation de la traduction de ATF4, indépendante de eIF-2. ATF4 induira l'expression de divers facteurs de stress et notamment CHOP (UPR target genes représenté en bleu induiront notamment l'induction de l'apoptose, lors d'un stress supplémentaire) (D'après Kezhong Zhang & Randal J. Kaufman 2008).

Enfin l'adhésion des plasmocytes dans leurs niches, se fait par les molécules VLA-4 et LFA-1 qui ont la capacité d'interagir avec divers composants de la moelle osseuse (V-CAM1, fibronectine, osteopontine, les différentes I-CAM(1-2-3)) (DiLillo et al., 2008). La dynamique cellulaire qui s'installe dans ces niches et le renouvellement des différentes populations produisant les cytokines nécessaires à la survie des plasmocytes est la clef de ces niches.

2.3.2.4 Implication de l'UPR dans la production des immunoglobulines

Lors de la différenciation plasmocytaire, nous avons vu que le facteur de transcription Xbp1 était surexprimé suite à l'inhibition de Pax5 et l'induction de Blimp1. Son rôle va être de promouvoir l'expansion du RE, pour pouvoir gérer la forte production d'Ig dans les plasmocytes (Hu et al., 2009; Shaffer et al., 2004). En effet, cette hausse de production va engendrer un stress du RE et déclencher la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*), dont l'une des voies fait intervenir l'endoribonucléase Ire1 α (*inositol-requiring enzyme 1 α*) (**Figure 33**). Comme les autres voies de l'UPR, que nous évoquerons plus loin, l'activité de Ire1 α est induite suite à sa dissociation avec la protéine chaperonne BiP. En effet, normalement, la protéine BiP réprime l'activité de Ire1 α en s'y associant. Cependant, lors d'une accumulation anormale de protéines mal repliées dans le RE, la BiP est réquisitionnée pour prendre en charge ces protéines et va donc se dissocier de Ire1 α permettant son activation. Ire1 α va alors induire l'excision d'une séquence de 26 nucléotides dans l'ARN codant Xbp1, conduisant à un changement de son cadre de lecture et à la synthèse de sa forme plus active Xbp1-s (Calfon et al., 2002; He et al., 2010). Xbp1-s va alors induire la surexpression d'un ensemble de gènes impliqués dans l'expansion du RE, dans l'augmentation des capacités d'assemblage des protéines (avec production de protéines chaperonnes dont BiP), de leur glycosylation ainsi que dans l'augmentation des protéines impliquées dans l'adressage vers la sécrétion (Shaffer et al., 2004). L'expression de ces gènes est à l'origine de la transformation morphologique des cellules B lors de leur différenciation en plasmocytes, passant d'une petite cellule avec peu de cytoplasme à une grosse cellule riche en organites. Toutes les protéines chaperonnes impliquées dans l'assemblage des Ig dans le RE et évoquées dans la partie 1.5.2 de ce manuscrit sont ainsi surexprimées et vont permettre de faire face à la production massive d'Ig des plasmocytes.

La voie de l'UPR Atf6, également régulée par BiP, sera aussi activée dans les plasmocytes et conduira à des effets similaires bien que moins bien détaillés dans la littérature. Par contre, la troisième voie de l'UPR, Perk, est réprimée dans les plasmocytes (Ma et al., 2010). Cette répression s'explique par le fait que cette voie est impliquée dans l'inhibition de la synthèse protéique par phosphorylation du facteur d'élongation eIF2 α ainsi que dans l'activation de la voie pro-apoptotique Chop (Marciniak et al., 2004; Shore et al., 2011), deux actions qui auraient des effets délétères sur la fonction de sécrétion et de survie du plasmocyte.

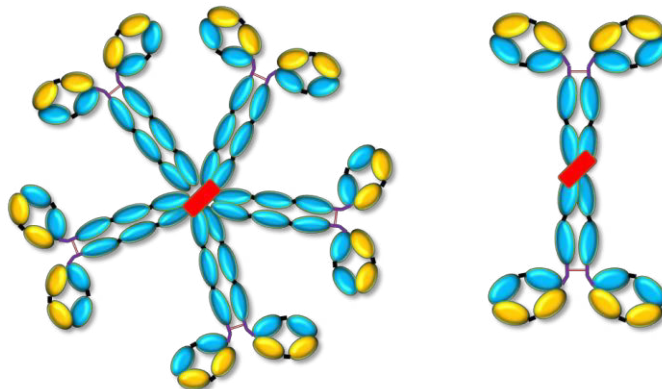


Figure 34 : **Ig polymériques et chaîne J.** Deux types d'Ig peuvent être polymérisées par l'intermédiaire de la chaîne J, les IgA et les IgM. Les IgA dimériques sont reliées par des liaisons covalentes entre les avants-dernières cystéines des domaines $C\alpha3$. Ces liaisons covalentes, des ponts disulfures, sont établis soit directement entre les deux domaines $C\alpha3$, soit par l'intermédiaire de la chaîne J, insérée entre les chaînes lourdes. De même pour les IgM, qui auront la capacité de se pentamériser. La chaîne J permettra de relier deux IgM par leur domaine $C\mu3$, les autres IgM seront quand à elles reliées uniquement par des ponts disulfures inter-chaînes.

Malgré cette régulation très efficace de la production des Ig, les plasmocytes sont exposés à un équilibre précaire du à l'énorme quantité d'Ig produites. Comme dans toute cellule, une partie non négligeable des protéines néo-synthétisées va être constamment dégradée par un organe intimement lié au RE, le protéasome. Le protéasome va prendre rapidement en charge les protéines présentant un défaut. Ce type de protéines, nommé DRiPs (*Defective Ribosomal Product*) pourrait constituer 30% des protéines produites, qui seraient dégradées dans les quelques minutes suivant leur synthèse (Princiotta et al., 2003; Schubert et al., 2000). Les protéines amenées à être sécrétées et présentant un défaut seront maintenues dans le RE où elles seront ubiquitinylées. Elles seront ensuite prises en charge par le mécanisme ERAD (*ER associated degradation*) dont le point d'orgue sera le protéasome (Sitia and Braakman, 2003). Etant donné la quantité importante d'Ig produites par les plasmocytes, ce mécanisme est particulièrement sollicité dans ces cellules. Aussi, les plasmocytes montrent-ils une très forte sensibilité aux inhibiteurs du protéasome, utilisés couramment comme traitement des myélomes (pour revue : Moreau et al., 2012). La diminution de la dégradation par le protéasome provoqué par ces inhibiteurs induit rapidement une accumulation anormalement élevée de DRiPs dans le RE provoquant un stress supplémentaire. Les voies Atf6 et Ire1 α étant déjà largement sollicitées, c'est la voie Perk qui est alors activée et qui va induire l'expression de Chop, conduisant *in fine* à l'apoptose (Meister et al., 2007a; Obeng et al., 2006; Zhou et al., 2014).

Nous verrons dans le prochain chapitre, ainsi que dans l'article 2 de cette thèse, que la structure même de l'Ig produite peut provoquer son accumulation anormale dans le RE et ainsi sensibiliser la cellule aux traitements par les inhibiteurs du protéasome.

2.3.3 La chaîne J

La chaîne J est un petit polypeptide de 15kDa, composé de 137 acides aminés, codés par le gène IgJ, localisé sur le chromosome 4 chez l'homme. Chez la souris, le gène IgJ, situé sur le chromosome 5, est constituée de quatre exons (Matsuuchi et al., 1986). Ce polypeptide est appelé « J » pour *Joining*, puisque son rôle est d'assembler les pentamères d'IgM ou les dimères d'IgA (**Figure 34**). Bien que son rôle soit d'associer les multimères d'IgM ou d'IgA, la chaîne J est également produite par des plasmocytes producteurs d'IgG, IgE ou IgD (Brandtzaeg and Korsrud, 1984). L'absence de chaîne J et donc d'oligomérisation sur ces derniers isotypes, vient du fait que la queue sécrétoire des IgG, IgE et IgD est différente de celle des IgA ou IgM, qui possèdent 18 acides aminés de plus, nécessaires à la liaison de la chaîne J sur leur partie C-terminale (pour revue : Castro and Flajnik, 2014; Johansen et al., 2000).

La chaîne J a plusieurs fonctions. Elle est essentielle pour la sécrétion mucosale des IgA. Le domaine C terminale de la chaîne J s'associe au récepteur poly-Ig (pIgR), à la surface basolatérale des cellules épithéliales des muqueuses, provoquant ainsi la transcytose des dimères d'IgA vers les muqueuses,

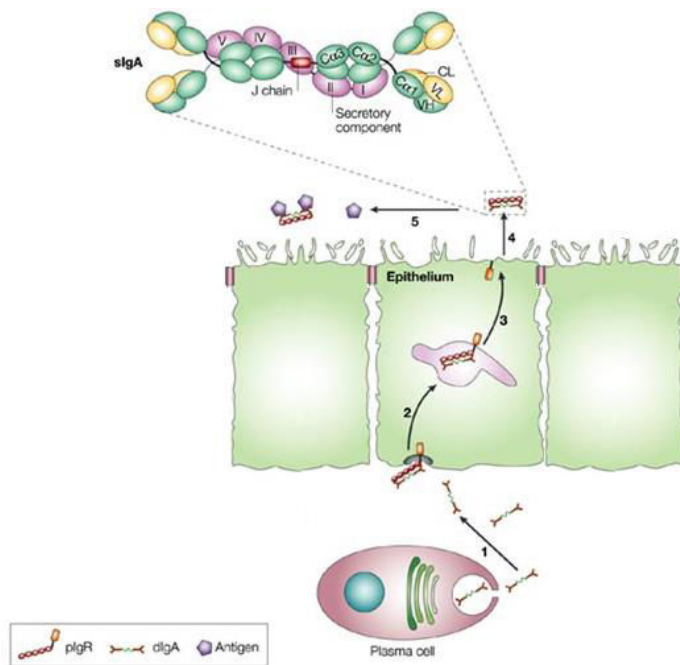


Figure 35 : **Représentation schématique de l'exportation des IgA à la surface des muqueuses.** Les plasmocytes de la lamina propria sécrètent les IgA, dimérisées par l'intermédiaire de la chaîne J (1). Les IgA dimériques vont se lier au récepteur des Ig polypériques (pIgR) situés à la surface basolatérale des cellules épithéliales (2). Une fois la liaison effectuée, les IgA seront acheminées au pôle apical de la cellule, par le mécanisme de transcytose (3). Une fois au pôle apical les IgA dimériques seront libérées suite au clivage de la partie extracellulaire du pIgR. De ce clivage résultera la « pièce sécrétoire », qui restera liée à l'IgA dimérique (4). Une fois dans les muqueuses les IgAs pourront cibler les antigènes dont ils sont spécifiques (5) (d'après Rojas R et al., 2002)

suite à un clivage protéolytique libérant les IgA (**Figure 35**). Ce clivage va induire une coupure dans le pIgR et la partie qui va rester associée au dimère d'IgA va devenir la pièce sécrétoire (Brandtzaeg, 1995, 2009; Lindh, 1975; Lycke et al., 1999). De plus, bien que la chaîne J ne soit pas essentielle à la présence d'IgA ou d'IgM, elle favorise leur stabilité. Un modèle murin de KO de la chaîne J a permis de mettre en évidence que l'absence de ce polypeptide, induit une diminution d'un facteur quatre des IgM sériques, ainsi qu'une oligomérisation non contrôlée avec des formes de tailles indéfinies, qui donc perdent leurs capacités d'activer le complément (Erlandsson et al., 1998). Les mêmes observations ont été faites avec les IgA (Erlandsson et al., 2001). Cependant des travaux sur des lignées cellulaires ont montrés des résultats contradictoires, en mettant en évidence une sécrétion d'IgM polymériques, de haut poids moléculaire (Cattaneo and Neuberger, 1987; Randall et al., 1992) et également un avantage au recrutement du complément (Davis et al., 1988).

La chaîne J a été initialement décrite comme étant exprimée par quasiment tous les plasmocytes humains (Brandtzaeg and Korsrud, 1984) et l'ARNm a aussi été détecté dans des cellules au stade pré-B, même si ces résultats sur lignées cellulaires restent peu convaincants et ne démontrent pas la présence de la protéine (McCune et al., 1981). Chez la souris, il a longtemps été difficile de détecter la chaîne J par absence de réactifs satisfaisants. Au début des années 2000, un modèle dans lequel la sous-unité A de la toxine diphtérique (DTA) a été insérée à la place de l'exon 1 de la chaîne J, a cependant mis en évidence que tous les plasmocytes n'exprimaient pas la chaîne J. En effet, ces animaux présentaient une diminution globale d'Ig sérique, mais pas une abolition totale ce qui suggère qu'une population de plasmocytes n'expriment pas la DTA et donc la chaîne J (Erlandsson et al., 2001).

De manière plus surprenante, la chaîne J a également été décrite dans un sous type de cellules dendritiques exprimant le CD11c (Källberg and Leanderson, 2008; Rissoan et al., 2002), ainsi que dans certaines cellules T matures chez l'homme (Bertrand et al., 1996). Cependant bien qu'une expression ectopique soit parfois décrite, elle reste relativement minoritaire en comparaison à l'expression observée dans les plasmocytes (Lamson and Koshland, 1984). La régulation de son expression, sous l'influence d'un promoteur et d'un enhanceur qui s'étendent sur 7.5kb en amont du site d'initiation de la transcription (Sigvardsson et al., 1993), a été bien décrite et dépend de nombreux facteurs et notamment de la levée d'inhibition de Pax5. En effet Pax5, réprime l'expression de la chaîne J ce qui explique son absence dans les lymphocytes B, puis son apparition lors du développement plasmocytaire (Lamson and Koshland, 1984). L'IL2 et l'IL5, produits par les cellules T et connus pour leur rôle dans la différenciation plasmocytaire, vont également permettre d'inhiber Pax5 et ainsi de lever son inhibition (McFadden and Koshland, 1991; Rinkenberger et al., 1996). De plus, l'IL2 va activer la transcription de STAT5, qui se liera à la région promotrice de la chaîne J et permettra son activation (Cho and Kang, 2005; Lim et al., 2009).

Les propriétés de la chaîne J et notamment son expression décrite majoritairement comme plasmocytaire ont permis au laboratoire d'utiliser ces propriétés pour générer un modèle de suivi plasmocytaire (Annexe 3, article en préparation). Ce modèle nous a ainsi permis d'identifier la chaîne J comme un marqueur précoce de la différenciation plasmocytaire. Les propriétés de ce modèle et notamment la facilité de suivi des plasmocytes ont permis l'écriture de résultats préliminaires présentés dans la partie « Résultats préliminaires et perspectives » (sous partie 1).

Chapitre 3. Les maladies de dépôts d'immunoglobulines monoclonales

Comme nous venons de le voir tout au long de ce manuscrit, le lymphocyte B est une cellule dont le développement est soumis à de nombreux contrôles. Malgré tout, les multiples réorganisations géniques que subissent ces cellules augmentent l'apparition d'anomalies génétiques pouvant aboutir à des situations pathogéniques. Ainsi, il n'est pas rare d'observer des translocations plaçant des oncogènes à proximité des gènes d'Ig. Le puissant effet des activateurs transcriptionnels peut alors induire l'expression de ces oncogènes provoquant ainsi une prolifération (c-Myc, Cyclines, etc...) ou une résistance à l'apoptose (Bcl2, Bcl-XL, etc...) anormale. Associées à d'autres mutations, ces anomalies peuvent alors conduire à un syndrome immunoprolifératif B (Mitelman et al., 2007).

Ces syndromes immunoprolifératifs sont caractérisés par l'émergence d'un clone B anormalement abondant et homogène. Ce clone traduit une prolifération monoclonale de cellules bloquées à un certain stade de la différenciation B. Lorsque cette prolifération concerne un clone de cellules sécrétrices d'anticorps, elle est généralement accompagnée de la production massive d'une Ig de spécificité unique, ou Ig monoclonale. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à certaines maladies provoquées par cet excès de production d'Ig. En effet, il n'est pas rare d'observer une rupture, partielle ou complète, de la stœchiométrie chaîne lourde/chaîne légère, aboutissant à la production en excès d'un fragment d'Ig monoclonale, que des particularités physico-chimiques vont rendre insolubles et prompts à l'agrégation. Ces agrégats peuvent alors précipiter et se déposer au niveau de divers organes, avec une forte prédisposition pour le rein, causant leur dysfonctionnement.

3.1 Un bref aperçu des syndromes immunoprolifératifs B

Les différents syndromes immunoprolifératifs B (ou néoplasies B), décrits à ce jour sont classés selon le stade de maturation du clone incriminé, qui va exprimer en surface (cas des lymphocytes B) ou sécréter (cas des plasmocytes) une Ig unique. Cette règle est à l'origine du caractère monoclonal de l'Ig produite. Quelques exceptions sont toutefois à noter : la macroglobulinémie de Waldenström, dans laquelle le clone proliférant appartient à plusieurs stades de maturation B (du lymphocyte au plasmocyte), et certains lymphomes (Lymphomes folliculaires, lymphomes de MALT) dans lesquels l'expression d'AID et la forte probabilité d'une activation antigénique continue peuvent provoquer des hétérogénéités de séquences des Ig (Du et al., 1996; Smit et al., 2003).

Les classifications des néoplasies B reposent sur des données histologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques, qui ont été par la suite affinées par les analyses de profils transcriptomiques (Shaffer et al., 2002b). Les leucémies B concernent des cellules B circulants abondamment dans le sang et dont l'origine correspond à des stades très précoces de l'ontogénèse B (pro-B, pré-B ou B immatures). Les lymphomes, dont la prolifération a lieu essentiellement dans les organes lymphoïdes périphériques, sont constitués de cellules B matures avec le plus souvent des phénotypes GC ou post-GC détectés en particulier par la présence ou non de mutations somatiques dans les gènes d'Ig. Enfin, les dyscrasies plasmocytaires concernent l'ensemble des proliférations de cellules sécrétrices d'anticorps, généralement localisées dans la moelle osseuse, telles que le myélome multiple et les gammopathies monoclonales de signification indéterminée qui feront l'objet d'une part importante de ce travail. La macroglobulinémie de Waldenström, bien que composée de cellules au phénotype plus hétérogène, rentre aussi dans cette classification des dyscrasies plasmocytaires puisqu'une partie des cellules malignes sont des plasmocytes médullaires sécréteurs d'une Ig monoclonale (Paiva et al., 2015).

3.2. Le myélome multiple et ses dérivés : classification et mécanismes moléculaires

Nous nous concentrerons essentiellement dans ce paragraphe sur le myélome multiple et ses dérivés, myélome indolent et gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS pour « *monoclonal gammopathy of undetermined significance* »).

Le myélome multiple (MM) est le pendant tumoral des plasmocytes à longue durée de vie. Il est ainsi caractérisé par une localisation systématique dans la moelle osseuse et une empreinte post-GC de part la présence de nombreuses mutations somatiques et la très forte proportion de cellules ayant subi la recombinaison de classe (seulement 1% des myélomes sont IgM) (Kuehl and Bergsagel, 2012). Le MM est très logiquement accompagné de la production massive d'une Ig monoclonale avec par ordre décroissant IgG > IgA > chaînes légères seules > IgD > IgM et exceptionnellement IgE. Contrairement aux plasmocytes sains, les cellules de MM conservent un faible potentiel prolifératif qui aboutit à des lésions osseuses, une calcémie élevée, une anémie, une immunodéficience et une atteinte de la fonction rénale (critères « CRAB »)(International Myeloma Working Group, 2003). Ce cancer, qui représente environ 1% de l'ensemble des cancers et 13% des hémopathies malignes, est encore aujourd'hui considéré comme incurable malgré de très gros progrès récents dans les traitements (Röllig et al., 2014a). Les atteintes rénales dues à des dépôts d'Ig monoclonales sont très fréquentes lors des MM et viennent fortement compliquer le pronostic du patient (Drayson et al., 2006; Hutchison et al., 2011).

La présence d'une Ig monoclonale sérique ou d'une protéine dite de « Bence Jones » (chaîne légère monoclonale) dans les urines sont des indicateurs d'une prolifération plasmocytaire sous-jacente. A l'origine, seul le MM était considéré comme symptomatique et pris en charge par chimiothérapie. Cette tendance a fortement évolué aujourd'hui en particulier depuis que le lien a été fait entre les nombreuses atteintes tissulaires et l'Ig monoclonale accompagnant des proliférations plasmocytaires souvent bénignes d'un point de vue tumoral.

Le MM dérive d'entités dites pré-tumorales, myélome multiple indolent (ou asymptomatique) et/ou MGUS. La classification de l'*International Myeloma Working Group* (IMWG) pour définir ces entités est basée sur la quantité d'Ig monoclonales circulantes et le pourcentage d'infiltration plasmocytaire dans la moelle osseuse. Ainsi, MM et Myélome indolents sont caractérisés par une Ig monoclonale > 30g/L et une infiltration médullaire de plasmocytes monotypiques > 10%. A la différence du MM, le myélome indolent est toutefois asymptomatique selon les critères CRAB. Le MGUS est caractérisé par la présence d'une Ig monoclonale < 30g/L et une infiltration médullaire < 10% sans symptômes CRAB (Kyle et al., 2010). L'évolution vers le MM à partir des formes pré-symptomatiques n'est pas systématique bien que pas moins de 10% des myélomes indolents évoluent vers le MM sur une période de 5 ans. Cette évolution est moindre pour le MGUS mais nous verrons que de nombreuses autres pathologies peuvent être associées à ces dyscrasies plasmocytaires (Dispenzieri et al., 2010; Landgren et al., 2009).

Dans tous les cas, il semblerait que certaines anomalies moléculaires primaires, telles qu'une surexpression des cyclines D, soient communes à toutes les formes de prolifération plasmocytaire (Kuehl and Bergsagel, 2012). Cette surexpression (principalement de la cycline D1 mais aussi D3 et D2) peut faire suite à des translocations sur les loci d'Ig, à des hyperdiploïdies ou à des activations de voies induisant les cyclines, telles que les translocations des gènes de la voie MAF. La translocation sur MMSET/FGFR3 est aussi rencontrée assez fréquemment (15% des MM). Les cassures observées lors des translocations mettent les cyclines sous le contrôle d'E μ ou de la 3'RR du locus IgH mais aussi sous le contrôle des activateurs transcriptionnels des loci de chaînes légères d'Ig. Les sites de cassures, assez souvent autour ou dans les régions S, semblent indiquer que ces anomalies apparaissent lors des recombinaisons AID-dépendantes dans les GC. Cependant, certaines cassures semblent indiquer que l'évènement oncogénique primaire a lieu dès les réarrangements V(D)J donc dans des cellules encore très immatures (Walker et al., 2013). Quoiqu'il en soit, des évènements secondaires doivent avoir lieu pour engendrer le processus malin. Des mutations de NRAS, KRAS, BRAF, des dérégulations de MYC ou de la voie NF- κ B semblent ainsi impliquées dans l'évolution d'un MGUS vers le MM (Chesi et al., 2008; Rasmussen et al., 2005).

LC-MGUS ^{*,†}			
	Male, n (%)	Female, n (%)	Total, n (%)
50–59 years	22/3450 (0.6)	14/3717 (0.4)	36/7167 (0.5)
60–69 years	25/2554 (1.0)	15/2776 (0.5)	40/5330 (0.8)
70–79 years	28/1608 (1.7)	15/2242 (0.7)	43/3850 (1.1)
80–89 years	6/577 (1.0)	21/1433 (1.5)	27/2010 (1.3)
Total	81/8189 (1.0)	65/10168 (0.6)	146/18357 (0.8)
[‡] Age-standardized	1.0 (95%CI, 0.8–1.2) [‡]	0.6 (95 %CI, 0.5–0.8) [‡]	--
[§] Age- and sex-standardized	--	--	0.8 (95%CI, 0.7–0.9) [§]
Any MGUS or LC MGUS [*]			
	Male, n (%)	Female, n (%)	Total, n (%)
50–59 years	95/3450 (2.8)	64/3717 (1.7)	159/7167 (2.2)
60–69 years	122/2554 (4.8)	85/2776 (3.1)	207/5330 (3.9)
70–79 years	116/1608 (7.2)	112/2242 (5.0)	228/3850 (5.9)
80–89 years	57/577 (9.9)	118/1433 (8.2)	175/2010 (8.7)
Total	390/8189 (4.8)	379/10168 (3.7)	769/18357 (4.2)
[‡] Age- standardized	5.1 (95%CI, 4.6–5.6) [‡]	3.5 (95%CI, 3.2–3.9) [‡]	--
[§] Age- and sex-standardized	--	--	4.2 (95%CI, 3.9–4.5) [§]

* Abnormal FLC-R with at least one free light chain above the normal range

[†] Excludes patients with intact heavy chain MGUS

[‡] Age-adjusted to the 2000 U.S. total population age 50 years and older

[§] Age- and sex-adjusted to the 2000 U.S. total population age 50 years and older

Figure 36 : Prévalence des MGUS en fonction de l'axe et du sexe. Etude réalisée sur une cohorte de 18357 personnes volontaires du comté de Olmsted dans le Minnesota (Dispenzieri et al. 2010).

Les mécanismes moléculaires et la physiopathologie de la macroglobulinémie de Waldenström sont moins connus. Il s'agit de la seule prolifération clonale concernant des cellules à des stades de différenciation multiples allant du lymphocyte mature au plasmocyte. Il partage avec le MM sa localisation essentiellement médullaire, la production d'une Ig monoclonale et certaines anomalies moléculaires. Cependant, au contraire du MM, l'évènement transformant majeur semble être la mutation de MYD88 retrouvée dans 90% des macroglobulinémies de Waldenström et l'Ig monoclonale est presque systématiquement une IgM (Paiva et al., 2015).

3.3. Les gammopathies monoclonales

Les gammopathies monoclonales accompagnent volontiers toutes proliférations anormales de plasmocytes. Elles résultent de la production excessive d'une Ig monoclonale par un clone plasmocytaire ainsi que, plus rarement, un clone lymphocytaire B dans des cas de lymphomes non-hodgkiniens ou de leucémies lymphoïdes chroniques. Les Ig produites sont les mêmes que précédemment décrites pour le myélome à l'exception d'une proportion d'IgM plus élevée (jusqu'à 20%) due précisément aux macroglobulinémies de Waldenström et aux rares leucémies/lymphomes pouvant provoquer des productions d'Ig. Les gammopathies monoclonales peuvent être malignes, c'est le cas du MM, de la macroglobulinémie de Waldenström et des leucémies/lymphomes, mais des études récentes menées par la Mayo clinique ont mis en évidence une prévalence particulièrement élevée de gammopathies monoclonales dues à des MGUS, avec une prolifération bénigne très souvent asymptomatique. Ainsi, sur une cohorte de 18357 personnes volontaires du comté de Olmsted dans le Minnesota, une MGUS a été découverte chez 4,2% de la population âgée de plus de 50 ans, une proportion qui augmente rapidement avec l'âge pour atteindre 8,7 % de la population de plus de 80 ans (**Figure 36**) (Dispenzieri et al., 2010).

Dans ces cas, même si la prolifération cellulaire n'est pas en elle-même pathogène, l'Ig monoclonale produite par le clone plasmocytaire (ou lymphocytaire) peut avoir des effets dévastateurs. Ainsi, de par leurs propriétés physicochimiques, certaines Ig monoclonales peuvent s'avérer extrêmement toxiques, même à des taux sériques faibles, en particulier suite à leur agrégation et leur dépôt dans différents organes (Merlini and Stone, 2006). Le rein est l'organe le plus fréquemment atteint par ces dépôts d'Ig monoclonales et a conduit à définir récemment une nouvelle entité pathologique : la gammopathie monoclonale de signification rénale (MGRS pour « *monoclonal gammopathy of renal significance* ») (Leung et al., 2012).

La détection des Ig monoclonales se fait généralement par simple électrophorèse des protéines sériques. Le profil obtenu permet d'avoir une appréciation quantitative et qualitative des principaux

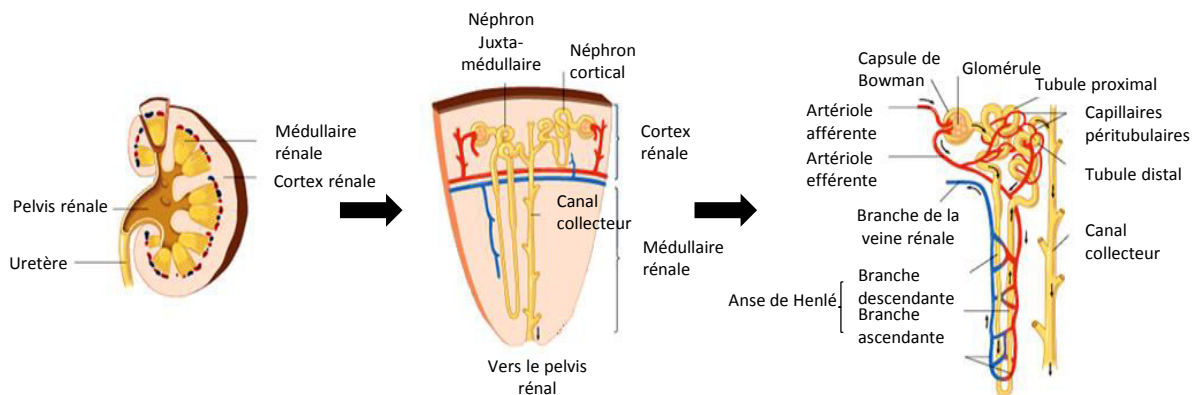


Figure 37 : **Représentation schématique du rein et de ces principales structures.** De la gauche vers la droite, représentation schématique du rein dans son ensemble jusqu'à un néphron. (Gauche) Le rein est composé de deux grandes zones, la médullaire et le cortex rénale. (Milieu) On retrouve dans chaque rein plus d'un million de néphron, l'unité de filtration du rein. (Droite) Zoom sur un néphron, la filtration va se faire tout d'abord dans le glomérule, en fonction de la taille et de la charge des différentes molécules, puis l'urine primitive qui en découle sera acheminée dans les tubules, proximaux et distaux, au sein desquels la réabsorption de différents composants aura lieu. A l'issue de ce tractus, tout ce qui n'a pas été réabsorbé est éliminé via le canal collecteur (d'après <http://www.gopixpic.com/498/how-the-nephron-works-1-dirty-blood-enters-kidney>).

composés sériques et notamment la présence ou non d'une Ig monoclonale. Si cette analyse laisse supposer la présence d'Ig, une immunofixation sera réalisée afin de valider, ou non, la présence d'une Ig, confirmer sa clonalité et déterminer l'isotype de la chaîne lourde et/ou de la chaîne légère associée (Kyle and Rajkumar, 2010). Cette Ig monoclonale peut être entière, c'est-à-dire respecter un rapport stœchiométrique chaîne lourde/légère normale. Cependant, il est presque constant d'observer un excès de chaînes légères libres (FLC pour « *Free Light Chain* ») dû à une rupture partielle (ou totale en cas d'absence de chaîne lourde) de cette stœchiométrie. Cette chaîne légère en excès peut alors être retrouvée dans les urines (protéinurie de Bence Jones) et va aussi conduire à un déséquilibre du ratio κ/λ sérique. En effet, la proportion normale dans le sérum est d'environ 2/3 κ pour 1/3 λ , soit un ratio moyen κ/λ de 0,66. En cas de gammopathie, la chaîne légère monoclonale en excès va modifier ce ratio. Un dosage des FLC est ainsi aujourd'hui classiquement effectué pour le diagnostic mais aussi le suivi après traitement des patients atteints de dyscrasies plasmocytaires (Dispenzieri et al., 2009). Cet excès de FLC monoclonales est à l'origine de la majorité des pathologies associées aux Ig monoclonales, particulièrement celles touchant le rein (Leung et al., 2012; Merlini and Stone, 2006). Un centre de référence national sur ces pathologies (amylose AL et autres maladies de dépôts d'Ig monoclonales), auquel le laboratoire est rattaché, a récemment vu le jour à Limoges et Poitiers.

3.3.1 Quelques mots sur l'architecture et la fonction rénale

La fonction première du rein est de filtrer le plasma sanguin. Environ 180L de plasma est ainsi filtré chaque jour, la majorité étant réabsorbée dans les tubules rénaux. Chaque rein possède en moyenne 1,3 million de néphrons qui constituent les unités fonctionnelles du rein. Chaque néphron est constitué d'un glomérule (le filtre), suivi du tube (ou tubule) contourné proximal, puis de l'anse de Henlé (branche grêle puis épaisse), puis du tube contourné distal qui se vide dans le tubule collecteur (**Figure 37**). Les métabolites et l'eau filtrés par le glomérule sont réabsorbés tout au long du tubule par des mécanismes obligatoires et/ou facultatifs. La filtration du glomérule permet la formation de l'urine primitive par diffusion de l'eau et des constituants du plasma à travers la barrière de filtration glomérulaire. Cette filtration dépend essentiellement de la taille (< 65kDa, soit environ le poids moléculaire de l'albumine) mais aussi de la charge des substances dissoutes (les molécules positivement chargées diffusant mieux) et des gradients de pression. L'urine primitive ainsi obtenue est ensuite acheminée vers les tubules dans lesquels environ 99% du filtrat est réabsorbée. Cette réabsorption concerne principalement les ions, l'eau et le glucose ainsi que les protéines de bas poids moléculaires filtrées par le glomérule, par des mécanismes passifs (diffusion) ou actifs (notamment pour les ions). Toute altération de la fonction rénale, soit par un engorgement du filtre glomérulaire, soit par un dysfonctionnement de la réabsorption tubulaire, soit par un « bouchage » des tubules ou des canaux collecteurs, peut conduire à une insuffisance rénale aiguë ou chronique selon la rapidité

Maladie des dépôts d'Ig dits « organisés »						Maladie des dépôts d'Ig dits « non-organisés » ou amorphes				
Microtubulaires			Fibrillaires			Cristaux	« Randall-type »			« non-Randall » <i>immun complex-like</i>
Cryo type I	Cryo type II	GOMMID	Amylose AL	Amylose AH	Amylose AHL	Synd Fanconi Néphropathie à cylindres myéломateux	LCDD	HCDD	LHCDD	IgG2κ IgG3 (κ ou λ) IgMκ
IgG IgA IgM LC κ ou λ	IgM anti-IgG	IgG1 (κ ou λ) IgG2κ IgG3κ	LC κ ou λ	HC tronquées (IgG1, IgG4 ou IgA)	IgA IgG1	LC κ ou λ	LC κ ou λ	HC tronquées (IgG ou IgA)	LC + HC tronquées	

Figure 38 : **Classification des néphropathies à dépôts d'immunoglobulines.** (adapté d'après Bridoux *et al.* 2012) (cryo = cryoglobulinémies)

d'apparition des symptômes. L'insuffisance rénale a des conséquences systémiques graves (cardiaques, métaboliques, etc...) et conduit à la dialyse lorsqu'elle devient terminale.

3.3.2. Les néphropathies liées aux dépôts d'immunoglobulines monoclonales

Dès 1971, Glenner a décrit la présence d'Ig dans des dépôts au niveau de certains organes chez des patients atteints d'amylose (Glenner et al., 1971). Depuis ces premières descriptions, de nombreuses autres observations ont mis en évidence la présence d'Ig monoclonales dans des dépôts tissulaires. L'atteinte rénale, même si elle peut être couplée à d'autres atteintes viscérales, est quasiment constante. La dysfonction rénale peut être glomérulaire ou tubulaire selon le lieu de dépôt ou d'accumulation des Ig.

Cependant, ce n'est pas seulement la localisation des dépôts qui va définir la pathologie mais le type de dépôts caractérisés suite à une biopsie rénale ainsi que la nature du composant monoclonal, Ig complète ou fragment d'Ig (CL ou CH isolée). Ainsi, on distinguera les néphropathies à dépôts dit "organisés", par opposition aux néphropathies à dépôts dit "non-organisés". Cette dichotomie de structure des dépôts est basée essentiellement sur des observations en microscopie optique ou électronique, et révèlent des organisations fibrillaires, microtubulaires ou cristallines ou *a contrario* des dépôts granulaires, denses aux électrons non organisés (**Figure 38**) (Bridoux et al., 2012). Parmi les dépôts organisés glomérulaires, on distingue les cryoglobulinémies (type I ou II), les glomérulopathies à dépôts microtubulaires d'Ig monoclonales (GOMMID) ou glomérulonéphrites (GN) et le plus fréquemment, les dépôts fibrillaires positifs au rouge Congo rentrant dans la catégorie des amyloses. Au niveau tubulaire, des agrégations d'Ig sous formes de cristaux intra ou extracellulaires peuvent être retrouvées dans le syndrome de Fanconi rénal et très souvent dans le myélome, la néphropathie à cylindres myélomateux. Concernant les néphropathies à dépôts d'Ig monoclonales "non-organisés", on retrouve les maladies de dépôts d'Ig monoclonales de type Randall (MIDD pour « *monoclonal Ig deposition disease* »), dont nous reparlerons en détail, et les dépôts non-Randall (*immune complex-like*) ou des dépôts d'IgM dans la maladie de Waldenström (pour revue (Bridoux et al., 2012)). Lors des gammopathies monoclonales, les atteintes rénales les plus fréquentes sont dues à des fragments d'Ig, essentiellement des chaînes légères isolées mais parfois aussi des chaînes lourdes isolées. Ce sont précisément à ces pathologies que je me suis intéressée au cours de ma thèse. On y retrouve par ordre décroissant d'occurrence les NCM, les amyloses AL ou AH, les MIDD de type Randall (LCDD ou HCDD) et le syndrome de Fanconi. Une plus grande attention leur sera donc portée au cours de ce chapitre, indépendamment du caractère organisé ou non des dépôts.

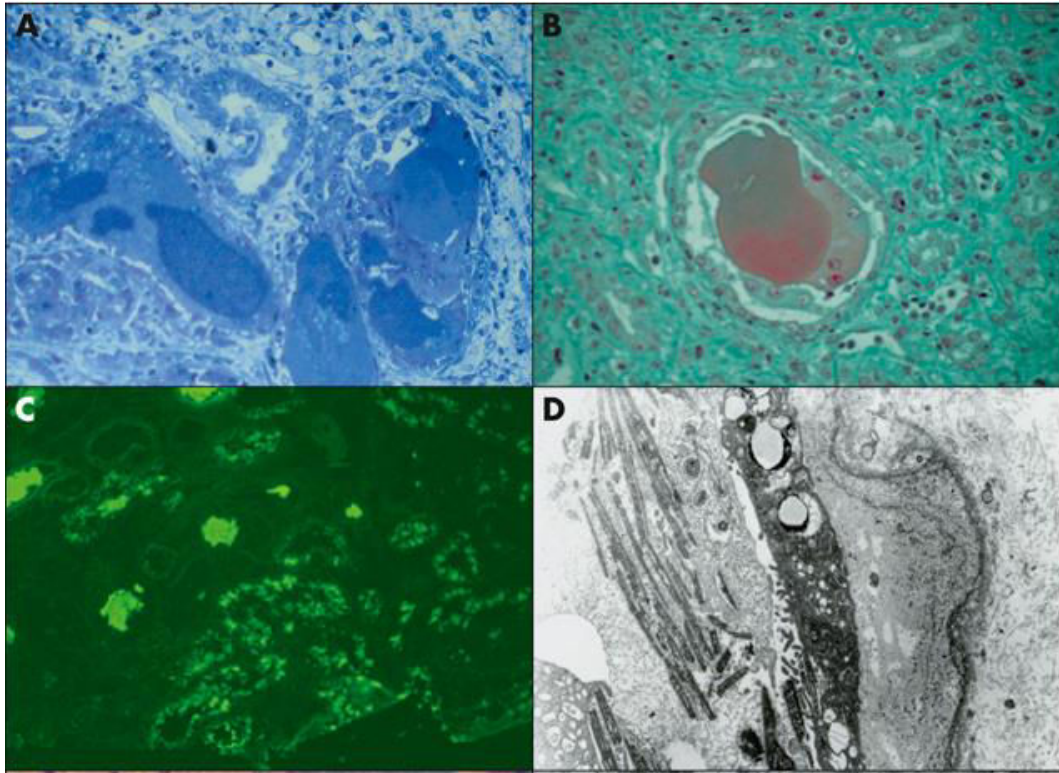


Figure 39 : **Néphropathie à cylindres myélomateux. Biopsie rénale.** (A) observé en microscopie optique, par une coloration au bleu de toluidine ($\times 200$). De nombreux cylindres myélomateux d'aspect fracturé, obstruent les lumières tubulaires et sont accompagnés d'un infiltrat inflammatoire interstitiel. (B) Coloration vert lumière ($\times 400$). Un cylindre myélomateux polychromatophile au sein d'une lumière tubulaire. Egalement visible, un infiltrat inflammatoire et une fibrose interstitielle avec réaction granulomateuse (cellule géante multinucléée) au contact du cylindre. (C) Immunofluorescence directe (anticorps anti- λ , $\times 200$). Présence de cylindres myélomateux et de gouttelettes de réabsorption tubulaires proximale marqués par le conjugué anti- λ . (D) Microscopie électronique ($\times 4\ 000$), mettant en évidence l'organisation cristalline des chaînes légères monoclonales au sein d'un cylindre myélomateux, ainsi qu'un épaissement de la membrane basale tubulaire et des dépôts linéaires sur le versant externe, caractéristiques d'une *light chain deposition disease* de type Randall (d'après E. Moumas *et al.* 2011).

3.3.2.1 Néphropathies tubulaires liées à des fragments d'immunoglobulines monoclonales

En condition physiologique, le faible poids moléculaire des chaînes légères d'Ig (environ 22kDa pour les formes monomériques et 44 kDa pour les formes dimériques) permet leur filtration passive par le glomérule. La majorité d'entre elles sont alors réabsorbées par les cellules tubulaires proximales (CTP) selon un processus d'endocytose mettant en jeu deux récepteurs multi-ligands fonctionnant en tandem, la mégaline et la cubiline (Batuman et al., 1998; Christensen and Birn, 2001) puis dégradées par les enzymes du compartiment lysosomal (en particulier, la cathepsine B). Cependant, comme nous venons de le voir, la prolifération d'un clone sécréteur d'Ig lors d'une gammopathie monoclonale peut considérablement augmenter la concentration de FLC saturant les mécanismes d'endocytose. Ces chaînes légères atteignent alors les tubules distaux et sont excrétées dans l'urine définitive. Sous certaines conditions essentiellement dues à leurs propriétés structurales particulières, ces chaînes légères en excès peuvent alors former des dépôts intra ou extracellulaires dans différentes parties du tubule, altérant son fonctionnement et pouvant aboutir à une insuffisance rénale (Hutchison et al., 2011; Sanders, 2012). Deux néphropathies sont associées aux dépôts de chaînes légères d'Ig dans les tubules : la néphropathie à cylindres myélomateux qui affecte de façon prédominante les tubules distaux, et le syndrome de Fanconi qui induit un dysfonctionnement généralisé de la réabsorption tubulaire proximale (Hutchison et al., 2011; Sirac et al., 2011).

- Néphropathie à cylindres myélomateux

La néphropathie à cylindres myélomateux (NCM), anciennement appelée "rein de myélome", est la complication la plus fréquente du myélome multiple (MM) puisque elle est présente chez plus de 10% des patients au diagnostic et apparaît chez près d'un patient sur deux au cours de l'évolution du myélome (Bridoux et al., 2012). Contrairement aux autres maladies de dépôts d'Ig que nous allons voir par la suite, la NCM est directement liée à l'abondance des chaînes légères monoclonales. Elle est ainsi essentiellement rencontrée lors de MM à forte masse tumorale, où la production de chaînes légères est telle que l'on observe un afflux massif de chaînes d'Ig au niveau des tubules distaux. C'est là que peut avoir lieu, dans certaines conditions encore mal définies (déshydratation, produits de contraste iodés, médicaments, etc...), la précipitation des chaînes légères après agrégation avec l'uromoduline (ou protéine de Tamm Horsfall), protéine produite par les cellules tubulaires de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Cette précipitation va former des cylindres dits « myélomateux » qui vont obstruer la lumière des tubules distaux et des tubes collecteurs (**Figure 39**). L'obstruction tubulaire va ainsi provoquer une augmentation de la pression tubulaire associées à une réabsorption proximale massive des chaînes légères, induisant un stress oxydatif et une production de cytokines pro-inflammatoire, le tout aboutissant à une insuffisance rénale aiguë (Basnayake et al., 2010; Sengul et al., 2003a; Ying et

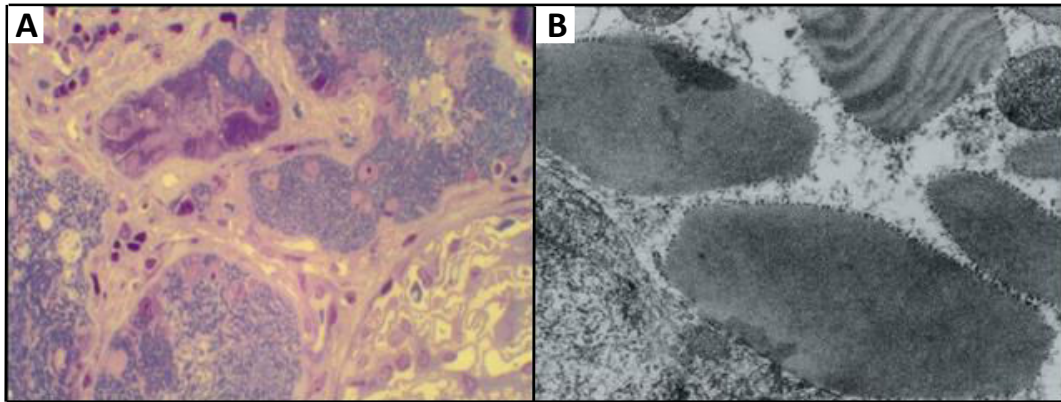


Figure 40 : **Syndrome de Fanconi. Biopsie rénale.** (A) Image de microscopie optique. Coloration au bleu de toluidine ($\times 1\ 000$), révélant une accumulation massive de structures cristallines dans l'épithélium tubulaire proximal. (B) Image de microscopie électronique ($\times 16\ 000$) mettant en évidence des inclusions cristallines losangiques dans les citernes ergastoplasmiques des cellules tubulaires proximales (d'après E. Moumas *et al.* 2011).

al., 2011) (pour revue : Hutchison et al., 2011; Sanders, 2012). Si les raisons précises de l'agrégation et de la précipitation ne sont pas encore très bien comprises, les études de l'équipe de Paul Sanders ont permis de montrer que la liaison de la chaîne légère avec l'uromoduline se faisait par l'intermédiaire du domaine CDR3 de l'Ig sur une séquence de neuf acides aminés (résidus 225-233) de l'uromoduline (Huang and Sanders, 1997; Ying and Sanders, 2001). Cette découverte leur a permis de développer des peptides cycliques inhibiteurs de l'interaction qui ont montrés des résultats particulièrement encourageants dans un modèle murin de NCM (Ying et al., 2012). Ces mêmes travaux ont aussi permis de démontrer une grande hétérogénéité dans la toxicité rénale des chaînes légères, apparemment liée à la séquence des CDR3, même si aucune particularité structurale n'a pu être mise en évidence.

- Syndrome de Fanconi

Le syndrome de Fanconi (SF) est une complication rare des MGUS ou des MM puisqu'une centaine de cas seulement a été observé à ce jour. Cependant, elle peut également résulter de certaines maladies héréditaires comme les cytopathies mitochondriales ou la cystinose, ou d'une exposition à diverses drogues ou métaux lourds (Kyle, 1989; Lee et al., 1972; Maldonado et al., 1975; Sirac et al., 2011). Il est fort possible que la prévalence du SF dépendant des Ig monoclonales soit sous-estimée, en raison de formes incomplètes non diagnostiquées ou d'une insuffisance rénale sévère pouvant masquer la tubulopathies proximale lors d'un MM (Ronco et al., 2000). Le SF correspond à une dysfonction globale de la réabsorption tubulaire proximale dépendante du sodium entraînant une perte des solutés normalement réabsorbés par cette section du tubule tels que des ions (P, Ca⁺⁺, HCO₃⁻), le glucose, les acides aminées et protéines de faible poids moléculaire. Très souvent, la prolifération plasmocytaire sous-jacente est découverte suite au diagnostic du SF. Ceci s'explique par le fait que, contrairement à la NCM, le SF est souvent associé à un clone plasmocytaire de petite taille, MM indolent ou MGUS (Maldonado et al., 1975; Messiaen et al., 2000). Quelques rares cas de SF associés à une MW ont aussi été découverts (Bridoux et al., 2005; Ugai et al., 2013). La présentation anatomopathologique du SF à chaînes légères est relativement homogène avec, la plupart du temps, la présence de cristaux intracytoplasmiques contenus dans les vésicules endolysosomales des cellules tubulaires proximales, et parfois retrouvés dans les plasmocytes sécréteurs (**Figure 40**). L'isotype est très majoritairement κ et dérive même essentiellement de deux gènes du sous-groupe de variabilité V κ 1, le V κ 1-33 et le V κ 1-39. Même si cette situation n'est pas exclusive, avec en particulier quelques cas de SF sans cristaux et des Ig monoclonales dont le domaine V dérive de sous-groupes de variabilité divers (γ compris CL λ) (Bridoux et al., 2005; Isobe et al., 1998; Messiaen et al., 2000), la fréquence élevée de ces deux domaines variables dans le SF a permis d'explorer plus en détails certaines particularités de structures pouvant expliquer l'agrégation sous forme de cristaux. Dès le premier séquençage complet d'une Ig impliquée dans un SF (*CHEB*), il a été possible de mettre en évidence certaines mutations inhabituelles

dans les CDR, CDR1 et 3 en particuliers. Ces mutations provoquent le remplacement d'acides aminés polaires par des acides aminés hydrophobes dans des régions fortement exposées au solvant (Aucouturier et al., 1993b). Une mutation de ce type dans le CDR1 en position 30 a ainsi été retrouvée dans plusieurs chaînes légères de SF du même sous-groupe de variabilité (V κ 1-39) (Déret et al., 1999; Rocca et al., 1995). La validation du rôle de cette mutation dans la cristallisation a par la suite été faite dans des modèles murins de greffe de tumeurs développés par notre équipe. Alors que l'injection à des souris Balb/C d'hybridomes syngéniques (lignées SP2/0) produisant la chaîne légère *CHEB* normale induit la formation de cristaux intracytoplasmiques similaires à ceux observés chez le patient, la greffe de cellules produisant la chaîne mutée n'entraîne pas la formation de cristaux (Decourt et al., 1999). La même expérience a été réalisée en remplaçant le résidu hydrophobe en position 94 (isoleucine) et a permis d'obtenir des résultats similaires. Toutefois, la présence d'un résidu hydrophobe en position 30 n'implique pas la cristallisation et inversement certaines chaînes légères forment des cristaux en dépit de l'absence de résidu non-polaire en position 30 (Messiaen et al., 2000). L'autre particularité longtemps évoquée comme responsable de la pathogénicité des chaînes de SF, et peut être liée elle aussi à la cristallisation, concerne leur résistance à la protéolyse, montrée *in-vitro* dans de nombreux cas (résistance à la trypsine et à la cathepsine B) et qui génère un fragment de 12 kDa correspondant au domaine V retrouvé majoritairement dans les cristaux. Une fois de plus, cette règle n'est pas absolue avec des cas d'Ig sensibles formant des cristaux et des cas d'Ig résistantes n'en formant pas (Déret et al., 1999). Au cours de ma thèse, nous avons par ailleurs montré que la chaîne *CHEB* mutée en position 30 restait résistante à la protéolyse tout en perdant sa capacité de cristallisation ainsi que toute toxicité sur des cultures primaires de cellules tubulaires proximales. Ces travaux sont présentés dans l'article 2 des annexes (soumis à PNAS). Afin de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques à l'origine du FS, nous avons développé le premier modèle transgénique de SF. Pour cela, nous avons inséré le gène codant le domaine VJ κ humain *CHEB* dans le locus κ de souris par recombinaison homologe dans des cellules souches embryonnaires (ES). Ces cellules ont permis de générer des animaux transgéniques exprimant une chaîne légère monoclonale hybride composée d'un domaine VJ κ humain pathogène associé à un domaine C κ murin. Ces animaux développent non seulement les lésions typiques du SF à cristaux mais aussi les anomalies de réabsorptions tubulaires. Ce modèle a donc permis de définitivement démontrer le rôle exclusif du domaine V dans la pathologie et un système de délétion inductible a montré que les lésions étaient réversibles rapidement après arrêt de la production de la chaîne légère pathogène (Sirac et al., 2006a).

Au final, la néphrotoxicité des chaînes légères impliquées dans un SF semblerait être due à leur accumulation dans les lysosomes, perturbant le recyclage du compartiment endolysosomal et par la même, la réabsorption tubulaire proximale. On ne peut cependant pas exclure une toxicité directe des

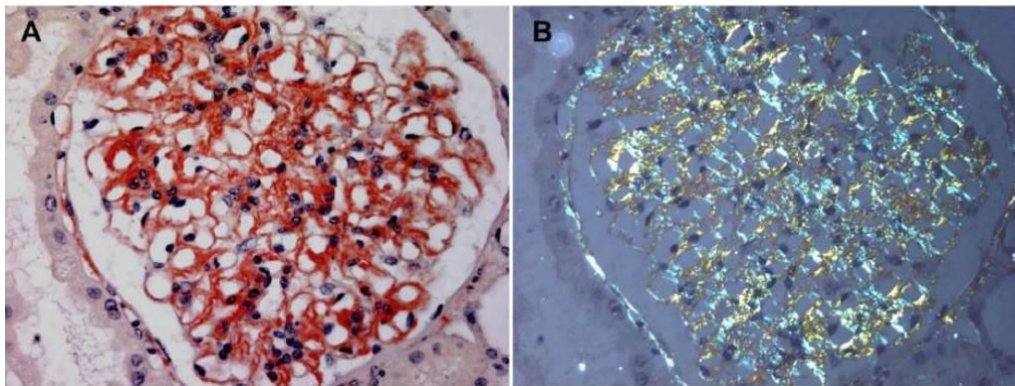
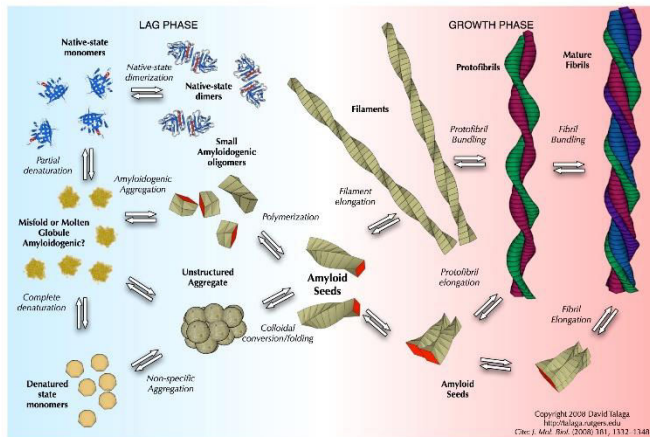


Figure 41 : **Amylose AL.** (haut) représentation schématique de la fibrillogénèse. Les protéines présentant une anomalie vont s'agréger et initier la formation de filaments amyloïdogènes qui vont s'associer en protofibrilles pour former des fibrilles matures (d'après <http://talaga.rutgers.edu/research>). (bas) Biopsie rénale colorée au Rouge Congo observée en microscopie optique (A) ou en lumière polarisée (B) (x400). A noter la présence de dépôts glomérulaires positifs au rouge congo et présentant la biréfringence caractéristique des dépôts amyloïdes en lumière polarisée, dans le mésangium, les capillaires et la capsule de Bowman (d'après Desport E, 2012).

chaînes légères sur le trafic et/ou la fonction endolysosomal qui pourrait expliquer que des chaînes légères ne formant pas de cristaux et ne présentant pas de résistance à la protéolyse puissent être rencontrées dans certains SF (Bridoux et al., 2005; Messiaen et al., 2000). Le travail présenté en annexe 2 et réalisé en collaboration avec l'équipe de Pr Olivier Devuyst à Zurich (soumis à PNAS) permet d'apporter des éléments de réponses à cette question.

3.3.2.1 Glomérulopathies liées à des fragments d'immunoglobulines monoclonales

Les dépôts d'Ig monoclonales peuvent affecter les glomérules rénaux conduisant à une destruction du filtre glomérulaire. Dans ces cas, et contrairement aux tubulopathies liées à des Ig monoclonales où la pathologie est restreinte au rein, il n'est pas rare d'observer des atteintes tissulaires multiples en plus de l'atteinte rénale. De même, si seules des chaînes légères isolées, naturellement filtrées par le glomérule, peuvent provoquer des atteintes tubulaires, il n'en est pas de même pour les atteintes glomérulaires où des Ig complètes et des chaînes lourdes isolées peuvent provoquer la pathologie. Comme expliqué précédemment, nous ne parlerons pas des dépôts d'Ig complètes mais uniquement des pathologies impliquant des fragments d'Ig.

- Les amyloses AL et AH

Les amyloses sont caractérisées par la présence de dépôts tissulaires composés de fibrilles amyloïdes. Elles peuvent être héréditaires ou acquises. Les fibres amyloïdes, formées de l'enroulement de protofibrilles β -plissées de 7 à 12 nm de diamètre et dont les propriétés optiques sont caractérisées par une biréfringence vert-jaune après marquage au Rouge Congo, vont envahir les espaces extracellulaires de différents organes, altérant la structure et la fonction des tissus concernés (**Figure 41**). La classification des amyloses est basée sur la protéine causale, regroupant plus d'une vingtaine de protéines différentes. Les fibres sont cependant toujours associées à d'autres protéines telles que le composant P amyloïde sérique (SAP) ou des héparanes sulfates. L'amylose AL, dont les dépôts sont constitués de chaînes légères monoclonales, est de loin la plus fréquente dans les pays industrialisés puisqu'elle représente à elle seule environ la moitié des cas d'amylose diagnostiqués (environ 500 nouveaux cas/an en France) (Desport et al., 2012; Kyle et al., 1992 et site internet du centre de ref : <http://www.unilim.fr/cr-amylose-al/>). Les dépôts amyloïdes sont préférentiellement retrouvés dans le rein (50 à 80%), le cœur (30 à 50%), le foie (20%) et le système nerveux périphérique et autonome (30%) (Ronco et al., 2011). Au niveau rénal les dépôts sont très majoritairement glomérulaires et prédominent dans le mésangium, et peuvent être retrouvés le long des membranes basales et associés à des dépôts vasculaires. Il s'agit d'une pathologie au pronostic très sévère, en particulier lors d'atteintes cardiaques où la médiane de survie avoisine les six mois en absence de traitement efficace (Kyle et al., 1992). Cependant, une meilleure prise en charge des patients et l'apparition de nouveaux

traitements a permis d'améliorer significativement la survie des patients (Jaccard et al., 2007). Comme lors du SF, l'amylose AL est majoritairement associée à des clones plasmocytaires de petite taille, MGUS ou myélomes indolents. Les amyloses AH, dont les dépôts sont composés de chaînes lourdes tronquées, sont extrêmement rares.

Une chaîne légère λ monoclonale est le plus souvent retrouvée, avec une surreprésentation du sous-groupe V λ VI (Kyle and Gertz, 1990; Ozaki et al., 1994; Solomon et al., 1992a) en particulier lorsque les dépôts sont majoritairement rénaux. Le sous-groupe de variabilité V λ 1-44 a aussi récemment été associé aux formes cardiaques (Perfetti et al., 2012). Il est encore difficile de dresser un tableau précis des anomalies structurales conduisant à l'agrégation des chaînes légères d'amylose. Cependant, des caractéristiques communes semblent ressortir telles que des stabilités thermodynamiques diminuées (Bellotti et al., 2000; Wall et al., 1999) ou une plus grande proportion de chaînes légères dimériques qui diminuerait leur clairance rénale et expliquerait par la même occasion la surreprésentation de l'isotype λ (essentiellement produit sous forme dimérique) (Kaplan et al., 2009).

Les traitements actuels visent essentiellement à diminuer la production de la protéine amyloïde en ciblant le clone plasmocytaire incriminé. Il s'agit donc de traitements proches de ceux utilisés dans le MM où l'apport de nouvelles molécules telles que le bortezomib a permis d'augmenter significativement la survie des patients (Jaccard et al., 2014; Palladini et al., 2014; Venner et al., 2014). Les mécanismes d'action de cette molécule seront évoqués dans un prochain chapitre.

Cependant, même en absence de protéine causale, la clairance des dépôts tissulaires d'amylose, très résistants à la protéolyse, est parfois longue, ne permettant pas une amélioration de la fonction des organes rapide. Il est donc nécessaire de développer des thérapies ciblant directement des dépôts afin d'induire leur dégradation. Deux approches utilisant des anticorps thérapeutiques sont actuellement en essais cliniques, l'un ciblant un épitope cryptique des fibres amyloïdes (Wall et al., 2012) et l'autre la SAP (Bodin et al., 2010), présente dans toutes les formes d'amyloses. Le mode d'action de ces anticorps est similaire : en venant se fixer sur les dépôts d'amylose, les anticorps, via leur domaine Fc, vont recruter et activer des macrophages qui phagocyteront les fibrilles. Même si les résultats des essais cliniques ne seront pas connus avant quelques temps, les tests chez l'animal se sont avérés particulièrement encourageants (Bodin et al., 2010; Wall et al., 2012). A noter que l'anticorps anti-SAP est utilisé en association avec un chélateur de la SAP (CPHPC) qui permet d'éliminer la SAP circulante avant d'injecter l'anticorps (Pepys et al., 2002). Cette stratégie permet d'augmenter l'efficacité du traitement en évitant aux anticorps de cibler la SAP circulante. D'autre part, il semblerait que la SAP puisse servir de « ciment » des fibrilles amyloïdes, sa déplétion permettrait donc de fragiliser les dépôts amyloïdes (Gillmore et al., 2010; Pepys et al., 2002).

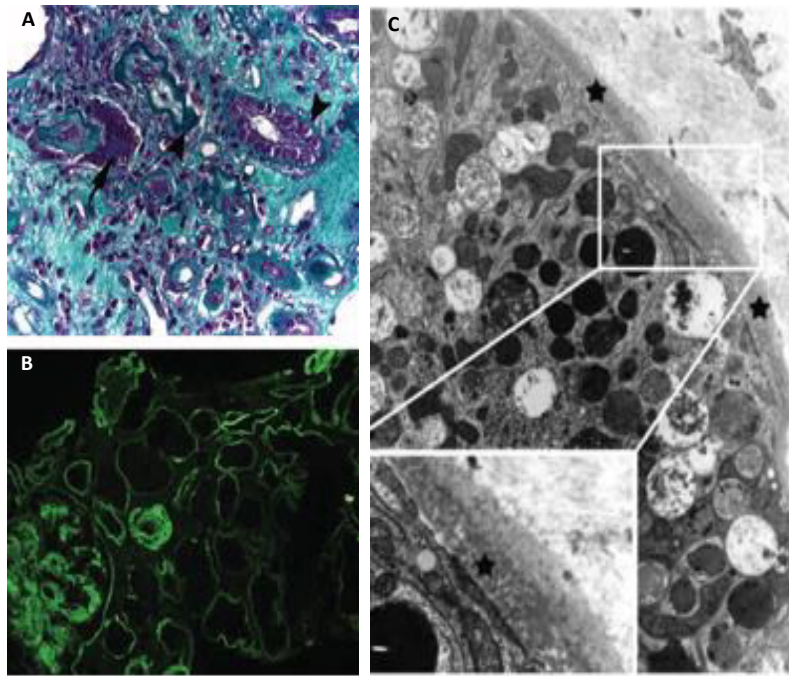


Figure 42 : **Marquages permettant la mise en évidence d'un syndrome de Randall de type LCDD.** (A) En microscopie optique (x400), un marquage au vert trichrome permet la mise en évidence de cellules géantes multinucléées (indiquées par les flèches) autour de tubules dont la structure est altérée. Toujours sur la même image, la coloration révèle des dépôts verts foncés réfringents le long des membranes basales tubulaires (tête de flèche). (B) Analyse par immunofluorescence d'une biopsie rénale, avec un anti-kappa couplé à un fluorochrome (x400). Ce marquage révèle la présence de dépôts linéaires de chaînes légères kappa, mésangiaux, le long des membranes basales glomérulaires et de la capsule de Bowman. (C) Image de microscopie électronique (x3300) mettant en évidence la présence de dépôts linéaires denses aux électrons, prédominant sur la face interne de l'épithélium de la membrane basale du tubule proximal (d'après Sicard A *et al.*, 2014).

- Maladies de dépôts d'Ig monoclonales de type Randall (LCDD, HCDD, LHCCD)

Le syndrome de Randall représente la plus fréquente des néphropathies à dépôts non organisés. Il a été caractérisé pour la première fois par Randall en 1976 (Randall et al., 1976). Les premières descriptions de syndromes de Randall concernaient des chaînes légères, cette pathologie a donc été nommée LCDD (pour *Light Chain Deposition Disease*). C'est seulement en 1993 que l'équipe de Pierre Aucouturier a décrit des dépôts similaires composés de chaîne lourde isolées, appelés HCDD (pour *Heavy Chain Deposition Disease*) (Aucouturier et al., 1993a). Enfin, quelques très rares cas de LHCCD (pour *Light and Heavy Chain Deposition Disease*) ont été décrits (pour revue : Preud'homme et al., 1994). D'une manière générale, ces pathologies sont regroupées sous le terme de MIDD (pour *Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease*). Quel que soit le type de MIDD, les dépôts sont majoritairement rénaux, mais peuvent être rencontrés dans d'autres organes tels que le foie, le cœur et le système nerveux périphérique, où, au contraire du rein, ils restent asymptomatiques. Les atteintes rénales sont responsables d'insuffisances rénales d'intensité variable mais quasi constantes, avec fréquemment une protéinurie forte (>1g/L) et associées pour 50% des patients à un syndrome néphrotique. Il a cependant récemment été montré des cas de syndrome de Randall sans protéinurie, compliquant fortement le diagnostic (Sicard et al., 2014). Comparées aux amyloses AL, les MIDD sont plus souvent associées à des MM (30 à 50% pour les LCDD, 25% pour les HCDD). Il n'est cependant pas rare qu'elles soient accompagnées de MGUS (15 à 40%) voire même pour 15 à 30% des cas, d'une absence de composant monoclonale détectable (en particulier dans le HCDD). Les dépôts sont caractérisés sur biopsie rénale par une absence de biréfringence en lumière polarisée après coloration au Rouge Congo. L'analyse en microscopie optique révèle un épaissement des membranes basales tubulaires (surtout distales) et glomérulaires avec un aspect rubané, ainsi que des dépôts éosinophiles PAS (*Periodic Acid Schiff*) positifs. Les artères, artérioles et capillaires péri-tubulaires au niveau des membranes sont aussi PAS positifs. La forme typique révèle aussi des dépôts mésangiaux souvent accompagnés d'une glomérulosclérose nodulaire. La microscopie électronique révèle des dépôts denses, linéaires, non organisés et finement granulaires, au sein et en périphérie des membranes basales tubulaires, glomérulaires et vasculaires (**Figure 42**) (Touchard et al., 2003). Cependant, dans environ 1/3 des cas de LCDD, les dépôts ne sont observables qu'en optique et immunofluorescence (Lin et al., 2001; Ronco et al., 2006; Touchard et al., 2003). Une accumulation de composants de la matrice extracellulaire est aussi observée au travers notamment du collagène IV, de la laminine, de la fibronectine et de la tenascin C (Bruneval et al., 1985; Keeling and Herrera, 2005). Cette augmentation des protéines de la matrice extracellulaire jouent très certainement un rôle dans l'apparition de la glomérulosclérose nodulaire constamment observée dans les HCDD et dans 60% des LCDD. L'équipe de Guillermo Herrera a particulièrement travaillé sur l'effet des chaînes légères de LCDD sur les cellules mésangiales en développant un système de culture *in vitro* (Herrera et al., 1994; Keeling et al.,

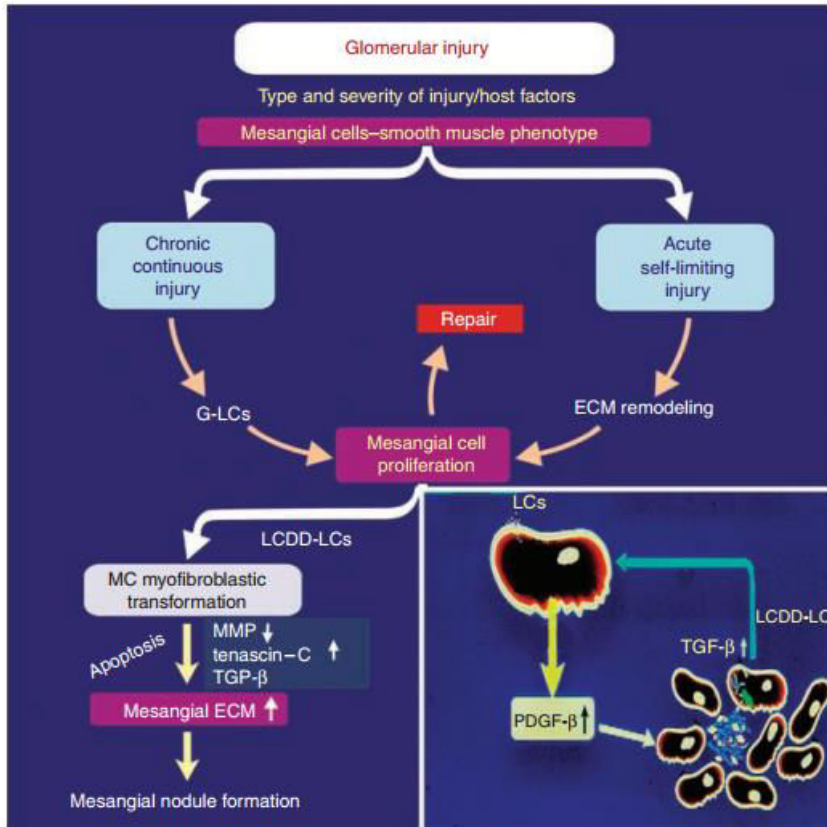


Figure 43 : **Représentation schématique des évènements moléculaires responsables de la pathogénicité des chaînes légères dans les LCDD.** Les chaînes légères de patients atteints de LCDD jouent un rôle sur la transformation phénotypique des cellules mésangiales rénales. Des remodelages de la matrice extracellulaire vont avoir lieu et induire une prolifération des cellules mésangiales et une diminution des métalloprotéases (MMP) qui va alors engendrer une augmentation de Tenascin C, traduisant les prémices d'une glomérulosclérose et donc des lésions typiques de LCDD. Ces phénomènes seront amplifiés du fait d'une augmentation de molécules pro-inflammatoires telles que le TGF β ou le PDGF β (D'après Keeling *J et al.*, 2009).

2004; Zhu et al., 1995). Ils ont ainsi montrés que les chaînes légères de LCDD induisaient une prolifération des cellules mésangiales ainsi que des modifications phénotypiques de type myofibroblastes. Ces travaux ont également permis de révéler une production intense de cytokines pro-inflammatoire et fibrosantes, telles que le TGF β , le PDGF β et le MCP1. Ces cytokines seraient à l'origine de la synthèse importante des différents composants de la matrice extracellulaire. Ces travaux ont aussi permis de voir une diminution de synthèse et d'activité des métalloprotéases (MMP), en particulier MMP7 qui en perdant son activité protéolytique, favoriserait l'accumulation de ténascine C et l'apparition de glomérulosclérose (**Figure 43**) (Keeling and Herrera, 2005, 2009; Truong et al., 1994). Enfin, ce système *in vitro* a permis de montrer que les chaînes légères de LCDD ne sont pas ou très peu internalisées, contrairement aux chaînes légères responsables d'amyloses AL qui sont internalisées et adressées au compartiment lysosomal. Ce défaut d'internalisation faciliterait donc la déposition sur les membranes basales (Teng et al., 2004, 2014).

Le composant monoclonale est dans 80% des cas une chaîne légère κ , avec une surreprésentation du sous-groupe Vk4 (Denoroy et al., 1994), même si cette observation est aujourd'hui remise en question suite à l'accumulation de séquences analysées dans le centre de référence des amylose AL et autres maladies de dépôts d'Ig monoclonales ne montrant pas une telle tendance (non publié). Une fois de plus, les études moléculaires laissent apparaître certaines particularités structurales (absence de la proline conservée en position 95, apparition de N-glycosylations dans le domaine variable, délétion partielle du domaine V) sans jamais dessiner de schéma commun pouvant différencier les chaînes légères de LCDD des autres maladies de dépôts d'Ig (Bellotti et al., 1991; Cogné et al., 1991; Decourt et al., 1996, 1998; Khamlichi et al., 1992; Rocca et al., 1993). Cependant, contrairement aux chaînes légères d'amylose AL, ces chaînes légères présentent des pI (pour point isoélectrique) élevés et donc une charge globale positive à pH neutre, qui pourrait favoriser leur interaction avec les protéoglycanes chargés négativement des membranes basales (Kaplan et al., 2007, 2008).

Les HCDD sont très rares en comparaison aux LCDD puisque depuis les premières descriptions (Aucouturier et al., 1993a), une trentaine de cas seulement a été décrit. Les dépôts sont identiques aux LCDD mais fixent des conjugués anti-chaîne lourde (essentiellement γ ou α) en absence de chaînes légères (**Figure 44**). La principale particularité structurale des chaînes de HCDD est l'absence systématique de leur domaine CH1 (parfois accompagné du hinge et du CH2), prérequis pour leur sécrétion par les plasmocytes en absence d'association avec une chaîne légère. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les chaînes lourdes sont retenues dans le RE par la protéine chaperonne BIP, jusqu'à leur association avec une chaîne légère qui permet leur sécrétion. En absence d'association avec une chaîne légère, les chaînes lourdes sont donc retenues puis dégradées par le protéasome via la voie ERAD. Pour être sécrétée, une chaîne lourde isolée doit donc ne pas posséder de domaine CH1 (Hendershot et al., 1987; Knittler and Haas, 1992; Zou et al., 2007). Les raisons pour lesquelles la chaîne

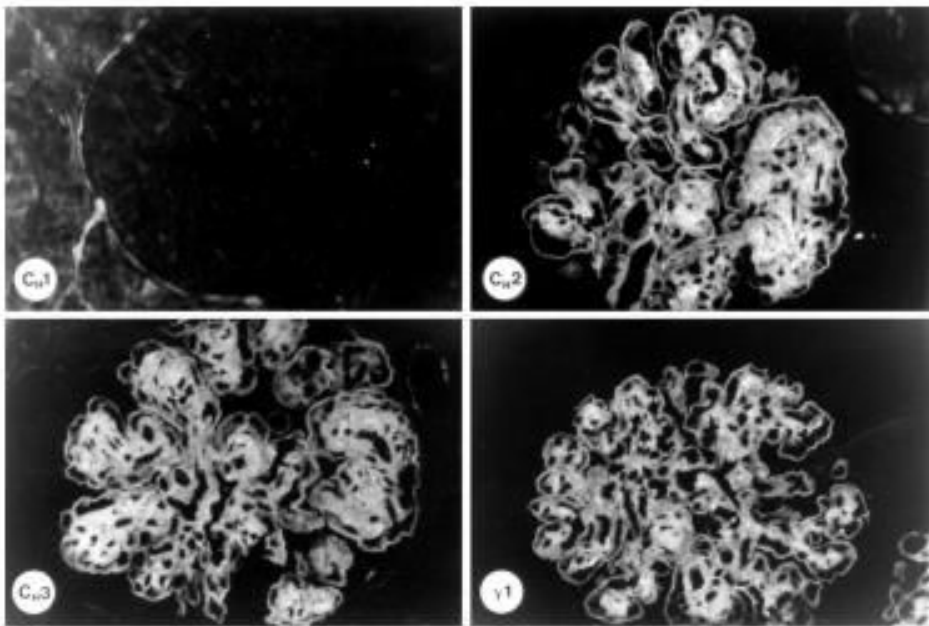


Figure 44 : **Analyse par immunofluorescence d'une section de rein d'un patient atteint de syndrome de Randall de type HCDD.** Un immunomarquage avec un anti-IgG permet de révéler la présence de dépôts d'IgG au niveau glomérulaire (bas-droit). Les immunomarquages avec les anti-domaines, γ -CH1, γ -CH2 et γ -CH3 (indiqués sur chaque image) permettent de voir une délétion du domaine CH1, l'anticorps anti- γ -CH1 étant le seul à ne pas mettre en évidence de marquages (d'après Moulin *et al.*, 1999).

lourde est sécrétée seule ne sont pas encore clairement définies. Si une absence totale de chaînes légères, suite par exemple à une mutation délétère lors des SHM, pourrait aisément expliquer ce phénomène, il semblerait que ce ne soit pas le cas, du moins pas systématiquement, dans les HCDD où il est couramment retrouvé une chaîne légère monoclonale produite par le même clone plasmocytaire que la chaîne lourde (Moulin et al., 1999 et travaux en cours de notre laboratoire). Ces chaînes lourdes tronquées sont la plupart du temps retrouvées dans le sérum des patients (Alexander et al., 2011; Lin et al., 2001; Moulin et al., 1999a; Nasr et al., 2012; Tubbs et al., 1992). Cependant, plus encore que pour les LCDD, les chaînes lourdes de HCDD semblent se déposer efficacement et être donc rapidement éliminées de la circulation d'où leur faible quantité voire leur absence de détection sérique (Ronco et al., 2001). Si l'absence du domaine CH1 est obligatoire pour leur sécrétion, la présence d'un domaine variable complet semble indispensable à leur précipitation puisqu'aucun dépôt n'est observé dans les maladies de chaînes lourdes (HCD pour « *Heavy Chain Disease*), une hémopathie mal définie dans laquelle des chaînes lourdes monoclonales présentant des délétions partielles ou complètes de leur domaine VH sont produites (Cogné et al., 1988a, 1988b, 1990; Mounir et al., 1990). Le domaine variable des chaînes lourdes semble donc indispensable pour que la chaîne lourde puisse se déposer. De plus, en accord avec ces suppositions, il a été décrit des substitutions inhabituelles dans les régions VH, qui modifient les propriétés physicochimiques en termes de charge et d'hydrophobicité (Khamlichi et al., 1995a) et aiderait donc probablement à la déposition.

3.4. Traitements aux inhibiteurs du protéasome

Ces dernières années ont vu l'apparition d'une nouvelle molécule prometteuse dans le traitement du MM : le bortezomib. Il s'agit d'un inhibiteur transitoire de l'activité *chymotrypsine-like* de la sous-unité 26S du protéasome. Son action dans le MM a longtemps été attribué à ses effets inhibiteurs de l'activité NF- κ B. En effet, le protéasome joue un rôle essentiel dans la dégradation de l'unité régulatrice de NF- κ B, I κ B. Aussi, l'inhibition du protéasome permettrait de limiter cette dégradation et par conséquent, empêcherait la translocation nucléaire et donc l'activité transcriptionnelle de NF- κ B généralement élevée dans le MM (Mitsiades et al., 2003). Aujourd'hui, on sait que cette hypothèse n'explique pas à elle seule l'efficacité des inhibiteurs du protéasome dans le MM. De plus en plus d'études tendent à montrer que l'action du bortezomib serait en fait directement liée à la forte production protéique observée dans les plasmocytes ce qui expliquerait sa bonne efficacité dans le MM (Cenci et al., 2012; Meister et al., 2007; Neubert et al., 2008). En effet, comme nous l'avons vu, les plasmocytes, lors de leur différenciation, utilisent physiologiquement les voies Ire1 et Atf6 de l'UPR afin de maximiser leur capacité de production protéique nécessaire à la sécrétion massive d'Ig. Cela implique aussi qu'une quantité accrue de DRIPs doivent être ubiquitinylées puis dégradées par le

protéasome. Ainsi, une inhibition du protéasome provoque l'accumulation de protéines mal repliées et déclenche la voie Perk de l'UPR, avec en particulier expression du facteur de transcription Chop, aboutissant à la mort par apoptose des cellules (Meister et al., 2007b; Obeng et al., 2006). En ce sens, il a d'ailleurs été proposé qu'une inhibition « physiologique » de l'activité du protéasome serait à l'origine de la mort rapide des plasmocytes à courte durée de vie (Bianchi et al., 2009).

Aujourd'hui, le bortezomib est classiquement utilisé en première ligne de traitement du MM en combinaison avec des chimiothérapies plus classiques (Melphalan et corticoïdes en particulier) et de nouveaux inhibiteurs du protéasome, potentiellement moins toxiques ou plus efficaces, font leur entrée en thérapeutique humaine (Metcalf et al., 2014; Ria et al., 2014; Röllig et al., 2014b). De nombreux essais cliniques ont été aussi lancés pour évaluer son efficacité dans les maladies de dépôts associées à des formes moins agressives de proliférations plasmocytaires (MM indolent et MGUS) avec des résultats particulièrement encourageants dans l'amylose AL (Jaccard et al., 2014a; Palladini et al., 2014a; Venner et al., 2014a). Une étude multicentrique en cours de publication, menées par le centre de référence des amylose AL et autres maladies de dépôts d'Ig monoclonales, semblent montrer une très bonne efficacité dans les syndromes de Randall et confirment la tendance observée dans des cas cliniques (Nasr et al., 2012; Patel et al., 2014). L'une des hypothèses avancées pour expliquer cette efficacité sur des clones plasmocytaires, par ailleurs peu proliférant, serait que les fragments d'Ig produits dans ces pathologies, de par leur mauvais repliement et leur propension à s'agréger, induiraient un stress UPR exacerbé qui sensibiliserait les cellules aux inhibiteurs du protéasome. Cette hypothèse n'a pas encore été démontrée mais un faisceau d'évidences tend à indiquer que l'accumulation anormale d'Ig dans les plasmocytes pourrait bien induire un stress UPR terminal et une sensibilisation aux inhibiteurs du protéasome (Meister et al., 2007b; Zhou et al., 2014). L'article 2 de ce présent manuscrit apporte certaines confirmations de cette hypothèse.

3.5. Modèles animaux de MGRS

Comme nous venons de le voir, les maladies de dépôts d'Ig monoclonales sont des pathologies complexes avec des mécanismes physiopathologiques encore mal compris. L'une des barrières à une meilleure compréhension de ces maladies repose sur l'absence de modèles expérimentaux fiables et reproductibles. Les modèles *in vitro* (lignées cellulaires) ou *ex vivo* (perfusions de néphrons) ont permis dans les années 90 de démontrer la toxicité des chaînes légères pour le rein (Batuman et al., 1986; Sanders et al., 1988; Sengul et al., 2003b; Wang and Sanders, 2007; Ying and Sanders, 2001). Cependant, les quantités souvent massives d'Ig utilisées, leur caractérisation incomplète ainsi que les systèmes cellulaires peu physiologiques utilisés ne permettent pas de dresser des tableaux précis de ces pathologies. Les modèles *in vivo* reposent essentiellement sur des injections, chez la souris ou le rat, d'Ig monoclonales généralement des chaînes légères purifiées à partir d'urine de patients (Khan et

al., 2010; Solomon et al., 1992; Ying et al., 2012). Même si, comme les modèles *in vitro*, ils ont permis de faire des avancées importantes sur la compréhension de ces pathologies, ils n'en restent pas moins peu physiologiques car utilisent des doses massives d'Ig, et ne dessinent que les stades précoces des lésions de façon très peu reproductibles. D'autre part, tous ces modèles, de part leur caractère transitoire, ne permettent pas d'envisager de tester l'efficacité de nouvelles thérapies. Notre laboratoire s'intéresse depuis longtemps à cette problématique avec le but de créer des modèles animaux qui replaceraient ces pathologies dans un contexte physiologique plus relevant. Les premiers modèles mis en place étaient basés sur l'injection à des souris Balb/C de cellules syngéniques (SP2/0) productrices d'Ig monoclonales issues de patients dont la pathologie a été préalablement caractérisée. Pour cela les cellules injectées en intrapéritonéal prolifèrent durant plusieurs semaines en produisant la chaîne légère néphrotoxique. Cette stratégie de production de chaînes légères humaines recombinantes a permis de reproduire de manière fidèle les lésions d'une LCDD ainsi que d'un syndrome de Fanconi (Decourt et al., 1999; Khamlichi et al., 1995b). Dans ce dernier, il a aussi été possible de mener des expériences de mutagenèse dirigée montrant que le simple remplacement d'un acide aminé pouvait supprimer les capacités d'agrégation de la chaîne légère (absence de cristaux). Cependant, encore une fois, le caractère transitoire du modèle du à l'envahissement tumoral rapide ne permet pas d'études physiopathologiques ou thérapeutiques fiables. Aussi, nous avons par la suite développé des modèles transgéniques par surexpression dans la lignée B de chaînes d'Ig humaines pathogènes. Après avoir cloné et séquencé le gène codant l'Ig pathogène, celui-ci est inséré par recombinaison homologue dans le locus κ murin, remplaçant les gènes endogènes. Ainsi, la production régulière de l'Ig monoclonale est assurée par l'ensemble des plasmocytes murins et aucune autre pathologie associée ne perturbe la physiologie de l'animal. C'est ainsi qu'a été créé le premier modèle transgénique de SF dont nous avons parlé précédemment (paragraphe « syndrome de Fanconi ») (Sirac et al., 2006a) et qui fait l'objet d'une publication en préparation présentée en annexe 2 dans laquelle les mécanismes physiopathologiques de la maladie ont pu être disséqués. C'est aussi avec une stratégie similaire que nous avons développé le modèle de HCDD dont nous parlerons dans l'article 2 et que d'autres tentatives, parfois infructueuses, d'autres fois encore à l'étude, ont été réalisées pour créer des modèles reproduisant chez l'animal les différentes MGRS.

