



**HAL**  
open science

# Impact de la production des immunoglobulines tronquées sur le développement lymphocytaire B normal et tumoral

Nivine Srour

► **To cite this version:**

Nivine Srour. Impact de la production des immunoglobulines tronquées sur le développement lymphocytaire B normal et tumoral. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0011 . tel-01760588

**HAL Id: tel-01760588**

**<https://theses.hal.science/tel-01760588>**

Submitted on 6 Apr 2018

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

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

# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276 - CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

---

## THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES**

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialité : Immunologie

---

Présentée et soutenue publiquement par

**Nivine SROUR**

Le 05 Avril 2016

**Impact de la production des immunoglobulines tronquées sur le développement lymphocytaire B normal et tumoral**

Directeur de thèse : Dr. Laurent DELPY

Président :

**Pr. Michel Cogné**

Professeur des Universités/Directeur de Recherche CNRS - Limoges

Rapporteurs :

**Dr. Jérôme Moreaux**  
**Dr. Nicolas Fazilleau**

Maître de conférences - Montpellier  
Directeur de recherche INSERM - Toulouse

Examineurs :

**Pr. Jamal Tazi**  
**Dr. Jérôme Saulière**

Professeur des Universités - Montpellier  
Chargé de Recherche INSERM - Paris

Directeur de thèse:

**Dr. Laurent DELPY**

Chargé de Recherche CNRS - Limoges



# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276 - CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

---

## THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES**

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialité : Immunologie

---

Présentée et soutenue publiquement par

**Nivine SROUR**

Le 05 Avril 2016

**Impact de la production des immunoglobulines tronquées sur le développement lymphocytaire B normal et tumoral**

Directeur de thèse : Dr. Laurent DELPY

Président :

**Pr. Michel Cogné**

Professeur des Universités/Directeur de Recherche CNRS - Limoges

Rapporteurs :

**Dr. Jérôme Moreaux**  
**Dr. Nicolas Fazilleau**

Maître de conférences - Montpellier  
Directeur de recherche INSERM - Toulouse

Examineurs :

**Pr. Jamal Tazi**  
**Dr. Jérôme Saulière**

Professeur des Universités - Montpellier  
Chargé de Recherche INSERM - Paris

Directeur de thèse:

**Dr. Laurent DELPY**

Chargé de Recherche CNRS - Limoges





Au cours de ces travaux de thèse, j'ai bénéficié pendant les trois premières années d'un financement par la région Limousin. J'ai par la suite obtenu une aide individuelle jeune chercheur de l'association ARC pour prolonger de six mois mon travail et finaliser les projets.



Laboratoire CRIBL « Contrôle de de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations »  
UMR CNRS 7276  
Faculté de Médecine, CBRS : Centre de Biologie et de Recherche en Santé  
2, rue du Docteur Marcland  
87025 LIMOGES Cedex





# Résumé

---

Le processus de recombinaison V(D)J des gènes d'immunoglobulines (Ig) est caractérisé par une grande imprécision des jonctions entre les segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J). Deux fois sur trois, un décalage du cadre de lecture apparaît, aboutissant à une jonction non productive dite « hors phase ». Plusieurs études ont démontré que les deux allèles productifs et non-productifs sont activement transcrits. Les transcrits matures issus des allèles non-productifs sont pris en charge par un mécanisme de surveillance des ARNm appelé NMD « *Nonsense-Mediated mRNA Decay* ». En dégradant efficacement les ARNm d'Ig contenant des codons non-sens, ce mécanisme prévient l'apparition des Ig tronquées au cours de l'ontogénie B. Néanmoins, aucune étude n'a jusqu'ici analysé l'impact de l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs. Ce phénomène appelé NAS « *Nonsense-associated Altered Splicing* » peut conduire à une production d'Ig tronquées présentant des délétions internes du domaine variable (V).

Les projets développés lors de cette thèse ont montré que la présence d'un codon non-sens, au niveau de l'exon variable (VJ) des transcrits Ig $\kappa$ , favorise le saut d'exon et la production de chaînes légères dépourvues de domaine variable ( $\Delta$ V- $\kappa$ LCs). De façon intéressante, ces Ig tronquées provoquent un stress cellulaire et conduisent à l'apoptose des plasmocytes (Article 1). Ces observations ont permis d'identifier un nouveau point de contrôle agissant tardivement lors de la différenciation plasmocytaire : le TIE « *Truncated-Ig Exclusion* » checkpoint. Ce processus de contrôle provoque l'élimination des plasmocytes qui produisent des chaînes d'Ig tronquées. Nous avons également étudié l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs en l'absence de TIE-checkpoint (Article 2). Cette étude a révélé que l'hypertranscription des gènes d'Ig dans les plasmocytes favorise l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs. En utilisant un modèle d'expression forcée d'Ig tronquées, nous avons mis en évidence une coopération entre les mécanismes assurant la surveillance des ARNm (NMD) et la surveillance au niveau protéique (UPR : « *Unfolded Protein Response* », autophagie) (Article 3).

Sur la base de ces résultats, nous avons mis au point une nouvelle approche thérapeutique qui consiste à forcer la production d'Ig tronquées en utilisant des oligonucléotides anti-sens (AON) capables de provoquer l'élimination de l'exon variable lors de l'épissage. Cette invention pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques pertinentes dans le traitement du Myélome Multiple et d'autres pathologies touchant les plasmocytes.

**Mots clefs :** Plasmocytes, Immunoglobulines (Ig), Ig tronquées, Surveillance des ARN, NAS (Nonsense-associated Altered Splicing), TIE-checkpoint (Truncated-Ig Exclusion checkpoint), NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response).





# *Abstract*

---

The recombination process V(D)J of immunoglobulin (Ig) genes is characterized by random junctions between the variable (V), diversity (D) and joining (J) segments. A frameshift mutation appears in two-third of cases, generating a non-productive or « out of frame » junction. Several studies have shown that both productive and non-productive alleles are actively transcribed. The mature transcripts from nonproductive alleles are usually considered sterile and innocuous as a result of an mRNA surveillance mechanism called NMD « Nonsense-Mediated mRNA Decay ». By degrading aberrant mRNA, this mechanism prevents the appearance of truncated Ig during B cell ontogeny. However, less is known about the impact of alternative splicing on non-productive Ig transcripts. This mechanism, called NAS « Nonsense-associated Altered Splicing » can lead to the production of truncated Ig with internal deletions of variable domain (V).

During my thesis, we have shown that the presence of a stop codon, within the variable exon (VJ) of Ig $\kappa$  transcripts, promotes exon skipping and synthesis of V domain-less  $\kappa$  light chains ( $\Delta$ V- $\kappa$ LCs). Interestingly, such truncated Ig causes cellular stress and leads to plasma cells apoptosis (Article 1). These findings have identified a new checkpoint acting late during plasma cell differentiation: TIE « Truncated-Ig Exclusion » checkpoint. This process ensures counter-selection of plasma cells producing truncated-Ig. We also studied the alternative splicing of non-productive Ig transcripts in the absence of TIE-checkpoint (Article 2). We found that hypertranscription of Ig genes in plasma cells promote alternative splicing of non-productive Ig transcripts. Using a model forcing the expression of truncated Ig, we identified a cooperative action between mRNA surveillance mechanisms (NMD) and those of protein surveillance (UPR « Unfolded Protein Response », autophagy) (Article 3).

Based on these results, we have developed a new therapeutic approach by increasing the production of truncated Ig using antisense oligonucleotides (AON) that leads to the elimination of the variable exon during splicing. This invention could open new avenues for the treatment of Multiple Myeloma patients and other pathologies affecting plasma cells.

**Keywords** : Plasma cells, Immunoglobulins (Ig), Truncated-Ig, RNA surveillance, NAS (Nonsense-associated Altered Splicing), TIE-checkpoint (Truncated-Ig Exclusion checkpoint), NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response).



# Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements, peut-être la tâche la plus ardue de ces années de thèse.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Laurent Delpy, pour m'avoir appris à être moins « bonne élève » et plus autonome tout au long de ce travail de recherche. Le regard critique, juste et avisé que tu as porté sur mes travaux ne peut que m'encourager à être encore plus perspicace et engagée dans mes recherches. Je te remercie pour tout le temps que tu m'auras consacré, tous les conseils, idées, avis mais également la confiance sans cesse renouvelée que tu m'as accordée.

Je remercie le Professeur Michel Cogné de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres de mon jury. Merci aux Docteurs Jérôme Moreaux et Nicolas Fazilleau de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens ensuite à remercier le Professeur Jamal Tazi et le Docteur Jérôme Saulière d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Un grand merci à toute l'équipe de l'UMR CNRS 7276, j'espère n'oublier personne, si c'était le cas, Pardon d'avance.

Je remercie d'abord toute l'équipe d'hémato « l'ex équipe du 2<sup>ème</sup> » : Jean, Chantal, Nathalie, Cathy, Christelle V-F, Magalie, Héloïse, Valéria, Emilie, Robin et Oussama. Racha, sècheuse de larmes, rebooteuse, merci d'être toujours présente pour m'écouter. Hazar, c'est bientôt ton tour, bon courage, tu vas y arriver. Nicolas A, merci pour ton soutien et ton humour.

Une pensée pour toutes les personnes qui font tourner notre laboratoire. Merci aux animaliers : Bernadette, David et Karine. Je remercie chaleureusement Sylvie pour sa gentillesse et sa disponibilité surtout ces derniers mois. Je voudrais également remercier Séverine de s'être occupée de notre verrerie.

Un merci très particulier à l'ensemble de l'équipe de Michel. Merci tout d'abord à Eric pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes précieux conseils. Merci Yves pour vos anecdotes et opinions qui ont souvent animé les pauses café. Merci d'avoir gentiment accepté de relire mon intro. Merci à Christian pour toutes nos discussions au moment des commandes. Merci à Sophie, Nico DL, et Jeanne pour votre gentillesse. Jeanne, merci pour toutes les corrections en anglais. Bon courage aux prochains : Iman, Zeinab, Hend, Batoul, Nour, Ophélie et Anderson, vous allez en avoir besoin pour cette dernière ligne droite.

Je voudrais remercier sincèrement et chaleureusement Brice, qui à présent a pris son envol mais qui m'a toujours ouvert les yeux sur les différentes façons de percevoir les choses quand je manquais de discernement. Bon courage pour ton post-doc aux states et je te promets dès l'envoi du manuscrit, j'envoie ma candidature à NYC !!! Armandoooo « Noopy », merci pour ta gentillesse et ton soutien, « alors t'en es où??!! ». Merci Alexis pour ton aide dans les moments les plus *speed* et les plus *hard* de la thèse (envoi de l'article et du manuscrit de thèse). J'ouvre le bal, maintenant c'est à toi de mener la danse 😊.




Merci à la « Sirac team », avec qui on partage pas mal de thématiques communes. Merci Christophe, grâce à toi j'ai appris beaucoup de choses sur le centre germinatif et les plasmocytes. Merci à mes compatriotes de bureau : Marine, Victoria et Marie C (avec toi j'ai fait mon premier marquage sur lame). Merci pour ton aide et pour ta gentillesse. Amélie, future maman que j'ai côtoyée pendant plus de 2 ans, merci pour tes conseils, t'inquiètes je me rappellerai toujours cette phrase : « *profites au max du jour de ta soutenance, c'est le seul moment, où tout le monde sera là pour t'écouter!!* ». Merci Seb pour tes conseils pertinents dans les manips.

J'adresse aussi mes remerciements à Cendrine, Sandrine LN, Mylène, Steph, Zo (pour la transgénèse), Anne, Christelle O (ancienne voisine de bureau et la reine des Westen Blot), Marie M et Aurore. Merci à Claire pour la sympathie que tu m'as témoignée, ta douceur de caractère, et ta capacité à transmettre tes visions positives des choses. Je n'oublierai pas les SMS « *fantômes* » et j'attends toujours ta visite aux pays des cèdres.

Un merci très particulier à Jean-Claude. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre bureau pour rédiger ma thèse au calme. Une pensée pour François, merci pour les efforts que tu fais pour nous familiariser avec la bio-info. Mes remerciements vont aussi à Faraj, qui m'a permis de découvrir de près la voie de l'autophagie.

Maintenant je vais remercier ceux qui ont travaillé à mes côtés. Tout d'abord merci à Guillaume qui a ouvert la voie. Merci à Aurélien mon « *mini-chef* », pour tout ce que tu m'as apporté, merci pour l'esprit scientifique que tu as tenté de me le transmettre, et Bravo pour ta réussite. Merci à Omar, toujours souriant et de bonne volonté. Bon courage pour la suite. Merci à Jean-Marie, pour ton aide et ton support ces derniers mois. Merci à Estelle pour sa bonne humeur et sa « *fraîcheur* », qui ont rythmé très agréablement mes journées au labo, merci pour tous les bons moments et les fous rires qu'on a partagé ensemble.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans remercier mes amis hors labo. Saada, *Charchourtiiiiiii* , merci pour ton amitié, tes bons plats, les moments de craquage, les sessions de remontage du moral, les journées *Shopping*... Ta compagnie m'a été très agréable. Je remercie également Aline pour les excellents week-end passés ensemble. Une pensée pour mes voisins Ahmad H et Oussama. Merci pour votre soutien. Je tiens aussi à remercier ELSA, qui m'a accompagnée depuis mon arrivée en France. Bon courage pour ta thèse au pays des kangourous et j'espère que ça va le faire.

Je garde cette dernière partie pour remercier les personnes que je nomme « *Ressources* » dans ma vie. Merci à mes parents, merci Maman, merci Papa, votre amour et vos encouragements sont pour moi, le pilier fondateur de ce que je suis et de ce que je fais. J'espère que vous êtes fières de votre fille. Un immense merci à mes sœurs (Khouloud, Darine et Mimo) et à mes frères (Ali et Moe) qui, avec cette question récurrente « *quand est-ce que tu la soutiens cette thèse?* », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Merci pour votre soutien tout au long de ces années, vous étiez loin des yeux mais toujours près du cœur.