Résultats

Article 1 : Switch regions per se trigger a long-range AID activity that is not sufficient for optimal class switch recombination

Article 1 :

Switch regions *per se* trigger a long-range AID activity that is not sufficient for optimal class switch recombination

Amélie Bonaud^{1,†}, Fabien Lechouane^{1,†}, Sandrine Le Noir^{1,†}, Olivier Monestier¹, Michel Cogné^{1,2,‡,*} and
Christophe Sirac^{1,‡,*}

En révision dans *Nature communications*,

L'article étant renvoyé prochainement vous trouverez ci-joint la lettre aux Reviewers. Les éléments demandés lors des révisions sont surlignés en bleu dans le texte.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, la Commutation de Classe (CSR) ou switch des Ig est un phénomène étroitement régulé qui nécessite d'une part la présence de régions S contenant des séquences répétées riches en G et d'autre part la transcription de ces régions qui les rend accessibles à AID. De plus, un certain nombre d'éléments *cis*-régulateurs semblent indispensables à une bonne efficacité de CSR. De nombreux travaux ont mis en lumière l'importance de ces éléments au sein du locus IgH, principalement par des approches de *Knock Out* (KO) des différents éléments soupçonnés d'influencer la CSR. Ainsi, notre équipe a pu mettre en évidence le rôle majeur de la région régulatrice 3'RR sur l'efficacité de la CSR. La délétion de cette région induit en particulier une baisse drastique de la transcription germinale de l'ensemble des régions S et un arrêt complet du switch vers la plupart des isotypes (Vincent-Fabert et al., 2010c). Plus récemment, ce même modèle murin de KO a permis de montrer un effet délétère également sur l'hypermutation somatique (SHM) (Rouaud et al., 2013). Cependant, il a aussi été montré dans cette étude que l'arrêt complet de SHM n'était pas exclusivement lié à la baisse de transcription liée à l'absence de 3'RR. Il semble donc qu'au-delà de son action sur la transcription du locus IgH, la 3'RR pourrait aussi avoir une action supplémentaire, encore mal définie, mais qui pourrait faciliter l'activité de SHM. Cependant, ce modèle n'a pas permis de déterminer si la seule baisse de la transcription était responsable ou non de l'inhibition de la CSR.

Outre ces travaux *in vivo*, des approches *in vitro* ont été menées afin de déterminer les structures minimales nécessaires à la CSR. Ainsi des vecteurs exprimant différentes régions switch transcrites, comme S μ et S γ 3 ou S μ et S γ 2b, ont été transfectés dans des cellules B. Suite à une stimulation *in vitro* par du LPS (lipopolysaccharide) ou par du CD40L un switch entre les régions S a été détecté, semblant montrer que la seule présence des régions S suffit pour induire la CSR (Ballantyne et al., 1998; Leung and Maizels, 1992). Cependant, dans ce type d'étude, les régions S sont insérées aléatoirement dans

le génome et il a été montré dans la lignée DT40 qu'AID cible de manière transitoire les constructions d'ADN nouvellement intégrées dans le génome (Yang et al., 2007). De plus, ces approches basées sur des systèmes de sélection négative, ne permettent pas d'évaluer la réelle efficacité de recombinaison. Plus récemment, des modèles de cassures induites par des endonucléases rares (méganucléase I-sceI) ou par ciblage via Crispr/Cas9 ont permis de montrer que deux cassures double-brin sur un même chromosome et situées à une distance n'excédant pas quelques centaines de kilobases était physiologiquement réparées selon un processus identique à la CSR et ceci, dans n'importe quel locus et n'importe quelle cellule. La CSR exploiterait donc un mécanisme de réparation ubiquitaire et seules les présences de régions S et de AID expliqueraient que ce phénomène soit restreint au locus IgH dans les cellules B (Gostissa et al., 2014). Cependant, les cassures provoquées par des endonucléases divergent de celles réalisées par AID et le système de détection utilisé dans leur étude, basé sur du séquençage haut-débit, permet difficilement d'évaluer quantitativement l'efficacité des recombinaisons en comparaison à celles obtenues lors de la CSR.

Notre approche pour déterminer les éléments minima nécessaires pour le phénomène de CSR utilise donc un modèle plus proche de la physiologie. Nous avons élaboré un modèle murin nommé « *Knock In Kappa Switch* » (KIKS) qui consiste en l'insertion, au sein du locus kappa physiologiquement ciblé par AID lors de la SHM, des éléments considérés comme suffisants pour la CSR. Ainsi, une « cassette de switch » a été insérée immédiatement en aval de la région J κ . Cette cassette est composée de deux régions S transcrites (S μ et S γ 3), séparées par les éléments codant pour la partie constante d'une chaîne légère kappa d'origine humaine. Ainsi, en absence de recombinaison, la chaîne légère kappa humaine sera exprimée, alors qu'en cas de recombinaison de la région S μ sur la région S γ 3, la portion humaine sera excisée et conduira à l'expression d'une chaîne légère kappa murine.

L'étude de ce modèle a révélé un développement lymphocytaire B normal avec une expression de la chaîne kappa humaine par la quasi-totalité des lymphocytes B. L'analyse de la population exprimant une chaîne légère kappa murine n'a permis de mettre en évidence que très peu de cellules ayant effectuées une recombinaison de type CSR au locus KIKS. Cependant, les rares jonctions S μ -S γ 3 existantes ont pu être isolées et séquencées et ont révélées de fort taux de mutation indiquant une forte activité AID dans ces régions. La nature de ces jonctions reflète de plus un recours aux mécanismes classiques de réparation du NHEJ (*Non Homologous End Joining*), sans biais pour de l'A-EJ généralement observé lors de réparations illégitimes (translocations ou défaut des mécanismes de réparation NHEJ). Une fréquence importante de mutations a été détectée tout au long du locus, quel que soit la position du promoteur par rapport à la région S μ , mettant en évidence que cette région recrute activement AID sur des distances largement supérieures à celle observées lors de la SHM.

Nous avons de plus montré que des cassures doubles brins avaient bien lieu au sein de chaque région S. En effet, nous observons un nombre de délétions internes supérieur à celui de la région S_{μ} endogène, essentiellement réparées par NHEJ, associées à la présence de foci γ H2AX et du recrutement de 53BP1. Ce modèle murin nous a donc permis de montrer que des régions S activement ciblées par AID, et en présence de toute la machinerie de réparation classique du NHEJ, ne suffisent pas à induire des recombinaisons de type CSR. Il semble donc que des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH soient nécessaires pour permettre le rapprochement (et/ou la synapse) requis pour recombiner deux régions S à distance. De tels éléments régulateurs faciliteraient ce type de recombinaisons au locus IgH et à contrario, expliqueraient la faible quantité de réparations illégitimes conduisant à des translocations. La suite de ce travail, présentée dans les résultats préliminaires, va consister à ajouter au locus KIKS des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH (au premier desquels la 3'RR) jusqu'à obtention d'un niveau de CSR significatif et ainsi de déterminer précisément les éléments minima requis pour ce phénomène.

Reviewer #1 (Remarks to the Author):

1. Fig1 and 2 show the KIKS mouse generation and that the mouse has normal B cell development. These are more befitting for supplementary figures.

We agree with the reviewer and moved Figure 1a and 2 to the supplementary data section. However, we think that the Figure 1b remains informative to understand the overall strategy to induce CSR in the κ locus. Fig. 1b is now Fig. 1 and Fig. 1a, Fig. 2 and Fig. 3a are now in the supplementary data section as supplementary Fig. S1.

We amended the text (p.5 and 6) and figure legends accordingly.

2. It might be important to show a WT littermate control in panel 1b through f as AID levels are extremely relevant to efficient CSR. Can the authors show the data of KIKS WT, KIKS AIDhet and KIKS AiDKO as a comparison to show if there is effect on IgH CSR due to insertion of S sequence in IgK? It would be surprising if normal CSR levels are not compromised in KIKS cells (especially KIKS AID het) because constitutively transcribed S region sink elsewhere in the genome (IgK) should soak up AID away from IgH S region.

As wisely suggested by reviewers 1 and 2, we have now repeated all the experiments with a complete comparison of IgH CSR efficiency in WT, KIKS AID+/+, KIKS AID+/- and KIKS AID-/- mice with representative cytometry and means of percentages of IgG3 and IgG1 B cells (Fig 2a and b). Upon SRBC immunization (day 8), we indeed observed a decrease (non significant) of CSR to IgG3 but not to IgG1 in KIKS mice as compared to WT mice. A decrease was also observed between KIKS AID+/+ and KIKS AID+/- . However, the status of AID alleles of KIKS mice have no effect (only a very slight non significant decrease in spleen in SRBC immunized mice) on KIKS locus CSR (Fig. 2c) that remains far below the level of IgH CSR despite a constitutive transcription of both S regions.

We also added Elisa dosages of serum IgG3, IgG1 and murine kappa in non-immunized and SRBC-immunized mice to emphasize the huge difference between IgH CSR and KIKS CSR (Fig.2d).

Also, as suggested by reviewer 2, we moved B cell stimulation experiments to supplementary Fig. S2. These analyses are indeed less relevant due to the well-known absence of AID recruitment at the kappa locus during stimulations.

We amended the text accordingly p.6 and 7 and in the figure legend.

It might also be relevant to ask whether absence of IgH CSR can promote CSR at IgK (eg. AID overexpression in KIKS B cells stimulated only for proliferation and not transcription of endogenous IgH S sequences). Transcription of the knocked-in S regions are driven by strong constitutive promoters, so absence of canonical CSR might promote CSR at IgK.

We thank the reviewer for this interesting suggestion. We actually started to cross KIKS mice with IgH 3'RR KO mice available in our lab to address this issue. However, the obtainment of double homozygous mice and their analysis will take more likely a year, a delay not compatible with the revision of the manuscript. We hope the reviewer will understand, especially according our new data in figure 2 further demonstrating the defective KIKS CSR as compared to the efficient IgH CSR, added

to the high mutation rates of KIKS S regions that already demonstrated an efficient AID targeting at KIKS loci.

We now discuss this issue in the discussion section (p.10).

3. Fig 4, 5 and 6 are overall well done with necessary controls, however some alternate possibilities cannot be completely ruled out: Intra S region recombination events are high in 53BP1 KO cells and the authors find (and have discussed) something similar with the KIKS cells. Can they rule out that 53BP1 levels are not limiting at the IgK locus (ChIP)? Chromatin modifications and players like PTIP etc are important drivers of CSR. Is the chromatin marks relevant to CSR similar between IgH S region and IgK knocked-in S region?

We now add ChIP experiments of 53BP1 and H3K4ac, shown to serve as a chromatin mark for recruiting CSR recombinase (Kuang et al. 2009, Wang et al. 2009). As shown in the supplementary Fig 6, we do observe 53BP1 and H3K9ac in KIKS S μ and S γ 3 regions. The primers used to distinguish IgH and KIKS regions exclude a direct quantitative comparison between the two loci, but results show slightly more 53BP1 and H3K9ac at KIKS than IgH locus when compared to inputs. (*We chose to evaluate the levels of 53BP1 and H3K4ac in total Peyer's patches and compared to WT mice since we did not obtain enough sorted GC B cells to carry out the experiments.*) A corresponding text is added in the results (p.9), the discussion (p.11) and the methods (p.17) sections and a supplementary Fig. 6 is added with corresponding legend.

We also would like to mention that, as we already discussed in the paper (p.9 and 12), we did not observe an increase of long microhomologies in ISDs or S-S junctions which are classically encountered in 53BP1 KO cells or NHEJ defective models. It is then very likely that 53BP1 and the other actors of NHEJ are efficiently recruited at KIKS locus to protect DNA ends from resection and A-EJ.

4. Recently, a paper was published "AID-Initiated DNA Lesions Are Differentially Processed in Distinct B Cell Populations" by Wang et al. (Journal of Immunology Oct 2014) claiming that knocked in S regions in c-Myc undergo differential repair and translocations in GC B cells versus ex vivo stimulated B cells, and that normal vs. aberrant repair also dictate the outcome (CSR v mutation v deletion). Findings of Wang et al. suggest that the locus where the S region has been knocked-in (Bcl6 v cMyc v IgK here) also dictates outcome of AID-induced lesions. Could the authors elaborate their discussion in light of these recent findings and may be ask if there is increased translocation potential in KIKS cells (ex vivo/in vivo)? Can there be trans-switching between IgK and IgH due to the knocked-in S region?

We now discuss this relevant issue in the discussion section (p.13) as we cannot rule out the possibility that the kappa locus could intrinsically dictates outcome of AID-induced lesions. However, in contrast with previous models of S region knock-in in Bcl6 or c-Myc loci, the kappa locus is a physiological exquisite target for AID, outclassing other loci (except of course IgH) by a 100-1000 order of magnitude in mutation efficiency (Liu et al., Nature 2008), a result also observed in the S regions of KIKS locus as compared with S regions knocked-in in Bcl6 or c-Myc loci. It is then difficult to compare such loci. Moreover, beside the AID-induced single strand mutations, we do observe internal deletions as marks of efficient double strand breaks that are, however, not managed by long distance recombinations.

Due to animal number limitation, we did not check if there is an increased translocation potential but we readily detected V κ -C α transcripts demonstrating the presence of trans-CSR.

We added this information in the results (p. 7), discussion (p. 13) and methods (p. 17) sections and in supplementary Fig. 5.

We plan to carry out high-throughput genome-wide translocation sequencing in a near future to address this interesting issue of KIKS translocation.

Minor points:

1. The authors have not really shown a comparison of AID recruitment (ChIP) at the IgK S region v IgH S region. Too much or too little AID can impact resultant outcomes differentially.

Unfortunately, it is very difficult to obtain sufficient number of sorted GC B cells in Peyer's patches to have information about AID recruitment by ChIP experiments. However, the high rate of mutations observed at the KIKS locus, absent in KIKS AID^{-/-} mice is in our opinion a very good, even if indirect, indicator of AID recruitment and activity.

2. On page 11, 4th last line, the authors should mention that according to the DNA deamination model, CSR uses no endonuclease.

We amended the text accordingly (p.12).

3. Page 6, 2nd last line: typo "differ" (not differed).

This sentence was removed.

Reviewer #2 (Remarks to the Author):

1) The authors describe the construction of artificial Igκ cassette with "1.9 kb of the 5' part of the murine core Smu . . ." and "2 kb of the 5' part of murine core Sgamma3". However they fail to give a detailed location of these sequences. To analyze the integrity of this construct, the primer sites or restriction enzyme sites used for cloning should be provided. Without using the entire switch core, can the authors really say that CSR is limited? Also Stavnezer and colleagues have reported that Smu is 3.2 kb and Sgamma3 is 2.7 kb (1). Can the inefficient CSR-like events be due to poor choice of switch sequences used for cloning?

We now clarify the cloning strategy of S regions in the methods section (p.15). The term "5' part of" was inadequately used. S_μ comprises a 1.9kb HindIII fragment cloned from a plasmid containing the JH to C_μ region of Balb/C mouse (Marcu et al. 1980). It lacks 1kb due to an internal recombination but still comprises about 1.5kb of the core S_μ repeats. The 2kb fragment of the S_{γ3} sequence (Genebank accession number M12182) was amplified by PCR, with the indicated primers, and features the entire repetitive region described in Hackney et al. (2009) and shown to efficiently support CSR to γ3 in several studies (Shanmugam A, JEM, 2000; Ma L, JI, 2002, Zarrin AA, JEM 2008). Then, even if we cannot rule out a suboptimal efficiency of CSR due to partially shortened S regions, it likely cannot explain the almost total absence of CSR at the KIKS locus.

2) The authors are attempting to compare in vivo switching efficiency at the endogenous IgG1 loci with the artificial KIKS allele. However it has been repeatedly shown that switching to IgG3 is several fold lower than

IgG1. It is thus unusual that the authors find switching in vitro to IgG3 at 12%, whereas previous analysis with LPS stimulation has been reported to be 3-6% (1-3).

We are grateful to the reviewer to point out this unexpected result of *in vitro* CSR to IgG3. We now repeated all the experiments with a new batch of anti-mouse IgG3 antibody. Representative results of LPS stimulations are depicted in Supp Fig 2 and show about 3-4% of IgG3 switched B cells, as expected, but still only traces of KIKS switching (murine κ positive B cells). To emphasize our data and to be more convincing especially concerning IgG3 CSR, we now added *in vivo* CSR to both IgG1 and IgG3 upon SRBC immunization and compared with KIKS CSR (Fig 2a, b and c). We obviously agree that CSR to IgG3 is lower than IgG1 but it remains far above KIKS CSR as seen by flow cytometry (Fig.2b and c) and serum dosages (Fig.2d). This very low KIKS CSR is obtained despite the fact that both $S\mu$ and $S\gamma 3$ regions in the KIKS locus are constitutively transcribed (pV κ promoters) in contrast to IgH $S\gamma 3$ region, which is only transcribed in some cells receiving the appropriate signal through specific cytokines.

We amended the text accordingly p.6 and 7 and in the figure legend.

3) While the authors' main analysis is sequencing of Peyer's patch cells, it would be better to perform the sequencing analysis on immunized mice to get a better grasp on the timing of mutations. The fact that on day 8 after SRBC's were administered, the authors do not see mCK is not completely unexpected, as germinal centers are newly being formed. The authors should wait until day 14 or day 20 and then perform their analysis to get a more controlled picture of mutation frequency.

We have now added the results of boost experiments showing that even after 30 days of SRBC immunization comprising a boost at day 20, there is no increase of KIKS CSR in spleen (Fig.2c). Given this lack of CSR in spleen, we chose to analyze only PPs which present detectable KIKS CSR and which are otherwise widely used to analyze SHM (refs?).

We amended the text accordingly in the results (p.6) and the methods (p.15) sections and in the figure legends.

4) Why did the authors used AID^{+/-} mice for their analysis? AID^{+/-} mice have reduced switching by ~50% (4). Perhaps AID^{+/+} mice would have more robust CSR in the KIKS locus. All these experiments should be repeated with AID^{+/+} cells.

We agree and addressed this issue in response to reviewer 1, point 2 (Fig.2 and supp Fig. 2). Additionally, we also would like to mention that, in our previous version of the Fig. 2, we choose to show KIKS AID^{+/-} because we did not observe differences with KIKS AID^{+/+} concerning KIKS CSR efficiency in PPs (Fig.2c and 2e). But for SHM and junctions analyses, ISDs, Fish3D and now CHIP experiments, we essentially worked in KIKS AID^{+/+} mice. We have now amended the text (p.7 and 8) to clarify this issue. We apologize for not being clear enough in the previous version and thank the reviewer for his help in improving our manuscript.

5) It is disappointing that the two joint last authors, Drs. Cogne and Sirac, did not check the Results and Figures for multiple errors before submission.

We reviewed carefully the manuscript and we apologize for these errors.

Other comments;

- The authors suggest transcription is sufficient in the KIKS allele. However in Figure S3, this conclusion is based on an end-point PCR of the spliced transcript. I find two problems with this analysis: 1) mRNA levels are not a direct analysis of transcriptional abundance. Nuclear run-on or RNAPII ChIP analysis is a better technique for checking transcription. 2) The 5' primer for the LV4-63/mCK is overlapping the leader and mCK sequence. This primer should be located completely within the leader sequence to eliminate the possibility that only the last 5-10 nucleotides are just amplifying the mCK, independent of the leader.

1) We have now added quantitative comparison of primary transcripts better illustrating the transcriptional abundance.

In any case, the end-point PCRs were initially shown to illustrate the transcription (non quantitative) and the normal splicing (since splicing is mandatory for CSR) of both S regions. The sufficient transcription was intrinsically demonstrated by the high levels of AID-induced mutations in KIKS S regions (S μ and S γ 3), that exceed those observed at the IgH S μ in the same cells.

2) The second point is just an error due to image editing. The 5' primer (LVk4-63mfor, sequence added in the supp Fig. 3b) is indeed located completely in the leader sequence and do not overlap the mCK sequence. We apologize for this error.

- Figure 3; the authors describe in vitro CSR analysis. As SHM in variable genes does not occur in vitro (5, 6), AID would not be recruited to the kappa locus and would not access the artificial switch sequences. This analysis is not useful.

We agree with the reviewer. However, we initially considered that additional S regions may have attracted AID to the KIKS kappa locus. In the absence of such situation, these experiments are indeed less relevant and were moved to the supplemental information section (Supp Fig. 2)

- Figure 4; the agarose gel analysis is not useful.

We removed the gel analysis from figure 4 and amended the text and figure legend accordingly.

- Figure 5; the authors should include mutational analysis for KIKS AID-/- mice when repeating this analysis in immunized samples

Since we did not carry out new sequences analyses upon immunization, we cannot address this issue. However, we do not fully understand the reason of this request. We already provided sequence analyses of resting B cells illustrating the background level of mutation rate (Fig. 4d).

Reviewer #3 (Remarks to the Author):

A lot has been written about transacting factors that might or might not control off target effects of AID. This fascinating paper by Lehouane et al, asks a key question: if you transpose a switching system on top of region that mutates through endogenous recruitment of AID, will switching ensue? The answer (based on a clever model system - their Knock-In Kappa Switch" (or KIKS) mice) is a resounding "no". Knocked-in switch regions are

involved in CSR-like events - but these are exceedingly rare. Thus, locus specific elements and not protein factors mediate this near-complete separation of SHM and CSR outcomes.

We are very grateful to the reviewer 3 for his kind and encouraging comment on our study.

minor comments: FIG5d endogenous 9vs endogene (lots of these; in general some help with french to english would be good)

We reviewed carefully the manuscript and we hope that we did not leave such errors.

Switch regions *per se* trigger a long-range AID activity that is not sufficient for optimal class switch recombination

Amélie Bonaud^{1,†}, Fabien Lechouane^{1,†}, Sandrine Le Noir^{1,†}, Olivier Monestier¹, Michel Cogné^{1,2,‡,*}
and Christophe Sirac^{1,‡,*}

¹Immunology, CNRS UMR 7276, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Université de Limoges, 87025 Limoges, France

²Institut Universitaire de France, 75000 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33-555-435924; Email:

christophe.sirac@unilim.fr

Correspondence may also be addressed to Michel Cogné. Tel: +33-555-435848; Email:

cogne@unilim.fr

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first three authors should be regarded as Joint First Authors.

‡The authors wish it to be known that, in their opinion, the last two authors should be regarded as Joint Last Authors.

ABSTRACT

Antibody affinity maturation relies upon activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation (SHM) of immunoglobulin (Ig) loci. Class switch recombination (CSR) can in parallel occur between AID-targeted, transcribed, spliced and repetitive switch (S) regions. AID then initiates not only mutations but also double-strand breaks (DSBs). What governs the choice between those two outcomes remains uncertain. We thus explored whether insertion of transcribed intronic S regions in a locus (Ig κ) strongly recruiting AID would be sufficient for efficient DNA breakage and recombination. Although strongly targeted by AID, hypermutated and carrying internal deletions, the knocked-in S regions only underwent rare CSR-like events in some class-switched B cells. This model confirms S regions as exquisite SHM targets, extending AID activity far from transcription initiation sites, but shows that such spliced and repetitive AID-targets are not sufficient by themselves for CSR. Beyond transcription and AID recruitment, additional IgH elements are thus needed for CSR, restricting this hazardous gene remodeling to IgH loci.

INTRODUCTION

Class switch recombination (CSR) occurs at immunoglobulin heavy chain (IgH) loci after mature B cell activation¹. By changing the IgH chain constant (C_H) gene, it switches from IgM/IgD production to either IgG, IgA or IgE². At the gene level, CSR needs “switch” (S) regions located 5’ of C_H genes to undergo double-strand breaks (DSBs), before donor (S_μ) and acceptor (S_γ , S_α or S_ϵ) regions can be joined and bring a downstream C_H gene in place of C_μ . CSR and occurrence of DSBs require adequate chromatin structure, looping of IgH loci³ and transcription of target C_H genes within specific units associating a I-promoter, a non-translatable “I-exon”, an intronic S region and the coding C_H exons¹. Although its role is still unclear, this germline transcription (GLT) initiating from I-promoters and running through S and C regions is mandatory for CSR and S-region accessibility to the activation-induced cytidine deaminase (AID) enzyme⁴. S regions are 1-10 kb-long highly repetitive DNA sequences containing RGYW motifs targeted by AID⁵. AID, also implicated in the somatic hypermutation (SHM) of V(D)J exons, catalyses cytosine (C) deamination into uracyl (U), such lesions being further processed by either the base excision repair (BER) or mismatch repair (MMR) machinery⁵. G-rich S regions may form R-loops during their transcription, allowing accessibility of the non-template strand to the enzymatic activity of AID⁶. While GLT is non-productive due to stop-codons in all three reading frames of I-exons, CSR needs I-exon splicing onto C_H exons⁷. This might be due to the contribution of the splicing regulator PTBP2 to AID recruitment⁸. Recent evidence also suggested that, during CSR, AID directly recruits MMR and BER factors². Processing of G:U mismatches by either MMR or BER initiates DSBs, then repaired by classical or to a lesser extent alternate Non-Homologous End Joining (c-NHEJ or a-NHEJ, respectively)⁹.

Besides the architecture of transcriptional units, a long standing issue about CSR is the role of IgH *cis*-regulatory elements. If the intronic E_μ enhancer has only a modest role during CSR¹⁰, the IgH 3’RR lying downstream of the last C_α exon, has long been described as a master regulator of CSR and recently appeared as also mandatory for SHM, its complete deletion in mice abrogating both

processes¹¹⁻¹³. The 3'RR deletion strongly decreases GLT of some C_H genes and modestly affects pV_H transcription. The nearly complete V_HDJ_H SHM blockade in 3'RR-deleted mice, suggests that the 3'RR also directly helps recruiting AID to V(D)J exons¹³. Whether the 3'RR also specifically attracts the CSR machinery onto S regions and/or promotes IgH locus bending and S-S synapses remains to be determined. Finally, although it was proposed that staggered single strand breaks in repetitive S regions can initiate DSBs¹⁴, it is unclear whether solely the S region structure controls the choice between processing AID attacks into either single strand lesions and SHM or the occurrence of DSBs followed with long distance deletions.

To determine the minimal requirements for the induction of DSBs and CSR, we created a model whereby transcribed S regions were introduced into the Igκ locus normally targeted by SHM. This “Knock-In Kappa Switch” (KIKS) mice expressed a functional human Ig C_κ exon (hC_κ) flanked by two transcribed S regions, downstream of the last J_κ and thus of endogenous rearranged V_κJ_κ exons. Hence, a complete CSR substrate was placed at sites naturally targeted by AID during SHM, while its CSR efficiency could be monitored by following the switch from hC_κ to murine C_κ (mC_κ) expression. Expression of hC_κ supported B cell development in KIKS mice, as previously reported in another mouse featuring hC_κ expression¹⁵. However, despite efficient transcription and AID targeting of S regions, the KIKS locus only displayed minimal CSR in few B cells within Peyer's patches (PP). This clearly uncouples the two issues of AID attacks, SHM and CSR. It demonstrates the requirement for specific IgH *cis*-acting elements which, beyond transcription and AID recruitment onto repetitive targets, finally promote efficient CSR at the IgH locus.

RESULTS

KIKS locus description and normal B cell development in KIKS mice.

In order to determine the minimal requirements for the occurrence of DSBs and CSR after AID DNA lesions, we inserted core S μ and S γ 3 regions within the Ig κ locus. These S regions fell comprised into the spliced introns of tandem transcriptional units, but with promoter, enhancer and intron sequences from Ig κ origin. This strategy avoided any possible influence of IgH *cis*-acting elements other than S regions on the artificial KIKS locus, although its architecture mimicked the IgH locus, with S regions comprised into the spliced introns of tandem transcriptional units (Supplementary Fig. 1a). Thus, transcription of the KIKS donor S μ was driven by the promoter of the rearranged V κ while constitutive transcription of the acceptor S γ 3 was ensured by a 2nd knocked-in pV κ promoter. S γ 3 is also preceded by a small non-coding exon (leader V κ 4-63 with an inserted stop codon but retaining its natural donor splice site) to ensure its splicing onto the mC κ exon and mimic non-productive IgH GLTs (Fig. 1). This strategy also forbids translation of any truncated and potentially harmful mC κ -LC. AID was expected to target the KIKS S μ since it stands immediately downstream of rearranged V κ J κ exons. Regarding the acceptor S γ 3, insertion of an additional pV κ in the Ig κ locus was previously shown to recruit AID¹⁶. Before any S μ -S γ 3 recombination, VJ-rearranged KIKS loci encode a chimeric “h κ -LC” combining a murine V with a human C domain. If CSR-like events occur, S μ -S γ 3 recombination should remove the human C κ and yield a fully murine κ -LC (m κ -LC) (Fig. 1). B cell development was normal in homozygous KIKS mice regarding bone marrow pro-, pre- and immature B cells and proportions of splenic marginal zone (MZ) / follicular (Fo) B cells (Supplementary Table 1), with percentage of κ -expressing B cells identical to WT mice (Supplementary Fig. 1b, left panel). The efficient association of the h κ -LC with murine HC was demonstrated by the similar membrane expression level of IgM and IgD in KIKS compared to WT B cells (Supplementary Fig. 1b, right panel). KIKS serum κ -LC levels were also similar to WT mice (mean \pm SEM : 3.72 \pm 0.44 mg/ml vs 4.80 \pm 0.45,

$p=0.15$, respectively, Supplementary Fig. 1c). The KIKS Igk locus thus supports normal B cell development and function in mice, as observed in another model¹⁵. Our reporter system was designed to easily monitor CSR-like recombination within the KIKS locus by detecting a switch from human to murine κ -LC at the B cell surface. In non-immunized KIKS mice, m κ -LC-expressing B cells were below significant detection by flow cytometry (Supplementary Fig. 1b, right panel). The few cells staining for both human and murine κ -LC never exceeded background levels set in parallel with non-specific isotype controls (Supplementary Fig. 1d). Accordingly, we only noticed minimal amounts of m κ -LC in sera of KIKS mice (0.017 ± 0.004 mg/ml) (Supplementary Fig. 1c).

KIKS locus undergoes low-level CSR-like recombination

To increase the probability of CSR events in spleen, we immunized KIKS mice using intraperitoneal (i.p.) injections of sheep red blood cells (SRBC). Eight days after immunization, mice were analyzed. As shown in Supplementary Fig. 1e, germinal center (GC) generation is similar in KIKS and WT mice, demonstrating that mutant B cells efficiently participate to immune responses. However, less than 0.2 % of B cells expressing only m κ -LC were detectable in both KIKS AID^{+/+} and AID^{+/-} mice (Fig. 2a) despite a clear increase of IgG1 and IgG3-switched cells, witnessing parallel efficient CSR at the IgH locus (Fig. 2b and c). These results were confirmed when mice were analyzed 10 days after a secondary immunization with 100 μ L of SRBC (Fig. 2c). Finally, this poor KIKS CSR was emphasized by the minute level of serum m κ -LC as compared to IgG1 and IgG3 even after immunization (Fig. 2d). We then analyzed Peyer's patches (PP) known to abundantly switch to IgA (Supplementary Fig. 2a). A small but significant proportion of these PP B cells was consistently found to express murine κ -LC (0.68 ± 0.09 % in KIKS AID^{+/+} and 0.63 ± 0.13 % in KIKS AID^{+/-} mice, mean \pm SEM) (Fig. 2c and e), a population specifically enriched among GC B cells (Fig. 2e, lower panel). AID-dependence of these CSR-like events was confirmed

by their absence in AID-deficient KIKS mice (Fig. 2c and e). Finally, we induced CSR in KIKS B cells by 4 days *in vitro* stimulation. Cytometry analysis indicated that, despite normal IgG3 and IgG1 CSR, the percentage of $\mu\kappa$ -LC-expressing cells still remained extremely low ($0.37 \pm 0.05\%$ and $0.40 \pm 0.04\%$, mean \pm SEM, after LPS or anti-CD40 + IL4 stimulation, respectively) albeit strictly higher than in AID^{-/-} stimulated B cells (Supplementary Fig. 2b). Altogether, these data show that the KIKS locus can undergo CSR-like events but only at a low level and in conditions only achieved upon strong B cell stimulation, such as in mucosae-associated lymphoid tissues.

Knocked-in switch regions are involved in CSR-like events

To further confirm that the few B cells expressing $\mu\kappa$ -LC carried CSR-like recombination, S μ /S γ 3 junctions were cloned and sequenced from *in vitro* stimulated B cells (LPS and CD40 + IL4) and Peyer's patches cells. Nested PCR primers amplified genomic DNA from the J κ 5 exon to the 5' part of the loxP site (Supplementary Fig. 3), and yielded bands in PP cells from KIKS AID^{+/+} and AID^{+/+} mice but not from KIKS AID^{-/-} cells or stimulated B cells (not shown). We then cloned the amplified bands, which indeed corresponded to junctions of breakpoints located within or close to S μ and S γ 3. Locations of breakpoints are depicted on Fig. 3a and junction sequences are shown in Supplementary Fig. 4. Strikingly, S μ and S γ 3 sequences around junctions carried very high mutation loads of 33.5 and 25.4 mutations per kb, respectively (Fig. 3b). Junctions involved essentially direct joins or short micro-homologies (≤ 3 nt), with no apparent bias toward A-NHEJ (Fig. 3c). In conclusion, CSR-like events occurred at low level in the KIKS S regions but associated with intense local AID recruitment and SHM levels far above those usually reported around normal IgH S-junctions¹⁹.

Knocked-in switch regions of KIKS are accessible to AID

Scarcity of KIKS CSR-like recombination could have reflected poor AID recruitment on the knocked-in S μ and/or S γ 3. As AID-targeting of S regions needs transcription, we checked the transcriptional activity at inserted S regions. It can obviously be inferred from the normal level of h κ -LC expression in KIKS B cells that S μ is efficiently transcribed and spliced out. Likewise, we also readily detected LV κ 4-63/mC κ transcripts implying transcription and splicing of the inserted S γ 3 (Supplementary Fig. 5b). To more specifically address the transcriptional abundance of KIKS S regions, we carried out quantitative PCR on primary transcripts of both KIKS S μ and S γ 3. S μ and S γ 3 primary transcripts of KIKS or IgH loci were transcripts at the same range (Supplementary Fig. 5b). Since both S regions are transcribed in a locus naturally accessible to AID, we checked the mutation frequencies within S μ and S γ 3 before CSR. For S μ , we analyzed 570 bp downstream J κ 5, comprising 220 bp from the J κ intron and 350 bp from the inserted S μ (Fig. 4a). As mutations occur within a range of 1.5 kb after the V promoter, with a rate decreasing with promoter distance and highest in the VJ exon, we checked if this distance also affected SHM in S μ and compared KIKS S μ mutations following rearrangement of either distant (J κ 1) or proximal (J κ 5) V κ J κ rearrangement (Fig. 4a). For S γ 3, we analyzed the first 400 bp (Fig. 4b). As expected, mutation frequencies within the knocked-in S μ and S γ 3 were far higher in sorted PNA^{high} Fas⁺ GC B cells than in resting KIKS AID^{+/+} PPs B cells (Fig. 4a, 4b and 4d). VJ κ 5-rearranged alleles revealed similar SHM frequencies in J κ 5 intron and in S μ (11.09 vs 13.80 mutations per kb). This is consistent with data reported in the equivalent region of the WT Ig κ locus^{13,20}. Surprisingly, VJ κ 1-rearranged KIKS loci also revealed high SHM rates within the knocked-in S μ (7.60 mutations per kb) although it lies more than 2 kb downstream of pV κ , *i.e.* at a distance normally escaping mutations downstream of rearranged VJ exons²¹ (Fig. 4a and 4d). This high mutation rate at long distances from the promoter likely involved an increased and/or extended AID recruitment on S sequences containing highly repetitive RGYW motifs, as recently demonstrated for S γ 1²². However, a similarly frequent SHM affected the J κ 5 intron from the same rearranged loci (9.20 mutations per kb). To exclude any local effect due to the close proximity of S μ , analyses were extended upstream of J κ 5 in a region lying

from ~ 1.3 kb to 1.8 kb downstream of pV κ (J κ 3) thus supposed to mostly escape SHM²¹ (primer 9, Supplementary Fig. 3). Here again, high SHM occurred in GC B cells, reaching 11.17×10^{-3} mutations per kb (Fig. 4d). The knocked-in S γ 3 from GC B cells also carried high SHM at 7.30 mutations per kb (Fig. 4b and 4d) *i.e.* slightly lower than for S μ lying on VJ κ 5 KIKS alleles at an equivalent distance from a pV κ , but clearly higher than reported for IgH S μ in WT GC B cells undergoing CSR (4.10 mutation per kb) (Fig. 4c and 4d) or *in vitro*^{13,23–25}. ChIP analysis also showed the accumulation at KIKS S regions of acetylated histone H3K9 (H3K9ac), a chromatin mark known to be associated with the transcriptional activity and accessibility of S regions allowing AID recruitment and activity (Supplementary Fig. 6, top panel)^{26,27}. Thus, the KIKS S regions are strongly targeted by AID and SHM, although this is clearly not followed with efficient CSR.

Double strand breaks and internal deletions occur in KIKS S regions.

Given that KIKS S regions are efficiently targeted by AID, CSR-like events scarcity could be due to either low occurrence of DSBs and/or their inefficient repair. To address this issue, internal S deletions (ISDs) witnessing resolved DSBs were appreciated within KIKS sequences. Interestingly, such deletions were readily detected in both KIKS S regions, at higher rates than in the corresponding endogenous S μ region and J κ 5 intron (0.230 and 0,263 ISD per 1000bp in S μ and S γ 3 regions, respectively, versus 0.054 in endogenous S μ and 0.037 in non-S regions) (Fig. 5a). The length of ISDs ranged from 16 to 160 bp, obviously biased by the preferential PCR amplification of short ISDs. The KIKS locus thus clearly undergoes AID-initiated DSBs that are proportional to SHM but only in G-rich sequences, consistent with the concept that S regions form R-loops targeted by AID on both the template and non-template DNA strands that hence end with staggered DSBs^{6,14}. Most of KIKS ISDs display blunt-ends junctions or short microhomology and therefore likely result from c-NHEJ repair of DSBs (Fig. 5b and Supplementary Fig. 7). Accordingly, ChIP experiments conducted at the KIKS locus and compared with IgH locus demonstrated the presence

of 53BP1, known to protect DNA ends from resection (Supplementary Fig. 6, bottom panel)²⁸.

Finally, since γ H2AX was supposed to be dispensable for intra-switch recombination but required for the chromatin remodeling that facilitates distant S region synapsis²⁵, we further searched for γ H2AX foci associated with the KIKS locus. Immunofluorescence staining followed by fluorescence *in situ* hybridization (3D immuno-FISH) simultaneously visualized γ H2AX and IgH or Ig κ loci in GL7⁺ sorted PP B cells. γ H2AX foci associated with Ig κ loci at frequencies close to IgH (6.8% vs 8.9%, respectively) confirming the presence of DSBs and their normal initial processing through γ H2AX recruitment (Fig. 5c and 5d).

DISCUSSION

This study addresses the long-standing issue of minimal requirements for CSR *vs* SHM, two processes sharing several common prerequisites but yielding drastically different genomic and cellular changes. In the IgH locus, S regions susceptible to multiple AID attacks on both DNA strands are mandatory targets for CSR and it is unclear whether other *cis*-elements of the locus play a role in orienting the processing of AID lesions towards DSBs and/or distant S-S recombination rather than SHM. The aim of our study was thus to check whether two transcribed and spliced S regions located at a position highly recruiting AID, would be sufficient for mediating CSR-like events and being joined at a high level in activated B cells. This issue was addressed in an *in vivo* model by generating KIKS mice, which carried S regions inserted into the Ig κ locus naturally targeted by AID, without any other regulatory element from the IgH locus. By designing the knock-in so that CSR-like events would change LC expression, we observed by flow cytometry that, despite their efficient transcription and splicing-out, the inserted S regions underwent only rare recombination and junction events, even in B cells undergoing high-rate CSR in the IgH locus. Since AID levels are relevant to CSR efficiency²⁹, we cannot totally rule out the possibility that additional transcribed S regions could dilute AID activity and then diminish CSR efficiency at the KIKS locus. However, such a situation would normally refer to both KIKS and IgH CSR and we observed only a very slight diminution of CSR activity at the IgH loci. Moreover, inserted S γ 3 and S μ regions were mutated in AID expressing-cells, and even both showed mutation rates far above the endogenous S μ region of B cells undergoing CSR *in vitro* or *in vivo*^{13,23–25,28,30}. Whether the absence IgH CSR, for example in 3'RR KO mice¹², would further increase AID recruitment and long-range recombinations at KIKS loci remains to be explored but cannot fully explain such low CSR-like levels. This demonstrated that AID and the BER and MMR machineries, all common actors of both SHM and CSR, were highly recruited to the inserted core S regions. A striking finding is the unexpected high mutation rates in both the J κ 5 intron and flanking S μ region regardless of their distance from the promoter²¹. While Ig κ locus enhancers are likely responsible

for AID recruitment onto both promoters of the KIKS locus, the extended SHM shows that the inserted S region structure *per se* modulates the pattern of AID recruitment. These results are reminiscent to the robust AID targeting recently reported in a model in which the core S γ 1 region was inserted in the *Bcl6* locus²². Thus, tethering of AID appears as an intrinsic property of transcribed S regions. However, by contrast to the *Bcl6* model where regions flanking the core S γ 1 were free of AID targeting²², we found a sustained high SHM rate throughout the 2kb-long J κ region that cannot be fully related to the fact that Ig κ is a much better AID target than *bcl6*³¹. In the KIKS model, the VJ gene close to the pV κ is initially subjected to SHM and it is likely that the distal G-rich S region not only recruits but also maintains AID tethering throughout the entire transcribed J κ region as it certainly processes in the IgH locus to target the whole extent of S regions upon distances up to 10 kb²⁷.

In current models of CSR, richness of core S regions in RGYW motifs is claimed to allow the generation by AID and UNG of staggered DSBs then recruiting the NHEJ machinery².

Accordingly, γ H2AX foci are readily detected at KIKS loci together with short ISDs in KIKS S regions at higher rates than in the IgH S μ (likely related to the locally increased SHM), confirming the occurrence of DSBs and their repair with no bias toward A-NHEJ. We also readily detected 53BP1 recruitment in the KIKS S regions, further indicating that DNA ends are likely protected from resection and overwhelmingly repaired by classical NHEJ similar to normal IgH S region DSBs²⁸. Altogether, these ISDs demonstrate that, besides high AID targeting indicated by SHM, DSBs are also generated and normally processed into KIKS S regions. Therefore, the poor ability of the KIKS locus to undergo CSR most likely reflects a defect in synapsis between the distant S μ and S γ 3 and/or their inefficient recruitment into “CSR factories” supporting recombination at long distance. This deserves comparison with recent studies showing that distant DSBs induced by high efficiency endonucleases (I-SceI meganuclease or Crispr/Cas9) are efficiently processed through a general *cis*-joining mechanism needing neither local transcription nor specific chromosomal

localization, provided that they are comprised within the 1Mb spreading range of the γ H2AX dependent DNA damage response^{28,30,32}. Although such models interestingly underlined that any cell can efficiently handle distant DSBs in *cis*, it differed from CSR by multiple features. **According to the DNA deamination model**, CSR uses no endonuclease directly generating DSBs but rather needs processing of single strand DNA bubbles appearing around mismatches. Together with the low SHM observed in S regions of GC B cells, it is then tempting to speculate that, by contrast to endonucleases-induced DSBs, the occurrence of two synchronous distant AID-induced DNA breaks should be rare in physiology, needing recruitment in specialized CSR factories to be efficiently joined and repaired. In addition, I-Sce-I-induced DSBs underwent extensive end-processing (Gostissa 2014), a condition rarely encountered during AID-induced CSR at the IgH or KIKS loci in which blunt ends are essentially processed through c-NHEJ, thus preserving locus integrity. In fact, AID-remodeling of the KIKS locus resembles models of “failed” CSR like 53BP1^{-/-}, γ H2AX^{-/-} or AID C-terminal region mutants, with normal SHM and intra-switch region recombination but only rare CSR junctions between distant S regions^{25,28,33}. While such defects of the potential “CSR factory” components are absent in our model (where normal IgH CSR occurs), the KIKS locus might then simply demonstrate a defective recruitment of the knocked-in S regions into such CSR factories. **Whether the Igk locus could intrinsically dictates differential outcome of AID-induced lesions, as it was recently demonstrated when S regions were knocked-in in other loci^{22,34}, is another possibility. But the presence of ISDs, few S-S junctions, 53BP1 recruitment and γ H2AX foci, proves that beside AID-induced single strand mutations, DSBs occur at the KIKS locus but are simply not managed through long distance recombination.** We thus propose that beside the general possibility for DSBs to be *cis*-joined over long distances, optimal CSR requires additional IgH *cis*-regulatory elements recruiting and synapsing target regions into specific nuclear areas with the functional ability to coordinate and associate distant DSBs and promote long-range recombination. Hereby constraining CSR to the IgH locus would also help prevent side genomic alterations. **In this view, it would be relevant to check if the presence of S regions outside of their physiological loci**

could increase, as previously described in c-Myc³⁴, translocation potential and genomic instability in KIKS cells and to what extent.

This work brings new insights in the molecular dissection of CSR. It demonstrates in a locus physiologically targeted by AID, that transcription, splicing, efficient SHM and occurrence of DSBs repairs by c-NHEJ into S regions are not sufficient to trigger CSR. We thus propose that the early events of CSR from cytidine deamination to occurrence of DSBs can affect any G-rich transcribed and spliced genomic position targeted by AID. By contrast, only the IgH locus context provides all the additional conditions for long-range synapsis between AID targets and efficient CSR. A good candidate for assembling the latter conditions is obviously the 3'RR, as its deletion in mouse drastically impairs CSR and was also shown to impair IgH synapsis¹². Long-range interactions between IgH 3'RR, E μ and I-promoter activated by specific stimulation, was shown to allow the acceptor S region to interact with S μ , then contributing to the stability of S-S synapsis during CSR³⁵. Since 3'RR deletions globally affected IgH SHM, GLT and CSR, its complex functions can hardly be analyzed by knock-out experiments. Whether the sole down-regulation of GLT or the concomitant lack of synapsis-promoting elements explains the lack of CSR in 3'RR mutant mice remains to be addressed. The adjunction of the 3'RR to the KIKS locus could provide insight into this issue. Others potential regulators of CSR are I-promoters that drive acceptor S region transcription prior to CSR and could participate in recruiting CSR factors³. While further investigations are needed to decipher the exact contribution of each of these elements, the KIKS strategy already sheds new light on the minimal requirements for efficient CSR, that are clearly beyond transcription, AID recruitment and occurrence of DSBs.

METHODS

Generation of KIKS mice. The previously described 12.7 kb *Bam*HI fragment from the *Igk* locus containing the 5 *Jk* segments and *Ck* was used³⁶. The 0.8 kb *Bst*EII fragment, located 0.2 kb downstream of *Jk*5 was eliminated and replaced by a *Not*I site, then allowing the sequential cloning of the fragments composing the KIKS locus using *Eag*I and *Not*I compatible sites. **S μ region comprises a *Hind*III 1.9 kb fragment from a plasmid containing the murine JH-C μ region³⁷ with 1.5 kb of core S μ repeats. A 2 kb fragment of the S γ 3 sequence (Genebank accession number M12182) was amplified from C57BL/6 genomic DNA, with the indicated primers (Supplementary Fig 3b), and features the entire repetitive region, previously described³⁸. Equivalent S regions were previously shown to efficiently support CSR in several studies³⁹⁻⁴¹. From 5' to 3', the following parts were then added: the murine core S μ , a 1.5 kb genomic fragment containing human *Eik* and *Ck*, a 0.3 kb fragment containing *Vk*4-63 promoter and the following leader exon (in which the last codon was replaced by a stop-codon in order to mimic a nontranslatable I exon) and the murine core S γ 3. A neomycine resistance gene (*Neo*^R) flanked with two *loxP* sites was inserted downstream S γ 3. Upstream of the 5' arm, a thymidine kinase (*TK*) gene was inserted for negative selection against random integration. E14 embryonic stem (ES) cells were transfected with linearized vector and selected by addition of G418 and ganciclovir to culture medium. An ES clone showing homologous recombination of the *Igk* locus by southern blot was injected into C57BL/6 blastocysts, and resulting chimeras were mated with C57BL/6 animals. Progeny was then bred with *EIIa*-CRE mice (a gift from Dr H. Westphal, Bethesda, MD) to obtain a *Neo*^R-deleted KIKS lineage and avoid any transcriptional competition from the *Neo*^R promoter. Mice were first screened by PCR for the presence of the human *Ck* exon and then for homozygous loss of the WT allele. All the animals were bred and maintained in pathogen-free conditions and analyzed at 8-16 weeks of age. All the protocols used have been approved by our institutional review board for animal experimentation.**

Immunization and spleen cells cultures. Mice were immunized by intraperitoneal injection of 200 μ l of SRBC and analyzed after 8 days. In some cases, primary immunized mice were boosted at day 20 with a second injection of 100 μ l of SRBC and analyzed 10 days after. Total spleen cells were cultured at a density of 1×10^6 cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) either with 50 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), alone or plus 20 ng/mL IL4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ), or IL4 plus 5 μ g/mL anti-CD40 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Flow cytometry and cell sorting. Antibodies and reagents used for staining and cell sorting experiments are detailed in Supplementary Table 2. Flow cytometry analyses were done on a BD Pharmingen LSRFortessa[®] cytometer. Data were then analyzed with BD FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA). Intracellular staining for flow cytometry was done using BD cytofix/cytoperm kit following the manufacturer's instructions (BD Biosciences). For SHM analyses, germinal center (B220+ PNA^{high} Fas+) and resting (B220+ PNA^{low} Fas-) B cells from Peyer's patches were sorted. Cell sorting experiments were done on a BD Pharmingen FACSVantage[®] cell analyzer.

SHM and S-junction analyses. Genomic DNA from total Peyer's patches cells (S-junctions) or sorted B cell subsets was extracted using standard proteinase K procedures. All DNA sequences for SHM were amplified using Phusion[®] high-fidelity DNA polymerase (New England BioLabs) with primers indicated in Supplementary Fig. 3, cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI), sequenced with the BigDye Terminator kit on a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and analyzed using Finch TV software. Mutations were counted for each sequence, then added and divided by the total number of analyzed nucleotides to obtain mutation frequency. For junction analysis, DNA was subjected to two rounds of PCR with nested primers

(Supplementary Fig. 3). The first round of PCR consisted in 10 cycles followed by a second round of 32 cycles.

ELISA assays. Human and mouse κ light chains, **IgG1 and IgG3** in sera from WT and KIKS mice were evaluated by ELISA as previously described⁴². Briefly, 96 multiwell plates (Maxisorb, Nunc, Denmark) were coated overnight with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with appropriate antibodies (Supplementary Table 2) in NaHCO_3 buffer. Plates were then blocked with PBS containing 3% BSA for 30 min and diluted sera samples or standards were incubated for 2 h at 37 °C. Alkaline phosphatase-conjugated antibodies were incubated for 1 h 30 at 37 °C and followed by the addition of p-Nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich). Reading of plates was done at 405 nm with a SAFAS Xenius® device.

Transcripts analysis. Total RNA from Peyer's patches was extracted with TRI Reagent® (Ambion, Austin, TX), according to the manufacturer's protocol, and 1 μg was used for cDNA synthesis using hexameres (Applied Biosystems). Amplification of primary transcripts was performed using primers indicated in Supplementary Fig. 3 with SYBR green Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer and normalized using GADPH as housekeeping gene.

Immuno-FISH 3D. GC B cells (GL7^+) from murine Peyer's Patches were dropped onto poly-L-lysine slides and fixed with 2% paraformaldehyde for 10min at room temperature. After washing with PBS, cells were permeabilized with 1% triton X100 for 15 min at room temperature. Cells were stained with $\gamma\text{-H2AX}$ antibody (1/300, Millipore) overnight at 4°C followed by secondary goat anti mouse IgG (1/1000, Invitrogen) during one hour at room temperature. After 3 washes with PBS/Tween 0.1%, cells were post-fixed in 2% paraformaldehyde for 10min at room temperature and permeabilized with triton X100 1% HCl 0.1M for 20 min at room temperature. Denaturation was performed during 35min with 2M HCl at room temperature and slides were rinsed 3 times in cold PBS. Cells were hybridized overnight at 37°C with Igh (5'IgH) or Ig κ (RP23-341D5) probes

labeled with dUTP-digoxigenine (Roche). The next day, cells were washed in 1X SSC at 72°C for 5 min and 1X SSC at room temperature for 5 min. Then, cells were incubated with anti-digoxigenine FITC (1/300, Abcam) 1h at room temperature and washed three times in 2X SSC. Finally, slides were mounted with vectashield (Vector labs). Images were acquired with an epifluorescence inverted microscope (LEICA DMI6000B). Optical sections separated by 0.2µm were collected and stacks were deconvoluted using Huygens software and analysed with Image J software.

Chromatin immunoprecipitation. We used the ChIP-IT Express Kit (Active Motif) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5×10^6 Peyer's patches cells were fixed with 1% formaldehyde at room temperature. The reaction was stopped by adding glycine to a final concentration of 0.125 M. After the cross-linking reaction, cell lysis and sonication were performed on Vibracell sonicator (Sonics and Materials, Inc). For immunoprecipitation, 4µg of each antibody was added to the lysate at 4 °C overnight. The immunoprecipitated DNA was used for real-time PCR using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The quantitative PCR signal was normalized using the % input method. Primers for KIKS locus are listed in Supplementary Fig. 3 or described in Wang et al.²⁷ for IgH locus. Antibodies used for pull-down of DNA associated with H3K9Ac and 53BP1 or control antibody (Millipore) are indicated in the supplementary Table 2 and were previously described^{27,43}.

Statistical analysis. The statistical tests used to evaluate differences between variables were indicated in legends and were done using Prism GraphPad software (San Diego, CA). All *P* values < 0.05 were considered significant.

REFERENCES

1. Chaudhuri, J. & Alt, F. W. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 541–552 (2004).
2. Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 517–531 (2012).
3. Manis, J. P., Tian, M. & Alt, F. W. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* **23**, 31–39 (2002).
4. Stavnezer-Nordgren, J. & Sirlin, S. Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO J.* **5**, 95–102 (1986).
5. Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 165–196 (2002).
6. Chaudhuri, J. *et al.* Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* **422**, 726–730 (2003).
7. Hein, K. *et al.* Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* **188**, 2369–2374 (1998).
8. Nowak, U., Matthews, A. J., Zheng, S. & Chaudhuri, J. The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* **12**, 160–166 (2011).
9. Stavnezer, J., Guikema, J. E. J. & Schrader, C. E. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 261–292 (2008).
10. Perlot, T., Alt, F. W., Bassing, C. H., Suh, H. & Pinaud, E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 14362–14367 (2005).
11. Dunnick, W. A. *et al.* Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J. Exp. Med.* **206**, 2613–2623 (2009).

12. Vincent-Fabert, C. *et al.* 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 (2010).
13. Rouaud, P. *et al.* The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* **210**, 1501–1507 (2013).
14. Rush, J. S., Fugmann, S. D. & Schatz, D. G. Staggered AID-dependent DNA double strand breaks are the predominant DNA lesions targeted to S mu in Ig class switch recombination. *Int. Immunol.* **16**, 549–557 (2004).
15. Casellas, R. *et al.* Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* **291**, 1541–1544 (2001).
16. Peters, A. & Storb, U. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* **4**, 57–65 (1996).
17. Reynaud, S. *et al.* Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* **174**, 6176–6183 (2005).
18. Laffleur, B. *et al.* Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes Immun.* **15**, 341–346 (2014).
19. Rouaud, P. *et al.* Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* **211**, 975–985 (2014).
20. Xiang, Y. & Garrard, W. T. The Downstream Transcriptional Enhancer, Ed, positively regulates mouse Ig kappa gene expression and somatic hypermutation. *J. Immunol.* **180**, 6725–6732 (2008).
21. Lebecque, S. G. & Gearhart, P. J. 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 (1990).

22. Chen, Z., Viboolsittiseri, S. S., O'Connor, B. P. & Wang, J. H. Target DNA Sequence Directly Regulates the Frequency of Activation-Induced Deaminase-Dependent Mutations. *J. Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1200416
23. Nagaoka, H., Muramatsu, M., Yamamura, N., Kinoshita, K. & Honjo, T. Activation-induced deaminase (AID)-directed hypermutation in the immunoglobulin Smu region: implication of AID involvement in a common step of class switch recombination and somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* **195**, 529–534 (2002).
24. Barreto, V., Reina-San-Martin, B., Ramiro, A. R., McBride, K. M. & Nussenzweig, M. C. C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol. Cell* **12**, 501–508 (2003).
25. Reina-San-Martin, B. *et al.* H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* **197**, 1767–1778 (2003).
26. Kuang, F. L., Luo, Z. & Scharff, M. D. H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *PNAS* **106**, 5288–5293 (2009).
27. Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A. A. & Kenter, A. L. S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J. Exp. Med.* **206**, 1817–1830 (2009).
28. Bothmer, A. *et al.* 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J. Exp. Med.* **207**, 855–865 (2010).
29. Takizawa, M. *et al.* AID expression levels determine the extent of cMyc oncogenic translocations and the incidence of B cell tumor development. *J. Exp. Med.* **205**, 1949–1957 (2008).
30. Gostissa, M. *et al.* IgH class switching exploits a general property of two DNA breaks to be joined in cis over long chromosomal distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 2644–2649 (2014).

31. Liu, M. *et al.* Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* **451**, 841–845 (2008).
32. Zarrin, A. A. *et al.* Antibody class switching mediated by yeast endonuclease-generated DNA breaks. *Science* **315**, 377–381 (2007).
33. Ta, V.-T. *et al.* AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat. Immunol.* **4**, 843–848 (2003).
34. Chen, Z. *et al.* AID-initiated DNA lesions are differentially processed in distinct B cell populations. *J. Immunol.* **193**, 5545–5556 (2014).
35. Wuerffel, R. *et al.* S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* **27**, 711–722 (2007).
36. Van Ness, B. G., Coleclough, C., Perry, R. P. & Weigert, M. DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin kappa light chain is frequently retained in cells that rearrange the kappa locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 262–266 (1982).
37. Marcu, K. B., Banerji, J., Penncavage, N. A., Lang, R. & Arnheim, N. 5' flanking region of immunoglobulin heavy chain constant region genes displays length heterogeneity in germ lines of inbred mouse strains. *Cell* **22**, 187–196 (1980).
38. Hackney, J. A. *et al.* DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* **101**, 163–189 (2009).
39. Leung, H. & Maizels, N. Regulation and targeting of recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch region sequences. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1450–1458 (1994).
40. Shanmugam, A., Shi, M.-J., Yauch, L., Stavnezer, J. & Kenter, A. L. Evidence for Class-Specific Factors in Immunoglobulin Isotype Switching. *J Exp Med* **191**, 1365–1380 (2000).
41. Zarrin, A. A., Goff, P. H., Senger, K. & Alt, F. W. Sy3 switch sequences function in place of endogenous Sy1 to mediate antibody class switching. *J Exp Med* **205**, 1567–1572 (2008).

42. Sirac, C., Carrion, C., Duchez, S., Comte, I. & Cogné, M. Light chain inclusion permits terminal B cell differentiation and does not necessarily result in autoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7747–7752 (2006).
43. Sabouri, S. *et al.* C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for efficient class switch recombination and gene conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 2253–2258 (2014).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the staff of the animal facility and the cell cytometry and imaging facility of Limoges University, Eric Pinaud, Laurent Delpy and Bernardo Reina San Martin for helpful discussions. This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Agence Nationale de la Recherche and Association pour la Recherche sur le Cancer. FL and AB are funded by grants from the French government, Agence Nationale de la Recherche and Ligue Nationale contre le Cancer.

Author contributions.

F.L., A.B., S.L.N. and C.S. performed experiments and analyzed data. O.M. and F.L. developed the experimental model. M.C. and C.S. conceived and supervised the study. F.L., M.C. and C.S. wrote the manuscript with contributions from A.B. and S.L.N.

Supplementary Information accompanies this paper at

<http://www.nature.com/naturecommunications>

The authors declare no conflict of interest.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Representation and expression of the KIKS locus. Functional KIKS VJ rearrangements yield Ig with a human C κ region. KIKS CSR-like events join S regions, then excising hC κ and yielding Ig with murine C κ .

Figure 2. Low-level of CSR-like recombination in KIKS mice. (a) Representative flow cytometry analyses of CSR in spleen B cells (B220⁺) from SRBC-immunized mice. Percentages of B-cells expressing IgG1 or murine κ -LC are indicated. (b) Comparison of IgH CSR efficiency in WT, KIKS AID^{+/+}, KIKS AID^{+/-} and KIKS AID^{-/-} mice upon SRBC immunization. Percentages of switched B cells in spleen are shown (mean \pm SEM) (c) Comparison of KIKS CSR efficiency in KIKS AID^{+/+}, KIKS AID^{+/-} and KIKS AID^{-/-} mice upon SRBC immunization (day 8 and day 10 after boost). Percentages of m κ -LC switched B cells in spleen and Peyer's patches are shown (mean \pm SEM). For (b) and (c), n = 4 – 6 mice of each strain except for KIKS AID^{-/-}, n = 2 – 4 mice in at least 2 independent experiments. (d) ELISA quantification of serum m κ -LC (black) as compared to IgG1 (light grey) and IgG3 (dark grey) in non immunized (NI) and SRBC-immunized mice. Superimposed means (μ g/ml) are shown (n = 4 – 6 mice per group in 2 independent experiments). (e) Representative flow cytometry analyses of human and mouse κ -LC expression among B220⁺ cells in Peyer's patches of KIKS AID^{+/+}, KIKS AID^{+/-} and KIKS AID^{-/-} mice. Percentage of m κ -LC⁺ on total B cells (B220⁺) (upper panel) and on germinal center B cells (B220⁺ GL7⁺) is represented (bottom panel).

Figure 3. Analysis of KIKS CSR-like junctions.

(a) Location of DNA breaks (vertical lines) in S μ (top) and S γ 3 (bottom) implicated in each sequenced junction. (b) Mutation rates (mutation per kb) in joined S μ (top) and S γ 3 (bottom) are indicated above the pie charts. Segment sizes in the pie charts are proportional to the number of sequences carrying the number of mutations indicated in the charts. The number of independent

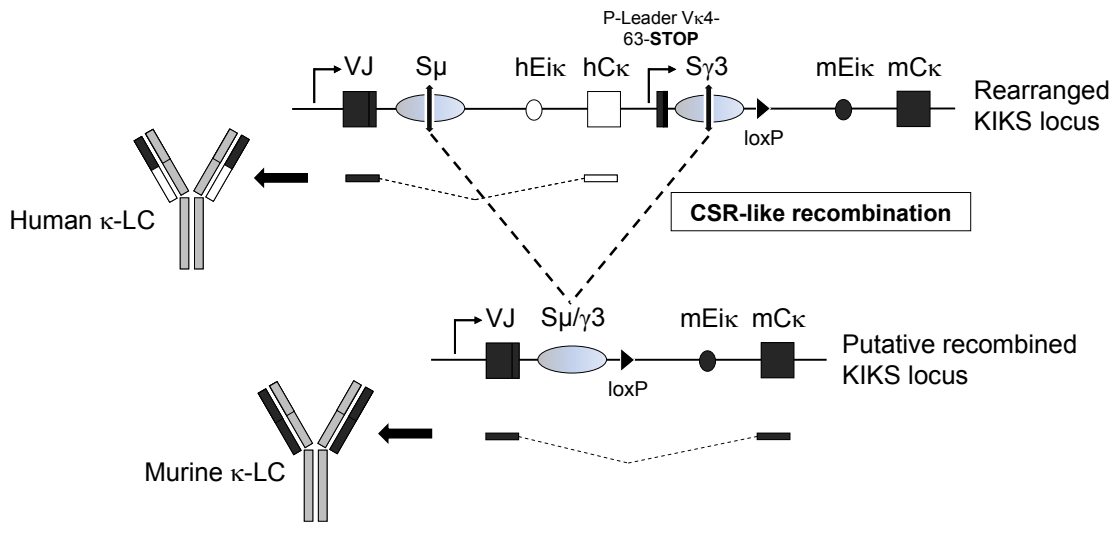
sequences analyzed is indicated in the center of each chart. (c) Analysis of microhomology at S μ /S γ 3 junctions in KIKS GC B cells. Histograms represent the percentage of S μ /S γ 3 junction sequences with indicated nucleotide overlap. Mean length of overlap in base pairs (OL) and number of sequences analyzed (*n*) are indicated. * Sequences with small insertions (one to three nucleotides) at the junction were scored as zero microhomology and represent 15% of total junctions. For (b) and (c), results were obtained from 4 independent experiments in which Peyer's patches of 3 mice were pooled.

Figure 4. KIKS locus is accessible to AID.

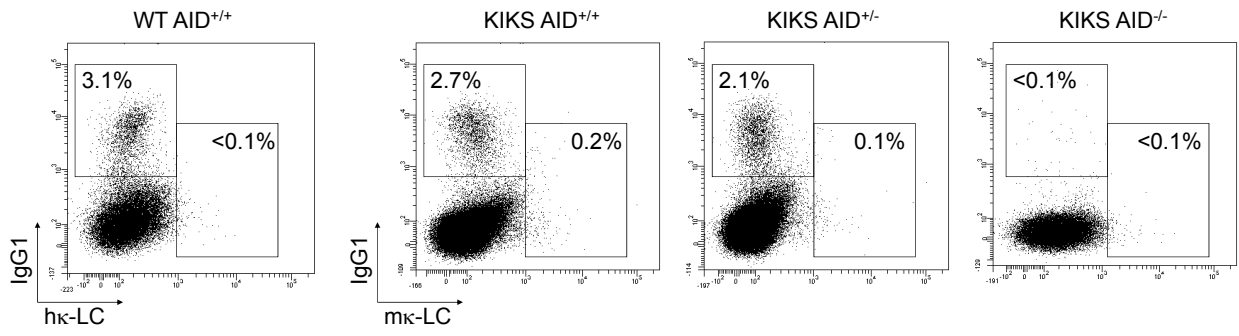
(a) Analysis of mutations in KIKS S μ region according to VJ rearrangement. Left panel: the two primers used for amplification (short arrows) allow amplification of KIKS alleles that are rearranged to all the J κ segments but analyses were carried out on J κ 5 (top) or J κ 1 (bottom) rearrangements. For both J κ 5 and J κ 1 rearrangements, J κ 5 intron and 5' part of S μ region were sequenced. Right panel: pie charts analyses of J κ 5 intron and 5' S μ mutations from sorted germinal center (B220⁺ PNA^{high} Fas⁺) Peyer's patches B cells from KIKS mice. Segment sizes of the pie charts are proportional to the number of sequences bearing the indicated numbers of mutations. Numbers of analyzed sequences (center of pie charts) and number of mutations per kb (mut/1kb) are indicated (below pie charts). (b) Analysis of mutations in KIKS 5' S γ 3 region from the same cells as in (a). Sequenced region, amplified with indicated primers (shorts arrows) is represented. Pie chart features are the same than in (a). (c) Analysis of mutations in IgH S μ region from the same cells as in (a). Sequenced region, amplified with indicated primers (shorts arrows) is represented. Pie chart features are the same than in (a). (d) Table representing the summary of somatic hypermutations on KIKS and IgH loci in Peyer's patches GC B cells from KIKS mice.

Figure 5. Double strand breaks occur normally in KIKS S regions

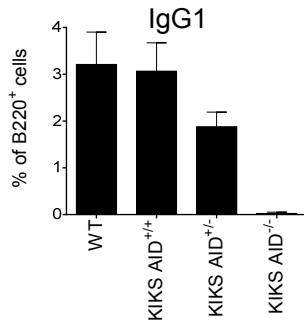
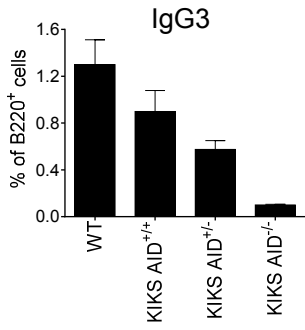
(a) The number of deletions per kilobase in switch regions is shown at the KIKS and IgH loci in KIKS mice. Total number of analyzed nucleotides is indicated on top of each bars. (b) Analysis of microhomology at total ISD junctions in KIKS GC B cells. Histogram represents the percentage of junction sequences with indicated nucleotide overlap. For (a) and (b), the number of experiments is the same as in Fig. 3. (c) γ -H2AX association with IgH or Ig κ in KIKS GC B cells. Histogram represents the combination of 3 independent experiments (individual data set are comparable). The p value calculated with a Fisher exact test is non significant ($p=0,46$). (d) Representative images of colocalization between γ -H2AX with IgH locus (left panel) or with Ig κ locus (right panel). Scale bar: 1 μ m.



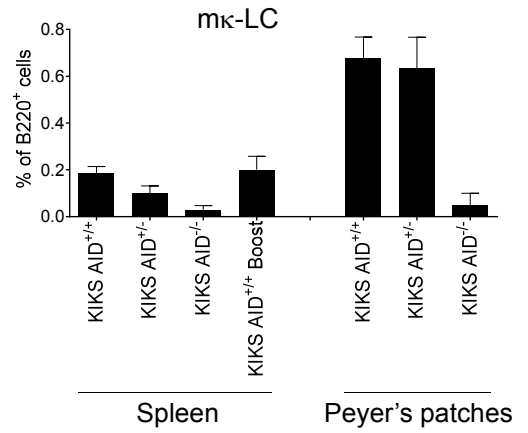
a



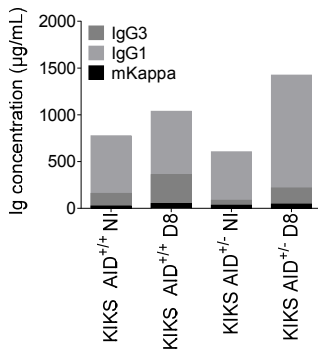
b



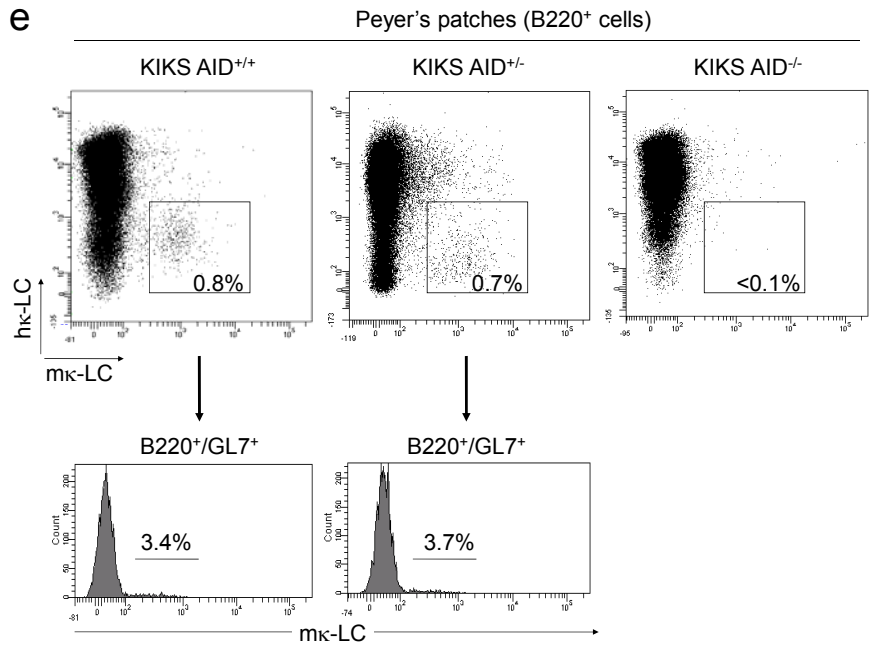
c

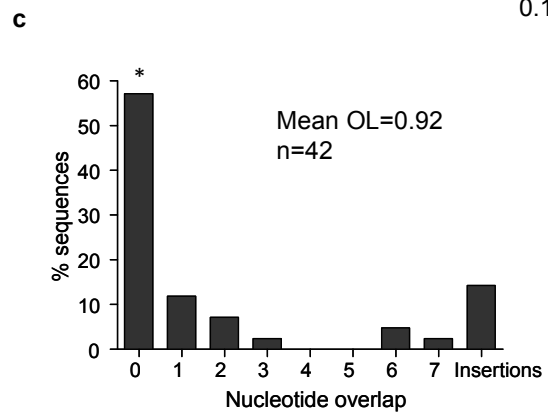
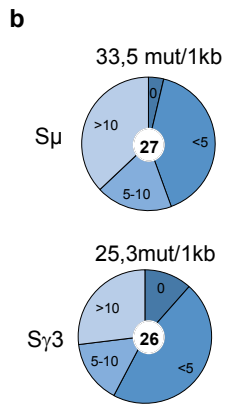
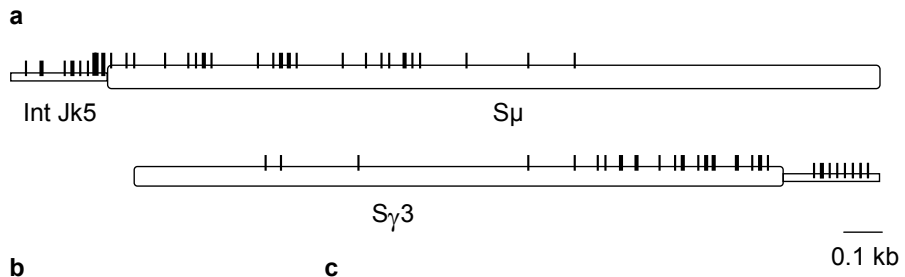


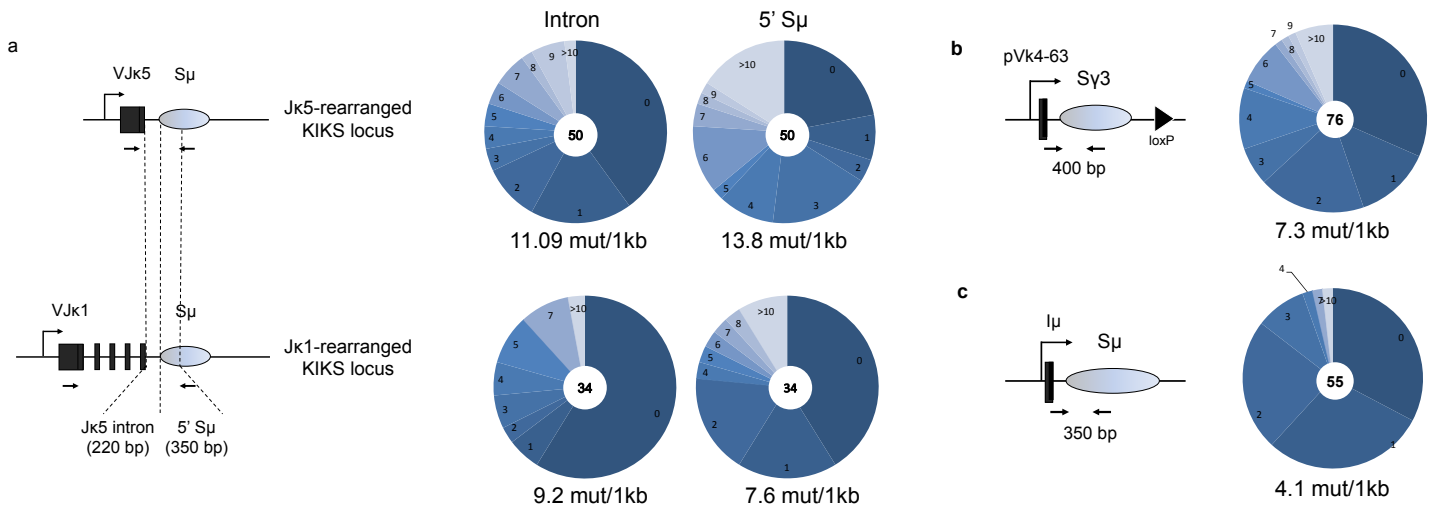
d



e

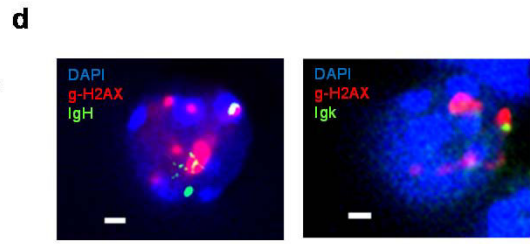
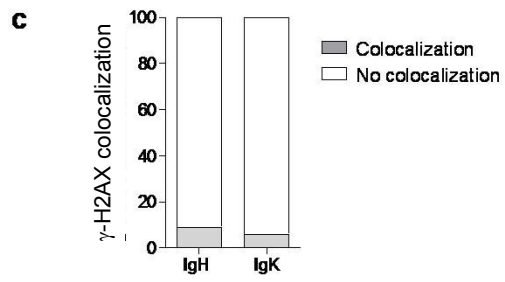
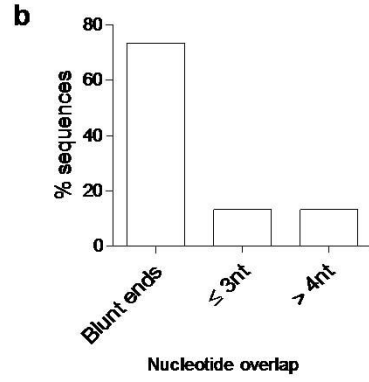
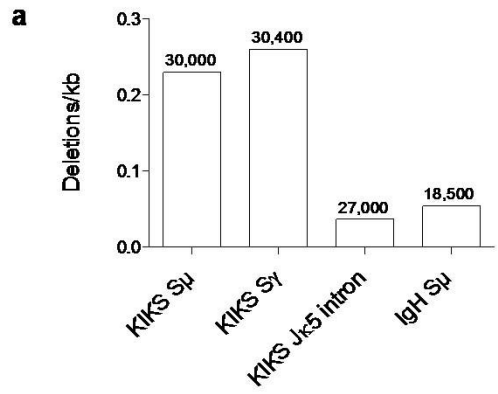






d

	Germinal Center B cells KIKS locus							B resting KIKS locus							
	Jk1 rearrangement			Jk5 rearrangement				IgH Sμ	Jk1 rearrangement			Jk5 rearrangement			IgH Sμ
	Jk3	intron	Sμ	intron	Sμ	Sy3	Jk3		intron	Sμ	intron	Sμ	Sy3		
Total number of sequences	12	34	34	50	50	76	55	12	39	39	34	34	73	11	
Total length (pb) analysed	7608	7480	11900	11000	17500	30400	19250	7608	8580	13650	7480	11900	29200	3850	
Mutations number	85	69	91	122	242	224	80	0	1	3	0	2	4	0	
Mutation frequency (%)	11,17	9,2	7,6	11,09	13,8	7,3	4,1	0	0,11	0,29	0	0,17	0,14	0	



Supplementary Information for

Switch regions *per se* trigger a long-range AID activity that is not sufficient for optimal class switch recombination

Lechouane *et al.*

Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1. KIKS locus targeting strategy and B cell development in KIKS mice. (a) The KIKS construct was inserted into the Ig κ locus by homologous recombination. The inserted cassette includes the core S μ , followed with the hE κ enhancer and constant hC κ exon from the human Ig κ locus and then with the core S γ 3. A V κ promoter and mutated leader exon provides transcription and splicing of S γ 3. The downstream floxed Neo^R gene was removed by Cre-deletion to generate the germline KIKS locus. (b) Flow cytometry analyses of surface Ig expression in spleen B cells (gated on B220⁺). Data shown are representative of at least 3 experiments with 3 animals of each strain. (c) ELISA quantification of murine (upper panel) and human (bottom panel) κ -LC in sera from non-immunized WT and KIKS mice. Data are represented as points for individual mice, expressed in log scale as mean \pm SEM and differences were evaluated using a Student's *t* test (n = 4-8 per group in at least 2 independent experiments). (d) Flow cytometry analysis of spleen B cells (B220⁺) from KIKS mice, stained with h κ -LC PE and either FITC-coupled isotype control or m κ -LC FITC. Only cells included in the lower gates can be considered as specifically expressing murine κ -LC. Data are representative of 3 independent experiments with 2 mice per group. (e) Flow cytometry analysis of germinal center B cells (B220⁺ GL7⁺) in spleen from non-immunized and SRBC-immunized WT and KIKS mice.

Supplementary Figure 2. CSR in stimulated B cells. (a) Representative flow cytometry analysis of the expression of B220 and IgA in Peyer's patches from KIKS mice. (b) Flow cytometry analysis of switched IgH isotypes and mouse κ -LC in spleen B cells after 4 days of *in vitro* stimulation with LPS (top) or anti-CD40 + IL4 (bottom). Data are representative of at least 2 independent experiments with 2 animals of each strain.

Supplementary Figure 3. Locus representation and primers used in this study. (a) Representation of the J κ 1-rearranged KIKS locus with location of the primers (arrowheads) used in this study. (b) Names, sequences and uses of these primers are indicated.

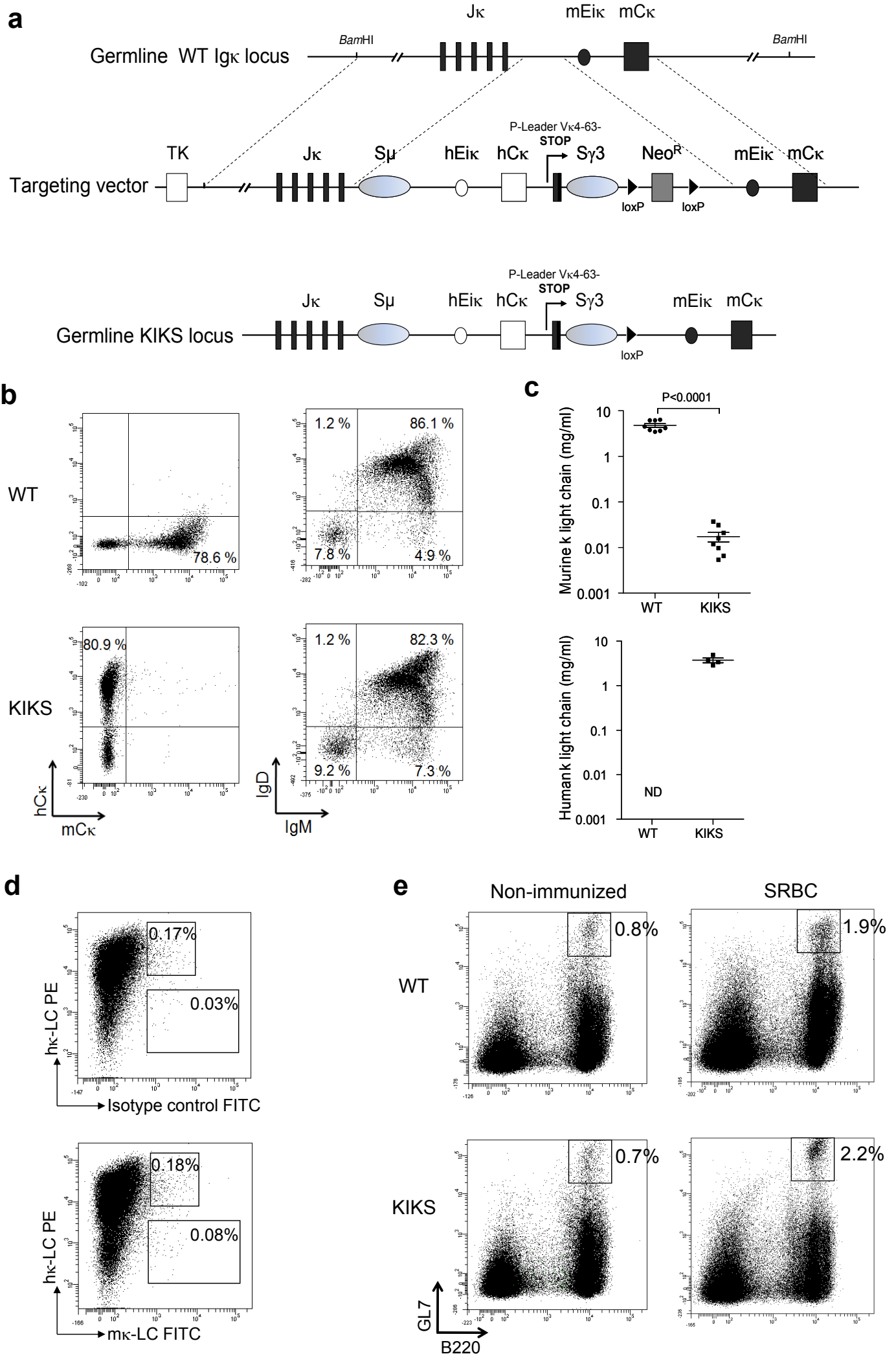
Supplementary Figure 4. S μ /S γ 3 junctions at KIKS locus. Sequences of junctions, from Peyer's patches cells, are compared to sequences of KIKS S μ and S γ 3. Homology is represented in gray. Some junctions involve the intronic region upstream S μ (Int J κ 5) or sequence downstream S γ 3 (3' S γ 3).