*Loin, loin, loin, loin, loin...*

Le plus fort de mes remerciements vont à toi Ali, qui partage ma vie. Merci de m'avoir tenu la main jusqu'au bout de ce chemin. Malgré les 5 000 Km qui nous ont séparés ces dernières années, tu as su être patient, toujours là à me soutenir et à trouver les mots réconfortants quand je perdais espoir ou quand j'avais le mal du pays. Pas besoin de m'étaler ici, tu sais à quel point tu comptes pour moi ... ♥



*« Si ce n'est aujourd'hui, ce sera demain :  
rappelons-nous que la patience  
est le pilier de la sagesse. »*

*Frédéric Mistral*

*« La réussite ne se trouve pas dans la meilleure des places,  
la plus haute ou la plus payante,  
mais dans le maximum  
qu'on peut tirer de soi-même. »*

*Renaud Tremblay*





*A mes parents,*

*A mon fiancé ♥*



# Sommaire

<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>4</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>5</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>9</b>
<b>Chapitre 1. Ontogénèse B et développement plasmocytaire</b> .....	<b>10</b>
1- Les immunoglobulines : du gène à la protéine .....	10
i. Organisation des loci d'immunoglobulines.....	11
• Le locus de chaînes lourdes (IgH).....	11
• Le locus de chaînes légères kappa (Igκ) .....	12
• Le locus de chaînes légères lambda (Igλ) .....	12
2- La moelle osseuse : berceau du développement B précoce.....	12
i. La spécification lymphoïde .....	13
ii. La spécification et l'engagement des cellules B .....	14
• Le stade pré-pro-B.....	14
• Le stade pro-B .....	14
• Le stade pré-B .....	15
• Le stade B immature .....	16
3- Remaniements des gènes d'Ig au cours du développement B précoce .....	17
i. Mécanistique des recombinaisons V(D)J .....	17
ii. Exclusion allélique et réarrangements ordonnées des gènes d'Ig .....	18
4- Maturation des cellules B au cours de la phase tardive du développement .....	21
i. Les cellules B transitionnelles.....	21
ii. Les cellules B matures.....	22
• Les cellules B-1 .....	22
• Les cellules B-2 .....	23
5- Formation des centres germinatifs .....	24
6- Réarrangements secondaires aux loci d'Ig.....	26
i. Hypermutation somatique (SHM) .....	27
ii. Commutation de classe (CSR) .....	28
7- Sortie des centres germinatifs : plasmocytes et lymphocytes B mémoires.....	30
i. Les lymphocytes B mémoires .....	30
ii. Les plasmocytes .....	31
iii. Les différentes populations plasmocytaires .....	31
iv. Le programme transcriptionnel impliqué lors de la différenciation plasmocytaire .....	32
v. Localisation et survie des plasmocytes (niches).....	34
8- Sécrétion des Ig et activation de la réponse UPR.....	35
9- Le Myélome Multiple et ses dérivés .....	39



<b>Chapitre 2. Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig .....</b>	<b>42</b>
1- Epissages conventionnels et alternatifs des ARN pré-messagers .....	42
i. La réaction d'épissage .....	42
ii. Le spliceosome .....	43
2- L'épissage alternatif .....	45
i. Les différents types d'épissage alternatif .....	46
ii. Les régulateurs de l'épissage alternatif .....	47
• Les éléments <i>cis</i> -régulateurs .....	47
• Les éléments <i>trans</i> -régulateurs.....	48
• Les régulateurs co-transcriptionnels.....	49
• La structure de la chromatine et les modifications des histones .....	49
3- Le saut d'exon thérapeutique .....	50
4- Le rôle de l'épissage alternatif dans les cellules B.....	52
5- Transcription, épissage et dégradation des transcrits d'Ig non-productifs.....	53
6- Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA (NMUP) .....	55
7- Nonsense-associated Altered Splicing (NAS).....	56
8- Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) .....	58
i. Les acteurs essentiels du NMD .....	58
• Les protéines UPF .....	59
• Les protéines SMG.....	60
ii. La règle du NMD .....	61
iii. Rôle de l'EJC dans le NMD.....	61
iv. Premier tour de traduction et déclenchement du NMD.....	63
v. Le NMD des transcrits d'Ig non-productifs .....	64
<b>POSITION DU PROBLEME.....</b>	<b>67</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>69</b>
1- Article 1.....	71
2- Article 2.....	75
3- Brevet .....	78
4- Article 3.....	79
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>83</b>
1- Epissage alternatif des transcrits d'Ig et activation du TIE checkpoint.....	84
2- « <i>Cross-talk</i> » entre la réponse UPR et le NMD .....	89
i. Les Ig tronquées et le NMD .....	90
ii. Les Ig tronquées et l'autophagie .....	91
3- Les Ig tronquées : Une cible thérapeutique .....	92
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>96</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>98</b>



# Abréviations

**3'RR** : 3' Regulatory Region

**4C** : Circularized-3C

**κ** : kappa

**λ** : lambda

**μ** : mu

**δ** : delta

**ε** : epsilon

**γ** : gamma

## A

**Ac** : Anticorps

**A-EJ** : Alternative End Joining

**Ag** : Antigène

**AID** : Activation-Induced Deaminase

**AON** : Antisense Oligonucleotides

**APC** : Cellule Présentatrice d'Ag

**ARNPol II** : ARN polymérase II

**APRIL** : A Proliferation - Inducing Ligand

**ATF6** : Activating Transcription Factor 6

## B

**BAFF** : B-cell Activating Factor

**BCL-2** : B-cell Lymphoma 2

**BCL-6** : B-cell Lymphoma 6

**BCR** : B cell receptor

**BER** : Base Excision Repair

**BiP** : Binding immunoglobulin Protein

**BLIMP-1** : B Lymphocyte-induced Maturation Protein 1

**BSAP** : B-cell Specific Activation Protein

**Bz** : Bortézomib

## C

**C** : région constante

( $C_L$  : région constante de chaînes légères/ $C_H$  : région constante de chaînes lourdes)

**CAR** : CXCL12-Abundant Reticular Cells

**CDR** : Complementarity Determining Region

**ChIP** : Chromatine ImmunoPrecipitation

**CHOP** : C/EBP Homologous Protein

**CHX** : Cycloheximide

**CFTR** : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

**CLIP** : CrossLinking and ImmunoPrecipitation

**CLP** : Common Lymphoid Precursors

**CMH II** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité II

**C-NHEJ** : Classical Non Homologous End Joining

**C<sup>PTC</sup>** : PTC situé au sein de l'exon constant

**CSR** : Class Switch Recombination

**CTCF** : CCCTC-binding Factor

**CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique

**CXCL-12** : CXC-Chemokine Ligand 12

**CXCR** : CXC-Chemokine Receptor

## D

**D** : segment de Diversité

**DC** : Dendritic Cell

**DDR** : DSB Dependent Response

**DECID** : Decay inducing complex

**DMD** : Duchenne Muscular Dystrophy

**DNA-PKcs** : DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit

**DNase I** : DésoxyriboNucléase I

**DR5** : Death Receptor 5

**DRiPs** : Defective Ribosomal Products

**DSB** : Double Strand Break

## E





**E2A** : E box protein binding  
2A

**EBF** : Early B cell Factor

**eIF** : elongation Initiation  
Factor

**EJC** : Exon Junction Complex

**ELL2** : Eleven-nineteen  
Lysine-rich Leukemia protein 2

**eRF** : elongation Release  
Factor

**ER** : Endoplasmic Reticulum

**ERAD** : ER associated  
degradation

**ESE** : Exonic Splicing  
Enhancer

**ESS** : Exonic Splicing Silencer

## F

**FISH** : Fluorescent *In Situ*  
Hybridization

**FDC** : Follicular Dendritic Cell

**FLT3L** : Fms-related Tyrosine  
Kinase 3 Ligand

**FO** : Follicular Zone

**FR** : Framework Region

## G

**GC** : Germinal Center

**GADD34** : Growth Arrest and  
DNA Damage 34

**GRP78** : 78 kDa Glucose-  
Regulated Protein

## H

**H** : Heavy

**hnRNP** : heterogeneous  
nuclear RiboNucleoProteins

**hs** : site hypersensible à la  
DNase I

**HSC** : Haematopoietic Stem  
Cells

## I

**Ig** : Immunoglobuline

**IgH** : Immunoglobulin Heavy  
chain locus

**IgL** : Immunoglobulin Light  
chain locus

**IL** : interleukine

**IRE1 $\alpha$**  : Inositol-Requiring  
Enzyme 1 $\alpha$

**IRF-4** : Interferon Regulatory  
Factor-4

**ISS** : Intronic Splicing Silencer

## J

**J** : segment de Jonction ( $J_L$  : de  
chaînes légères/ $J_H$  : de chaînes  
lourdes)

## K

**Kb** : Kilobases

**KI** : Knock In

**KO** : Knock Out

## L

**L** : Light

**LB** : Lymphocyte B

**L** : Leader

**LMMP** : Lymphoid-Primed  
Multipotential Progenitors

**LPS** : LipoPolySaccharide  
bactérien

**LS** : Like Switch

**LSR** : Locus Suicide  
Recombination

**LT** : Lymphocyte T

## M

**MALT** : Mucosae Associated  
Lymphoid Tissue

**MAPK** : Mitogen-Activated  
Protein Kinases

**MAR** : Matrix Attachment  
Region

**Mb** : Mégabases

**MGUS** : Monoclonal  
Gammopathy of Undetermined  
Significance

**MM** : Myélome Multiple

**MMR** : Mismatch Repair

**MPP** : Multipotent  
Hematopoietic Progenitors

**MZ** : Marginal Zone

## N

**NAS** : Nonsense-Associated  
Altered Splicing

**neo<sup>R</sup>** : gène de résistance à la  
Néomycine

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor kappa  
B

**NHEJ** : Non Homologous End  
Joining



**NK** : Natural Killer

**NMD** : Nonsense-Mediated mRNA Decay

**NMUP** : Nonsense-Mediated Upregulation of PremRNA

## P

**PAIRs**: Pax5-Activated Intergenic Repeat elements

**PALS** : Periarterial Lymphatic Sheaths

**PAMP** : Pathogen Associated Molecular Pattern

**Pax5** : Paired-box gene 5

**Pb** : paire de base

**PCH** : pericentromeric heterochromatin

**pDH**: promoteur des segments DH

**PERK** : RNA-dependent protein kinase (PKR)-like endoplasmic Reticulum (ER) Kinase

**PKA** : Protéine Kinase A

**PNA** : PeaNut Agglutinin

**PRDM1** : PR DoMain zinc finger protein 1

**PTC**: Premature Termination Codon

**PU.1**: PUrine box factor-1

**pV<sub>H</sub>**: promoteur des régions Variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines

## R

**RAG** : Recombination Activating Gene

**RE** : Réticulum Endoplasmique

**RNA Pol II** : ARN polymérase II

**RR** : Regulatory Region

**RS** : Recombination Sequence

**RSS** : Recombination Signal Sequence

## S

**S** : Switch

**SHM** : Somatic Hypermutation

**SI** : Système Immunitaire

**SMG** : Suppressor with Morphogenetic effects on Genitalia

**SSB** : Single Strand Break

**ssDNA** : single strand DNA

**snRNA** : small nuclear RNA

**snRNP** : small nuclear RiboNucleoProtein

## T

**T1/T2/T3** : Transitional 1/2/3

**TCR** : T Cell Receptor

**TD** : réponse T Dépendante

**TdT** : Terminal deoxynucleotidyl Transferase

**T<sub>FH</sub>** : T Follicular Helper

**TI** : réponse T Indépendante

**TIE** : Truncated-Ig Exclusion

## U

**UNG** : Uracile N-Glycosylase

**UPF** : UP-Frameshift

**UPR** : Unfolded Protein Response

**UTR** : UnTranslated Region

## V

**V** : région Variable et segment de Variabilité (V<sub>L</sub> : de chaînes légères/ V<sub>H</sub> : de chaînes lourdes)

**V<sup>PTC</sup>**: PTC situé au sein de l'exon VJ

**VLA4**: Very Late Antigen 4

## W

**WT** : Wild type

## X

**XBPI** : X Box Protein 1

**XRCC4** : X-ray Repair Cross Complementing Protein 4

## Y

**YY1** : Ying Yang 1

## Z

**Z** : Zone (DZ : Dark Zone / LZ : Light Zone)



# *Table des illustrations*

## **Introduction**

- Figure 1: Structure globale d'une immunoglobuline.  
Figure 2: Représentation schématique de l'organisation des loci des Ig.  
Figure 3 : Génération d'un répertoire d'anticorps hautement diversifié.  
Figure 4: Schéma général de l'ontogénie B.  
Figure 5 : Points de contrôle durant le développement B précoce.  
Figure 6 : Principe des recombinaisons VDJ au locus IgH.  
Figure 7: Mécanistique des recombinaisons V(D)J.  
Figure 8 : Phénomène d'exclusion allélique et réarrangements ordonnés des gènes d'Ig.  
Figure 9: Modèle exposant le développement des cellules B-1 et B-2.  
Figure 10: Structure schématique de la rate.  
Figure 11 : Génération du centre germinatif.  
Figure 12 : Représentation schématique d'une interaction  $T_{FH}$ -B au sein du centre germinatif.  
Figure 13 : Profil des hypermutations somatiques induites par AID.  
Figure 14: Prise en charge des mésappariements générés lors de l'hypermutation somatique (SHM).  
Figure 15 : Schéma de la recombinaison de classe au cours de la phase tardive du développement B.  
Figure 16: Résolution des cassures double-brins.  
Figure 17: Génération des cellules B mémoires et différenciation plasmocytaire.  
Figure 18: De la cellule B à la génération des plasmocytes.  
Figure 19: Programme transcriptionnel lors de la différenciation plasmocytaire.  
Figure 20: Niche de survie plasmocytaire dans la moelle osseuse.  
Figure 21: Passage de la forme membranaire à la forme sécrétée d'une IgM.  
Figure 22: La réponse UPR activée lors d'un stress du RE.  
Figure 23: Le développement du Myélome Multiple (MM).  
Figure 24 : Séquences consensuelles d'épissage au niveau des pré-ARNm.  
Figure 25: Modèle d'assemblage séquentiel du spliceosome.  
Figure 26: Les différents types d'épissage alternatif.  
Figure 27: Les régulateurs de l'épissage des pré-ARNm.  
Figure 28: Modèle de régulation de l'épissage alternatif par la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II.  
Figure 29: Les différents mécanismes de surveillance des ARN.  
Figure 30: Exclusion d'un exon contenant un PTC par le processus de NAS.  
Figure 31: La dégradation par NMD dépend de la position des PTC.  
Figure 32: Mise en place du complexe de surveillance lors du NMD.  
Figure 33: Dégradation des transcrits contenant de PTC après phosphorylation d'UPF1.  
Figure 34: Comparaison entre NMD EJC-dépendant et NMD EJC-indépendant.