Supplementary Figure 5. Representation of the rearranged KIKS locus and transcription of S μ and S γ 3 regions. (a) Primers (arrowhead) and size of the transcripts after amplification by PCR are indicated. For each transcript, gel electrophoresis analysis of PCR products is shown. The DNA ladder (L) used is pUC19/*Msp*I. (b) Primary transcription of S μ and S γ 3 regions of KIKS and IgH loci was quantified by quantitative RT-PCR on total Peyer's Patches cells from KIKS mice. (n=2 mice in at least 2 independent experiments, mean \pm SEM)

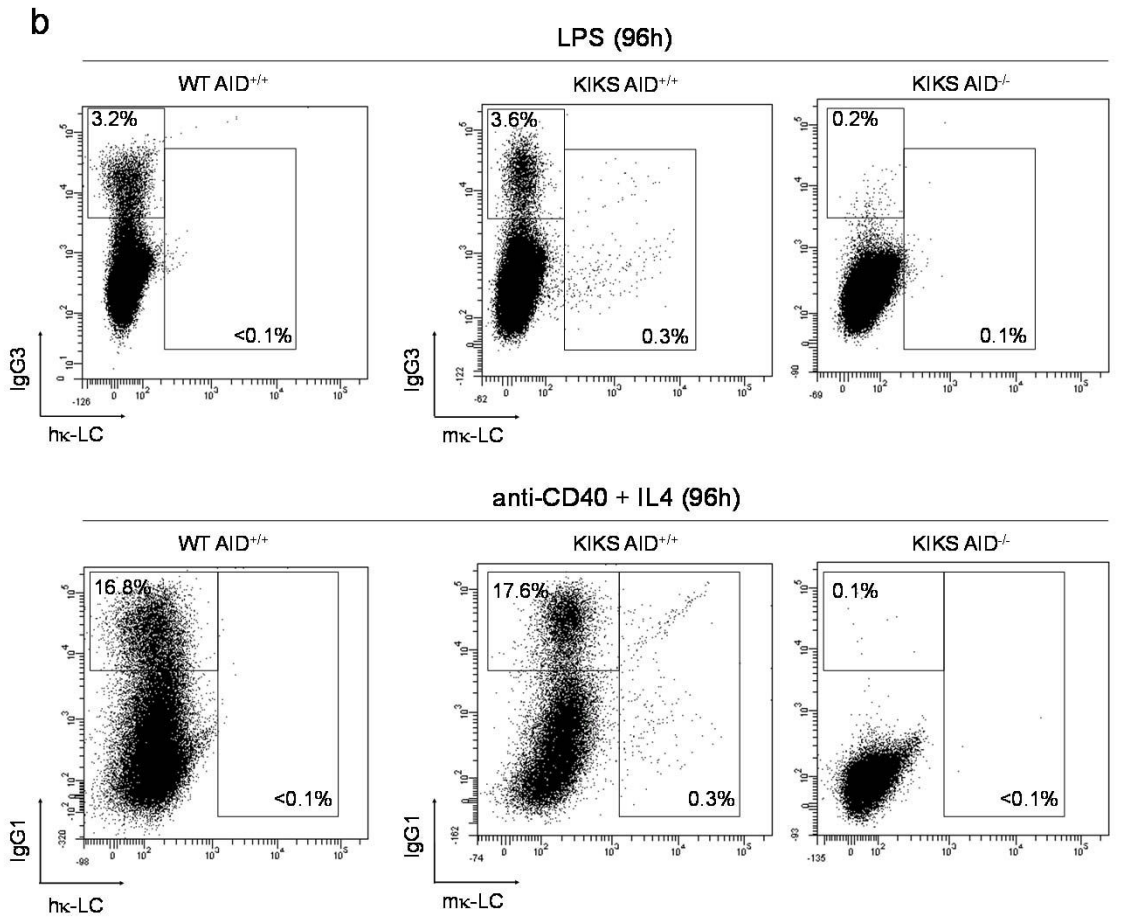
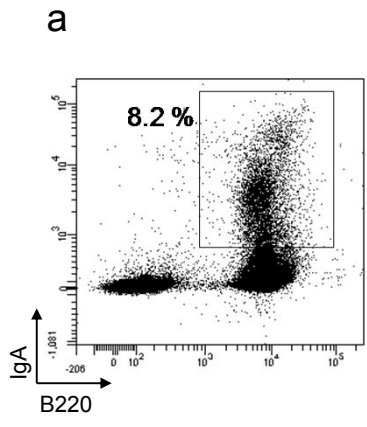
Supplementary Figure 6. ChIP experiments. H3K9AC (top panel) and 53BP1 (bottom panel) antibody were used for ChIP experiment on total Peyer's patches from KIKS mice.

Input and IP samples were analyzed by QPCR for the S μ KIKS locus, or for IgH S μ or C μ (left panel) and S γ 3 KIKS locus and IgH S γ 3 (right panel). Primer used are located on a schematic diagram (bottom). ChIP-QPCR data are presented as percentage input (Mean \pm SEM)

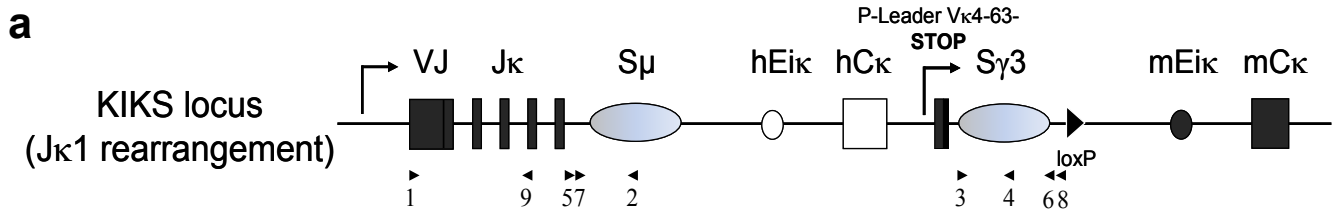
Supplementary Figure 7. Analysis of ISD sequences. Sequences of ISDs in KIKS S μ and S γ 3. 5' and 3' parts of the junctions are separated by slash. Nucleotides into parenthesis represent microhomologies. Sequences in red represent homologies of more than 10 nucleotides.



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



b

Primer	Sequence (from 5' to 3')	Use
1 VKconsensus	CAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGGRAC	V κ /S μ (SHM), V κ /hC κ , <i>trans</i> -CSR
2 SmuKIKSrev	CCAACACAGCGTAGCATAGC	V κ /S μ and IgH S μ (SHM)
3 Sg3mforBglII	ATCGTAGATCTCTGGGGGATTATGGAAACCT	S γ 3 (SHM)
4 Sg3KIKSrev	AGCTTGGTCCCCATACCTTC	S γ 3 (SHM)
5 IntJk5for1	GAGAAAATGGAGAGGGCTCA	S μ /S γ 3 junctions
6 KIKSg3rev1	GCTTGGCTGGACGTAAGCTC	S μ /S γ 3 junctions
7 IntJk5for2	GGGGCAAAAAGAGGCTTTAG	S μ /S γ 3 junctions
8 KIKSg3rev2	GGGTTACATGGCCCTTAG	S μ /S γ 3 junctions
9 UpJK5mRev1	CGCTCAGCTTTCACACTGAC	J κ 3 (SHM)
Not shown in (a)		
LVk4-63mFor	TGCAGATTCAGCTTCCTG	S γ 3 primary transcripts and ChIP
Sg3R1KIKS	GGTGCTCAGTCCAGTTTTCTG	S γ 3 primary transcripts and ChIP
SmuFKIKS	ATACTATGGTCACAGCGGCC	Smu primary transcripts and ChIP
SmuRKIKS	AGAAGCACTCAGAGAAGCCC	Smu primary transcripts and ChIP
CkmRev	GCACCTCCAGATGTTAACTGC	LV κ /mC κ transcripts
CkhRev	GACTTCGCAGGCGTAGACTT	V κ /hC κ transcripts
MAR3S	GTACCGTTGTCTGGGTCACCTCAC	IgH S μ (SHM)
Calpharev	GCAGGTCCTCAAGAGCTGGC	<i>trans</i> -CSR
5'EikhFor	ACGGCCGTCTGTTGACTTCTCCCAGCA	KIKS locus construction
3'pACKhrev	AGCGGCCGCGAGGGAGGACTGTCTTGCAG	KIKS locus construction
5'pVk4-63m	ACGGCCGTGTGTCAGGGCACATGAAAT	KIKS locus construction
3'LVk4-63mStop	AGCGGCCGCTCTGTTACCTCAGGCACTG	KIKS locus construction
Sg3mfor	ACGGCCGCTGGGGGATTATGGAAACCT	KIKS locus construction
Sg3Revm	AGCGGCCGCCCTTCAGGCAGGTTATTCA	KIKS locus construction
Sp6	TATTTAGGTGACACTATAG	Sequencing
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequencing

IntJk5 AGAGGAAAGTAATAAATACTATGGTCACAG----- IntJk5 ACAGCTGAGTCGAGATGGGTGGGCTTCTCT----- IntJk5 26
1 AGAGGAGGCATTAATACTATGGTCACAGGGAGTTCGGGTGGTGGGACGTGGGACCA ATGGCTGAGCCGAGATGGGTGGGCTTTCTAGAGGTGAGCTGGGTTAGGTTGGAGTATGG
Sy3 -----GGAGCTAGGGTGGTGGGATGTGGGGACCA -----AGAGGTGAGCTGGGTAGGTTGGAGTATGG

IntJk5 AATGAAGTACTGTAATAAATACTGGAAATGA----- S11 GAGATGGGTTGAGATGGGTGAGCTGAGCTGGGC----- IntJk5 27
2 GATGAAGTACTGTAATAAATACTGGAAATGAATGCATCGATGCATCGATGCAGGAATTC GAGATGGGTTGAGATGGGTGAGCTGAGCTGGGCAGATCTCAGGAGCTGGGAGGTGGA
3'Sy3 -----ATGCATCGATGCATCGATGCAGGAATTC S11 GAGATGGGTTGAGATGGGTGAGCTGAGCTGGGCAGATCTCAGGAGCTGGGAGGTGGA
Sy3 -----GCTGGGCAGCTCCTCAGGAGCTGGGAGGTGGA

IntJk5 GAGCTAGACTGAGCTGAGCTAGGTTGAGCTG----- S11 AGAGCTAAACTCTACTGCCTACACTGGACTG----- IntJk5 28
3 GAGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGTTGAGCTGAGTGAAGTATGGGACCAAGCTGGGC AGAGCTAAACTCTACTGCCTACACTGGACTGCTGGGTAGGAGGAGTGTGGGACCAAG
Sy3 -----GTAAGTGAAGTATGGGACCAAGCTGGGC S11 AGAGCTAAACTCTACTGCCTACACTGGACTG----- GCTGGGTAGGAGGAGTGTGGGACCAAG
Sy3 -----GCTGGGTAGGAGGAGTGTGGGACCAAG

IntJk5 GAACAAGTTGAGAGCCCTAGTAAGCCGAGG----- S11 AGCTGGGTGAGCTAGACTGAGCTGAGC----- IntJk5 29
4 GAACAAGTTGAGAGCCCTAGTAAGCCGAGGTTGAGCCGGGTAGTGGGAATATGGAGA AACTGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTCCAGGCTGGGCAGCTCCTGGAGGAAGCTAGG
Sy3 -----GGTGAAGCCGGGTAGTGGGAATATGGAGA S11 AGCTGGGTGAGCTAGACTGAGCTGAGC----- CCAGGCTGGGCAGCTCCTGGAGGAGCTAGG
Sy3 -----

IntJk5 AGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGGGTTGAGCTG----- S11 AGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAGCTGGGT----- IntJk5 30
5 AGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGGGTTGAGCTGTGGGTGAGGACCAAGCTGGGAGCTA AGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAGATGGGTAGGAGGAGTATGAGGACTAGGTTGGG
Sy3 -----GTGGGTTGAGGACCAAGCTGGGAGCT S11 AGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAGCTGGGT----- TGGGTAGGAGGAGTATGAGGACTAGGTTGGG
Sy3 -----

IntJk5 TTGAGAGGAACTAATAAATACTATGCTCA----- S11 GAGTACTGAGATGGGTGAGATGGG----- IntJk5 31
6 TTGAGAGGAACTAATAAATACTATGCTCAATGGGCAGCTCTGGGCAGCTGAGGTTAGT GAGTACTGAGATGGGTGAGATGGG----- TAGAGGTGAGCCGGGTAGTGGGAATATG
Sy3 -----TGGGCAGCTCTGGGCAGCTGAGGTTAGT S11 GAGTACTGAGATGGGTGAGATGGG----- TACAGGTGAGCCGGGTAGTGGGAATATG
Sy3 -----TACAGGTGAGCCGGGTAGTGGGAATATG

IntJk5 GAGCCCTAGTAAGCCGAGGCTCTAAAAGCA----- S11 GAGCTGGGTTGAGCTAGACTGAGCTGAGCCT----- IntJk5 32
7 GAGCCCTAGTAAGCCGAGGCTCTAAAAGCAATCCTCTGGGCAGCTGAGGTTAGTGGGAGTG GACTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCCTCAGGCTGGGCAGCTCCTGGAGGAAGTAGG
Sy3 -----CCTCTGGGCAGCTGAGGTTAGTGGGAGTG S11 GACTGGGTTGAGCTAGACTGAGCTGAGCCT----- CTGAGGCTGGGCAGCTCCTGGAGGAGCTAGG
Sy3 -----

IntJk5 GCTACGCTGTGTGGGTTGAGCTGATCTGA----- S11 GCTAGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTG----- IntJk5 33
8 GCTACGCTGTGTGGGTTGAGCTGATCTGATCCTGAGGACTAGGTTGGGAGCTACAGGTGAGCTG GCTAGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGGGTGGACCAGGCTGGGCAGCTCCTCAGGAGAG
Sy3 -----GGACTAGGTTGGGAGCTACAGGTGAGCT S11 GCTAGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTG----- GACCAGGCTGGGCAGCTCCTCAGGAGAGC
Sy3 -----

IntJk5 GAGAGGAAAGTAAATAAATACTATGGTCACA----- S11 GGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAG----- IntJk5 34
9 GAGAGGAGGATTAATAAATACTATGGTCACAGGGAGTTCGGGTGGTGGGAGCTGGGAC GGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAG----- GAGTATGAGGACTAGCTTGGGCAGCTACAG
Sy3 -----GGGAGCTAGGTTGGTGGGATGTGGGACCA S11 GGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAG----- TAGTATGAGGACTAGCTTGGGCAGCTACAG
Sy3 -----

IntJk5 GAATGAGCTGGGCCGCTAAGCTAAACTAGG----- S11 GAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAGCTGGGTG----- IntJk5 35
10 GAATGAGCTGGGCCGCTAAGCTAAACTAGGTTCTGAAGAGGAGTTACGTCAGCCAGGCT TCTGAAGAGGAGTTTACGTCAGCCAGGCTA----- GAGGTGAGGCTGAGCTGGGACCAAGCTGGGCA
3'Sy3 -----TCTGAAGAGGAGTTTACGTCAGCCAGGCT S11 GAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAGCTGGGTG----- GAGGTGAGGCTGAGCTGGGACCAAGCTGGGCA
Sy3 -----

IntJk5 TAGACTGTAATAAATACTGGAATGAGCTGGC----- S11 GCTAAACTCTACTGCCTACACTGGACTGTT----- IntJk5 36
11 TAGACTGTAATAAATACTGGAATGAGCTGGCCACCTCTGGGCAGCTAGGTTAGTGGGAGTG GCTAAACTCTACTGCCTACACTGGACTGTTGGGTAGGAGGAGTGTGGGACCAAGCTG
Sy3 -----CTGGGCAGCTCTGGGCAGCTAGGTTAGTGG S11 GCTAAACTCTACTGCCTACACTGGACTGTT----- GGGGTAGGAGGAGTGTGGGACCAAGCTG
Sy3 -----

IntJk5 AAAAGCAAGCTGAGCTGAGATGGTGGGCTGGC----- S11 CTGCCTACACTGGACTGTTCTGAGCTGAGAT----- IntJk5 37
12 AAAAGCAAGCTGAGCTGAGATGGTGGGCTGGCCACCTGAGGAGCTGAGGTTGGGATATGAGGAG CTTGCCTACACTGGACTGTTCTGAGCTGAGATATGGGACTAACCTGGGCAGCTCTGGGG
Sy3 -----GAACTGGGTTAGTGGGACTATAGGAGCAG S11 CTGCCTACACTGGACTGTTCTGAGCTGAGAT----- TATGGGACTAACCTGGGCAGCTCTGGGG
Sy3 -----

IntJk5 AGAGGAAAGTAAATAAATACTATGGTCACAG----- S11 CTGAGCTGAGCTAGGTTGAGCTGAGCTGGGT----- IntJk5 38
13 AGAGGAGAAATAAATAAATACTATGGTCACAGTTGTTGGGTCACAGCTGTGGGGCCAGGCTGGGCTGTTCTCGGAG CTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAG----- CTGAGGTAGAGAGCTAGGTTAAGTGGGTTAGG
Sy3 -----ATGTTGGGTCACAGGCTGGGAGCTCTCGGAG S11 CTGAGCTGAGCTAGGTTGAGCTGAGCTGGGT----- GAGGGAGCTAGGTTAAGTGGGTTAGG
Sy3 -----

IntJk5 GATGAAGTACTGTAATAAATACTGGAAATGA----- S11 GTAATGAACTGGAATGAGCTGGGCCGCTAAG----- IntJk5 39
14 GATGAAGTACTGTAATAAATACTGGAAATGAATGCATCGATGCATCGATGCAGGAATTC GTAATGAACTGGAATGAGCTGGGCCGCTAAGTACAGGTGAGCCGGGTAGTGGGAATAT
Sy3 -----ATGCATCGATGCATCGATGCAGGAATTC S11 GTAATGAACTGGAATGAGCTGGGCCGCTAAG----- TACAGGTGAGCCGGGTAGTGGGAATAT
Sy3 -----TACAGGTGAGCCGGGTAGTGGGAATAT

IntJk5 ATGGGTTGAGATGGGTTGAGCTGAGCTGGG----- S11 ACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACTAAA----- IntJk5 40
15 ATGGGTTGAGATGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGGAGGAGTGTGGGG ACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACTAAAAGTGGGTATGGGACCAAGCTGGGCA
Sy3 -----AGCTGAGCTGGGTTAGGAGGAGTGTGGGG S11 ACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACTAAA----- AAGTGGGTTATGGGACCAAGCTGGGCA
Sy3 -----

IntJk5 AGCTGAGCTGGACTGAGCTGAGCTGGG----- S11 GCTGGGTTGAGCTCAGCTATGTACTACCG----- IntJk5 41
16 AGCTGAGCTGGACTGAGCTGAGCTGGGTGCTCTGAGGTTGAGCTGGGTTGAGGAGGAGTAT GCTGGGTTGAGCTCAGCTATGTACTACCG- (. . .) -GTGAGGACCAAGCTGGGCAGCTACAG
Sy3 -----TAGGTGAGCTGGGTTAGGAGGAGTAT S11 GCTGGGTTGAGCTCAGCTATGTACTACCG----- GTGAGGACCAAGCTGGGCAGCTACAG
Sy3 -----

IntJk5 TTAACCGAGATGAGCCAACTGGAATGAAC----- S11 TTAACCGAGATGAGCCAACTGGAATGAAC----- IntJk5 42
17 TTAACCGAGATGAGCCAACTGGAATGAACAGGCTGGGCAGCTCTGGAGGAGCTAGGTT TTAACCGAGATGAGCCAACTGGAATGAAC----- TGAGCCGGGTAGTGGGAATATGGAGACC
Sy3 -----CAGGCTGGGCAGCTCTGGAGGAGCTAGGTT S11 TTAACCGAGATGAGCCAACTGGAATGAAC----- TGAGCCGGGTAGTGGGAATATGGAGACC
Sy3 -----

IntJk5 GAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT----- S11 GACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACT----- IntJk5 18
18 GAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGGTTGAGTGGGAACATAGGTTATTAGC GACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACT----- TGAGGAGTGGGAACATAGGTTATTAGC
Sy3 -----TGAGGTTAGTGGGAACATAGGTTATTAGC S11 GACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACT----- TGAGGAGTGGGAACATAGGTTATTAGC
Sy3 -----

IntJk5 GAACCTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACT----- S11 GACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACT----- IntJk5 19
19 GAACCTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACTGGGCAGCTACAGGTGAGCCGGGTAGTGG GACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACT----- GGCAGCTACAGGTGAGCCGGGTAGTGG
Sy3 -----GGCAGCTACAGGTGAGCCGGGTAGTGG S11 GACTTTCATTAATCTAGGTTGAATAGACT----- GGCAGCTACAGGTGAGCCGGGTAGTGG
Sy3 -----

IntJk5 ATCTAGGTTGAATAGACTAAACTCTACTG----- S11 ATCTAGGTTGAATAGACTAAACTCTACTG----- IntJk5 20
20 ATCTAGGTTGAATAGACTAAACTCTACTGTTAGGTAAGTGAAGGATGGGGACCAAGGCT ATCTAGGTTGAATAGACTAAACTCTACTG----- TAGGTTAAGTGAAGGATGGGGACCAAGGCT
Sy3 -----TAGGTTAAGTGAAGGATGGGGACCAAGGCT S11 ATCTAGGTTGAATAGACTAAACTCTACTG----- TAGGTTAAGTGAAGGATGGGGACCAAGGCT
Sy3 -----

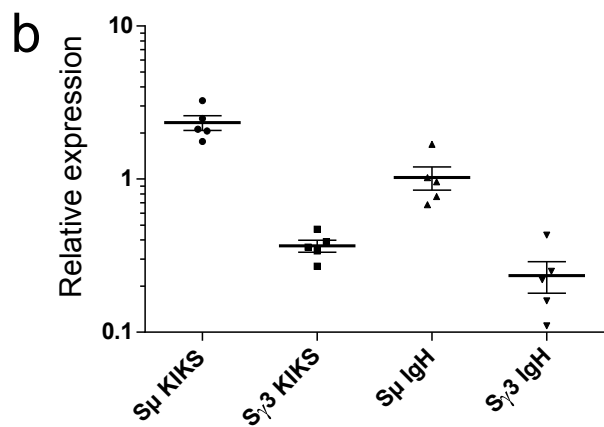
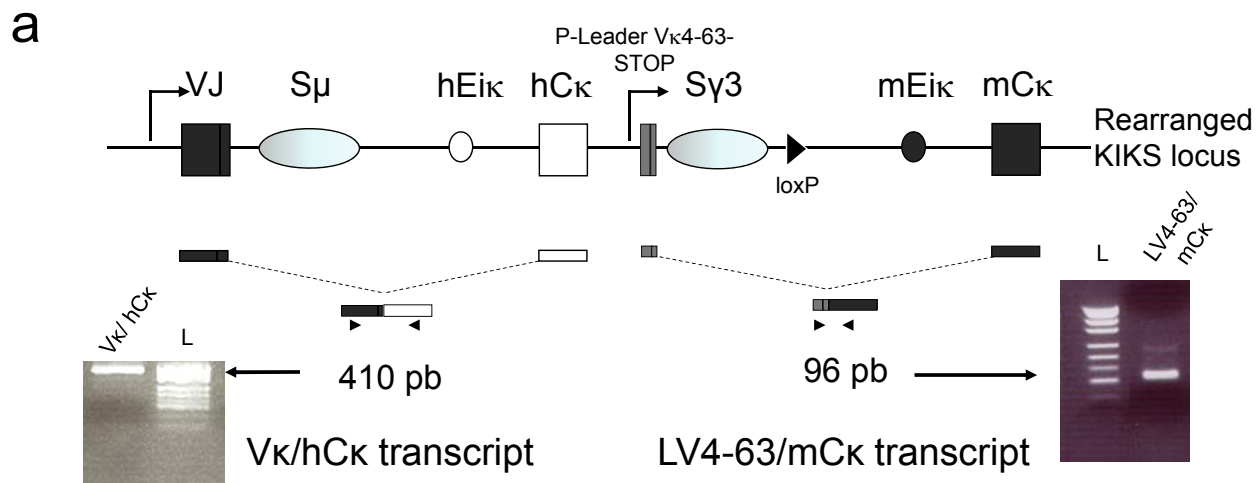
IntJk5 GCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAG----- S11 GCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAG----- IntJk5 21
21 GCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAGCAGTTCTGGGTAAGCTGGGTTACATGGGTT GCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAGCAGTTCTGGGTAAGCTGGGTTACATGGGTT
Sy3 -----GACAGCTCTGGGTAAGCTGGGTTACATGGGTT S11 GCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTGAG----- GACAGCTCTGGGTAAGCTGGGTTACATGGGTT
Sy3 -----

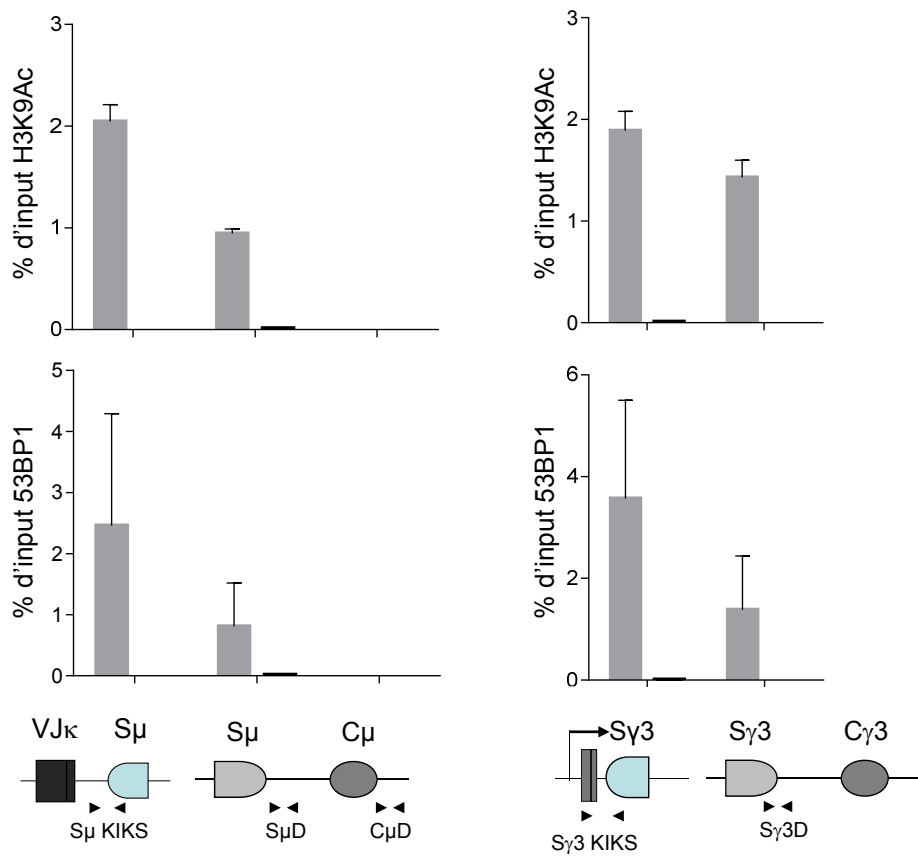
IntJk5 CGCTAAACTGAGGTGATTACTCTGAG----- S11 CGCTAAACTGAGGTGATTACTCTGAG----- IntJk5 22
22 CGCTAAACTGAGGTGATTACTCTGAG- (. . .) -CAGGTTAATATGTCGACTAAAGGGCGA CGCTAAACTGAGGTGATTACTCTGAG- (. . .) -CAGGTTAATATGTCGACTAAAGGGCGA
Sy3 -----CAGGTTAATATGTCGACTAAAGGGCGA S11 CGCTAAACTGAGGTGATTACTCTGAG----- CAGGTTAATATGTCGACTAAAGGGCGA
Sy3 -----

IntJk5 AAAGCAAGGCTGAGCTGAGATGGTGGGC----- S11 AAAGCAAGGCTGAGCTGAGATGGTGGGC----- IntJk5 23
23 AAAGCAAGGCTGAGCTGAGATGGTGGGCATGGGAACAGGCTGACAGCTCTGGGAA AAAGCAAGGCTGAGCTGAGATGGTGGGCATGGGAACAGGCTGACAGCTCTGGGAA
Sy3 -----ATGGAACAGGCTGACAGCTCTGGGAA S11 AAAGCAAGGCTGAGCTGAGATGGTGGGC----- ATGGAACAGGCTGACAGCTCTGGGAA
Sy3 -----

IntJk5 ACTATGGTCACAGCCGGCTCCGATA----- S11 ACTATGGTCACAGCCGGCTCCGATA- (. . .) -TAGTGGGAGTGTAGGGACCAAGCTGGG----- IntJk5 24
24 ACTATGGTCACAGCCGGCTCCGATA- (. . .) -TAGTGGGAGTGTAGGGACCAAGCTGGG ACTATGGTCACAGCCGGCTCCGATA- (. . .) -TAGTGGGAGTGTAGGGACCAAGCTGGG
Sy3 -----TAGTGGGAGTGTAGGGACCAAGCTGGG S11 ACTATGGTCACAGCCGGCTCCGATA- (. . .) -TAGTGGGAGTGTAGGGACCAAGCTGGG----- TAGTGGGAGTGTAGGGACCAAGCTGGG
Sy3 -----

IntJk5 GTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAG----- S11 GTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAG----- IntJk5 25
25 GTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAGATGGGTTAGGAGGAGTATGAGGACTAGGTT GTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAGATGGGTTAGGAGGAGTATGAGGACTAGGTT
Sy3 -----TGGGTTAGGAGGAGTATGAGGACTAGGTT S11 GTGAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTAAG----- TGGGTTAGGAGGAGTATGAGGACTAGGTT
Sy3 -----





Supplementary Figure 6

S μ :

```
008 CTCATCC-----/TGTAG
016 GAGGCTC-----/AAGCA
018 GTGATTA-----/GAATG
030 GTGATTA-----/GAATG
031 GCTCATC-----/GTTTA
036 AAGCAAA-----(AAA)/TGAAG
130 CAGCTCA-----/GAGTT
```

S γ 3 :

```
109 GGAGCTG-----/CCAGG
117 GGGGTAG-----/GCTCT
120 GGTGAGG-----(AGG)/CTGGG
120 GGAGCTGGGG-----(...GCTGGGG)/AGGTG
174 AGGTTTG-----/TAGGA
183 TAGGGACCAG-----(...GGACCAG)/GCTGG
193 CTGGGGT-----/GTTCA
176 GCAGTTC-----/AGGAC
```

Supplementary Table 1. B cell development in KIKS mice.

	Spleen ^a			Bone marrow ^b		
	% B cells (B220+)	% Fo (B220+ CD23+ CD21lo)	% MZ (B220+ CD23- /lo CD21hi)	% Pro-B (B220+ CD43+ CD25-)	% Pre-B (B220+ CD43- CD25+)	% Immature (B220+ CD25- IgMint)
WT	46,9 ± 2,4	74.0 ± 2.8	6.4 ± 0.5	4.9 ± 0.5	9.0 ± 1.3	3.9 ± 0.6
KIKS	49.3 ± 1,7	72.2 ± 1.6	5.3 ± 0.7	5.7 ± 0.6	9.1 ± 1.6	4.0 ± 0.6

^a Percentages ± SEM are indicated based on lymphocyte gate analysis. Percentages of Fo and MZ are determined among the B220+ B cell population. Differences between WT and KIKS are not significant using Student's *t*-test (n = 6-10 in at least 2 independent experiments).

^b Percentages ± SEM are determined among bone marrow cells gated on lymphocytes. Differences between WT and KIKS are not significant using Student's *t*-test (n = 4-6 in 2 independent experiments).

Supplementary Table 2. Antibodies used in this study.

Antibody	Clone	Source
Flow cytometry		
Anti-B220- BD Horizon™ V450	RA3-6B2	BD Biosciences
Anti-B220-APC	RA3-6B2	BioLegend
Anti-CD138-APC	281-2	BD Biosciences
Anti-mouse kappa-FITC	187-1	Beckman Coulter
Anti-human kappa-PE	NA	Dako
Anti-IgM-APC	II/41	eBioscience
Anti-IgD-PerCP/Cy5.5	11-26C.2a	BioLegend
Anti-IgG1-PE	A85-1	BD Pharmingen
Anti-IgG3-FITC	R40-82	Becton Dickinson
Anti-IgA-PE	11-44-2	eBioscience
Anti-CD21-PE	7G6	BD Pharmingen
Anti-CD23-PC7	B3B4	BioLegend
Anti-CD25-PC7	PC61	BioLegend
Anti-CD43-PE	S7	BD Pharmingen
GL7-PE	GL7	BD Pharmingen
PNA-FITC	NA	Sigma-Aldrich
In vitro stimulation		
Anti-CD40	1C10	R&D Systems
ELISA		
anti-mouse Kappa	NA	SouthernBiotech
anti-mouseKappa-AP	NA	SouthernBiotech
anti-human Kappa	NA	Beckman Coulter
anti-humanKappa-AP	NA	Beckman Coulter
Anti-mouse IgG1	NA	Beckman Coulter
Anti-mouse IgG1-AP	NA	Beckman Coulter
Anti-mouse IgG3	NA	SouthernBiotech
Anti-mouse IgG3-AP	NA	Beckman Coulter
CHIP		
Anti-53BP1	NA	Novus Biological
Anti-H3K9Ac	NA	Millipore
Control antibody	NA	Millipore

NA: not applicable.

Article 2 : A mouse model recapitulating human monoclonal heavy chain deposition disease evidences the relevance of proteasome inhibitor therapy

Article 2

A mouse model recapitulating human monoclonal heavy chain deposition disease evidences the relevance of proteasome inhibitor therapy

Amélie Bonaud, Sébastien Bender, Guy Touchard, Corinne Lacombe, Nivine Srour, Laurent Delpy, Christelle Oblet, Anne Druilhe, Nathalie Quellard, Vincent Javaugue, Michel Cogné, Frank Bridoux and Christophe Sirac

(soumis à Blood)

Le syndrome de Randall de type HCDD (*Heavy Chain Deposition Disease*) est caractérisé par la présence de dépôts de chaîne lourde d'Ig monoclonales anormales au niveau rénal. Ces chaînes lourdes pathogènes présentent, dans tous les cas décrits à ce jour, une délétion à minima du domaine CH1, permettant leur sécrétion en absence d'association avec une chaîne légère (Aucouturier et al., 1993c). Cependant, une trentaine de cas seulement ont été décrits (Moulin et al., 1999; Bridoux et al. en préparation), rendant l'étude de ce type de pathologie particulièrement difficile.

Comme expliqué dans l'introduction bibliographique de cette thèse, les études menées sur le syndrome de Randall ont principalement été réalisées au travers de travaux concernant les chaînes légères d'Ig issues de patients atteints de LCDD (*Light Chain Deposition Disease*), qui représente la forme la plus fréquente de cette pathologie. Ces travaux *in vitro* ont mis en lumière la toxicité de ces chaînes pathogènes et notamment leur capacité à induire la production de cytokines pro-inflammatoire par les cellules mésangiales. Ils ont également permis de voir la dérégulation de production des composants de la matrice extra cellulaire, ainsi qu'une diminution de synthèse et d'activité des métalloprotéases (MMP) probablement impliquées dans la formation de la sclérose glomérulaires, fréquemment observée dans cette pathologie (Keeling and Herrera, 2005, 2009). Bien que ces travaux aient permis de grandes avancées sur la compréhension de la toxicité de ces Ig pathogènes, ils ne reproduisent pas les conditions physiologiques en raison des grandes quantités d'Ig utilisées et de l'absence des autres types cellulaires présents dans le rein et surtout ne permettent pas d'envisager la mise au point de thérapies innovantes. Nous avons donc entrepris la création de modèles murins reproduisant ces pathologies.

Dans les années 1990, nos modèles de « greffes de tumeurs » ont montrés que les lésions rénales typiques de LCDD pouvaient être reproduites chez la souris (Khamlichi et al., 1995b). Cependant du fait de la progression de la tumeur, des études sur plus long terme, comme les approches

thérapeutiques ne sont pas envisageables avec une telle stratégie. C'est pourquoi nous avons repris la stratégie utilisée dans le cas du modèle murin de syndrome de Fanconi dans lequel une chaîne légère humaine d'immunoglobuline a été insérée dans le locus kappa murin, en lieu et place des domaines κ . Nous avons donc inséré une chaîne lourde d'Ig issue d'un patient atteint de HCDD, dans le locus kappa murin. Cette chaîne lourde présentait une délétion du premier domaine constant (CH1). Nous avons donc amplifié et inséré un domaine CH1, préalablement encadré de site LoxP, de manière à pouvoir déléter à façon le CH1. Nous avons ainsi obtenu un modèle murin qui produit une chaîne lourde d'Ig complète (CH1⁺) et un modèle murin qui produit une chaîne lourde d'Ig tronquée du CH1 (CH1⁻). Bien qu'une proportion similaire de plasmocytes produise les deux formes de la chaîne lourde, la version tronquée est retrouvée à un niveau significativement plus faible dans le sérum, en partie due à une très nette diminution de production de la chaîne tronquée par rapport à la chaîne complète. Malgré ces très faibles taux d'Ig pathogène, les analyses des reins de ces souris ont révélées des dépôts typiques du syndrome de Randall uniquement dans les animaux produisant la chaîne tronquée, montrant donc l'importance de la délétion du CH1, pour la génération de ces dépôts. Ainsi, les analyses d'immunofluorescence et de microscopie électronique laissent apparaître des dépôts linéaires amorphes le long des membranes basales tubulaires et glomérulaires.

De manière à reproduire le plus finement la pathologie et tenter d'amplifier les dépôts, ces animaux ont été croisés avec le modèle murin DH-LMP2A (Casola et al., 2005). Dans ce modèle, la protéine LMP2A issue du virus de l'EBV (*Epstein Bar Virus*) et mimant la signalisation du BCR, a été insérée dans le locus des chaînes lourdes murines, invalidant ce dernier. Nous avons montré que ce modèle présente une proportion plus importante de plasmocytes (Lechouane et al., 2013). De plus, ce modèle présente l'avantage de produire exclusivement notre chaîne lourde transgénique puisque le locus IgH est invalidé. Ainsi, des études de cytométrie en flux ont montré que la quasi-totalité des plasmocytes de ces animaux, dit DH-CH1⁻ ou DH-CH1⁺, produisent la chaîne lourde transgénique et surtout, que des dépôts de plus forte intensité étaient mis en évidence, en comparaison aux animaux non DH-LMP2A. Malgré la présence de dépôts intenses, la fonction rénale de ces animaux n'est pas affectée. Cependant, des signes précoces de glomérulosclérose sont présents au travers de l'accumulation de Tenascin-C, traduisant un défaut notamment de la fonction des métalloprotéases.

Un traitement hématologique à base de Bortezomib et de cyclophosphamide, classiquement utilisé chez l'homme, a permis de voir le caractère réversible des dépôts suite à une diminution de la production de l'Ig pathogène et valide donc ce modèle pour des études thérapeutiques. Au cours de notre étude, nous avons aussi constaté que les plasmocytes produisant les Ig tronquées étaient particulièrement sensibles à des traitements au bortezomib. Cette forte sensibilité nous a poussés à analyser les voies de stress du réticulum endoplasmique dans les plasmocytes produisant ces chaînes

tronquées en comparaison à des plasmocytes produisant des Ig complètes. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation significative de la protéine chaperonne BiP ainsi que du facteur de transcription pro-apoptotique Chop, marqueurs typiques d'un stress du réticulum endoplasmique (UPR). Ce stress exacerbé et la présence de la protéine Chop pourrait expliquer la grande sensibilité de ces cellules aux thérapies à base de bortezomib observée chez l'Homme.

En conclusion, nous avons généré un modèle reproduisant le syndrome de Randall de type HCDD et notamment les premiers stades de la pathologie. L'étude de ce modèle, nous a permis de mettre en évidence que la nature même de l'Ig tronquées pouvait induire un stress du réticulum endoplasmique, sensibilisant les cellules à des traitements à base de bortezomib. Nous devons déterminer les raisons précises de ce phénomène qui pourrait être la conséquence d'un repliement non optimal de la protéine, qui par conséquent, s'accumulerait dans le RE causant l'UPR. Dans une telle hypothèse, il sera intéressant de vérifier si d'autres Ig pathogènes impliquées dans des maladies de dépôts d'Ig monoclonales (Amylose AL, LCDD) pourraient conduire aux mêmes phénomènes et expliquer les fortes réponses aux inhibiteurs du protéasome observées chez l'Homme (Jaccard et al., 2014b; Palladini et al., 2014b; Venner et al., 2014b). Nous discuterons dans la partie « résultats préliminaires et perspectives » des premières données que nous avons obtenues sur cette question.

Ce modèle présente donc un réel intérêt pour la compréhension du syndrome de Randall et s'inscrit dans la logique de compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant à l'établissement de ces dépôts et devrait permettre d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre ce type de pathologies.

Scientific category: Immunobiology/ Lymphoid neoplasia

A mouse model recapitulating human monoclonal heavy chain deposition disease evidences the relevance of proteasome inhibitor therapy

Amélie Bonaud^{1,2}, Sébastien Bender^{1,2}, Guy Touchard³, Corinne Lacombe^{2,4}, Nivine Srour¹, Laurent Delpy¹, Christelle Oblet¹, Anne Druilhe¹, Nathalie Quellard^{2,5}, Vincent Javaugue^{2,3}, Michel Cogné¹, Frank Bridoux^{1,2,3} and Christophe Sirac^{1,2}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7276, Université de Limoges, 87000 Limoges, France

² Centre national de référence amylose AL et autres maladies par dépôt d'immunoglobulines monoclonales, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, 87000 Limoges, France

³ Service de néphrologie et transplantation, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86000 Poitiers, France

⁴ Service d'immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86000 Poitiers, France

⁵ Service d'anatomo-pathologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86000 Poitiers, France

Correspondence: Christophe Sirac, CRIBL laboratory, CNRS UMR7276, CBRS room 110, 2 rue du Dr Marcland 87000 Limoges, France; e-mail: christophe.sirac@unilim.fr

Text word count : 3980; Abstract word count : 239; Number of figures : 5; Number of references: 63

Short title: A transgenic mouse model of Randall-type MIDD

Key points:

- We created the first transgenic mouse model recapitulating the early pathologic features of Randall-type heavy chain deposition disease
- Production of a truncated immunoglobulin heavy chain heightens plasma cell sensitivity to bortezomib via terminal unfolded protein response

Abstract

Randall-type heavy chain deposition disease (HCDD) is a rare disorder characterized by glomerular and peritubular amorphous deposits of a truncated monoclonal immunoglobulin (Ig) heavy chain (HC) bearing a deletion of the first constant domain (CH1). We created a transgenic mouse model of HCDD using targeted insertion in the Ig kappa locus of a human HC extracted from a HCDD patient. Our strategy allows the efficient expression of the human HC in mouse B and plasma cells and conditional deletion of the CH1 domain reproduces the major event underlying HCDD. We show that the deletion of the CH1 domain dramatically reduced serum HC levels. Strikingly, even with very low serum level of truncated monoclonal HC, histological studies revealed typical Randall-type renal lesions that were absent in mice expressing the complete human HC. Bortezomib-based treatment resulted in a strong decrease of renal deposits. We further demonstrated that this efficient response to proteasome inhibitors mostly relies on the presence of the isolated truncated HC that sensitizes plasma cells to bortezomib through an elevated unfolded protein response (UPR). This new transgenic model of HCDD efficiently recapitulates the pathophysiological features of the disease and demonstrates that the renal damage in HCDD relies on the production of an isolated truncated HC which, in the absence of a LC partner, displays a high propensity to aggregate even at very low concentration. It also brings new insights into the efficacy of proteasome inhibitor-based therapy in this pathology.

Introduction

Tissue deposition of a monoclonal immunoglobulin (Ig) fragment frequently complicates plasma cell disorders.^{1,2} Among the wide spectrum of renal diseases associated with monoclonal gammopathies, Randall-type monoclonal Ig deposition disease (MIDD) is a multi-systemic disorder with prominent renal manifestations including glomerular proteinuria and renal failure.^{1,3-5} Kidney lesions in MIDD are characterized by non-amyloid amorphous linear deposits of a monoclonal Ig fragment along tubular, and in most cases, vascular and glomerular basement membranes (BM). Nodular glomerulosclerosis and diffuse thickening of tubular BMs are commonly observed.^{3,6} The most frequent type of MIDD is related to deposition of monoclonal light chain (LC) (LCDD), mostly of the κ isotype, but deposits composed of monoclonal heavy chain (HC) only (HCDD) or of light and heavy chain (LHCDD) have been also described.^{3,7} Most reported cases of HCDD were characterized by γ HC deposits.^{4,5,8-11}

The mechanisms involved in the deposition of monoclonal Ig fragments in MIDD remain poorly understood. Structural peculiarities of the V domains of nephrotoxic LCs in LCDD have been suggested to govern their propensity to form insoluble aggregates that precipitate in extracellular spaces, including the presence of hydrophobic residues in solvent-exposed complementary determining region (CDR), N-glycosylation or small protein truncation.^{7,12-16} Few studies also revealed a striking elevated isoelectric point (*pI*) of LCDD LCs as compared to other pathogenic LCs, which may facilitate interactions with anionic proteoglycans of renal basement membranes.^{17,18} In HCDD, the most striking molecular characteristic of the pathogenic HC is the deletion of the first constant (CH1) domain, invariably found by immunofluorescence (IF) studies of kidney biopsies, and molecular studies of bone marrow.^{8,9,11,19} In the absence of LC association, deletion of the CH1 domain appears to be a

prerequisite for the secretion of an isolated HC, precluding its retention in the endoplasmic reticulum (ER) by the interaction with GRP78/Bip chaperone.²⁰⁻²² The V domain also plays a critical role in the pathogenesis of HCDD. Indeed, to date, HC tissue deposition has never been reported in heavy chain disease (HCD), a condition associated with various lymphoproliferative disorders and characterized by a partial or complete deletion of the VH domain.²³

Seminal studies by Herrera and colleagues have highlighted a specific phenotypic modification of mesangial cells upon exposure to LCDD LCs.²⁴⁻²⁹ These changes appeared similar to those observed in diabetic nephropathy, that features glomerular lesions close to those observed in MIDD.^{30,31} LCDD-LCs were shown to induce the production of TGF β and PDGF β , leading to an increased production of extracellular matrix (ECM) proteins including the non conventional tenascin-C together with an inhibition of the matrix metalloproteinase 7 (MMP7) production/activity.^{25-28,30,32,33} This profound ECM remodeling is supposed to contribute, together with the monoclonal Ig deposits, to the pattern of nodular glomerulosclerosis frequently observed in MIDD. However, it remains difficult to depict the pathophysiological mechanisms involved in MIDD in the absence of reliable *in vivo* experimental models. We previously developed models in which secreting cells producing pathogenic human LCs (isolated from patients with either LCDD or renal Fanconi syndrome) were grafted to mice. These models featured renal lesions similar to those observed in the respective patients, validating the reproducibility of the human diseases in mice and the specific involvement of the V domains in the propensity for tissue deposition.^{34,35} However, the poor general condition and short survival of animals due to rapid tumor growth prevented full characterisation and therapeutic investigations. To overcome these problems, we recently created a transgenic mouse model overexpressing a human LC from a patient with LC-associated Fanconi syndrome.³⁶ We targeted insertion of the human LC gene in the mouse κ

locus, allowing a continuous high production of the LC plasma cells. This model accurately reproduced the pathologic features of the disease and permitted physiologic explorations due to the otherwise good general condition of the animals.

In the present study, we used a similar strategy to generate a transgenic model of Randall-type MIDD by targeted insertion in the κ locus of a $\gamma 1$ HC gene isolated from a patient with HCDD. Our knock-in design allowed a conditional CRE-mediated deletion of the CH1 domain reproducing the major event underlying the production of a pathogenic truncated HC. Beside the tissue deposition of the monoclonal human HC accurately reproducing the early events of the disease, this model also allowed to explore the effect of the production of an isolated truncated monoclonal HC by plasma cells.

Materials and methods

Mice

Gene targeting into the murine Ig κ locus was performed as previously described.³⁶ Briefly, the gene coding the secreted form of a human monoclonal γ 1HC extracted from a patient with HCDD was introduced in place of the mouse J κ segments. The step by step procedure to reconstitute the complete human γ HC, comprising a floxed CH1 domain, is detailed in the supplemental Methods and supplemental Figure 1A. DH-LMP2A mice³⁷ were kindly provided by S. Casola (IFOM, Milan, Italy). All the protocols used have been approved by our institutional review board for animal experimentation. Animals were maintained in pathogen-free conditions and analyzed at 6 months of age except when otherwise stated.

***In vivo* treatment, surgery and biochemical parameters**

Unilateral nephrectomy was performed on 8 weeks old mice as previously described.³⁸ The removed kidneys were collected and nephrectomised mice were sacrificed 4 months later. Bortezomib (Velcade®, Janssen Cilag) and cyclophosphamide (Endoxan®, Baxter) (2mg/kg) were injected subcutaneously at the indicated times. We used a Bortezomib dose of 0.75mg/kg per injection, that was previously shown to efficiently deplete plasma cells in another mouse model,³⁹ and which, in our hands, induced a >90% depletion of plasma cells at 24h (not shown). To test the sensitivity of plasma cells to Bortezomib, we set up a protocol using 2 daily injections of a sub-optimal dose (0.5 mg/kg) of Bortezomib leading to a depletion of ~70% of plasma cells in WT mice. Mice were sacrificed for analysis 24h after the last injection. All injections were performed under anesthesia. Biochemical parameters were measured on overnight urine collections and blood samples were obtained by retro-orbital puncture under anesthesia. Urine concentrations of creatinine and albumin were measured

using the Creatinine Assay Kit (Abcam) and Albumin mouse ELISA kit (Abcam), respectively, according to the manufacturer recommendations.

Flow cytometry and cell sorting

Splenocytes were isolated and stained as previously described⁴⁰ with appropriate antibodies (supplemental Table 2). Intracellular stainings were performed using the Intraprep™ kit (Beckman Coulter). Flow cytometry analyses were performed on a BD Pharmingen LSRFortessa® cytometer, and cell sorting experiments were done using a BD FACSAria III cell sorter. Data were analyzed with BD FACSDiva software (BD Biosciences).

Western Blot

Serum proteins were separated by reducing SDS-PAGE (10%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Membranes were blocked in 5% milk Tris-buffered saline Tween, incubated with appropriate antibodies (supplemental Table 2) and revealed by chemiluminescence (ECL, Pierce).

Pathologic studies

Kidney samples were processed for light microscopic examination, immunofluorescence and electron microscopic studies, as previously described.^{35,36} Briefly, immunofluorescence was performed on organs included in OCT and snap frozen in liquid nitrogen. Cryosections of 8µm were fixed with cold acetone, blocked with PBS 3% BSA and stained with appropriate antibodies (supplemental Table 2). Slides were observed on an LSM 510 confocal microscope (Zeiss). Immunoelectron microscopy was made on samples fixed with 4% glutaraldehyde in PBS and embedded in resin (TAAB Labs). Ultra-thin sections were processed for EM studies,

incubated with anti- γ gold-conjugated and examined with a JEOL JEM-1010 electron microscope as previously described.⁴¹ Toluidine-blue stained semi-thin sections were prepared and examined by light microscopy using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss) as previously described.³⁶ Fluorescence intensity of Ig deposits and tenascin-C accumulation were quantified on renal sections in blind experiments carried out by at least two independent experimenters. For Ig deposits, scores of fluorescence intensity ranged from 0 to 4 (0 =absent; 1 = mild discontinuous fluorescence in some glomeruli; 2 = mild linear fluorescence along GBMs; 3 = moderate fluorescence along GBMs and TBMs; 4 = strong fluorescence along GBMs, TBMs and in the mesangium). For tenascin-C accumulation in glomeruli, scores ranged from 0 to 3, with 0 = no fluorescence; 1 = mild fluorescence; 2 = moderate fluorescence and 3 = strong fluorescence). Representative images with scores are depicted in supplemental Figure 3.

In vitro stimulations

Spleen B cells were magnetically enriched using CD43 depletion kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer recommendations and stimulated in vitro (5×10^5 cell/mL) with $5 \mu\text{g/mL}$ of LPS (InVivoGen) during four days, in RPMI supplemented with 10% FCS. 1.10^6 cells were used for flow cytometry analyzes and the remaining cells were used for transcriptional analyzes.

ELISA

Serum were analyzed for the presence of human IgG, as previously described.³⁶ To reveal hybrid Igs composed of the human γHC associated with a murine κLC , we adapted the same protocol using coating with the anti-human IgG and revelation with an anti-mouse κLC . For short-term HC production analysis, spleen cells or 3 days stimulated cells were counted,

washed twice in PBS, normalized on the number of CD138⁺ secreting cells and plated in complete medium for 6 h. Supernatants were collected and dosed by ELISA. All antibodies used in the study are depicted in supplemental Table 2. Plates were read at 405nm with a Xenius® spectrophotometer (Safas).

Transcriptional analysis

Total RNA was extracted using TRI Reagent (Ambion). Reverse transcription was performed using high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) on 3µg of total RNA, with random hexamers. Relative quantification was performed with TaqMan Universal or SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) on cDNA samples (50ng per reaction). Quantification of the gene of interest was analyzed by Δ Ct method with Gapdh used as housekeeper gene. TaqMan® probes for Gapdh (Mm99999915_g1), CHOP (Mm01135937_g1), Herp (Mm01249592_m1), BiP (Mm01333324_g1) and a Sybr green® assay for Xbp1-s (sXBP1for: 5'-gagtccgcagcaggtg-3' and sXBP1rev 5'-gtgtcagagtccatggga-3')⁴² were used.

Statistical analysis.

The statistical tests used to evaluate differences between variables were done using Prism GraphPad software (GraphPad Software, Inc). *P* values between variables were determined using the unpaired Student *t* test. *P* values < 0.05 were considered significant.

Results

Generation and characterization of transgenic mice expressing complete and truncated human monoclonal γ 1HC

A genetically reconstituted gene encoding the VDJ sequence from a patient with HCDD associated with the complete secreted form of the human γ 1 constant region was inserted in the murine κ locus to force expression of the human γ 1HC throughout B cell differentiation (CH1^+ mice). To generate a truncated γ HC similar to that extracted from the patient, we flanked the CH1 sequence by two loxP sites, allowing its Cre-mediated deletion (CH1^- mice) (supplemental Figure 1A). About half of the CH1^+ and CH1^- plasma cells was shown to express the human γ HC together with a murine Ig (Figure 1A and supplemental Figure 2A). We further crossed these mice with the DH-LMP2A mice in which the HC locus was invalidated by the targeted insertion of the Epstein Barr virus protein LMP2A that mimics BCR signalling and allows complete B cell development.³⁷ We recently showed that DH-LMP2A mice feature increased plasma cell differentiation despite the absence of endogenous HCs.⁴⁰ Consequently, DH- CH1^- and DH- CH1^+ mice closely recapitulate the features of a monoclonal gammopathy with an elevated number of plasma cells producing the human monoclonal γ HC in the absence of endogenous murine HC (Figure 1A). Of note, percentage of plasma cells are equivalent in all DH strains (Figure 1A) and only about 50% of plasma cells co-expressed a murine κ LC (supplemental Figure 2A). In sera, human γ HC rates were more elevated in CH1^+ than in DH- CH1^+ mice ($5830 \pm 452 \mu\text{g/mL}$ mean \pm SEM vs 2949 ± 451 , respectively) (Figure 1B). This result may be related to the absence of endogenous LCs in about 50% of plasma cells in DH mice (supplemental Figure 2A) that likely precludes the secretion of the isolated HC due to intracellular retention by the chaperone protein BiP.^{20,43,44} Cre-mediated deletion of the CH1 domain resulted in the production of the expected truncated

human γ 1HC (supplemental Figure 1B). Strikingly, this deletion was associated with a massive decrease of serum human γ HCs in both CH1⁻ ($24.73 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$) and DH-CH1⁻ mice ($34.88 \pm 8.8 \mu\text{g/mL}$) (Figure 1B) which was partially due to a defective secretion by plasma cells as observed by dosage of human γ HCs in supernatants of 6h cultures of either spleen cells or 3 days LPS-stimulated B cells (Figure 1C). We detected only traces of human γ HC in urines in both CH1⁺ and CH1⁻ mice (supplemental Figure 2B) showing that the low level in sera is not due to an increased renal excretion. Similarly to previous observations,^{11,20} we readily detected hybrid Igs composed of the truncated human γ HC associated with a murine LC (supplemental Figure 2C). However, in the absence of available standards, it remained difficult to precisely evaluate the proportion of these non-covalently linked HC/LC Igs as compared to free HC.

Truncated human γ HC recapitulates the renal lesions of HCDD in mouse

We further carried out pathologic studies of kidney sections from 6 month-old mice. Despite the low serum level of human truncated γ 1HCs in mice, immunofluorescence studies revealed typical linear HC deposits along the glomerular, vascular and tubular BMs in CH1⁻ (supplemental Figure 3A) and DH-CH1⁻ kidneys (Figure 2A). These deposits were more pronounced in DH-CH1⁻ than in CH1⁻ kidneys (scores = 3.6 ± 0.19 , mean \pm SEM vs 1.75 ± 0.48 , respectively) (Figure 2B) and were not stained with anti-mouse κ LC (supplemental Figure 3A). Linear vascular γ 1HC deposits were also observed in lung and liver (supplemental Figure 3B). Ig deposits were not observed in WT, DH or DH-CH1⁺ kidneys, demonstrating the specific pathogenicity of the truncated HC (Figure 2A and B). Discrete non linear deposits were observed in some CH1⁺ glomeruli, likely related to immune complexes deposits since they partially colocalized with murine κ LC (supplemental Figure 3A) and were absent in DH-CH1⁺ mice which lack murine Igs. Antibodies specific for human γ HC domains

confirmed the absence of CH1 domain in deposits whereas similar staining patterns were observed with the anti- γ CH2 and anti-human IgG conjugates (supplemental Figure 3C). Due to higher deposit scores, further studies were carried out in DH-CH1⁻ mice and compared to DH mice as control, except when indicated. Linear glomerular and peritubular γ IHC deposits were detectable in kidneys of 2 month-old mice and increased up to 6 months (supplemental Figure 3D). We did not observe a significant increase in renal deposits either in 12 (supplemental Figure 3D) and 18 month-old mice (not shown) or in mice unilaterally nephrectomised at 2 months of age and sacrificed 4 months later (supplemental Figure 3D). Immunoelectron microscopy studies confirmed the presence of non-organized linear deposits along tubular and glomerular BMs, which stained with the anti-human γ HC gold-labelled antibody, similar to those observed in the patient's kidney biopsy samples (Figure 2B and C). Finally, toluidine blue staining revealed a faint diffuse thickening of medullary tubular and glomerular BMs as well as in the mesangium, with no evidence of nodular glomerulosclerosis (Figure 2D) even in 18 month-old mice or unilaterally nephrectomised mice (not shown).

HCDD mice show early signs of glomerulosclerosis but no renal dysfunction

The increased production by mesangial cells of extracellular matrix (ECM) proteins including laminin, collagen type IV, fibronectin and, more specifically, tenascin-C is a hallmark of early glomerular changes in LCDD.^{25,28} We therefore investigated the potential glomerular accumulation of tenascin-C in DH-CH1⁻ kidneys. IF studies revealed a significant ($p=0.0002$) increase in tenascin-C in DH-CH1⁻ as compared to control DH kidneys (scores = 2.11 ± 0.22 vs 0.67 ± 0.11 , mean \pm SEM) (Figure 3A). Since HCDD usually manifests with glomerular proteinuria, we compared the urine albumin /creatinine ratio of DH and DH-CH1⁻ mice. We observed no significant difference despite a trend toward the increase in DH-CH1⁻ mice as compared to DH mice (8560 ± 1575 vs 22330 ± 8283 , mean \pm SEM) (Figure 3B).

Inhibition of kidney HC deposits upon hematologic treatment

To validate the usefulness of our MIDD model for therapeutic investigations, we treated CH1⁻ mice for 5 weeks with a combination of cyclophosphamide + bortezomib closely mimicking the CyBorD (cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone) combination, which is widely used in the various disorders associated with monoclonal gammopathies, including cast nephropathy, AL amyloidosis and MIDD.^{5,45-48} Cyclophosphamide was shown to efficiently deplete B cells (supplemental Figure 4A) and combination with bortezomib maintained a lower level of human IgG as compared to non-treated mice (supplemental Figure 4B). After 5 weeks of treatment, animals were sacrificed and analysed for kidney deposits. We observed a significant inhibition of HC deposits in kidneys of treated mice as compared to non-treated mice (Scores = $2,214 \pm 0,3058$ vs $0,8333 \pm 0,2472$, mean \pm SEM; $p = 0.0056$) (Figure 4C). Although incomplete, recovery of kidney lesions correlated with partial hematologic response, as illustrated by persistence of detectable low serum level of human γ HC (supplemental Figure 4B).

Truncated γ HC-producing plasma cells display exacerbated ER stress and are highly sensitive to proteasome inhibition

Several recent case reports have highlighted the efficiency of bortezomib-based treatments in HCDD.^{5,49} We then sought to determine if the production of an isolated truncated γ HC could influence the fate of plasma cells upon proteasome inhibitor treatment. Spleen plasma cell count was performed in WT, DH and DH-CH1⁻ mice after 2 daily injections of bortezomib (0.5 mg/kg). At post-treatment day 3, spleen plasma cells counts were significantly lower in DH-CH1⁻ mice than in WT or DH mice (fold decrease = 7.13 ± 0.57 , mean \pm SEM vs $3.50 \pm$

0.70 and 2.81 ± 0.35 , respectively) (Figure 5A). We then hypothesized that the increased effect of bortezomib could be related to an exacerbated ER stress induced by the production of an isolated truncated γ HC. We analyzed the transcriptional expression of ER stress markers Chop, BiP/GRP78, HERP and Xbp1s in 4 days LPS-stimulated B cells, a condition known to induce differentiation toward secreting plasmablasts.⁴⁰ When compared to WT cells that produce complete Igs, or DH cells producing either no Ig or isolated LCs (supplemental Figure 2A), we observed a significant increase in several ER stress markers in stimulated B cells of DH-CH1⁻ mice (Figure 5B), including BiP, or the pro-apoptotic transcription factor Chop known to be repressed during normal plasma cell differentiation.⁵⁰ Xbp1s transcription was lower in WT and DH-CH1⁻ cells as compared with DH cells, but this decrease corroborated with the lower plasmablast differentiation as observed by CD138⁺ staining (supplemental Figure 5). The increase in Chop expression was further confirmed in sorted plasma cells of DH-CH1⁻ mice as compared with WT or DH mice (Figure 5C). No significant difference was detected in WT vs DH mice either in sorted plasma cells or in stimulated B cells.

Discussion

We characterized the first transgenic murine model of human MIDD. Using an established strategy of gene targeting in the κ locus,³⁶ we introduced a sequence coding a human γ 1HC from a patient with Randall-type HCDD. HCDD is characterized by tissue deposition, mostly in the kidney, of an isolated truncated monoclonal HC that lacks the CH1 domain but invariably displays a complete VH domain. Then, we analyzed mice producing an artificially reconstituted complete human γ 1HC comprising the CH1 domain and its CH1-truncated counterpart. We demonstrated that mice secreting full-length γ HC, which efficiently associates with murine LCs, did not show any evidence of glomerular and tubular lesions. By contrast, deletion of the CH1 domain led to the progressive appearance of the hallmark renal pathological changes in HCDD, e.g. amorphous linear deposits of the isolated γ HC along tubular and glomerular BMs and in the mesangium. The absence of glomerular proteinuria and glomerulosclerosis, two frequent features of HCDD, was probably related the mixed genetic background of the transgenic mice since both C57BL/6 and 129/Sv mice were shown to be highly resistant in models of nephron reduction or diabetic nephropathy.⁵¹⁻⁵³ Whether backcrossing of our HCDD mouse model to nephropathy-prone genetic background like DBA/2J could overcome this issue remains to be confirmed.⁵² Nevertheless, γ HC deposits were accompanied by glomerular accumulation of tenascin-C, a typical marker of ECM remodeling that precedes development of nodular glomerulosclerosis in LCDD.²⁸ Consequently, our model remains relevant to accurately study *in vivo* the early phenotypic modifications of mesangial cells (induction of TGF β , MMP7 activity, etc...)^{25,27-29} and to test new therapeutic approaches to prevent glomerular injury in MIDD.

It was previously demonstrated that the ER resident chaperone protein BiP/GRP78 retains free HC by stable interaction with the CH1 domain, until a LC displaces this association and

allows secretion of an entire Ig.⁴³ Monoclonal γ HC lacking the CH1 domain were consequently supposed to be freely secreted by plasma cells.²⁰⁻²² Accordingly, isolated HCs produced by plasma cells in human diseases (HCD and HCDD) are invariably characterized by the absence of the CH1 domain. However, in our model, the deletion of the CH1 domain led to a massive decrease of circulating γ HC, partially due to a defective secretion by plasma cells. Whether a defective interaction between CH1-truncated γ HCs and the neonatal Fc receptor (FcRn), known to protect IgG from degradation, could further explain this result remains to be explored.⁵⁴ As previously hypothesized, another non-exclusive possibility could be related to the high avidity for BMs of truncated HCs.^{11,55} In any case, this observation correlates with the low serum level of monoclonal HC usually observed in HCDD patients, making difficult both diagnostic assessment and evaluation of treatment efficacy in this disease.³¹ It also demonstrates the striking nephrotoxic effect of circulating truncated HCs featuring an entire V domain.

Finally, our model showed that plasma cells producing a truncated γ HC are more sensitive to bortezomib treatment than their WT counterpart producing complete Igs. Accumulating evidence has linked protein synthesis to the responsiveness of proteasome inhibitors in multiple myeloma.⁵⁶⁻⁵⁹ Moreover, proteasome inhibitors were shown to trigger the PERK-dependent branch of the UPR and CHOP, leading to a terminal ER stress response due to accumulation of unfolded proteins.⁵⁸⁻⁶⁰ Here, we demonstrated that isolated truncated γ HCs are poorly secreted by plasma cells which in turn, are intrinsically and basically stressed as observed by overexpression of CHOP. We then hypothesize that truncated γ HCs, due to their incomplete assembly^{11,20} and/or their high propensity to aggregate, may represent exquisite substrates to trigger ER stress, lowering the threshold for terminal UPR upon proteasome inhibitor treatments.⁵⁹ This could explain the efficacy of bortezomib-based regimens in HCDD.^{5,49} Further investigations should be conducted to accurately decipher the mechanisms

leading to ER stress in plasma cells producing truncated HCs. In a broader view, the intrinsic toxicity for plasma cells of Ig fragments prone to misfolding and aggregation deserves to be explored in other monoclonal Ig-related diseases including AL amyloidosis and LCDD, in which preliminary studies suggest that bortezomib-based therapy has a strong impact on renal and patient outcomes.^{45,61-63} Transgenic mouse models could be of invaluable interest to explore this issue.³⁶

Altogether, the present transgenic mouse model of HCDD accurately recapitulates the early steps of the human pathology and represents a valuable tool to explore the mechanisms that govern toxicity of truncated HCs and the sequential events leading to glomerular injury in MIDD. It also raises new perspectives to test innovative therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the staff of the animal facility, the cell cytometry and imaging facility of Limoges University, M. Clavel, S. Lecardeur and C. Carrion for technical assistance, and A. Jaccard for helpful discussion. This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique, Fondation pour la Recherche Médicale, Association pour la Recherche sur le Cancer (grant SL220100601332), Institut Universitaire de France, Région Limousin, and Fondation Française pour la Recherche contre le Myelome et les Gammopathies monoclonales. AB and N.S. were funded by fellowships from the Ligue National Contre le Cancer, Région Limousin, and the French ministry of research.

Author contributions

A.B. and S.B. designed, performed and analyzed experiments and drafted the manuscript; C.L, N.S., C.O., A.D., N.Q. and V.J. performed experiments and analyzed data. L.D., M.C. and G.T. provided general advice and critically reviewed the manuscript. F.B. provided general advice and wrote the manuscript. C.S. designed and supervised research and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. *Blood*. 2006;108(8):2520–2530.
2. Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, et al. Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood*. 2012;120(22):4292–4295.
3. Buxbaum J, Gallo G. Nonamyloidotic monoclonal immunoglobulin deposition disease. Light-chain, heavy-chain, and light- and heavy-chain deposition diseases. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1999;13(6):1235–1248.
4. Lin J, Markowitz GS, Valeri AM, et al. Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: the disease spectrum. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*. 2001;12(7):1482–1492.
5. Nasr SH, Valeri AM, Cornell LD, et al. Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: a report of 64 patients from a single institution. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN*. 2012;7(2):231–239.
6. Bridoux F, Leung N, Hutchison CA, et al. Diagnosis of monoclonal gammopathy of renal significance. *Kidney Int*. 2015;
7. Preud'homme JL, Aucouturier P, Touchard G, et al. Monoclonal immunoglobulin deposition disease: a review of immunoglobulin chain alterations. *Int. J. Immunopharmacol*. 1994;16(5-6):425–431.
8. Aucouturier P, Khamlichi AA, Touchard G, et al. Brief report: heavy-chain deposition disease. *N. Engl. J. Med*. 1993;329(19):1389–1393.
9. Khamlichi AA, Aucouturier P, Preud'homme JL, Cogné M. Structure of abnormal heavy chains in human heavy-chain-deposition disease. *Eur. J. Biochem. FEBS*. 1995;229(1):54–60.
10. Tubbs RR, Berkley V, Valenzuela R, et al. Pseudo-gamma heavy chain (IgG4 lambda) deposition disease. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc*. 1992;5(2):185–190.

11. Moulin B, Deret S, Mariette X, et al. Nodular glomerulosclerosis with deposition of monoclonal immunoglobulin heavy chains lacking C(H)1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 1999;10(3):519–528.
12. Denoroy L, Déret S, Aucouturier P. Overrepresentation of the V kappa IV subgroup in light chain deposition disease. *Immunol. Lett.* 1994;42(1-2):63–66.
13. Déret S, Chomilier J, Huang DB, et al. Molecular modeling of immunoglobulin light chains implicates hydrophobic residues in non-amyloid light chain deposition disease. *Protein Eng.* 1997;10(10):1191–1197.
14. Rocca A, Khamlichi AA, Aucouturier P, et al. Primary structure of a variable region of the V kappa I subgroup (ISE) in light chain deposition disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1993;91(3):506–509.
15. Decourt C, Cogné M, Rocca A. Structural peculiarities of a truncated V kappa III immunoglobulin light chain in myeloma with light chain deposition disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1996;106(2):357–361.
16. Decourt C, Touchard G, Preud'homme J-L, et al. Complete Primary Sequences of Two λ Immunoglobulin Light Chains in Myelomas with Nonamyloid (Randall-Type) Light Chain Deposition Disease. *Am. J. Pathol.* 1998;153(1):313–318.
17. Kaplan B, Livneh A, Gallo G. Charge differences between in vivo deposits in immunoglobulin light chain amyloidosis and non-amyloid light chain deposition disease. *Br. J. Haematol.* 2007;136(5):723–728.
18. Kaplan B, Ramirez-Alvarado M, Dispenzieri A, et al. Isolation and biochemical characterization of plasma monoclonal free light chains in amyloidosis and multiple myeloma: a pilot study of intact and truncated forms of light chains and their charge properties. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC.* 2008;46(3):335–341.

19. Soma J, Sato K, Sakuma T, et al. Immunoglobulin gamma3-heavy-chain deposition disease: report of a case and relationship with hypocomplementemia. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 2004;43(1):E10–16.
20. Hendershot L, Bole D, Köhler G, Kearney JF. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J. Cell Biol.* 1987;104(3):761–767.
21. Zou X, Osborn MJ, Bolland DJ, et al. Heavy chain-only antibodies are spontaneously produced in light chain-deficient mice. *J. Exp. Med.* 2007;204(13):3271–3283.
22. Feige MJ, Hendershot LM, Buchner J. How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* 2010;35(4):189–198.
23. Cogné M, Silvain C, Khamlichi AA, Preud'homme JL. Structurally abnormal immunoglobulins in human immunoproliferative disorders. *Blood.* 1992;79(9):2181–2195.
24. Herrera GA, Shultz JJ, Soong SJ, Sanders PW. Growth factors in monoclonal light-chain--related renal diseases. *Hum. Pathol.* 1994;25(9):883–892.
25. Zhu L, Herrera GA, Murphy-Ullrich JE, Huang ZQ, Sanders PW. Pathogenesis of glomerulosclerosis in light chain deposition disease. Role for transforming growth factor-beta. *Am. J. Pathol.* 1995;147(2):375–385.
26. Keeling J, Teng J, Herrera GA. AL-amyloidosis and light-chain deposition disease light chains induce divergent phenotypic transformations of human mesangial cells. *Lab. Invest.* 2004;84(10):1322–1338.
27. Keeling J, Herrera GA. Matrix metalloproteinases and mesangial remodeling in light chain--related glomerular damage. *Kidney Int.* 2005;68(4):1590–1603.
28. Keeling J, Herrera GA. An in vitro model of light chain deposition disease. *Kidney Int.* 2008;75(6):634–645.

29. Russell WJ, Cardelli J, Harris E, Baier RJ, Herrera GA. Monoclonal light chain--mesangial cell interactions: early signaling events and subsequent pathologic effects. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 2001;81(5):689–703.
30. Ronco P, Plaisier E, Aucouturier P. Monoclonal immunoglobulin light and heavy chain deposition diseases: molecular models of common renal diseases. *Contrib. Nephrol.* 2011;169:221–231.
31. Ronco P, Plaisier E, Mougnot B, Aucouturier P. Immunoglobulin Light (Heavy)-Chain Deposition Disease: From Molecular Medicine to Pathophysiology-Driven Therapy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;1(6):1342–1350.
32. Yang CW, Hattori M, Vlassara H, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta 1 mRNA is associated with up-regulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in nonobese diabetic mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 1995;5(8):1610–1617.
33. Herrera GA, Russell WJ, Isaac J, et al. Glomerulopathic light chain-mesangial cell interactions modulate in vitro extracellular matrix remodeling and reproduce mesangiopathic findings documented in vivo. *Ultrastruct. Pathol.* 1999;23(2):107–126.
34. Khamlichi AA, Rocca A, Touchard G, et al. Role of light chain variable region in myeloma with light chain deposition disease: evidence from an experimental model. *Blood.* 1995;86(10):3655–3659.
35. Decourt C, Rocca A, Bridoux F, et al. Mutational analysis in murine models for myeloma-associated Fanconi's syndrome or cast myeloma nephropathy. *Blood.* 1999;94(10):3559–3566.
36. Sirac C, Bridoux F, Carrion C, et al. Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi syndrome. *Blood.* 2006;108(2):536–543.

37. Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, et al. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* 2004;5(3):317–327.
38. Mallipattu SK, Gallagher EJ, LeRoith D, et al. Diabetic nephropathy in a nonobese mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2014;306(9):F1008–1017.
39. Neubert K, Meister S, Moser K, et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat. Med.* 2008;14(7):748–755.
40. Lechouane F, Bonaud A, Delpy L, et al. B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* 2012;
41. Bridoux F, Sirac C, Hugue V, et al. Fanconi's syndrome induced by a monoclonal V κ 3 light chain in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 2005;45(4):749–757.
42. Pengo N, Scolari M, Oliva L, et al. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat. Immunol.* 2013;14(3):298–305.
43. Hendershot LM. Immunoglobulin heavy chain and binding protein complexes are dissociated in vivo by light chain addition. *J. Cell Biol.* 1990;111(3):829–837.
44. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* 1983;306(5941):387–389.
45. Venner CP, Lane T, Foard D, et al. Cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone therapy in AL amyloidosis is associated with high clonal response rates and prolonged progression-free survival. *Blood.* 2012;119(19):4387–4390.
46. Mikhael JR, Schuster SR, Jimenez-Zepeda VH, et al. Cyclophosphamide-bortezomib-dexamethasone (CyBorD) produces rapid and complete hematologic response in patients with AL amyloidosis. *Blood.* 2012;119(19):4391–4394.

47. Shah G, Kaul E, Fallo S, et al. Bortezomib subcutaneous injection in combination regimens for myeloma or systemic light-chain amyloidosis: a retrospective chart review of response rates and toxicity in newly diagnosed patients. *Clin. Ther.* 2013;35(10):1614–1620.
48. Kikukawa Y, Yuki H, Hirata S, et al. Combined use of bortezomib, cyclophosphamide, and dexamethasone induces favorable hematological and organ responses in Japanese patients with amyloid light-chain amyloidosis: a single-institution retrospective study. *Int. J. Hematol.* 2015;101(2):133–139.
49. Patel K, Dillon JJ, Leung N, et al. Use of Bortezomib in Heavy-Chain Deposition Disease: A Report of 3 Cases. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 2014;
50. Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ, Jin Y, Hendershot LM. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones.* 2010;15(3):281–293.
51. Zheng F, Striker GE, Esposito C, Lupia E, Striker LJ. Strain differences rather than hyperglycemia determine the severity of glomerulosclerosis in mice. *Kidney Int.* 1998;54(6):1999–2007.
52. Qi Z, Fujita H, Jin J, et al. Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2005;54(9):2628–2637.
53. Ma L-J, Fogo AB. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int.* 2003;64(1):350–355.
54. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7(9):715–725.
55. Kambham N, Markowitz GS, Appel GB, et al. Heavy chain deposition disease: the disease spectrum. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 1999;33(5):954–962.

56. Bianchi G, Oliva L, Cascio P, et al. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood*. 2009;113(13):3040–3049.
57. Cenci S, Oliva L, Cerruti F, et al. Pivotal Advance: Protein synthesis modulates responsiveness of differentiating and malignant plasma cells to proteasome inhibitors. *J. Leukoc. Biol.* 2012;92(5):921–931.
58. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, et al. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 2006;107(12):4907–4916.
59. Meister S, Schubert U, Neubert K, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* 2007;67(4):1783–1792.
60. Zhou P, Ma X, Iyer L, Chaulagain C, Comenzo RL. One siRNA pool targeting the λ constant region stops λ light-chain production and causes terminal endoplasmic reticulum stress. *Blood*. 2014;123(22):3440–3451.
61. Kastritis E, Terpos E, Dimopoulos MA. Current treatments for renal failure due to multiple myeloma. *Expert Opin. Pharmacother.* 2013;14(11):1477–1495.
62. Reece DE, Hegenbart U, Santhorawala V, et al. Long-term follow-up from a phase 1/2 study of single-agent bortezomib in relapsed systemic AL amyloidosis. *Blood*. 2014;124(16):2498–2506.
63. Jaccard A, Comenzo RL, Hari P, et al. Efficacy of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone in treatment-naïve patients with high-risk cardiac AL amyloidosis (Mayo Clinic stage III). *Haematologica*. 2014;99(9):1479–1485.

Figure Legends

Figure 1: Characterization of the murine model of HCDD. (A) Splenocytes from 6 month-old WT, CH1⁺ or CH1⁻ (top) and DH, DH-CH1⁺ or DH-CH1⁻ (bottom) mice were stained with the indicated antibodies and analyzed by flow cytometry. Representative results from 3 independent experiments with at least 2 mice of each strain are shown. Numbers indicate percentages of plasma cells on biparametric graphs and human γ HC positive plasma cells on histograms. (B) Serum human γ HC production from 8 to 12 weeks old mice. Each dot represents an individual mouse. Results are expressed in log scale as mean \pm SEM (μ g/mL) (n = 9 - 14 per group in at least three independent experiments; ns, not significant; ***, $p < 0.001$). (C) Human γ HC production in supernatants of 6 h cultures of non stimulated spleen cells (left) and 3 days LPS stimulated B cells (right). Plated cell counts were normalized on the number of secreting CD138⁺ cells. Means \pm SEM (ng/mL) are shown (n = 4 per strain in two independent experiments; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

Figure 2: HCDD transgenic mice reproduce human kidney lesions. (A) Immunofluorescence microscopy on DH, DH-CH1⁺ or DH-CH1⁻ kidney sections with an anti-human γ HC-FITC. Fluorescence and DIC are merged. Original magnification: x400. Note the intense linear staining of tubular and glomerular BMs and in the mesangium of DH-CH1⁻ kidney. (B) Deposit intensity based on immunofluorescence studies of kidney sections. Each dot represents a score of fluorescence from an individual kidney as described in the Methods section. Means \pm SEM are shown (n = 6 – 9 mice in 3 independent experiments; ***, $p < 0.001$). (C) Electron micrograph of kidney from a DH-CH1⁻ mouse showing finely granular electron-dense deposits along the inner part of the lamina densa of a glomerular-

capillary BM (arrows). Original magnification, x20000; scale bar is indicated. (D) Immunoelectron microscopy on kidney from a DH-CH1⁻ mouse (top) and a renal biopsy of the corresponding HCDD patient (bottom). Note the presence of anti- γ HC-conjugated gold particles along the BMs in both patient and mice kidneys. Original magnification, x50000; scale bars are indicated. (D) Toluidine blue staining showing a faint diffuse thickening of tubular BMs in the outer medulla (left) and glomerular BMs (arrows). Deposits are also observed in the mesangium (star). Original magnification, x600

Figure 3: Tenascin-C accumulation and kidney function. (A) Comparison of tenascin-C accumulation in glomeruli by immunofluorescence studies of kidney sections. Each dot represents the score of fluorescence from an individual kidney. Means \pm SEM are shown ($n = 6 - 9$ mice in 3 independent experiments; ***, $p < 0.001$). (B) Urine albumin to creatinine ratio was measured on overnight urine samples from DH and DH-CH1⁻ mice. Each dot represents the result from an individual mouse. Values are indicated in ng/mL (albumin) / nmol/ μ L (creatinine). Means \pm SEM are shown ($n = 9 - 12$ mice; ns, not significant).

Figure 4: Hematologic treatment reduces the onset of kidney deposits. (A) Therapeutic protocol applied to deplete B and plasma cells in CH1⁻ mice. (B) (top panel) Representative immunofluorescence on kidney sections of treated or non-treated CH1⁻ mice with an anti-human γ HC-FITC. Magnification: x400. (bottom) Comparison of deposit intensity in kidney sections of treated vs non-treated CH1⁻ mice. Each dot represents the score of fluorescence from an individual kidney. Means \pm SEM are shown ($n = 6 - 7$ mice in two independent experiments; **, $p < 0.01$).

Figure 5: Plasma cells producing a truncated γ HC are highly sensitive to bortezomib (A)

Fold decrease of spleen plasma cells upon 48h of bortezomib treatment. Each dot represents the mean fold decrease of plasma cell number ($CD138^+$ / $B220^{low}$ cells) in an independent experiment with at least two treated and two non-treated mice. Means \pm SEM are shown (n = 4 – 6 independent experiments; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). (B,C) Quantitative transcriptional analysis of ER stress markers in (B) four days LPS-stimulated B cells and (C) sorted $CD138^+$ spleen plasma cells from DH (white bars), WT (light grey bars) and DH-CH1⁻ (dark grey bars) mice. Results are means \pm SEM of three independent experiments with two mice of each strain (B) and two experiments of sorted plasma cells (C). ns, not significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

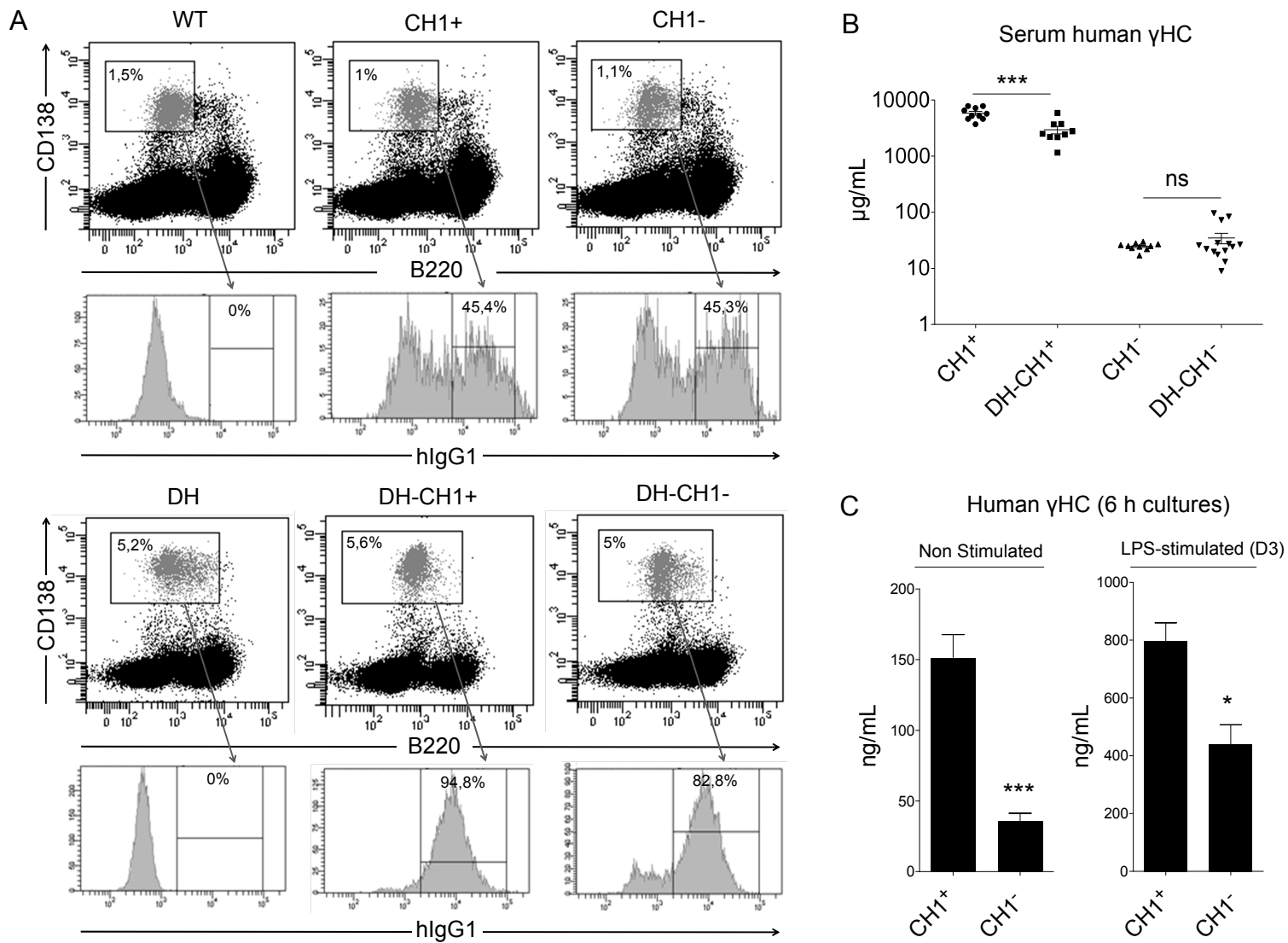


Figure 1

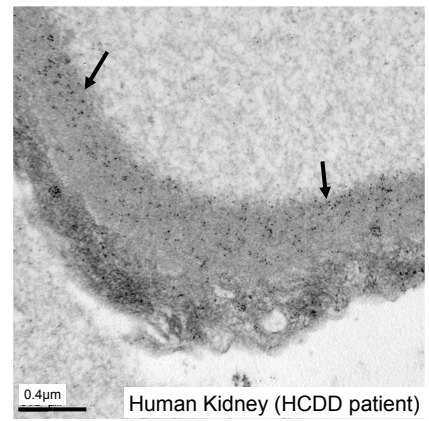
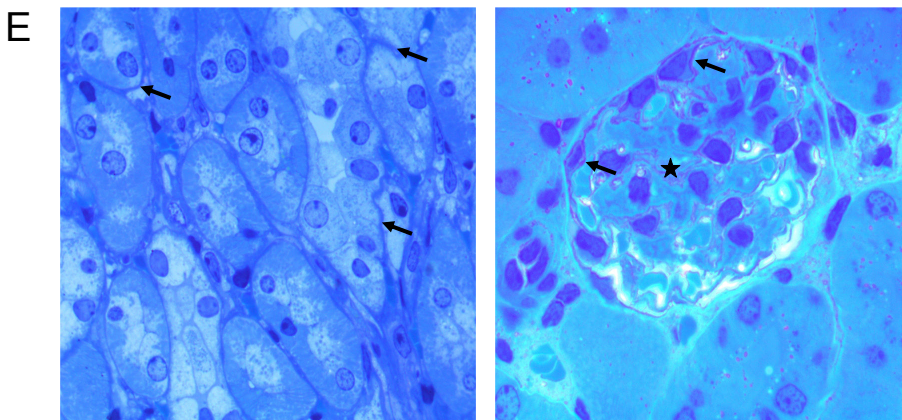
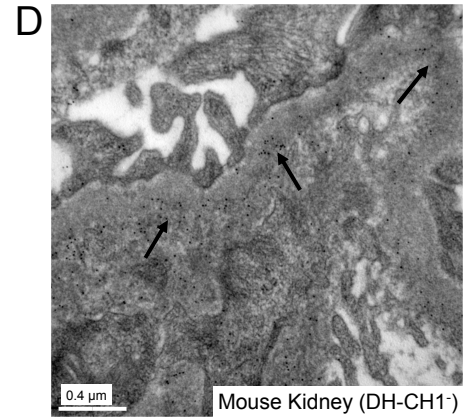
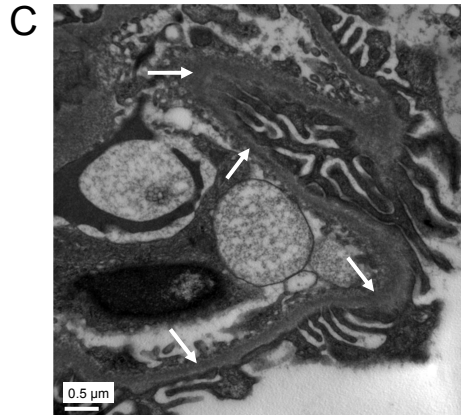
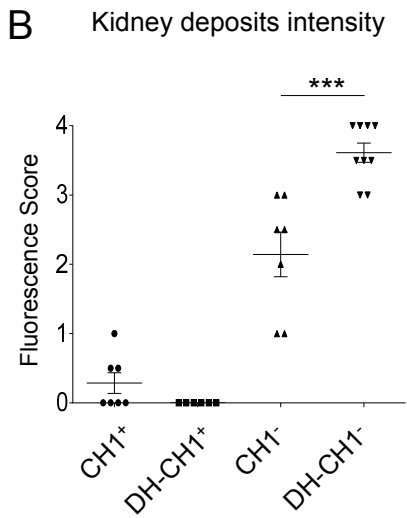
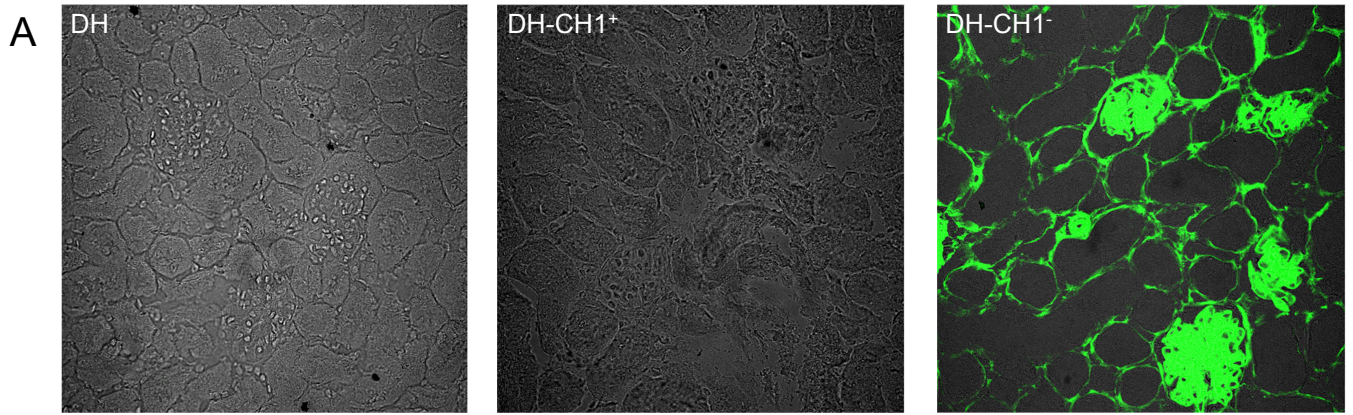


Figure 2

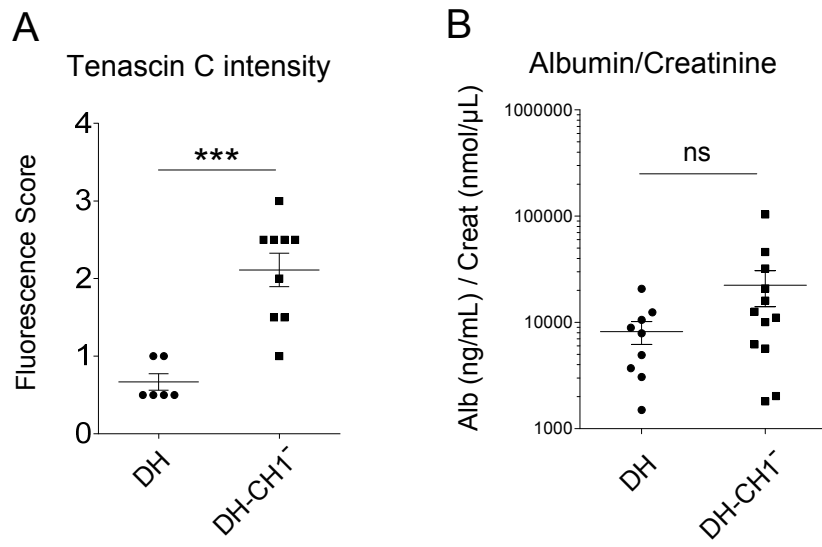


Figure 3

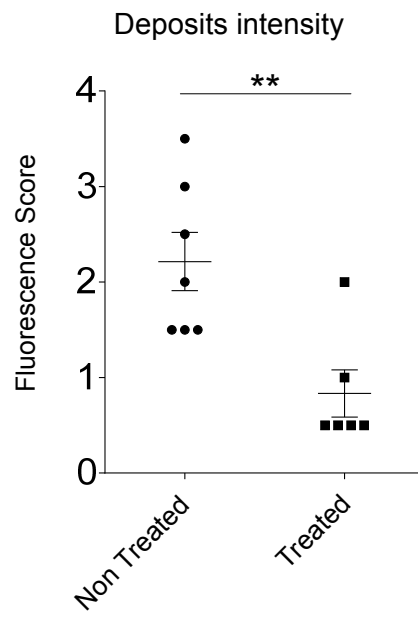
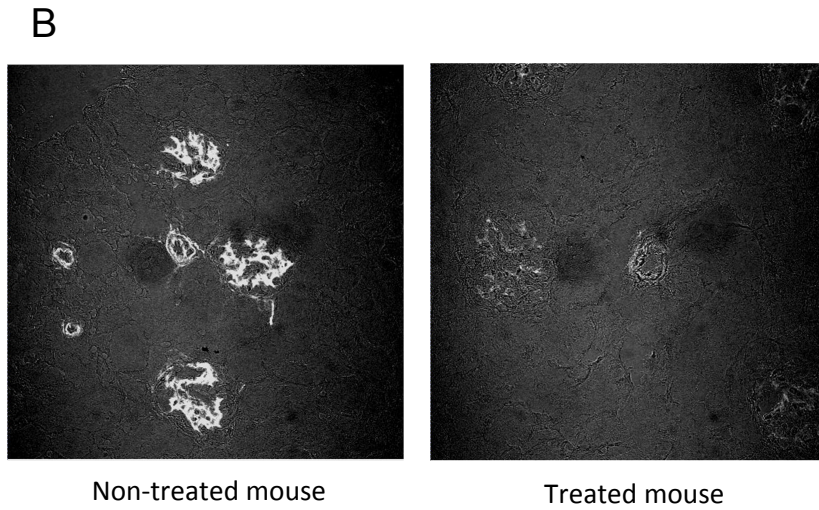
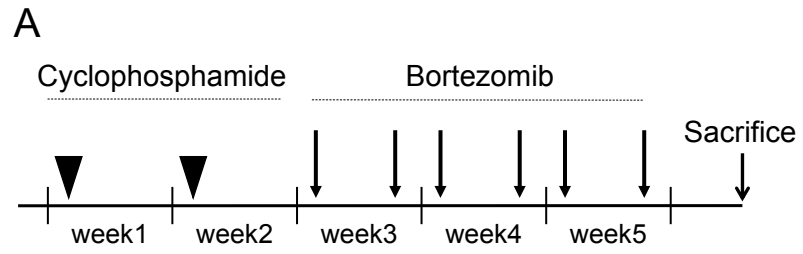
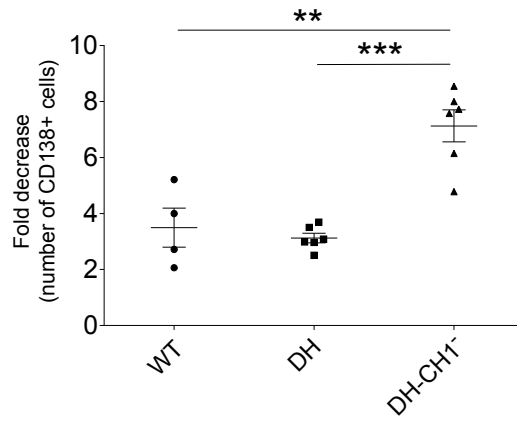


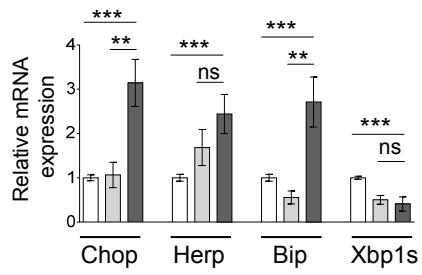
Figure 4

A



B

LPS stimulation (D4)



C

Sorted Plasma cells (CD138⁺)

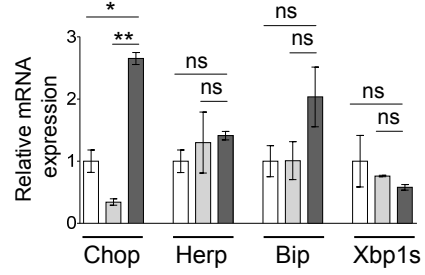


Figure 5

Supplemental methods

Gene targeting

Total RNA from a bone marrow extract was obtained from a patient with HCDD. After reverse transcription, a series of PCR followed by cloning (pGEM-T easy vector, Promega) and sequencing allowed us to detect the monoclonal HC sequence composed of a rearranged VDJ directly spliced to a $\gamma 1$ constant region devoid of CH1 domain but comprising hinge-CH2-CH3 domains. The VDJ sequence derived from the germline genes VH3-30, DH2-15 and JH4. A 12.7 kb *Bam*HI genomic fragment corresponding to the germ-line mouse J κ C κ cluster¹ was used to generate the human $\gamma 1$ HC targeting construct. A 2.2 kb *Bsm*I/*Sac*I fragment containing the 5 J κ segments was replaced with a *Not*I restriction site allowing the sequential cloning of the fragments composing the transgenic locus using *Eag*I and *Not*I compatible sites. From 5' to 3', the following parts were then added: a 0.5 kb fragment containing a VH promoter,² the rearranged VDJ sequence from the patient with HCDD, a 0.8 kb genomic fragment containing the human $\gamma 1$ CH1 domain with parts of 5' and 3' introns and flanked with two loxP sites, a 1.1 kb genomic fragment containing the human $\gamma 1$ hinge-CH2-CH3 domains with introns and polyA site and finally, a neomycine resistance gene (Neo^R) flanked with two Frt sites. Upstream of the 5' arm, a thymidine kinase (TK) gene was inserted for negative selection against random integration. Primers used to amplify fragments are indicated in supplemental Table 1 and sequences verification was done with the BigDye Terminator kit on a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and analyzed using Finch TV software (Geospiza, Inc.). E14 embryonic stem cells (129/Ola background) were transfected with linearized vector and selected by addition of G418 and ganciclovir to culture medium. Correctly recombined cells were used to generate chimeras after injection into C57BL/6 blastocysts and the mice were crossed with 129S4-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm2(FLP*)Sor}/J

mice (Jackson Laboratories) to delete the Neo^R gene. Deletion of the CH1 domain was obtained by breeding with C57BL/6 CMV-CRE mice (Mouse clinical institute, Illkirch, France). The absence of any mutations and the correct splicing of the CH1⁺ and CH1⁻ human γ 1HC were checked by sequencing cDNAs from spleen cells with the indicated primers (supplemental Table 1).

1. Van Ness BG, Coleclough C, Perry RP, Weigert M. DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin kappa light chain is frequently retained in cells that rearrange the kappa locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982;79(2):262–266.
2. Sirac C, Bridoux F, Carrion C, et al. Role of the monoclonal κ chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi syndrome. *Blood.* 2006;108(2):536–543.

Supplemental Table 1

Name	Sequence	Use
KappaSalIFor	ATGGCAGTCCTTTGTTCCACC	Screening ES cells, 5' arm and amplification of VH promoter
pVHRevNotI	AGCGGCCGCGGATGTGTGTTTCAGTGTGATC	
pVHForEagI	ACGGCCGAAGCTTAAAAACCTCAGAGGATTTGTC ATCTCTA	Screening ES cells, 3' arm and amplification of VH promoter
Sondekapp3'Rev	TTCACAAAGGACAAGGTTGC	
NeoInFor2	AGCACGTACTCGGATGGAAG	Screening of neomycin resistance gene deletion
3'SacIIJkmrev2	CTGTGCCTCAGGAAAGTGGT	
pVHForEagI	ACGGCCGAAGCTTAAAAACCTCAGAGGATTTGTC ATCTCTA	Screening of CH1 deletion
GammaCH3HumRev	GTGGTCTTGTAGTTGTTCTC	
5'BsmIJKfor2	CACTCAGCCCAGGAAAAGTT	Screening of WT mouse kappa allele
Jk1murRev	CACAGACATAGACAACGGAAG	
5'DQ52	AAGGTACCTCCATGGCTTCC	Screening of DH-LMP2A mice
LMP2A550Rev	GCTGCCAAGAGTAGAAGTGAGAGG	
JH1Rev	CCCGTTTCAGAATGGAATGTGC	
LeaderVH3-30EagI	ACGGCCGACTATGGAGTTTGGGCTGAGCTG	Human VDJ amplification
HumanJH4-RevNotI	AGCGGCCGCGGACTCACCCGAGGAGACG	
G1CH1LoxForEagI	ACGGCCGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGA AGTTATAGGCCTGACCTTGGCTTT	Amplification of human genomic γ 1CH1 exon flanked by two loxP sites
G1CH1LoxRevNotI	AGCGGCCGCATAACTTCGTATAGCATAACATTATAC GAAGTTATCCTCCCGGATATGGCTCT	
HingeG1ForHEagI	ACGGCCGCCAAACTCTCCACTCCCTCA	Amplification of genomic γ 1 Hinge/CH2/CH3/polyA segment
BgHpolyArev	ATCTGGCGGCCGCGTTCCTTCCGCTCAGAA	
NeoFrtForNotI	AAGCGGCCGCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTAT AGGAACTTCGAGTTTACGTCCAGCCAAGC	Amplification of neomycin resistance gene flanked by two FRT sites
NeoFrtRevNotI	AGCGGCCGCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATA	

Supplemental Table 2

Antibody	Reactivity	Clone	Source	Conjugate	Applications
Anti-B220	Mouse	RA3-6B2 (Becton Dickinson)	Rat	BV421	Flow cytometry
Anti-CD138	Mouse	281-2 (BD Biosciences)	Rat	APC or PE	Flow cytometry
Anti-kappa	Mouse	187-1 (Beckman Coulter)	Rat	PE or BV421	Flow cytometry and Immunofluorescence
Anti-IgM	Mouse	eB121-15F9 (eBiosciences)	Rat	PE or PC7	Flow cytometry
Anti-TenascinC	Mouse	MTn-12 (Abcam)	Rat	Unconjugated	Immunofluorescence
Anti-Rat IgG (secondary)	Rat	Polyclonal (Invitrogen)	Donkey	A1488	Immunofluorescence
Anti-γHC(Fc)	Human	Polyclonal (Dako)	Goat	FITC	Flow cytometry and Immunofluorescence
Anti-γCH1	Human	TM15 (SeraAntibodyscience)	Mouse	House conjugated	Immunofluorescence
Anti-γCH2	Human	G7c (Serascience)	Mouse	House conjugated	Immunofluorescence
Anti-γHC(Fc)	Human	Polyclonal (Beckman Coulter)	Goat	Unconjugated or AP or HRP	ELISA or Western Blot
Anti-kappa	Mouse	Polyclonal (Beckman Coulter)	Goat	Unconjugated or AP	ELISA
CD16/32 (Fc block)	Mouse	2.4G2 (BD Pharmingen)	Rat	Unconjugated	Flow cytometry

Supplemental Figure Legends

Supplemental Figure 1. (A) Structure of the targeted locus (not to scale). (Top) Representation of the WT unrearranged kappa locus and the structure of the inserted human γ heavy chain gene replacing the $J\kappa$ region. (Middle) Resulting kappa locus after targeted recombination is shown. The absence of $J\kappa$ segments precludes any Ig κ LC rearrangement and expression. (Bottom) Cre-mediated deletion of the CH1 domain leads to the production of a truncated γ 1HC as seen in the patient. In the absence of Cre-mediated deletion, a complete HC is produced. Association with murine LCs is only depicted for the complete γ HC (dashed boxes). The hypothetical disulfide bound between monomers of truncated γ HC is also indicated (dashed line). (B) Western blot analysis of human γ HC in sera of DH, CH1⁺ and CH1⁻ mice. Bands appear at the expected size for the complete (CH1⁺) and the truncated (CH1⁻) γ HCs. Dilutions of serum are indicated.

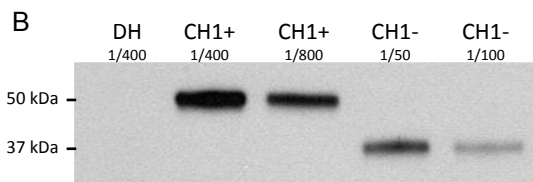
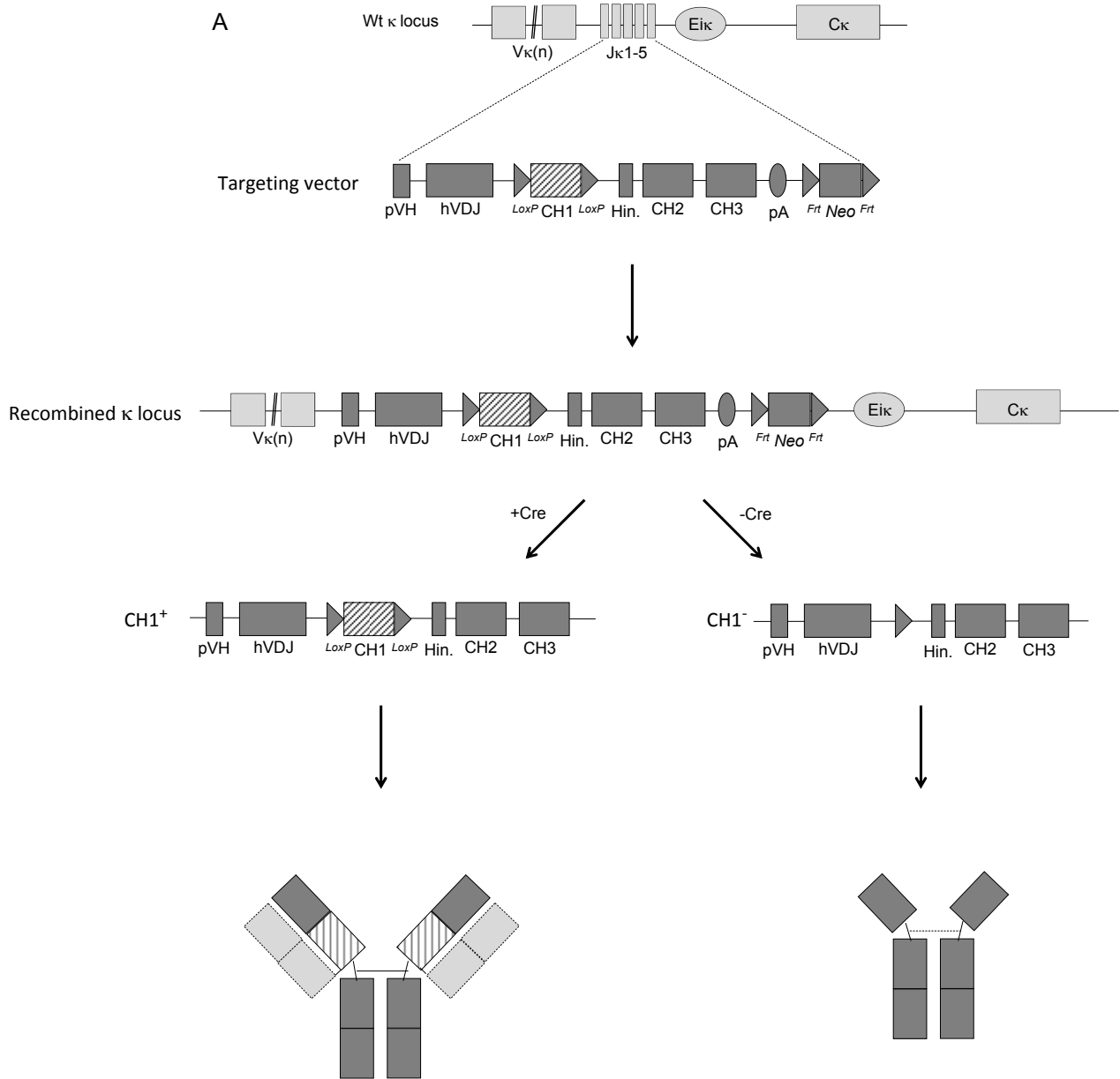
Supplemental Figure 2. (A) Flow cytometry analyses of permeabilized plasma cells (CD138⁺) from (top) WT, CH1⁻, CH1⁺ and (bottom) DH, DH-CH1⁺ and DH-CH1⁻ mice. Representative results are shown (n = 4 – 6 mice of each strain). Percentages are indicated. Note that the human γ HC is overwhelmingly expressed together with murine κ LCs which represent the major LC isotype in mouse. Murine μ HCs are also coexpressed with the human γ HC in most of in CH1⁺ and CH1⁻ plasma cells. As expected, no murine μ HCs were detected in DH mice and about half of plasma cells lacks κ LC expression. We did not test other murine HC isotypes. (B) Dosage of human γ HC in urines of CH1⁺ and CH1⁻ mice. Means \pm SEM (μ g/mL) are shown (n = 5 – 7 mice of each strain). (C) Relative production of hybrid human

γ HC/murine κ LC antibodies in sera from DH-CH1⁺ and DH-CH1⁻ mice. Connected dots correspond to the means \pm SEM (OD at 405 nm) of serial dilutions of sera from DH-CH1⁺ and DH-CH1⁻ mice obtained by a hybrid ELISA as described in the materials and methods section (n = 6 – 8 mice).

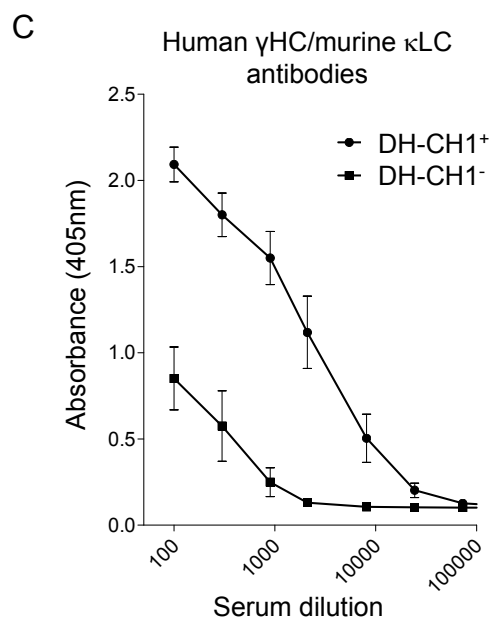
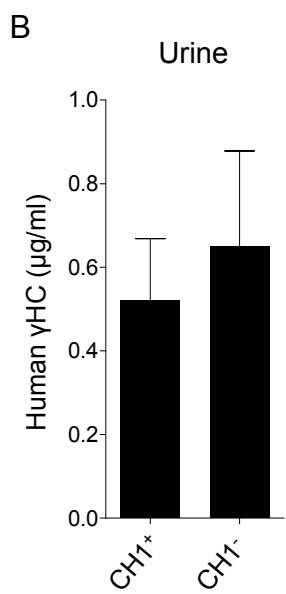
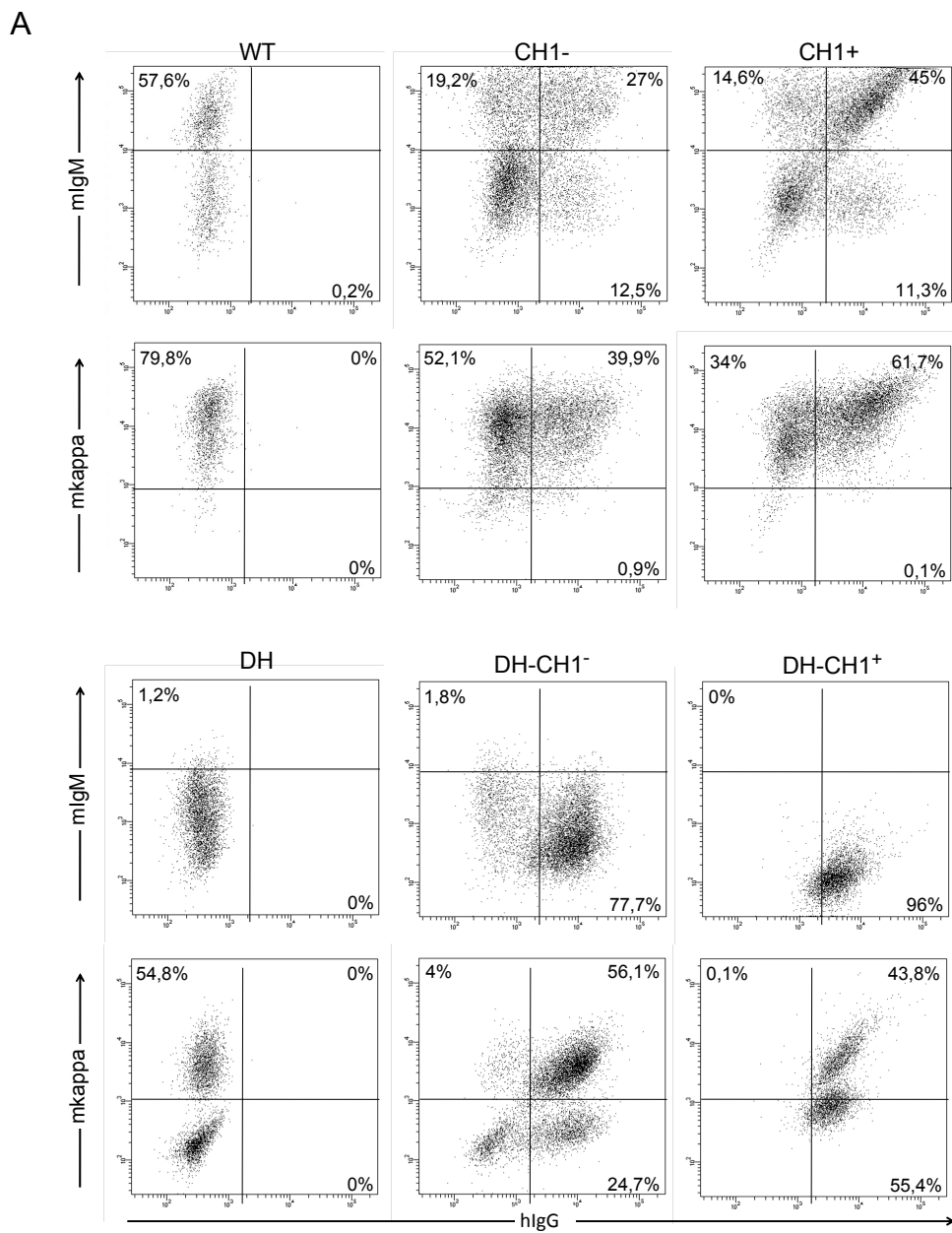
Supplemental Figure 3. (A) Immunofluorescence analysis of WT, CH1⁺ and CH1⁻ kidneys co-stained with anti-human γ HC (top) and anti-murine κ LC (bottom). Note the faint non linear staining of glomeruli in CH1⁺ kidneys that colocalizes with anti- κ LC. Original magnification, x400. (B) Immunofluorescence analysis of liver and lung from CH1⁺ mice. Note the linear staining along vascular membranes. Original magnification, x400. (C) Immunofluorescence analysis of CH1⁻ kidney using a costaining with anti-human γ HC and anti-human γ CH1 (left panel) or γ CH2 domains antibodies. Note the complete absence of staining with the anti- γ CH1 antibody and the similar staining with anti- γ CH2 and anti- γ HC antibodies. Original magnification, x400. (D) Evolution of Ig deposits intensity and accumulation of tenascin-C with age. Immunofluorescence analysis of kidneys from DH (control) and DH-CH1⁻ mice at different ages and upon unilateral nephrectomy (U.N.). Fluorescence and DIC are merged. Kidney from 2 month-old U.N. mouse corresponds to the kidney collected at the time of unilateral nephrectomy, on a 2 month-old mouse. Kidney from 6 month-old U.N. mouse corresponds to the kidney collected 4 months later at the time of sacrifice of the same mouse. Representative scores are shown for Ig deposits and tenascin-C accumulation. For tenascin-C, one glomerulus is shown in each image. Original magnification, x400 (upper panel) and x640 (lower panel).

Supplemental Figure 4. (A) B cell depletion in blood upon treatment of CH1⁻ mice with cyclophosphamide + bortezomib. Percentage of B cells in blood was monitored by flow cytometry using a B220 staining. Connected dots correspond to the percentage of blood B cells (lymphocyte gate) of an individual mouse during treatment (n = 6 mice in two independent experiments; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$). (B) Follow-up of serum human γ HC production following treatment. Mean \pm SEM are shown (n = 6 – 7 mice in two independent experiments; ns, non significant; *, $p < 0.05$).

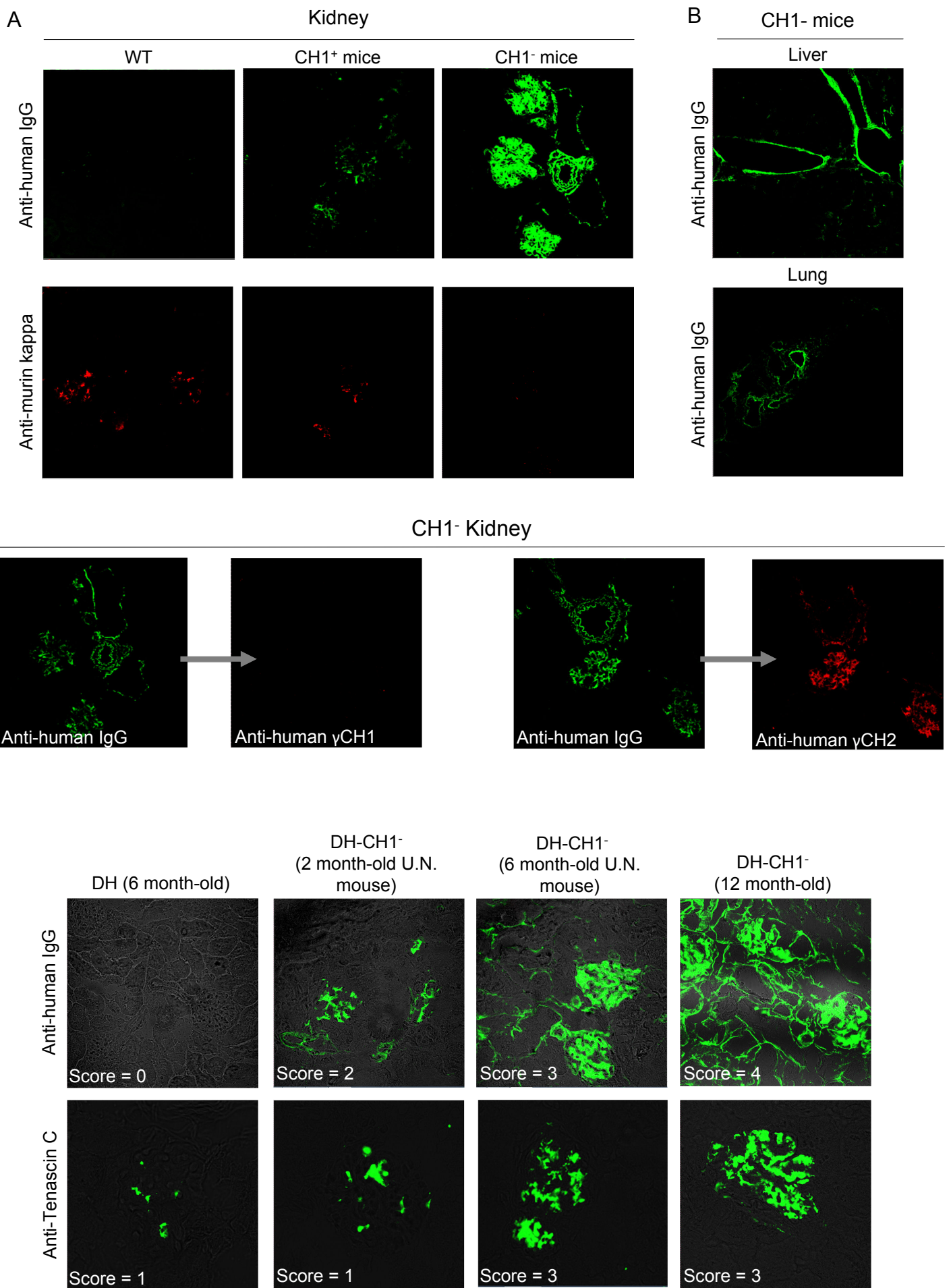
Supplemental Figure 5. Plasmablast differentiation upon LPS stimulation of DH, WT and DH-CH1- spleen B cells. Percentage of plasmablasts (CD138⁺ cells) was monitored by flow cytometry. Means \pm SEM are shown (n = 6 mice of each strain in three independent experiments; ns, non significant; ***, $p < 0.001$).



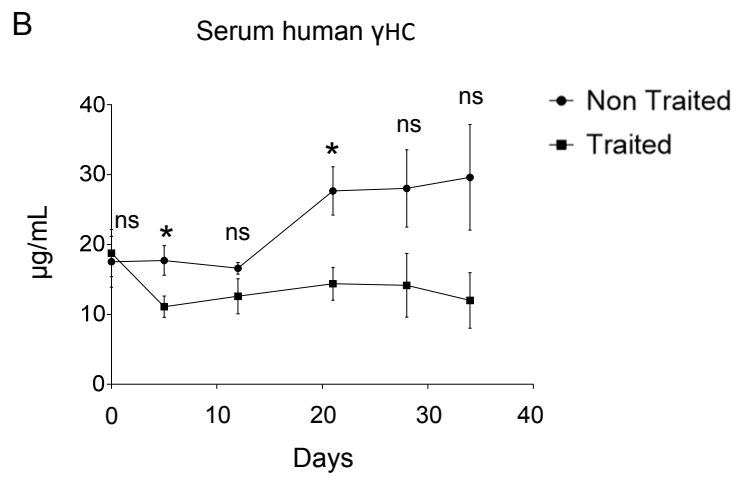
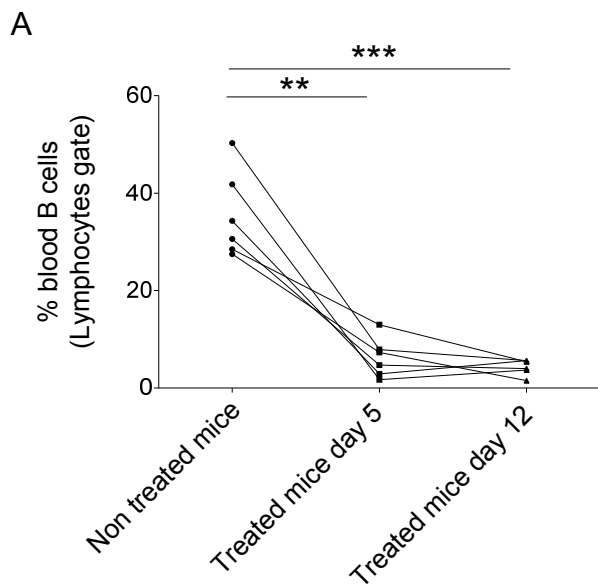
Supplemental Figure 1



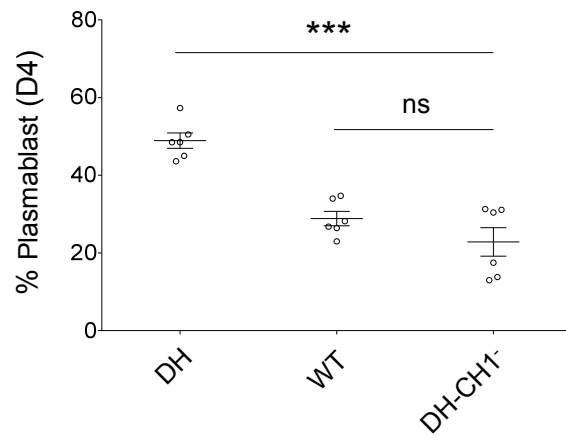
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental figure 4



Supplemental figure 5

Résultats préliminaires & Perspectives

1. Centres germinatifs et plasmocytes : analyse des plasmocytes dans ces structures.

Au sein du laboratoire un modèle murin transgénique de suivi plasmocytaire a été élaboré, le modèle IgJ-GFP (Annexe 3, en préparation). Pour cela, le gène codant la protéine fluorescente eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) a été placé sous le contrôle des activateurs transcriptionnels et du promoteur de la chaîne J murine. Ces éléments, composés d'une région de 1,4kb immédiatement en amont du gène (HSS1) et d'une région de 1,5kb située à 7,5kb en amont (HSS3/4), ont été décrits comme nécessaires et suffisants pour induire un contrôle de l'expression de la chaîne J identique au locus endogène (Sigvardson et al., 1993 ; Kang et al., 1998). Ce modèle « reporter » dit IgJ-GFP, a permis de préciser le profil d'expression de la chaîne J chez la souris qui, en l'absence d'anticorps efficace, restait encore mal connu. Des analyses par cytométrie en flux ont ainsi révélées que la quasi-totalité des plasmocytes (>95%) expriment bien la GFP de façon intense (GFP^{high}), quels que soient leurs isotypes d'Ig et leur localisation (rate, ganglions, moelle osseuse, MALT, lamina propria). De façon inattendue, aucune autre cellule B ne présente d'expression de la GFP, excepté une population distincte présente dans les organes lymphoïdes périphériques. L'expression de la GFP dans cette population est plus faible que dans les plasmocytes (GFP^{int}) et l'analyse phénotypique de ces cellules par cytométrie en flux et microscopie confocale a révélée qu'il s'agissait de cellules B des GC. Les analyses transcriptomiques de ces cellules ont confirmé l'expression de la chaîne J et ont aussi révélé une baisse significative de Pax5 sans augmentation des transcrits typiques de la différenciation plasmocytaire tels que Blimp1 ou Xbp1. Nous avons aussi montré par Elispot qu'une part non négligeable de ces cellules (> 10%) sécrète de petites quantités d'Ig. Nous avons ainsi avancé l'hypothèse que ces cellules représentent le stade pré-plasmablaste, décrit précédemment dans un modèle KO du gène Prdm1 dans lequel l'absence de Blimp1 (produit du gène Prdm1) permettait l'accumulation de telles cellules (Kallies et al., 2007). De manière surprenante cependant, ces cellules dans notre modèle représentent la majeure partie des cellules B de GC, une observation qui pourrait être en fait biaisée par la ½ vie relativement longue de la eGFP. Dans tous les cas, la baisse de Pax5 dans ces cellules correspond bien à la description de la régulation de l'expression de la chaîne J, connue pour être réprimée par ce facteur de transcription B-spécifique (Kang et al., 1996, Wallin et al., 1999).

Un autre intérêt non négligeable de ce modèle repose sur le fait que les différences d'expression de la GFP entre les cellules B de GC et les plasmocytes nous permettent de visualiser aisément ces deux lignées cellulaires. Lors des analyses en microscopie confocale des organes lymphoïdes secondaires,

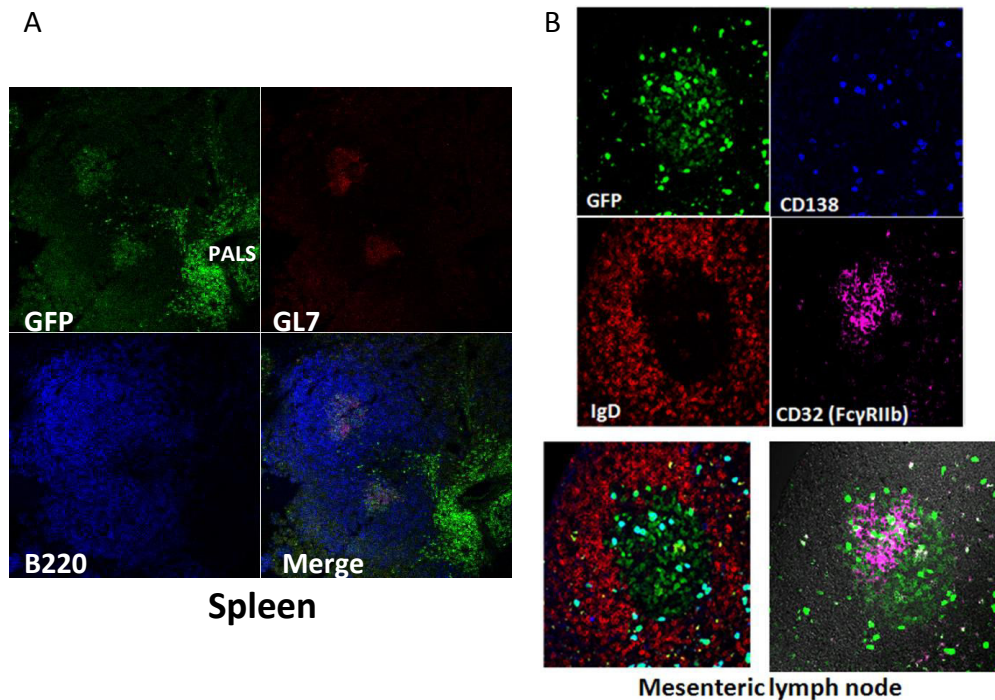


Figure 1 : **Caractérisation de plasmocytes dans les centres germinatifs de la rate.** Analyse par microscopie confocale de coupes de rate (A) ou de ganglions mésentériques (B) après 14 jours d'immunisation SRBC. (A) L'immunomarquage met en évidence l'expression de la protéine fluorescente GFP dans les centres germinatifs, caractérisés en parallèle par l'expression du marqueur GL7. Le marqueur B220 permet de mettre en évidence les zones dite « lymphocytaire B » dans la rate. La présence de cellules exprimant fortement la GFP est à noter dans les PALS, zone riche en plasmocytes. Grossissement x100 (B) Immunomarquage réalisé sur une coupe de ganglion mésentérique (x400). Le marquage IgD permet de délimiter le centre germinatif, qui exprime modérément la GFP. Le marqueur CD32, exprimé par les FDC (cellules folliculaires dendritiques) permet d'identifier la zone claire. Enfin sur cette image, les cellules exprimant fortement la GFP sont co-marquées par l'anti CD138, spécifique des plasmocytes, validant le fait que ces cellules sont bien des plasmocytes.

nous avons ainsi observé un nombre non négligeable de plasmocytes dans certains GC. Même si des plasmocytes avaient déjà été observés dans les GC (Angelin Duclos et al., 2000 ; Victora et al., 2010 et pour revue : Shlomchik et Weisel, 2012), leur nombre est décrit comme négligeable et il est dit qu'ils regagnent rapidement l'extérieur de ces structures et ne s'y accumulent pas. Cette observation nous a donc conduits à étudier plus en détail l'apparition de ces cellules dans les GC.

Résultat 1 : Observation de plasmocytes dans les centres germinatifs après immunisation.

Afin de vérifier la première observation qui avait été faite, des immunisations à base d'hématies de sang de mouton (SRBC pour *Sheep Red Blood Cells*), connues pour induire une forte réponse T-dépendante avec formation de GC, ont été effectuées et les organes lymphoïdes, notamment la rate et les ganglions mésentériques ont été prélevés 14 jours après l'immunisation. Les immunomarquages sur des coupes d'organes de ces animaux IgJ-GFP immunisés nous ont permis de confirmer la présence de plasmocytes dans les GC, à ce temps de l'immunisation (**Figure1**). En effet nous avons bien retrouvé au sein des GC, exprimant modérément la GFP, des cellules exprimant fortement cette protéine fluorescente. Des co-marquages GL7 et IgD ont bien confirmés que les cellules GFP^{int} étaient des cellules de GC et que seules les GFP^{high} présentent dans ces structures coexprimaient le marqueur plasmocytaire CD138. Cependant, les marquages CD138 sur coupes d'organes s'avèrent relativement inconstants et l'intensité de la GFP a été principalement utilisée pour différencier les cellules B de GC (GFP^{int}) des plasmocytes (GFP^{high}).

Résultat 2 : Accumulation de plasmocytes dans les centres germinatifs au cours de la réponse immune

Suite à cette observation de plasmocytes dans les GC, nous avons réalisé une cinétique d'immunisation, de manière à analyser plus en détail l'évolution de cette population cellulaire au cours de l'immunisation. Chaque cinétique a été réalisée en établissant une cohorte d'animaux (trois souris pour chaque point, répété dans trois expériences indépendantes), immunisés avec 200µL de SRBC en intra péritonéale, de manière à induire une réponse immune T-dépendante. Les animaux ont ensuite été analysés à différents temps après l'immunisation correspondant aux phases de progression et de décroissance des GC (Victora et al., 2014) : J+4, J+7, J+14, J+21 et J+28.

L'analyse de coupes nous a permis de confirmer les données de la littérature avec une augmentation de la surface des GC de J+4 à J+7 après l'immunisation, suivie par un plateau de la taille de ces

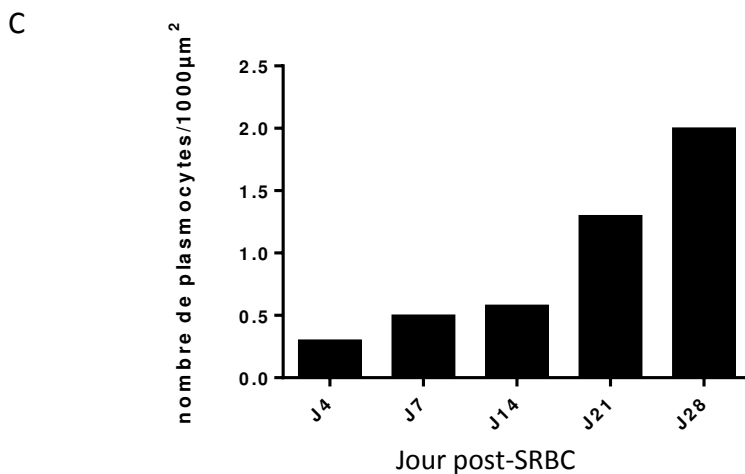
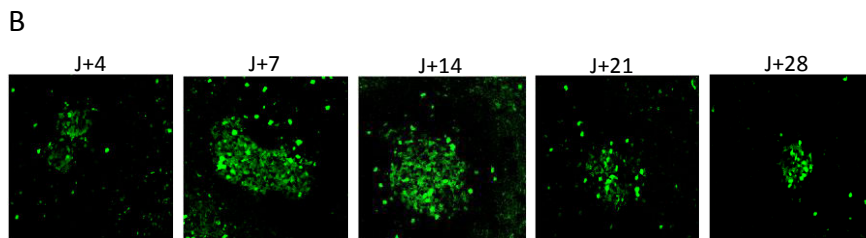
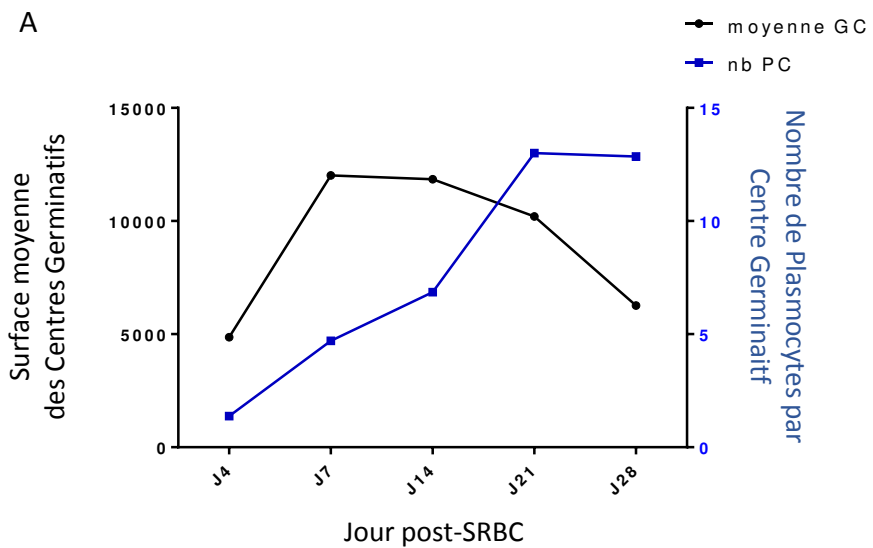


Figure 2 : Analyse de l'évolution des plasmocytes au sein des centres germinatifs au cours de la réponse immunitaire. (A) La surface des centres germinatifs (GFP^{int}) de section de rate est déterminée par analyse en microscopie confocale (axe gauche, ligne noire). Le nombre de plasmocytes (GFP^{high}) observés au sein des centres germinatifs est représenté sur le même graphique (axe droit, ligne bleu). (B) Cinq coupes de rates, observées en microscopie confocale (x400) représentatives des résultats présentés en (A) aux différents temps de l'immunisation. (C) Analyse du nombre de plasmocytes pour 1000 μm^2 de surface de centres germinatifs (n = 3-4 animaux d'un test. Pour chaque animal, les centres germinatifs de trois sections de rates sont analysées)

structures jusqu'à J+14, puis d'une régression à J+21 puis à J+28 où la taille moyenne des GC redevient celle observée en début d'immunisation. En parallèle, nous avons compté le nombre de plasmocytes par GC au cours de la réponse immune. Nous avons constaté une hausse constante et régulière de ce nombre jusqu'à J+21, avant une phase de plateau (**Figure 2A et B**). En corrélant le nombre de plasmocytes à chaque point de l'immunisation par unité de surface ($1000\mu\text{M}^2$) de GC, nous observons une très nette accumulation de plasmocytes dans les GC (**Figure 2C**). Ces résultats surprenants sont à comparer aux études précédentes montrant peu de plasmocytes dans les GC. En fait, la plupart des travaux précédents ont été réalisés à des temps précoces d'immunisation (J+14) auxquels nous n'observons pas encore d'accumulation de plasmocytes. Ainsi, il semble que le nombre de plasmocytes intra-GC s'accumulent au cours de la réponse immune pour être maximal lors des phases de régression des GC. Au vu de ces résultats, il est possible d'émettre l'hypothèse que la présence des plasmocytes est directement liée au devenir du GC. L'une des possibilités serait alors que les anticorps produits par les plasmocytes, connus pour être de haute affinité pour l'Ag (Smith et al., 2000 ; Phan et al., 2006), pourraient inhiber la réaction de GC, soit en rendant l'Ag inaccessible aux cellules B nouvellement formées dans la DZ qui ne pourraient alors pas recevoir les signaux de survie essentiels à leur expansion/différenciation, soit en inhibant le signal BCR de ces cellules via par exemple, les récepteurs inhibiteurs Fc γ RIIb (Bruhns et al., 2012). Cet effet régulateur des anticorps de hautes affinités a d'ailleurs été démontré récemment dans un modèle d'injection d'anticorps de différentes affinités pour l'Ag (Zhang et al., 2013). Aussi, nous avons souhaité déterminer si l'absence de maturation d'affinité des anticorps et de CSR dans des souris AID $^{-/-}$ pourrait avoir des conséquences sur le devenir des GC.

Résultat 3 : Evolution du nombre de cellules B de GC et de plasmocytes au cours d'une immunisation dans des souris sauvages et des souris AID $^{-/-}$

Nous avons appliqué le même protocole d'immunisation que précédemment dans des souris WT (IgJ-GFP) et des souris AID $^{-/-}$ avec en plus, une analyse à J0 et J40. Nous avons procédé à un suivi par cytométrie en flux des cellules B de GC (B220 $^+$ /GL7 $^+$) (**Figure 3A**) et des plasmocytes (B220 $^-$ /GFP $^{\text{high}}$, et B220 $^-$ CD138 $^+$) (**Figure 3B**). Ce suivi nous a permis de mettre en évidence un pic de cellules B de GC à J+7 après l'immunisation, concomitant avec un pic de plasmocytes. Rapidement à J+14, ce pourcentage de B de GC et de plasmocytes revient quasiment à son niveau basal, voire inférieur pour les plasmocytes. Au contraire, dans les souris AID $^{-/-}$, nous n'observons pas ce parallélisme entre les pourcentages de B de GC et de plasmocytes. En fait, aucune augmentation de plasmocytes n'est observée après immunisation (**Figure 3B**). Par contre, le nombre de B de GC augmente continuellement

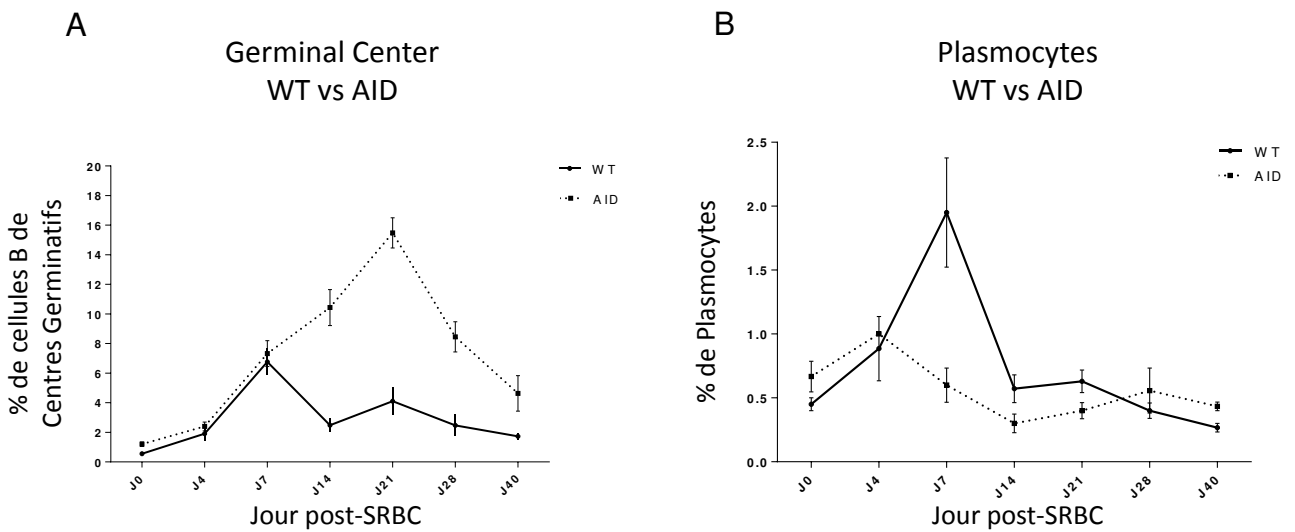


Figure 3 : **Evolution des pourcentages de cellules B de GC et de plasmocytes au cours d'une cinétique d'immunisation dans les animaux WT et AID^{-/-}.** Le pourcentage de cellules B des centres germinatifs de la rate, B220⁺/Gl7⁺ (A) et des plasmocytes, B220⁻/CD138⁺ de souris AID^{-/-} (B) tout au long d'une immunisation SRBC est représenté. Sur les deux graphiques, les cinétiques réalisées sur les animaux AID^{-/-} sont représentées en traits discontinus et en traits pleins pour les animaux WT (IgJ-GFP). En abscisse les temps post immunisation SRBC, auxquels sont analysés les souris (n=3-4 animaux de 2 tests indépendants pour les AID^{-/-} et 3 tests indépendants pour les WT. Mean ± SEM)

jusqu'à J+21 avant de décroître jusqu'à J+40 sans pour autant revenir à son niveau de départ (**Figure 3A**).

Conclusion et Perspectives

Les GC sont les structures au sein desquelles se produisent les phénomènes de maturations secondaires que sont la CSR et la SHM. Cependant bien que les phénomènes qui ont lieu dans les GC soient très étudiés, les mécanismes contrôlant leur longévité ne sont pas connus. Certains travaux évoquent une durée d'environ 21 jours sans toutefois apporter d'autres explications que la baisse du nombre de cellules B et une concentration moindre de cellules à l'intérieur de ces structures (pour revue : Victora et al., 2014). Les différentes observations que nous avons faites semblent indiquer un rôle des plasmocytes dans cette régulation des GC. Nous avons montré qu'une absence de génération de plasmocytes producteurs d'Ig de fortes affinités dans les souris AID^{-/-}, conduit à une accumulation et une survie des GC anormalement longue. L'observation de GC plus importants dans les souris AID^{-/-} est connue de longue date et certains travaux récents ont montré que cette accumulation était due à une diminution de l'apoptose dans les GC sans pour autant expliquer les raisons de cette diminution (Boulianne et al., 2013 ; Zaheen et al., 2009). Ici, nous émettons l'hypothèse que les plasmocytes, certainement via les anticorps de hautes affinités qu'ils produisent, pourraient être à l'origine de ce défaut d'apoptose. D'autre part, notre modèle de suivi plasmocytaire IgJ-GFP nous a permis de constater que des plasmocytes pouvaient s'accumuler dans les GC au cours de la réponse immune et que cette accumulation était concomitante avec le déclin des GC. La production d'anticorps de haute affinité *in situ* pourrait participer à ce déclin en créant une compétition pour l'Ag et/ou en inhibant la signalisation du BCR des cellules B via des récepteurs inhibiteurs tels que le FcγRIIb. L'origine de ces plasmocytes est pour le moment inconnue. Sont-ils produits sur place et dans l'incapacité de migrer hors des GC où retournent-ils dans les GC après leur différenciation ? A l'heure actuelle il est décrit que seuls les plasmablastes, stade intermédiaire entre le stade B et le stade terminal de différenciation plasmocytaire ont la capacité de migrer (pour revue : Tarlinton et al., 2008). En fin de vie du GC, alors que le nombre de cellules possédant des BCR de haute affinité est maximal, il est envisageable que la différenciation plasmocytaire soit plus rapidement établie augmentant le nombre de plasmocytes terminaux (CD138⁺ B220^{low} tels que ceux que nous observons dans les GC des souris IgJ-GFP) qui perdent donc leurs capacités migratrices et s'accumulent dans les GC en produisant des Ig de hautes affinités *in situ*.

Les prochaines étapes de cette étude porteront sur des analyses de souris IgJ-GFP AID^{-/-} afin de vérifier si ces souris présentent aussi une accumulation de plasmocytes dans les GC au cours de la réponse

immune. L'éventualité d'une absence d'accumulation, très probable au vu du nombre de plasmocytes n'évoluant pas au cours de la réponse immune T-dépendante, appuierait notre hypothèse que les plasmocytes des GC jouent un rôle prépondérant dans le destin de ces structures. Une autre possibilité serait que les anticorps non switchés et de faibles affinités produits dans les souris AID^{-/-} ne pourraient pas induire de compétition pour l'Ag et/ou ne pourraient pas inhiber le signal BCR via les récepteurs FcγRIIb. Cette dernière hypothèse pourrait être vérifiée grâce à des injections d'anticorps bloquant ce récepteur au pic de la réaction immune. Si une des fonctions des anticorps switchés de hautes affinités est bien de réguler les cellules B du GC en interagissant via le FcγRIIb, le blocage de ce récepteur devrait empêcher cette régulation et donc augmenter la survie des GC. Enfin, des modèles de déplétion plasmocytaire tels que le modèle Blimp1 KO pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse à la question du rôle des anticorps dans la régulation des GC.

Dans un autre registre, la spécificité d'expression de la chaîne J nous a poussés à envisager la génération d'un modèle IgJ-Cre. Un tel modèle de contrôle de l'expression ou de la délétion de gènes dans la lignée plasmocytaire n'existe pas à l'heure actuelle. La même stratégie que pour le modèle IgJ-GFP, par transgénèse classique, a alors été utilisée mais nous n'avons jamais obtenu de délétion spécifiquement plasmocytaire avec ce modèle. Une stratégie de KI de la Cre recombinase inducible au tamoxifène, CreERT2, dans le locus de la chaîne J est actuellement envisagée. Ce KI nous permettrait ainsi d'avoir une expression de la Cre inducible spécifiquement dans les plasmocytes, comme observé avec le modèle IgJ-GFP. Des *Knock In* dans le locus de la chaîne J ont précédemment été tentés dans le laboratoire et ce locus semble difficile à cibler. Un recours aux technologies des TALENs ou au système CRISPR/CAS9, facilitant les insertions ciblées, paraît donc essentiel pour cette stratégie. Un tel modèle nous permettrait d'analyser l'effet que les plasmocytes ont sur les GC, suite à des délétions géniques spécifiques des plasmocytes. Par exemple, une délétion conditionnelle de Blimp1, le master régulateur des plasmocytes, pourrait être envisagée. Ce type de délétion nous permettrait de voir l'évolution des GC avant et après délétion des plasmocytes.

D'un point de vue plus général, un tel modèle, inexistant à l'heure actuelle, pourrait avoir des intérêts majeurs dans l'étude des plasmocytes normaux et pathologiques. Il serait envisageable, entre autres, d'induire à façon l'expression de gènes impliqués dans l'apparition des myélomes, ou encore des Ig pathogènes afin de précisément suivre la cinétique d'apparition des dépôts.

2. Etude des éléments minima requis pour la CSR.

Les résultats présentés dans l'article 1, nous ont permis de voir que la présence de régions switches transcrites, fortement ciblées par AID, n'est pas suffisante pour permettre un phénomène de CSR efficace. Cette quasi absence de CSR a pourtant lieu dans des conditions permettant une accessibilité et une activité optimale d'AID et un recrutement normal de toute la machinerie de réparation de l'ADN capable de réparer efficacement par NHEJ des cassures double brin sur de courtes distances. Par conséquent, seuls des éléments du locus IgH, qui permettraient les recombinaisons entre deux cassures de l'ADN situées à de plus longues distances, semblent manquants. La suite de nos travaux s'inscrira donc toujours dans la logique de détermination des éléments minima nécessaires pour la CSR. Parmi les éléments potentiellement importants pour une CSR efficace, le candidat premier apparaît être la 3'RR. En effet, comme nous l'avons vu, le KO de la 3'RR a des conséquences dramatiques sur la CSR (Vincent-Fabert et al., 2010c), mais également sur la SHM, l'effet sur cette dernière apparaissant au moins partiellement indépendant de la diminution de transcription du locus IgH en absence de 3'RR (Rouaud et al., 2013). L'équipe de Amy Kenter a montré que cet enhancer permet le rapprochement entre les promoteurs I, E μ et la 3'RR durant l'activation de la CSR et que ce rapprochement serait à l'origine de l'induction des transcrits germinaux. Ce rapprochement mettant à proximité la région donneuse S μ et une région S acceptrice, pourrait aussi faciliter la formation de la synapse nécessaire pour réparer des cassures survenant dans ces deux régions, normalement distantes (Wuerffel et al., 2007). C'est pourquoi nous pensons que l'ajout de la 3'RR pourrait combler le déficit de synapses entre nos deux régions S, et ainsi fournir la condition manquante à une CSR efficace dans le locus KIKS. Ainsi, un modèle murin dit « KIKS-micro3'RR » est actuellement en cours d'obtention au laboratoire (Le Noir S, travaux en cours). Devant la difficulté à ajouter une région 3'RR au locus KIKS déjà de taille conséquente, une version réduite de la 3'RR, comprenant les coeurs (« Cores ») des quatre enhancers a été insérée derrière un fragment génomique contenant l'enhancer intronique κ (E κ) et le C κ murin (**Figure 4**). Cet ensemble a ensuite été ajouté en aval de la région S γ 3 dans le vecteur de *Knock In* KIKS. Ainsi, comme dans le locus IgH, la micro3'RR se retrouve en aval du dernier exon C. Si la 3'RR est l'élément manquant à notre construction, nous devrions observer un switch efficace et ainsi montrer qu'en plus de son effet sur la transcription, la 3'RR permet le recrutement de facteurs spécifiques et nécessaires à la CSR. Les premiers animaux ont été obtenus et une première analyse de la lignée homozygote est espérée d'ici le début de l'été. L'approche sera similaire à celle du modèle KIKS avec, en premier lieu, la recherche de cellules B exprimant le C κ murin par cytométrie en

flux après immunisation. Ces souris seront bien évidemment comparées au premier modèle KIKS afin de déterminer si l'ajout de la 3'RR permet une augmentation de la CSR au locus KIKS.

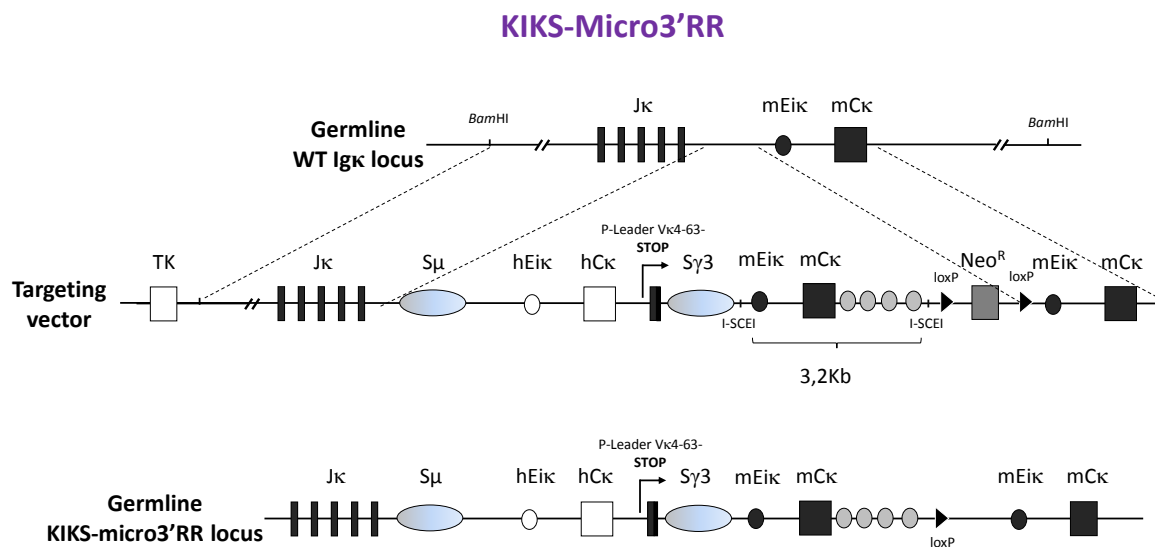


Figure 4 : Génération des souris KIKS-micro3'RR. La construction KIKS-micro3'RR comprenant, de 5' en 3', le core S μ , l'activateur hEik et le domaine constant hCk du locus humain Ig κ , suivi du core S γ 3, dont la transcription est assurée par le promoteur pV κ , comme dans la construction d'origine (article1). L'activateur mEik ainsi que le domaine constant murin mCk précèdent la micro-3'RR, constituée des 4 cores activateurs de la 3'RR, font suite à la construction. En aval de cette nouvelle cassette de switch le gène de résistance à la néomycine, encadré de sites LoxP. La construction sera insérée dans le locus kappa murin par recombinaison homologue.

Dans l'éventualité d'une absence de CSR malgré la présence de la 3'RR, l'ajout de combinaisons des différents éléments régulateurs (promoteurs I, exons I, régions S, 3'RR complète, activateur intronique) pourra être envisagé dans le locus KIKS. Cependant, ce type de stratégie devra être testé dans un premier temps sur des modèles cellulaires *in vitro*, le temps et le coût nécessaire pour générer des modèles animaux de ce type étant trop élevés. Cette approche *in vitro* avait déjà été tentée mais nous sommes heurtés à deux difficultés : le choix du bon modèle cellulaire et le site d'insertion du plasmide. Nos premières tentatives infructueuses ont été réalisées par insertions aléatoires mais nous avons rapidement considéré que ce type d'approche perdait tout l'avantage d'une insertion dans un locus naturellement ciblé par AID. Ainsi une insertion dirigée dans le locus kappa, de manière à s'affranchir des possibles effets de position, pourrait être envisagé. Pour cela un recours aux outils Crispr/cas9 facilitant les recombinaisons homologues nécessaires pour les KI sera indispensable (Wang et al., 2013). La limite supplémentaire d'une telle approche concerne le modèle cellulaire utilisé. En effet, les lignées capables de CSR, telles que la lignée CH12, ne recrutent pas AID au locus kappa et

sont donc peu à même de représenter de bons modèles pour la stratégie KIKS. A contrario, la lignée BL2 qui, sous des conditions d'activations complexes, peut induire la SHM (Faili et al., 2004) n'est pas décrite comme permettant la CSR. Ainsi, un résultat négatif dans cette dernière lignée ne serait que peu informatif, puisque le défaut de CSR pourrait autant être attribué à une incapacité de ces cellules à réaliser ce phénomène qu'au manque d'un élément au sein de notre locus KIKS. Il faut ajouter à cela que le statut de réarrangement du locus kappa de ces lignées n'est pas clairement défini et qu'il sera donc compliqué d'y réaliser des insertions dirigées du plasmide KIKS. Ces difficultés expliquent que nous n'ayons pas, pour le moment, poussé plus loin nos tentatives d'études des éléments minima de CSR dans des systèmes *in vitro*.

3. Modélisation des Maladies de Dépôts d'Ig Monoclonales (MIDD) chez la souris

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mes travaux de thèse, et plus particulièrement l'équipe de Christophe Sirac, est rattachée au Centre National de Référence « Maladie Rare Amyloses AL et autres maladies de dépôts d'immunoglobulines monoclonales (MIDD) ». Ainsi, de nombreux travaux sont en cours sur plusieurs de ces pathologies, travaux auxquels j'ai apporté une contribution plus ou moins importante. Dans cette partie de ce manuscrit, seront donc présentés d'une part les perspectives concernant le modèle de HCDD présenté dans l'article 2 mais aussi les résultats préliminaires obtenus dans le but de la génération d'un modèle de LCDD, les travaux sur le modèle de syndrome de Fanconi ayant donné lieu à une publication en collaboration avec l'équipe du Pr O. Devuyst (annexe 2), ainsi que les échecs auxquels nous faisons face pour l'établissement d'un modèle murin d'amylose AL.

L'ensemble des modèles murins présentés dans les points suivants sont établis en reprenant la stratégie développée pour l'établissement du modèle animal reproduisant le syndrome de Fanconi (Sirac et al., 2006b) et du modèle de HCDD présenté dans article 2. Pour cela, l'ADN codant pour les chaînes d'Ig pathogènes humaines est inséré dans le locus kappa murin, puis les animaux obtenus sont croisés avec la lignée transgénique DH-LMP2A dans laquelle la perte d'expression des chaînes lourdes murines associée à un nombre accru de plasmocytes (Lechouane et al., 2013) permet l'obtention d'un très bon niveau de sécrétion des Ig humaines transgéniques sous forme libre, spécifiquement par les cellules de la lignée B (**Figure 5**). Cette stratégie est particulièrement pertinente dans nos modèles de production de chaînes légères humaines où nous avons constaté, lors de l'élaboration du modèle de syndrome de Fanconi, que les chaînes légères humaines s'associaient parfaitement bien avec les chaînes lourdes murines. Ainsi, sous fond DH-LMP2A, nous évitons l'association chaînes lourdes/chaînes légères et donc les animaux ne produisent que des « Free Light Chains » (FLC), formes à l'origine des pathologies.

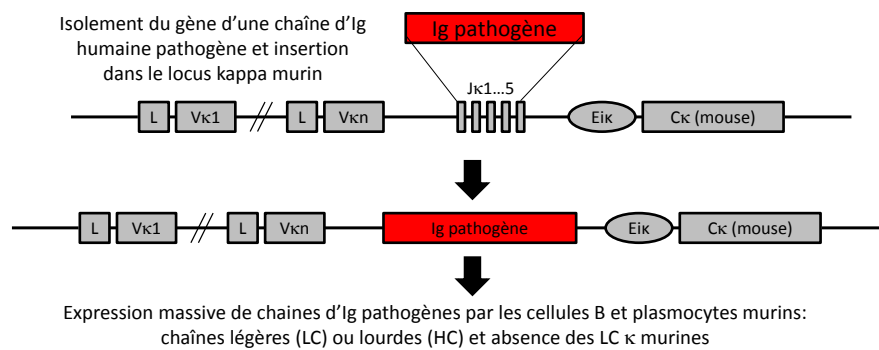


Figure 5 : Stratégie de production de chaînes d'immunoglobulines humaines chez la souris. La première étape consiste à isoler le gène d'une chaîne d'Ig pathogène à partir d'un prélèvement de patient. Une fois ce gène isolé, il est ensuite inséré dans le locus kappa murin. Puis les animaux sont croisés avec la lignée transgénique DH-LMP2A pour une production massive d'Ig sous forme libre.

3.1 Syndrome de Randall de type HCDD

Les travaux présentés dans l'article 2 ont abouti à la création d'un modèle murin reproduisant un syndrome de Randall de type HCDD, avec notamment la présence de dépôts linéaires non organisés le long des membranes basales tubulaires et glomérulaires, composés de la chaîne lourde d'Ig humaine. Le caractère réversible de ces dépôts a été mis en évidence et fait de ce modèle un excellent moyen de tester de nouvelles thérapies.

A l'heure actuelle, bien que les dépôts rénaux soient typiques du syndrome de Randall de type HCDD, et montrent une réorganisation de la matrice extracellulaire glomérulaire, les animaux ne développent pas de glomérulosclérose et la fonction rénale n'est pas affectée (absence de protéinurie), contrairement à ce qui est observé chez les patients atteints de HCDD. Il est cependant connu que de nombreuses lignées murines, dont les lignées utilisées pour l'élaboration des souris transgéniques (C57Bl/6 et 129/Fv), présentent une forte résistance à la sclérose rénale, ce qui pourrait expliquer que nous n'observions pour l'instant que les signes précoces de glomérulosclérose. Pour la suite des études sur ce modèle, nous allons donc mettre cette lignée sous un fond génétique pur décrit comme étant susceptible à la sclérose et la protéinurie glomérulaire, tel que le fond DBA/2J (Qi et al., 2005). Ce fond génétique est particulièrement utilisé dans les travaux sur les néphropathies diabétiques, car il est un des seuls à permettre de reproduire la glomérulosclérose nodulaire typique de ces pathologies et très proche de celle observée dans le HCDD (Ronco et al., 2011). Outre l'intérêt pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la glomérulosclérose, le suivi de la fonction rénale sur les paramètres urinaires serait un avantage incontestable, notamment pour tester de nouvelles thérapies.

Notre modèle présente cependant déjà un réel intérêt pour la compréhension de cette pathologie. Un des prochains axes de recherche sera de trouver avec quel(s) composant(s) des membranes basales les chaînes lourdes tronquées interagissent. Un travail préliminaire de notre équipe (non présenté) a montré que les domaines variables de ces chaînes lourdes tronquées de HCDD présentent presque tous un pI élevé et donc une charge globale positive à pH sanguin. De façon intéressante, une observation similaire avait été faite pour les chaînes légères de LCDD (Kaplan et al., 2007). L'une des hypothèses serait donc que l'interaction des chaînes lourdes pathogènes se fasse via des composants chargés négativement des membranes basales rénales. Parmi ces composants des glycosaminoglycans, tels que les héparanes sulfates semblent être de bon candidats (pour revue : Suh and Miner, 2013). Afin de vérifier cette hypothèse, nous envisageons d'injecter aux animaux de l'héparanase afin de couper les chaînes d'héparanes sulfates des protéoglycannes formant la matrice extracellulaire. Ce type d'injections a déjà été réalisée avec succès chez la souris (Wijnhoven et al., 2007, 2008). Si les chaînes lourdes pathogènes interagissent avec ces héparanes sulfates, suite à l'élimination de ces composés, les dépôts devraient régresser. Une autre approche serait de croiser nos animaux avec les modèles transgéniques de surexpression de l'héparanase humaine (Zcharia et al., 2004) dont l'activité induit la diminution des sites anioniques de la membrane basale glomérulaire (van den Hoven et al., 2008). Il serait alors intéressant de comparer la cinétique d'apparition des dépôts dans ces animaux par rapport à des animaux WT. Une molécule qui mime les héparanes sulfates, le PI88 (actuellement en phase III d'essai clinique pour une toute autre utilisation) (Ferro et al., 2007), pourrait alors être envisagée comme une nouvelle stratégie thérapeutique permettant de détourner les Ig pathogènes de leur cible, à la manière du CPHPC dans l'amylose qui chelate la SAP circulante (Pepys et al., 2002).

Les thérapies cellulaires à base de cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse (BMSC pour *Bone marrow Mesenchymal Stem Cells*) commencent à montrer des résultats intéressants sur la régénération des tissus rénaux (Fleig and Humphreys, 2014). Utilisant les facultés régénératrices de ces cellules, l'équipe de Guillermo Herrera a récemment montré dans un système *in vitro* que les lésions induites par des chaînes légères d'amylose AL pouvaient être efficacement réparées par une co-incubation avec des BMSC (Herrera et al., 2011) et il semblerait que des résultats similaires aient été obtenus dans des modèles *in vivo* d'injection de chaînes légères pathogènes (communication personnelle auprès de C Sirac). Il serait donc intéressant de tester ce type de thérapie dans notre modèle de HCDD afin de voir si des BMSC peuvent aussi améliorer les lésions rénales dans un contexte de production en continu de chaînes d'Ig pathogènes.