## **Discussion**

- Figure 35: Représentation schématique du mécanisme TIE-checkpoint.  
Figure 36 : Approche thérapeutique par saut d'exon dans le traitement du myélome.



## *Avant-propos*

---

---





Le système immunitaire (SI) assure les défenses de l'organisme en éliminant les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels il est exposé. Cette fonction repose essentiellement sur ses capacités de reconnaissance et de mémoire qui permettent la tolérance des antigènes (Ag) du « soi » et l'élimination des antigènes du « non-soi ». Ces derniers sont des molécules essentiellement d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. La réponse immune implique d'abord les cellules de l'immunité innée et repose ensuite sur l'activation des lymphocytes, les cellules effectrices de l'immunité adaptative. Les lymphocytes T (LT) et B (LB) expriment des récepteurs spécifiques des antigènes et disposent ainsi d'une capacité de mémoire. Les cellules de la lignée lymphocytaire B, objet de mon travail, sont à l'origine de la réponse humorale. Ces cellules expriment d'abord la forme membranaire des immunoglobulines (Ig) au sein du récepteur des cellules B (BCR pour « *B Cell Receptor* ») puis sécrètent des Ig solubles ou anticorps (Ac) lorsqu'elles se différencient en plasmocytes.

La partie introductive de mon manuscrit sera axée sur la description du développement lymphocytaire B et des remaniements des gènes d'immunoglobulines. Nous mettrons l'accent sur les recombinaisons V(D)J, l'exclusion allélique ainsi que sur l'accessibilité transcriptionnelle des allèles d'Ig réarrangés d'une façon non-productive. Nous étudierons ensuite le devenir de ces transcrits d'Ig contenant des codons non-sens (PTC pour « *Premature Termination Codon* ») et leur prise en charge par les mécanismes de surveillance des ARNm. Ces mécanismes de « contrôle qualité » des ARN comme le NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*) ou le NAS (*Nonsense-Associated Altered Splicing*) sont très actifs dans les lignées lymphoïdes B et T.

La partie résultats présentera mes travaux de thèse consacrés à l'étude de l'épissage alternatif des transcrits d'Ig au cours du développement lymphocytaire B. Plus précisément, nous avons analysé l'impact des chaînes d'Ig tronquées, codées par des transcrits alternatifs dépourvus d'exon variable, sur la maturation des cellules B et la différenciation plasmocytaire. Pour mener à bien cette étude, nous avons élaboré un modèle murin permettant une expression inductible de chaînes légères d'Ig sans domaine variable. Les résultats soulignent que la présence d'Ig tronquées exacerbe le stress du réticulum endoplasmique (RE) et provoque l'apoptose des plasmocytes. Ces observations ont conduit à proposer l'existence d'un nouveau point de contrôle (« TIE-checkpoint : *Truncated-Ig Exclusion* ») permettant d'éliminer les plasmocytes producteurs d'Ig tronquées. Ce phénomène agissant tardivement au cours de la maturation B peut toucher jusqu'à 20-25% de



la population plasmocytaire. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans *The Journal of Experimental Medicine* (Srouf et *al.*, 2015).

Les gènes d'Ig sont activement transcrits dans les plasmocytes pour permettre la production massive d'anticorps. Au niveau moléculaire, nous avons montré que l'hypertranscription globale des gènes d'Ig (productifs et non-productifs) s'accompagne d'une augmentation très nette du saut d'exon lors de l'épissage des transcrits non-productifs (Srouf et *al.*, en préparation : Article 2). Cette amplification du saut d'exon touchant des gènes fortement transcrits souligne le lien entre la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II (ARNpol II) et le processus d'épissage alternatif.

En accord avec nos résultats précédents, la traduction des transcrits d'Ig alternatifs dépourvus d'exon variable engendre une expression néfaste d'Ig tronquées et l'apoptose des plasmocytes par activation du « TIE-checkpoint ». Au cours d'une autre étude, nous avons révélé pour la première fois l'existence d'un rétrocontrôle positif entre le mécanisme de NMD, contrôlant la qualité des ARNm par dégradation des transcrits non-sens, et les mécanismes assurant le maintien de la protéostasie cellulaire (réponse UPR pour « *Unfolded Protein Response* », activation du protéasome). Contrairement au saut d'exon, cette coopération entre deux mécanismes de surveillance agissant au niveau des ARNm et des protéines, limite l'apparition d'Ig tronquées et l'élimination massive de plasmocytes par activation du « *TIE checkpoint* » (Srouf et *al.*, en préparation : Article 3).

Sur la base des résultats montrant l'impact des Ig tronquées dépourvues de domaine variable dans les plasmocytes, nous avons déposé une demande de brevet concernant l'utilisation d'oligonucléotides antisens (AON pour « *Antisense-OligoNucleotides* ») pour forcer le saut d'exon des transcrits d'Ig dans le traitement du Myélome Multiple (MM) (dépôt le 23/11/2015, FR n°1561252). Le MM est un cancer incurable des cellules plasmocytaires caractérisée par une production élevée d'Ig monoclonale dans la plupart des cas. Les traitements AON ciblent des séquences spécifiques sur les transcrits codant pour l'Ig monoclonale et permettent d'éliminer l'exon variable lors de l'épissage. Le rationnel de cette approche de saut d'exon thérapeutique, favorisant l'expression de chaînes d'Ig tronquées dépourvues de domaine variable, consiste à provoquer un stress cellulaire et une autodestruction des plasmocytes en forçant l'activation du « *TIE checkpoint* ».

Ce travail a mis en évidence de nouveaux mécanismes permettant d'optimiser les réponses immunes à médiation humorale, en sélectionnant des plasmocytes producteurs



d'anticorps fonctionnels. Les perspectives de recherche fondamentale et appliquée qui en découlent seront discutées à la fin du manuscrit en mettant l'accent sur l'approche thérapeutique par saut d'exon dans le traitement du MM. Cette stratégie ciblant le réarrangement V(D)J de l'Ig monoclonale, devrait permettre de détruire spécifiquement le clone tumoral en épargnant les cellules saines. L'administration d'AON spécifiques des récepteurs à l'antigène est un concept original qui pourrait ouvrir de nouveaux champs thérapeutiques en hématologie. Cette approche personnalisée est basée sur la production de protéines tronquées exerçant des effets toxiques rapides. Son efficacité pourrait être meilleure que les thérapies par saut d'exon visant à synthétiser sur le long terme une protéine quasiment fonctionnelle, comme par exemple la dystrophine dans le traitement de la myopathie de Duchenne (DMD).

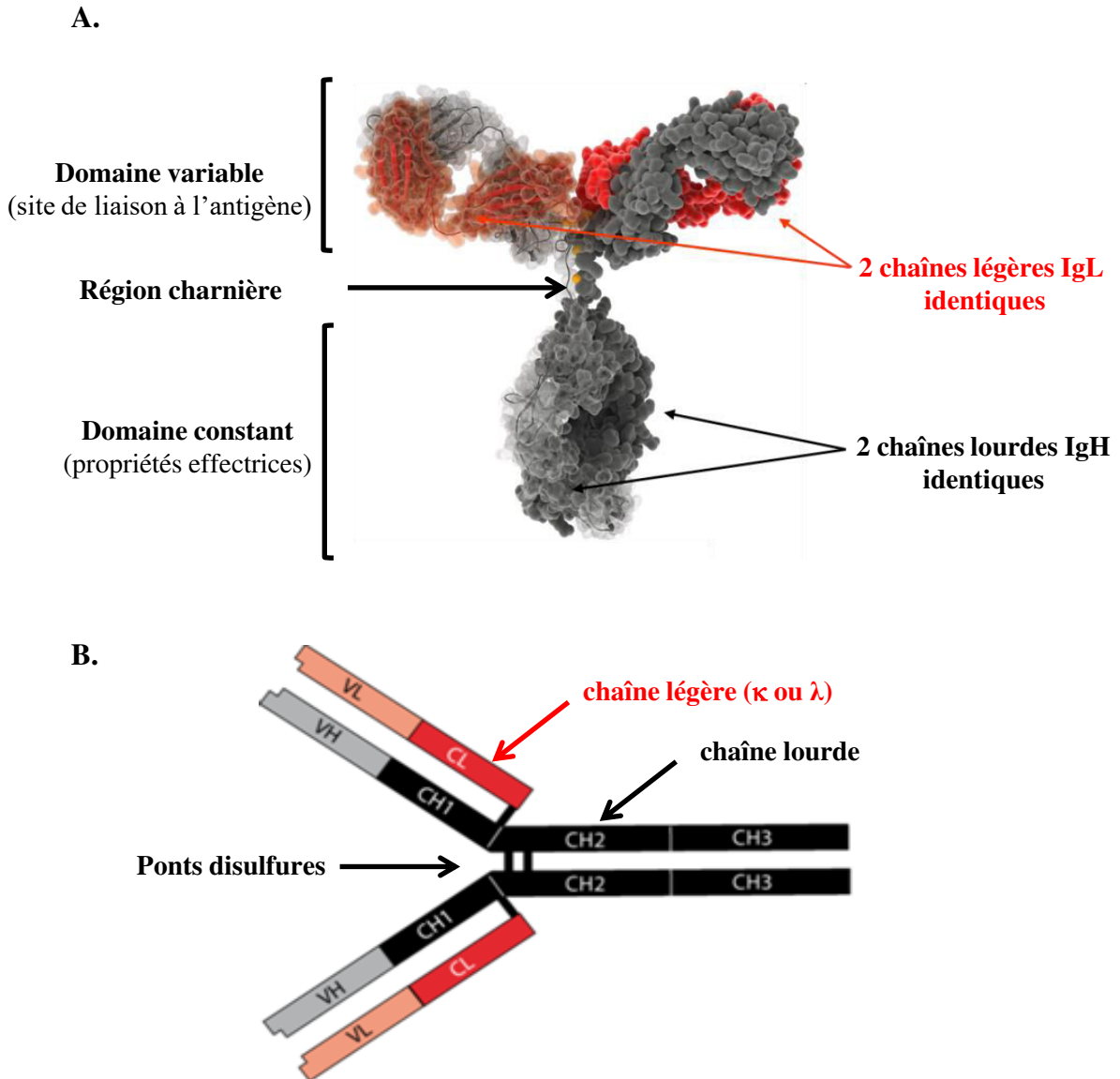


## *Synthèse Bibliographique*

---

---





**Figure 1 : Structure globale d'une immunoglobuline.**

**A.** Représentation tridimensionnelle d'une Ig de souris (sous forme monomérique).

**B.** Représentation schématique d'une Ig. Elle est constituée de deux chaînes lourdes, représentées en noir, composées d'un domaine variable ( $V_H$ ) et de trois domaines constants ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  et  $C_{H3}$ ). Les domaines  $C_{H1}$  et  $C_{H2}$  sont séparés par la région charnière qui permettra l'association des deux chaînes lourdes ensemble *via* des ponts disulfures. A ces chaînes lourdes sont associées deux chaînes légères, représentées en rouge, composées d'un domaine variable ( $V_L$ ) et d'un seul domaine constant ( $C_L$ ).

### Chapitre 1. Ontogénèse B et développement plasmocytaire

*Maturation B et remaniements des gènes d'immunoglobulines*

#### 1- Les immunoglobulines : du gène à la protéine

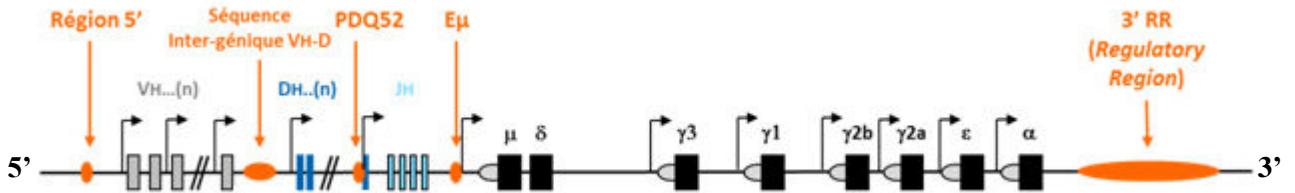
Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines hétérodimériques constituées de deux chaînes lourdes IgH (H pour « *Heavy* ») identiques reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures et de deux chaînes légères IgL (L pour « *Light* ») identiques, chacune liée à une chaîne lourde par un pont disulfure (**Figure1**), l'ensemble forme un complexe protéique d'environ 150kDa.

Il existe deux types de chaînes légères, kappa ( $\kappa$ ) et lambda ( $\lambda$ ) et cinq classes de chaînes lourdes à savoir : *mu* ( $\mu$ ), *delta* ( $\delta$ ), *gamma* ( $\gamma$ ), *alpha* ( $\alpha$ ) et *epsilon* ( $\epsilon$ ), correspondant respectivement aux monomères d'IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. Chez la souris, on distingue quatre sous-populations d'IgG : IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 (IgG1, IgG2 IgG3 et IgG4 chez l'homme). Les Ig possèdent un domaine variable (V) qui assure la liaison à l'antigène (Ag) et un domaine constant (C) qui confère les fonctions effectrices telles que l'activation du complément ou la liaison aux récepteurs Fc. Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois à quatre domaines  $C_H$  : ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  et  $C_{H4}$ ).

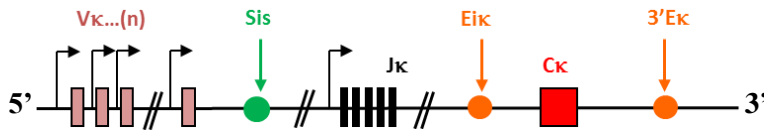
Dans leur configuration germinale, les gènes d'Ig ne sont pas fonctionnels. Des remaniements géniques sont donc nécessaires pour générer des récepteurs à l'antigène fonctionnels. Ces événements ont lieu au cours de la phase précoce de la lymphopoïèse B dans la moelle osseuse. Il s'agit des recombinaisons V(D)J dont le rôle est de générer un vaste répertoire d'Ig à partir d'un nombre restreint de gènes. Les domaines variables de chaînes lourdes résultent de l'assemblage des segments V pour variable, D pour diversité et J pour jonction. Les domaines variables de chaînes légères ne possèdent pas de segment D et résultent de l'assemblage des segments V et J (Early et al., 2004).