Enfin dans le but de mieux comprendre les conséquences qu'entraînent la production d'une chaîne lourde tronquée sur les plasmocytes, nous pourrions mettre à profit le caractère inductible de notre modèle de Randall de type HCDD. Pour cela le modèle CH1+ devra être croisé avec des animaux exprimant la CreERT2, idéalement de manière restreinte à la lignée plasmocytaire ou aux stades finaux de différenciation B (AID-CreERT2 que nous possédons au laboratoire ou modèle IgJ-Cre-ERT2 que nous souhaitons réaliser (voir la première partie des Résultats préliminaires et Perspectives). Ainsi, suite à des injections de tamoxifène, nous pourrions à façon déléter le domaine CH1 et étudier l'effet d'une telle délétion sur la survie, la prolifération ou le stress du réticulum endoplasmique (UPR) dans ces cellules. Une telle délétion inductible reproduirait fidèlement les étapes physiopathologiques du HCDD dans lequel le domaine CH1 est très probablement éliminé lors des événements de recombinaisons secondaires (SHM et CSR) du centre germinatif. Une telle approche permettrait de confirmer et mieux étudier l'effet toxique intrinsèque d'une chaîne lourde tronquée pour les plasmocytes, ainsi que nos résultats de l'article 2 semblent le montrer. Ceci pourrait expliquer d'une part, la sensibilité exacerbée aux inhibiteurs du protéasome et d'autre part, le fait que les HCDD soient majoritairement accompagnées de petits clones plasmocytaires peu évolutifs. Enfin, le contrôle de la délétion du domaine CH1 dans les plasmocytes permettra de mieux étudier la cinétique d'apparition des dépôts tissulaires.

3.2 Syndrome de Randall de type LCDD

Précédemment au laboratoire, il a été montré dans un modèle de « greffes de tumeurs » qu'une chaîne légère issue d'un patient atteint de LCDD pouvait reproduire les lésions typiques de cette pathologie chez la souris (Khamlichi et al., 1995b), ouvrant la voie à notre stratégie de modélisation de ces maladies chez l'animal. Le modèle HCDD que nous venons de présenter a aussi depuis confirmé qu'il était possible de reproduire un syndrome de Randall avec notre approche transgénique. Cependant, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique de ce manuscrit, la forme de loin la plus fréquente des syndromes de Randall est causée par des dépôts de chaînes légères monoclonales. Aussi, nous avons souhaité créer en parallèle au modèle HCDD, une lignée de souris LCDD en utilisant la chaîne légère précédemment employée dans le modèle de greffe de tumeur (FRA). Nous avons cette fois-ci inséré dans le locus kappa, l'ADNc codant l'ensemble de la chaîne humaine, incluant le domaine constant, plutôt que seulement les domaines VJ comme dans le modèle de syndrome de Fanconi (**Figure 6A**, gauche). Cette approche a été choisie afin de simplifier le suivi de l'expression de la chaîne

légère par dosage « Freelite » utilisé pour suivre les chaînes légères libres chez les patients, ce qui ne pouvait pas être fait dans le cas d'une chaîne légère hybride contenant un domaine constant Ck murin.

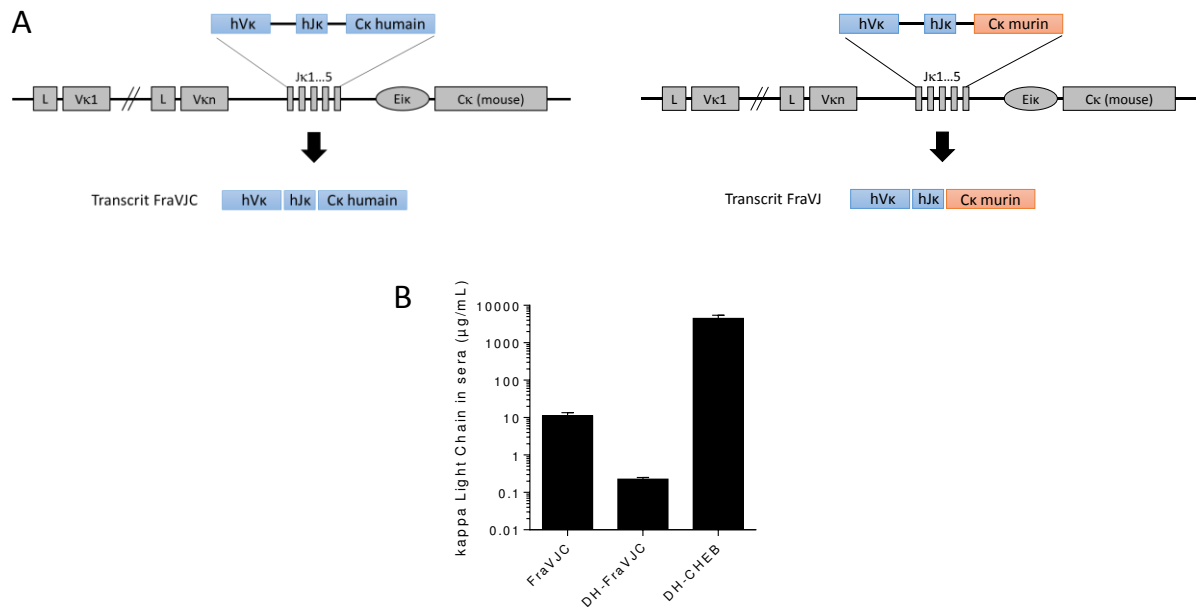


Figure 6 : Stratégie de génération d'un modèle murin de LCDD et dosage sériques des chaînes légères d'Ig humaines. (A) Représentation schématique de la stratégie de production de chaînes légères FRA. La chaîne légère est soit composée des domaines V-J-C humain (FraVJC, gauche) soit composée des domaines V-J humain et du Ck murin, comme dans le modèle de syndrome de Fanconi (FraVJ, droite). Ces constructions sont ensuite insérées dans le locus κ murin tel que décrit figure 5. (B) Dosages sériques des chaînes légères FraVJC ou DH-FraVJC de souris âgées de 1 à 5 mois. Ces dosages sont mis en parallèle de ceux précédemment obtenus avec la lignée DH-CHEB afin de montrer les taux espérés. (n=13 FraVJC et n=4 FraVJ mean ± SEM (µg/mL).

Les premiers résultats montrent des taux de production de la chaîne légère pathogène très décevants, avoisinants à peine la dizaine de µg/ml (**Figure 6B**). Les dosages urinaires n'ont quant à eux révélés que quelques traces de chaînes légères (non montré).

Les analyses d'organes de ces animaux n'ont pas révélé de dépôts d'Ig dans les reins. Cependant, ces animaux n'avaient pas encore été mis sous fond DH-LMP2A (cf article 2 et annexe 1). Néanmoins, les premiers animaux DH-FraVJC, observés n'ont pas non plus révélé de lésions rénales. Nous attendons actuellement que ces animaux soient plus âgés, pour réitérer ces analyses, les premières ayant été faites sur des souris de maximum 3 mois, ce qui peut ne pas suffire pour observer l'apparition des dépôts. Il est possible que l'expression d'un ADNc complet ne permette pas d'obtenir des productions aussi importantes que lors d'une insertion du domaine VJ seul. Cependant, des résultats obtenus sur un autre modèle d'expression de chaîne légère semblent contredire cette explication (voir la sous partie 4). Il est donc possible que la nature même de la chaîne légère Fra (séquence ou particularités structurales) ne permette pas sa production et/ou sécrétion optimale, ce que nous avons déjà constaté lors des transfections en lignée SP2/0, où les lignées Fra présentaient des taux de sécrétion beaucoup plus faible que d'autres transfectants. Nous avons cependant réalisé un second modèle dans

lequel seul le domaine VJ a été cloné (**Figure 6B**, droite), de façon similaire au modèle de syndrome de Fanconi. Les premiers résultats de dosages sériques devraient être connus d'ici quelques semaines et nous espérons ainsi obtenir un modèle complémentaire au modèle HCDD pour l'étude des mécanismes physiopathologiques inhérents aux maladies de dépôts d'Ig monoclonales de type Randall.

3.3 Syndrome de Fanconi

Le travail présenté en annexe 2, réalisé en collaboration avec l'équipe de Pr Olivier Devuyst à Zurich (soumis à PNAS) et auquel j'ai pu participer, est un exemple de valorisation des modèles murins de maladies de dépôts d'Ig monoclonales. Cette étude a permis de confirmer, en les précisant, les observations précédemment décrites dans l'étude originale du modèle (Sirac et al., 2006b) et d'aller plus en avant dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques du syndrome de Fanconi. Nous avons démontré la toxicité hautement spécifique des chaînes légères impliquées dans un syndrome de Fanconi sur les cellules tubulaires proximales. Cette toxicité passe par une inhibition de l'endocytose suite à une dysfonction du trafic et de la fonction lysosomale et semble associée à une dédifférenciation/prolifération des cellules tubulaires proximales. Ces observations ont pu être faites sur le modèle animal de syndrome de Fanconi (modèle Che), en comparaison à un modèle contrôle dont nous reparlerons dans le prochain paragraphe (Souris Del), puis ont été confirmées *in vitro* sur un système de cultures primaires de cellules tubulaires proximales (Terry et al., 2007) exposées à de faibles doses d'Ig monoclonales recombinantes (25µg/ml). L'étude *in vitro* a permis de pousser un peu plus loin les investigations et en particulier de confirmer la spécificité des chaînes légères dans ce mécanisme physiopathologique de dysfonction du trafic lysosomal. Ainsi, une seconde chaîne légère de syndrome de Fanconi (Dup) a pu être testée et a provoqué précisément les mêmes anomalies sur les cellules tubulaires. Par contre, deux chaînes contrôles (Del et Roc) issues de patients atteints d'autres MIDD ainsi qu'un mutant de la chaîne Che (Chemut30 possédant un remplacement du résidu hydrophobe Ala par un résidu polaire Ser) n'affectent en aucune façon la fonction des cellules tubulaires proximales. Contrairement à la chaîne de syndrome de Fanconi Che, le mutant Chemut30 ne forme plus de cristaux dans les cellules tubulaires proximales, une caractéristique commune à de nombreux cas de Fanconi à chaînes légères d'Ig (Decourt et al., 1999). Cependant, de façon intéressante, cette mutation n'affecte pas sa résistance à la protéolyse par des enzymes lysosomales (cathepsine B). Ainsi, l'une des hypothèses de la toxicité tubulaire des chaînes de Fanconi, qui proposait que l'accumulation des chaînes légères était due à une résistance aux protéases, semble contredite. Il est donc très envisageable qu'une toxicité directe de certaines chaînes légères en se liant sur un ligand encore inconnu soit à l'origine de la dysfonction lysosomale.

De manière éloquent, des effets similaires ont aussi été observés dans un modèle de syndrome de Fanconi héréditaire, la cystinose (maladie de surcharge lysosomale), induit par une mutation du gène CTNS, à l'origine du plus fréquent syndrome de Fanconi de l'enfant (Raggi et al., 2014). Il semblerait donc que quelque soit l'évènement primaire (mutation ou Ig monoclonale), le processus moléculaire pathogénique des syndromes de Fanconi soit commun (Sirac et al., 2011).

La suite de ces travaux sera effectuée essentiellement par l'équipe du Pr Devuyst et consistera à déterminer les raisons précises de la dysfonction des lysosomes. Plusieurs voies sont à l'étude avec pour but de révéler le mécanisme commun aux différentes formes de syndrome de Fanconi. Ces observations permettront peut-être ainsi de mettre en lumière un déclencheur commun qui pourrait être la cible de nouvelles thérapies. Pour notre part, nous souhaiterions analyser l'effet du bortezomib dans ce modèle. Il semble en effet que les traitements aux inhibiteurs du protéasome ne permettent pas de restaurer efficacement la fonction rénale dans le syndrome de Fanconi contrairement, comme nous l'avons vu, aux autres maladies de dépôts d'Ig monoclonales. Nous voudrions donc vérifier que le bortezomib ne peut pas avoir des effets aggravants sur les cellules tubulaires, engorgées par des chaînes légères qu'elles n'arrivent pas à dégrader efficacement. En effet, il est maintenant clairement établi que les différentes voies de dégradation protéiques (lysosome, autophagosome, protéasome) intracellulaires coopèrent (Korolchuk et al., 2010) et des résultats préliminaires obtenus par l'équipe d'Olivier Devuyst semblent d'ailleurs montrer que l'autophagie est impliquée dans le défaut de dégradation lysosomale des cellules tubulaires. Ainsi, dans une cellule dont l'homéostasie protéique est grandement perturbée, il est possible que l'inhibition du protéasome soit un facteur aggravant. Ainsi, même si le traitement au bortezomib permet de diminuer le clone plasmocytaire et donc la production de chaînes légères pathogènes, son effet délétère sur les cellules tubulaires pourrait expliquer le maintien de l'anomalie rénale.

3.4 Amylose AL

Un des objectifs de longue date de notre équipe est de mettre au point un modèle murin d'amylose AL, pathologie de dépôts d'Ig monoclonales la plus fréquente et la plus grave et souffrant de l'absence de modèle animal efficace. Depuis près d'une vingtaine d'année maintenant, différentes stratégies ont été employées par notre équipe pour faire un tel modèle. Des méthodes de transgénèse classique dans lesquelles une chaîne légère pathogène issue d'un patient atteint d'amylose AL a été placée sous le contrôle de promoteurs forts, B spécifiques puis ubiquitaires, n'ont jamais permis d'obtenir de fortes

productions de chaînes légères, ni l'obtention de dépôts d'amylose. Devant les réussites obtenues par KI dans le locus kappa murin, un premier modèle (souris « Del ») utilisant strictement la même stratégie que le modèle de syndrome de Fanconi a été réalisé. Comme expliqué précédemment, afin d'obtenir des taux satisfaisants de chaînes légères libres pathogènes, ces animaux ont été croisés avec la lignée DH-LMP2A (décrite dans l'article 2 et annexe 1). Ainsi, nous avons obtenu dans ce modèle une très forte production de chaînes légères d'Ig libres, à des taux nettement supérieurs à ceux observés chez le patient dont est issue la chaîne d'Ig (**Figure 7A**). Cependant, aucun dépôt positif au rouge congo, traduisant la présence d'amylose, n'a pu être détecté chez ces souris, quelques soit l'âge des animaux et les organes. Il est à noter que ces chaînes pathogènes sont également retrouvées en quantité extrêmement importante dans les urines sans causer d'atteinte rénale (**Figure 7B**). Ce modèle a d'ailleurs été utilisé comme témoin négatif dans l'étude menée sur le syndrome de Fanconi (annexe 2).

La même stratégie a été retenté plus récemment avec une chaîne légère d'isotype lambda dont le domaine variable est issu du sous-groupe de variabilité V λ 6, connu pour être presque systématiquement associé à des dépôts amyloïdes rénaux (Souris « Sai »). Encore une fois, une production intense de la chaîne légère d'Ig pathogène sous forme libre dans le sérum a été obtenue mais aucun dépôt d'amylose n'a pu être observé (**Figure 7A**). Contrairement au modèle « Del » peu de chaînes légères sont retrouvées dans les urines (**Figure 7B**). Il est fort probable que cette différence soit la conséquence d'une moins bonne filtration glomérulaire des chaînes λ due à leur forme dimérique prépondérante. Des expériences préliminaires de western blot non dénaturant semblent confirmer cette hypothèse (non montré). Quelles que soient ces différences, il s'avère qu'aucune des deux chaînes ne se déposent, aucune anomalie tissulaire n'ayant pu être observée dans les deux modèles.

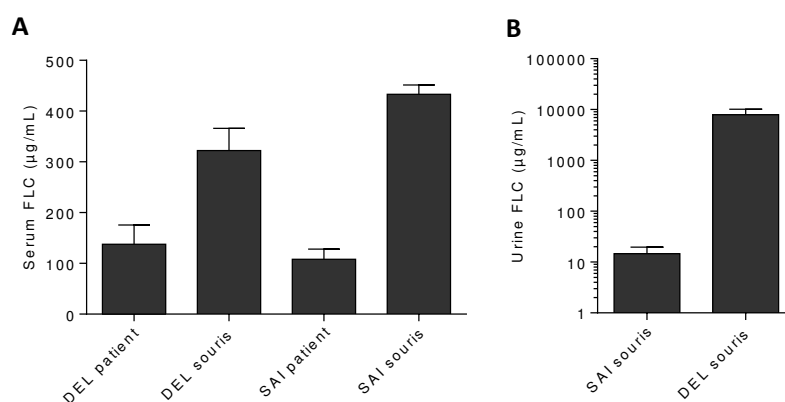


Figure 7 : Dosage sérique(A) et urinaire (B) des chaînes légères libres dans les souris Del et Sai. Les datas sont représentatives des dosages de 6 à 12 animaux âgées de 3-4mois, mean \pm SEM (μ g/mL)

Afin d'augmenter encore la production de la chaîne légère pathogène, un croisement de nos lignées avec le modèle murin Xbp1-s (Carrasco et al., 2007), développant avec l'âge des proliférations plasmocytaires pouvant conduire à un myélome, est envisagé. Nous possédons ces souris dans le laboratoire. Cependant, nous n'avons jusqu'à maintenant pas observé de forte augmentation des Ig sériques dans ces animaux, contrairement aux résultats publiés.

Les données obtenues avec ces deux modèles murins laissent penser que, soit la souris est résistante à l'amylose AL, soit des modifications post-traductionnelles de chaînes produites chez la souris ne permettent pas l'induction de l'amylose, soit, enfin, il manque un évènement déclenchant la nucléation des fibrilles amyloïdogènes. Pour répondre à cette dernière possibilité, nous avons donc injecté des fibrilles amyloïdes provenant de patients atteints d'amylose AL de même isotype que les Ig présentes dans les souris, l'objectif étant que ces fibrilles servent d'AEF (*Amyloidosis Enhancing Factor*). Cette méthode s'est malgré tout avérée infructueuse dans notre cas. Dans nos prochaines tentatives, nous allons tenter de « fabriquer » un AEF à partir de chaînes légères purifiées issues des urines des souris. En collaboration avec l'équipe de Cyrille Garnier à Rennes, nous souhaitons créer des fibrilles amyloïdes *in vitro* avec ces chaînes légères par les méthodes classiques de fibrillogénèse (baisse de pH, chauffage, agitation) (Arosio et al., 2012; Martin and Ramirez-Alvarado, 2010), puis réinjecter ces fibrilles aux animaux correspondants. Nous espérons que des fibrilles faites à partir de protéines de même nature puissent servir de base de nucléation efficace pour initier l'élongation de fibres amyloïdes. Une autre possibilité soulevée par quelques travaux récents serait que la nucléation ou les protofibrilles soient en fait formées dans la cellule productrice. Ainsi, pour des raisons encore mal connues mais certainement liées à un mauvais repliement des chaînes d'Ig lors de leur synthèse, un début d'agrégation aurait lieu dans le plasmocyte qui sécrèterait ainsi des « noyaux » d'amylose pouvant se déposer à amorcer la suite de l'élongation des dépôts. Dans ce cas, il est possible que des plasmocytes sains soient capables de contenir ces agrégats en les dégradant efficacement. Aussi, nous souhaiterions tenter de « provoquer » le mauvais repliement des protéines dans les plasmocytes murins en inhibant, par exemple, des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique. Cette inhibition pourrait conduire à un défaut de repliement des chaînes pathogènes, qui de ce fait pourraient être amenées à s'agréger. Pour cela des KO ou des knock-down de certaines chaperonnes pourraient être envisagés. Dans le cas du KO, un recours à des modèles de délétion conditionnelle sera certainement indispensable, les protéines chaperonnes étant pour la plupart ubiquitaires et servant au repliement d'un grand nombre de protéines. Pour cela, le modèle AID-CreERT2 que nous possédons au laboratoire pourra être utilisé et permettra d'induire la délétion de la chaperonne ciblée uniquement dans les cellules B étant passées par un centre germinatif. Si nous réussissons à élaborer le modèle IgJ-CreERT2 (KI de la Cre recombinase dans le locus IgJ), ce modèle dont l'expression de la

Ce serait restreinte aux plasmocytes serait bien évidemment le choix premier pour mener à bien cette stratégie. Plusieurs protéines chaperonnes pourraient être ciblées dont la BiP, la protéine majeure du repliement des Ig mais aussi Erdj3. En effet, des travaux récents particulièrement intéressants ont montrés que Erdj3, une chaperonne dont le rôle initial est d'adresser des protéines mal repliées à la BiP puis en cas de surcharge protéique au protéasome, pouvait être sécrétée en association avec des protéines mal repliées afin de prévenir leur agrégation toxique en dehors de la cellule (**Figure 8**). Ces études ont ainsi montré que la présence de Erdj3 était capable d'inhiber, en extracellulaire, l'agrégation de transthyréline mutée impliquée dans une amylose TTR (Genereux et al., 2015). Il est donc possible que l'inhibition de Erdj3 faciliterait la production et la sécrétion de protéines mal repliées qui pourraient en retour s'agréger pour former la nucléation nécessaire à l'initiation des fibrilles amyloïdes. Il sera dans tous les cas intéressant d'évaluer chez des patients si des différences de quantités sériques de cette chaperonne peuvent être associées avec l'apparition d'amyloses. Une telle observation pourrait représenter une nouvelle piste thérapeutique à explorer.

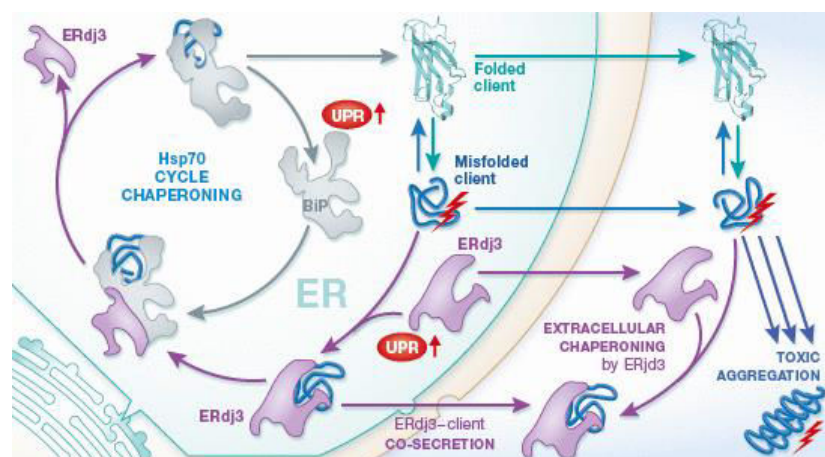


Figure 8 : Mécanisme d'action de ERdj3, co-chaperonne de BiP. En réponse à l'activation de l'UPR la protéine ERdj3 va reconnaître les protéines mal repliées et soit les ré-adresser à BiP pour un nouveau cycle de repliement soit être sécrétée avec, afin de prévenir une possible agrégation de protéines toxiques (d'après Genereux JC, 2014)

De même, il serait intéressant de vérifier si des traitements répétés avec de faibles doses de bortezomib, n'induisant pas la mort des plasmocytes mais provoquant une accumulation intracellulaire de protéines mal repliées, ne pourrait pas conduire à la sécrétion d'agrégats amyloïdes dans nos modèles et ainsi favoriser l'apparition de dépôts d'amylose.

L'établissement d'un tel modèle permettrait de tester entre autres les divers anticorps thérapeutiques en cours de développement par plusieurs équipes, tels que les anticorps anti-SAP (Bodin et al., 2010) ou anti-fibrilles amyloïdes (Wall et al., 2012) mais aussi la molécule thérapeutique que nous développons avec le LFB Biotechnologies et pour laquelle nous venons de déposer un brevet (données

encore confidentielles). Dans tous les cas, l'étude de la formation des dépôts amyloïdes de chaînes légères monoclonales dans un modèle *in vivo* représente une attente importante de la communauté scientifique.

4. Stress UPR et traitements aux inhibiteurs du protéasome

Les résultats présentés dans l'article 2 ont mis en lumière la forte sensibilité aux inhibiteurs du protéasome des plasmocytes produisant une chaîne lourde d'Ig tronquée du domaine CH1. Cette sensibilité semble s'expliquer par un stress du réticulum endoplasmique naturellement plus important que dans des cellules produisant des chaînes d'Ig complètes. Nous avons ainsi pu observer à l'état basal une augmentation de l'expression de certains marqueurs impliqués dans la réponse UPR dont BiP, CHOP ou encore Herp. Ces observations nous ont poussés à explorer ce phénomène sur d'autres animaux producteurs de chaînes d'Ig monoclonales pathogènes. Comme dans l'article 2, les lignées Del et Che ont été croisées avec la lignée DH-LMP2A puis des traitements au bortezomib, utilisant des doses sub-optimales (0.5mg/kg), permettant de voir des différences de sensibilités, ont été réalisés et comparés à des souris sauvages (WT) et DH-LMP2A (**Figure 9**).

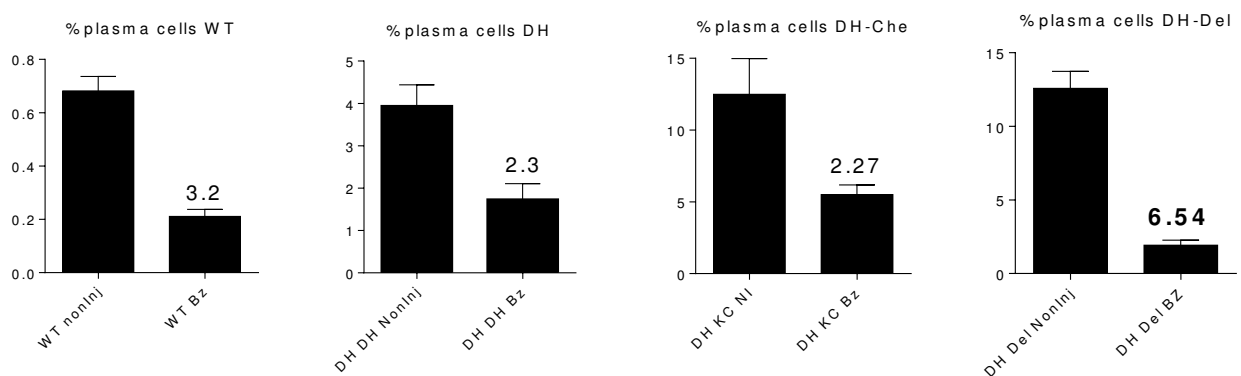


Figure 9 : Effet du traitement au bortezomib. Les animaux traités au bortezomib (Bz) ont reçus 2 injections de 0.5mg/mL 2 jours de suite et ont été analysés le lendemain de la deuxième injection. Le pourcentage de plasmocytes a été déterminé par cytométrie en flux grâce au marqueur CD138. WT = animaux sauvages, DH = lignée DH-LMP2A. Données issues de 3 expériences indépendantes avec 2 ou 3 animaux. Les chiffres indiquent la diminution du pourcentage de plasmocytes après traitement.

L'application de cet inhibiteur du protéasome a révélé une diminution du pourcentage de plasmocytes de 6.5 fois par rapport aux animaux non traités. Comme décrit dans l'article 2, les animaux WT et DH-LMP2A présentent une diminution de la population plasmocytaire beaucoup moins importante en réponse au bortezomib. Étonnamment, les animaux DH-Che ne présentent pas de sensibilité exacerbée au bortezomib. Ainsi, les animaux DH-Del présentent, comme les DH-CH1⁻ (cf article 2), une sensibilité exacerbée à cette molécule et cet effet semble directement lié à la nature de la chaîne d'Ig

produite puisqu'un modèle strictement équivalent mais exprimant une autre chaîne légère (DH-Che) ne présente pas cette sensibilité.

Nous souhaitons explorer la voie de l'UPR dans ces lignées, comme nous l'avons fait avec la lignée DH-CH1. Une activation de cette voie UPR dans la lignée DH-Del mais pas dans la lignée DH-Che démontrerait le lien entre la sensibilité au bortezomib et le stress du réticulum endoplasmique. Il semble donc que la nature de la chaîne puisse influencer la réponse à un traitement couramment utilisé en thérapie humaine pour ce type de pathologie. Bien que préliminaires, ces résultats corroborent de façon surprenante les observations cliniques sur le traitement au bortezomib. En effet, le bortezomib semble particulièrement bien fonctionner dans les traitements de l'amylose AL ((Jaccard et al., 2014b; Palladini et al., 2014b) ainsi que dans les LCDD/HCDD (Nasr et al., 2012; Patel et al., 2014 ainsi que données préliminaires du centre de référence en cours de publication). Comme nous l'avons proposé dans la discussion de l'article 2, nous émettons l'hypothèse que des chaînes d'Ig monoclonales pathogènes dont les particularités structurales les rendent prompts à l'agrégation pourraient s'accumuler sous forme mal repliées dans les plasmocytes et provoquer un stress UPR exacerbé les rendant particulièrement sensibles à des traitements visant les voies de dégradations protéiques telles que le protéasome. Le cas du syndrome de Fanconi est plus complexe à expliquer puisqu'il a été démontré que la présence de cristaux dans les plasmocytes était due à leur agrégation intra cellulaire (Khamlichi et al., 1992) or les plasmocytes ne semblent pas sensibles à ce type de thérapies. Il est possible que ces structures cristallines ne soient pas accessibles aux protéines chaperonnes, qui donc ne seront pas recrutées et ne déclencheront pas l'UPR.

Afin de confirmer ces résultats montrant que les Ig monoclonales produites par les plasmocytes peuvent influencer les réponses aux traitements par inhibiteurs du protéasome, nous mèneront des études similaires sur les autres modèles transgéniques de MIDD (DH-Sai, DH-Fra ainsi que d'autres modèles en cours non présentés dans ce manuscrit). Des études sur lignées plasmocytaires pourraient aussi être envisagées afin de faire une étude comparative de l'effet des Ig sur une plus grande quantité de protéines. Si nous confirmons que le stress UPR basal est directement lié à la réponse au bortezomib, il sera alors intéressant de mener une étude similaire sur des cellules de patients (issues de biopsies de moelle osseuse) pour d'une part, vérifier que notre hypothèse est valide et d'autre part, évaluer la faisabilité d'un test permettant de prédire la réponse à un traitement au bortezomib basé sur l'activité UPR basale des plasmocytes.

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de ces années de thèse m'ont permis d'appréhender des aspects très différents mais complémentaires du développement tardif de la lignée lymphocytaire B.

Une approche très fondamentale a permis d'apporter des éléments de compréhensions sur la régulation du phénomène de commutation isotypique des Ig. Ainsi, le modèle KIKS a prouvé que, contrairement à ce qui était proposé par certains modèles, la recombinaison de classe est essentiellement restreinte au locus des chaînes lourdes d'Ig grâce à des éléments *cis*-régulateurs qui contrôlent étroitement la réparation des cassures d'ADN réalisées par AID sur des régions spatialement éloignées. Ce contrôle participe très certainement au maintien de l'intégrité du génome lors de ces événements en limitant des réparations illégitimes pouvant conduire à des situations pathologiques.

Ce contrôle passe aussi indirectement par une fenêtre d'action limitée dans le temps par la durée de vie des centres germinatifs où ont lieu ces recombinaisons. Mon travail a permis de proposer une explication à cette durée limitée même si ces travaux restent préliminaires. Ainsi, il semblerait que le produit final de la réaction du centre germinatif, le plasmocyte, soit aussi celui qui signe son arrêt de mort.

Enfin, dans une démarche plus appliquée, j'ai pu participer à l'élaboration d'un nouveau modèle de maladies de dépôts d'Ig, reflétant l'une des conséquences d'une mauvaise régulation des phénomènes physiologiques pré-cités. Outre son intérêt pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie, ce modèle a ouvert une nouvelle voie d'exploration du contrôle de la survie des plasmocytes en montrant que la raison d'être de ces cellules, l'anticorps, pouvait aussi causer sa perte.

Annexes

Annexe 1 : B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation

B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation

Fabien Lechouane¹, Amélie Bonaud¹, Laurent Delpy¹, Stefano Casola², Zeliha Oruc¹, Guillaume Chemin¹, Michel Cogné¹ and Christophe Sirac¹

¹ Université de Limoges, CNRS UMR 7276, Limoges, France

² IFOM, The FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation, Milan, Italy

B-cell terminal differentiation into antibody secreting plasma cells (PCs) features a transcriptional shift driven by the activation of plasma cell lineage determinants such as Blimp-1 and Xbp-1, together with the extinction of Pax5. Little is known about the signals inducing this change in transcriptional networks and the role of the B-cell receptor (BCR) in terminal differentiation remains especially controversial. Here, we show that tonic BCR signal strength influences PC commitment *in vivo*. Using immunoglobulin light chain transgenic mice expressing suboptimal surface BCR levels and latent membrane protein 2A knock-in animals with defined BCR-like signal strengths, we show that weak, antigen-independent constitutive BCR signaling facilitates spontaneous PC differentiation *in vivo* and *in vitro* in response to TLR agonists or CD40/IL-4. Conversely, increasing tonic signaling completely prevents this process that is rescued by lowering surface BCR expression or through the inhibition of Syk phosphorylation. These findings provide new insights into the role of basal BCR signaling in PC differentiation and point to the need to resolve a strong BCR signal in order to guarantee terminal differentiation.

Keywords: B cells · BCR · LMP2A · Plasma cells



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Signaling emanating from the B-cell receptor (BCR) is necessary for B lymphocyte survival at all stages of differentiation [1–5]. Accumulating evidence indicates that basal BCR signaling controls the development of the three major subsets of mature B cells: B-1, follicular (FO), or marginal zone (MZ) B cells [4, 6]. In addition, it is well known that upon increased BCR signaling in response to antigen (Ag) binding, in the presence of T-cell

help, B lymphocytes can induce a differentiation program leading either to terminally differentiated antibody-secreting plasma cells (PCs), or to memory B cells [7–9]. The concerted induction of essential transcription factors such as Blimp-1, Xpb-1, and Irf-4, together with silencing of Pax-5 and Bcl-6 expression is responsible for PC differentiation, whereas their access to particular survival niches will determine their life span [10]. However, little is known about the initial signals governing entry into the PC compartment rather than the memory B-cell pool. In particular, if basal BCR signaling controls mature B-cell lineage maintenance [2] and BCR triggering supports proliferation and selection of B cells within the GC [11], it is still a matter of debate as to what extent signaling through the antigen receptor is important or even necessary for PC differentiation. In fact, several *in vitro*

Correspondence: Dr. Christophe Sirac
e-mail: christophe.sirac@unilim.fr

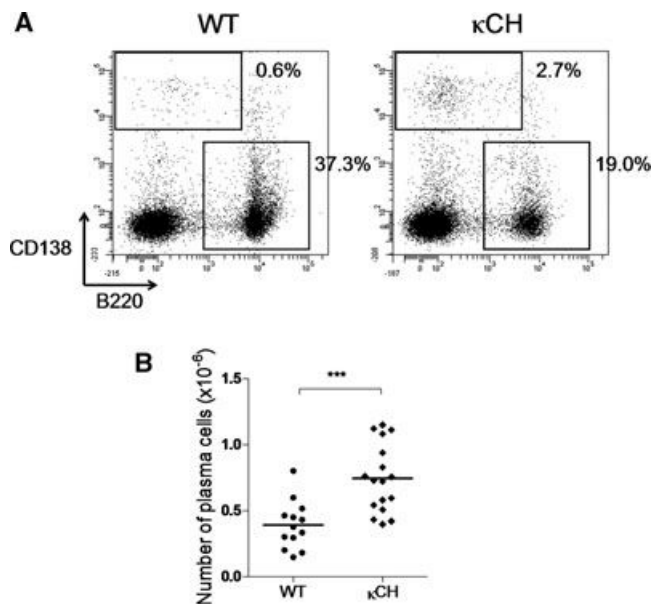


Figure 1. Low BCR expression leads to an enhanced plasma cell differentiation. (A) Flow cytometry analysis of splenocytes from WT and κ CH mice are shown. Data shown are representative of four independent experiments with at least two mice of each strain. (B) Absolute numbers of spleen plasma cells from WT and κ CH mice, calculated with the CD138⁺ gate represented in (A). Each symbol represents an individual mouse and horizontal lines represent means, data pooled from four experiments performed. Differences were evaluated using Student's t-test (***) $p < 0.001$.

studies have highlighted a inhibition of mitogen-induced PC differentiation by BCR signaling alone or in combination with CD40 and/or IL-4 ligation [12–16]. This inhibition is often considered as a mechanism to prevent PC differentiation during the GC reaction to favor memory B-cell formation [17, 18]. Another interpretation for BCR negative control of PC differentiation applies to the specific inhibition of B cells expressing a self-reactive BCR [14, 15]. However, most studies have been performed in vitro and there is still no in vivo evidence for BCR-dependent inhibitory mechanisms limiting PC development. Instead, several studies have underlined the importance of strong BCR signaling to drive efficient PC differentiation during both GC and extra follicular responses [19, 20]. However, the nature and concentration of the BCR ligand, the duration and timing of the signal, the availability of accessory signals and the particular microenvironment can all influence B-cell fate and thus contribute to the complex interpretation of such studies, particularly in the context of the entire lymphoid organ network [11, 21]. To bypass this problem, we used latent membrane protein 2A (LMP2A) mice previously described by Casola et al. [22]. In this model, a knock-in strategy resulted in the expression of the BCR surrogate LMP2A encoded by the Epstein-Barr virus genome, instead of the endogenous IgH chain. LMP2A mimics BCR signaling and replaces BCR function to support B-cell development and survival [23]. The LMP2A gene was inserted under the control of either a D_H (DQ52) or V_H promoter, respectively, leading to low or high expression, respectively. In BCR-less LMP2A mice a strong constitutive signal provided to B cells progenitors by

the viral surrogate promoted the development of B-1 cells, while a weak signal induced the differentiation of MZ and FO B cells [22].

In the present study, we analyzed the relationship between tonic BCR signal strength and B-cell terminal differentiation using a transgenic mouse model exhibiting low surface BCR expression and homozygous LMP2A knock-in mice. Our data show that PC development can occur independently of BCR triggering once a weak basal BCR signaling is provided. In contrast, a strong sustained BCR signal prevented both in vitro and in vivo terminal differentiation, demonstrating an inverse correlation between BCR signal strength and PC development.

Results

Increased plasma cell differentiation of transgenic B cells with low surface BCR expression

We previously generated a knock-in mouse model, κ CH mice, expressing a chimeric human/mouse κ light chain by inserting a rearranged human V κ J κ gene in place of the mouse J κ cluster. We demonstrated that suboptimal expression of the transgene in homozygous mice induced a significant reduction in surface BCR expression accompanied by a decrease in peripheral B-cell numbers compared with those of WT mice [24] (Supporting Information Fig. 1). Despite lower BCR expression levels, we detected equivalent levels of secreted Ig κ light chains between κ CH and WT mice [25], pointing to a possible increase in transgenic mice in the generation of antibody secreting cells (ASCs). We therefore checked the frequency of plasma cells in the spleen of unimmunized κ CH mice. As shown in Figure 1A and B, we detected a significant increase in the percentage and number of PCs in spleens of κ CH compared with those of WT mice ($0.84 \pm 0.06 \times 10^6$ mean \pm SEM versus $0.43 \pm 0.05 \times 10^6$).

PC development is dependent on the strength of the signal provided by the BCR surrogate LMP2A

We chose to continue our analysis using a mouse model where BCR expression was replaced by its EBV surrogate LMP2A. The advantage of this system relies on the particular property of the viral protein to replace the BCR and sustain B-cell development and survival in the absence of any antigen recognition, revealing the sole intrinsic influence of a strong (V_H-LMP2A) or weak (D_H-LMP2A) basal BCR-like signaling in B-cell terminal differentiation. As seen in Figure 2A, barely any PCs (CD138⁺B220^{low}) were detected in V_H-LMP2A mice. In such mice and, to a lower extent, in WT mice, we excluded from the scoring CD138^{low}B220^{high} cells that were small in size and failed to secrete Ig light chains (Supporting Information Fig. 2). In contrast, a high percentage of PCs (CD138⁺B220^{low}) was observed in D_H-LMP2A mice (Fig. 2A) with fourfold higher

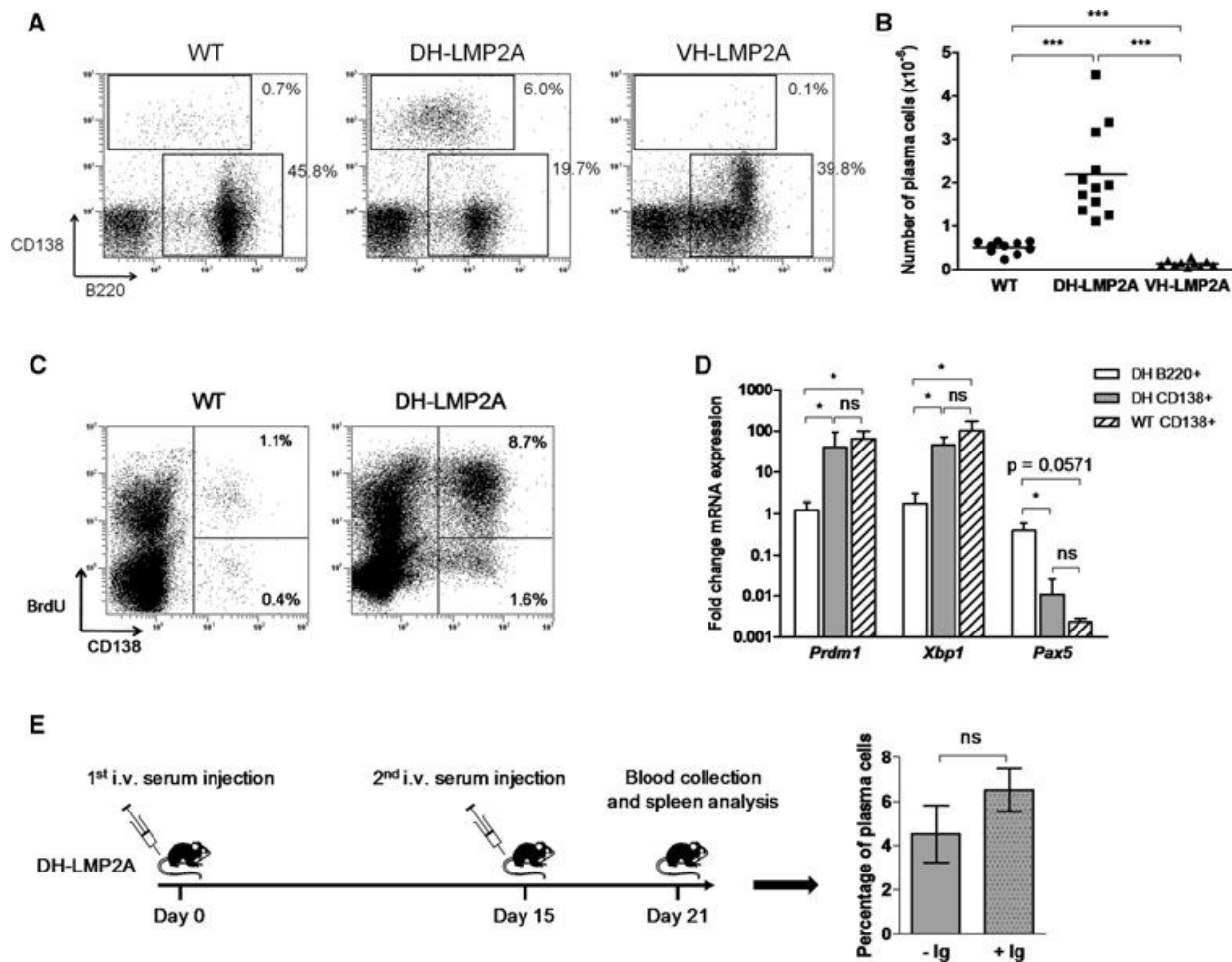


Figure 2. In vivo plasma cell development is increased in DH-LMP2A but absent in VH-LMP2A mice. (A) Flow cytometry analysis of splenocytes from LMP2A and WT mice. Data shown are representative of five independent experiments with at least two mice of each strain. (B) Absolute number of plasma cell in spleen from WT, DH-LMP2A, and VH-LMP2A mice, calculated with percentage obtained in CD138⁺ gate represented in (A). Each symbol represents an individual mouse and horizontal lines represent means, data pooled from five experiments performed. Statistical differences were evaluated using a Student's *t*-test (***p* < 0.01; ****p* < 0.001). (C) Representative flow cytometry analysis of proliferative (BrdU⁺) and nonproliferative (BrdU⁻) PCs in WT (*n* = 3) and DH-LMP2A (*n* = 5) spleen after 10 days of BrdU feeding. Results shown are from one experiment representative of two independent experiments. (D) Transcription analysis of sorted B220⁺CD138⁻ and CD138⁺ cells from WT and DH-LMP2A spleens. Fold change expression was established compared with B220⁺CD138⁻ WT spleen B cells with *Gapdh* as housekeeping gene. Data are pooled from at least three experiments in which spleens from two mice were pooled and sorted. Results are expressed in log scale as mean + SD and differences were evaluated using Mann–Whitney test (ns, nonsignificant; **p* < 0.05). (E) The effect of the presence of Ig in serum of DH-LMP2A on plasma cell development was evaluated by intravenous injection of WT mouse serum according to the protocol diagram (left). Percentage of plasma cells (CD138⁺) in spleen was evaluated by flow cytometry in DH-LMP2A mice injected with serum (+ Ig) or PBS (-Ig) (right). Results are shown as mean ± SD (*n* = 4) of percentages of plasma cells (CD138⁺). Results are pooled from two independent experiments and differences were evaluated using Mann–Whitney test (ns, nonsignificant).

numbers than in control mice (Fig. 2B and Table 1). In DH-LMP2A mice, a significant proportion of CD138⁺ cells were resting in analogy to those found in controls, confirming their PC identity (Fig. 2C). A similar increase in PC numbers was observed in mesenteric lymph nodes (Table 1) but not in the bone marrow of DH-LMP2A where numbers were significantly lower compared with those in WT mice (Table 1). Using quantitative RT-PCR, we confirmed that CD138⁺ cells in DH-LMP2A shared a similar PC gene expression profile with CD138⁺ cells from WT mice (Fig. 2D). Spontaneous PC accumulation in DH-LMP2A mice could be due to a compensatory mechanism common in lym-

phopenic mice [26, 27] dependent on the absence of soluble Ig. It was previously shown that engagement of the Fc receptor FcγRIIB by IgG on B cells limits the rate of PC and autoantibody production [28]. Therefore the absence of antibodies in DH-LMP2A mice could lead to increased PC development. To test this hypothesis, we injected DH-LMP2A mice intravenously with sera from WT mice that reconstituted IgG levels similar to those observed in WT mice (Fig. 2E and Supporting Information Fig. 3). The presence of soluble polyclonal Igs in DH-LMP2A mice during 20 days did not influence the fraction of CD138⁺ cells, supporting a B-cell intrinsic mechanism leading to exacerbated terminal differentiation

Table 1. Analysis of lymphoid organs from LMP2A mice.

	Absolute numbers of CD138 ⁺ cells × 10 ⁶		
	Spleen (n)	Bone marrow ^{a)} (n)	Mesenteric lymph nodes ^{a)} (n)
A: WT ^{b)}	0.512 ± 0.044 (10)	0.090 ± 0.016 (6)	0.021 ± 0.005 (4)
B: DH-LMP2A ^{b)}	2.191 ± 0.292 (12)	0.026 ± 0.006 (6)	0.077 ± 0.014 (4)
C: VH-LMP2A ^{b)}	0.140 ± 0.023 (10)	0.013 ± 0.003 (5)	0.008 ± 0.003 (3)
A versus B ^{c)}	<0.001	<0.01	<0.01
A versus C ^{c)}	<0.001	<0.01	ns
B versus C ^{c)}	<0.001	ns	<0.01

^{a)}Absolute number for 1 femur and 1 lymph node per mouse is shown.

^{b)}Absolute number ± SEM (× 10⁶) of plasma cells (CD138⁺) are shown.

^{c)}*p*-value is indicated. Differences were evaluated with Student's *t*-test (ns, not significant).

(Fig. 2E). Altogether, these results imply that PC development does not require Ag-driven BCR triggering and seems favored by a weak and inhibited by a strong tonic BCR signaling in vivo.

Weak BCR signaling facilitates in vitro terminal differentiation

To further confirm that the increased number of ASCs in D_H-LMP2A and κCH mice represented an intrinsic property of transgenic B cells to differentiate into PCs, we stimulated purified splenic B cells with LPS in vitro. We triggered a BCR independent pathway of PC differentiation to avoid possible differences in the responses between control and transgenic B cells due to the absence (LMP2A) or reduction (κCH) in surface Ig levels in the latter cases. LPS-induced terminal differentiation of D_H-LMP2A and κCH B cells was substantially increased compared with that in WT cells. After 72 h of LPS stimulation, respectively, 45.2 ± 2.3 (mean ± SEM)% of B cells differentiated into CD138⁺ plasmablasts (PB) in D_H-LMP2A and 34.1 ± 1.7%, in κCH, versus only 22.47 ± 1.51% in WT cultures (Fig. 3A and B). Similar results were obtained when control and transgenic B cells were stimulated with CpG or anti-CD40 + IL-4 (Fig. 3C). It was previously demonstrated that MZ B cells differentiate more rapidly and effectively than FO cells in response to LPS stimulation [29, 30]. To verify if the increased terminal differentiation was the consequence of the augmented MZ B-cell compartment present in κCH [24] and D_H-LMP2A [22] spleens, we sorted and stimulated separately MZ and FO B cells of the different strains. In addition, we sorted CD5⁺ B1 cells from WT and κCH mice only since DH-LMP2A mice do not carry this B-cell subset [22]. Importantly, a significant increase in CD138⁺ cells was observed in cultures of transgenic B cells regardless of their identity (Fig. 3D).

Strong BCR signaling inhibits terminal differentiation triggered through TLRs or T-cell help mimicry

In contrast to the results shown above, purified V_H-LMP2A B cells, displaying a stronger BCR-like signal, upon stimulation with LPS

yielded very few CD138⁺ cells after 72 h of culture, confirming the in vivo defects (Fig. 3A and B). This result was also confirmed upon triggering of transgenic B cells with anti CD40 + IL-4 or CpG (Fig. 3C). Continuous high LMP2A expression could exert a toxic effect in activated V_H-LMP2A B cells, thereby preventing terminal differentiation. Annexin-V staining was carried out in resting cells and at 48 and 72 h of LPS stimulation. We observed no significant differences between D_H- and V_H-LMP2A B cells, neither before nor after LPS stimulation (Fig. 3E). We also observed no difference in the proliferation between B cells purified from the two LMP2A strains in response to LPS stimulation (Supporting Information Fig. 4). These results argue against a toxicity effect linked to high LMP2A levels during terminal differentiation. Finally, as the BCR-like signal provided by LMP2A in V_H-LMP2A B cells is strong and constant [22], we tried to mimic this condition in WT and κCH B cells, cross-linking the BCR in combination with LPS stimulation. As previously described [13–15], this condition yielded a nearly complete inhibition of PB formation (Fig. 3A and B) comparable to that observed in LPS stimulated V_H-LMP2A B cells, confirming the negative influence exerted by a strong and sustained BCR signal on PC differentiation.

PC differentiation is directly linked to the strength of tonic BCR signaling

We speculated that a strong sustained BCR-like signal, and consequently a high level of Syk activation [22] blocked terminal differentiation of V_H-LMP2A B cells. We therefore tried to inhibit Syk phosphorylation during LPS stimulation of V_H-LMP2A B cells using the specific inhibitor Bay 61–3606 [31]. A significant increase in CD138⁺ cells was observed in V_H-LMP2A B-cell cultures after 72 h of LPS stimulation in the presence of the Syk inhibitor (Fig. 4A). In contrast, the inhibitor had no effect on WT B cells.

We then took advantage of the LMP2A knock-in design to allow Cre-dependent replacement of the V_H promoter with its weaker DQ52 counterpart (Fig. 4B). To perform the promoter switch, we crossed V_H-LMP2A mice with Ppm1a-CreERT2 mice to induce Cre recombination by tamoxifen treatment [32]. We stimulated

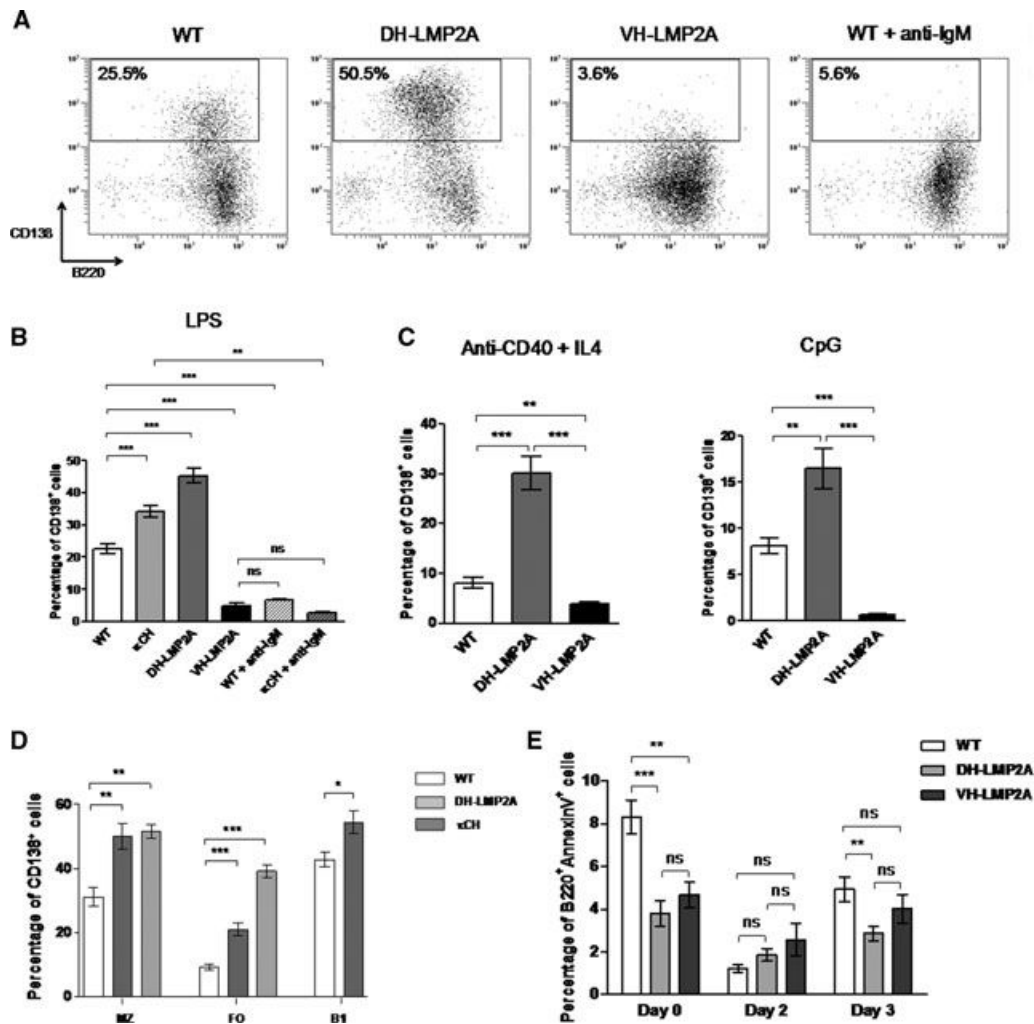


Figure 3. BCR signal strength regulates in vitro plasma cell development of B cells. (A) Flow cytometry analysis of spleen B cells after 72 h of in vitro LPS stimulation. Data shown are representative of at least five independent experiments with at least two mice of each strain. (B) The percentage of CD138⁺ cells after 3 days stimulation with LPS or LPS + anti-IgM for WT and κCH mice is shown as mean ± SEM of at least ten samples pooled from five independent experiments. (C) Likewise, the percentage of CD138⁺ cells was evaluated after 3 days stimulation with anti-CD40 + IL-4 (left) or CpG (right), and shown as mean ± SEM. (B, C) Statistical differences were evaluated using a Student's t-test (ns, nonsignificant; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). (D) Sorted MZ and FO spleen cells from WT, κCH, and DH-LMP2A mice and B1 spleen cells from WT and κCH mice were analyzed for the percentage of CD138⁺ cells after 3 days of stimulation with LPS. Results are pooled from three independent experiments with two mice of each strain. Data are shown as mean ± SD and differences were evaluated using Mann-Whitney test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01). (E) Percentage of apoptotic B220⁺ cells was measured by Annexin V staining at different time points: before stimulation (Day 0), after LPS stimulation for 48 h (Day 2) and 72 h (Day 3). Analysis of LPS stimulations was carried out on activated B-cell gate. Results are pooled from four independent experiments with at least two mice of each strain and shown as mean ± SEM. Statistical differences were evaluated using Student's t-test (ns, nonsignificant; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

primary V_H-LMP2A B cells with LPS in the presence or absence of 10 μM 4-OHT and checked PB development after 72 h. As observed in Figure 4C, PBs were readily detected in stimulations carried out in the presence of 4-OHT, reaching a similar frequency to that observed in D_H-LMP2A cultures, while no PBs were observed in V_H-LMP2A cultured in the absence of the hormone. This result indicates that the impaired PC differentiation seen in V_H-LMP2A mice does not depend on the particular B-1 like phenotype of the PC progenitor [22], but rather the signal strength of the BCR surrogate.

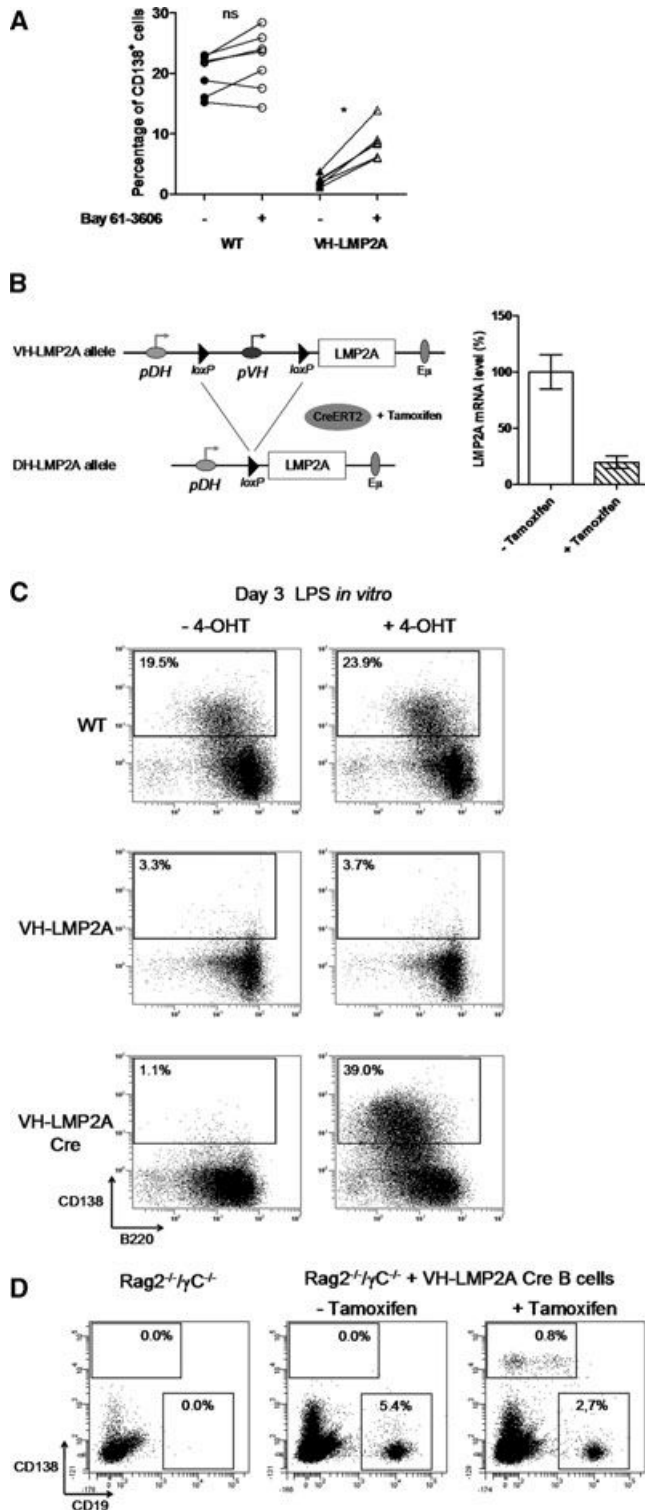
Finally, to confirm the in vitro results, we adoptively transferred magnetically purified B cells from V_H-LMP2A-CreERT2

animals into Rag2^{-/-}/γC^{-/-} mice. After 20 days and repeated tamoxifen injections, mice were sacrificed and spleen cells were analyzed. We readily observed CD19⁺ B cells in all reconstituted mice. However, only animals injected with tamoxifen exhibited a substantial population of PCs (Fig. 4D). Using a similar tamoxifen treatment, we also showed directly in V_H-LMP2A-CreERT2 mice that the appearance of PCs precedes a potential loss of CD5⁺ cells, so that terminal differentiation is not the consequence of a shift from B-1 to B-2 cells (Supporting Information Fig. 5). Altogether, these results confirm the negative role of a strong tonic BCR signal on PC differentiation in vivo.

Discussion

In vitro stimulations studies carried out on primary B cells have allowed the identification of several signals inducing the shift of transcriptional programs required for terminal differentiation of B lymphocytes into plasma cells. Regardless of the type of stimu-

lation, concomitant BCR cross-linking strongly inhibited terminal differentiation that is in contradiction with the Ag-induced terminal differentiation model [7, 8]. In the present study, we provide new insights supporting an inhibitory role provided by the BCR on terminal differentiation in vivo. V_H -LMP2A mice, with high expression in B cells of the BCR surrogate LMP2A showed a striking defect in PC generation both in vivo and in vitro. Consistent with these data, when BCR signaling was reduced using a Syk inhibitor, we readily detected CD138⁺ cells. As V_H -LMP2A B cells consist mainly of CD5⁺ B-1 cells, it could be postulated that the failure to give rise to PCs relates to this specific subset. However, this hypothesis seems unlikely since conventional B-1 cells can efficiently differentiate into CD138⁺ cells in response to stimulation with different mitogens [30, 33]. In support of this, we succeeded to drive terminal differentiation of V_H -LMP2A B cells upon acute reduction of LMP2A signaling strength by replacing in vitro and in vivo the strong V_H promoter with its weaker DQ52 counterpart, with no apparent change in the B-1 subset. These findings raise the question of how conventional B-1 cells, displaying a high basal BCR signal in vivo [34] can differentiate into PCs. Accumulating evidence indicates that B-1 cell development and maintenance depends on (self) antigen recognition through the BCR [3]. Consequently, it cannot be excluded that continuous self-antigen recognition limits terminal differentiation of B-1 B cells in vivo as observed in V_H -LMP2A mice. Consistent with this hypothesis, Wong et al. [35] showed that peritoneal B-1 B cells have signaling properties similar to tolerant cells. Furthermore, Yang et al. [36] failed to identify B-1 derived PCs in the peritoneal cavity, even after injection with LPS. Instead, authors showed that terminal differentiation of these cells occurred upon their migration to the spleen. We can speculate that during migration or more likely within the splenic environment, self-antigen recognition by



◀ **Figure 4.** PC differentiation is directly linked to BCR signaling level. (A) Percentage of CD138⁺ cells after 72 h of LPS stimulation of WT and VH-LMP2A spleen cells without (-) or with (+) Syk inhibitor Bay 61-3606 in the culture medium (middle). Connected dots correspond to the percentage of CD138⁺ cells obtained from an individual mouse with or without treatment. Results are pooled from three independent experiments with at least two mice of each strain and differences were evaluated using a paired t-test (ns, nonsignificant; **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). (B) Crossing VH-LMP2A with CreERT2 strain, allowing the deletion of the floxed VH promoter by tamoxifen induction of Cre recombinase activity (left). Verification of the decreased expression of LMP2A transcripts in VH-LMP2A-CreERT2 B cells after 10 days of in vivo tamoxifen treatment, as analyzed by real-time PCR (right). Results are pooled from purified spleen B cells of two mice in each condition. (C) Effect of the replacement of VH promoter by DH promoter was evaluated after stimulation by LPS of B cells from VH-LMP2A-CreERT2 mice with (+ 4-OHT), or without (- 4-OHT) for control, 4-hydroxytamoxifen. WT and VH-LMP2A B cells were cultured in the same conditions to check any possible direct effects of the 4-OHT. Data shown are representative of three independent experiments with at least two mice of each strain. (D) Effect of replacement of VH promoter by DH promoter on PC differentiation was evaluated in vivo by reimplanting B cells from VH-LMP2A-CreERT2 mice in Rag2^{-/-}/γC^{-/-} recipients. Animals were then treated for 20 days with Tamoxifen and spleens were analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of three independent experiments with two mice of each strain.

B-1 B cells becomes limiting thus allowing their differentiation into PCs.

In striking contrast, D_H -LMP2A mice showed a significant increase in PC differentiation. In this model, low LMP2A expression in B cells resulted in a very low tonic BCR-like signaling, confirmed by the lower Syk phosphorylation levels when compared with resting conventional B2 cells [22]. The propensity of D_H -LMP2A B cells to spontaneously differentiate into PCs appears an intrinsic feature of these cells, as it was confirmed in vitro under different stimulation conditions. Notably, the increased differentiation potential of D_H -LMP2A B cells was not due to their identity as both the FO and MZ subset showed similar enhanced responses compared with those of control counterparts. We confirmed the positive effect of weak BCR signaling on PC differentiation in a more conventional BCR transgenic system in which surface expression of the BCR was suboptimal (κ CH mice). We also showed in this model that spleen B1 cells also exhibit a higher propensity to undergo terminal differentiation compared with WT cells. This result provides another argument showing that the enhanced PC differentiation relates to the low BCR signal strength and does not merely originate from a biased proportion of the various B-cell subsets. Although we cannot exclude this hypothesis, it is unlikely that enhanced terminal differentiation observed in D_H -LMP2A mice results from a qualitatively different signal delivered by LMP2A compared with a normal BCR. The striking similarity between LMP2A and BCR signaling is supported by a serious set of recent in vivo and in vitro data [23, 37–40]. This similarity likely reflects the selection by the Epstein Barr Virus of receptors able to exploit the major survival pathway active in B cells to guarantee life-long latency to the virus [41]. However, a potential concern with LMP2A models should be the abnormal regulation of the BCR surrogate signal by co-receptors like CD19, CD22, or CD45. It is indeed difficult to reconcile the study of the influence of a fixed BCR signal strength without excluding specific events that occur during antigenic stimulation. In this regard, it should be interesting to check the influence of these coreceptors on PC differentiation in LMP2A mice using different mutant models [42, 43]. In the current study, the enhanced PC differentiation observed in κ CH mice, harboring a conventional BCR, further shows that, even in a situation of normal regulation by coreceptors, low BCR signaling favors terminal differentiation.

PCs in D_H -LMP2A displayed all the features of CD138⁺ ASCs generated in the absence of GCs and consequently of T-cell help, thus possibly accounting for their absence in the bone marrow [9, 44]. These results were confirmed with adoptive cell transfer experiments in $Rag2^{-/-}/\gamma C^{-/-}$ mice in which purified B cells from V_H -LMP2A mice gave rise to a substantial number of PCs following inducible lowering of the BCR-surrogate signal. It is therefore likely that the spontaneous terminal differentiation of LMP2A⁺ B cells is driven by innate stimuli [45].

Altogether, we propose a model in which weak BCR signaling is a prerequisite for antigen independent PC differentiation. This model excludes neither a role for antigen-dependent BCR triggering necessary for the expansion of specific B cells during an immune response nor a direct role of the BCR in terminal differ-

entiation in the context of the tightly regulated environment of GCs. However, our findings that terminal differentiation outside of the GCs requires weak BCR signaling precludes a direct role for BCR activation in the initiation of PC development and raise the possibility that, in this context, PC differentiation may ultimately proceed through signaling emanating from other surface receptors likely belonging to the innate immune system. Hence, a strong BCR signaling could prevent the TLR-induced activation of possible autoreactive B cells in the absence of T-cell help, only allowing non dangerous B-cell clones to differentiate into PCs [14, 15] to produce the pool of no or low self-reactive natural antibodies. Our results reconcile in vivo PC differentiation with in vitro observations in which continuous BCR triggering inhibits terminal differentiation. Finally, the present study provides new insights on the role of LMP2A in EBV biology. Besides supporting the survival of latently infected B cells, LMP2A could control lytic viral reactivation triggered in response to terminal differentiation [46–48].

Materials and methods

Mice and serum injections

V_H -LMP2A mice were kindly provided by S. Casola (IFOM, the FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation, Milano, Italy) and bred with C57BL/6 CMV-CRE mice from the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France) to obtain D_H -LMP2A mice. C57BL/6 mice were obtained from Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) and used to backcross V_H -LMP2A mice to obtain a similar mixed genetic background to D_H -LMP2A mice. κ CH mice were previously obtained and described in our laboratory [24]. V_H -LMP2A-CreERT2 animals were generated by crossing V_H -LMP2A mice to Ppm1a-CreERT2 mice, kindly provided by the Mouse Clinical Institute. $Rag2^{-/-}/\gamma C^{-/-}$ mice [49] were kindly provided by James Di Santo (Pasteur Institute, Paris, France). LMP2A and κ CH mice were all analyzed in a homozygous state. Animals were maintained in pathogen-free conditions and analyzed at 8–12 weeks of age. All protocols used were approved by our institutional review board for animal experimentation. The effect of serum polyclonal Ig on PC development was monitored following two intravenous (i.v.) 1 mL injections of total serum from WT mice (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), containing more than 5 g/L total IgG or PBS for controls at days 0 and 15. At day 21, mice were sacrificed for analysis and the presence of serum Ig was determined by ELISA.

ELISA assays

Total IgG in sera from LMP2A and WT mice was quantified by ELISA as previously described [25]. Briefly, 96 multiwell plates (Maxisorb, Nunc, Denmark) were coated overnight with 1 μ g/mL unlabeled goat anti-mouse total IgG (Southern Biotechnology,

Birmingham, AL) in NaHCO₃ buffer. Plates were then blocked with PBS containing 3% BSA for 30 min and diluted serum samples or standard IgG were incubated for 2 h at 37°C. Bound total IgG was revealed with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotechnology) incubated for 1 h 30 at 37°C, followed by the addition of *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich). Plates were read at 405 nm with a Xenius[®] spectrophotometer (Safas, Monaco).

Flow cytometry and cell sorting

Antibodies and reagents used for staining and cell sorting experiments are detailed in Supporting Information Table 1. Flow cytometry analyses were done on a BD Pharmingen LSRFortessa[®] cytometer. Cell sorting experiments were done on a BD Pharmingen FACSVantage[®] cell analyzer. MZ, FO, and B1 cells were sorted by gating the B220⁺/CD23^{low}/CD21^{high}, B220⁺/CD23^{high}/CD21^{int}, and CD19^{high}/CD5⁺ cells, respectively. Data were analyzed with BD FACSDiva software (BD Biosciences) or WinMDI software (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

In vivo proliferation assay

Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 2 mg BrdU (Sigma-Aldrich) and then fed with 0.8 mg/mL BrdU in drinking water during 10 days before analysis. Cells were then stained with indicated antibodies and prepared according to the BrdU Flow kit (BD Pharmingen) protocol.

Real-time PCR analysis

Total RNA from sorted cells was extracted with TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was treated with DNaseI (Invitrogen) and 1 µg was used for cDNA synthesis with Applied Biosystems Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Relative quantification was done using TaqMan[®] probes for *Prdm1* (Mm00476128.m1), *Xbp1* (Mm00457359.m1), *Pax5a* (Mm00435494.m1), and a Sybr green[®] assay for LMP2A transcripts using the following primers: LMP2AforQ: 5'-TGGGGCAGTGGAAATAGAAC-3' and LMP2ArevQ: 5'-GCCAATGAGGAAAATCAGGA-3'. All experiments were done in an ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System using *Gapdh* (Mm9999915.g1) as a housekeeper reference gene. Transcript fold change expressions were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula.

Spleen cell cultures and signaling inhibition assays

B cells from spleens were magnetically purified by depleting non-B cells with CD43 microbeads from WT and DH-LMP2A mice or

with the Pan-B Cell Isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) from V_H-LMP2A using manufacturer's instructions. B-cell purity was more than 80% and WT and DH-LMP2A fractions were devoid of CD138⁺ cells (Supporting information Fig. 6). B cells were cultured at a density of 5×10^5 cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) either with 50 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich) alone or together with 10 µg/mL anti-IgM (Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor, ME). Some experiments were also carried out using 10 µg/mL LPS with no significant difference. Other stimulation protocols included IL-4 (20 ng/mL PeproTech, Rocky Hill, NJ) plus anti-CD40 mAb (5 µg/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN) or CpG (2 µg/mL, ODN1826, Invivogen, San Diego, CA). In vitro inhibition of Syk was done for 3 days in LPS-stimulation medium containing 1 µM Bay 61–3606 (Sigma-Aldrich). Controls were carried out in the presence of the dilution buffer.

Deletion of the V_H promoter and cell transfer

B cells from V_H-LMP2A-CreERT2 mice were treated in vitro with 10 µM 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) to give rise to D_H-LMP2A B cells (Sigma-Aldrich). As control, V_H-LMP2A B cells were incubated with carrier, during the 72 h of LPS-stimulation. For in vivo deletion, 1.5 mg tamoxifen (Sigma-Aldrich), diluted in 10% ice-cold ethanol and 90% sterile sunflower oil, was injected i.p. every 4 days in V_H-LMP2A-CreERT2 mice or in adoptively transferred Rag2^{-/-}/γC^{-/-} mice. Mice injected with dilution buffer alone were used as controls. For cell transfers, sterile suspensions of 5×10^6 magnetically purified B cells from V_H-LMP2A-CreERT2 spleens were injected in the tail vein of Rag2^{-/-}/γC^{-/-} mice and animals were sacrificed after 20 days for analysis. Three pairs of Rag2^{-/-}/γC^{-/-} mice were injected with cells from independent V_H-LMP2A-CreERT2 mice. Each pair received tamoxifen treatment or dilution buffer alone.

ELISPOT assays

Multiscreen PVDF plates (Millipore) were coated with 1.5 µg of goat anti-κ (Beckman Coulter) in PBS overnight at 4°C. Sorted cells were plated in duplicates starting at 2×10^5 cells per well followed by fivefold serial dilutions in RPMI 1640 containing 10% FCS and incubated for 6 h at 37°C. Plates were washed with PBS containing 0.01% Tween 20 and κ-light chain was detected using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-κ (Beckman Coulter).

In vitro proliferation assays

For in vitro proliferation assays, 1×10^6 magnetically purified primary B cells were stained with CFSE (Invivogen) according to the manufacturer's protocol and cultured 48 or 72 h in the presence of LPS.

Statistical analysis

The statistical tests used to evaluate differences between variables were indicated in legends and were done using Prism GraphPad software. All *p* values less than 0.05 were considered significant.

Acknowledgments: We would like to thank the staff of the animal facility at the IFR 145 (Limoges, France), C. Carrion and C. Ouk-Martin (Cytometry Imaging and Mathematics platform), R. Amin and A. David for technical assistance and advice. We thank K. Rajewsky and S. Casola for providing LMP2A mice and for pertinent suggestions and Jeanne Moreau for the careful proof-reading of the manuscript. This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin. F.L. and A.B. are funded by French government fellowships

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Wang, H. and Clarke, S. H., Regulation of B-cell development by antibody specificity. *Curr. Opin. Immunol.* 2004. **16**: 246–250.
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N. and Rajewsky, K., Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 2004. **117**: 787–800.
- Cancro, M. P. and Kearney, J. F., B-cell positive selection: road map to the primary repertoire? *J. Immunol.* 2004. **173**: 15–19.
- Pillai, S., Cariappa, A. and Moran, S. T., Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. **23**: 161–196.
- Monroe, J. G., ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. **6**: 283–294.
- Berland, R. and Wortis, H. H., Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 2002. **20**: 253–300.
- Liu, Y. J. and Banachereau, J., Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin. Immunol.* 1997. **9**: 235–240.
- McHeyzer-Williams, M. G. and Ahmed, R., B-cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr. Opin. Immunol.* 1999. **11**: 172–179.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G. C., Dörner, T. and Hiepe, F., Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. **6**: 741–750.
- Oracki, S. A., Walker, J. A., Hibbs, M. L., Corcoran, L. M. and Tarlinton, D. M., Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* 2010. **237**: 140–159.
- Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G., Randall, K. L., Mackay, F. and Brink, R., Control systems and decision making for antibody production. *Nat. Immunol.* 2010. **11**: 681–688.
- Grandien, A., Modigliani, Y., Coutinho, A. and Andersson, J., Suppression of B-cell differentiation by ligation of membrane-bound IgM. *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 1561–1565.
- Knödel, M., Kuss, A. W., Berberich, I. and Schimpl, A., Blimp-1 overexpression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B-cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur. J. Immunol.* 2001. **31**: 1972–1980.
- Rui, L., Vinuesa, C. G., Blasioli, J. and Goodnow, C. C., Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B-cell antigen receptor ERK signaling. *Nat. Immunol.* 2003. **4**: 594–600.
- Rui, L., Healy, J. I., Blasioli, J. and Goodnow, C. C., ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B-cell receptor and T-cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation. *J. Immunol.* 2006. **177**: 5337–5346.
- Caven, T. H., Sturgill, J. L. and Conrad, D. H., BCR ligation antagonizes the IL-21 enhancement of anti-CD40/IL-4 plasma cell differentiation and IgE production found in low density human B-cell cultures. *Cell. Immunol.* 2007. **247**: 49–58.
- Randall, T. D., Heath, A. W., Santos-Argumedo, L., Howard, M. C., Weissman, I. L. and Lund, F. E., Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 1998. **8**: 733–742.
- Satpathy, S., Shenoy, G. N., Kaw, S., Vaidya, T., Bal, V., Rath, S. and George, A., Inhibition of terminal differentiation of B cells mediated by CD27 and CD40 involves signaling through JNK. *J. Immunol.* 2010. **185**: 6499–6507.
- Paus, D., Phan, T. G., Chan, T. D., Gardam, S., Basten, A. and Brink, R., Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B-cell differentiation. *J. Exp. Med.* 2006. **203**: 1081–1091.
- Phan, T. G., Paus, D., Chan, T. D., Turner, M. L., Nutt, S. L., Basten, A. and Brink, R., High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* 2006. **203**: 2419–2424.
- Tsubata, T., Molecular mechanisms for apoptosis induced by signaling through the B-cell antigen receptor. *Int. Rev. Immunol.* 2001. **20**: 791–803.
- Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C. et al., B-cell receptor signal strength determines B-cell fate. *Nat. Immunol.* 2004. **5**: 317–327.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J. and Longnecker, R., Epstein-Barr virus LMP2A drives B-cell development and survival in the absence of normal B-cell receptor signals. *Immunity* 1998. **9**: 405–411.
- Sirac, C., Carrion, C., Duchez, S., Comte, I. and Cogné, M., Light chain inclusion permits terminal B-cell differentiation and does not necessarily result in autoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006. **103**: 7747–7752.
- Sirac, C., Bridoux, F., Carrion, C., Devuyt, O., Fernandez, B., Goujon, J.-M., El Hamel, C. et al., Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi syndrome. *Blood* 2006. **108**: 536–543.
- Agénès, F. and Freitas, A. A., Transfer of small resting B cells into immunodeficient hosts results in the selection of a self-renewing activated B-cell population. *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 319–330.
- Walter, J. E., Rucci, F., Patrizi, L., Recher, M., Regenass, S., Paganini, T., Keszei, M. et al., Expansion of immunoglobulin-secreting cells and defects in B-cell tolerance in Rag-dependent immunodeficiency. *J. Exp. Med.* 2010. **207**: 1541–1554.
- Jiang, Y., Hirose, S., Sanokawa-Akakura, R., Abe, M., Mi, X., Li, N., Miura, Y. et al., Genetically determined aberrant down-regulation of FcγRIIB1 in germinal center B cells associated with hyper-IgG and IgG autoantibodies in murine systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 1999. **11**: 1685–1691.

- 29 Oliver, A. M., Martin, F. and Kearney, J. F., IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol.* 1999. **162**: 7198–7207.
- 30 Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C. and Defrance, T., TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B-cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.* 2007. **178**: 7779–7786.
- 31 Yamamoto, N., Takeshita, K., Shichijo, M., Kokubo, T., Sato, M., Nakashima, K., Ishimori, M. et al., The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. **306**: 1174–1181.
- 32 Imai, T., Jiang, M., Chambon, P. and Metzger, D., Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001. **98**: 224–228.
- 33 Fairfax, K. A., Corcoran, L. M., Pridans, C., Huntington, N. D., Kallies, A., Nutt, S. L. and Tarlinton, D. M., Different kinetics of blimp-1 induction in B-cell subsets revealed by reporter gene. *J. Immunol.* 2007. **178**: 4104–4111.
- 34 Pillai, S., Cariappa, A. and Moran, S. T., Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol. Rev.* 2004. **197**: 206–218.
- 35 Wong, S.-C., Chew, W.-K., Tan, J. E.-L., Melendez, A. J., Francis, F. and Lam, K.-P., Peritoneal CD5⁺ B-1 cells have signaling properties similar to tolerant B cells. *J. Biol. Chem.* 2002. **277**: 30707–30715.
- 36 Yang, Y., Tung, J. W., Ghosn, E. E. B., Herzenberg, L. A. and Herzenberg, L. A., Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007. **104**: 4542–4546.
- 37 Merchant, M., Caldwell, R. G. and Longnecker, R., The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J. Virol.* 2000. **74**: 9115–9124.
- 38 Portis, T., Cooper, L., Dennis, P. and Longnecker, R., The LMP2A signalosome—a therapeutic target for Epstein-Barr virus latency and associated disease. *Front. Biosci.* 2002. **7**: d414–d426.
- 39 Portis, T. and Longnecker, R., Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* 2004. **23**: 8619–8628.
- 40 Engels, N., Yigit, G., Emmerich, C. H., Czesnik, D., Schild, D. and Wienands, J., Epstein-Barr virus LMP2A signaling in statu nascendi mimics a B-cell antigen receptor-like activation signal. *Cell Commun. Signal.* 2012. **10**: 9.
- 41 Merchant, M., Swart, R., Katzman, R. B., Ikeda, M., Ikeda, A., Longnecker, R., Dykstra, M. L. et al., The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B-cell function. *Int. Rev. Immunol.* 2001. **20**: 805–835.
- 42 Hermiston, M. L., Xu, Z. and Weiss, A., CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003. **21**: 107–137.
- 43 Poe, J. C., Hasegawa, M. and Tedder, T. F., CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction. *Int. Rev. Immunol.* 2001. **20**: 739–762.
- 44 Tarlinton, D., Radbruch, A., Hiepe, F. and Dörner, T., Plasma cell differentiation and survival. *Curr. Opin. Immunol.* 2008. **20**: 162–169.
- 45 Bernasconi, N. L., Traggiai, E. and Lanzavecchia, A., Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002. **298**: 2199–2202.
- 46 Thorley-Lawson, D. A., Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2001. **1**: 75–82.
- 47 Merchant, M., Swart, R., Katzman, R. B., Ikeda, M., Ikeda, A., Longnecker, R., Dykstra, M. L. et al., The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B-cell function. *Int. Rev. Immunol.* 2001. **20**: 805–835.
- 48 Laichalk, L. L. and Thorley-Lawson, D. A., Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* 2005. **79**: 1296–1307.
- 49 Goldman, J. P., Blundell, M. P., Lopes, L., Kinnon, C., Di Santo, J. P. and Thrasher, A. J., Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br. J. Haematol.* 1998. **103**: 335–342.

Abbreviations: ASC: antibody secreting cell · FO: follicular · LMP2A: latent membrane protein 2A · MZ: marginal zone · PB: plasmablast · PC: plasma cell

Full correspondence: Dr. Christophe Sirac, Université de Limoges – CNRS UMR 7276, 2 rue du Dr. Marcland, F-87025 Limoges, France
Fax: +33-555-435-897
e-mail: christophe.sirac@unilim.fr

Current address: Guillaume Chemin, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale – UMR, 5089 Toulouse, France.

Received: 11/8/2012

Revised: 11/11/2012

Accepted: 19/12/2012

Accepted article online: 26/12/2012

Annexe 2 : Disruption of Lysosomal Dynamics and Function Entails Monoclonal Light Chain Renal Fanconi Syndrome

Soumis à PNAS

Classification: Biological Sciences/Medical Sciences

Disruption of Lysosomal Dynamics and Function Entails Monoclonal Light Chain Renal Fanconi Syndrome

Alessandro Luciani^{a1}, Christophe Sirac^{b1}, Sara Terryn^c, Vincent Javauge^{b,d}, Jenny Ann Prangue^a, Sébastien Bender^b, Amélie Bonaud^b, Michel Cogné^b, Pierre Aucouturier^e, Pierre Ronco^{f,g,h}, Frank Bridoux^{b,d,2} and Olivier Devuyst^{a,c,2}

^aInstitute of Physiology, Zurich Center for Integrative Human Physiology, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland; ^bImmunology, CNRS UMR 7276, Université de Limoges, F-87025 Limoges, France; ^cDivision of Nephrology, Université catholique de Louvain, B-1200 Brussels, Belgium; ^dDepartment of Nephrology, CHU Poitiers, Centre national de référence amylose et maladies à dépôts d'immunoglobulines monoclonales, Université de Poitiers, F-86007 Poitiers, France; ^eINSERM U25, Laboratoire d'Immunologie Clinique, Hôpital Necker, 161 rue de Sevres, F-75015 Paris; ^fAP-HP, Hôpital Tenon, Department of Nephrology and Dialysis, F-75020, Paris, France; ^gSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France; ^hINSERM U489 and Renal Division, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, F-75020 Paris, France.

¹AL and CS have contributed equally to the study.

² Corresponding authors:

Prof. Dr. med. Olivier Devuyst, Institute of Physiology, University of Zurich,
Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich; olivier.devuyst@uzh.ch, Tel.: +41 44 635 50 82

or Prof. Frank Bridoux, Department of Nephrology, CHU Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021
Poitiers, France; f.bridoux@chu-poitiers.fr, Tel. : +33 5 49 44 41 59.

ABSTRACT

Monoclonal gammopathies are frequently complicated by kidney lesions that increase the morbidity and mortality of the disease. In particular, immunoglobulin free light chains (LCs) may accumulate within epithelial cells, causing proximal tubule (PT) dysfunction and massive loss of solutes in urine (renal Fanconi syndrome, RFS). To investigate the mechanisms linking LC accumulation and PT dysfunction, we used transgenic mice overexpressing control or RFS-associated κ LCs, and primary cultures of PT cells exposed to corresponding human LCs. Transgenic mice overexpressing RFS- κ LCs showed PT dysfunction related to loss of apical transporters and receptors, and increased proliferation rates associated with lysosomal accumulation of κ LCs. These changes were observed before structural damage and renal failure. Exposure of PT cells to RFS- κ LCs resulted in κ LC accumulation within enlarged and dysfunctional lysosomes, alteration of cellular dynamics, defective proteolysis and hydrolase maturation, and impaired lysosomal acidification. These changes were specific to the RFS- κ LC variable (V) sequence as they were neither observed with control LCs nor with RFS- κ LC carrying a V domain mutation. The lysosomal alterations induced by RFS- κ LCs were also reflected by increased cell proliferation, decreased apical expression of endocytic receptors and defective endocytosis. These results reveal that specific κ LCs accumulate within lysosomes, altering their dynamics and proteolytic function due to defective acidification, causing dedifferentiation and loss of reabsorptive capacity of PT cells. The characterization of these early events, which are similar to those encountered in congenital lysosomal disorders, provides a basis for the differential LC toxicity and opens new perspectives for understanding LC-induced RFS.

Keywords: Plasma cell dyscrasia, monoclonal gammopathy, proximal tubule, receptor-mediated endocytosis

Significance Statement

The kidney is frequently involved in plasma cell dyscrasias including multiple myeloma. In this study, we deciphered the mechanisms by which monoclonal immunoglobulin free light chains induce proximal tubule dysfunction and inappropriate loss of solutes in urine (renal Fanconi syndrome). Using transgenic mouse models and proximal tubule cells in culture, we show that specific kappa light chains accumulate within lysosomes and alter their dynamics and proteolytic function. In turn, these changes cause dedifferentiation and proliferation of the cells, which lose their capacity to reabsorb ligands by apical endocytosis. The characterization of these early events, which are similar to those encountered in congenital lysosomal storage disorders, opens new perspectives to treat complications related to tubular toxicity of monoclonal gammopathies.

INTRODUCTION

Monoclonal gammopathies affect more than 3% of adults over the age of 50, with a rate of progression to malignant plasma cell disorder of ~ 1% per year (1). The kidney is the most commonly involved organ in monoclonal gammopathies, causing a range of complications that increase the morbidity and mortality of the disease (2). In normal conditions, the kidney is essential for the clearance of free light chains (LCs) produced by plasma cells (3). The polyclonal LCs are filtered by the glomerulus and, like other low-molecular-weight (LMW) proteins, reabsorbed in proximal tubule (PT) cells by receptor-mediated endocytosis. The latter involves two multiligand receptors, megalin and cubilin, and the cooperating protein amnionless (AMN), that are expressed in the apical membrane of PT cells (4). Following binding and internalization into coated vesicles, LCs are delivered to endosomes and lysosomes for degradation, so that they are virtually absent from final urine (5).

Plasma cell disorders are often characterized by an overproduction of monoclonal LCs, which can overwhelm the endocytic capacity of PT cells, leading to the presence of LCs in urine (6). The accumulation of LCs into PT cells leads to tubulo-interstitial inflammation and fibrosis via different pathways that include oxidative stress, activation of NF- κ B and release of inflammatory mediators (3, 7). In high mass myeloma, massive quantities of LCs in distal tubular segments may trigger the formation of casts made of LCs associated with uromodulin, that obstruct tubule lumen also leading to tubulo-interstitial fibrosis (6). Alternatively, monoclonal LCs may cause renal Fanconi syndrome (RFS), a general dysfunction of PT cells leading to the urinary leak of LMW proteins, phosphate, uric acid, glucose and amino acids often associated with osteomalacia and progressive renal failure. In contrast with cast nephropathy, RFS is mostly observed in patients with smoldering myeloma or isolated monoclonal gammopathy (8,9). Monoclonal gammopathy is a main cause of RFS in adults over 50 years of age (10). Proximal tubule dysfunction and RFS may also result from congenital disorders such as Dent's disease and cystinosis, with defective receptor-mediated endocytosis as a common feature (11-13).

There is a remarkable heterogeneity in the capacity of free LCs to induce renal tubular damage. Only some LCs are nephrotoxic and when they are, the pattern of tubular injuries is heterogeneous. If a broad range of LCs can induce cellular stress and inflammation when administered at high dose *in vitro* or *ex vivo* in experimental models (14-16), only limited sequence peculiarities of the variable (V) region can lead to specific development of cast

nephropathy or RFS in humans. Most LCs involved in RFS belong to the V κ 1 subgroup, derive from two germline genes (V κ 1-33 and V κ 1-39) and present mutations in the V domain conferring a resistance to proteolysis (17), leading to the formation of intracytoplasmic crystals in mice injected with the corresponding clones (18). Due to the limitations of cellular and animal models used thus far, the molecular mechanisms involved in the toxic effect of LCs and the basis of their unique specificity remain poorly understood. Previous *in vitro* studies used cell systems that were often poorly characterized in terms of differentiation (polarity, expression of key transporters) and endocytic function (19). *In vivo*, perfused tubule systems (14,15) and LC-expressing tumor grafts (18) were limited by the short-time exposure to LCs or the systemic repercussions of tumor growth, respectively. Whether the activity of the endo-lysosomal system is modified and how such changes affect tubular epithelial differentiation during the course of LC-associated RFS remain unknown.

The aim of the present study was to analyze the specific effect of monoclonal human κ LCs responsible for RFS (RFS- κ LC) or other confirmed renal manifestations, prior to the onset of renal failure. We used transgenic mice expressing similar levels of human κ LCs from a patient with RFS (κ CH mice) (20) or from a patient with biopsy-proven renal AL amyloidosis but without RFS and kidney damage (κ DE mice). We also used a well-differentiated primary PT cell culture system exposed to low doses of human κ LCs (13,21,22). We show that specific RFS- κ LCs accumulate in lysosomes within PT cells, causing marked alterations in cell dynamics and in lysosomal function. In turn, these alterations promote dedifferentiation of the cells and defective receptor-mediated endocytosis, sustaining the loss of reabsorptive capacity of the kidney tubule.

RESULTS

1. Accumulation of specific RFS-κLCs induces proximal tubule dysfunction in mouse.

We first analyzed the mechanism of κLC toxicity *in vivo*, using κCH and κDE mice. Light microscopy evidenced intracellular rhomboid crystals in κCH kidneys (Fig. 1A), with no other structural damage. The crystalline inclusions of κLCs were located within PT cell multivesicular body-like structures, containing electron dense material compatible with the late endosome/lysosome compartment (Fig. 1B-C). The intra-lysosomal inclusions of κLCs were confirmed by co-localization in CD-63 positive vesicles in PT cells of κCH kidneys (Fig. 1D; correlation coefficient: 63±2 vs. 16±3 respectively). The κLC crystalline inclusions were exclusively detected in κCH kidneys, unrelated to the amount of free κLCs in the urine (Fig. S1A).

To confirm that the lysosomal accumulation of κLCs induces PT dysfunction and RFS, we performed metabolic cage studies in age- and gender-matched wild-type (WT) vs. κDE and κCH mice (Table 1; Fig. S1B). Compared to WT and κDE, κCH mice showed classical features of RFS including polyuria, glycosuria, phosphaturia, and LMW proteinuria including megalin (Clara cell protein, CC16; vitamin D-binding protein, DBP) and cubilin (transferrin, TF) ligands, without changes in plasma creatinine and BUN levels.

2. RFS-κLCs decrease apical receptors and transporters and increase cell proliferation.

We next investigated the mechanisms accounting for PT dysfunction secondary to lysosomal accumulation of RFS-κLCs. There was a ~40-50% decrease of megalin/cubilin protein levels and NaPi-IIa in κCH kidneys vs. WT littermates, whereas other PT cell components such as the water channel AQP1, the endocytic catalyst Rab5a, the endosomal chloride-proton exchanger (ClC-5) and the brush border component CD13 (amino-peptidase N) were unaffected (Fig. 2A-B; Fig. S2A). None of these changes was observed in κDE kidneys (Fig. S2B). The cell-specific effect of κLCs was demonstrated by a decreased apical expression of megalin restricted to κLC-accumulating PT cells of κCH kidneys, and preserved expression in faintly κLC-positive PT cells in κDE kidneys (Fig. 2C). The decreased expression of endocytic receptors in κCH kidneys was unrelated to decreased mRNA levels (Fig. 2D), suggesting a role for defective endomembrane trafficking as observed in Dent's disease (12). By analogy with congenital PT disorders, we reasoned that the defective expression of apical receptors and transporters in κCH kidneys could reflect a loss of differentiation (13,23).

Indeed, κ CH kidneys showed a marked increase in the expression of proliferative markers (PCNA, Cyclin D1 and DBPA/ZONAB; [Fig. 2D](#)), associated with nuclear translocation of PCNA and ZONAB as evidenced by immunofluorescence ([Fig. 2E-F](#)) and immunoblotting ([Fig. 2G](#)) analyses. Conversely, neither the expression of PCNA/Cyclin D1 nor ZONAB nuclear translocation was consistently altered in κ DE kidneys ([Fig. S2C-D](#)).

3. RFS- κ LCs accumulate in lysosomes through improper degradation.

To gain mechanistic insights into the link between RFS- κ LCs accumulation and PT dysfunction, we used differentiated cultures of PT cells (mPTCs) that deliver apical ligands either to the recycling compartment or to lysosomes for degradation (13,21). The mPTCs were exposed to purified human κ LCs associated with RFS (κ CH or κ DU), cast nephropathy (κ RO), AL amyloidosis without RFS (κ DE) or with a mutant version of κ CH (κ CHm, Ala30→Ser) ([Suppl. Table 1](#); [Fig. S3A-B](#)). The κ CHm, obtained by directed-mutagenesis of κ CH, features replacement of the hydrophobic Ala at position 30 by the polar Ser that was previously shown to prevent formation of crystals in PT cells (18). This unique mutation does not modify the isoelectric point or global structure of the V κ domain, but has a substantial effect on the predictive aggregation score ([Suppl. Table 1](#); [Fig. S3B](#)). Since RFS- κ LCs accumulation in PT cells was supposed to be associated with a peculiar resistance of V κ domain to proteolysis (24), we performed *in vitro* cathepsin-B digestion of the V κ 1 LCs. Only κ DE showed complete degradation at 3h whereas all other κ LCs displayed a 12 kDa fragment corresponding to the V domain resistant to digestion ([Fig. S3C](#)). Thus, the Ala→Ser mutation in κ CHm did not affect cathepsin-B resistance.

Exposure of mPTCs for 60 min to low concentration (25 μ g/ml) of κ LCs, followed by chase up to 24h, resulted in a rapid delivery of κ LCs to intracellular vesicles, as scored by real-time confocal microscopy ([Fig. 3A](#)). Internalization of κ LCs was blocked when cells were pre-incubated with M- β -CD, which inhibits clathrin-mediated endocytosis, or filipin, a specific inhibitor of lipid raft- or caveolae-dependent endocytosis ([Fig. S4A](#)) confirming that endocytosis dictates the intracellular trafficking of κ LCs in this system like *in vivo* (25). Once internalized, control κ LCs (κ RO, κ DE and κ CHm) showed a diffuse distribution throughout the cytoplasm, which faded over time ([Fig. 3A](#); [Fig. S4B](#)). In contrast, incubation with either κ CH ([Fig. 3A](#)) or κ DU ([Fig. S4B](#)) led to a sustained κ LC staining pattern, with strong, perinuclear clustering that overlapped with CD-63 positive lysosomes ([Fig. S4B-D](#);

Fig. S5A-C), demonstrating the prolonged retention (or defective processing) of RFS- κ LCs within lysosomes. The marked increase in CD63-positive vesicles containing κ CHm and κ RO in presence of Bafilomycin-A1 (BfnA1), an inhibitor of lysosomal acidification, further confirmed that the reduction of signal over time was caused by lysosomal degradation (Fig. S5A-C). Taken together, these results demonstrated that RFS- κ LCs accumulate in lysosomes through improper degradation independently of their *in vitro* resistance to proteolysis.

4. RFS- κ LCs specifically alter lysosomal dynamics.

In light of the endomembrane reorganization, we next evaluated a potential effect of κ LCs on lysosome dynamics, by monitoring the lysosome-associated membrane protein type 1 (LAMP1) which typically transits through the endolysosomal pathway. Confocal microscopy revealed that LAMP1-positive lysosomes were dispersed throughout the cytosol in mPTCs exposed to κ RO, κ CHm or κ DE, whereas they aggregated in the perinuclear region in cells exposed to RFS- κ LCs (κ CH or κ DU) (Fig. 3B; Fig. S6A). The perinuclear clustering of LAMP1-positive vesicles in cells exposed to RFS- κ LCs, as well as their increase in size and reduction in number, were confirmed by automated confocal analysis (Fig. 3C-E; Fig. S6B-C). Electron microscopy (EM) studies confirmed the accumulation of abnormal, single-membrane structures engulfed by intact or partly degraded cytosolic constituents in mPTCs exposed to κ CH or κ DU compared to cells exposed to κ RO or κ CHm (Fig. 3F; Fig. S6D). This accumulation was reflected by a two-fold increase in LAMP1 protein despite unchanged mRNA levels (Fig. S6E-F).

The major effect of RFS- κ LCs on lysosomal dynamics did not result from abnormal trafficking through the endocytic system, since co-localization between the endosomal markers Rab5 and Rab7 and LAMP1 outside the clusters was unaffected in these conditions (Fig. S7A). Also, the RFS- κ LCs did not interfere with the traffic from trans-Golgi network to the endo-lysosomal compartment, as evidenced by the lack of overlap between LAMP1 clusters and the cis-Golgi marker, GM130 (Fig. S7B). Changes in LAMP1 dynamics in mPTC exposed to κ CH were not linked to alterations in Golgi structure or function because LAMP1 clusters were still visible after Golgi disruption by Nocodazole and did not co-aggregate with GM130-labelled Golgi fragments (Fig. S7B).

Taken together, these results demonstrate that RFS- κ LCs affect the protein degradation pathway by a specific accumulation and alteration of lysosome dynamics, with no impact on the endosomal and Golgi compartments.

5. Defective proteolysis and acidification in lysosomes exposed to RFS-κLCs.

To understand the mechanisms and consequences of aberrant lysosomal dynamics in PT cells exposed to RFS-κLCs, we assessed the maturation of lysosomal hydrolases such as cathepsin-B. Relative to cells exposed to κRO or κCHm, a decreased proteolytic generation of the 32 kDa, mature cathepsin-B was observed in cells exposed to κCH or κDU ([Fig. 4A](#); [Fig. S8A](#)). The lysosomal cathepsin-B activity was tested *in situ*, by incubating mPTCs with Magic Red^R, a membrane-permeable substrate that fluoresces only after cleavage in acidic environment, followed by Fluorescence Recovery After Photo-bleaching (FRAP) microscopy analysis. Whereas photobleaching of Magic Red-positive lysosomes was followed by a rapid ($\tau_{1/2}=18\text{sec}$) and substantial (70%) recovery of the initial fluorescence in cells exposed to κRO or κCHm, the fluorescence recovery was slower ($\tau_{1/2}=34\text{sec}$) and smaller (25% recovery) in cells exposed to κCH or κDU ([Fig. 4B](#); [Fig. S8B](#)).

The defective maturation of lysosomal hydrolases in mPTCs exposed to RFS-κLCs was confirmed by using Bodipy-FL-Pepstatin A, a fluorescence-tagged pepstatin A (PepA) that binds to the active site of cathepsin-D in acidic lysosomes (26). While the majority of lysosomes were co-stained with PepA-labelled cathepsin-D in cells exposed to κRO or κCHm, the number of PepA-labeled vesicles and the colocalization of active cathepsin-D with LAMP1 were substantially lower in cells exposed to κCH or κDU ([Fig. 4C](#); [Fig. S8C](#)). To account for the impaired maturation of lysosomal cathepsins and lysosomal-mediated degradation, we assessed whether lysosomal acidification may be affected ([Fig. 4D-E](#)). We first incubated mPTCs with LysoSensor DND-167 to qualitatively measure lysosomal pH (26). LysoSensor demonstrated strong fluorescence in virtually all LAMP1 vesicles of cells exposed to κRO, κCHm and κDE, whereas fewer than 20% of LAMP1 vesicles exhibited detectable fluorescence in cells exposed to κCH or κDU ([Fig. 4D](#); [Fig. S8D](#)). Measurement of lysosomal pH with quantitative ratiometric LysoSensor yellow/blue DND-160 (26) revealed an increase of lysosomal pH in cells exposed to RFS- κLCs from 4.5 ± 0.08 to 5.4 ± 0.01 , which was similar to that observed in PT cells treated with NH_4Cl ([Fig. 4E](#); [Fig. S8E](#)). These data indicate that RFS-κLCs impair lysosomal acidification, causing a defect in hydrolase maturation and thus altering the lysosomal degradative capacity.

6. Exposure to selective RFS- κ LC induces cellular proliferation, dedifferentiation and defective endocytosis.

Finally, we tested whether the lysosomal alterations induced by human κ LCs in mPTCs recapitulate the differential PT dysfunction/toxicity observed *in vivo*. In comparison to control LCs (κ RO, κ CHm), exposure to the RFS-causing κ CH induced a major cell proliferation as assessed by BrDU incorporation (Fig. 5A) and by nuclear translocation of the proliferation markers PCNA and ZONAB (Fig. 5B-D). Dedifferentiation of the cells was evidenced by a decreased apical abundance of NaPi-IIa and megalin/cubilin (Fig. 5E-F; Fig. S9A,C), a marked decrease in albumin and transferrin uptake (Fig. 5G; Fig. S9B), and an increased retention of megalin and NaPi-IIa into EEA-1-positive endosomal compartment (Fig. 5H; Fig. S9C). Of note, no noticeable changes in apoptosis markers were detected in mPTCs exposed to control or pathogenic κ LCs (Fig. S9D). These data demonstrate that the κ LCs associated with RFS induce a phenotype switch that is essentially similar to the PT changes observed *in vivo*.

DISCUSSION

The present study sheds light on the molecular mechanisms causing renal proximal tubule dysfunction associated with monoclonal κ LCs. Using transgenic mice and primary cultures, we demonstrate that specific RFS- κ LCs accumulate in lysosomes, alter their dynamics and proteolytic function, and cause dedifferentiation/proliferation changes altering the reabsorptive capacity of the cells. These changes are similar to those observed in congenital lysosomal disorders causing RFS, including nephropathic cystinosis. Transgenic mice, which recapitulate the chronic production of monoclonal LCs in patients, and primary cultures of PT cells represent powerful tools to explore the toxicity triggered by individual LCs.

Our investigations demonstrate a remarkable specificity of cellular damage induced by κ LCs. The changes in PT function observed in κ CH mice recapitulate the RFS of the corresponding patient, whereas no such changes were observed in κ DE mice expressing similar levels of κ LCs from a patient with AL amyloidosis but no RFS. Importantly, PT dysfunction was observed in absence of renal failure and structural damage. These observations were extended *in vitro*: exposure of mPTCs to low concentrations of RFS- κ LCs (κ CH, κ DU) induced marked changes in lysosomal function and cellular phenotype, not observed with control κ LCs. Interestingly, the V domain in κ DE mice is derived from the V κ 1-33 gene which is frequently associated with RFS in human (27), showing that subtle changes in the V sequences are required to induce RFS. Likewise, a single mutation in the CDR1 of the κ CH (Ala to Ser, κ CHm), precluding the intracellular crystal formation in PT cells (18) without affecting protease resistance of the V domain, strongly decreased the toxicity of the corresponding LC in mPTCs. As no crystals were detected in lysosomes of mPTCs exposed to RFS- κ LC, these results suggest that neither *in vitro* protease resistance of the V domain nor crystal formation account for the toxicity of RFS- κ LC. Conversely, subtle changes in V sequences can have tremendous consequences for renal toxicity.

Although monoclonal LC-associated PT dysfunction is a frequent cause of RFS in adults, the molecular mechanisms involved remain debated. Previous studies showed that free LCs can block metabolites transport and promote oxidative stress leading to NF- κ B activation and inflammation (3). However, characteristics of cellular and animal models cause significant limitations to investigate mechanisms of PT dysfunction in general and potential defects in the endolysosomal apparatus in particular (19). Cell systems are often immortalized, with loss of differentiation (polarity, expression of key transporters) and low levels (if any) of endogenous receptors and endocytic uptake (3,5). *In vivo*, PT cell

dysfunction was observed after injection of high quantities of LCs (1mg/mL or more) in rat or mouse (15, 28), a condition that does not reflect the chronic delivery of low doses of LCs during smoldering myeloma or MGUS, which typically underlie hematologic disorders associated with RFS (9). The use of transgenic mice models producing human monoclonal LCs and of well differentiated primary cultures of PT cells is thus particularly useful to investigate mechanisms of epithelial differentiation in response to monoclonal LCs.

We show that RFS- κ LCs alter cell dynamics and lysosome functions *in vivo* and *in vitro*. These changes are caused by accumulation of RFS-causing κ LCs in enlarged, perinuclear lysosomes. The lysosomal defect is evidenced by morphological abnormalities and defective processing/degradation of LCs likely resulting from the defective maturation and activity of cathepsin-B and -D revealed by FRAP analysis and Pepstatin-A staining, respectively. Importantly, these changes in lysosome function occur with no evidence for crystals, and in absence of apoptosis. Furthermore, RFS- κ LCs induce a defect in vesicular acidification, as monitored by LysoSensor imaging and lysosomal pH. The conjugation of impaired lysosomal dynamics, defective hydrolase maturation and altered lysosomal degradative capacity is strikingly similar to the changes observed in nephropathic cystinosis, a congenital disorder due to inactivating mutations in the lysosomal transporter cystinosin (13). Loss of cystinosin function results in the accumulation of cystine inside lysosomes, invariably causing RFS (29). Thus, lysosomal accumulation of specific κ LCs or of cystine may have the same functional consequences in PT cells.

Several mechanisms could sustain the lysosomal toxicity of RFS- κ LCs. Once reabsorbed and trafficked to lysosomes, the κ LCs may bind to and inactivate cathepsins or other proteases, or produce a form that is resistant to lysosomal hydrolysis. In turn, the prolonged retention of such κ LCs within lysosomes may further impair the processing of acid hydrolases, promoting further cargo accumulation. As suggested by our results, RFS- κ LCs also impair lysosomal acidification, which may result from an impact on V-ATPase activity, due to sequestration or defective trafficking of V-ATPase subunits, or to changes in lysosomal membrane cholesterol levels (30). Detailed temporal analysis of the lipid metabolism and pH changes could help to answer some of these questions.

Beside the lysosomal defect, RFS- κ LCs also cause alterations in receptor-mediated endocytosis, with defective expression of megalin and cubilin. These alterations, observed in cells accumulating RFS- κ LCs, account for the loss of LMW ligands in urine. In absence of

transcriptional defects, the loss of apical receptor is similar to that observed in the mouse and cellular models of Dent's disease (12). Defects in receptor-mediated endocytosis are also directly involved in nephropathic cystinosis (13) and in a constitutive KO of the $\alpha 4$ subunit of the V-ATPase, also causing lysosomal protein accumulation (31). We also show that a second apical pathway operating in PT cells is defective in LC-associated RFS: the κ CH mice show phosphaturia and decreased expression of the phosphate cotransporter NaPi-IIa. Likewise, NaPi-IIa is only decreased in cells exposed to the toxic κ CH and κ DU. Since phosphate reabsorption via NaPi-IIa is under the control of the parathyroid hormone (PTH) via its apical and basal receptors, one can hypothesize that a trafficking defect similar to that observed in *Ctns*^{-/-} and *Clcn5*^{-/-} kidneys may be involved (12,13).

In addition to defective apical transport, dedifferentiation of PT cells is typically associated with abnormal proliferation (13,23,32). Increased proliferation was consistently observed in κ CH kidneys and mPTCs exposed to RFS- κ LCs, as indicated by the PCNA and cyclin-D1 markers and BrDU incorporation. Our data suggest the involvement of the Y-box transcription factor ZONAB, which is active during nephrogenesis and PT maturation (23). When epithelial cells are confluent and express differentiated tight junctions, ZONAB is retained by the cytosolic SH3 domain of ZO-1 (33), preventing its nuclear translocation and activation of target genes, including PCNA and cyclin-D1. Upon exposure to RFS- κ CH, but not to control LCs, we observed a nuclear translocation of ZONAB associated with markers of proliferation. Could these changes reflect an adaptation to the uptake of toxic κ LCs? Proximal tubule cells exposed to high concentrations of albumin decrease the expression of megalin (34). By analogy, PT cells could thus inhibit endocytosis and accumulation of LCs in case of monoclonal gammopathies (35). A potential mechanism may involve retention inside the endolysosomal compartment, with prolonged activation of the EGF-receptor causing dedifferentiation in PT cells (36). The defective lysosomes may also impact on autophagy, causing oxidative stress and affecting redox-sensitive pathways (2,3).

In conclusion, our studies demonstrate that RFS- κ LCs induce profound alterations in cell dynamics and lysosome functions, sustaining a loss of apical transport capacity. These data provide a basis for the differential LC toxicity in the kidney tubule, before the onset of renal failure. Insights into these early events may provide new targets to alleviate the burden caused by the urinary loss of vital metabolites in monoclonal gammopathies.

Materials and Methods

Detailed methods used for mouse models; renal function parameters; histological analysis; electron microscopy and immunogold analysis; production of human κ -light chains in vitro; isolation and primary cultures of proximal tubule cells (mPTCs); quantification of light chain uptake; quantitative real-time PCR; subcellular fractionation; immunoblotting; immunofluorescence and confocal microscopy; quantification of lysosome distribution; lysosomal pH measurement; statistical analyses; as well as antibodies, reagents and primers are provided in *Supporting information*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fonds National de la Recherche Scientifique and the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (Brussels, Belgium); the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 305608 (EURenOmics); the Cystinosis Research Foundation (Irvine, CA, USA); the Swiss National Science Foundation project grant 310030-146490 ; the clinical research priority program (KFSP) Molecular Imaging Network Zurich (MINZ) of the UZH; the Conseil Régional du Limousin (France) and the French national reference center for AL amyloidosis. A.B. is funded by French government fellowships.

The authors acknowledge P. J. Courtoy, A. Kaech, C. Pierreux and C. Raggi, for discussions and/or preliminary experiments; C.A. Wagner, P.J. Verroust and R. Kozyraki for reagents; B. Fernandez and N. Quellard for electron microscopy assistance and F. Di Meo for 3D modeling. Imaging was performed with equipment maintained by the Center for Microscopy and Image Analysis, University of Zurich.

Conflict of Interest Statement: The authors state that they do not have any conflict of interest.

REFERENCES

1. Kyle RA, et al. (2006) Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 354(13):1362-1369.
2. Leung N et al. (2012) Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood* 120(22):4292-4295.
3. Sanders PW (2012). Mechanisms of light chain injury along the tubular nephron. *J Am Soc Nephrol* 23(11):1777-1781.
4. Christensen EI, Birn H, Storm T, Weyer K, Nielsen R (2012) Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)* 27(4):223-236.
5. Batuman V et al. (1998) Myeloma light chains are ligands for cubilin (gp280). *Am J Physiol* 275(2):F246-F254.
6. Hutchison CA et al. (2011) The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol* 8(1):43-51.
7. Ying WZ, Wang PX, Aaron KJ, Basnayake K, Sanders PW (2011) Immunoglobulin light chains activate nuclear factor- κ B in renal epithelial cells through a Src-dependent *Blood* 117(4):1301-1307.
8. Maldonado JE et al. (1975) Fanconi syndrome in adults. A manifestation of a latent form of myeloma. *Am J Med* 58(3):354-364.
9. Messiaen T et al. (2000) Adult Fanconi syndrome secondary to light chain gammopathy. Clinicopathologic heterogeneity and unusual features in 11 patients. *Medicine (Baltimore)* 79(3):135-154.
10. Sirac C et al. (2011) Toward understanding renal Fanconi syndrome: step by step advances through experimental models. *Contrib Nephrol* 169:247-261.
11. Avner E, Harmon W, Niaudet P, Yoshikawa N. (2009) Pediatric nephrology. In: Igarashi, T. (ed), Fanconi Syndrome. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg), pp. 1039–1067.
12. Christensen EI et al. (2003) Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(14):8472-8477.
13. Raggi C et al. (2014) Dedifferentiation and aberrations of the endolysosomal compartment characterize the early stage of nephropathic cystinosis. *Hum Mol Genet* 23(9):2266-2278.
14. Sanders PW, Herrera GA, Galla JH (1987) Human Bence Jones protein toxicity in rat proximal tubule epithelium in vivo. *Kidney Int* 32(6):851-861.
15. Sanders PW, Herrera GA, Chen A, Booker BB, Galla JH (1988) Differential nephrotoxicity of low molecular weight proteins including Bence Jones proteins in the perfused rat nephron in vivo. *J Clin Invest* 82(6):2086-2096.
16. Pote A, Zwizinski C, Simon EE, Meleg-Smith S, Batuman V (2000) Cytotoxicity of myeloma light chains in cultured human kidney proximal tubule cells. *Am J Kidney Dis* 36(4):735-744.
17. Aucouturier P et al. (1993) Monoclonal IgL chain and L chain V domain fragment crystallization in myeloma-associated Fanconi's syndrome. *J Immunol* 150(8):3561-3568.

18. Decourt C et al. (1999) Mutational analysis in murine models for myeloma-associated Fanconi's syndrome or cast myeloma nephropathy. *Blood* 94(10):3559-3566.
19. Dickson LE, Wagner MC, Sandoval RM, Molitoris BA (2014) The proximal tubule and albuminuria: really! *J Am Soc Nephrol* 25(3):443-453.
20. Sirac C et al. (2006) Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi's syndrome. *Blood* 108(2): 536-544.
21. Terryn S et al. (2007) A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(2):F476-F485.
22. Reed AA et al. (2010) CLC-5 and KIF3B interact to facilitate CLC-5 plasma membrane expression, endocytosis, and microtubular transport: relevance to pathophysiology of Dent's disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(2):F365-380.
23. Gailly P et al. (2008) A novel renal carbonic anhydrase type III plays a role in proximal tubule dysfunction. *Kidney Int* 74(1):52-61.
24. Leboulleux M et al. (1995) Protease resistance and binding of Ig light chains in myeloma-associated tubulopathies. *Kidney Int* 48(1):72-79.
25. Nath KA (2010) Receptor-mediated endocytosis is a Trojan horse in light-chain nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 21(7):1065-1066.
26. Lee JH et al. (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141(7):1146-1158.
27. Déret et al. (1999) Kappa light chain-associated Fanconi's syndrome: molecular analysis of monoclonal immunoglobulin light chains from patients with and without intracellular crystals. *Protein Eng* 12(4):363-369.
28. Khan AM et al. (2010) Myeloma light chain-induced renal injury in mice. *Nephron Exp Nephrol* 116(2):e32-41.
29. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA (2002) Cystinosis. *N Engl J Med* 347(2):111-121.
30. Cox BE, Griffin EE, Ullery JC, Jerome WG (2007) Effects of cellular cholesterol loading on macrophage foam cell lysosome acidification. *J Lipid Res* 48(5):1012-1021.
31. Hennings JC et al. (2012) A mouse model for distal renal tubular acidosis reveals a previously unrecognized role of the V-ATPase a4 subunit in the proximal tubule. *EMBO Mol Med* 4(10):1057-1071.
32. Lima WR et al. (2010) ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 21(3): 478-488.
33. Balda MS, Matter K (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1788(4):761-767.
34. Caruso-Neves C, Pinheiro AA, Cai H, Souza-Menezes J, Guggino WB (2006) PKB and megalin determine the survival or death of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(49):18810-18815.
35. Basnayake K, Ying WZ, Wang PX, Sanders PWC(2010) Immunoglobulin light chains activate tubular epithelial cells through redox signaling. *J Am Soc Nephrol* 21(7):1165-1173.

36. Hallman MA, Zhuang S, Schnellmann RG (2008) Regulation of dedifferentiation and redifferentiation in renal proximal tubular cells by the epidermal growth factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 325(2): 520–528.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Specific κ LCs accumulate in lysosomes of proximal tubule cells in mouse kidney.

(A) Semi-thin, toluidine blue-stained kidney sections, showing numerous crystalline inclusions in proximal tubule cells of κ CH mice (arrows) compared to normal appearance in κ DE mice. Scale bar, 50 μ m. (B-C) Electron microscopy revealing crystalline and osmiophilic inclusions (arrows) surrounded by a single membrane within proximal tubular cells of κ CH vs. κ DE kidneys. Scale bar, 2 μ m. (C, inset) Immunogold labeling shows strongly positive crystals labeled with anti- κ LC in κ CH kidneys. Scale bar, 0.1 μ m. (D) Confocal microscopy illustrating colocalization of κ LC-positive dots (green) with CD63-positive vesicles (red) in proximal tubular cells of κ DE and κ CH kidneys. Nuclei counterstained with DAPI (blue). G, glomerulus. Scale bar, 10 μ m.

Fig. 2. Dedifferentiation and proliferation in proximal tubule cells of κ CH kidneys.

(A) Representative immunoblots for megalin, cubilin, NaPi-IIa, ClC-5, AQP1, Rab5a and aminopeptidase (CD13) in κ CH and wild-type (WT) kidneys (20 μ g total protein per lane). (B) Immunofluorescence for NaPi-IIa in WT and κ CH kidneys. Nuclei counterstained with DAPI (blue). G, glomerulus. Scale bar, 50 μ m. (C) Double immunostaining for megalin (red) and κ LCs (green) in WT, κ DE and κ CH kidneys. The accumulation of κ LCs in some tubule profiles is reflected by a decreased immunoreactivity for megalin in κ CH kidneys. Scale bar, 50 μ m. (D) Quantitative RT-PCR to measure the mRNA expression of proximal tubule (*Lrp2*, *Cubn*, *Car2*, *Clcn5* and *Atp6v1e1*) and proliferation (*Pcna*, *Ccnd1* and *DbpA*) genes in κ CH and WT whole kidneys. The normalization factor was calculated from five different housekeeping genes. * P <0.05 vs. WT, n =6 mice per group. (E) Double immunofluorescence for PCNA (red, *left*) or ZONAB (red, *right*) and the proximal tubule marker Lotus tetragonolobus lectin (LTL, green) in WT and κ CH kidneys. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 20 μ m. (F) Quantification of LTL-positive proximal tubule cells presenting nuclear PCNA or ZONAB immunoreactivity (%). * P <0.05 κ CH vs. WT kidneys, n=100 LTL-positive cells. (G) Representative immunoblots for ZONAB and PCNA in nuclear fractions (P84 enriched, GAPDH depleted) extracted from WT and κ CH kidneys.

Fig. 3. Specific κ LCs accumulate in lysosomes and alter cell dynamics.

(A) Confocal microscopy of mPTCs exposed to low concentration (25 μ g/ml) of κ LCs for 60 min, followed by chase up to 24h, stained with an anti- κ LC antibody. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. Right panel: Quantification of cells containing κ LCs. * P <0.05 κ CH vs. κ RO, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH, n = 200 cells per group. (B) Double immunofluorescence for LAMP1 (red) and plasma membrane marker (PM, green) in mPTCs exposed to κ LCs up to 24h. Scale bar, 10 μ m. Adjacent panels show quantification of changes in vesicle size (C), number (D) and lysosome position (E). * P <0.05 κ CH vs. κ RO, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH, n = 200 cells per condition. (F) Electron microscopy of mPTCs exposed to κ LCs for 24h. Cells exposed to κ CH show accumulation of single-membrane structures containing cytosolic constituents. No crystalline inclusion was observed. Scale bar, 0.5 μ m.

Fig. 4. Defective proteolysis and acidification in lysosomes exposed to RFS- κ LCs.

(A) Representative immunoblots showing a reduced mature cathepsin-B (Mat, 32 kDa) in mPTCs exposed to the RFS-associated κ CH vs. control κ RO and κ CHm. 20 μ g of total protein loaded per lane. (B) Measure of cathepsin-B activity in mPTCs exposed to κ LCs for 24h, followed by Magic Red fluorescence recovery (FRAP) microscopy analysis. FRAP data are displayed as % recovery of pre-bleach fluorescence, representative of 10 recordings from different cells. (C) Cathepsin D activity/trafficking assessed by confocal microscopy analysis of Bodipy-FL-Pepstatin-A (PepA) staining after exposure to κ LCs. Right panel: Quantification of the Bodipy-positive dots. Scale bar, 10 μ m. * P <0.01 κ CH vs. κ RO, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH, n = 200 cells per condition. (D) Effect of exposure of mPTCs to κ LCs or NH_4Cl on LysoSensor DND167 reactivity and colocalization with LAMP1. The LAMP1-positive compartments were LysoSensor-positive in cells exposed to κ RO or κ CHm but LysoTracker-negative in cells exposed to κ CH, similar to NH_4Cl treated cells. HM, high magnification inset. Scale bar, 10 μ m. Right panel: Quantification of LysoSensor DND167/LAMP1 co-localization (correlation coefficient). * P <0.003 vs. unexposed cells or κ RO, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH, n = 200 cells per condition. (E) Lysosomal pH values were ratiometrically measured using LysoSensor yellow/blue DND-160. * P <0.005 vs. unexposed cells or κ RO, # P <0.05 κ CHm vs. κ CH, n = 150 cells per condition.

Fig. 5. RFS-κLCs selectively induce proliferation, dedifferentiation and defective endocytosis in proximal tubule cells.

Primary mPTCs were exposed to human κLCs for 24h **(A-H)** and probed. **(A)** BrdU staining and quantification. Scale bar, 20μm. * $P < 0.05$ vs. unexposed or κRO cells, # $P < 0.005$ vs. κCH, n=200 cells per condition. **(B)** Representative immunoblots for PCNA in nuclear-enriched (p84 enriched, GAPDH depleted) cell extracts. **(C-D)** Representative immunostaining for ZONAB, showing nuclear translocation in cells exposed to RFS-κCH compared to diffuse staining in cells exposed to κRO or κCHm. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10μm. **(D)**: Quantification of ZONAB-positive nuclei, * $P < 0.005$ vs. κRO, # $P < 0.005$ vs. κCH, n=200 cells per condition. **(E)** Representative immunoblots for megalin and cubilin in total cell lysates. **(F)** Confocal microscopy and X-Z side view of a z-stack showing a decreased expression of megalin (green), cubulin (red) and NaPi-IIa (magenta) at the apical plasma membrane of mPTCs exposed to κCH vs. κRO or κCHm. **(G)** Quantification of cell-associated uptake of Alexa Fluor-488(A488)-BSA and Alexa Fluor-546-(A546)-transferrin after 1h incubation at 4°C. * $P < 0.01$ vs. unexposed or κRO cells, # $P < 0.05$ vs. κCH, n = 150 cells per condition. **(H)** Double immunofluorescence staining for EEA-1(green)/megalin (red) or EEA-1(green)/NaPi-IIa (red) in mPTCs exposed to κLCs for 24h. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10μm. Dotted white squares contain high magnification (HM) images.

Table 1. Body weight, urine and blood parameters in wild-type and κ LC transgenic mice.

	Wild-type	κ CH	κ DE
Body weight (g)	27.8 \pm 0.5	26.5 \pm 0.5	27.9 \pm 1.8
U Volume (μ l/24h)	1361 \pm 92	2024 \pm 153 ^{**}	1384 \pm 176
U Albumin (μ M/mg creat/dl)	1073 \pm 143	776 \pm 266	957 \pm 395
U CC16 (μ g/g creat)	11 \pm 1.5	148 \pm 13.3 ^{***}	20 \pm 7.8
U Calcium (mg/g creat)	64 \pm 4	53 \pm 4	97 \pm 15
U Phosphate (mg/g creat)	87 \pm 7	133 \pm 7.5 ^{***}	84 \pm 16
U Glucose (mg/g)	1.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.3 [*]	1.4 \pm 0.1
U Creatinine (mg/dl)	62 \pm 4	57 \pm 6	61 \pm 9
BUN (mg/dl)	21 \pm 1.2	22 \pm 1.6	24 \pm 1.7
P Creatinine (mg/dl)	0.094 \pm 0.01	0.096 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$; there were 7 mice per group.

CC16, Clara cell protein; BUN, blood urea nitrogen; U, urine; P, plasma.

Figure 1

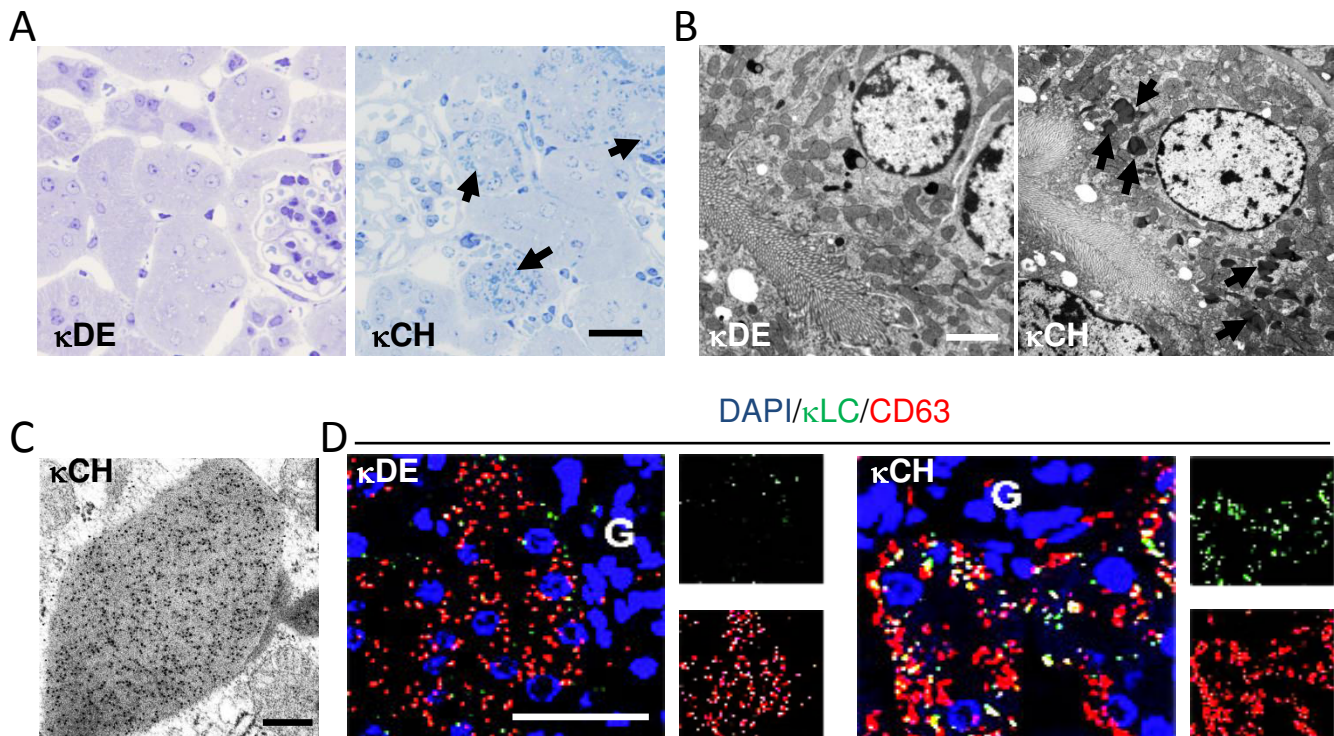


Figure 2

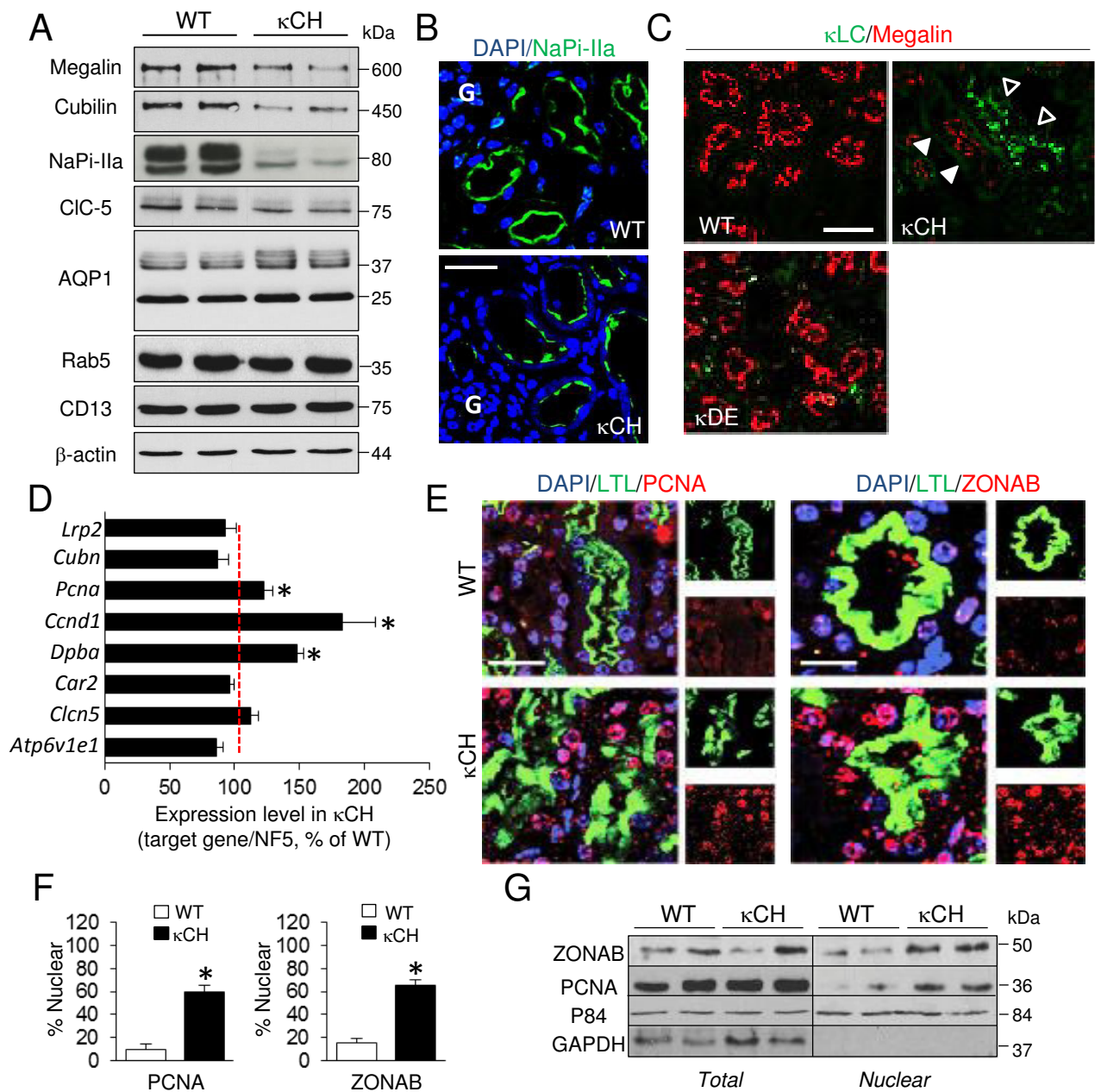


Figure 3

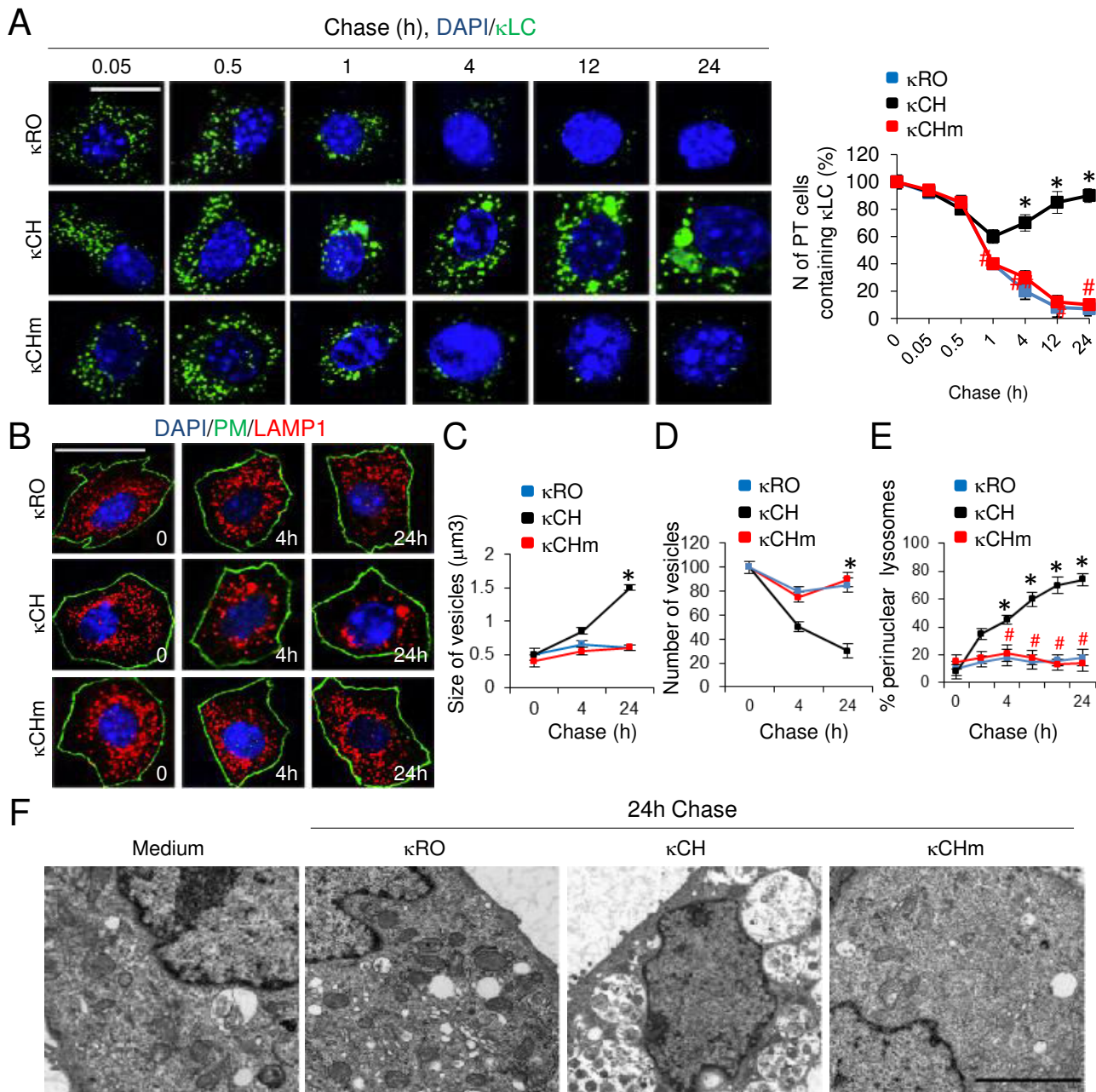


Figure 4

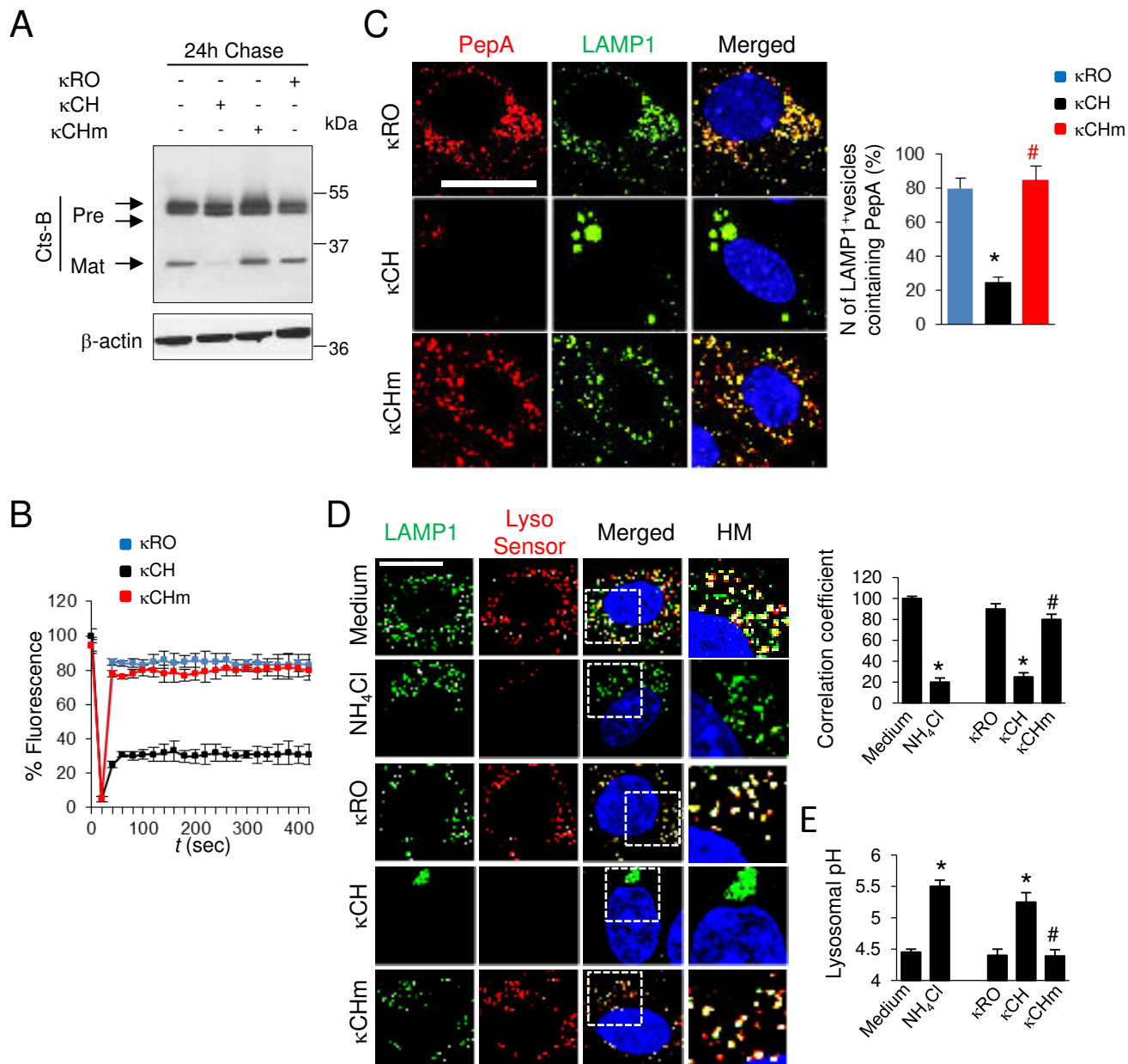
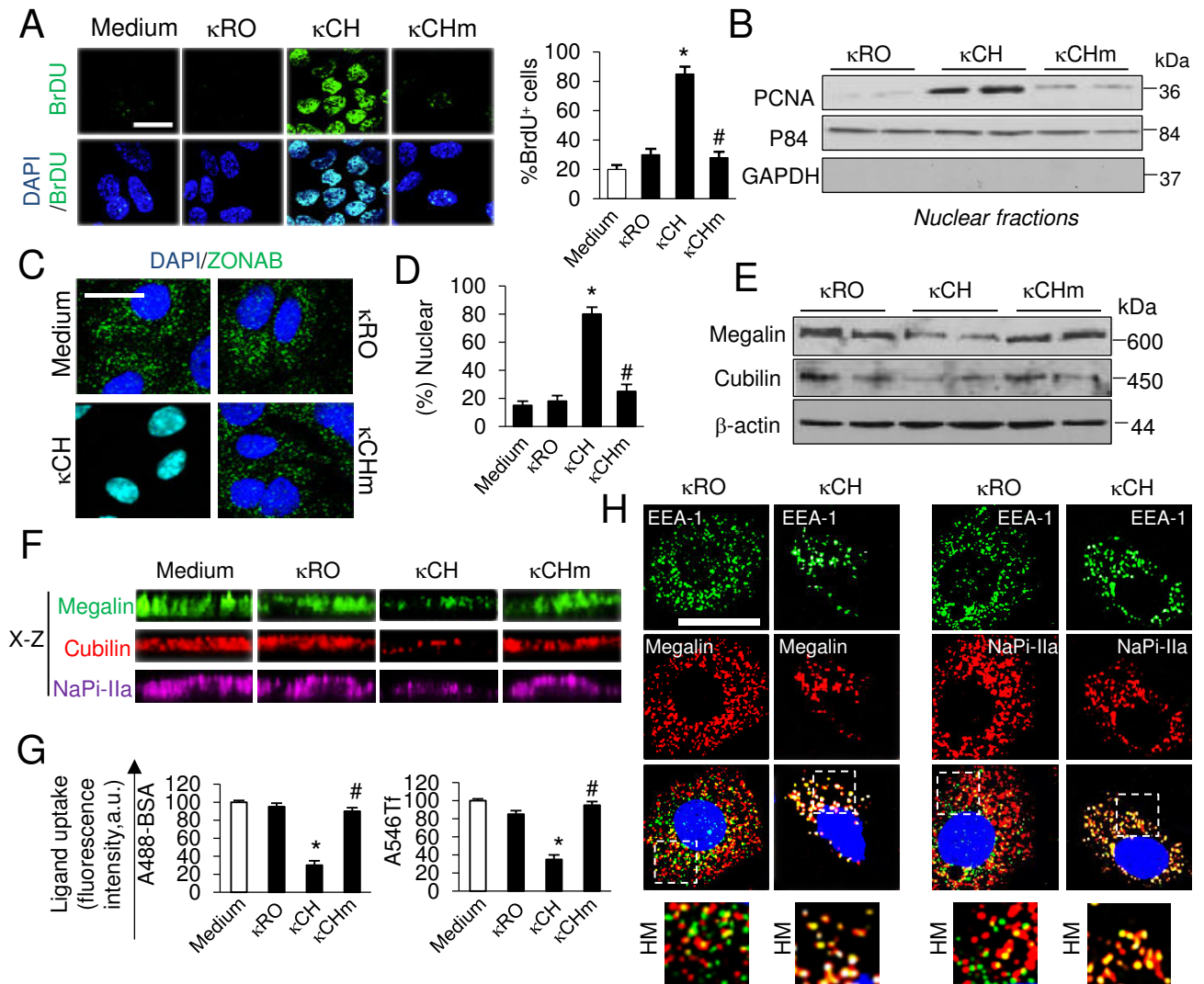


Figure 5



Supporting Information

Disruption of Lysosomal Dynamics and Function Entails Monoclonal Light Chain Renal Fanconi Syndrome

Alessandro Luciani, Christophe Sirac, Sara Terryn, Vincent Javauge, Jenny Ann Prangue, Sébastien Bender, Amélie Bonaud, Michel Cogné, Pierre Aucouturier, Pierre Ronco, Frank Bridoux and Olivier Devuyst

Detailed Material and Methods
Supplementary References
Supplementary Figure Legends
Supplementary Tables 1 and 2
Supplementary Figures S1-S9

Detailed Materials and Methods

Mouse models. Experiments were conducted on age (16-20 weeks) and gender-matched wild-type (WT), κ DE and κ CH transgenic mice generated as previously described (1). The κ DE mice were obtained using the same strategy than κ CH mice, with targeted insertion in the κ locus leading to the production of a hybrid LC formed of a human V domain associated with the murine constant κ region. The V domain is derived from the V κ 1-33 germline gene (2), and was extracted as previously described (3) from a patient diagnosed with AL amyloidosis. All experiments were conducted in mice homozygous for the targeted insertion which does not enable the production of endogenous κ LCs. The LC production in urine was measured by ELISA as previously described (1). Mice were maintained under temperature- and humidity-controlled conditions with 12-h light/12-h dark cycles with free access to appropriate standard diet (Carfil Quality, Oud-Turnhout, Belgium). The experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethics Committees of the Université catholique de Louvain, the Université de Limoges and the University of Zurich.

Renal function parameters. After appropriate training, mice were placed overnight in metabolic cages with ad libitum access to food and drinking water; urine was collected over ice and diuresis was measured. Blood was obtained by puncture of the vena cava at the time of euthanasia with ketamine/xylazine or isoflurane (4). The urine and blood parameters were measured using a SynchronCX5 analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), whereas Clara cell protein (CC16) concentration was measured in duplicate by latex immunoassay (courtesy of X. Dumont, UCL Medical School, Brussels, Belgium). Urinary LMW proteins, including vitamin D-binding protein and transferrin were measured by western blotting as described previously (4,5). The kidneys were carefully dissected and harvested. One kidney was split transversally and one half was fixed for histology or immunostaining while the other half was flash-frozen and stored at -80°C. The contralateral kidney was taken for primary cultures of proximal tubule cells or for whole kidney RNA extraction.

Histological analysis. Light microscopic examination was performed on kidney samples stained with either hematoxylin/eosin (HES), Periodic Acid Schiff, light green trichrome, silver methenamine, or toluidine blue as previously described (1,4,6). Regular procedures were performed on paraffin-embedded, 6 μ m-thick sections. For semi-thin sections, tissue was

post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in PBS (Life Technologies, Zug, Switzerland), dehydrated in serial ethanol solutions and embedded in an araldite-epon mixture. Embedded tissues were then placed at 60°C for 2 days to polymerize. Semithin, 1 µm-thick sections were prepared with an ultramicrotome and stained with toluidine blue and examined under light microscope.

Electron microscopy and immunogold analysis. For ultrastructural examination, kidney tissue and proximal tubule cell monolayers were fixed 2.5% glutaraldehyde in 125 mM cacodylate buffer and stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a JEOL 1010 transmission electron microscope (Tokyo, Japan). For immuno-electron microscopy, kidney samples were fixed with a mixture of 4% (w/v) PFA and 0.05% (v/v) glutaraldehyde in 0.2 M HEPES (pH 7.4) for 15 min at room temperature and then placed in 4% (w/v) PFA in the same buffer for 30 min at room temperature. After washing, samples were incubated with blocking buffer for 30 min at room temperature and then with the primary antibody (diluted in blocking buffer) overnight at 4°C. Next, samples were washed in PBS and incubated with a secondary antibody coupled to 1.4-nm gold particles. After extensive washing with PBS, samples were post-fixed in 1% glutaraldehyde in 0.2 M HEPES (pH=7.4) for 5 min. The gold particles were enhanced by Goldenhance-EM (NanoProbes, Yaphank, NY, USA) following the manufacturer's instructions. After washing, the samples were treated with 1% osmium tetroxide plus 1.5% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) for 2 h on ice in the dark; they were then dehydrated, embedded in Epoxy resin (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) and polymerized for at least 24 h at 62°C. Sections were analyzed at 120 kV using a Tecnai 12 electron microscope (Hillsboro, OR, USA).

Antibodies and reagents. The following antibodies were used in this study: Rat anti-κLC (Beckman Coulter, Villepinte, France); mouse anti-PCNA (Dako, Glostrup, Denmark); rabbit anti-DBP (Dako); rabbit anti-LMW proteins (Dako); rabbit anti-CC16 (BioVendor, Heidelberg, Germany); rabbit anti-transferrin (Dako); mouse anti-β-actin (Sigma, St. Louis, USA); rabbit anti-ZONAB (Invitrogen; Bethyl, Montgomery, TX, USA); rabbit anti-AQP1 (Millipore, Billerica, MA, USA); rabbit anti-CD13 (Abcam, Cambridge, UK); mouse anti-p84 (Abcam); rabbit anti-LAMP1 (Abcam); rabbit anti-LAMP2 (Abcam); goat anti-cathepsin-B (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA); goat anti-cathepsin-D (Santa Cruz Biotechnology); rabbit anti-Rab5 (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands); rabbit anti-Rab7 (Santa Cruz Biotechnology); mouse anti-GM130 (Abcam); and rabbit anti-

EEA-1(Cell Signaling). Sheep anti-megalin and rabbit anti-cubilin antibodies were kindly provided by Dr. P. Verroust and Dr. R. Kozyraki (INSERM, Paris, France).

Compounds included bafilomycin-A1 (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland); ammonium chloride (NH₄Cl, Sigma); valinomycin (Life Technologies); methyl- β -cyclo-dextrin (Sigma); filipin (Sigma); and nocodazole (Enzo Life Sciences).

Characteristics, production, purification and digestion of human κ LCs. Human LC genes were isolated and transfected in the hybridoma cell line SP2/0 as previously described (6). The characteristics of the human LCs used in this study are depicted in Suppl. Table 1. Theoretical isoelectric points (*pI*) was estimated using the Protein calculator v3.4 software (<http://protcalc.sourceforge.net/>). Prediction of aggregating regions in V domain was calculated using the TANGO algorithm (<http://tango.crg.es/protected/academic/calculation.jsp>) (7). Molecular modeling of the κ LCs was performed using VMD software (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) (8) with the pdb files obtained from the Swiss-Model server (<http://swissmodel.expasy.org/>) (9) using the 2bx5l crystal structure as template. LCs were produced using a Celine disposable bioreactor system (Integra Biosciences AG, Zizers, Switzerland) at similar rates, ranging from 0.7 to 2 mg/ml. Supernatants were directly diluted in serum free culture medium to the indicated final concentration for exposure to mPTC. For cathepsin-B digestion experiments, κ LCs were purified on HiTrap Protein L columns (GE healthcare, Glatbrugg, Switzerland), concentrated at 1mg/mL by Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Millipore, Molsheim, France) and were digested by cathepsin-B at 37°C as previously described (10). Samples were analyzed by western blot using a mouse anti-human κ 1 antibody (kindly provided by Alan Solomon).

Isolation and primary cultures of proximal tubule cells. Primary cultures of mouse PT cells (mPTC) were prepared from male C57/BL6 mice as described previously (4, 11). Freshly micro-dissected PT segments were seeded onto collagen-coated chamber slides (Nunc, Rochester, NY, USA) or collagen coated 24-well plates (Corning, Tewksbury, MA, USA) in culture medium (DMEM:F12 with 15 mM HEPES, 0.55 mM Na-pyruvate, 0.1 ml/l non-essential amino acids and the SingleQuots kit (Lonza, Verviers, Belgium) containing hydrocortisone, hEGF, FBS, epinephrine, insulin, triiodothyronine, TF, gentamicin/amphotericin, pH 7.40, 325 mOsm/kg) and incubated in a humidified chamber at 37°C–5% CO₂. The medium was replaced every 48 h. Confluent monolayers of mPTCs expanded from the tubular fragments after 6–7 days, characterized by a high endocytic uptake

capacity. All experiments were performed on non-passaged, confluent monolayers grown on chamber slides or plates.

Human κ LCs uptake. For human κ LC uptake, mPTCs were incubated for 1h at 4°C with 25 μ g/mL κ LCs in complete HEPES-buffered DMEM and then, after repeated washes, chased for 3 min, 30 min, 1h, 4h, 8h, 12h and 24 h at 37°C and acid washed before being processed for western blots or immunofluorescence analyses.

Endocytosis assays. For endocytic uptake assays, mPTCs cells were serum starved for 6h at 37°C in serum-free, HEPES-buffered DMEM and then incubated for 1 h on ice with 100 μ g/mL Bovine Serum Albumin (BSA)-Alexa-Fluor-488 or with 50 μ g/mL Transferrin (Tf)-Alexa-Fluor-546 (both from Life Technologies). The cells were washed twice in cold complete medium, and incubated for the indicated times in complete HEPES-buffered medium. At the end of incubation, the cells were acid washed (150mM NaCl, 10mM acetic acid, pH=3.5) before being fixed and processed for immunofluorescence analyses (4).

Quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted from kidneys using AurumTM Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-Rad, Hercules, CA), following the manufacturers protocol. DNase I treatment was performed to eliminate genomic DNA contamination. Total RNA was extracted from primary cell cultures with RNAqueousR kit (Applied Biosystems, Life Technologies), following the manufacturers protocol. One microgram of RNA was used to perform the reverse transcriptase reaction with iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). The primers were designed using Beacon Designer 2.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, USA) ([Suppl. Table 2](#)). Changes in target genes mRNA levels were determined by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with an iCycler IQ System (Bio-Rad) using SYBR Green I detection of single PCR product accumulation. The qRT-PCR analyses were performed in duplicate with 100nM of both sense and anti-sense primers in a final volume of 20 μ l using iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad). PCR conditions were 94°C for 3 min followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 61°C and 1 min at 72°C. The relative changes in target gene/GAPDH mRNA ratio were determined by the relation $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (4).

Subcellular fractionation. For subcellular fractionation, kidney cortex samples were dissected in ice-cold dissection solution (HBSS with in mmol/l: 10 glucose, 5 glycine, 1

alanine, 15 HEPES, pH 7.4 and osmolality 325 mosmol/kgH₂O), and homogenized by Dounce homogenizer in five volumes of TBS with 10% sucrose, protease inhibitor and phosphatase inhibitors (Complete Mini^R, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). The mixture was centrifuged at 800×g for 5 min. The supernatant represented total fraction while pellet (nuclear fraction) was washed twice and lysed in 0.5 Triton X-100 buffer 0.5% SDS and sonicated. All the above procedures prior to boiling in SDS-sample loading buffer were carried out either on ice or at 4°C. The total and nuclear fractions were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Western blotting. Immunoblotting was performed as described previously (4). Proteins were extracted from isolated kidneys or primary cultured cells, lysed in lysis buffer containing protease inhibitors, followed by sonication and centrifugation at 16,000 g for 1 min at 4°C. The samples were thawed on ice, normalized for protein (20µg/lane) or urinary creatinine levels, diluted in Laemmli buffer and separated by (SDS–PAGE in reducing conditions. After blotting onto nitrocellulose and blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody, washed, incubated with peroxidase-labeled secondary antibody, and visualized with enhanced chemiluminescence (ECL Pierce, Life Technologies). For re-probing, the membranes were rinsed, incubated for 30 min at 55°C in a stripping buffer (62.5 mmol/l Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM - mercaptoethanol, pH 7.4), before incubation with primary antibodies. Quantitative analysis was performed by scanning the blots and measuring the relative density of each band normalized to β-actin using NIH-Image V1–57 software.

Immunofluorescence and confocal microscopy. Mouse kidneys were snap-frozen in cryogenic Tissue-Tek OCT compound (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). The embedded tissue was sectioned at 6 µm with a Leica cryostat (Leica, Heerbrugg, Switzerland). The sections were fixed with 4% paraformaldehyde, blocked with PBS containing 5% BSA, and incubated for 1 h with primary antibodies. After three PBS rinses, fluorophore-conjugated Alexa secondary antibodies (Invitrogen) were applied for 30 min. Sections were subsequently mounted in Prolong Gold Anti-fade reagent (Invitrogen) and then analyzed under a Leica SP5 confocal laser scanning microscope (Center for Microscopy and Image Analysis, University of Zurich).

The cells on chamber slides were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde (Sigma) in PBS, quenched with 50 mM NH₄Cl and permeabilized for 30 min in blocking buffer (0.1% (w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) BSA in PBS/Ca/Mg). The cells were incubated for 2 h with

the primary antibody, washed three times in PBS, incubated for 1 h with the secondary (Alexa labelled) antibody, washed three times in PBS and were finally mounted on Vectashield covered coverslips (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The samples were examined under Leica SP5 confocal laser scanning microscope equipped with $\times 63$ oil-immersion objective. Image processing was done with Adobe Photoshop C2 (Adobe System Inc, San Jose, USA). To perform quantitative image analysis, 10–15 randomly chosen fields that included 8–10 cells each were scanned, using the same setting parameters (i.e. pinhole, laser power, and offset gain and detector amplification) below pixel saturation. The correlation coefficient analysis was used as value of co-localization as previously described (14). Quantification of the number and size of LAMP1-positive vesicles was performed using the AnalySIS software (Soft Imaging Systems GmbH, Muenster, Germany). Quantification was carried out on at least 200 cells per condition, obtained from 2 to 4 independent experiments.

Quantification of lysosome distribution. To score lysosome distribution, mPTCs were categorized into perinuclear-dominant lysosomal pattern (more than 50% of LAMP1-positive vesicles localized in the perinuclear region) and peripheral-dominant pattern (more than 50% of the vesicles localized in the peripheral region), on the basis of the number of lysosomes in each region (12). The data are expressed as a proportion of cells with predominantly (50%) perinuclear lysosomes. Quantification was carried out on at least 200 cells per condition from 2 to 4 independent experiments.

Lysosomal pH measurement. LysoSensor Blue DND-167 is commonly used to measure the pH of acidic organelles including lysosomes (13). Briefly, cells were loaded with $1\mu\text{M}$ LysoSensor Green DND-167 (Life Technologies) in pre-warmed regular medium for 20 min at 37°C . Then the cells were washed twice with PBS, fixed and stained with LAMP1 antibody and analyzed by confocal microscope. The correlation coefficient analysis was used as value of co-localization between LysoSensor and LAMP1 as previously described (14). Quantification of lysosomal pH was performed using a ratiometric lysosomal pH dye, LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (Life Technologies), as described previously (13). Briefly, cells were trypsinized and labeled with 2mM LysoSensor Yellow/Blue DND-160 for 30 min at 37°C in regular medium, and excessive dye was washed out using PBS. The labeled cells were treated for 10 min with 10mM monensin (Sigma) and 10M nigericin (Sigma) in 25mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) calibration buffer, pH 3.5–6.0, containing 5

mM NaCl, 115 mM KCl and 1.2 mM MgSO₄. Quantitative comparisons were performed in a 96-well plate, and the fluorescence was measured with a micro-plate reader at 37°C. Light emitted at 440 and 535 nm in response to excitation at 340 and 380 nm were measured, respectively. The ratio of light emitted with 340 and 380 nm excitation was plotted against the pH values in MES buffer, and the pH calibration curve for the fluorescence probe was generated from the plot using Microsoft Excel.

TUNEL assay. Apoptotic cell death was measured by using Click-iT TUNEL Alexa Fluor 488 imaging assay kit according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Life Technologies).

Statistical analysis. Data were statically analyzed using Prism5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Two-tailed Student's *t* test or one-way ANOVA followed by post-hoc tests were used to assess the statistical value of differences between groups. Results are presented as means ± SEM. A *P* value < 0.05 was considered significant.

Supplementary References

1. Sirac C et al. (2006) Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi's syndrome. *Blood* 108(2): 536-544.
2. Messiaen T et al. (2000) Adult Fanconi syndrome secondary to light chain gammopathy. Clinicopathologic heterogeneity and unusual features in 11 patients. *Medicine (Baltimore)* 79(3): 135-154.
3. Bridoux F et al. (2005) Fanconi's syndrome induced by a monoclonal V kappa3 light chain in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Am J Kidney Dis* 45(4):749-757.
4. Raggi C et al. (2014) Dedifferentiation and aberrations of the endolysosomal compartment characterize the early stage of nephropathic cystinosis. *Hum Mol Genet* 23(9):2266-2278.
5. Christensen EI et al. (2003) Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(14):8472-8477.
6. Decourt C et al. (1999) Mutational analysis in murine models for myeloma-associated Fanconi's syndrome or cast myeloma nephropathy. *Blood* 94(10): 3559-3566.
7. Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, Diella F, Serrano L (2004) A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol* 342(1):345-353.
8. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33-38.
9. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2):195-201.
10. Leboulleux M et al. (1995) Protease resistance and binding of Ig light chains in myeloma-associated tubulopathies. *Kidney Int* 48(1):72-79.
11. Terryn S et al. (2007) A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(2):F476-F485.
12. Korolchuk VI et al. (2011) Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol* 13(4):453-460.
13. Lee JH et al. (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141(7):1146-1158.

14. Luciani A et al. (2010) Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* 12(9):863-875.

Supplementary Figure Legends

Fig. S1. Quantification of free κ LC in urine of wild-type and transgenic mice.

(A) ELISAs for the detection of κ LCs were performed on urine samples of wild-type (WT) and transgenic κ CH and κ DE mice. The levels of free LCs were similar in κ CH and κ DE mice ($n = 6$). $**P < 0.01$; $***P < 0.0001$; ns, not significant. (B) Clinical and biological parameters obtained from κ DE and κ CH mice compared to wild-type controls matched for age and gender. The κ CH mice show polyuria, glucosuria, phosphaturia and increased urinary excretion of Clara cell protein 16 (CC16) as compared to WT controls and κ DE mice ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$; $n = 7$ mice per group). Body weight, blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine levels are similar. (B, inset) Representative immunoblots for low-molecular-weight proteins (LMWP), vitamin D-binding protein (DBP) and transferrin (TF) in urine samples from wild-type (WT), κ CH and κ DE mice. Loading was normalized to urinary creatinine concentration.

Fig. S2. Dedifferentiation and proliferation in κ DE kidneys.

(A) Densitometry analysis of immunoblots for the proximal tubule markers, as shown in Fig. 2A. $*P < 0.05$ vs. WT (taken as 100%), $n = 5$ mice per group. (B) Immunofluorescence staining for megalin, cubilin and NaPi-IIa (DAPI nuclear counterstain) in WT and κ DE kidneys. Scale bar: $50\mu\text{m}$. (C) Double immunofluorescence staining for Lotus tetragonolobus lectin (LTL, green) and PCNA (red) in WT and κ DE kidneys. Nuclei counterstained with DAPI. Scale bar, $25\mu\text{m}$. Quantification of LTL-positive cells with nuclear PCNA immunoreactivity showed no significant difference ($n = 100$ LTL-positive cells). (D) Double immunofluorescence staining for ZONAB (red) and LTL (green) in WT and κ CH kidneys. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, $25\mu\text{m}$. Quantification of LTL-positive cells presenting nuclear ZONAB immunoreactivity showed no significant difference ($n = 100$ LTL-positive cells).

Fig. S3. Molecular characteristics and protease resistance of human κ LCs.

(A) 3D structures of wild-type κ CH (red) and mutant κ CHm (blue) were superimposed to show modifications induced by the Ala to Ser mutation at position 30. Total V κ domains representation (left) shows a complete homology between the two LCs even in the CDR1 loop (inset) where the mutation at position 30 is present (ball-and-stick representation). (B) Predicted aggregating regions in the V domains of κ CH and κ CHm LCs as calculated by TANGO algorithm. Arrows indicate the position of the residue 30 mutated in κ CHm. (C)

Western Blot analysis of purified κ CH, κ CHm, κ DE and κ DU LCs after digestion by cathepsin-B during the indicated times (10 μ g per lane). The 12 kDa resistant fragments are revealed by an anti-human V κ 1 antibody.

Fig. S4. Accumulation of specific κ LCs within lysosomes of proximal tubule cells.

(A) mPTCs were incubated with 25 μ g/ml of κ RO or κ CH and chased for the indicated times. Where drug treatment was performed, cells were incubated with methyl- β -cyclo-dextrin (M- β -CD, 10mM) or filipin (5 μ g/mL) during the 60 min pulse period and the chase period. The cells were fixed, stained with an anti- κ LC antibody and subjected to confocal microscopy analysis. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. Right panel:

Quantification of cells containing κ LCs. * P <0.005 vs. untreated, # P <0.003 vs. untreated, n = 200 cells per group. (B-D) mPTCs were incubated with 25 μ g/ml of κ DE or κ DU for 60 min, washed and incubated with control, κ LC-free medium for the indicated chase times. (B) Confocal microscopy of cells stained with an anti- κ LC antibody. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. Right panel: Quantification of mPTCs containing κ LCs at different time points. * P <0.01 κ DU vs. κ DE, n = 200 cells per group. (C) Double immunofluorescence staining for κ LC (green) and for CD63 (red). Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. The cells from (C) were assessed for the (D) quantitative measurement of κ LC/CD63 co-localization (correlation coefficient). * P <0.05 κ DU vs. κ DE, n = 200 cells per condition. (E) Quantification of κ LC-containing lysosomes in mPTCs exposed to κ DE or κ DU. * P <0.05 κ DU vs. κ DE, n = 200 cells per condition.

Fig. S5. κ LCs associated with RFS are specifically retained within lysosomes.

(A-C) mPTCs were incubated with 25 μ g/ml of κ LCs for 60 min and chased for additional 4h. Where drug treatment was performed, cells were incubated with bafilomycin-A1 (BfnA1, 250nM for 6h) during the 60 min pulse period and the chase period. (A) Double immunofluorescence staining for κ LCs (green) and for CD63 (red). Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. The cells from (A) were assessed for the (B) quantitative measurement of κ LC/CD63 co-localization (correlation coefficient). * P <0.05 κ CH vs. κ RO, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH, n = 200 cells per condition. (C) Quantification of the number of lysosomes containing κ LCs (% of total lysosomes). * P <0.05 κ CH vs. κ RO, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH, n = 200 cells per condition.

Fig. S6. Lysosomal alterations in proximal tubule cells exposed to κ LCs.

(A-D) mPTCs were incubated with 25 μ g/ml of κ DU or κ DE for 60 min, washed and incubated with control, κ LC-free medium for the indicated chase time. (A) Double immunofluorescence staining for LAMP1 (red) and plasma membrane marker (green). Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. The cells from (A) were assessed for change in vesicle size (B) and for change in vesicle positioning (C). * P <0.05 κ DU vs. κ DE, n = 200 cells per condition. (D) Ultrastructural examination of mPTCs exposed to either κ DE or κ DU. Cells exposed to κ DU show accumulation of single-membrane structures containing cytosolic constituents. Scale bar, 0.5 μ m. (E-F) Representative immunoblots and densitometry analyses showing an increase of LAMP1 in mPTCs exposed to RFS-associated κ CH and κ DU compared with to control κ RO or κ DE or to mutant κ CHm. * P <0.05 vs. unexposed cells or vs. κ DE, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH.

Fig. S7. Exposure to κ LCs does not impact LAMP1 dynamics at the Golgi or endocytic compartments.

(A-B) mPTCs exposed to control medium or 25 μ g/ml of κ LCs for 60 min were washed and incubated with control, κ LC-free medium for the indicated times (chase). (A) The cells were fixed, co-stained with anti-LAMP1 and anti-Rab5 or anti-Rab7 antibodies and subjected to confocal microscopy. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. The cells from (A) were assessed for Rab5/LAMP1 or Rab7/LAMP1 co-localizations. n = 100 cells per condition. (B) Effect of pre-incubation with nocodazole (30 μ M, 2h) on immunostaining for LAMP1 (red) and the Golgi marker GM130 (green) in cells exposed to control medium or κ LCs and then chased for 24h. There is no co-localization of LAMP1 clusters with GM130. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. The cells from (B) were assessed for LAMP1/GMA130 co-localization. n = 100 cells per condition.

Fig. S8. Impaired cathepsin-B processing and lysosomal acidification in proximal tubule cells exposed to specific κ LCs.