Au sein des organes lymphoïdes secondaires, des mutations peuvent apparaître dans les gènes codant les régions variables pour augmenter l'affinité des Ig : c'est l'hypermutation somatique (SHM pour « *Somatic HyperMutation* »). Des remaniements de gènes constants se produisent également au niveau du locus IgH, sans changer la spécificité antigénique : c'est

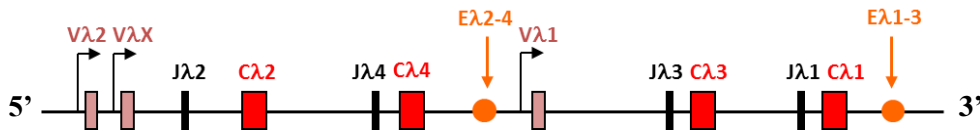
### A. Locus IgH (chromosome 12)



### B. Locus Igkappa (chromosome 6)



### C. Locus Iglambda (chromosome 16)



**Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation des loci des Ig.**

**A.** Le locus IgH dans sa configuration germinale (localisé sur le chromosome 12). Les segments codants la partie variable et les gènes constants sont représentés par des rectangles: segments  $V_H$  (gris), segments  $D_H$  (bleu), segments  $J_H$  (bleu clair) et les gènes constants (noir). Les gènes constants sont précédés par des ellipses grises représentant les régions switch. Les différents promoteurs sont représentés par des flèches coudées. Les autres éléments *cis*-régulateurs sont représentés par des cercles ou des ellipses oranges et sont signalés par des flèches.

**B.** Le locus Igkappa dans sa configuration germinale (localisé sur le chromosome 6). Les rectangles roses, noirs et rouge représentent respectivement les segments  $V_kappa$ ,  $J_kappa$  et le gène  $C_kappa$ . Les différents promoteurs sont représentés par des flèches coudées. Les *enhancers* sont représentés par des cercles oranges et l'élément *silencer* des recombinaisons par un cercle vert.

**C.** Le locus Iglambda dans sa configuration germinale (localisé sur le chromosome 16). Les segments  $V_lambda$ ,  $J_lambda$  et les gènes constants  $C_lambda$  sont représentés respectivement par des rectangles roses, noirs et rouges. Les différents promoteurs sont représentés par des flèches coudées. Les *enhancers* sont représentés par des cercles oranges.

la commutation isotypique (ou CSR pour « *Class Switch Recombination* ») (pour revues Perlot and Alt, 2008; Alt et al., 2013). La **Figure 3** illustre brièvement ces mécanismes qui seront détaillés plus loin.

### i. Organisation des loci d'immunoglobulines

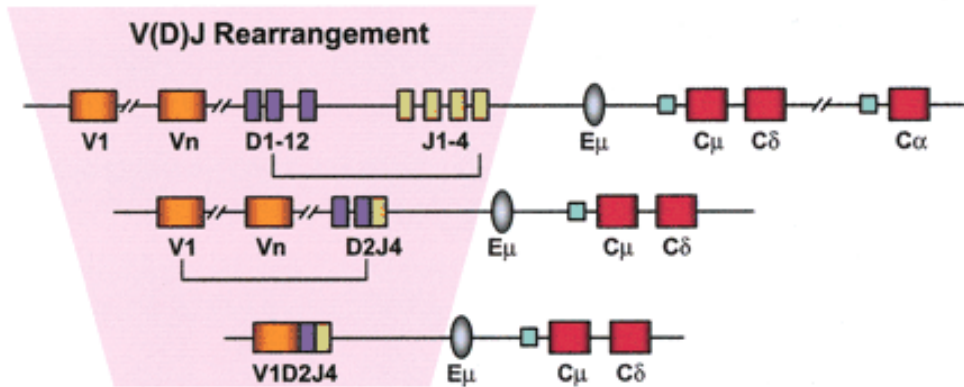
Ayant travaillé sur des modèles murins durant ma thèse, je ne détaillerai que l'organisation des gènes d'Ig de souris, en gardant à l'esprit les différentes variations entre les différentes souches murines. L'organisation du locus murin étant similaire à celle du locus humain, la souris est un excellent modèle pour l'étude de la génétique des Ig (pour revue Rauta et al., 2012).

#### • Le locus de chaînes lourdes (IgH).

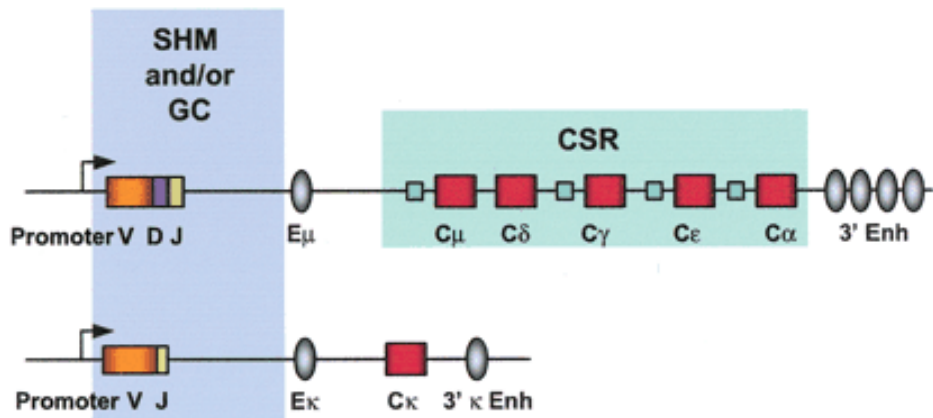
Le locus IgH (**Figure 2A**) est divisé en 4 régions principales contenant les familles de gènes  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$  et  $C_H$ . Il est situé sur le chromosome 12 de la souris (chromosome 14 chez l'homme), où il s'étend sur environ 2,8 mégabases (Mb). Du télomère au centromère, il comprend environ 100 segments variables ( $V_H$ ) fonctionnels et presque autant de segments  $V_H$  non fonctionnels, de 17 à 20 segments  $D_H$ , ce nombre peut varier selon la souche murine étudiée, et 4 segments  $J_H$  qui sont tous fonctionnels. La partie constante des chaînes lourdes est codée, quand à elle par 8 gènes codant les régions constantes des différents isotypes de la chaîne lourde (Brodeur and Riblet, 1984; Retter et al., 2007).

L'alignement des séquences des gènes  $V_H$  permet de les regrouper en 15 familles de gènes qui partagent 80% d'homologie. On distingue les segments variables dits « distaux » situés en 5' du locus, des segments « proximaux » en 3'. Notons que près de la moitié des segments  $V_H$  appartient à la famille  $V_HJ558$ , située essentiellement dans la partie distale. Les segments  $D_H$  sont très courts, 10 à 15 nucléotides, mais ils ont un rôle critique dans la diversité du répertoire. Ils sont regroupés en 4 familles (DFL16, DSP2, DST4 et DQ52) (Lefranc, 2009). Au nombre de 8, les gènes  $C_H$  codent les régions constantes des huit classes et sous-classes d'Ig :  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2a$ ,  $\gamma 2b$ ,  $\gamma 3$ ,  $\alpha$  et  $\epsilon$ . Notons que chaque gène constant est composé de nombreux exons codant les domaines structuraux propres à chaque isotype ; les régions charnières, ainsi que les régions intracytoplasmiques et transmembranaires des Ig de surface (Maki et al., 1981; Lefranc, 2009).

A.



B.



**Figure 3 : Génération d'un répertoire d'anticorps hautement diversifié.**

Trois mécanismes importants sont responsables de la diversité des anticorps.

A. Les recombinaisons V(D)J.

B. Les mécanismes d'hypermutation somatique (SHM) et de commutation de classe (CSR) au locus des chaînes lourdes d'Ig (en haut). SHM au locus des chaînes légères  $\kappa$  (en bas). Les loci sont représentés après les étapes de réarrangements V(D)J (*Extrait de Li et al., 2004*).

- **Le locus de chaînes légères kappa (Igκ)**

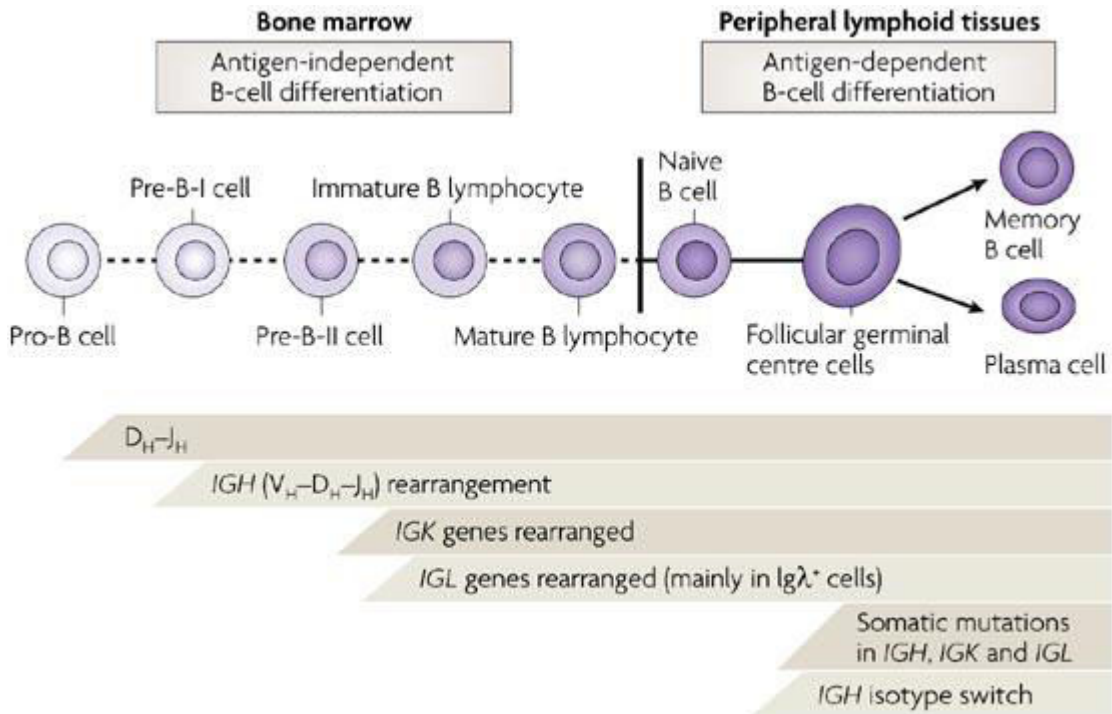
Le locus kappa (**Figure 2B**) est situé sur le chromosome 6 de la souris (chromosome 2 chez l'homme). Il est légèrement plus grand que le locus IgH et s'étend sur environ 3,2 Mb. Dans sa configuration germinale, il comporte 161 segments V $\kappa$  dont 91 à 92 sont fonctionnels. Les gènes J $\kappa$  sont au nombre de 5 dont un non fonctionnel. La région constante est codée par un seul segment C $\kappa$  (Aoki-Ota et al., 2012). D'une façon intéressante, la moitié des gènes V $\kappa$  est positionnée dans le sens inverse des 5 segments J $\kappa$  et du seul gène constant C $\kappa$ . Par conséquent, de nombreux segments V sont conservés pour une utilisation potentielle lors des réarrangements secondaires qui peuvent avoir lieu avec les segments de jonction situés en aval (Aoki-Ota et al., 2012).

- **Le locus de chaînes légères lambda (Igλ)**

Le locus Ig lambda est localisé sur le chromosome 16 de souris (chromosome 22 chez l'homme). Ce locus est assez petit, 200 Kilobases (Kb) (**Figure 2C**) et présente une diversité limitée. Il a une organisation différente des loci décrits précédemment. Il est formé de deux clusters adjacents VJC (Variable-Jonction-Constant), le premier : 5'-V2-V3-J2C2, résultant de l'association entre deux segments variables V2 et V3 avec un segment de jonction (J2), puis un segment constant (C2), et le second : V1-J3C3-J1C1, formé d'un seul segment variable (V1) suivi de segment de jonction et constant J3C3, puis des segments J1C1 (Eisen and Reilly, 1985). Le répertoire λ est peu représenté chez la souris, ce qui explique que 95% des anticorps sériques sont de type κ. Les gènes λ n'ayant pas fait l'objet de mes travaux de thèse, je ne détaillerai pas leurs remaniements dans ce manuscrit.

## 2- La moelle osseuse : berceau du développement B précoce

L'ontogénèse B peut être séparée en deux phases principales : dépendante ou non de la présence d'antigène (**Figure 4**). Au niveau de la moelle osseuse et du foie fœtal, les précurseurs des cellules B vont se différencier en cellules B immatures en passant par de multiples étapes marquées par les réarrangements séquentiels des gènes d'Ig et l'expression du BCR (pour « *B-Cell Receptor* ») (pour revue Hardy and Hayakawa, 2001). Au cours de leur maturation, les cellules B subissent plusieurs étapes de sélection avant de devenir des lymphocytes B matures (Rolink et al., 2004). Ces points de contrôle permettent



**Figure 4 : Schéma général de l'ontogénie B.**

Présentation du développement lymphocytaire B. L'ontogenèse B est divisée en deux phases principales: une phase précoce indépendante de l'antigène qui se déroule au niveau de la moelle osseuse et une phase tardive, dépendante d'une stimulation antigénique qui a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (*e.g* rate, ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Les remaniements géniques des loci d'Ig qui caractérisent chaque phase sont indiqués sur le schéma.

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

principalement d'évaluer l'assemblage et l'absence d'auto-réactivité du BCR exprimé par chaque lymphocyte B (Nemazee and Weigert, 2000).

Chez les mammifères, les lymphocytes B dérivent des cellules souches pluripotentes indifférenciées appelées cellules souches hématopoïétiques HSC (pour « *Hematopoietic Stem Cells* »). Ces cellules perdent progressivement leurs propriétés de pluripotence tout en acquérant des nouvelles fonctions spécialisées associées aux cellules B. Cette progression n'est pas clairement cloisonnée, on parle plutôt de « *continuum* », durant lequel ces HSC subissent une cascade d'évènements qui permettent leur différenciation dans le lignage lymphoïde, suivi de leur engagement dans le lignage B pour devenir des cellules B matures (Baba et al., 2004; Mandel and Grosschedl, 2010). Les différentes étapes de la maturation B indépendante de l'antigène passent par les stades pré-proB, proB, pré-B, B immatures et B matures. Le status des réarrangements V(D)J des gènes d'Ig et l'expression ou non de molécules de surface permettent d'identifier ces différents stades (Hardy and Hayakawa, 2001; Hardy et al., 2012).