(A-F) mPTCs were incubated with 25 μ g/ml of κ LCs for 60 min, washed and incubated with control medium for the indicated chase times. (A) Representative immunoblots showing a

reduced generation of mature cathepsin-B form (Mat, 32kDa) in cells exposed to RFS-associated κ DU compared to those exposed to κ RO. Pre, premature cathepsin-B doublet. **(B)** After exposure to κ LCs, the cells were further loaded with the membrane-permeable substrate Magic Red and fluorescence recovery (FRAP) microscopy analysis to score the cathepsin-B activity. The FRAP data are displayed as percentage of recovery with respect to pre-bleach fluorescence (taken as 100%) and are representative of 10 recordings from different cells from five independent spots. **(C)** After exposure to κ LCs, the cells were loaded with membrane permeable-substrate Bodipy-FL-PepstatinA (PepA, 100nM for 30 min), fixed and subjected to confocal microscopy analysis. Left panel: Bodipy-FL fluorescence staining; right panel: quantification of the number of PepA-positive dots in mPTCs exposed to κ LCs. Scale bar, 10 μ m. * P <0.01 κ CH vs. κ RO, # P <0.005 κ CHm vs. κ CH, ** P <0.003 κ DU vs. κ RO, n = 200 cells per condition. **(D)** After exposure to κ LCs, the cells were incubated with LysoSensor DND167 and immunostained for LAMP1. LAMP1 positive compartments were LysoSensor-positive in cells exposed to κ RO but LysoSensor negative in cells exposed to κ DU. The cells from **(D)** were assessed for the quantification of LysoSensor DND167/LAMP1 co-localization. * P <0.001 κ DU vs. κ RO, n = 200 cells per condition. **(E)** Lysosomal pH values were ratiometrically measured using LysoSensor Yellow/Blue DND-160. * P <0.005 κ DU vs. κ RO, n = 150 cells per condition.

Fig. S9. Defective endocytosis in mPTCs exposed to RFS- κ LCs.

(A-D) mPTCs were incubated with 25 μ g/ml of κ LCs for 60 min and chased for 24h. **(A)** Immunofluorescence staining for megalin (green), cubilin (red) and NaPi-IIa (magenta). Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. **(B)** The cells were incubated with Alexa Fluor-488(A488)-BSA or with Alexa Fluor-546-(A546)-transferrin (Tf) for 1h at 4 $^{\circ}$ C, and then fixed and subjected to confocal microscopy analysis. Nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m. **(C)** Quantitative measurement of EEA-1/megalin or EEA-1/NaPi-IIa co-localizations. * P <0.005 κ CH vs. κ RO. **(D)** RFS- κ LCs do not promote apoptosis. mPTCs were incubated with 25 μ g/ml of κ LCs for 60 min and chased for additional 4h. Where drug treatment was performed, cells were incubated with Valinomycin (10nM for 6h). Quantification of the percentage of TUNEL-positive cells. * P <0.01 vs. unexposed cells, n = 200 cells per group.

Supplementary Table 1. Characteristics of the human light chains used in the study.

Light Chain	Kidney Disease	Isotype	V(L) domain	Mutations of interest*	Crystal formation [†]	<i>pI</i> (V domain)	Charge (pH7/pH5)	Aggregation Score (V domain) [‡]	References
CH	RFS	κ	Vk1-39	A30; I94	Yes	8.45	1.9/3.2	486.69	(1,6)
DU	RFS	κ	Vk1-5	V31	Yes	5.17	-1.1/0.4	897.65	-
CHm	-	κ	Vk1-39	A30→S	No	8.45	1.9/3.2	229.12	(6)
DE	AL Amyloidosis	κ	Vk1-33	F52	No	5.36	-1.1/1.0	332.77	-
RO	Cast nephropathy	κ	Vk2-28	A51;Y52	No	7.09	0.1/3.0	595.71	-

*polar to hydrophobic residue substitution in solvent-exposed loops (CDR)

[†]Crystal formation was documented by electron microscopy study of the kidney biopsy

[‡]Aggregation score obtained using the TANGO algorithm

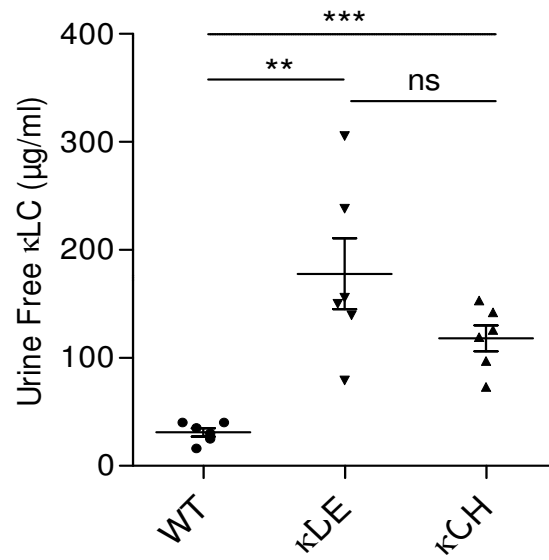
RFS, renal Fanconi syndrome; *pI*, isoelectric point

Supplementary Table 2. Primers used for quantitative RT-PCR analyses.

Gene products	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	PCR products (bps)	Efficiency
<i>Gapdh</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGATGCAGGGATGATGTTCT	176	1.04 ± 0.03
<i>Actb</i>	TGCCCATCTATGAGGGCTAC	CCCGTTCAGTCAGGATCTTC	102	1.03 ± 0.04
<i>Hprt 1</i>	ACATTGTGGCCCTCTGTGTG	TTATGTCCCCCGTTGACTGA	162	0.99 ± 0.01
<i>Ppiase</i>	CGTCTCCTTCGAGCTGTTTG	CCACCCTGGCACATGAATC	139	1.02 ± 0.02
<i>18S</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	151	0.98 ± 0.02
<i>36B4</i>	CTTCATTGTGGGAGCAGACA	TTCTCCAGAGCTGGGTTGTT	150	1.02 ± 0.02
<i>Cubn</i>	TCATTGGCCTCAGACATTCC	CCCAGACCTTCACAAAGCTG	149	1.04 ± 0.05
<i>Lrp2</i>	CAGTGGATTGGGTAGCAGGA	GCTTGGGGTCAACAACGATA	150	0.99 ± 0.04
<i>Pcna</i>	TTGGAATCCCAGAACAGGAG	ATTGCCAAGCTCTCCACTTG	155	0.97 ± 0.04
<i>Ccnd1</i>	AGCAGAAGTGCGAAGAGGAG	CAAGGGAATGGTCTCCTTCA	149	1.03 ± 0.05
<i>DbpA</i>	AGGACGCGGAGAAGAAAGTT	ACTTGCGTGGGTTGTTTTTC	153	0.98 ± 0.04
<i>Clen5</i>	TGGAGGAGCCAATCCCTGGTGT	AGAAAGCATCGCTCACACTG	156	0.99 ± 0.02
<i>Atp6v1e1</i>	GGCGCTCAGCGATGCAGATGT	CAAGGCGACCTTTCTCAATG	134	1.05 ± 0.01
<i>Car2</i>	CTTGAAGCACTGCATTCCAT	CACGATCCAGGTCACACATT	154	1.02 ± 0.03

Figure S1

A



B

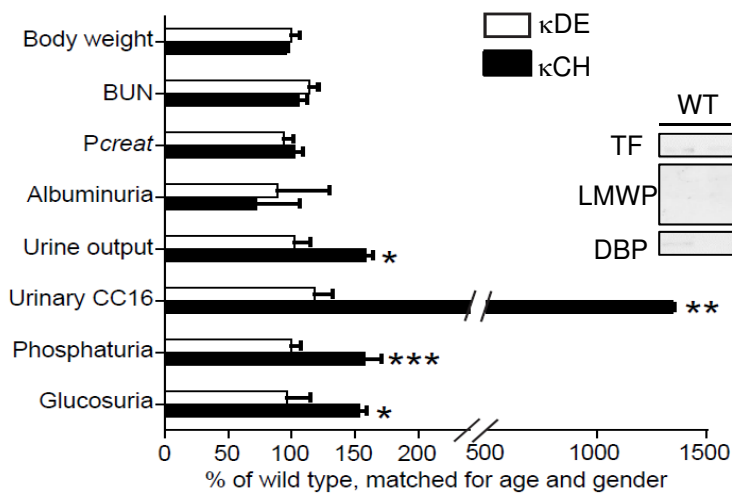


Figure S2

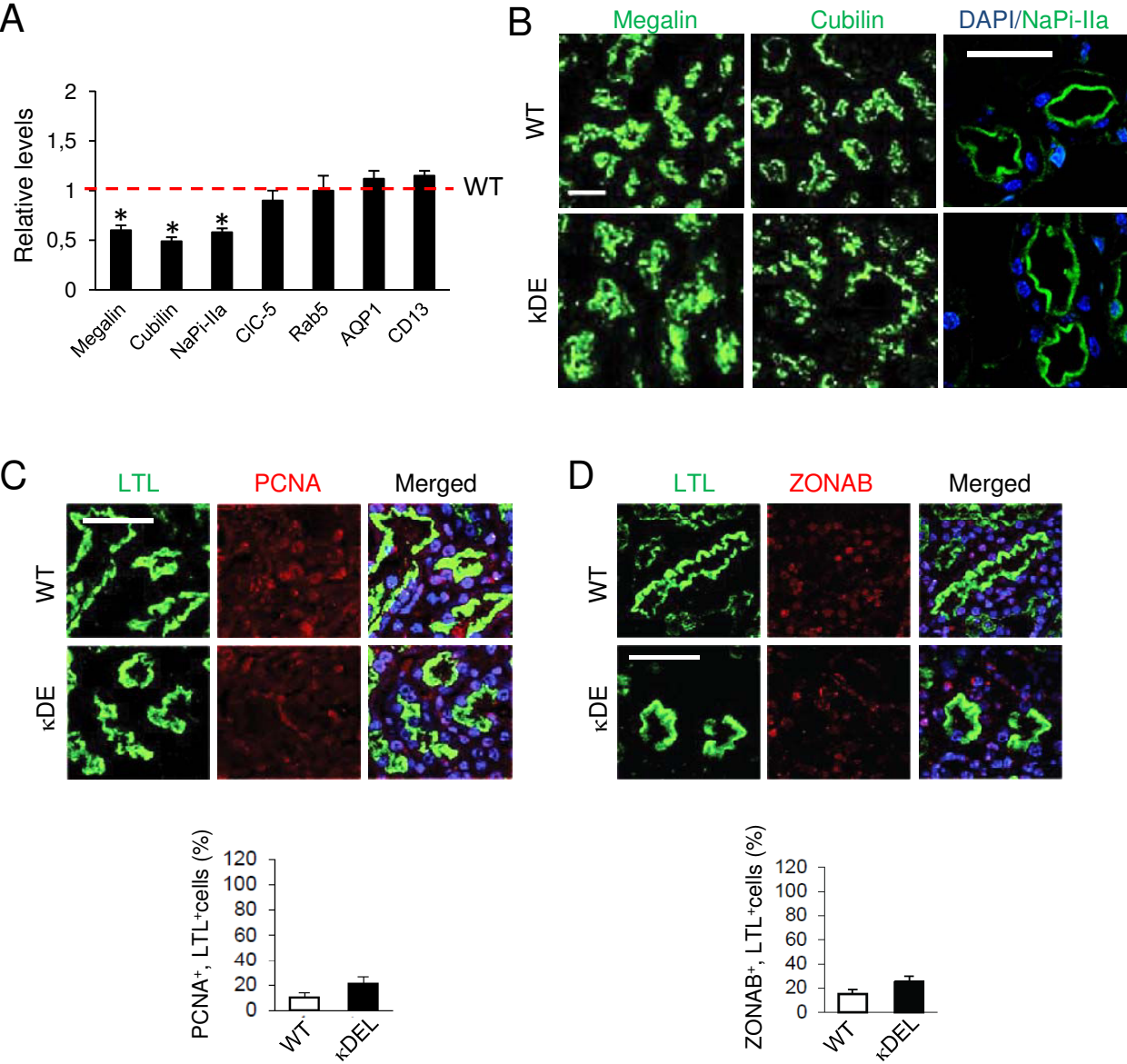
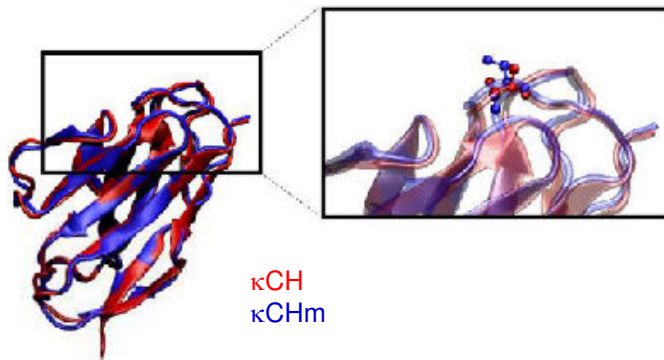
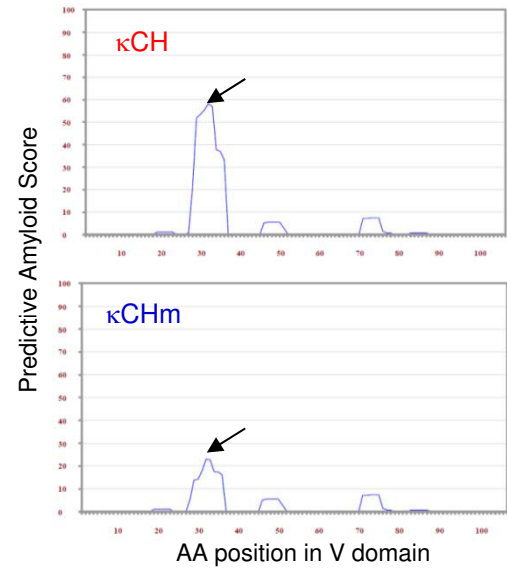


Figure S3

A



B



C

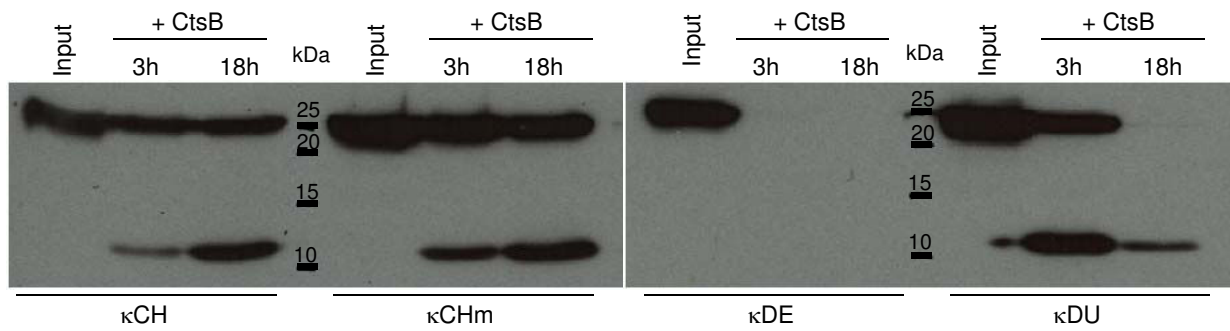
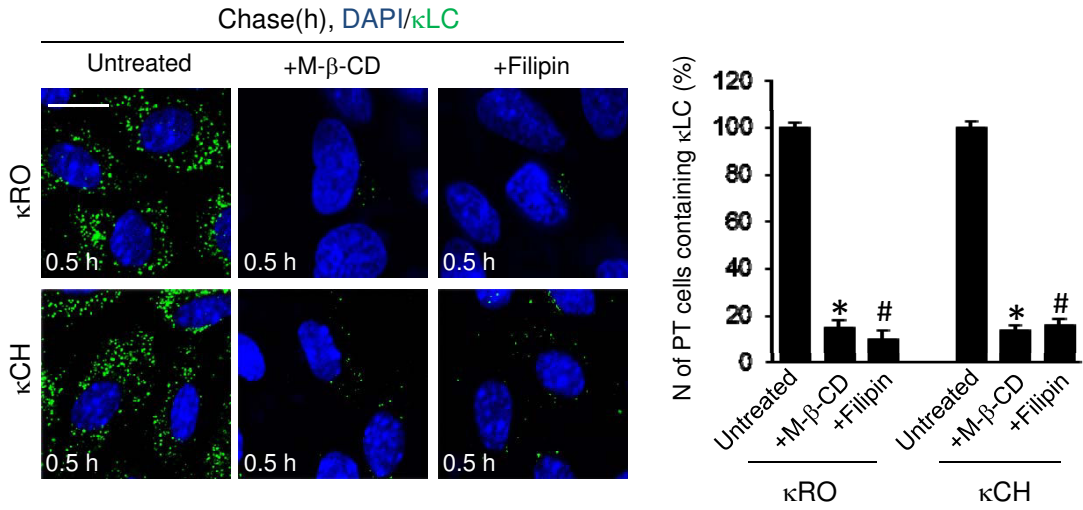
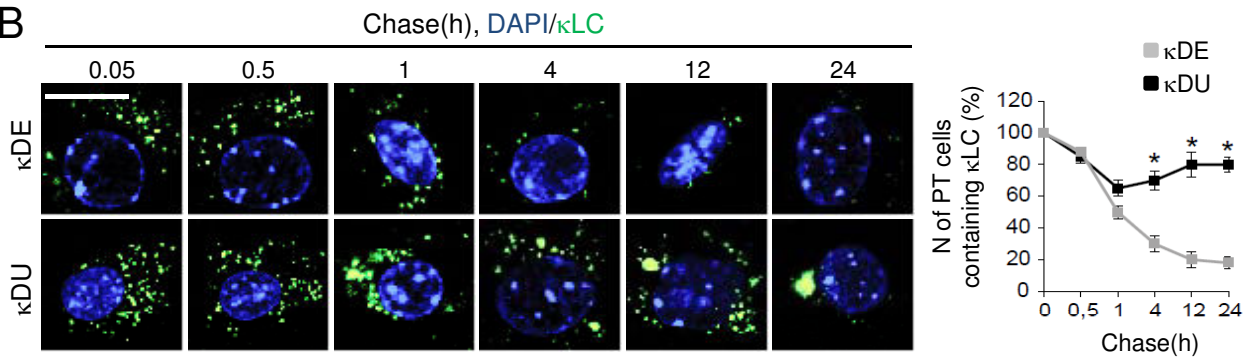


Figure S4

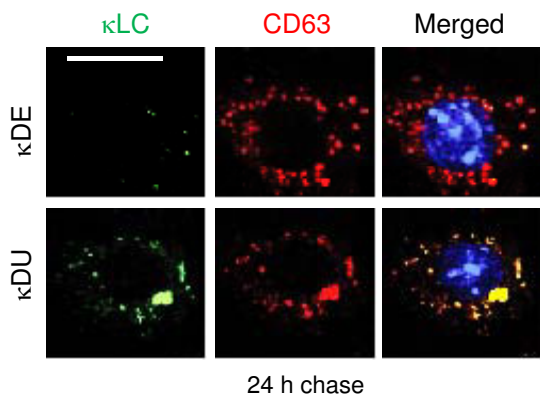
A



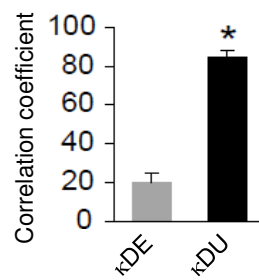
B



C



D



E

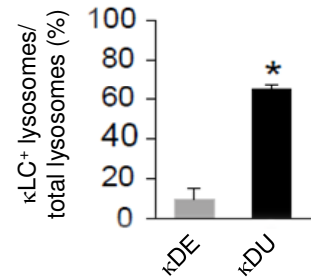


Figure S5

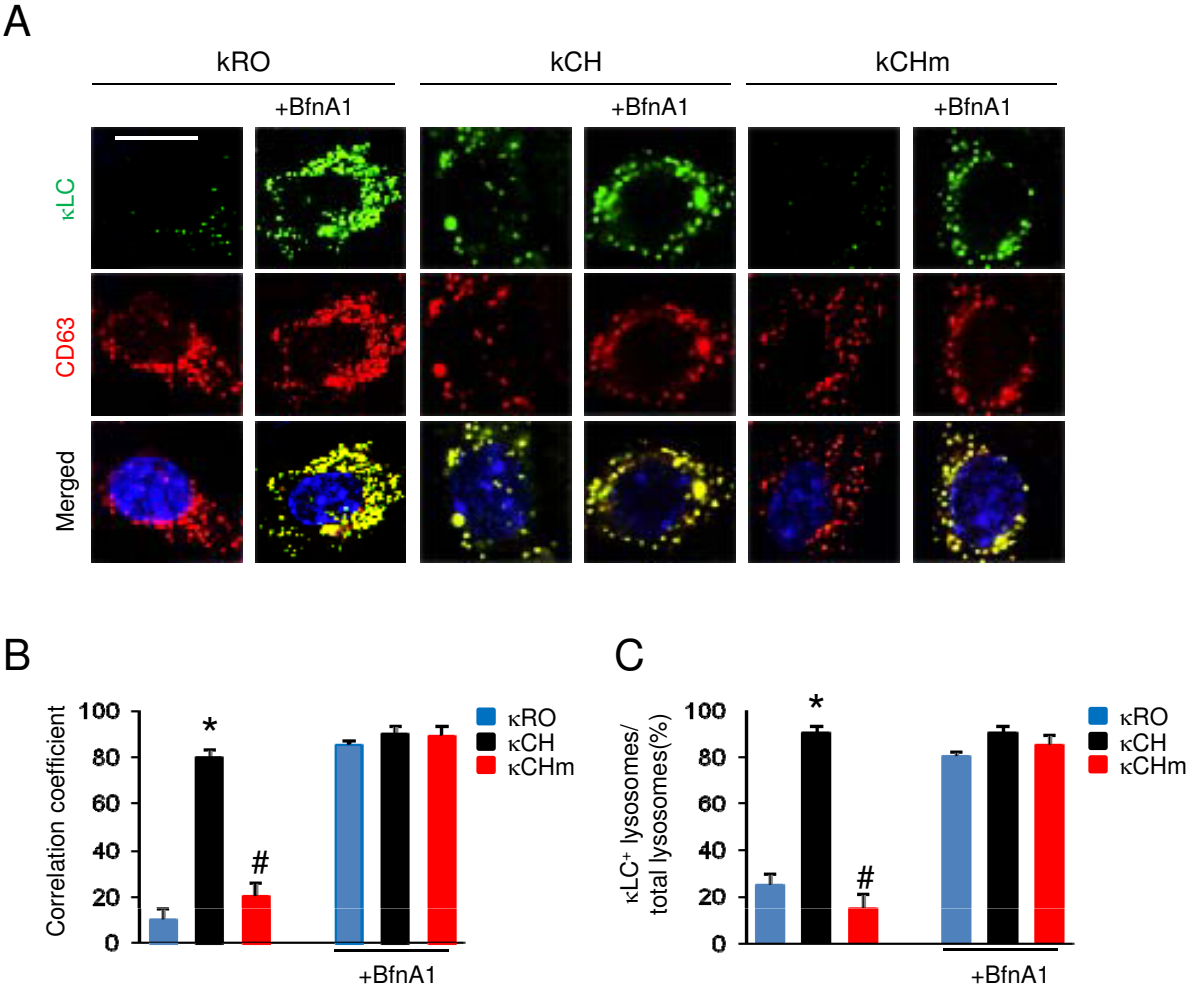


Figure S6

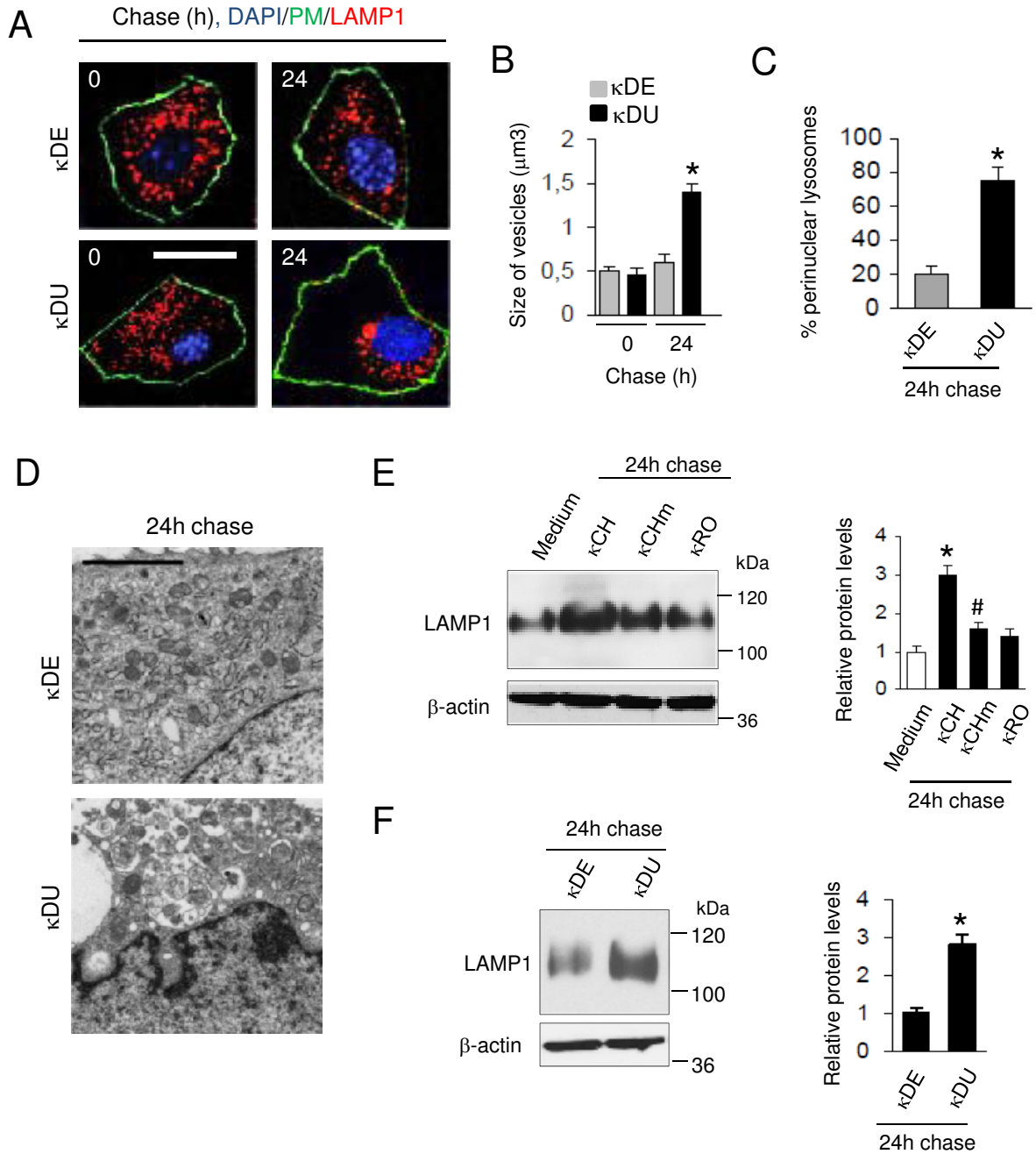


Figure S7

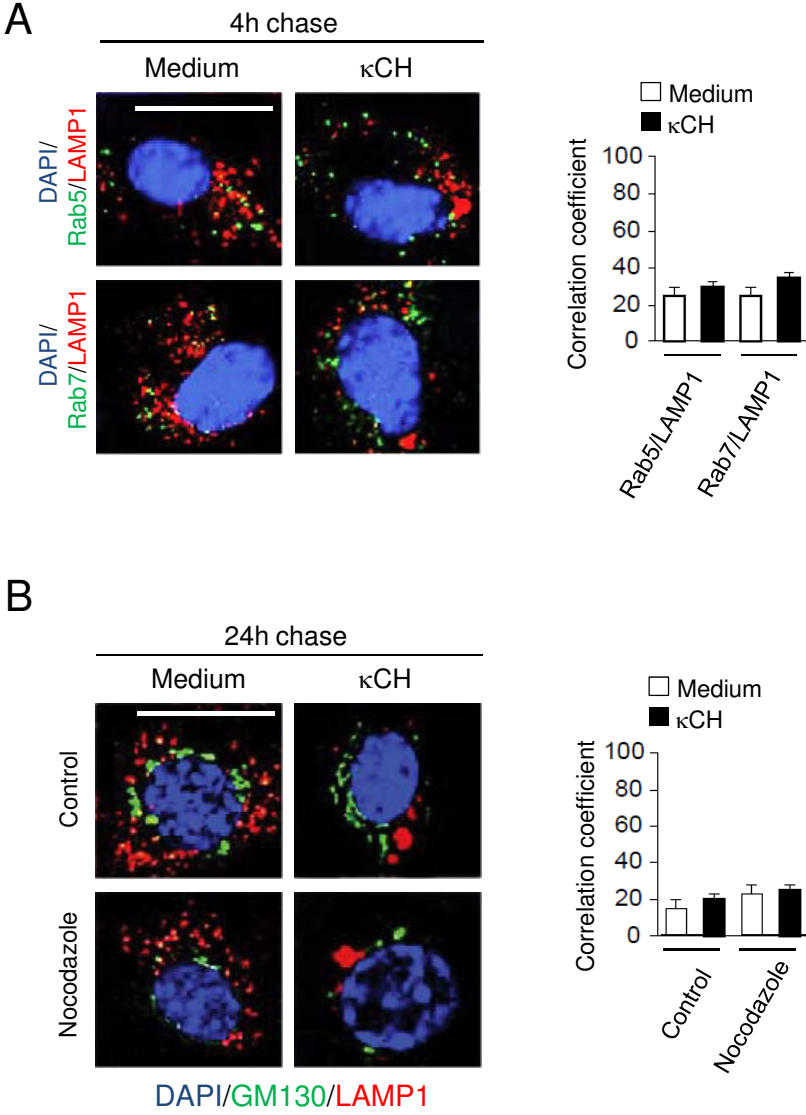


Figure S8

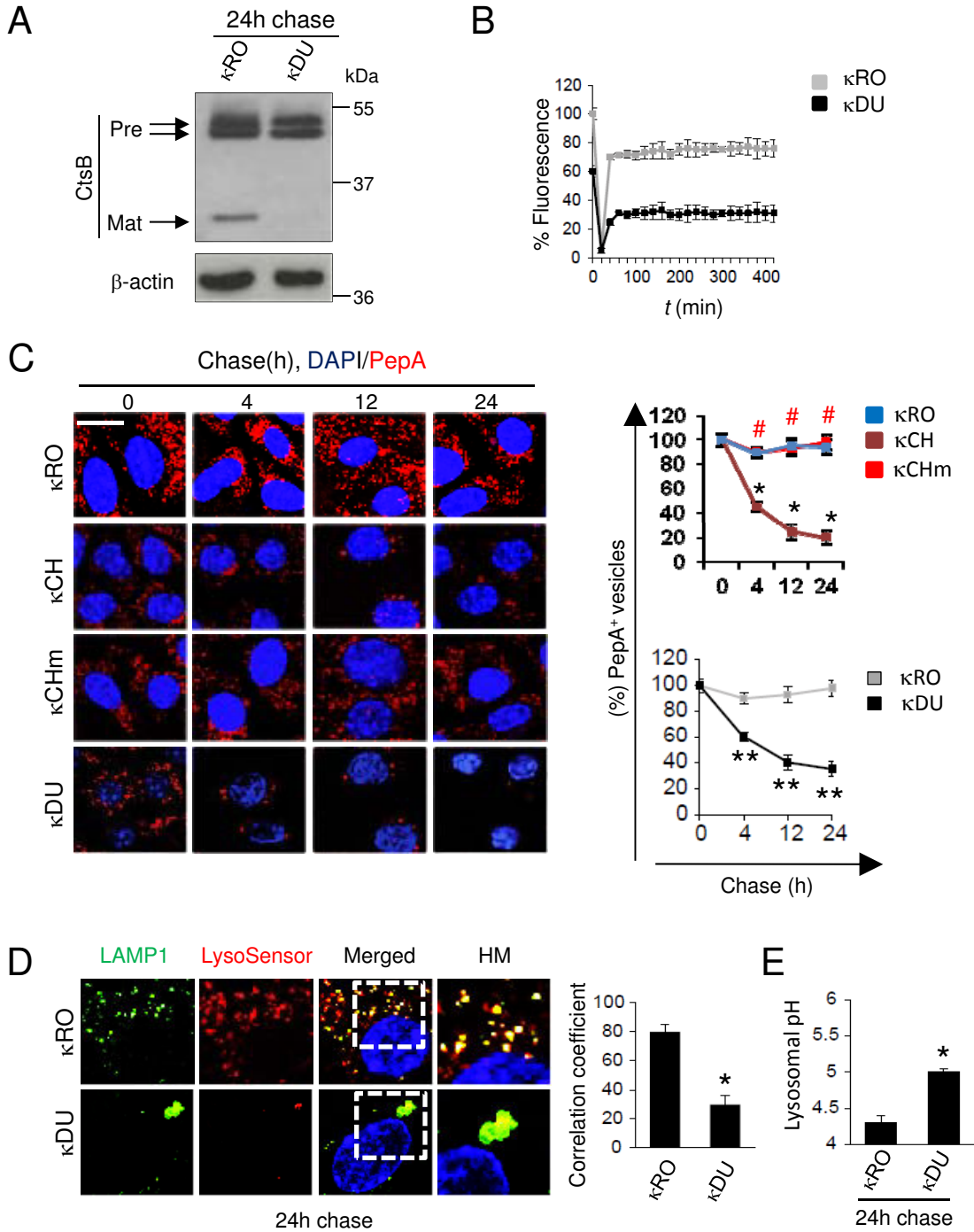
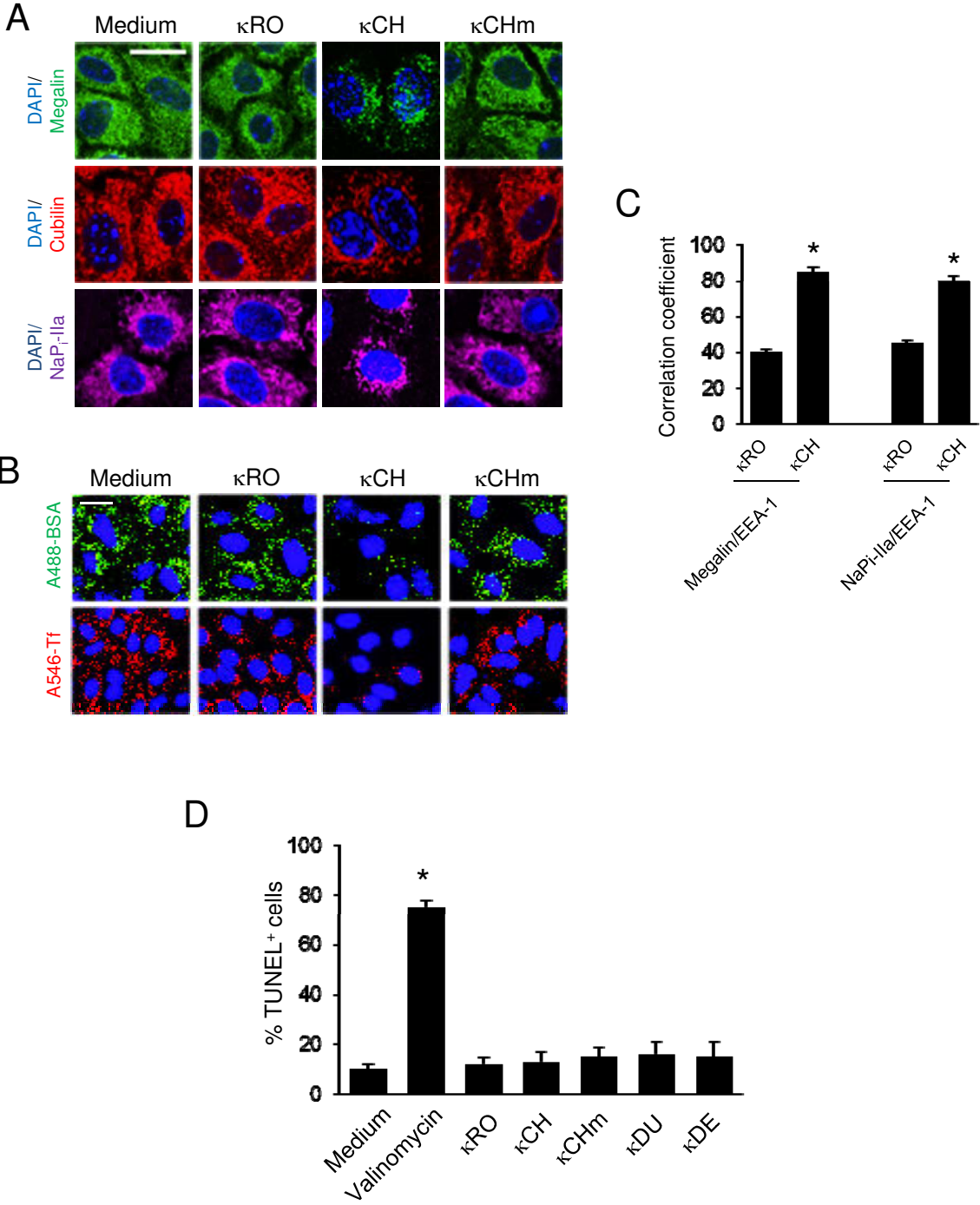


Figure S9



Annexe 3 : Reassessment of immunoglobulin joining-chain expression during B cell development: an early marker of plasma cell differentiation in germinal centers

Manuscrit en préparation

Reassessment of immunoglobulin joining-chain expression during B cell development: an early marker of plasma cell differentiation in germinal centers

Fabien Lechouane, Amélie Bonaud, Claire Carrion, Zeliha Oruc, Virginie Pascal, Michel Cogné and Christophe Sirac

Abstract:

Immunoglobulin J chain (IgJ) is required for the correct assembly of pentameric IgM and dimeric IgA. However, its expression during B cell development in mouse remains incompletely defined. To address this specific issue, we created a transgenic mouse model in which a green fluorescent protein (GFP) gene is placed under the control of the well-characterized regulatory elements of the murine *IgJ* locus. We show that almost all plasma cells (PCs) express IgJ regardless of the location or the immunoglobulin isotype. In vitro studies definitively confirmed that IgJ is an early marker of antibody secreting cells and appears before the expression of CD138. Strikingly, beside the PC compartment, GC B cells also overwhelmingly express IgJ in vivo. This expression is not restricted to few differentiated B cells but appears as a global mark of the entire GC B cell compartment and is accompanied by a decrease of *Pax5* but not the increased expression of other PC-specific transcription factors like *Prdm1* or *Xbp1*. We propose a model in which B cells acquire in GCs a pre-differentiated state, facilitating their engagement into the PC fate upon appropriate secondary signals.

Introduction

Plasma cells (PC), dedicated to the secretion of large amounts of antigen-specific immunoglobulins, represent the final stage of B cell lineage differentiation. In the first days after immunization, antigen-specific B cells can either induce a differentiation program leading to the generation of short-lived PCs, at the origin of the first wave of low affinity antibodies mainly of the IgM isotype, or participate in the formation of a germinal center (GC) reaction. GC B cells subsequently undergo Ig class switch recombination, somatic hypermutation and finally produce long-lived non-proliferating PCs that secrete high-affinity antibodies and can migrate to the sites of inflammation and the bone marrow where they participate on the long term in maintaining low quantities of specific serum antibodies [1–4]. The transcriptional program involved in the transition from B cell to PC has been extensively studied the last few years revealing two sets of transcription factors that are mutually opposite: those involved in the B cell identity and maintenance like Pax5, Bcl6 or Bach2 and those that control PC differentiation like Blimp1 and Irf4 or Xbp1 [5–13]. However, if the respective importance of these factors has been well documented using knock out or reporter mouse models, the precise ordering of the early events determining the PC fate is still unclear. It was first supposed that the expression of Blimp1 and its subsequent inhibition of Pax5 was the first transcriptional event in the PC fate decision. However, Kallies et al. [14], using a Blimp^{gfp} reporter mouse model, have later demonstrated the existence of antibody secreting cells, called preplasmablasts (PPBs), in Blimp1 null mice. These cells, characterized by a low expression of Pax5 and the absence of Syndecan1/CD138 the most widely used surface PC marker, represented the first demonstration that Pax5 repression precedes Blimp1 expression. A similar population was also observed at very low rate in human lymph nodes and in an *in vitro* memory to PC differentiation culture system [15]. In these studies, PPBs were described as a transient population of cells able to secrete low amount of Ig before their terminal

differentiation in PC. But the quantity, the role and the precise location of such cells remains unclear, especially because of the lack of specific markers for very early events of PC commitment.

Immunoglobulin Joining (IgJ)-chain is a 15 kDa peptide expressed by antibody secreting cells and required for correct assembly of pentameric IgM and dimeric IgA [16]. It is required for the transport of these polymeric immunoglobulins (pIg) to the mucosal surface [17]. Several studies have demonstrated that plasma cells producing monomeric Ig isotypes also express this peptide but it still remains controversial to what extent [18,19]. Conversely, IgM and IgA secreting cells have been detected in significant number in a mouse model of depletion of IgJ producing cells, the IgJ-DTA model [20]. The exact stage of production during B cell development and differentiation into PC remains unknown but promoter activity and transcriptional studies have revealed that IgJ is expressed at very early steps of PC differentiation [21], before the requirement for Blimp1 over-expression [14].

In the present study, we created a transgenic murine model that expresses the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) under the control of the well-characterized murine *IgJ* gene enhancer/promoter [21]. This model allowed us to follow IgJ expression during *in vivo* and *in vitro* differentiation of B cells into PC. We first show that, in contrast to previous assumptions, almost all ASC express the IgJ chain, independently of the secreted IgH isotype. IgJ appears as an early marker of terminal differentiation before the expression of CD138. We also revealed that IgJ is a pan-marker of germinal center B cells and a significant proportion of these cells already secrete detectable amounts of immunoglobulins. We discuss the significance of this early expression of the J chain in germinal center B cells.

Materials and methods

Generation of ChJ-GFP mice and immunization. The IgJ-GFP construct includes the 1.1kb NdeI/NheI genomic fragment harboring IgJ enhancer activity previously described and the 1.4 kb IgJ promoter followed by EGFP gene from pMOD-ZGFPsh vector (Cayla Invivogen), all flanked by two insulators from chicken β -globin gene locus [22]. A neomycine resistance cassette follows this construct. CK35 embryonic stem cells were electroporated with the linearized vector and G418 resistant clones were screened by PCR. Two clones (10 and 13) were reimplanted in C57BL/6 blastocysts. For each clone, chimeric founders gave rise to a ChJ-GFP lineage respectively named IgJ^{GFP}10 and IgJ^{GFP}13. All the animals were bred and maintained in pathogen-free condition in our animal facility and were analyzed at 8-16 weeks of age. All the protocols used have been approved by our institutional review board for animal experimentation. IgJ^{GFP} mice were immunized with one intra-peritoneal injection of 200 μ l of sheep red blood cells (Sigma-Aldrich) and analyzed at the indicated times.

Flow cytometry, cell sorting and confocal microscopy. Antibodies and reagents used for staining and cell sorting experiments are detailed in supplemental Table I. Flow cytometry analyses were done on a BD Pharmingen LSRFortessa[®] cytometer. Cell sorting experiments were done on a BD Pharmingen FACSVantage[®] cell analyzer. Data were then analyzed with BD FACSDiva software (BD Biosciences). Intracellular staining for flow cytometry was done using IntraPrep Permeabilization kit following manufacturer's instructions (Beckman Coulter). For confocal microscopy, organs were incubated 1 h in PBS/PFA 4 % followed by 6 h in PBS/sucrose 30 % before freezing. Frozen 8 μ m sections were prepared and incubated with PBS/BSA 3 %/Tween 0.05 % before staining. Images were acquired with a Zeiss LSM

510 Meta confocal immunofluorescent microscope (Zeiss) and then analyzed with LSM Image Browser software (Zeiss).

Spleen cells cultures. Total spleen cells were cultured at a density of 1×10^6 cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) with 50 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich). Culture of B-cells after cell-sorting experiments was done at a density of 5×10^5 cells/mL.

ELISPOT assays. For evaluation of Igk or IgM secretion, sorted populations were seeded in duplicate at a density starting at 2×10^4 cells per well, followed by five-fold serial dilutions in culture medium on a 96-well plate MultiSreen HTS (Millipore) previously coated over-night at 4 °C with 1.5 µg per well of anti-Igk or anti-IgM (Beckman Coulter) in PBS and saturated with culture medium. Cells were incubated 6 h at 37 °C and then removed by washing with PBS/Tween 0.01 %. Plate was then incubated 1 h à 37 °C with 1 µg per well of alkaline phosphatase-coupled anti-Igk or anti-IgM (Beckman Coulter) in PBS. After washing PBS/Tween 0.01 %, plates were incubated 10 min with 100 µL of BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate (Millipore). After washing and drying, pictures of wells were taken and images were analyzed for spots numbers and areas with ImageJ software.

PCR and mutations analysis. Genomic DNA from different B-cell subsets was extracted using proteinase K. Mutation analysis was done on the first 100 bp of Jk5 intron after amplification of genomic fragment containing VJk5 rearrangement with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) using following primers: Vkconsensus:

5'-CAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGGGRAC-3' and Jκ5REV: 5'-CATTTTCTCAAGATT
TTCTGAACTGAC-3'. PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega,
Madison, WI), and then sequenced with BigDye Terminator kit (Applied Biosystems).
Sequencing was done with a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Retrotranscription and real-time PCR analysis. Total RNA from sorted cells was extracted
TRI Reagent® (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's protocol. Total RNA
was treated with DNaseI (Invitrogen) and 1 µg was used for cDNA synthesis with Applied
Biosystems Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Relative
quantification was done using TaqMan® probes for *Prdm1* (Mm00476128_m1), *Xbp1*
(Mm00457359_m1), *Pax5a* (Mm00435494_m1), *Bcl2* (Mm00477631_m1), *Aicda*
(Mm01184115_m1) and *Igj* (Mm00461780_m1) and sybergreen® assays for transcripts
membrane and secreted forms of Igu heavy chain using the following primers: a forward
primer used for used for both forms, IGMMBFOR: 5'-TGGA ACTCCGGAGAGACCTA-3',
a reverse primer for membrane form IGMMBREV: 5'-TTCCTCCTCAGCATTACCT-3'
and a reverse primer for secreted form IGMSECREV: 5'CGCTAGCATGGTCAATAGCA-
3'. All experiments were done in an ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System using
Gapdh (Mm99999915_g1) as a housekeeper reference gene. Transcript fold change
expressions were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula.

Statistical analysis. The statistical tests used to evaluate differences between variables were
indicated in legends and were done using Prism GraphPad software (San Diego, CA). All *P*
values < 0.05 were considered significant.

Results

Generation and characterization of the IgJ^{GFP} reporter model.

To explore the early events of PC differentiation, we generated a transgenic mouse strain that express the eGFP cDNA under the control of regulatory sequences from the IgJ locus. The transgene comprise the 1.4 kb promoter sequence of the IgJ gene including the Pax5 repression site [23] and a 1.5 kb genomic fragment from a region located between 6 and 7.5 kb upstream of the transcriptional start site, containing the main enhancer element controlling IgJ gene expression [21]. To limit the position effects, the transgene was flanked with two insulators sequences from the chicken β -globin. We obtained two different strains (clone 10 and 13) that were first analyzed by flow cytometry. In spleen, we detected two distinct cell populations expressing GFP: a bright population (GFP^{high}) characterized by a low expression of the pan-B cell marker B220 and a population expressing intermediate level of GFP (GFP^{int}) together with the B220 marker (Fig.1A). As expected, in both strains, CD138⁺ B220^{low} PCs were highly GFP positive with a slight difference in intensity between clones 10 and 13 (Fig 1B). As clone 13 presented the strongest level of GFP, further results presented in this study will focused on this strain. But, except when indicated, the pattern of expression of the GFP is similar in both strains. We also detected a GFP^{high} population in bone marrow corresponding to the CD138⁺/B220^{low} PCs. Interestingly, by contrast to previous assumptions [20], almost all CD138⁺ cells in spleen or bone marrow were GFP^{high} and thus, express the IgJ gene (Fig 1B). We then checked the presence of the J chain protein using an overnight intracellular staining with anti-IgJ antibody. As seen in Figure 1C, all GFP⁺ cells were also positive for intracellular IgJ protein with levels proportional to the GFP fluorescence intensity, confirming the similar regulation of our GFP transgene and the endogenous IgJ locus.

IgJ is an early marker of B cell terminal differentiation.

To verify if the IgJ gene is expressed during all stages of PC differentiation, we further performed *in vitro* LPS stimulations of spleen B cells from IgJ^{GFP} mice. As seen in Fig. 2A, GFP was strongly detected from the first 48h in a significant proportion of cells, most of these cells remaining CD138 negative. At 72h, all the CD138⁺ cells were also GFP⁺, but a population of GFP⁺/CD138⁻ cells was still present. Interestingly, κ light chain specific ELISPOT revealed that these GFP⁺/CD138⁻ cells are secreting cells even if spots area were slightly smaller than GFP⁺/CD138⁺ plasmablasts cells (Fig 2B). By contrast, GFP⁻/CD138⁻ B cells secreted no or very low amount of Ig light chain. Real-time PCR analyses confirmed these results showing that GFP⁺/CD138⁻ cells already express the master regulator of plasma cell *Prdm1* and the secreted form of Igu heavy chain, together with a downregulation of *Pax5* (Fig. 2C). These results seem to demonstrate that IgJ/GFP expression appears very early during the process of terminal differentiation of the B cell lineage, before the expression of CD138 and should therefore be an efficient marker of the previously described pre-plasmablast population [14,15]. However, to verify if these cells are all engaged in the plasmablast fate, we sorted GFP⁻/CD138⁻ and GFP⁺/CD138⁻ cells at 48h and restimulated them for 48h or 96h with LPS. After 48h of LPS stimulation of the sorted cells, few GFP⁻ cells began to express GFP together with CD138. By contrast, a large part of the GFP⁺ cells became CD138⁺. However, a significant proportion remained CD138⁻ (Fig. 2D) revealing that GFP⁺ cells are not necessarily committed to the terminal differentiation or that a population of CD138⁻ secreting cells can persist even after the induction of the PC transcriptional switch. We did not succeed to analyze the fate of GFP⁺ cells after 96h of stimulation since most of the cells died (not shown). This result could be the consequence of a different sensitivity for apoptosis of cells engaged in the terminal differentiation and requires more precise investigations.

IgJ⁺ CD138⁻ cells are germinal center B cells.

The early expression of GFP during the plasma cell differentiation process in vitro led us to explore the origin and localization of the GFP^{int} population in IgJ^{GFP} mice. First, phenotypic characterization was carried out using flow cytometry analyses on 8 days SRBC immunized mice. Strikingly, we showed that B220⁺/GFP^{int} cells express the markers of germinal centers GL7 and Fas together with a high expression of CMHII (Fig. 3A). Some of the GFP^{int} B cells are IgH-switched expressing IgG1 together with GL7 (Fig. 3A). Interestingly, IgH-switched cells that do not express GFP are also GL7⁻ and can therefore be considered as post-GC memory B cells (Fig. 3A, bottom panel). About 75% of the GL7⁺ B cells in spleen are GFP positive. Similar results were obtained with PNA/Fas staining in Peyers' patches (Supporting Information Fig.1). We showed that the remaining GFP⁻/GL7⁺ cells mostly display membrane IgD expression together with the absence of Fas and are therefore certainly pre-GC or immature GC cells already expressing GL7 (Fig. 3B). Further characterization revealed that about 75% of GFP^{int} B cells are CXCR4⁺ consistent with a centroblast phenotype (Fig. 3B). We did not detect any difference in GFP level between CXCR4⁺ centroblast and CXCR4⁻ centrocytes suggesting that IgJ is equivalently expressed in all GC compartments and can therefore be considered as a pan-GC B cell marker (Fig. 3B). To further characterize these IgJ-expressing B cells, we performed transcriptional analyses on sorted GL7⁺/GFP^{int} cells from spleen. Consistent with their GC phenotype, GFP⁺ B cells express high amount of *Aicda* gene together with a significant decrease of the anti-apoptotic transcription factor *Bcl2* compared with GFP⁻ B cells. As expected, they also express increased amount of IgJ transcripts compared with GFP⁻ B cells. Interestingly, GFP^{int} B cells do not express increased amount of plasma cell transcription factors like *Prdm1* or *Xbp1* but display a significant reduction of about 7 fold of *Pax5* (Fig. 3C). They also display a high mutation rate

demonstrating that they fully participate to the GC reaction (Table 1). Finally, immunofluorescence on spleen sections confirmed the GC nature of the GFP^{int} cells which colocalized with GL7⁺ B cells in follicles (Fig. 4A and B). Consistent with flow cytometry results, GFP^{high} plasma cells are present mainly in the extrafollicular and peri-arteriolar areas (Fig. 4C). Other secondary lymphoid organs were analyzed and confirmed the GC localization of the GFP^{int} cells and the PC origin of the GFP^{high} cells (Fig. 4D)

Kinetic of appearance of IgJ/GFP^{int} cells upon immunization.

The kinetic of appearance of GFP^{int} cells was monitored in non-immunized, 3 days and 8 days SRBC immunized mice. In non-immunized mice, we detected only few GFP^{int} and GFP^{high} cells corresponding to the low number of GC B cells and PCs (Fig. 4A and B). By contrast, we readily observed both GFP positive populations in 3 days immunized mice together with the increased number of GL7⁺ GC B cells and PCs (Fig. 4A and B). In these two conditions, the GFP^{int} cells only represent about 50% of the total GL7⁺ B cells with a slight increase in day 3 (Fig. 4C). But once again, when we characterized the GL7⁺/GFP⁻ cells, we observed that about 70% of this population also display a strong expression of IgD and consequently, can certainly not be considered as mature GC cells (Fig. 4D). By contrast, only very few GFP⁺ B cells express IgD. At day 8 after immunization, the two populations of GFP^{int} and GFP^{high} cells are substantially increased together with the number of GL7⁺ B cells and the CD138⁺ PCs respectively. As previously depicted in Fig. 3B, more than 75% of the GL7⁺ GC B cells are GFP^{int} and most of the remaining GL7⁺/GFP⁻ cells are IgD positive (Fig 4B). Collectively, these results show that IgJ expression is not only induced in PCs but is also a hallmark of mature GC B cells that accumulate during the immune response.

A significant proportion of IgJ⁺ GC B cells secrete low but detectable amounts of immunoglobulins.

In vitro stimulations depicted in Fig. 2C showed that GFP⁺/CD138⁻ B cells are secreting cells. We thus wondered if GFP^{int} GC B cells observed in spleen and PP of IgJ-GFP mice also secreted their Igs. We first performed Igκ-specific ELISPOT on sorted GFP⁻/B220⁺, GFP^{int}/B220⁺ and GFP⁺/CD138⁺ cells from 8 days SRBC-immunized mice. As expected, most of the CD138⁺ PC secrete large amount of κ chain. Interestingly, we also detected spots in GFP^{int}/B220⁺ cells but almost no spot in GFP⁻/B220⁺ cells (Fig. 4A). The spots areas were heterogeneous with few large spots and many smaller but detectable spots (Fig. 4A, bottom panel). The precise count of secreting cells was difficult to establish due to the small size of spots. Using Image J image retreatment, we estimated that about 5 to 10% of GFP^{int}/B220⁺ cells secrete Igκ chains. We obtained similar results with IgM-specific ELISPOTs demonstrating that the secretion is not restricted to free κ light chain but also involves IgH chains that switched from membrane to secreted form (Fig. 4B).

Discussion

This study shed light on a yet unknown pattern of expression of the IgJ chain in mouse. The lack of reliable antibodies has long precluded the efficient characterization of the IgJ-expressing cells in mouse. Here, using a transgenic reporter system in which the GFP gene was placed under the control of the IgJ promoter/enhancer, we show that IgJ chain is expressed in almost all PCs in mouse, independently of their localization in spleen, bone marrow, lamina propria or Peyer's patches. This first result is in contradiction with the study of Erlandsson et al. [20] in which the insertion of a suicide gene in the IgJ locus did not substantially modified secreted Ig levels in sera from mutant mice. However, even if we did not detect GFP expression in bone marrow B cells, it was previously shown that IgJ gene could be expressed at low level during pre-B to immature B cell stage. As the suicide gene used in their study, DT-A, was described as extremely toxic for mammalian cells [24], we can speculate that mature B cells arising from the bone marrow were enriched in cells that have mutated their DT-A gene. Additionally, we also detected few GFP⁻ PCs corresponding to less than 5% of total CD138⁺ cells. Such cells in the DT-A model are certainly favoured to proceed to terminal differentiation during the immune response. Accordingly, it is worth to note that Ig secretion in the DT-A model was more diminished during early than late immune response.

Our transgenic model allowed us to precisely determine the stages of induction of the IgJ chain in vitro, following LPS stimulation of primary B cells. We show that IgJ/GFP is expressed earlier than CD138, a result which could be consistent with PPBs, an early subset of antibody secreting cells recently described by Kallies et al. [14]. Using mice rendered *prdm1*-deficient by the targeted insertion of a GFP gene, they characterized a population of low secreting cells that express IgJ together with markers of PC differentiation like XBP1 and

IRF4. However, in contrast with PPBs described by Kallies et al. [14], the GFP⁺/CD138⁻ cells in our study secrete high amounts of Ig, comparable to CD138⁺ cells. This difference could account for the absence of BLIMP1 in their model, limiting the secretion rate of Ig chains. Whether PPBs in their study and our GFP⁺/CD138⁻ cells represent different stages of PC differentiation or an equivalent population that simply differs due to the absence or presence of BLIMP1, remains to be addressed. In any cases, IgJ expression appears as a reliable marker of antibody secreting cells in vitro as already shown in human B cells [16,25,26] and the IgJ^{GFP} model will be useful to accurately study the early steps of the PC differentiation.

Another striking result obtained in the present work is the presence of a distinct population of B cells expressing intermediate levels of GFP in secondary lymphoid organs. We demonstrate that these cells belong to the GC subset and that they represent the major part of the mature GC B cell pool. It is interesting to note that no other B-cells were positive for GFP either in spleen, Peyers' patches or bone marrow. This observation emphasizes a yet unknown tight regulation of the IgJ chain expression in vivo. Conflicting data concerning this regulation have emerged during the last decades from immunohistochemical and transcriptional studies. IgJ transcripts and protein were detected in most of the antibody-secreting cell but also in some immature and mature B cell [16]. However, most of the studies were carried out on immortalized tumor cells in which the normal regulation of gene expression may be questioned. Here, we show that in vivo, beside the overall expression in PCs, IgJ is restricted to B cells engaged in a GC reaction but not in other B cell compartments. Molecular studies on the regulation of the IgJ expression have demonstrated its dependence upon IL-2 that induces a chromatin remodelling of the locus allowing its subsequent opening and constitutive activation [21]. This T-cell specific cytokine is also implicated in the induction of the PC differentiation program of B cells [27,28]. In GCs, the close proximity of Tfh cells, shown to produce IL-2 [29], and B cells could then account for the IgJ/GFP expression observed in our

model. Interestingly, Tfh cells are also characterized by the production of IL-21, a potent activator of the PC differentiation [30]. IL-21, like IL-2, trigger the activation of STAT5 that was described as crucial for the induction of the IgJ chain [21].

PAX5, the master regulator of B cell identity [31], is one of the best-characterized inhibitor of IgJ expression [23,32]. Accordingly, GFP^{int} B cells present a significant reduction of *Pax5* expression but no change in *Prdm1* or *Xbp1* expression. Whether the change in *Pax5* expression is due to the sole influence of only few differentiated cells or a general downregulation in all GC B cells remains to be addressed. However, since we and others [33] have shown that IgJ expression in vitro is associated with the secretion of Igs, the decreased expression of *Pax5* together with the presence of IgJ in GC B cells obviously raises the question of their secretion status. In ELISPOT studies, we detected about 5 to 10% of GC GFP^{int} B cells that produce readily detectable amounts of Igs. Thus, all GFP^{int} B cells do not secrete Igs or, at least, at rates detectable by conventional techniques of single cell analysis. It was previously shown that few centrocytes already express some markers of PC differentiation like IRF4 and BLIMP1 and could account for this population of GC secreting B cells [34]. But this small population can explain neither the overall GFP expression in GC B cells of IgJ^{GFP} mice, nor the significant decrease of *Pax5* expression together with the absence of variation of other PC transcription factors. In fact, our findings are consistent with the model in which a decrease of PAX5 is the first molecular event of PC differentiation [2,14]. An attractive interpretation of these results could be that most of GC B cells are prepared to terminal differentiation thanks to this decrease of PAX5, but only centrocytes that receive a secondary signal, for example induced by IRF4 in the light zone, could definitely enter into the PC differentiation.

Further investigations will be carried out to more accurately characterize GFP^{int} GC B cells in light of the unsuspected expression of IgJ chain, so far considered as a marker of PC

differentiation. It will be interesting to determine if all GC B cells bear other marks of a PBB stage of development as IgJ expression and the decrease of *Pax5* seem to indicate. Notably, the secretion status of the GC B cells deserves to be more precisely assessed. The secretion by B cells of Igs with increasing affinity could induce a competition with the BCR for the Ag presented by follicular dendritic cells and this could have important consequences on the regulation and fate of the GC reaction. Beside the reassessment of the IgJ expression in mouse, IgJ^{GFP} mice will represent an interesting tool to study both PC and GC development.

Acknowledgments: We would like to thank the staff of the animal facility at the IFR 145 (Limoges, France), M. Fradet and C. Ouk-Martin (Cytometry Imaging and Mathematics platform). This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin. FL and AB are funded by French government fellowships.

References:

1. Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM: **Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches.** *Semin. Immunol* 2008, **20**:49–58.
2. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM: **Plasma cell development and survival.** *Immunol. Rev* 2010, **237**:140–159.
3. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R: **Control systems and decision making for antibody production.** *Nat. Immunol* 2010, **11**:681–688.
4. Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ: **Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics.** *J. Immunol* 2010, **185**:3117–3125.
5. Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M: **Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells.** *Immunity* 2006, **24**:269–281.
6. Nera K-P, Kohonen P, Narvi E, Peippo A, Mustonen L, Terho P, Koskela K, Buerstedde J-M, Lassila O: **Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation.** *Immunity* 2006, **24**:283–293.
7. Tunyaplin C, Shaffer AL, Angelin-Duclos CD, Yu X, Staudt LM, Calame KL: **Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation.** *J. Immunol.* 2004, **173**:1158–1165.
8. Muto A, Ochiai K, Kimura Y, Itoh-Nakadai A, Calame KL, Ikebe D, Tashiro S, Igarashi K: **Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch.** *EMBO J.* 2010, **29**:4048–4061.

9. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H: **Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation.** *Immunity* 2006, **25**:225–236.
10. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, Ludwig T, Rajewsky K, Dalla-Favera R: **Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination.** *Nat. Immunol* 2006, **7**:773–782.
11. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltnane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, et al.: **Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program.** *Immunity* 2002, **17**:51–62.
12. Lin K-I, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K: **Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells.** *Mol. Cell. Biol* 2002, **22**:4771–4780.
13. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravallesse EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH: **Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1.** *Nature* 2001, **412**:300–307.
14. Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, Pridans C, Emslie D, McKenzie BS, Lew AM, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tarlinton DM, et al.: **Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1.** *Immunity* 2007, **26**:555–566.
15. Jourdan M, Caraux A, Caron G, Robert N, Fiol G, Rème T, Bolloré K, Vendrell J-P, Le Gallou S, Mourcin F, et al.: **Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation.** *J. Immunol.* 2011, **187**:3931–3941.

16. Koshland ME: **The coming of age of the immunoglobulin J chain.** *Annu. Rev. Immunol.* 1985, **3**:425–453.
17. Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P: **The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA.** *J. Immunol.* 2001, **167**:5185–5192.
18. Bjerke K, Brandtzaeg P: **Terminally differentiated human intestinal B cells. J chain expression of IgA and IgG subclass-producing immunocytes in the distal ileum compared with mesenteric and peripheral lymph nodes.** *Clin. Exp. Immunol.* 1990, **82**:411–415.
19. Brandtzaeg P, Johansen F-E: **Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties.** *Immunol. Rev.* 2005, **206**:32–63.
20. Erlandsson L, Akerblad P, Vingsbo-Lundberg C, Kallberg E, Lycke N, Leanderson T: **Joining chain-expressing and -nonexpressing B cell populations in the mouse.** *J. Exp. Med.* 2001, **194**:557–570.
21. Kang CJ, Sheridan C, Koshland ME: **A stage-specific enhancer of immunoglobulin J chain gene is induced by interleukin-2 in a presecretor B cell stage.** *Immunity* 1998, **8**:285–295.
22. Szabó PE, Tang S-HE, Reed MR, Silva FJ, Tsark WMK, Mann JR: **The chicken beta-globin insulator element conveys chromatin boundary activity but not imprinting at the mouse Igf2/H19 domain.** *Development* 2002, **129**:897–904.
23. Wallin JJ, Rinkenberger JL, Rao S, Gackstetter ER, Koshland ME, Zwollo P: **B cell-specific activator protein prevents two activator factors from binding to the**

- immunoglobulin J chain promoter until the antigen-driven stages of B cell development.** *J. Biol. Chem.* 1999, **274**:15959–15965.
24. Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y: **One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell.** *Cell* 1978, **15**:245–250.
25. Brandtzaeg P: **Immunohistochemical characterization of intracellular J-chain and binding site for secretory component (SC) in human immunoglobulin (Ig)-producing cells.** *Mol. Immunol.* 1983, **20**:941–966.
26. Hajdu I, Moldoveanu Z, Cooper MD, Mestecky J: **Ultrastructural studies of human lymphoid cells. mu and J chain expression as a function of B cell differentiation.** *J. Exp. Med* 1983, **158**:1993–2006.
27. Emslie D, D’Costa K, Hasbold J, Metcalf D, Takatsu K, Hodgkin PO, Corcoran LM: **Oct2 enhances antibody-secreting cell differentiation through regulation of IL-5 receptor alpha chain expression on activated B cells.** *J. Exp. Med.* 2008, **205**:409–421.
28. Le Gallou S, Caron G, Delaloy C, Rossille D, Tarte K, Fest T: **IL-2 Requirement for Human Plasma Cell Generation: Coupling Differentiation and Proliferation by Enhancing MAPK-ERK Signaling [Internet].** *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2012, doi:10.4049/jimmunol.1200301.
29. Lüthje K, Kallies A, Shimohakamada Y, Belz GT, Light A, Tarlinton DM, Nutt SL: **The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse.** *Nature Immunology* 2012, **13**:491–498.

30. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst A-M, Robbins R, Da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ, Lipsky PE: **IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells.** *J. Immunol.* 2005, **175**:7867–7879.
31. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M: **Pax5: the guardian of B cell identity and function.** *Nat. Immunol* 2007, **8**:463–470.
32. Rinkenberger JL, Wallin JJ, Johnson KW, Koshland ME: **An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene.** *Immunity* 1996, **5**:377–386.
33. Matsui K, Nakanishi K, Cohen DI, Hada T, Furuyama J, Hamaoka T, Higashino K: **B cell response pathways regulated by IL-5 and IL-2. Secretory microH chain-mRNA and J chain mRNA expression are separately controlled events.** *J. Immunol.* 1989, **142**:2918–2923.
34. Cattoretti G, Shaknovich R, Smith PM, Jäck H-M, Murty VV, Alobeid B: **Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance.** *J. Immunol.* 2006, **177**:6930–6939.

Figures legends:

Figure 1 : The vast majority of PCs expresses IgJ chain. (A) Flow cytometry analyses of GFP expression in spleen and bone marrow B cells (left) and PCs (right) of IgJ^{GFP} mice. Two distinct populations of GFP expressing cells are observed (B) Flow cytometry analyses of GFP expression among PCs IgJ^{GFP} mice. PCs are gated based on the CD138⁺/B220^{low} staining (left) and analyzed for GFP expression (right). Percentages indicate the proportion of GFP-expressing PCs. Data shown in (A) and (B) are representative of 10 independent experiments with at least 2 mice of each strain. (C) Intracellular staining of IgJ chain in the different GFP⁺ and GFP⁻ populations observed in spleen cells of IgJ^{GFP} 13 mice. Data shown are representative of 4 independent experiments with at least 2 mice of each strain.

Figure 2 : IgJ expression is an early marker of PC differentiation. Flow cytometry analyses LPS-stimulated splenocytes from IgJ^{GFP} 13 mice at 48h and 72h. B220⁺/GFP^{int} cells are framed and percentages are indicated. GFP⁺ population framed in the left panel appears in black in the subsequent graphs. Percentages of CD138⁺ plasmablasts are indicated (middle) and the expression of CD138 among GFP⁺ cells is shown in the right panel. Data shown are representative of 10 independent experiments with at least 2 mice. (B) Representative ELISPOT results from LPS-stimulated cells sorted at 72h according to the GFP and CD138 expression as indicated in images. Data shown are representative of 3 independent sorting experiments. (C) Gene expression relative to *Gapdh* of sorted CD138⁻/GFP⁻, CD138⁻/GFP⁺ and CD138⁺/GFP⁺ cells. Results are shown as fold-change expression compared to the CD138⁻/GFP⁺ cells. Results are from 3 independent sorting experiments. Data are shown as mean \pm SD. (D) Analysis of the fate of the CD138⁻/GFP⁺ preplasmablast population. After 48h of LPS stimulation, CD138⁻ cells are sorted based on their expression of GFP and restimulated with LPS for 48h. Then, they are analyzed for their expression of GFP and

CD138. Data shown and percentages indicated are representative of 5 independent experiments.

Figure 3: GFP^{int} cells are GC B cells. (A) Flow cytometric characterization of the GFP^{int} population in spleen cells of 8 days immunized IgJ^{GFP} 13 mice. GFP^{int}/B220⁺ cells are framed in the left graph appears in black in the subsequent analyses for GL7, Fas, CMHII and IgG1 expression (right panel). GL7 and GFP expression in IgG1⁺ B cells is also shown. (B) Analysis of GFP expression among B220⁺/GL7⁺ GC B cells. B220⁺/GFP^{int} cells are framed and appear in black in the subsequent analyses for IgD, Fas and CXCR4 expression. Percentages of each populations are indicated. Data shown are representative of 4 independent experiments with at least 2 mice. (C) Transcription analysis of sorted B220⁺/GFP⁻, B220⁺/GFP^{int} and CD138⁺/GFP^{high} cells from spleens of IgJGFP 13 mice. Fold change expression was established compared to B220⁺/GFP⁻ B cells with *Gapdh* as housekeeping gene. Data are pooled from 7 experiments in which spleens from 2 mice were pooled and sorted, except for CD138⁺/GFP^{high} cells that were sorted in 5 experiments. Results are expressed in log scale as mean + SEM and differences were evaluated using a Student's *t* test (ns, non significant; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001).

Figure 4: Localization of the GFP⁺ cells in mouse organs. (A) Confocal microscopy analysis of spleen section from 8 days immunized IgJ^{GFP} mice stained with anti-B220 (blue) and GL7 (red) and GFP (green). A low GFP staining is colocalized with GL7⁺ in GCs and high GFP cells are located outside of the B220⁺ follicle (white star) (Scale bar: 200 μm). (B) Magnification of GCs shown in (A) (white frame). Note the presence of GFP^{high} cells that are located at the periphery of GCs and are certainly newly formed PCs that egress from the GCs (arrows) (Scale bar: 50 μm). (C) Analysis of T-cell zone containing few B220⁺ B cells and a significant number of PCs that coexpress GFP (green) and CD138 (red) but not B220 (blue) (Scale bar: 50 μm). (D) Section of lamina propria cavities with large number of

CD138⁺/GFP^{high} PCs and few B220⁺ B cells (Scale bar: 50 μ m). Data shown are representative of at least 6 different mice from 3 independent experiments.

Figure 5 : GFP^{int} cells accumulate in GCs following immunization. (A) Induction of GFP in B cells and PCs following SRBC immunization was analysed by flow cytometry. Percentages of GFP^{int} and GFP^{high} cells are indicated. Both GFP^{int} GC B cells and GFP^{high} PCs accumulate during the immunization. (B) Accumulation of PCs during immunization as followed by CD138 staining. (C) Analyses of the GC B cells based on GL7 and GFP staining. Note the accumulation of double expressing cells during the immunization. Percentages in bold represent GL7⁺ B cells among total B220⁺ B cells. Other percentages indicate the proportion of GFP^{int} and GFP⁻ cells among the GL7⁺ population. (D) IgD expression in GL7⁺ B cells. At day 8, almost all GL7⁺/IgD⁻ are GFP^{int}. All data and percentages shown are representative of 2 independent experiments with at 2 mice.

Figure 6: A significant proportion of GC B cells secrete their Igs. (A) ELISPOTs specific for κ light chain were performed on sorted B220⁺/GFP⁻ (left), B220⁺/GFP^{int} (middle) and CD138⁺/GFP^{high} cells. For B220⁺/GFP⁻ and B220⁺/GFP^{int}, data represented are from wells with 5000 sorted cells and 1000 cells for CD138⁺/GFP^{high} cells. A magnification of the wells are represented to show the large number of small spots obtained with the B220⁺/GFP⁺ cells. (B) ELISPOTs specific for IgM with the same configuration as in (A). Data shown are from 5 independent experiments with at least 2 mice.