### i. La spécification lymphoïde

La différenciation des HSC en progéniteurs pluripotents MPP (pour « *Multipotent Progenitors* ») est caractérisée par une perte de la capacité d'auto-renouvellement. Au cours de cette transition progressive, les cellules évoluant vers un destin lymphoïde expriment des niveaux élevés du facteur FLT-3 (pour « *Fms-related Tyrosine Kinase 3 Ligand* ») (Welner et al., 2008; Bryder and Sigvardsson, 2010). Ces cellules FLT-3<sup>hi</sup> parfois nommées LMPP (pour « *Lymphoid-Primed Multipotent Progenitors* ») forment une population hétérogène comprenant les sous-populations MPP2 et MPP3. Ces derniers donnent très peu de cellules myéloïdes et semblent aussi générer moins de lymphocytes B (CD19<sup>+</sup>) que les MPP2. Par contre, ils sont plus compétents dans la génération des précurseurs T extra-thymiques. (Månsson et al., 2007). La maturation des cellules vers la lignée lymphoïde (CLP pour « *Common Lymphoid Progenitors* ») est caractérisé par une forte expression de l'IL-7R $\alpha$  (pour « *Interleukine-7 Receptor alpha* »). L'expression du facteur de transcription *Pax5* (pour « *Paired box gene 5* ») permet ensuite l'engagement définitif dans la lignée lymphocytaire B au détriment de la lignée T et ceci en réprimant la transcription du gène de la spécification des cellules T *Notch1* (Pui et al., 1999; Souabni et al., 2002).





### ii. La spécification et l'engagement des cellules B

L'engagement des CLP dans le lignage B est caractérisé par l'expression de nombreux facteurs de transcription tels que *E2A* (*E box protein Binding 2 A*), *Ikaros*, *EBF1* (*Early B cell Factor-1*), *PU.1* (*Purine box factor-1*) et *BSAP* (*B cell Specific Activator protein*) codé par le gène *Pax5* (Nutt et al., 1997). L'absence d'un ou plusieurs de ces facteurs de transcription pourrait altérer le développement B. Dans ce sens, il a été démontré que le facteur de transcription *Ikaros*, appartenant à la famille des protéines en doigt de zinc, est essentiel pour la génération de toutes les lignées lymphoïdes (Georgopoulos et al., 1994). Concernant la lignée B, l'équipe de Busslinger a observé que ce facteur semble requis lors de la transition du stade pro-B vers le stade pré-B (Schwickert et al., 2014). Dans ce sens les souris déficientes en *Ikaros*, présentent un défaut de recombinaison  $V_H$  vers  $DJ_H$  au locus IgH (Reynaud et al., 2008).

Le facteur de transcription *Pax5* est le régulateur principal qui va définitivement provoquer l'engagement et le maintien des progéniteurs dans la lignée B (Reth and Nielsen, 2014). En effet, dans les souris déficientes en *Pax5*, le développement B est arrêté entre le stade pré-proB et pro-B (Cobaleda et al., 2007). En plus de son rôle essentiel dans l'engagement dans le lignage B, *Pax5* est impliqué dans la maintenance de l'identité de cellules B durant toute la maturation, son expression s'éteint ensuite lors de la différenciation terminale en plasmocytes (Mikkola et al., 2002). Les différentes étapes de l'ontogénèse B sont illustrées dans la **Figure 4**.

#### • Le stade pré-pro-B

Ces cellules représentent les précurseurs B les plus précoces et se caractérisent par l'expression d'un certain nombre de marqueurs de surface tels que B220 (récepteur du CD45), c-Kit (CD117) et CD43 mais n'expriment pas encore CD19 (Rolink et al., 1996; Rumfelt et al., 2006; pour revue Hardy et al., 2007). Ainsi, durant ce stade, la liaison de la chimiokine CXCL12 à son récepteur CXCR4, est une étape cruciale permettant de diriger les précurseurs B dans la niche appropriée (pour revue Nagasawa, 2006).

#### • Le stade pro-B

Les cellules pro-B expriment le marqueur CD19 à leur surface ainsi que les molécules calnexine CD79a (Ig $\alpha$ ) et CD79b (Ig $\beta$ ) qui constituent une forme précurseur du récepteur à l'Ag des lymphocytes B (Nagata et al., 1997). Ces cellules interagissent avec l'IL-7 afin



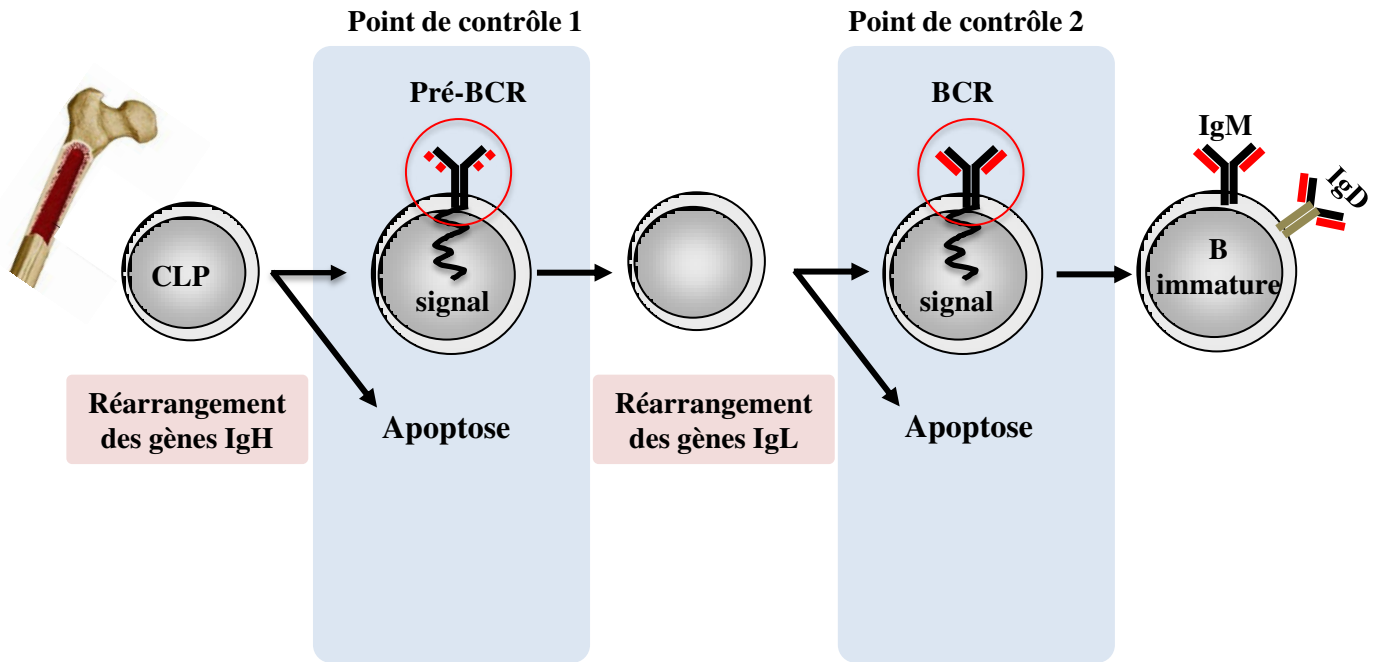
d'induire des cascades de signalisation intracellulaire responsables de la survie et de la prolifération des cellules B (Milne and Paige, 2006). A ce stade s'initient les premiers réarrangements des gènes codant les chaînes lourdes d'Ig entre un segment D<sub>H</sub> et un segment J<sub>H</sub> (Jung et al., 2006). Ce type de réarrangement a lieu presque simultanément sur les deux allèles et il est suivi par un deuxième réarrangement entre un segment V<sub>H</sub> et le segment DJ<sub>H</sub> préexistant afin de coder la partie variable de la chaîne lourde (*cf* chapitre 1 §3-i ). Cette étape se fait de façon séquentielle sur un allèle, puis sur le second si le premier s'avère non - productif. Le processus de l'exclusion allélique sera détaillé au chapitre 1 §3-ii.

L'expression du facteur de transcription YY1 (Ying Yang 1) joue un rôle crucial à ce stade. Son absence affecte les réarrangements V<sub>H</sub> vers DJ<sub>H</sub> et bloque la transition des cellules du stade pro-B vers le stade pré-B. En utilisant la technique de *3D DNA FISH* (pour « *Fluorescence in situ Hybridization* »), Liu et ses collaborateurs ont démontré que la suppression de YY1 dans les cellules pro-B affecte la contraction du locus IgH qui est un événement nécessaire pour les réarrangements des segments V<sub>H</sub> distaux vers DJ<sub>H</sub>. En revanche, l'absence de YY1 n'a que peu d'impact sur la localisation du locus IgH au sein du noyau. Cette fonction de YY1 spécifiquement lors des recombinaisons VDJ repose sur des interactions directes avec l'activateur intronique (E $\mu$ ) du locus IgH (Liu et al., 2007).

### • Le stade pré-B

L'engagement dans le stade pré-B (ou fraction C' selon la nomenclature de Hardy et al., 1991) est une étape cruciale au cours du développement B. Elle est marquée par l'expression du marqueur CD25 à la surface des cellules B (Rolink et al., 2004).

Ce stade est caractérisé par l'expression d'une chaîne lourde  $\mu$  qui, une fois produite, sera transportée à la surface de la cellule sous forme de « pré-BCR ». Ce complexe est formé de deux chaînes  $\mu$ HC identiques entre elles, qui vont s'associer à une pseudo chaîne légère (SLC pour « *Surrogate Light Chain* »), codée par les gènes *VpreB* et  $\lambda 5$ , ainsi que l'hétérodimère I $\alpha$ /I $\beta$ , (sous unités de transduction de signal) (Tsubata and Reth, 1990; Mårtensson et al., 2007a; Herzog et al., 2009). L'expression du pré-BCR est un point de contrôle (« *check-point* ») incontournable pour le développement B. En effet, la signalisation du pré-BCR permet la survie et l'expansion clonale des cellules ayant réarrangées leur locus IgH d'une façon fonctionnelle et exerce un rétrocontrôle négatif sur la transcription des gènes qui codent la pseudo chaîne légère ce qui a pour conséquence l'initiation des réarrangements



**Figure 5 : Points de contrôle durant le développement B précoce.**

Deux points de contrôle permettent la progression de la différenciation B. Les signaux provenant du pré-BCR induisent une phase de prolifération intense, conduisant à l'expansion des cellules pré-B ayant recombinaison leurs gènes IgH d'une façon fonctionnelle. En outre, les signaux provenant du pré-BCR favorisent les recombinaisons aux loci IgL, ce qui entraîne l'expression d'un BCR mature. De façon générale, seules les cellules B tolérantes vis-à-vis des Ag du soi sont autorisées à avancer au cours de l'ontogénie B. Les cellules B auto-réactives sont éliminées par apoptose (*Adapté de Meffre et al., 2000*).

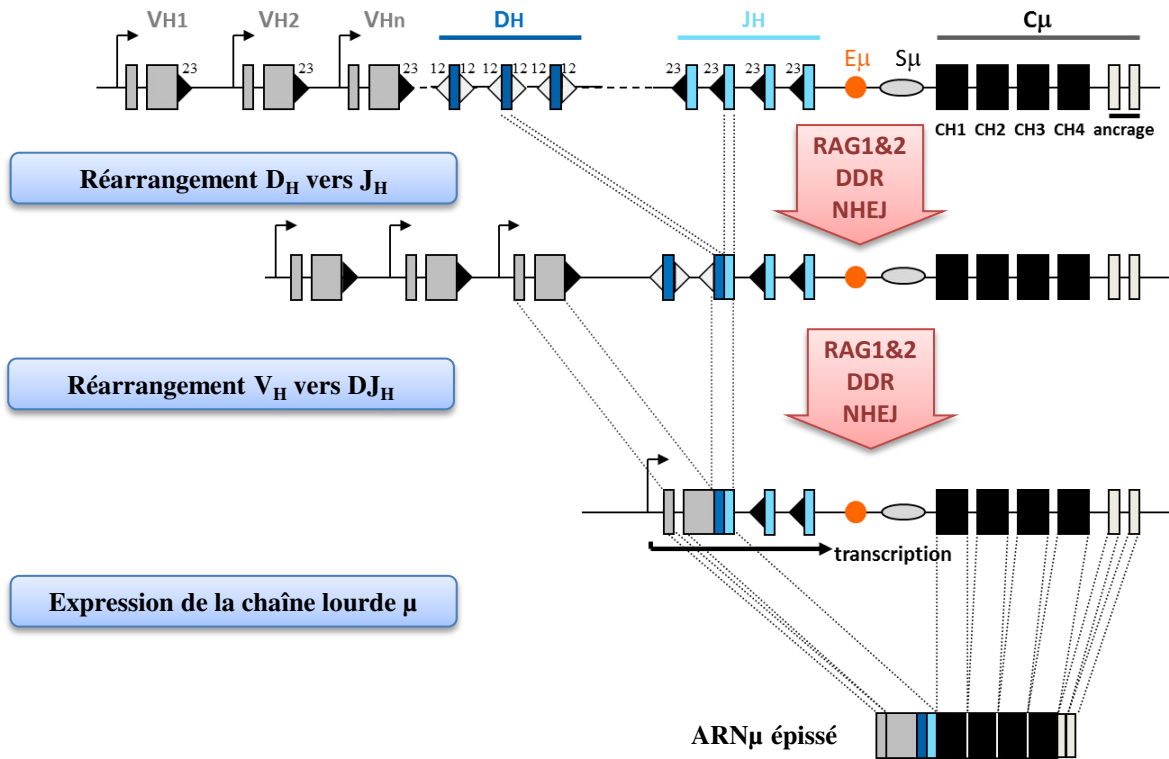
VJ aux loci des chaînes légères. Ce processus de recombinaison des gènes IgL permet aux cellules pré-B de remplacer leur SLC par une chaîne légère conventionnelle et donc de devenir des cellules B immatures qui expriment un BCR fonctionnel (Herzog et al., 2009).

### • Le stade B immature

Les cellules B immatures (ou fraction E selon la nomenclature de Hardy *et al.*, 1991) expriment un BCR fonctionnel de type IgM et n'expriment plus le marqueur CD43. C'est à ce stade, avant de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, que les cellules B vont subir une sélection négative mettant en évidence un deuxième point de contrôle important dans l'ontogénèse B (**Figure 5**). A cette étape, les cellules B exprimant des BCR auto-réactifs (*i.e.* qui reconnaissent des Ag du soi) subissent un processus de sélection négative et sont éliminées par apoptose afin d'éviter le développement des maladies auto-immunes (Nemazee and Bürki, 1989).

Il existe un deuxième mécanisme qui assure la tolérance centrale, connu sous le nom de l'édition du BCR : « *Receptor Editing* » (Hertz and Nemazee, 1997; Melamed and Nemazee, 1997; Sandel and Monroe, 1999; Casellas et al., 2001). Ce processus cible les cellules B qui ont échappé à la sélection négative, en opérant des réarrangements secondaires en particulier aux loci IgL afin de produire des nouvelles chaînes légères exprimant un BCR compatible avec les éléments du soi. Le locus Igk peut également subir des réarrangements de type kappa-RS (RS pour « *Recombining Sequence* »), durant lesquels un segment V $\kappa$  se recombine avec la séquence  $\kappa$ RS inactivant ainsi le locus Ig $\kappa$  (Edry and Melamed, 2004). Si ce processus se révèle infructueux, alors la cellule est soit éliminée par des mécanismes d'apoptose (Hartley et al., 1993; Norvell et al., 1995), soit inactivée par anergie (Pike et al., 1982; Goodnow et al., 1988).

A ce stade, les cellules B immatures, exprimant un BCR fonctionnel et non auto-réactif, quittent la moelle osseuse afin de rejoindre la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (*e.g.* rate, ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) où elles vont subir une 2<sup>ème</sup> vague de remaniements de leurs gènes d'Ig lors de la CSR et de la SHM (*cf* chapitre 1 § 6).



**Figure 6 : Principe des recombinaisons VDJ au locus IgH.**

Les réarrangements V(D)J ont lieu au cours de la phase précoce de l'ontogénie B dans la moelle osseuse. Les exons codants sont représentés par des rectangles, les introns par des traits fins, les signaux de recombinaison (RSS) par des triangles, les promoteurs par des flèches et l'activateur E<sub>μ</sub> par un cercle orange. La machinerie enzymatique catalysant les recombinaisons V(D)J est présentée par une flèche rose (*Extrait de Dudley et al., 2005*).

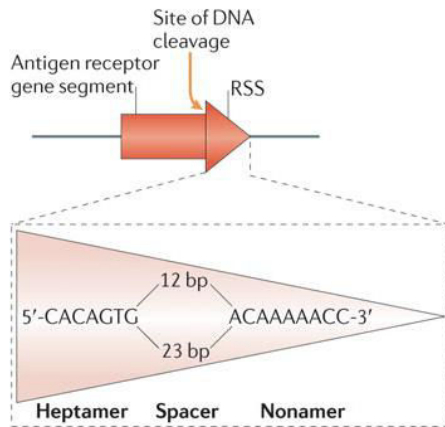
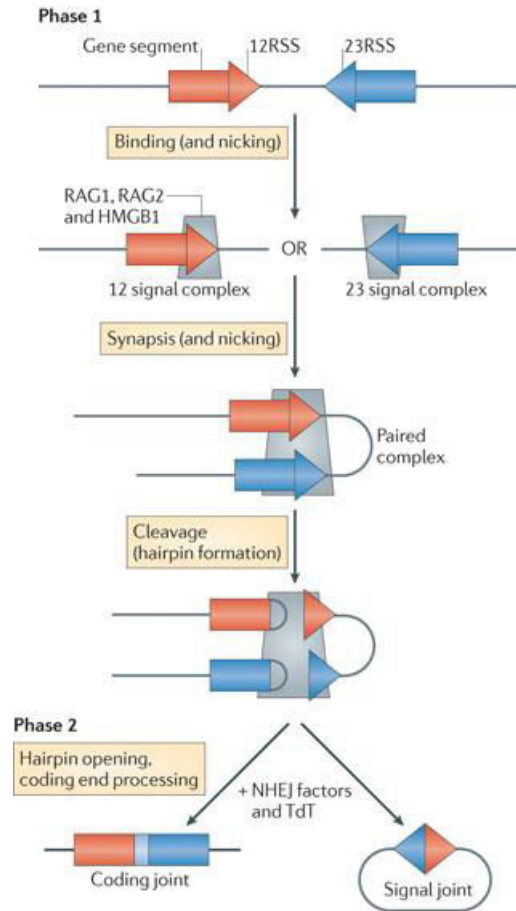
### 3- Remaniements des gènes d'Ig au cours du développement B précoce

#### i. Mécanistique des recombinaisons V(D)J

Les réarrangements V(D)J (**Figure 6**) commencent par l'action des protéines lymphoïdes spécifiques appelées RAG1 et RAG2 (pour « *Recombination-Activated Gene* ») (Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990). Des études ont montré qu'aucun réarrangement V(D)J ne se produit dans les souris déficientes en RAG1 ou RAG2 (Shinkai et al., 1992; Mombaerts et al., 1992; Schlissel et al., 1993). Ces endonucléases forment un complexe qui reconnaît des séquences signal de recombinaison hautement conservées appelées RSS (pour « *Recombination Signal Sequences* ») (Leu and Schatz, 1995). Ces séquences sont positionnées en 3' de chaque gène V, en 5' de chaque segment J et des deux cotés de chaque segment D. Les RSS sont composées d'une séquence heptamérique (7 nucléotides : CACAGTG) et d'une séquence nonamérique riche en A (9 nucléotides : ACAAAAACC). Ces séquences hautement conservées sont séparées par un « espaceur » moins conservé de 12 ou 23 nucléotides, d'où leurs noms de RSS-12 et RSS-23 (Tonegawa, 1983). Des recombinaisons efficaces se produisent entre une séquence RSS contenant un espaceur de 12 nucléotides et une RSS contenant un espaceur de 23 nucléotides, situées au sein du même locus (**Figure 7A**). Cette règle de 12/23, assure que les gènes se recombinent d'une façon appropriée, en évitant les réarrangements entre deux segments V ou deux segments J des chaînes lourdes et légères et elle empêche également qu'un segment V<sub>H</sub> ne s'associe à un segment J<sub>H</sub> (sans l'insertion d'un segment D entre les deux).

Les réarrangement V(D)J se divisent en deux étapes finement coordonnées : L'induction des cassures doubles brins et leurs réparations. Au cours de la première phase, les endonucléases RAG1 et RAG2 lient une séquence RSS-12 et une séquence RSS-23, qui flanque chacun des segments V, D et J et les rapprochent les unes des autres. Par la suite, des cassures doubles brins DSB (pour « *Double-Strand Break* ») vont avoir lieu au niveau des deux séquences RSS et les extrémités clivées sont maintenues au sein des complexes synaptiques (McBlane et al., 1995). L'endonucléase RAG1 clive l'ADN d'une façon ciblée au niveau d'une séquence RSS en introduisant une coupure simple brin entre le segment codant et la RSS, générant ainsi un groupement 3'hydroxyle libre qui va attaquer le second brin. Ensuite, RAG2 va intervenir et maintenir le complexe RAG1-RSS déjà formé puis capturer une séquence RSS partenaire pour former une synapse en forme d'épingle à



**A.****B.**

**Figure 7 : Mécanisme des recombinaisons V(D)J.**

**A.** Assemblage du locus IgH selon la règle « 12/23 ». Tous les segments V, D et J sont flanqués des séquences RSS (« *Recombination Signal Sequence* ») schématisées ici par des triangles. Elles sont constituées de deux types de séquences hautement conservées (les heptamères et les nonamères), séparées par un espaceur de 12 à 23 pb. Les réarrangements ont lieu majoritairement entre deux espaceurs de 12 et 23 nucléotides.

**B.** Réparation des cassures double-brins induites par le complexe protéique RAG. Lors de la première phase des recombinaisons V(D)J, le complexe composé de RAG-1, RAG-2 et HMGB1 se fixe au niveau des séquences RSS pour former une « synapse ». Le complexe RAG introduit des cassures double-brins et génère deux extrémités en épingle à cheveux dites « codantes » et deux extrémités « signal » à bouts francs. La deuxième étape consiste à réparer ces cassures double-brins par la voie NHEJ. Les facteurs impliqués dans cette voie facilitent l'ouverture des structures en épingle à cheveux. TdT ajoute des nucléotides au niveau des extrémités codantes. Le processus de réparation se termine grâce au complexe de ligature XRCC4 et DNA ligase IV, qui relie les extrémités franches formées et produisent des jonctions codantes modifiées (*Extrait de Schatz and Ji, 2001*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

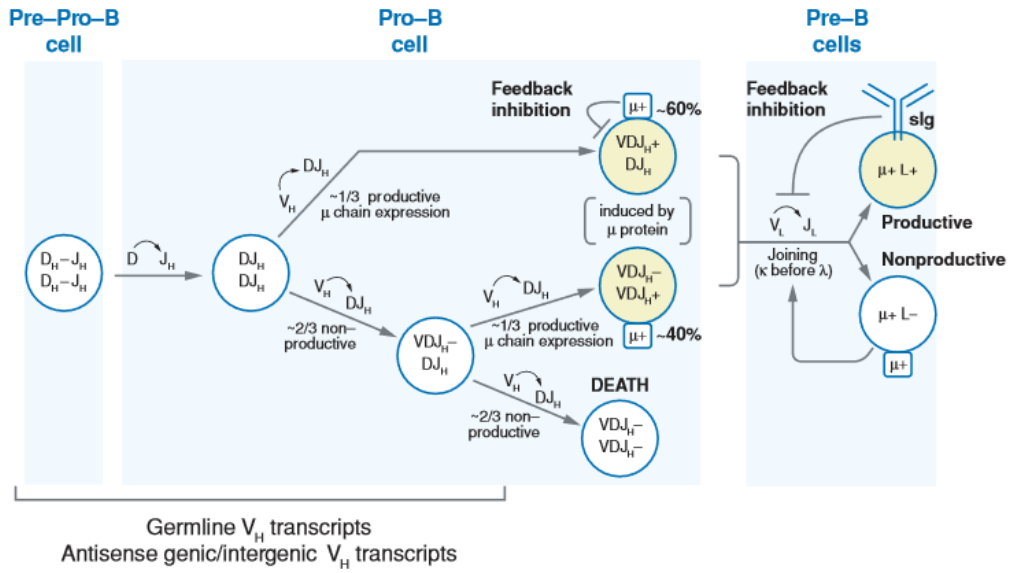
cheveux. Ce clivage génère deux extrémités codantes en épingle à cheveux et deux extrémités franches au niveau des RSS (pour revue Schatz and Spanopoulou, 2005).

La seconde phase des réarrangements V(D)J est caractérisée par la réparation des DSB générées auparavant (**Figure 7B**). Celle-ci est médiée principalement par les enzymes exprimées d'une manière ubiquitaire dans l'organisme et impliquées dans la machinerie de réparation des extrémités non homologues (NHEJ pour « *Non homologous End joining* »), voie prédominante pour la réparation des DSB chez les mammifères (Weterings and Chen, 2008). Pour résoudre la structure en épingle à cheveux ainsi formée, un complexe protéique contenant plusieurs facteurs, dont Ku70/80, DNA-PKcs (pour *DNA-dependant protein kinase catalytic subunit*), XRCC4 (pour « *X-ray Repair Cross-Complementing porotein 4* »), DNA ligase IV, l'endonucléase Artemis et Cernunnos intervient au niveau de l'ADN (Ma et al., 2002a; Schlissel, 2002; pour revue Boboila et al., 2012).

Bien que les extrémités franches des RSS et les extrémités en épingle à cheveux des segments codants mobilisent la même voie de réparation, elles ne seront pas réparées de la même façon. Les extrémités à bouts francs sont généralement liguées, sans modification de leur séquence, aboutissant à la formation des « épisomes » qui seront ensuite dégradés par la cellule. En revanche, les extrémités codantes vont subir des modifications *via* l'insertion ou la délétion de nucléotides. Les nucléotides insérés sont de deux types : (1) les nucléotides P (pour « *Palindromic* ») insérés par les ADN polymérase sur le brin le plus court, provoquant ainsi l'apparition de très courtes séquences palindromiques, et (2) les nucléotides N ( pour « *Non-germline nucleotide* ») riches en G/C qui vont être introduits de manière aléatoire aux extrémités des régions codantes *via* l'intervention de l'enzyme TdT (pour « *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* ») (Alt and Baltimore, 1982; pour revues Lewis, 1994; Motea and Berdis, 2010). L'expression de la TdT étant principalement détectée au stade pro-B ; par conséquent, les insertions N sont trouvées préférentiellement au niveau des réarrangements de chaînes lourdes. Cette étape d'apprêtement des extrémités assurera une diversité jonctionnelle entre les segments recombinants, permettant ainsi de générer un large éventail d'Ig à partir d'un nombre restreint de gènes.

### ii. Exclusion allélique et réarrangements ordonnés des gènes d'Ig

Le paradigme « *une cellule B - un anticorps* » repose sur un phénomène d'exclusion allélique au cours des réarrangements V(D)J. Ce processus permet de réaliser des



**Figure 8 : Phénomène d'exclusion allélique et réarrangements ordonnés des gènes d'Ig.**

Les réarrangements  $D-J_H$  s'effectuent sur les deux allèles dès le stade pré-pro-B. Ensuite, la recombinaison d'un segment  $V_H$  sur le segment  $DJ_H$  déjà réarrangé s'effectue sur un seul des deux allèles (phénomène d'exclusion allélique) durant le stade pro-B. Si ce réarrangement est productif ( $VDJ^+$ , partie du haut), la chaîne lourde peut s'associer avec une pseudo-chaîne légère pour former le pré-BCR. La signalisation en aval du pré-BCR permet à la cellule B de poursuivre sa maturation et d'activer les réarrangements des gènes de chaînes légères. Par contre, deux fois sur trois, ce réarrangement est non-productif et entraîne l'apparition de codon non-sens ( $VDJ^-$ , partie du bas). Un second réarrangement  $VDJ$  s'effectue alors sur le second allèle  $IgH$ . Les cellules présentant des réarrangements bi-alléliques de type  $VDJ^-/VDJ^+$  peuvent poursuivre leur maturation, tandis que les cellules hébergeant 2 réarrangements non-productifs  $VDJ^-/VDJ^-$  sont éliminées. L'état des réarrangements des gènes variables est indiqué au sein des cellules (dans les cercles) et les pourcentages indiquent la proportion de cellules présentant la configuration indiquée (*Extrait de Jung et al., 2006*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

réarrangements ordonnés au locus IgH, puis IgL. Son intervention conduit à la présence d'un seul allèle fonctionnel, codant chaque chaîne d'Ig, au sein d'une même cellule B. Ainsi, un lymphocyte B exprime à sa surface un seul type d'Ig ce qui lui assure une mono-spécificité antigénique (Boekel et al., 1998).