Table 1: Intronic Jk5 mutation rates in sorted B cells populations of IgJ^{GFP} mice

Population	Frequency of mutations
B220 ⁺ GFP ⁻	0,0035
B220 ⁺ GFP ^{int}	0,0196
B220 ⁻ GFP ⁺	0,013

a, at least 10 sequences in each population were analyzed

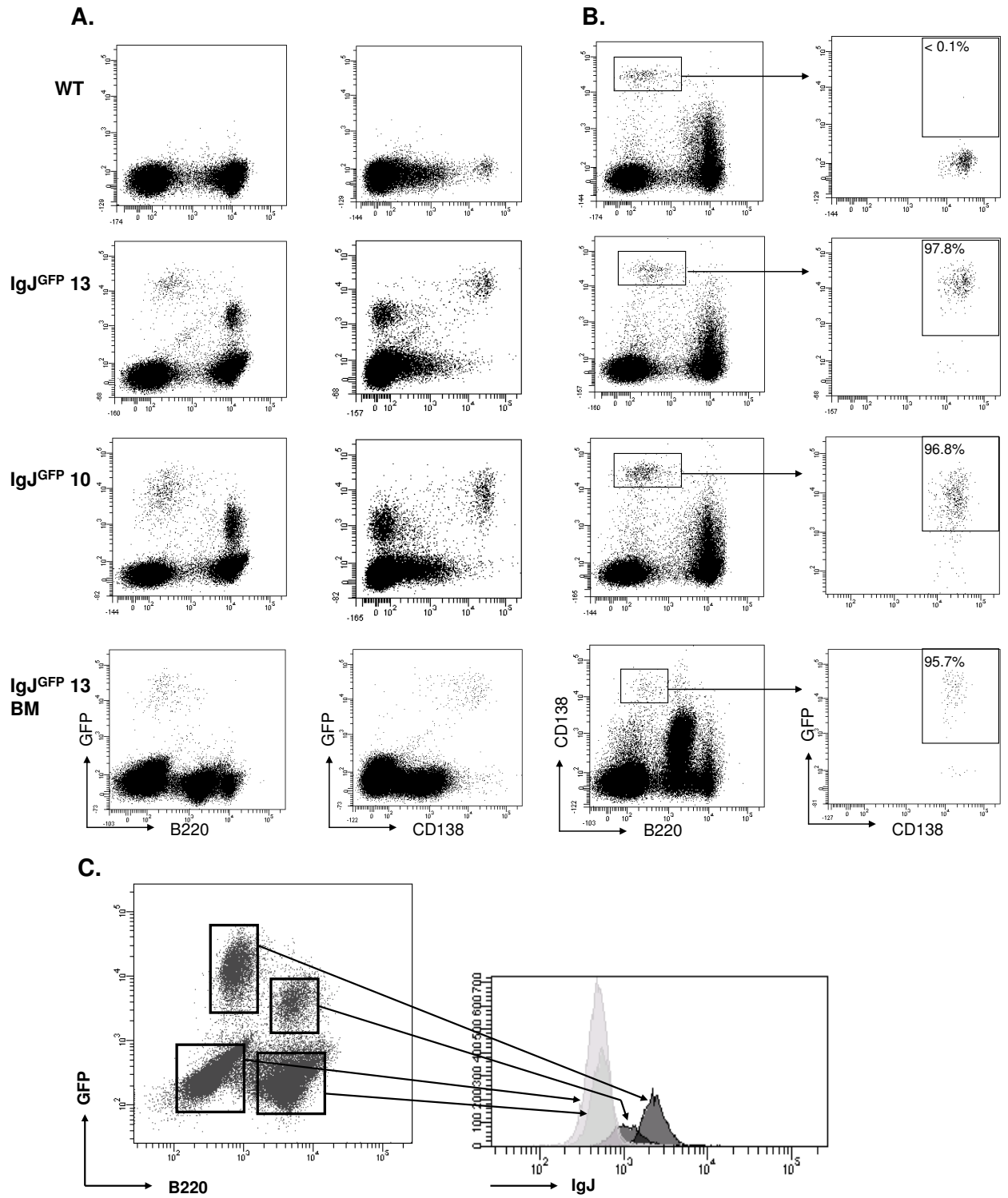


Figure 1

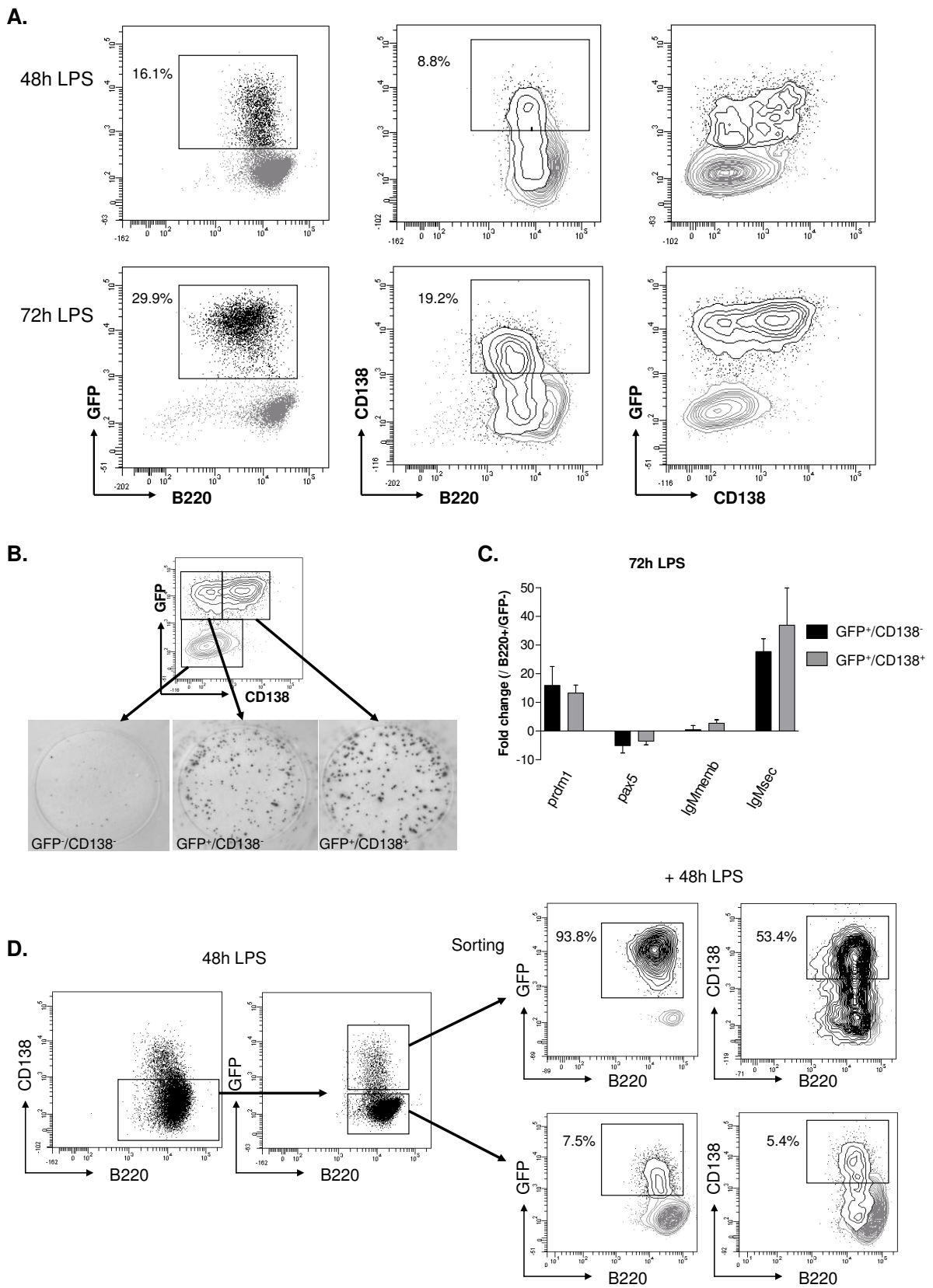


Figure 2

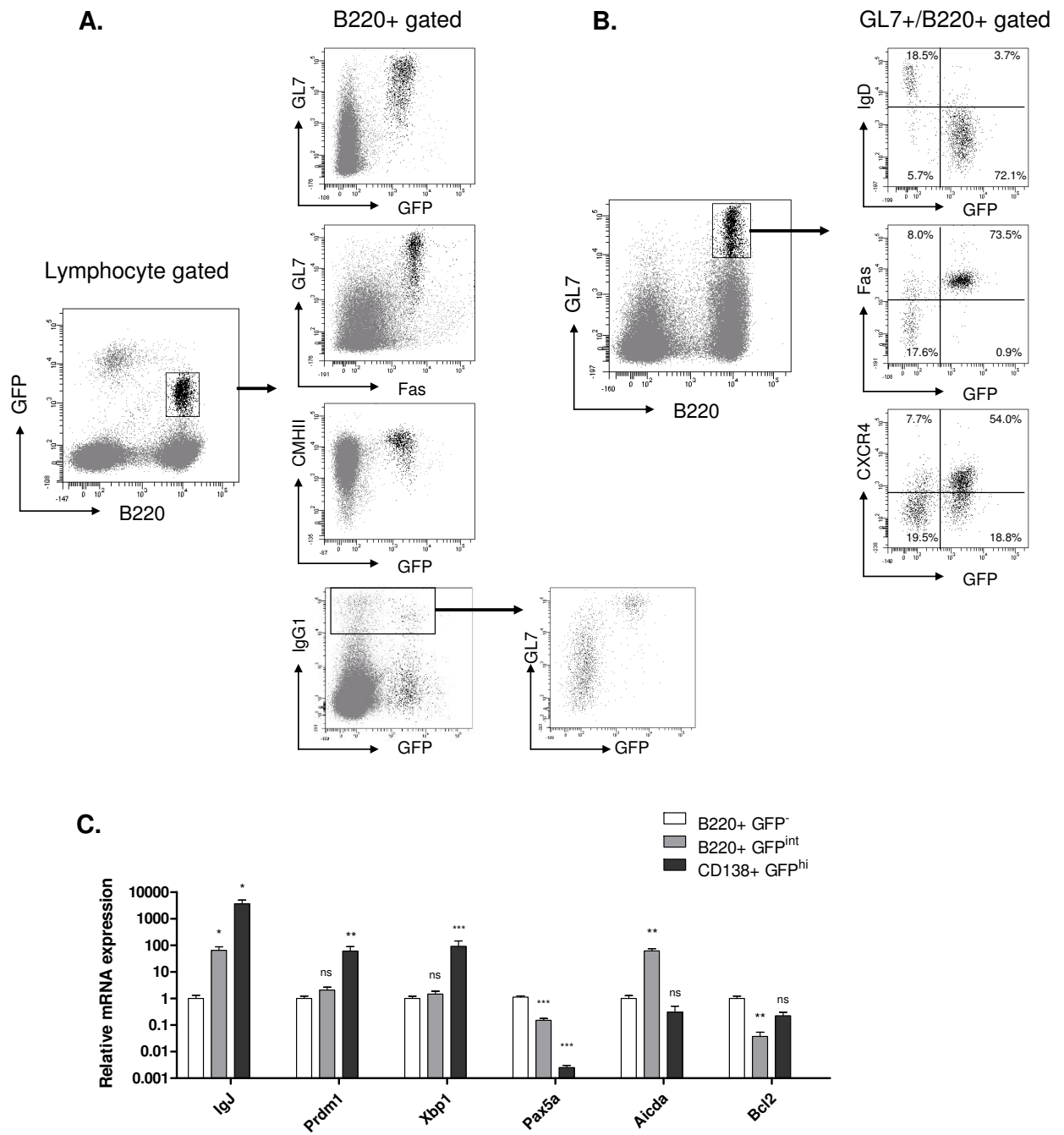


Figure 3

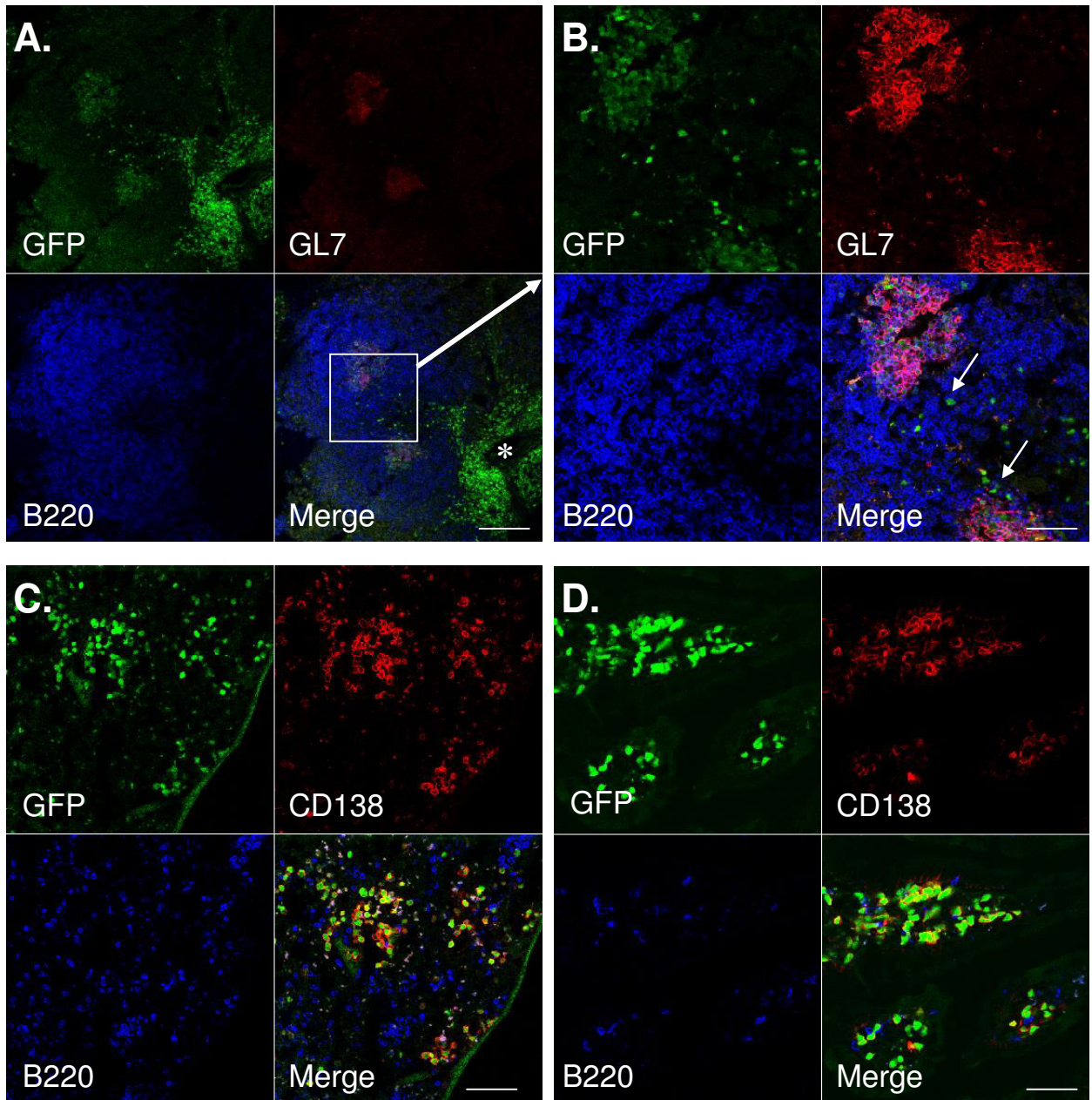


Figure 4

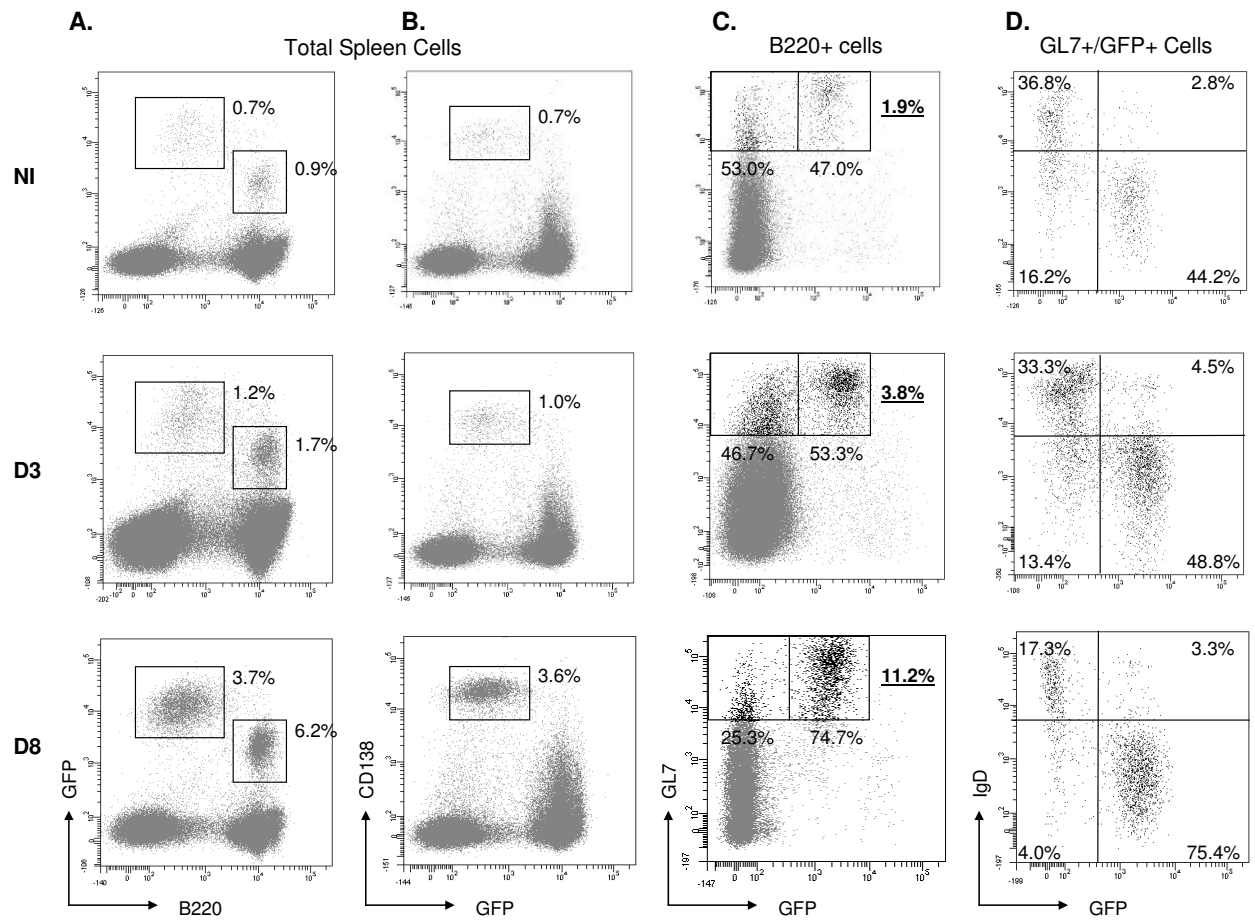


Figure 5

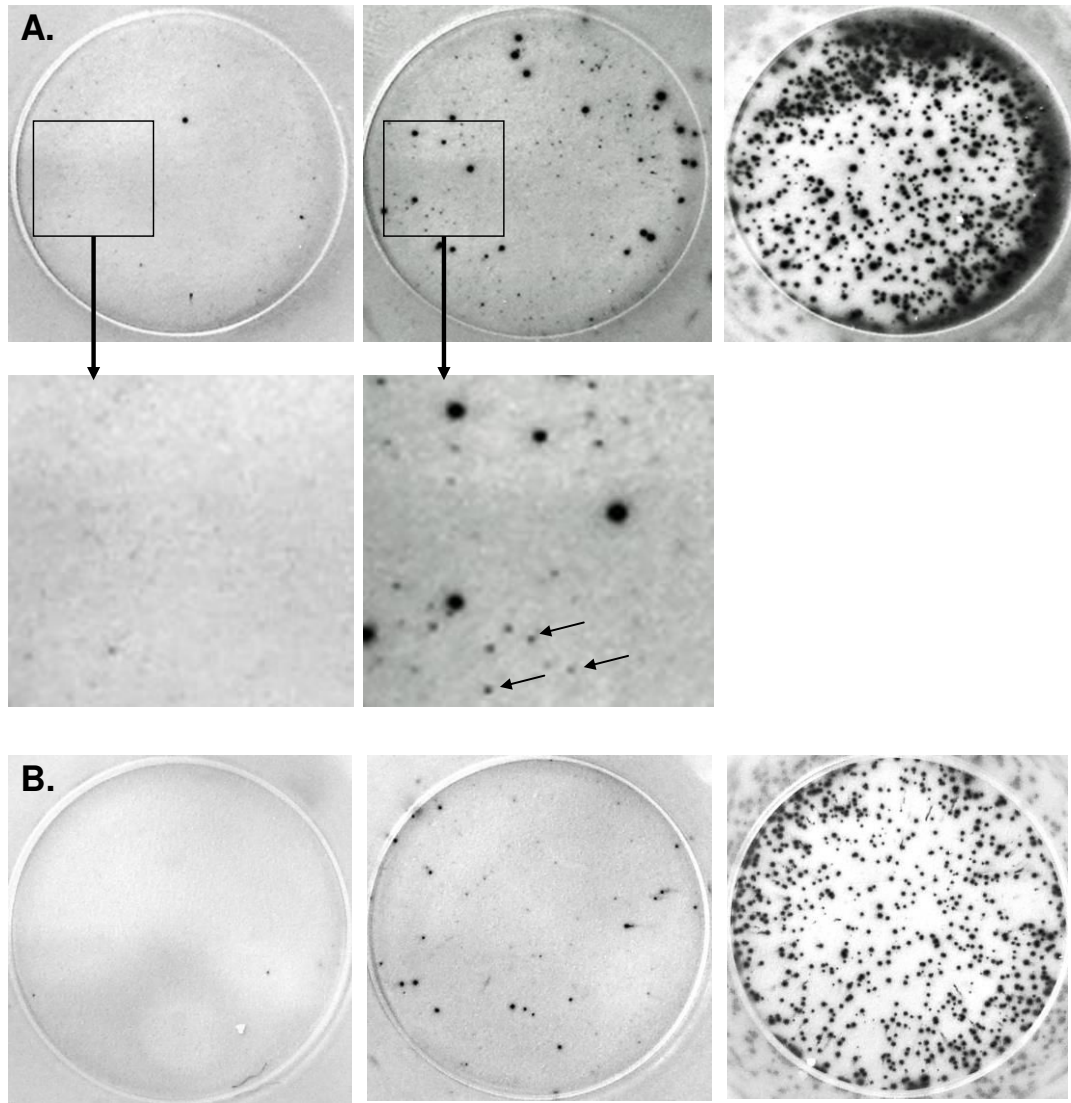


Figure 6

Supporting Information

Supplemental Table I. Antibodies used in flow cytometry and cell-sorting experiments

Antibody	Clone	Source
Anti-B220- BD Horizon™ V450	RA3-6B2	BD Biosciences
Anti-B220-APC	RA3-6B2	BioLegend
Anti-CD138-PE	281-1	BD Biosciences
Anti-CD138-APC	281-2	BD Biosciences
Anti-mouse kappa-PE	H139-52.1	Beckman Coulter
Anti-IgM-APC	II/41	eBioscience
Anti-IgD-APC	11-26C.2a	BD Biosciences
Anti-IgJ-PE ^a	NA	Santa Cruz Biotechnology
GL7-Alexa Fluor®647	GL7	BD Pharmingen
GL7-PE ^a	GL7	BD Pharmingen
Anti-CXCR4-PE	2B11	BD Pharmingen
Anti-IgG1-PE	A85-1	BD Pharmingen
PNA-Alexa Fluor®647	NA	Life Technologies
Anti-Fas-PE	JO2	BD Pharmingen

NA, Not applicable.

^a Coupled to PE with Lightning-Link® kit (Innova Biosciences)

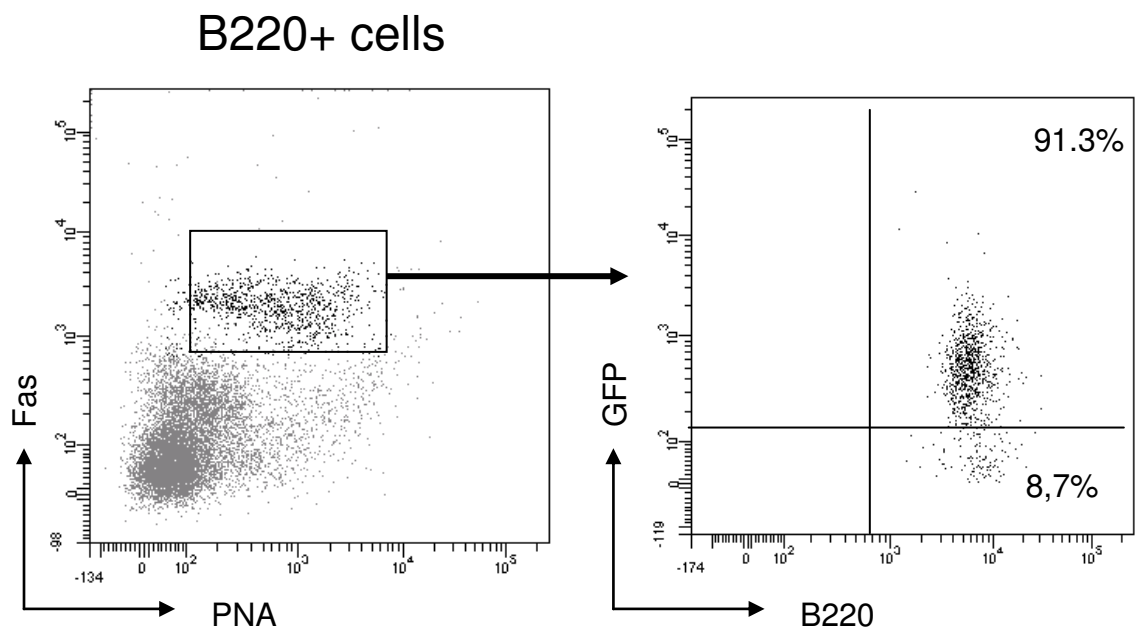


Figure S1: PNA⁺/Fas⁺ GC B cells in Peyer's patches express the IgJ chain. Flow cytometry analysis of PNA⁺/Fas⁺ B cells according to their expression of GFP in IgJ^{GFP} mice. Percentages indicate the proportion of GFP-expressing B cells among the population of GC B cells in Peyer's patches. Data shown are representative of 5 independent experiments.

Références Bibliographiques

- Ahearn, J.M., Fischer, M.B., Croix, D., Goerg, S., Ma, M., Xia, J., Zhou, X., Howard, R.G., Rothstein, T.L., and Carroll, M.C. (1996). Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 4, 251–262.
- Alexander, M.P., Nasr, S.H., Watson, D.C., Méndez, G.P., and Rennke, H.G. (2011). Renal crescentic alpha heavy chain deposition disease: a report of 3 cases and review of the literature. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 58, 621–625.
- 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.
- Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6834–6840.
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3, 1209–1219.
- Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K.I., and Calame, K. (2000). Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J. Immunol.* 165, 5462.
- Anthony, R.M., and Ravetch, J.V. (2010). A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J. Clin. Immunol.* 30 *Suppl 1*, S9–S14.
- Arosio, P., Owczarz, M., Müller-Späth, T., Rognoni, P., Beeg, M., Wu, H., Salmons, M., and Morbidelli, M. (2012). In vitro aggregation behavior of a non-amyloidogenic λ light chain dimer deriving from U266 multiple myeloma cells. *PLoS One* 7, e33372.
- Aucouturier, P., Khamlichi, A.A., Touchard, G., Justrabo, E., Cogne, M., Chauffert, B., Martin, F., and Preud'homme, J.-L. (1993a). Heavy-Chain Deposition Disease. *N. Engl. J. Med.* 329, 1389–1393.
- Aucouturier, P., Bauwens, M., Khamlichi, A.A., Denoroy, L., Spinelli, S., Touchard, G., Preud'homme, J.L., and Cogné, M. (1993b). Monoclonal Ig L chain and L chain V domain fragment crystallization in myeloma-associated Fanconi's syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 150, 3561–3568.
- Aucouturier, P., Khamlichi, A.A., Touchard, G., Justrabo, E., Cogne, M., Chauffert, B., Martin, F., and Preud'homme, J.L. (1993c). Brief report: heavy-chain deposition disease. *N. Engl. J. Med.* 329, 1389–1393.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279, 55117–55126.
- Ballantyne, J., Henry, D.L., Muller, J.R., Briere, F., Snapper, C.M., Kehry, M., and Marcu, K.B. (1998). Efficient recombination of a switch substrate retrovector in CD40-activated B lymphocytes: implications for the control of CH gene switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 1336–1347.

- Basnayake, K., Ying, W.-Z., Wang, P.-X., and Sanders, P.W. (2010). Immunoglobulin light chains activate tubular epithelial cells through redox signaling. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *21*, 1165–1173.
- Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* *109 Suppl*, S45–S55.
- 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.
- Batuman, V., Sastrasinh, M., and Sastrasinh, S. (1986). Light chain effects on alanine and glucose uptake by renal brush border membranes. *Kidney Int.* *30*, 662–665.
- Batuman, V., Verroust, P.J., Navar, G.L., Kaysen, J.H., Goda, F.O., Campbell, W.C., Simon, E., Pontillon, F., Lyles, M., Bruno, J., et al. (1998). Myeloma light chains are ligands for cubilin (gp280). *Am. J. Physiol.* *275*, F246–F254.
- Bébin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogné, N., Lecardeur, S., Cogné, M., and Pinaud, E. (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *184*, 3710–3717.
- Bellotti, V., Stoppini, M., Merlini, G., Zapponi, M.C., Meloni, M.L., Banfi, G., and Ferri, G. (1991). Amino acid sequence of k Sci, the Bence Jones protein isolated from a patient with light chain deposition disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1097*, 177–182.
- Bellotti, V., Mangione, P., and Merlini, G. (2000). Review: immunoglobulin light chain amyloidosis--the archetype of structural and pathogenic variability. *J. Struct. Biol.* *130*, 280–289.
- Bergman, L.W., and Kuehl, W.M. (1979). Formation of intermolecular disulfide bonds on nascent immunoglobulin polypeptides. *J. Biol. Chem.* *254*, 5690–5694.
- Berton, M.T., Uhr, J.W., and Vitetta, E.S. (1989). Synthesis of germ-line gamma 1 immunoglobulin heavy-chain transcripts in resting B cells: induction by interleukin 4 and inhibition by interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 2829–2833.
- Bertrand, F.E., Billips, L.G., Gartland, G.L., Kubagawa, H., and Schroeder, H.W. (1996). The J chain gene is transcribed during B and T lymphopoiesis in humans. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *156*, 4240–4244.
- Bianchi, G., Oliva, L., Cascio, P., Pengo, N., Fontana, F., Cerruti, F., Orsi, A., Pasqualetto, E., Mezghrani, A., Calbi, V., et al. (2009). The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood* *113*, 3040–3049.
- Boboila, C., Jankovic, M., Yan, C.T., Wang, J.H., Wesemann, D.R., Zhang, T., Fazeli, A., Feldman, L., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M., et al. (2010). Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3034–3039.
- 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.
- Bodin, K., Ellmerich, S., Kahan, M.C., Tennent, G.A., Loesch, A., Gilbertson, J.A., Hutchinson, W.L., Mangione, P.P., Gallimore, J.R., Millar, D.J., et al. (2010). Antibodies to human serum amyloid P component eliminate visceral amyloid deposits. *Nature* *468*, 93–97.

- Boes, M., Esau, C., Fischer, M.B., Schmidt, T., Carroll, M., and Chen, J. (1998). Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J. Immunol.* *160*, 4776.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E.M., and Corcoran, A.E. (2007). Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu. *Mol Cell Biol* *27*, 5523–5533.
- Bortnick, A., Chernova, I., Quinn, W.J., Mugnier, M., Cancro, M.P., and Allman, D. (2012). Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 5389–5396.
- Bosma, G.C., Kim, J., Urich, T., Fath, D.M., Cotticelli, M.G., Ruetsch, N.R., Radic, M.Z., and Bosma, M.J. (2002). DNA-dependent protein kinase activity is not required for immunoglobulin class switching. *J Exp Med* *196*, 1483–1495.
- Brachtel, E.F., Washiyama, M., Johnson, G.D., Tenner-Racz, K., Racz, P., and MacLennan, I.C. (1996). Differences in the germinal centres of palatine tonsils and lymph nodes. *Scand. J. Immunol.* *43*, 239–247.
- Brandts, J.F., Brennan, M., and Lung-Nan Lin, null (1977). Unfolding and refolding occur much faster for a proline-free proteins than for most proline-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 4178–4181.
- Brandtzaeg, P. (1995). Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *103*, 1–19.
- Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand. J. Immunol.* *70*, 505–515.
- Brandtzaeg, P., and Korsrud, F.R. (1984). Significance of different J chain profiles in human tissues: generation of IgA and IgM with binding site for secretory component is related to the J chain expressing capacity of the total local immunocyte population, including IgG and IgD producing cells, and depends on the clinical state of the tissue. *Clin. Exp. Immunol.* *58*, 709–718.
- Bridoux, F., Sirac, C., Hugue, V., Decourt, C., Thierry, A., Quellard, N., Abou-Ayache, R., Goujon, J.-M., Cogné, M., and Touchard, G. (2005). Fanconi's syndrome induced by a monoclonal V κ 3 light chain in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *45*, 749–757.
- Bridoux, F., Delbes, S., Sirac, C., Pourreau, F., Puyade, M., Desport, E., Jaccard, A., Femand, J.-P., and Touchard, G. (2012). [Renal disorders associated with monoclonal gammopathies: Diagnostic and therapeutic progress.]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983.
- Bruneval, P., Foidart, J.M., Nochy, D., Camilleri, J.P., and Bariety, J. (1985). Glomerular matrix proteins in nodular glomerulosclerosis in association with light chain deposition disease and diabetes mellitus. *Hum. Pathol.* *16*, 477–484.
- Calame, K.L., Lin, K.-I., and Tunyaplin, C. (2003). Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 205–230.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* *415*, 92–96.

- Carrasco, D.R., Sukhdeo, K., Protopopova, M., Sinha, R., Enos, M., Carrasco, D.E., Zheng, M., Mani, M., Henderson, J., Pinkus, G.S., et al. (2007). The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* 11, 349–360.
- Casellas, R., Shih, T.A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M.C. (2001). Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291, 1541–1544.
- 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.
- Castro, C.D., and Flajnik, M.F. (2014). Putting J chain back on the map: how might its expression define plasma cell development? *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 3248–3255.
- Cattaneo, A., and Neuberger, M.S. (1987). Polymeric immunoglobulin M is secreted by transfectants of non-lymphoid cells in the absence of immunoglobulin J chain. *EMBO J.* 6, 2753–2758.
- Cattoretti, G., Shaknovich, R., Smith, P.M., Jack, H.M., Murty, V.V., and Alobeid, B. (2006). Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *J. Immunol.* 177, 6930.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol. In press.*
- Cenci, S., Oliva, L., Cerruti, F., Milan, E., Bianchi, G., Raule, M., Mezghrani, A., Pasqualetto, E., Sitia, R., and Cascio, P. (2012). Pivotal Advance: Protein synthesis modulates responsiveness of differentiating and malignant plasma cells to proteasome inhibitors. *J. Leukoc. Biol.* 92, 921–931.
- Cerutti, A. (2010). Immunology. IgA changes the rules of memory. *Science* 328, 1646–1647.
- Cerutti, A., and Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740–750.
- Chahwan, R., Edelmann, W., Scharff, M.D., and Roa, S. (2012). AIDing antibody diversity by error-prone mismatch repair. *Semin. Immunol.* 24, 293–300.
- 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.
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol* 94, 157–214.
- Chaumeil, J., and Skok, J.A. (2012). The role of CTCF in regulating V(D)J recombination. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 153–159.
- Chauveau, C., Pinaud, E., and Cogne, M. (1998). Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur J Immunol* 28, 3048–3056.

- Chemin, G., Tinguely, A., Sirac, C., Lechouane, F., Duchez, S., Cogné, M., and Delpy, L. (2010). Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 5009–5017.
- Chen, Z., Koralov, S.B., Gendelman, M., Carroll, M.C., and Kelsoe, G. (2000). Humoral immune responses in Cr2^{-/-} mice: enhanced affinity maturation but impaired antibody persistence. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 4522–4532.
- Cheng, H.L., Vuong, B.Q., Basu, U., Franklin, A., Schwer, B., Astarita, J., Phan, R.T., Datta, A., Manis, J., Alt, F.W., et al. (2009). Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice. *Proc Natl Acad Sci U A* *106*, 2717–2722.
- Chesi, M., Robbiani, D.F., Sebag, M., Chng, W.J., Affer, M., Tiedemann, R., Valdez, R., Palmer, S.E., Haas, S.S., Stewart, A.K., et al. (2008). AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* *13*, 167–180.
- Cho, S.-J., and Kang, C.-J. (2005). A Stat5-overlapping site is critical for the IgJ enhancer activity in the plasma cells and bound by a ubiquitous protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 1897–1905.
- Choe, J., and Choi, Y.S. (1998). IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol.* *28*, 508–515.
- Chowdhury, D., and Sen, R. (2004). Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunol. Rev.* *200*, 182–196.
- Christensen, E.I., and Birn, H. (2001). Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *280*, F562–F573.
- Chu, V.T., and Berek, C. (2012). Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur. J. Immunol.* *42*, 130–137.
- Chu, V.T., Fröhlich, A., Steinhäuser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Löhning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* *12*, 151–159.
- Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* *24*, 343–349.
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., and Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat. Immunol.* *9*, 54–62.
- Clarke, S.H., and Arnold, L.W. (1998). B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig)M⁺ B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J. Exp. Med.* *187*, 1325–1334.
- Cogné, M., Mounir, S., Preud'homme, J.-L., Nau, F., and Guglielmi, P. (1988a). Burkitt's Lymphoma Cell Lines Producing Truncated P Immunoglobulin Heavy Chains Lacking Part of the Variable Region. *Eur. J. Immunol.* *18*, 1485–1490.
- Cogné, M., Bakhshi, A., Korsmeyer, S.J., and Guglielmi, P. (1988b). Gene mutations and alternate RNA splicing result in truncated Ig L chains in human gamma H chain disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *141*, 1738–1744.

- Cogné, M., Mounir, S., Aucouturier, P., Preud'homme, J.L., Nau, F., and Guglielmi, P. (1990). Immunoglobulin light chain transcripts with altered V regions in Burkitt's lymphoma cell lines producing short mu chains. *Eur. J. Immunol.* *20*, 1905–1910.
- Cogné, M., Preud'homme, J.L., Bauwens, M., Touchard, G., and Aucouturier, P. (1991). Structure of a monoclonal kappa chain of the V kappa IV subgroup in the kidney and plasma cells in light chain deposition disease. *J. Clin. Invest.* *87*, 2186–2190.
- Cogne, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H.L., and Alt, F.W. (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* *77*, 737–747.
- Cook, A.J.L., Oganessian, L., Harumal, P., Basten, A., Brink, R., and Jolly, C.J. (2003). Reduced switching in SCID B cells is associated with altered somatic mutation of recombined S regions. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *171*, 6556–6564.
- Corcoran, A.E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin. Immunol.* *17*, 141–154.
- Daniels, G.A., and Lieber, M.R. (1995). Strand specificity in the transcriptional targeting of recombination at immunoglobulin switch sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5625–5629.
- Danner, D., and Leder, P. (1985). Role of an RNA cleavage/poly(A) addition site in the production of membrane-bound and secreted IgM mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 8658–8662.
- Davis, A.C., Roux, K.H., and Shulman, M.J. (1988). On the structure of polymeric IgM. *Eur. J. Immunol.* *18*, 1001–1008.
- Decourt, C., Cogné, M., and Rocca, A. (1996). Structural peculiarities of a truncated V kappa III immunoglobulin light chain in myeloma with light chain deposition disease. *Clin. Exp. Immunol.* *106*, 357–361.
- Decourt, C., Touchard, G., Preud'homme, J.L., Vidal, R., Beaufils, H., Diemert, M.C., and Cogné, M. (1998). Complete primary sequences of two lambda immunoglobulin light chains in myelomas with nonamyloid (Randall-type) light chain deposition disease. *Am. J. Pathol.* *153*, 313–318.
- Decourt, C., Rocca, A., Bridoux, F., Vrtovsnik, F., Preud'homme, J.L., Cogné, M., and Touchard, G. (1999). Mutational analysis in murine models for myeloma-associated Fanconi's syndrome or cast myeloma nephropathy. *Blood* *94*, 3559–3566.
- Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol* *16*, 395–404.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* *24*, 269–281.
- Denoroy, L., Déret, S., and Aucouturier, P. (1994). Overrepresentation of the V kappa IV subgroup in light chain deposition disease. *Immunol. Lett.* *42*, 63–66.
- Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L.M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* *276*, 589–592.

- Déret, S., Denoroy, L., Lamarine, M., Vidal, R., Mougenot, B., Frangione, B., Stevens, F.J., Ronco, P.M., and Aucouturier, P. (1999). Kappa light chain-associated Fanconi's syndrome: molecular analysis of monoclonal immunoglobulin light chains from patients with and without intracellular crystals. *Protein Eng.* *12*, 363–369.
- Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W., and Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* *311*, 752–755.
- Desport, E., Bridoux, F., Sirac, C., Delbes, S., Bender, S., Fernandez, B., Quellard, N., Lacombe, C., Goujon, J.-M., Lavergne, D., et al. (2012). AL Amyloidosis. *Orphanet J. Rare Dis.* *7*, 54.
- DiLillo, D.J., Hamaguchi, Y., Ueda, Y., Yang, K., Uchida, J., Haas, K.M., Kelsoe, G., and Tedder, T.F. (2008). Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 361–371.
- Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J.M., and Ferguson, D.O. (2009). Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 808–813.
- Dispenzieri, A., Kyle, R., Merlini, G., Miguel, J.S., Ludwig, H., Hajek, R., Palumbo, A., Jagannath, S., Blade, J., Lonial, S., et al. (2009). International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* *23*, 215–224.
- Dispenzieri, A., Katzmann, J.A., Kyle, R.A., Larson, D.R., Melton, L.J., Colby, C.L., Therneau, T.M., Clark, R., Kumar, S.K., Bradwell, A., et al. (2010). Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* *375*, 1721–1728.
- 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.
- Donohoe, M.E., Zhang, L.-F., Xu, N., Shi, Y., and Lee, J.T. (2007). Identification of a Ctfc cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. *Mol. Cell* *25*, 43–56.
- Drayson, M., Begum, G., Basu, S., Makkuni, S., Dunn, J., Barth, N., and Child, J.A. (2006). Effects of paraprotein heavy and light chain types and free light chain load on survival in myeloma: an analysis of patients receiving conventional-dose chemotherapy in Medical Research Council UK multiple myeloma trials. *Blood* *108*, 2013–2019.
- Du, M., Diss, T.C., Xu, C., Peng, H., Isaacson, P.G., and Pan, L. (1996). Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia* *10*, 1190–1197.
- 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.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* *19*, 981–992.

- Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvaggio, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2011). The distal V(H) gene cluster of the Igh locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity* 34, 175–187.
- Edelman, G.M. (1970). The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. XI. Functional implications. *Biochemistry (Mosc.)* 9, 3197–3205.
- Edry, E., and Melamed, D. (2004). Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 4265–4271.
- Ehrenstein, M.R., O’Keefe, T.L., Davies, S.L., and Neuberger, M.S. (1998). Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10089.
- Eisen, H.N., and Siskind, G.W. (1964). VARIATIONS IN AFFINITIES OF ANTIBODIES DURING THE IMMUNE RESPONSE. *Biochemistry (Mosc.)* 3, 996–1008.
- Erlandsson, L., Andersson, K., Sigvardsson, M., Lycke, N., and Leanderson, T. (1998). Mice with an inactivated joining chain locus have perturbed IgM secretion. *Eur. J. Immunol.* 28, 2355–2365.
- Erlandsson, L., Akerblad, P., Vingsbo-Lundberg, C., Kallberg, E., Lycke, N., and Leanderson, T. (2001). Joining Chain–Expressing and–Nonexpressing B Cell Populations in the Mouse. *J. Exp. Med.* 194, 557.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Weller, S., Vuillier, F., Stary, A., Sarasin, A., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2004). DNA polymerase eta is involved in hypermutation occurring during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 199, 265–270.
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* 10, 375–384.
- Feige, M.J., Hagn, F., Esser, J., Kessler, H., and Buchner, J. (2007). Influence of the internal disulfide bridge on the folding pathway of the CL antibody domain. *J. Mol. Biol.* 365, 1232–1244.
- Feige, M.J., Hendershot, L.M., and Buchner, J. (2010). How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* 35, 189–198.
- Ferguson, A.R., Youd, M.E., and Corley, R.B. (2004). Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int. Immunol.* 16, 1411–1422.
- Ferro, V., Dredge, K., Liu, L., Hammond, E., Bytheway, I., Li, C., Johnstone, K., Karoli, T., Davis, K., Copeman, E., et al. (2007). PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis. *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 557–568.
- Fleig, S.V., and Humphreys, B.D. (2014). Rationale of mesenchymal stem cell therapy in kidney injury. *Nephron Clin. Pract.* 127, 75–80.
- Fooksman, D.R., Schwickert, T.A., Victora, G.D., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., and Skokos, D. (2010). Development and Migration of Plasma Cells in the Mouse Lymph Node. *Immunity* 33, 118–127.

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

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

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

Le Gallou, S., Caron, G., Delaloy, C., Rossille, D., Tarte, K., and Fest, T. (2012). IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 161–173.

Genereux, J.C., Qu, S., Zhou, M., Ryno, L.M., Wang, S., Shoulders, M.D., Kaufman, R.J., Lasmézas, C.I., Kelly, J.W., and Wiseman, R.L. (2015). Unfolded protein response-induced ERdj3 secretion links ER stress to extracellular proteostasis. *EMBO J.* 34, 4–19.

Gillmore, J.D., Tennent, G.A., Hutchinson, W.L., Gallimore, J.R., Lachmann, H.J., Goodman, H.J.B., Offer, M., Millar, D.J., Petrie, A., Hawkins, P.N., et al. (2010). Sustained pharmacological depletion of serum amyloid P component in patients with systemic amyloidosis. *Br. J. Haematol.* 148, 760–767.

Glenner, G.G., Terry, W., Harada, M., Isersky, C., and Page, D. (1971). Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. *Science* 172, 1150–1151.

Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2010). Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3117–3125.

Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., and Raphael, K. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676–682.

Gostissa, M., Schwer, B., Chang, A., Dong, J., Meyers, R.M., Marecki, G.T., Choi, V.W., Chiarle, R., Zarrin, A.A., and Alt, F.W. (2014). IgH class switching exploits a general property of two DNA breaks to be joined in cis over long chromosomal distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2644–2649.

Goto, Y., and Hamaguchi, K. (1981). Formation of the intrachain disulfide bond in the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Mol. Biol.* 146, 321–340.

Grandien, A., Modigliani, Y., Coutinho, A., and Andersson, J. (1993). Suppression of B cell differentiation by ligation of membrane-bound IgM. *Eur. J. Immunol.* 23, 1561–1565.

Guikema, J.E.J., Linehan, E.K., Tsuchimoto, D., Nakabeppu, Y., Strauss, P.R., Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2007). APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 204, 3017–3026.

Haas, I.G., and Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306, 387–389.

Han, L., and Yu, K. (2008). Altered kinetics of nonhomologous end joining and class switch recombination in ligase IV-deficient B cells. *J. Exp. Med.* 205, 2745–2753.

- Hartley, S.B., Cooke, M.P., Fulcher, D.A., Harris, A.W., Cory, S., Basten, A., and Goodnow, C.C. (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72, 325–335.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., and Herzenberg, L.A. (1983). The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* 157, 202–218.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 5099–5108.
- He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., Chen, H., and Qi, L. (2010). Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr.* 15, 13–25.
- Hein, K., Lorenz, M.G., Siebenkotten, G., Petry, K., Christine, R., and Radbruch, A. (1998). Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 188, 2369–2374.
- Hendershot, L.M. (1990). Immunoglobulin heavy chain and binding protein complexes are dissociated in vivo by light chain addition. *J. Cell Biol.* 111, 829–837.
- Hendershot, L., Bole, D., and Kearney, J.F. (1987). The role of immunoglobulin heavy chain binding protein in immunoglobulin transport. *Immunol. Today* 8, 111–114.
- Herrera, G.A., Shultz, J.J., Soong, S.J., and Sanders, P.W. (1994). Growth factors in monoclonal light-chain-related renal diseases. *Hum. Pathol.* 25, 883–892.
- Herrera, G.A., Turbat-Herrera, E.A., and Teng, J. (2011). Repair of damaged mesangium by rat mesenchymal stem cells (RMSCs) in a 6D (dimensional) live cell model. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* 18 Suppl 1, 29–31.
- Hertz, M., and Nemazee, D. (1997). BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity* 6, 429–436.
- Herzenberg, L.A. (2000). B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol. Rev.* 175, 9–22.
- Herzenberg, L.A., Baumgarth, N., and Wilshire, J.A. (2000). B-1 cell origins and VH repertoire determination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 252, 3–13.
- 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.
- Van den Hoven, M.J., Wijnhoven, T.J., Li, J.-P., Zcharia, E., Dijkman, H.B., Wismans, R.G., Rops, A.L., Lensen, J.F., van den Heuvel, L.P., van Kuppevelt, T.H., et al. (2008). Reduction of anionic sites in the glomerular basement membrane by heparanase does not lead to proteinuria. *Kidney Int.* 73, 278–287.
- Hu, C.-C.A., Dougan, S.K., McGehee, A.M., Love, J.C., and Ploegh, H.L. (2009). XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *EMBO J.* 28, 1624–1636.
- Hu, Y., Ericsson, I., Torseth, K., Methot, S.P., Sundheim, O., Liabakk, N.B., Slupphaug, G., Di Noia, J.M., Krokan, H.E., and Kavli, B. (2013). A combined nuclear and nucleolar localization motif in activation-induced cytidine deaminase (AID) controls immunoglobulin class switching. *J. Mol. Biol.* 425, 424–443.

- Huang, Z.Q., and Sanders, P.W. (1997). Localization of a single binding site for immunoglobulin light chains on human Tamm-Horsfall glycoprotein. *J. Clin. Invest.* *99*, 732–736.
- Huard, B., McKee, T., Bosshard, C., Durual, S., Matthes, T., Myit, S., Donze, O., Frossard, C., Chizzolini, C., Favre, C., et al. (2008). APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J. Clin. Invest.* *118*, 2887–2895.
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M., and Palm, W. (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* *264*, 415–420.
- Huntington, N.D., Xu, Y., Puthalakath, H., Light, A., Willis, S.N., Strasser, A., and Tarlinton, D.M. (2006). CD45 links the B cell receptor with cell survival and is required for the persistence of germinal centers. *Nat. Immunol.* *7*, 190–198.
- Hutchison, C.A., Batuman, V., Behrens, J., Bridoux, F., Sirac, C., Dispenzieri, A., Herrera, G.A., Lachmann, H., and Sanders, P.W. (2011). The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat. Rev. Nephrol.*
- International Myeloma Working Group (2003). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J. Haematol.* *121*, 749–757.
- Isobe, T., Kametani, F., and Shinoda, T. (1998). V-domain deposition of lambda Bence Jones protein in the renal tubular epithelial cells in a patient with the adult Fanconi syndrome with myeloma. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* *5*, 117–120.
- Jaccard, A., Moreau, P., Leblond, V., Leleu, X., Benboubker, L., Hermine, O., Recher, C., Asli, B., Lioure, B., Royer, B., et al. (2007). High-dose melphalan versus melphalan plus dexamethasone for AL amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1083–1093.
- Jaccard, A., Comenzo, R.L., Hari, P., Hawkins, P.N., Roussel, M., Morel, P., Macro, M., Pellegrin, J.-L., Lazaro, E., Mohty, D., et al. (2014a). Efficacy of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone in treatment-naïve patients with high-risk cardiac AL amyloidosis (Mayo Clinic stage III). *Haematologica* *99*, 1479–1485.
- Jaccard, A., Comenzo, R.L., Hari, P., Hawkins, P.N., Roussel, M., Morel, P., Macro, M., Pellegrin, J.-L., Lazaro, E., Mohty, D., et al. (2014b). Efficacy of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone in treatment-naïve patients with high-risk cardiac AL amyloidosis (Mayo Clinic stage III). *Haematologica* *99*, 1479–1485.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991). Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* *354*, 389–392.
- Janeway, C.A. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* *13*, 11–16.
- Jhunjhunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., and Murre, C. (2009). Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. *Cell* *138*, 435–448.
- Johansen, F.E., Braathen, R., and Brandtzaeg, P. (2000). Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand. J. Immunol.* *52*, 240–248.

- Jou, S.-T., Carpino, N., Takahashi, Y., Piekorz, R., Chao, J.-R., Carpino, N., Wang, D., and Ihle, J.N. (2002). Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 8580–8591.
- Källberg, E., and Leanderson, T. (2008). A subset of dendritic cells express joining chain (J-chain) protein. *Immunology* *123*, 590–599.
- Kallies, A., and Nutt, S.L. (2007). Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 156–162.
- Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2004). BlimpGFP. *J. Exp. Med.* *200*, 967–977.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* *313*, 670–673.
- Kaplan, B., Livneh, A., and Gallo, G. (2007). Charge differences between in vivo deposits in immunoglobulin light chain amyloidosis and non-amyloid light chain deposition disease. *Br. J. Haematol.* *136*, 723–728.
- Kaplan, B., Ramirez-Alvarado, M., Dispenzieri, A., Zeldenrust, S.R., Leung, N., Livneh, A., and Gallo, G. (2008). Isolation and biochemical characterization of plasma monoclonal free light chains in amyloidosis and multiple myeloma: a pilot study of intact and truncated forms of light chains and their charge properties. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* *46*, 335–341.
- Kaplan, B., Ramirez-Alvarado, M., Sikkink, L., Golderman, S., Dispenzieri, A., Livneh, A., and Gallo, G. (2009). Free light chains in plasma of patients with light chain amyloidosis and non-amyloid light chain deposition disease. High proportion and heterogeneity of disulfide-linked monoclonal free light chains as pathogenic features of amyloid disease. *Br. J. Haematol.* *144*, 705–715.
- Keeling, J., and Herrera, G.A. (2005). Matrix metalloproteinases and mesangial remodeling in light chain-related glomerular damage. *Kidney Int.* *68*, 1590–1603.
- Keeling, J., and Herrera, G.A. (2009). An in vitro model of light chain deposition disease. *Kidney Int.* *75*, 634–645.
- Keeling, J., Teng, J., and Herrera, G.A. (2004). AL-amyloidosis and light-chain deposition disease light chains induce divergent phenotypic transformations of human mesangial cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *84*, 1322–1338.
- Kenter, A.L. (2012). AID targeting is dependent on RNA polymerase II pausing. *Semin. Immunol.* *24*, 281–286.
- Kepler, T.B., and Perelson, A.S. (1993). Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol. Today* *14*, 412–415.
- 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.
- Khamlichi, A.A., Aucouturier, P., Silvain, C., Bauwens, M., Touchard, G., Preud'homme, J.L., Nau, F., and Cogné, M. (1992). Primary structure of a monoclonal kappa chain in myeloma with light chain deposition disease. *Clin. Exp. Immunol.* *87*, 122–126.

- Khamlichi, A.A., Aucouturier, P., Preud'homme, J.L., and Cogné, M. (1995a). Structure of abnormal heavy chains in human heavy-chain-deposition disease. *Eur. J. Biochem. FEBS* *229*, 54–60.
- Khamlichi, A.A., Rocca, A., Touchard, G., Aucouturier, P., Preud'homme, J.L., and Cogne, M. (1995b). Role of light chain variable region in myeloma with light chain deposition disease: evidence from an experimental model. *Blood* *86*, 3655–3659.
- Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* *103*, 3828–3836.
- Khan, A.-M., Li, M., Balamuthusamy, S., Maderdrut, J.L., Simon, E.E., and Batuman, V. (2010). Myeloma light chain-induced renal injury in mice. *Nephron Exp. Nephrol.* *116*, e32–e41.
- Kim, M.-S., Lapkouski, M., Yang, W., and Gellert, M. (2015). Crystal structure of the V(D)J recombinase RAG1-RAG2. *Nature* *518*, 507–511.
- Kinoshita, K., Tashiro, J., Tomita, S., Lee, C.G., and Honjo, T. (1998). Target specificity of immunoglobulin class switch recombination is not determined by nucleotide sequences of S regions. *Immunity* *9*, 849–858.
- Klein, U., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* *188*, 1679–1689.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* *7*, 773–782.
- Knarr, G., Gething, M.J., Modrow, S., and Buchner, J. (1995). BiP binding sequences in antibodies. *J. Biol. Chem.* *270*, 27589–27594.
- Knittler, M.R., and Haas, I.G. (1992). Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *EMBO J.* *11*, 1573–1581.
- Kohli, R.M., Abrams, S.R., Gajula, K.S., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Stivers, J.T. (2009). A portable hot spot recognition loop transfers sequence preferences from APOBEC family members to activation-induced cytidine deaminase. *J. Biol. Chem.* *284*, 22898–22904.
- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2010). Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* *584*, 1393–1398.
- 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.
- Kosco-Vilbois, M.H., Gray, D., Scheidegger, D., and Julius, M. (1993). Follicular dendritic cells help resting B cells to become effective antigen-presenting cells: induction of B7/BB1 and upregulation of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* *178*, 2055–2066.
- Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G.P., Sheng, C., Phillips, T.M., Lipsky, P.E., and Ettinger, R. (2007). Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 5886–5896.

- Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2012). Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Invest.* *122*, 3456–3463.
- Kyle, R.A. (1989). Monoclonal gammopathies and the kidney. *Annu. Rev. Med.* *40*, 53–60.
- Kyle, R.A., and Gertz, M.A. (1990). Systemic amyloidosis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *10*, 49–87.
- Kyle, R.A., and Rajkumar, S.V. (2010). Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* *5*, 62–69.
- Kyle, R.A., Linos, A., Beard, C.M., Linke, R.P., Gertz, M.A., O’Fallon, W.M., and Kurland, L.T. (1992). Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood* *79*, 1817–1822.
- Kyle, R.A., Durie, B.G.M., Rajkumar, S.V., Landgren, O., Blade, J., Merlini, G., Kröger, N., Einsele, H., Vesole, D.H., Dimopoulos, M., et al. (2010). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* *24*, 1121–1127.
- Lamson, G., and Koshland, M.E. (1984). Changes in J chain and mu chain RNA expression as a function of B cell differentiation. *J. Exp. Med.* *160*, 877–892.
- Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R.M., Katzmann, J.A., Caporaso, N.E., Hayes, R.B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R.J., Baris, D., et al. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* *113*, 5412–5417.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 268–274.
- Lechouane, F., Bonaud, A., Delpy, L., Casola, S., Oruc, Z., Chemin, G., Cogné, M., and Sirac, C. (2013). B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 619–628.
- Lee, D.B., Drinkard, J.P., Rosen, V.J., and Gonick, H.C. (1972). The adult Fanconi syndrome: observations on etiology, morphology, renal function and mineral metabolism in three patients. *Medicine (Baltimore)* *51*, 107–138.
- Lefranc, M.-P. (2005). IMGT, the international ImMunoGeneTics information system: a standardized approach for immunogenetics and immunoinformatics. *Immunome Res.* *1*, 3.
- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Müller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Barbié, V., and Chaume, D. (1999). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* *27*, 209–212.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* *37*, D1006–D1012.
- Leung, H., and Maizels, N. (1992). Transcriptional regulatory elements stimulate recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch-region sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 4154–4158.
- Leung, N., Bridoux, F., Hutchison, C.A., Nasr, S.H., Cockwell, P., Femand, J.-P., Dispenzieri, A., Song, K.W., Kyle, R.A., and International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group (2012).

Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood* 120, 4292–4295.

Lim, J.-H., Kim, H.-G., Park, S.-K., and Kang, C.-J. (2009). The promoter of the Immunoglobulin J Chain gene receives its authentic enhancer activity through the abutting MEF2 and PU.1 sites in a DNA-looping interaction. *J. Mol. Biol.* 390, 339–352.

Limnander, A., Zikherman, J., Lau, T., Leitges, M., Weiss, A., and Roose, J.P. (2014). Protein kinase C δ promotes transitional B cell-negative selection and limits proximal B cell receptor signaling to enforce tolerance. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1474–1485.

Lin, J., Markowitz, G.S., Valeri, A.M., Kambham, N., Sherman, W.H., Appel, G.B., and D'Agati, V.D. (2001). Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: the disease spectrum. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 12, 1482–1492.

Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4771–4780.

Linderson, Y., Eberhard, D., Malin, S., Johansson, A., Busslinger, M., and Pettersson, S. (2004). Corecruitment of the Grg4 repressor by PU.1 is critical for Pax5-mediated repression of B-cell-specific genes. *EMBO Rep.* 5, 291–296.

Lindh, E. (1975). Increased resistance of immunoglobulin A dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 114, 284–286.

Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R., and Desiderio, S. (2007). A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* 27, 561–571.

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

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

Lycke, N., Erlandsson, L., Ekman, L., Schön, K., and Leanderson, T. (1999). Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 913–919.

Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 209, 1241–1253.

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

Ma, Y., Shimizu, Y., Mann, M.J., Jin, Y., and Hendershot, L.M. (2010). Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones* 15, 281–293.

MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139.

- Maldonado, J.E., Velosa, J.A., Kyle, R.A., Wagoner, R.D., Holley, K.E., and Salassa, R.M. (1975). Fanconi syndrome in adults. A manifestation of a latent form of myeloma. *Am. J. Med.* *58*, 354–364.
- Manis, J.P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A., and Alt, F.W. (1998). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* *188*, 1421–1431.
- Manis, J.P., Dudley, D., Kaylor, L., and Alt, F.W. (2002). IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity* *16*, 607–617.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *18*, 3066–3077.
- Marcinowski, M., Höller, M., Feige, M.J., Baerend, D., Lamb, D.C., and Buchner, J. (2011). Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 150–158.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007). The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 137–142.
- Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett.* *584*, 2572–2579.
- Martin, D.J., and Ramirez-Alvarado, M. (2010). Comparison of amyloid fibril formation by two closely related immunoglobulin light chain variable domains. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* *17*, 129–136.
- 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.
- Matsuuchi, L., Cann, G.M., and Koshland, M.E. (1986). Immunoglobulin J chain gene from the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 456–460.
- Matthews, A.G., Kuo, A.J., Ramon-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N., et al. (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* *450*, 1106–1110.
- Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J., and Chaudhuri, J. (2014). Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* *122*, 1–57.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991–1045.
- Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R., and Buchner, J. (2000). BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J. Biol. Chem.* *275*, 29421–29425.
- McCune, J.M., Fu, S.M., and Kunkel, H.G. (1981). J chain biosynthesis in pre-B cells and other possible precursor B cells. *J. Exp. Med.* *154*, 138–145.

- McFadden, H.J., and Koshland, M.E. (1991). Interleukin 2- and interleukin 5-induced changes in the binding of regulatory factors to the J-chain gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 11027–11031.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U A* *81*, 3180–3184.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., et al. (2007a). Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* *67*, 1783–1792.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., et al. (2007b). Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* *67*, 1783–1792.
- Melamed, D., and Nemazee, D. (1997). Self-antigen does not accelerate immature B cell apoptosis, but stimulates receptor editing as a consequence of developmental arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9267–9272.
- Merlini, G., and Stone, M.J. (2006). Dangerous small B-cell clones. *Blood* *108*, 2520–2530.
- Messiaen, T., Deret, S., Mougnot, B., Bridoux, F., Dequiedt, P., Dion, J.J., Makdassi, R., Meeus, F., Pourrat, J., Touchard, G., et al. (2000). Adult Fanconi syndrome secondary to light chain gammopathy. Clinicopathologic heterogeneity and unusual features in 11 patients. *Medicine (Baltimore)* *79*, 135–154.
- Metcalfe, R., Scott, L.M., Daniel, K.G., and Dou, Q.P. (2014). Proteasome inhibitor patents (2010 - present). *Expert Opin. Ther. Pat.* *24*, 369–382.
- Meunier, L., Usherwood, Y.-K., Chung, K.T., and Hendershot, L.M. (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4456–4469.
- Meyer-Hermann, M.E., and Maini, P.K. (2005). Cutting edge: back to “one-way” germinal centers. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 2489–2493.
- Meyer-Hermann, M., Mohr, E., Pelletier, N., Zhang, Y., Victora, G.D., and Toellner, K.-M. (2012). A theory of germinal center B cell selection, division, and exit. *Cell Rep.* *2*, 162–174.
- Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 233–245.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., Poulaki, V., Tai, Y.-T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., et al. (2003). The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* *101*, 2377–2380.
- Monnet, C., Jorieux, S., Souyris, N., Zaki, O., Jacquet, A., Fournier, N., Crozet, F., de Romeuf, C., Bouayadi, K., Urbain, R., et al. (2014). Combined glyco- and protein-Fc engineering simultaneously enhance cytotoxicity and half-life of a therapeutic antibody. *mAbs* *6*, 422–436.

Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat. Immunol.* 7, 293–301.

Moreau, P., Richardson, P.G., Cavo, M., Orłowski, R.Z., San Miguel, J.F., Palumbo, A., and Harousseau, J.-L. (2012). Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 120, 947–959.

Moreaux, J., Sprynski, A.-C., Dillon, S.R., Mahtouk, K., Jourdan, M., Ythier, A., Moine, P., Robert, N., Jourdan, E., Rossi, J.F., et al. (2009). APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. *Eur. J. Haematol.* 83, 119–129.

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

Moser, K., Tokoyoda, K., Radbruch, A., MacLennan, I., and Manz, R.A. (2006). Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 265–270.

Moulin, B., Deret, S., Mariette, X., Kourilsky, O., Imai, H., Dupouet, L., Marcellin, L., Kolb, I., Aucouturier, P., Brouet, J.C., et al. (1999a). Nodular glomerulosclerosis with deposition of monoclonal immunoglobulin heavy chains lacking C(H)1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10, 519–528.

Moulin, B., Deret, S., Mariette, X., Kourilsky, O., Imai, H., Dupouet, L., Marcellin, L., Kolb, I., Aucouturier, P., Brouet, J.C., et al. (1999b). Nodular glomerulosclerosis with deposition of monoclonal immunoglobulin heavy chains lacking C(H)1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10, 519–528.

Mounir, S., Guglielmi, P., Preud'homme, J., Nau, F., and Cogné, M. (1990). Alternate splice sites within the human VH gene coding sequences lead to truncated Ig mu-chains. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 144, 342–347.

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.

Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., et al. (2007). Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3008–3022.

Nakahashi, H., Kwon, K.-R.K., Resch, W., Vian, L., Dose, M., Stavreva, D., Hakim, O., Pruett, N., Nelson, S., Yamane, A., et al. (2013). A genome-wide map of CTCF multivalency redefines the CTCF code. *Cell Rep.* 3, 1678–1689.

Nasr, S.H., Valeri, A.M., Cornell, L.D., Fidler, M.E., Sethi, S., D'Agati, V.D., and Leung, N. (2012). Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: a report of 64 patients from a single institution. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 7, 231–239.

Nera, K.-P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.-M., and Lassila, O. (2006). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 24, 283–293.

Neubert, K., Meister, S., Moser, K., Weisel, F., Maseda, D., Amann, K., Wiethe, C., Winkler, T.H., Kalden, J.R., Manz, R.A., et al. (2008). The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat. Med.* *14*, 748–755.

Nijnik, A., Dawson, S., Crockford, T.L., Woodbine, L., Visetnoi, S., Bennett, S., Jones, M., Turner, G.D., Jeggo, P.A., Goodnow, C.C., et al. (2009). Impaired lymphocyte development and antibody class switching and increased malignancy in a murine model of DNA ligase IV syndrome. *J. Clin. Invest.* *119*, 1696–1705.

Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.

Norvell, A., Mandik, L., and Monroe, J.G. (1995). Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 4404–4413.

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.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* *325*, 1001–1005.

Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., and Li, G.C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* *382*, 551–555.

Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Jr, Lee, K.P., and Boise, L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* *107*, 4907–4916.

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., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.-L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* *199*, 91–98.

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 573–583.

Oettgen, H.C. (2000). Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of epsilon germline transcripts. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 618–623.

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

Oppezio, P., Dumas, G., Lalanne, A.I., Payelle-Brogard, B., Magnac, C., Pritsch, O., Dighiero, G., and Vuillier, F. (2005). Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *105*, 2495–2503.

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

Osmond, D.G. (1993). The turnover of B-cell populations. *Immunol. Today* *14*, 34–37.

Ozaki, S., Abe, M., Wolfenbarger, D., Weiss, D.T., and Solomon, A. (1994). Preferential expression of human lambda-light-chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenström's macroglobulinemia. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *71*, 183–189.

Paiva, B., Corchete, L.A., Vidriales, M.-B., García-Sanz, R., Perez, J.J., Aires-Mejia, I., Sanchez, M.-L., Barcena, P., Alignani, D., Jimenez, C., et al. (2015). The cellular origin and malignant transformation of Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*.

Palladini, G., Milani, P., Foli, A., Vidus Rosin, M., Basset, M., Lavatelli, F., Nuvolone, M., Obici, L., Perlini, S., and Merlini, G. (2014a). Melphalan and dexamethasone with or without bortezomib in newly diagnosed AL amyloidosis: a matched case-control study on 174 patients. *Leukemia* *28*, 2311–2316.

Palladini, G., Milani, P., Foli, A., Vidus Rosin, M., Basset, M., Lavatelli, F., Nuvolone, M., Obici, L., Perlini, S., and Merlini, G. (2014b). Melphalan and dexamethasone with or without bortezomib in newly diagnosed AL amyloidosis: a matched case-control study on 174 patients. *Leukemia* *28*, 2311–2316.

Pan-Hammarstrom, Q., Jones, A.M., Lahdesmaki, A., Zhou, W., Gatti, R.A., Hammarstrom, L., Gennery, A.R., and Ehrenstein, M.R. (2005). Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells. *J Exp Med* *201*, 189–194.

Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Jenkins, M.K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* *331*, 1203–1207.

Patel, K., Dillon, J.J., Leung, N., Bomback, A.S., Appel, G.B., D'Agati, V., and Canetta, P.A. (2014). Use of Bortezomib in Heavy-Chain Deposition Disease: A Report of 3 Cases. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.*

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

Peled, D., Daube, S.S., and Naaman, R. (2008). Selective enzymatic labeling to detect packing-induced denaturation of double-stranded DNA at interfaces. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* *24*, 11842–11846.

Peperzak, V., Vikstrom, I.B., and Tarlinton, D.M. (2012). Through a glass less darkly: apoptosis and the germinal center response to antigen. *Immunol. Rev.* *247*, 93–106.

Pepys, M.B., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Lachmann, H.J., Gallimore, J.R., Lovat, L.B., Bartfai, T., Alanine, A., Hertel, C., et al. (2002). Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature* *417*, 254–259.

Perfetti, V., Palladini, G., Casarini, S., Navazza, V., Rognoni, P., Obici, L., Invernizzi, R., Perlini, S., Klersy, C., and Merlini, G. (2012). The repertoire of λ light chains causing predominant amyloid heart involvement and identification of a preferentially involved germline gene, IGLV1-44. *Blood* *119*, 144–150.

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. (2012). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* *336*, 931–934.

- Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M., and Gottschling, D.E. (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat. Genet.* *27*, 64–67.
- Phan, R.T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* *432*, 635–639.
- Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* *203*, 2419–2424.
- Pike, B.L., Boyd, A.W., and Nossal, G.J. (1982). Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2013–2017.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 161–196.
- 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.
- 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- κ B pathway. *Nat. Commun.* *3*, 767.
- Porter, R.R. (1973). Structural studies of immunoglobulins. *Science* *180*, 713–716.
- Preud'homme, J.L., Aucouturier, P., Touchard, G., Striker, L., Khamlichi, A.A., Rocca, A., Denoroy, L., and Cogné, M. (1994). Monoclonal immunoglobulin deposition disease (Randall type). Relationship with structural abnormalities of immunoglobulin chains. *Kidney Int.* *46*, 965–972.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.-B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* *18*, 343–354.
- Qi, Z., Fujita, H., Jin, J., Davis, L.S., Wang, Y., Fogo, A.B., and Breyer, M.D. (2005). Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. *Diabetes* *54*, 2628–2637.
- Rada, C., and Milstein, C. (2001). The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J.* *20*, 4570–4576.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 741–750.
- Raggi, C., Luciani, A., Nevo, N., Antignac, C., Terryn, S., and Devuyst, O. (2014). Dedifferentiation and aberrations of the endolysosomal compartment characterize the early stage of nephropathic cystinosis. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 2266–2278.

- Ramon-Maiques, S., Kuo, A.J., Carney, D., Matthews, A.G., Oettinger, M.A., Gozani, O., and Yang, W. (2007). The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2. *Proc Natl Acad Sci U A* *104*, 18993–18998.
- Ramsden, D.A., and Wu, G.E. (1991). Mouse kappa light-chain recombination signal sequences mediate recombination more frequently than do those of lambda light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 10721–10725.
- Randall, K.L., Lambe, T., Johnson, A.L., Johnson, A., Treanor, B., Kucharska, E., Domaschenz, H., Whittle, B., Tze, L.E., Enders, A., et al. (2009). Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nat. Immunol.* *10*, 1283–1291.
- Randall, R.E., Williamson, W.C., Jr, Mullinax, F., Tung, M.Y., and Still, W.J. (1976). Manifestations of systemic light chain deposition. *Am. J. Med.* *60*, 293–299.
- Randall, T.D., Brewer, J.W., and Corley, R.B. (1992). Direct evidence that J chain regulates the polymeric structure of IgM in antibody-secreting B cells. *J. Biol. Chem.* *267*, 18002–18007.
- Ranuncolo, S.M., Polo, J.M., Dierov, J., Singer, M., Kuo, T., Grealley, J., Green, R., Carroll, M., and Melnick, A. (2007). Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat. Immunol.* *8*, 705–714.
- Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., Johnsen, H.E., and Dahl, I.M.S. (2005). Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood* *105*, 317–323.
- Reece, D.E., Hegenbart, U., Sanchorawala, V., Merlini, G., Palladini, G., Bladé, J., Fermand, J.-P., Hassoun, H., Heffner, L., Kukreti, V., et al. (2014). Long-term follow-up from a phase 1/2 study of single-agent bortezomib in relapsed systemic AL amyloidosis. *Blood* *124*, 2498–2506.
- Reimold, A.M., Ponath, P.D., Li, Y.S., Hardy, R.R., David, C.S., Strominger, J.L., and Glimcher, L.H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J. Exp. Med.* *183*, 393–401.
- Reina-San-Martin, B., Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R.F., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2003). H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J Exp Med* *197*, 1767–1778.
- Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J. Exp. Med.* *200*, 1103–1110.
- Reth, M., and Nielsen, P. (2014). Signaling circuits in early B-cell development. *Adv. Immunol.* *122*, 129–175.
- Ria, R., Reale, A., and Vacca, A. (2014). Novel agents and new therapeutic approaches for treatment of multiple myeloma. *World J. Methodol.* *4*, 73–90.
- Rinkenberger, J.L., Wallin, J.J., Johnson, K.W., and Koshland, M.E. (1996). An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene. *Immunity* *5*, 377–386.
- Rissoan, M.-C., Duhon, T., Bridon, J.-M., Bendriss-Vermare, N., Péronne, C., de Saint Vis, B., Brière, F., and Bates, E.E.M. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like

transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **100**, 3295–3303.

Robert, I., Dantzer, F., and Reina-San-Martin, B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* **206**, 1047–1056.

Rocca, A., Khamlichi, A.A., Aucouturier, P., Noël, L.H., Denoroy, L., Preud'homme, J.L., and Cogné, M. (1993). Primary structure of a variable region of the V kappa I subgroup (ISE) in light chain deposition disease. *Clin. Exp. Immunol.* **91**, 506–509.

Rocca, A., Khamlichi, A.A., Touchard, G., Mougnot, B., Ronco, P., Denoroy, L., Deret, S., Preud'homme, J.L., Aucouturier, P., and Cogné, M. (1995). Sequences of V kappa L subgroup light chains in Fanconi's syndrome. Light chain V region gene usage restriction and peculiarities in myeloma-associated Fanconi's syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **155**, 3245–3252.

Rodriguez Gomez, M., Talke, Y., Goebel, N., Hermann, F., Reich, B., and Mack, M. (2010). Basophils support the survival of plasma cells in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 7180–7185.

Roessler, S., Györy, I., Imhof, S., Spivakov, M., Williams, R.R., Busslinger, M., Fisher, A.G., and Grosschedl, R. (2007). Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 579–594.

Roldan, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat Immunol* **6**, 31–41.

Rolink, A.G., Andersson, J., and Melchers, F. (1998). Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3738–3748.

Röllig, C., Knop, S., and Bornhäuser, M. (2014a). Multiple myeloma. *Lancet*.

Röllig, C., Knop, S., and Bornhäuser, M. (2014b). Multiple myeloma. *Lancet*.

Ronco, P., Aucouturier, P., and Mougnot, B. (2000). Plasma cell dyscrasia-related glomerulopathies and Fanconi's syndrome: a molecular approach. *J. Nephrol.* **13 Suppl 3**, S34–S44.

Ronco, P., Plaisier, E., Mougnot, B., and Aucouturier, P. (2006). Immunoglobulin light (heavy)-chain deposition disease: from molecular medicine to pathophysiology-driven therapy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **1**, 1342–1350.

Ronco, P., Plaisier, E., and Aucouturier, P. (2011). Monoclonal immunoglobulin light and heavy chain deposition diseases: molecular models of common renal diseases. *Contrib. Nephrol.* **169**, 221–231.

Ronco, P.M., Alyanakian, M.-A., Mougnot, B., and Aucouturier, P. (2001). Light Chain Deposition Disease: A Model of Glomerulosclerosis Defined at the Molecular Level. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1558–1565.

Roque, M.C., Smith, P.A., and Blasquez, V.C. (1996). A developmentally modulated chromatin structure at the mouse immunoglobulin kappa 3' enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3138–3155.

Roth, K., Oehme, L., Zehentmeier, S., Zhang, Y., Niesner, R., and Hauser, A.E. (2014). Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **85**, 15–24.

Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2012). Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* *287*, 8356–8360.

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.

Rui, L., Healy, J.I., Blasioli, J., and Goodnow, C.C. (2006). ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation. *J. Immunol.* *177*, 5337.

Sagaert, X., and De Wolf-Peeters, C. (2003). Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunol. Lett.* *90*, 179–186.

Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., et al. (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11294–11299.

Sandel, P.C., and Monroe, J.G. (1999). Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* *10*, 289–299.

Sanders, P.W. (2012). Mechanisms of light chain injury along the tubular nephron. *J. Am. Soc. Nephrol.* *JASN* *23*, 1777–1781.

Sanders, P.W., Herrera, G.A., Chen, A., Booker, B.B., and Galla, J.H. (1988). Differential nephrotoxicity of low molecular weight proteins including Bence Jones proteins in the perfused rat nephron in vivo. *J. Clin. Invest.* *82*, 2086–2096.

Saribasak, H., Maul, R.W., Cao, Z., McClure, R.L., Yang, W., McNeill, D.R., Wilson, D.M., and Gearhart, P.J. (2011). XRCC1 suppresses somatic hypermutation and promotes alternative nonhomologous end joining in Igh genes. *J. Exp. Med.* *208*, 2209–2216.

Sayegh, C., Jhunjhunwala, S., Riblet, R., and Murre, C. (2005). Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev* *19*, 322–327.

Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 167–202.

Scheid, J.F., Mouquet, H., Kofer, J., Yurasov, S., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2011). Differential regulation of self-reactivity discriminates between IgG+ human circulating memory B cells and bone marrow plasma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 18044–18048.

Schlissel, M. (2002). Allelic exclusion of immunoglobulin gene rearrangement and expression: why and how? *Semin. Immunol.* *14*, 207–212.

Schrader, C.E., Linehan, E.K., Mochegova, S.N., Woodland, R.T., and Stavnezer, J. (2005). Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.* *202*, 561–568.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163–189.

- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S41–S52.
- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* *404*, 770–774.
- Schwickert, T.A., Lindquist, R.L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M.H., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* *446*, 83–87.
- Seitan, V.C., Krangel, M.S., and Merckenschlager, M. (2012). Cohesin, CTCF and lymphocyte antigen receptor locus rearrangement. *Trends Immunol.* *33*, 153–159.
- Sengul, S., Zwizinski, C., and Batuman, V. (2003a). Role of MAPK pathways in light chain-induced cytokine production in human proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *284*, F1245–F1254.
- Sengul, S., Zwizinski, C., and Batuman, V. (2003b). Role of MAPK pathways in light chain-induced cytokine production in human proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *284*, F1245–F1254.
- 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., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., and Staudt, L.M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* *13*, 199–212.
- 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. (2002a). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* *17*, 51–62.
- Shaffer, A.L., Rosenwald, A., and Staudt, L.M. (2002b). Lymphoid Malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 920–933.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* *21*, 81–93.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* *19*, 607–620.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., Savitsky, D., Liao, J., and Calame, K. (2005). Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J. Exp. Med.* *202*, 1471–1476.
- Shen, Y., Meunier, L., and Hendershot, L.M. (2002). Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J. Biol. Chem.* *277*, 15947–15956.
- Shimazaki, N., and Lieber, M.R. (2014). Histone methylation and V(D)J recombination. *Int. J. Hematol.* *100*, 230–237.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., et al. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or

bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **278**, 3466–3473.

Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* **4**, 435–441.

Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* **247**, 52–63.

Shore, G.C., Papa, F.R., and Oakes, S.A. (2011). Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 143–149.

Sibéril, S., de Romeuf, C., Bihoreau, N., Fernandez, N., Meterreau, J.-L., Regenman, A., Nony, E., Gaucher, C., Glacet, A., Jorieux, S., et al. (2006). Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc gamma R functions. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **118**, 170–179.

Sicard, A., Karras, A., Goujon, J.-M., Sirac, C., Bender, S., Labatut, D., Callard, P., Sarkozy, C., Essig, M., Vanhille, P., et al. (2014). Light chain deposition disease without glomerular proteinuria: a diagnostic challenge for the nephrologist. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **29**, 1894–1902.

Sigvardsson, M., Olsson, L., Högbom, E., and Leanderson, T. (1993). Characterization of the joining chain (J-chain) promoter. *Scand. J. Immunol.* **38**, 411–416.

Sirac, C., Bridoux, F., Carrion, C., Devuyst, O., Fernandez, B., Goujon, J.-M., El Hamel, C., Aldigier, J.-C., Touchard, G., and Cogné, M. (2006a). Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi syndrome. *Blood* **108**, 536–543.

Sirac, C., Bridoux, F., Carrion, C., Devuyst, O., Fernandez, B., Goujon, J.-M., El Hamel, C., Aldigier, J.-C., Touchard, G., and Cogné, M. (2006b). Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi syndrome. *Blood* **108**, 536–543.

Sirac, C., Bridoux, F., Essig, M., Devuyst, O., Touchard, G., and Cogné, M. (2011). Toward understanding renal Fanconi syndrome: step by step advances through experimental models. *Contrib. Nephrol.* **169**, 247–261.

Sitia, R., and Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* **426**, 891–894.

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., Light, A., O'Reilly, L.A., Ang, S.M., Strasser, A., and Tarlinton, D. (2000). bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J. Exp. Med.* **191**, 475–484.

- Snapper, C.M., and Paul, W.E. (1987). B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *139*, 10–17.
- Solomon, A., Weiss, D.T., and Pepys, M.B. (1992a). Induction in mice of human light-chain-associated amyloidosis. *Am. J. Pathol.* *140*, 629–637.
- Solomon, A., Weiss, D.T., and Pepys, M.B. (1992b). Induction in mice of human light-chain-associated amyloidosis. *Am. J. Pathol.* *140*, 629–637.
- Soulas-Sprauel, P., Le Guyader, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Olivier-Martin, C., Goujet-Zalc, C., Charneau, P., and de Villartay, J.P. (2007). Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* *204*, 1717–1727.
- Stanhope-Baker, P., Hudson, K.M., Shaffer, A.L., Constantinescu, A., and Schlissel, M.S. (1996). Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro. *Cell* *85*, 887–897.
- Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2006). Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends Genet* *22*, 23–28.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* *26*, 261–292.
- Stavnezer-Nordgren, J., and Sirlin, S. (1986). Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *Embo J* *5*, 95–102.
- Steward, A., Adhya, S., and Clarke, J. (2002). Sequence conservation in Ig-like domains: the role of highly conserved proline residues in the fibronectin type III superfamily. *J. Mol. Biol.* *318*, 935–940.
- Stubington, M.J.T., and Corcoran, A.E. (2013). Non-coding transcription and large-scale nuclear organisation of immunoglobulin recombination. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *23*, 81–88.
- Su, T.T., Guo, B., Wei, B., Braun, J., and Rawlings, D.J. (2004). Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol. Rev.* *197*, 161–178.
- Suh, J.H., and Miner, J.H. (2013). The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat. Rev. Nephrol.* *9*, 470–477.
- Swanson, P.C., Volkmer, D., and Wang, L. (2004). Full-length RAG-2, and not full-length RAG-1, specifically suppresses RAG-mediated transposition but not hybrid joint formation or disintegration. *J. Biol. Chem.* *279*, 4034–4044.
- Tangye, S.G. (2011). Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol.* *32*, 595–602.
- Tarlinton, D., Radbruch, A., Hiepe, F., and Dorner, T. (2008). Plasma cell differentiation and survival. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 162–169.
- Taubenheim, N., Tarlinton, D.M., Crawford, S., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2012). High rate of antibody secretion is not integral to plasma cell differentiation as revealed by XBP-1 deficiency. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 3328–3338.

- Teng, J., Russell, W.J., Gu, X., Cardelli, J., Jones, M.L., and Herrera, G.A. (2004). Different types of glomerulopathic light chains interact with mesangial cells using a common receptor but exhibit different intracellular trafficking patterns. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *84*, 440–451.
- Teng, J., Turbat-Herrera, E.A., and Herrera, G.A. (2014). An animal model of glomerular light-chain-associated amyloidogenesis depicts the crucial role of lysosomes. *Kidney Int.* *86*, 738–746.
- Terryn, S., Jouret, F., Vandenabeele, F., Smolders, I., Moreels, M., Devuyt, O., Steels, P., and Van Kerkhove, E. (2007). A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *293*, F476–F485.
- Lee-Theilen, M., Matthews, A.J., Kelly, D., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 75–79.
- Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., and Delpy, L. (2012). Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 107–117.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575–581.
- Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N., and Pirrotta, V. (1978). Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *42 Pt 2*, 921–931.
- Tornberg, U.C., and Holmberg, D. (1995). B-1a, B-1b and B-2 B cells display unique VHDJH repertoires formed at different stages of ontogeny and under different selection pressures. *EMBO J.* *14*, 1680–1689.
- Truong, L.D., Majesky, M.W., and Pindur, J. (1994). Tenascin is synthesized and secreted by rat mesangial cells in culture and is present in extracellular matrix in human glomerular diseases. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *4*, 1771–1777.
- Tubbs, R.R., Berkley, V., Valenzuela, R., McMahon, J.T., Gephardt, G.N., Fishleder, A.J., Nally, J.V., Pohl, M.A., Bukowski, R.M., and Lichtin, A.E. (1992). Pseudo-gamma heavy chain (IgG4 lambda) deposition disease. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *5*, 185–190.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *173*, 1158–1165.
- Turner, C.A., Mack, D.H., and Davis, M.M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* *77*, 297–306.
- Ugai, T., Tsuda, K., Sugihara, H., Nishida, Y., Yamakura, M., Takeuchi, M., and Matsue, K. (2013). Renal Fanconi syndrome associated with monoclonal κ free light chain in a patient with Waldenström macroglobulinemia. *Br. J. Haematol.* *162*, 1.
- Venner, C.P., Gillmore, J.D., Sachchithanatham, S., Mahmood, S., Lane, T., Foard, D., Rannigan, L., Gibbs, S.D.J., Pinney, J.H., Whelan, C.J., et al. (2014a). A matched comparison of cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone (CVD) versus risk-adapted cyclophosphamide, thalidomide and dexamethasone (CTD) in AL amyloidosis. *Leukemia* *28*, 2304–2310.

- Venner, C.P., Gillmore, J.D., Sachchithanatham, S., Mahmood, S., Lane, T., Foard, D., Rannigan, L., Gibbs, S.D.J., Pinney, J.H., Whelan, C.J., et al. (2014b). A matched comparison of cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone (CVD) versus risk-adapted cyclophosphamide, thalidomide and dexamethasone (CTD) in AL amyloidosis. *Leukemia* 28, 2304–2310.
- Vettermann, C., and Schlissel, M.S. (2010). Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol. Rev.* 237, 22–42.
- Victora, G.D. (2014). SnapShot: the germinal center reaction. *Cell* 159, 700–700.e1.
- Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.
- 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.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5, 520.
- Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogne, N., Cogne, M., and Denizot, Y. (2009). Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol* 182, 6926–6932.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2010a). The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* 40, 3306–3311.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010b). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116, 1895–1898.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010c). 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.
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Goodnow, C.C., and Randall, K.L. (2010). T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol. Rev.* 237, 72–89.
- Vuong, B.Q., and Chaudhuri, J. (2012). Combinatorial mechanisms regulating AID-dependent DNA deamination: interacting proteins and post-translational modifications. *Semin. Immunol.* 24, 264–272.
- Walker, B.A., Wardell, C.P., Johnson, D.C., Kaiser, M.F., Begum, D.B., Dahir, N.B., Ross, F.M., Davies, F.E., Gonzalez, D., and Morgan, G.J. (2013). Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood* 121, 3413–3419.
- Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrncic, R., Stevens, F.J., and Solomon, A. (1999). Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 14101–14108.
- Wall, J.S., Kennel, S.J., Williams, A., Richey, T., Stuckey, A., Huang, Y., Macy, S., Donnell, R., Barbour, R., Seubert, P., et al. (2012). AL amyloid imaging and therapy with a monoclonal antibody to a cryptic epitope on amyloid fibrils. *PLoS One* 7, e52686.

- Wang, P.-X., and Sanders, P.W. (2007). Immunoglobulin light chains generate hydrogen peroxide. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 1239–1245.
- Wang, Y., and Carter, R.H. (2005). CD19 regulates B cell maturation, proliferation, and positive selection in the FDC zone of murine splenic germinal centers. *Immunity* 22, 749–761.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910–918.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138, 1019–1031.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374–1377.
- Weigert, M.G., Cesari, I.M., Yonkovich, S.J., and Cohn, M. (1970). Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 228, 1045–1047.
- Weill, J.-C., Weller, S., and Reynaud, C.-A. (2004). A bird's eye view on human B cells. *Semin. Immunol.* 16, 277–281.
- Weill, J.-C., Weller, S., and Reynaud, C.-A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285.
- Welinder, E., Ahsberg, J., and Sigvardsson, M. (2011). B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return. *Semin. Immunol.* 23, 335–340.
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647–3654.
- Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecue, D., Gauthier, F., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* 205, 1331–1342.
- Wijnhoven, T.J.M., Geelen, J.M., Bakker, M., Lensen, J.F.M., Rops, A.L.W.M.M., Kramer, A.B., Navis, G., van den Hoven, M.J.W., van der Vlag, J., Berden, J.H.M., et al. (2007). Adult and paediatric patients with minimal change nephrotic syndrome show no major alterations in glomerular expression of sulphated heparan sulphate domains. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 22, 2886–2893.
- Wijnhoven, T.J.M., van den Hoven, M.J.W., Ding, H., van Kuppevelt, T.H., van der Vlag, J., Berden, J.H.M., Prinz, R.A., Lewis, E.J., Schwartz, M., and Xu, X. (2008). Heparanase induces a differential loss of heparan sulphate domains in overt diabetic nephropathy. *Diabetologia* 51, 372–382.
- Winter, O., Moser, K., Mohr, E., Zotos, D., Kaminski, H., Szyska, M., Roth, K., Wong, D.M., Dame, C., Tarlinton, D.M., et al. (2010). Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* 116, 1867–1875.

- 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.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531.
- Xue, J., Zhu, L.-P., and Wei, Q. (2013). IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconj. J.* 30, 735–745.
- 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.
- Yang, S.Y., Fugmann, S.D., Gramlich, H.S., and Schatz, D.G. (2007). Activation-induced cytidine deaminase-mediated sequence diversification is transiently targeted to newly integrated DNA substrates. *J Biol Chem* 282, 25308–25313.
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., et al. (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat. Genet.* 16, 161–170.
- Ying, W.Z., and Sanders, P.W. (2001). Mapping the binding domain of immunoglobulin light chains for Tamm-Horsfall protein. *Am. J. Pathol.* 158, 1859–1866.
- Ying, W.-Z., Wang, P.-X., Aaron, K.J., Basnayake, K., and Sanders, P.W. (2011). Immunoglobulin light chains activate nuclear factor- κ B in renal epithelial cells through a Src-dependent mechanism. *Blood* 117, 1301–1307.
- Ying, W.-Z., Allen, C.E., Curtis, L.M., Aaron, K.J., and Sanders, P.W. (2012). Mechanism and prevention of acute kidney injury from cast nephropathy in a rodent model. *J. Clin. Invest.* 122, 1777–1785.
- 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.
- 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.
- Zarrin, A.A., Tian, M., Wang, J., Borjeson, T., and Alt, F.W. (2005). Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2466–2470.
- Zarrin, A.A., Goff, P.H., Senger, K., and Alt, F.W. (2008). Sgamma3 switch sequences function in place of endogenous Sgamma1 to mediate antibody class switching. *J. Exp. Med.* 205, 1567–1572.
- Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., Aingorn, H., Elkin, M., Friedmann, Y., Weinstein, T., Li, J.-P., Lindahl, U., and Vlodavsky, I. (2004). Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 252–263.

- Zhang, Z.Z., Pannunzio, N.R., Hsieh, C.-L., Yu, K., and Lieber, M.R. (2014). The role of G-density in switch region repeats for immunoglobulin class switch recombination. *Nucleic Acids Res.* *42*, 13186–13193.
- Zhou, P., Ma, X., Iyer, L., Chaulagain, C., and Comenzo, R.L. (2014). One siRNA pool targeting the λ constant region stops λ light-chain production and causes terminal endoplasmic reticulum stress. *Blood* *123*, 3440–3451.
- Zhu, L., Herrera, G.A., Murphy-Ullrich, J.E., Huang, Z.Q., and Sanders, P.W. (1995). Pathogenesis of glomerulosclerosis in light chain deposition disease. Role for transforming growth factor-beta. *Am. J. Pathol.* *147*, 375–385.
- Zotos, D., and Tarlinton, D.M. (2012). Determining germinal centre B cell fate. *Trends Immunol.* *33*, 281–288.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D’Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* *207*, 365–378.
- Zou, X., Osborn, M.J., Bolland, D.J., Smith, J.A., Corcos, D., Hamon, M., Oxley, D., Hutchings, A., Morgan, G., Santos, F., et al. (2007). Heavy chain-only antibodies are spontaneously produced in light chain-deficient mice. *J. Exp. Med.* *204*, 3271–3283.
- Zouali, M., and Richard, Y. (2011). Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Front. Immunol.* *2*, 63.