Bien que les recombinaisons  $D_H$  vers  $J_H$  se produisent simultanément sur les deux allèles IgH, l'étape de jonction entre un segment  $V_H$  et le segment  $DJ_H$  réarrangé se fait de façon séquentielle. Cette jonction se produit initialement sur un allèle, l'autre allèle étant considéré comme « exclu ». Compte tenu de la diversité jonctionnelle générée au cours des recombinaisons V(D)J, deux fois sur trois, un décalage du cadre de lecture peut avoir lieu provoquant ainsi l'apparition de codons stop prématurés (Mostoslavsky et al., 2004a). Si le réarrangement  $V_HDJ_H$  respecte le cadre ouvert de lecture, il est dit « productif » et il va donc coder pour une chaîne lourde fonctionnelle. L'expression d'une chaîne lourde  $\mu$  capable de s'associer à une pseudo chaîne légère, formée par les protéines  $V_{pré-B}$  (CD179a) et  $\lambda 5$  (CD179b), va alors permettre l'adressage membranaire du pré-BCR. La signalisation en aval du pré-BCR valide l'entrée de la cellule au stade pré-B et provoque une expansion clonale. De façon concomitante à cette prolifération, le signal pré-BCR réprime l'expression des enzymes RAG. Ceci a pour conséquence d'inhiber les réarrangements V- $DJ_H$  et donc de laisser l'allèle « exclu » dans un statut de réarrangement DJ (Jung et al., 2006). Dans le cas où le réarrangement  $VDJ_H$  sur le premier allèle est non-productif, l'absence d'expression de pré-BCR autorise le réarrangement  $V_H$  vers  $DJ_H$  sur le second allèle. Si ce nouveau réarrangement  $V_HDJ_H$  est productif et que la cellule peut exprimer le pré-BCR, elle poursuit sa maturation en hébergeant des réarrangements bi-alléliques  $VDJ^+/VDJ^-$ . En revanche, si ce second réarrangement n'est pas productif, la cellule pro-B est éliminée par apoptose, faute de pouvoir exprimer un pré-BCR (**Figure 8**) (Alt et al., 1984; Ehlich et al., 1993; Rajewsky, 1996). Une partie des LB possèdera donc deux allèles IgH réarrangés et les transcrits issus de l'allèle non-productif seront pris en charge par différents mécanismes de surveillance des ARN à laquelle une partie de ce présent manuscrit sera consacrée (Daly et al., 2007; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012).

Le signalisation en aval du pré-BCR joue un rôle crucial dans le maintien de l'exclusion allélique au cours des réarrangements. Cette signalisation contrôle la transition du stade pro-B au stade pré-B et permet de s'assurer que la cellule exprime une chaîne lourde unique avant d'initier les réarrangements sur le locus des chaînes légères (Mårtensson et al., 2007). Ce récepteur pré-B, formé par assemblage d'une chaîne lourde  $\mu$  et de la pseudo



## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

chaîne légère, est associée aux molécules de transduction du signal  $Ig\alpha$  (CD79a) et  $Ig\beta$  (CD79b). Comme énoncé précédemment, le signal transmis par le pré-BCR induit la prolifération et la sous expression des protéines RAG à la surface des cellules pré-B. A ce stade intensif de prolifération les cellules sont appelées « *large pre-B* », en référence à leur grande taille. Pour permettre la transition vers le stade « *small pre-B* », le signal pré-BCR exerce un rétro-contrôle négatif sur la transcription des gènes codant la pseudo chaîne légère, ce qui va inhiber sa propre expression. La diminution du signal s'accroît à chaque division cellulaire. Cette dilution aboutit à l'arrêt de la prolifération et à un changement morphologique des cellules. Ces cellules *small pre-B* réexpriment alors les enzymes RAG, avec pour conséquence le déclenchement des réarrangements  $V_L-J_L$  sur les loci de chaînes légères (pour revue Reth and Nielsen, 2014).

Comme pour les chaînes lourdes, les réarrangements V vers J aux loci des chaînes légères s'effectuent selon la règle 12/23. La différence majeure entre les réarrangements de chaînes lourdes et légères provient de l'absence d'expression de la TdT au stade pré-B. Les jonctions VJ présentent ainsi très peu de « N-diversité ». Les réarrangements de chaînes légères se produisent d'abord au locus  $Ig\kappa$ , puis au locus  $Ig\lambda$  si les premiers s'avèrent défectueux. Un réarrangement  $V\kappa$  vers  $J\kappa$  productif, codant une chaîne légère  $\kappa$  capable de s'associer avec la chaîne lourde  $\mu$ , permet l'expression d'un BCR de classe IgM. Le signal BCR, de façon analogue à celui du pré-BCR, diminue l'expression des enzymes RAG et conduit à l'arrêt des recombinaisons. L'expression d'un BCR fonctionnel non autoréactif marque le passage au stade de lymphocyte B immature. Par contre si le premier allèle est réarrangé d'une façon non productive, l'absence de signal BCR autorise les recombinaisons sur le second allèle  $Ig\kappa$ . Si les échecs se répètent, c'est le locus  $\lambda$  qui sera réarrangé selon le même principe. Ainsi, une même cellule exprime un seul type de chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$  (Gorman and Alt, 1998; Mostoslavsky et al., 2004a; Jung et al., 2006).

Pour tenter de comprendre comment les réarrangements V(D)J ciblent préférentiellement un allèle sur un même locus, Mostoslavsky *et al.*, ont analysé leur vitesse de réplication au cours de la division cellulaire (Mostoslavsky et al., 2001). Ces auteurs ont fait le constat que tous les loci d'Ig subissent une réplication asynchrone. Il en est de même pour les allèles contenant les gènes  $TCR\beta$  (Norio et al., 2005). Cette réplication asynchrone semble marquer chacun des allèles dès le stade embryonnaire et avant l'engagement dans la lignée lymphoïde. De façon intéressante, l'allèle qui présente une vitesse de réplication



rapide est celui sur lequel s'initie les recombinaisons V vers DJ pour les chaînes lourdes, ou V vers J pour les chaînes légères. Ainsi cette répllication asynchrone semble être à la base du phénomène d'exclusion allélique au cours des réarrangements V(D)J. Des modifications asymétriques de la structure chromatinienne (acétylation des histones, déméthylation de l'ADN...) vont alors se produire sur les allèles à répllication rapide, augmentant ainsi leur accessibilité aux enzymes RAG (Mostoslavsky et al., 1998, 2001).

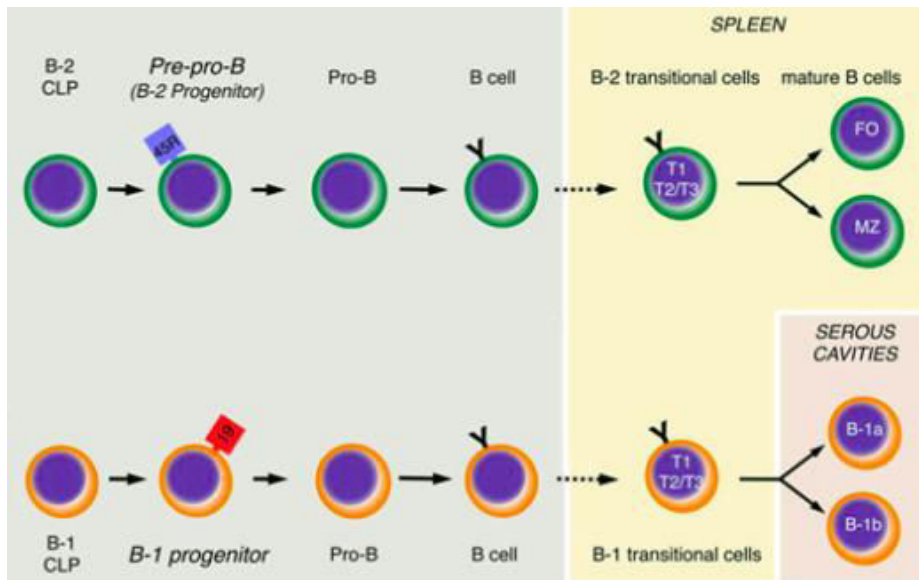
### 4- Maturation des cellules B au cours de la phase tardive du développement

Après leur sortie de la moelle osseuse, les cellules B immatures (naïves) empruntent la circulation sanguine afin de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses aussi appelés MALT pour « *Mucosae Associated Lymphoid Tissue* »). Dans ces organes, les cellules B activées par l'Ag vont poursuivre leur développement afin de se différencier en cellules sécrétrices d'Ig solubles ou anticorps (plasmocytes) et en cellules B mémoires. Cette seconde phase de la lymphopoïèse B aboutit à la production d'anticorps plus affins, grâce au phénomène d'hypermutation somatique (SHM), et dont les propriétés effectrices peuvent varier après activation de la CSR (*cf* chapitre 1 §6-i et 6-ii).

#### i. Les cellules B transitionnelles

Il est estimé que 10% des cellules B quittent la moelle osseuse pour se diriger en périphérie. Ces cellules avec une courte durée de vie de 1 à 5 jours sont qualifiées de B transitionnelles (Allman et al., 1992, 1993; Loder et al., 1999) au vue de leur stade intermédiaire de développement. Elles se caractérisent par leur grande sensibilité à l'apoptose en réponse à la signalisation du BCR, ainsi que par l'expression de marqueurs de surface tels que AA4.1 (CD93) et HSA (CD24) (Allman et al., 1992; Norvell and Monroe, 1996; Allman et al., 2001). A ce stade, les cellules vont exprimer une IgD à la membrane en plus de l'IgM acquise lors des stades ultérieurs. Cette co-expression est possible grâce à un mécanisme d'épissage alternatif d'un grand transcrit primaire contenant l'exon VDJ réarrangé et les exons constants C $\mu$  et C $\delta$  (Mountz et al., 1990; pour revue Chen and Cerutti, 2011). Cependant, les cellules B transitionnelles forment une population hétérogène. En fonction de leur localisation, de leur phénotype et de leur fonction, elles peuvent être divisées en trois





**Figure 9 : Modèle exposant le développement des cellules B-1 et B-2.**

Les cellules B-2 (partie du haut) sont produites dans la moelle osseuse après la naissance. Après maturation, elles migrent vers la rate (cellules B-2 transitionnelles T1, T2 et T3) puis selon la nature et la force de la signalisation BCR, ces cellules vont devenir des cellules B matures de la zone folliculaire (FO) ou de la zone marginale (MZ). Le développement des B-2 est dépendant d'IL-7. Les cellules matures B-1 (partie du bas) sont générées à partir des CLP B-1 qui se différencient séquentiellement en progéniteurs B-1, pro-B, pré-B (non représenté) puis en cellules B-immatures. Les cellules matures migrent ensuite vers la rate (stade transitionnel) et acquièrent des phénotypes B-1a ou B-1b au niveau des cavités pleurales et péritonéales (*Adapté de Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

sous-populations : les cellules T1 ( $\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD23}^-$ ), T2 ( $\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{high}}\text{CD23}^+$ ) et T3 ( $\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{high}}\text{CD23}^+$ ) (Allman et al., 2001).

Il est généralement admis que les cellules T1 sont phénotypiquement proches des cellules B immatures et se situent au niveau de la moelle osseuse, du sang et de la rate. C'est au niveau des manchons lymphoïdes péri-artériolaires, PALS (pour « *Periarterial Lymphatic Sheaths* ») situés dans la pulpe blanche, que ces cellules vont subir une sélection négative aboutissant à leur élimination par apoptose (Loder et al., 1999; pour revue Chung et al., 2003). Les cellules T1 qui arrivent à surpasser ce point de contrôle rentrent dans les follicules de la rate et deviennent des T2. L'engagement du BCR des cellules T2 induirait une sélection positive permettant leur différenciation en cellules B folliculaires (FO pour « *Follicular B Cells* ») ou cellules B de la zone marginale (MZ pour « *Maginal zone B cells* ») (Srivastava et al., 2005; Su et al., 2004).

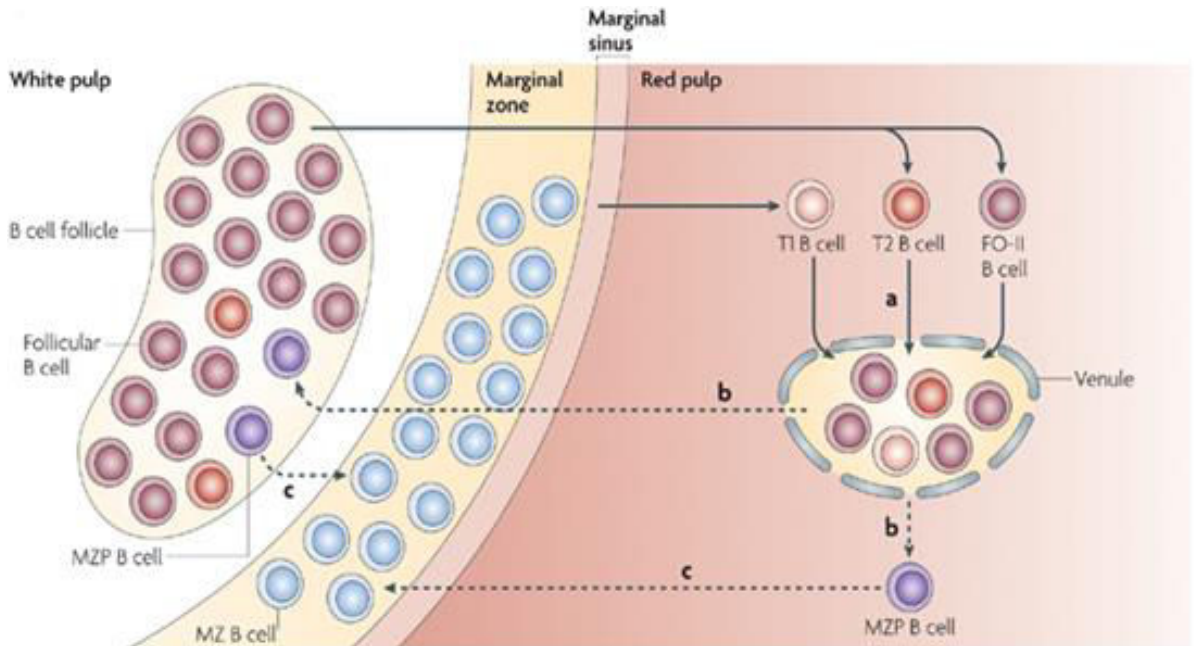
Différentes théories ont été proposées quand à la nature des cellules T3 (pour revue Allman and Pillai, 2008). Basé sur des expériences de marquage BrdU, il a été proposé que les T3 représentent une partie intermédiaire de la scène de développement  $\text{T1} \Rightarrow \text{T2} \Rightarrow \text{T3} \Rightarrow \text{B matures}$  (Allman et al., 2001). En revanche, d'autres études suggèrent que cette population ne soit pas à l'origine des cellules matures (Teague et al., 2007). Ces cellules T3 semblent en effet principalement auto-réactives et pourraient correspondre à une population de cellules anergiques (Merrell et al., 2006).

### ii. Les cellules B matures

Selon leur phénotype, leur localisation et leur fonction, les cellules T2 vont se différencier en cellules B matures qui peuvent être subdivisées en deux populations distinctes : les cellules de la catégorie B-1, connues comme étant des cellules productrices d'anticorps naturels (Reynolds et al., 2015) et les cellules de la catégorie B-2 qui sont plutôt associées à l'immunité adaptative. Elles s'appellent aussi des cellules B conventionnelles dont font partie les cellules B de la zone folliculaire (FO) et celles de la zone marginale (MZ) (**Figure 9**) (Pillai and Cariappa, 2009).

#### • Les cellules B-1

Les B-1 sont majoritairement rencontrées au niveau de la cavité péritonéale et pleurale (Martin and Kearney, 2001). Elles représentent 30 à 60% des LB totaux sur ce site (Baumgarth, 2013) et sont rarement trouvées au niveau de la rate et des autres organes



**Figure 10 : Structure schématique de la rate.**

Ce schéma indique la localisation spécifique des différents types cellulaires dans la rate. La rate contient une gaine lymphoïde périartériolaire (PALS: Periarterial Lymphatic Sheaths), correspondant à la pulpe blanche où sont positionnées les cellules B de la zone folliculaire (FO). Les cellules B de la zone marginale (MZ) se situent à la jonction de la pulpe rouge et de la pulpe blanche. Cette zone est séparée de la pulpe blanche par le sinus marginal formé par une branche terminale de l'artère centrale. MZP: précurseurs de la zone marginale (*Extrait de Pillai and Cariappa, 2009*).

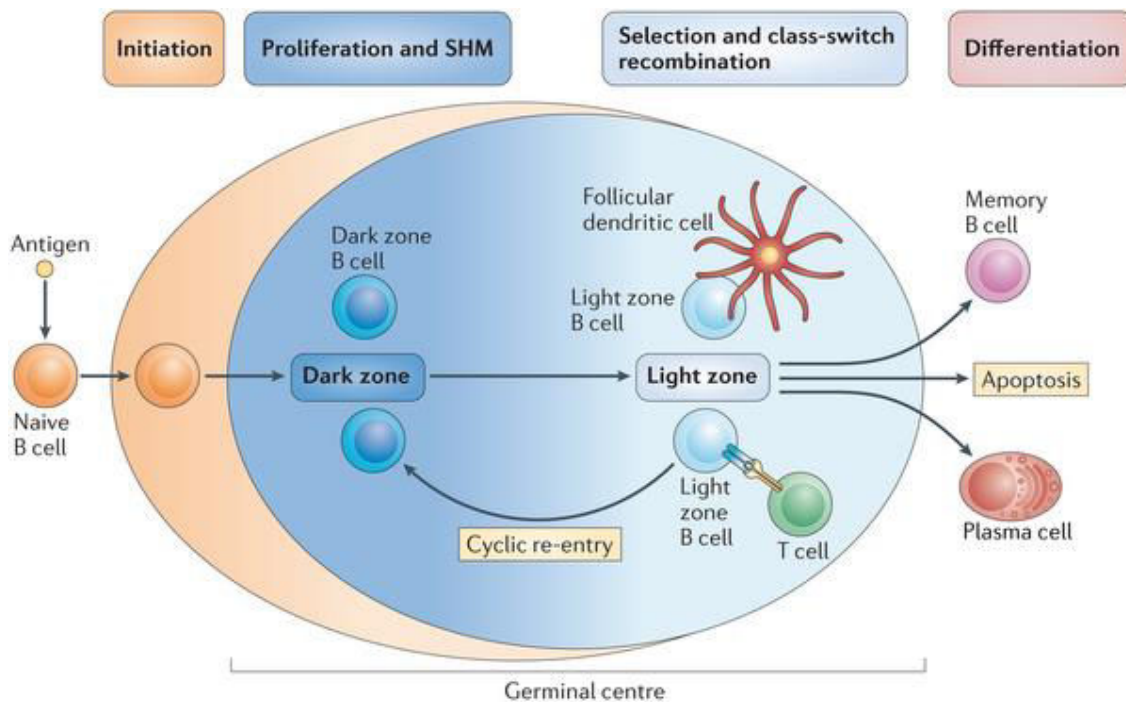
lymphoïdes (0,2 à 1%). Ces cellules représentent une population hétérogène divisée en deux sous-classes. Sur la base de l'expression du marqueur de surface CD5 (Iy-1), nous pouvons distinguer les cellules B-1a qui l'expriment des cellules B-1b qui ne l'expriment pas (Haas, 2015). Les cellules B-1a produisent des anticorps naturels importants pour la protection précoce, alors que les cellules B-1b sont induites après exposition à un Ag, fournissant ainsi une protection à long terme (Haas et al., 2005). L'origine de ces cellules reste encore controversée. Cependant, elles sont facilement générées à partir des précurseurs de foie fœtal mais leur production est réduite à l'âge adulte (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012). Plusieurs hypothèses ont été émises afin de comprendre le développement des cellules B-1. La première présume que les cellules B-1 ont pour origine une lignée propre différente des cellules B-2 (Herzenberg et al., 2000; Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2006) alors que la seconde suppose que les cellules B-1 et B-2 se développent à partir d'une même origine mais dérivent vers des destinations différentes selon le type de signal reçu.

- **Les cellules B-2**

Les cellules B-2 appelées aussi « cellules B conventionnelles » sont générées à partir des précurseurs de la moelle osseuse et se regroupent en deux sous-ensembles de cellules B matures : les cellules B de la zone marginale (MZ) et les cellules B de la zone folliculaire (FO) (**Figure 9**).

- **Les cellules B de la zone marginale (MZ)**

Les cellules B MZ constituent 5 à 10% des cellules B de la rate. Leur nomenclature fait référence à leur localisation au niveau de la zone marginale de la rate, à l'interface de la pulpe blanche et la pulpe rouge (**Figure 10**) (Weill et al., 2009). Elles se caractérisent par une forte expression d'IgM et des marqueurs de surface CD21 et CD1d et une faible expression d'IgD et du marqueur CD23. Ces cellules répondent aux stimuli TLR (pour « *Toll Like Receptor* ») et participent à la réponse immunitaire précoce. Suite à une stimulation indépendante des cellules T, elles peuvent se différencier en plasmocytes de courte durée de vie (extra folliculaires), producteurs essentiellement d'anticorps de type IgM (Martin et al., 2001). Il a été ainsi démontré que ces cellules pouvaient effectuer une commutation de classe en produisant des IgA en réponse à certaines protéines membranaires ou lipides bactériens (Cerutti et al., 2013).



**Figure 11 : Génération du centre germinatif.**

Ce schéma décrit le cheminement des cellules ainsi que les différents évènements ayant lieu au sein du centre germinatif (GC). Les cellules B activées suite à une stimulation antigénique vont former une population appelée « centroblastes », proliférant dans la zone sombre (*dark zone* DZ). Le processus de SHM se produit dans ces centroblastes. Les cellules centroblastiques vont ensuite migrer dans la zone claire (*light zone* LZ) pour devenir des « centrocytes ». Au sein de la LZ, les cellules sont sélectionnées sur la base de l'affinité du BCR vis-à-vis de l'Ag. Cette sélection repose sur des interactions avec les FDC (cellules dendritiques folliculaires) et les cellules  $T_{FH}$  (LT auxiliaires folliculaires). Le GC est fonctionnellement polarisé : la DZ est le site de prolifération et de SHM alors que la LZ est le lieu où les cellules B subissent une activation et une sélection. La maturation des cellules B ne se fait pas selon une voie uni-directionnelle entre ces deux compartiments. Les centrocytes peuvent retourner dans la DZ pour subir un nouveau tour de SHM. C'est le phénomène de « cyclic re-entry /recyclage». Après sélection positive des cellules les plus affines pour l'Ag, les centrocytes subissent la CSR et se différencient en plasmocytes ou en cellules B mémoires (*Extrait de Basso and Dalla-Favera, 2015*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

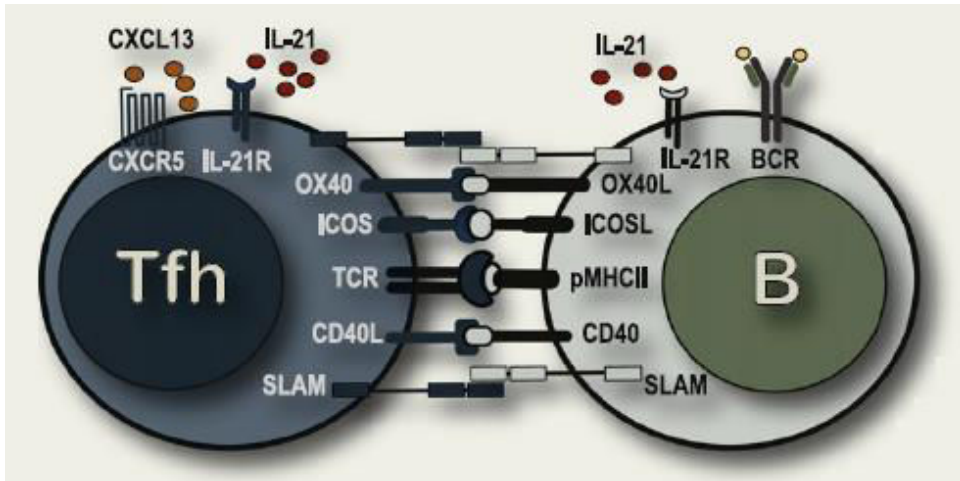
### - Les cellules B de la zone folliculaire (FO)

Les cellules B FO représentent la majeure partie des cellules lymphocytaires B de la rate et des ganglions lymphatiques. Elles sont rencontrées au niveau de la pulpe blanche à l'intérieur des follicules primaires d'où elles tirent leur nom (**Figure 10**) (pour revue Pillai and Cariappa, 2009). Ces cellules ont une durée de vie relativement longue (demi-vie de 5 mois chez la souris) (Förster and Rajewsky, 1990), et elles se caractérisent par une forte expression de CD23 et une faible expression du marqueur CD21. Les B FO répondent préférentiellement à une stimulation T-dépendante au sein des centres germinatifs (*cf* détails dans le paragraphe suivant) et aboutissent à la formation des cellules B mémoires et des plasmocytes à longue durée de vie (pour revue Good-Jacobson and Tarlinton, 2012).

### 5- Formation des centres germinatifs

En réponse à une stimulation antigénique de type T-dépendante (qui nécessite une coopération entre les cellules B et les cellules T), les cellules B naïves migrent au sein des follicules primaires. Ces follicules sont séparés par une région inter-folliculaire et sont bordés par une zone riche en cellules T. Au centre de ces follicules, les cellules B sont en contact avec un réseau de cellules dendritiques folliculaires (FDC pour « *Follicular Dendritic Cells* ») (Victoria and Nussenzweig, 2012; Heesters et al., 2014).

L'initiation des GC (pour « *Germinal Center* ») débute par l'activation des cellules B par un Ag (**Figure 11**). La cellule B reconnaît son Ag sous forme soluble ou sous forme native à la surface des FDC. Cette activation nécessite une collaboration entre les cellules B folliculaires, les cellules T CD4<sup>+</sup> et les FDC qui jouent le rôle de « cellules présentatrices d'Ag » ou CPA. Ces cellules vont présenter un complexe contenant les peptides antigéniques avec les molécules de CMH II (complexe majeure d'Histocompatibilité de classe II) aux lymphocytes T. Cette reconnaissance entraîne l'activation des cellules T ainsi que leur migration au niveau de la zone inter-folliculaire (zone d'interaction entre cellules B et T), où elles prennent le nom des cellules T<sub>FH</sub> (pour « *T Follicular Helper* »). Ces T<sub>FH</sub> fourniront des signaux de prolifération et/ou de différenciation nécessaires à la survie des cellules B (*i.e.* liaison CD40-CD40L) (**Figure 12**) (Fazilleau et al., 2009; Ma et al., 2012). En revanche lors de la sélection clonale, si les LB n'interagissent pas correctement avec les FDC et les T<sub>FH</sub>, elles seront moins aptes à endocyter l'Ag afin de le présenter aux T<sub>FH</sub>, et par conséquent elles



**Figure 12 : Représentation schématique d'une interaction  $T_{FH}$ -B au sein du centre germinatif.**

Les différentes interactions entre les cellules T et B se font suite à une rencontre BCR-Ag. L'Ag sera apprêté et présenté *via* le CMH de classe II aux cellules T qui le reconnaîtront *via* le TCR. Les  $T_{FH}$  sont caractérisées par la sécrétion d'IL-21 et expriment le CXCR5 permettant leur migration dans le follicule et leur maintien dans de le centre germinatif. Le signal fournit aux cellules B *via* les interactions CD40-CD40L permet leur survie et leur prolifération. D'autres interactions notables sont faites *via* ICOS et ICOSL pour former des contacts stables T-B. CXCR5: Chemokine Receptor; ICOS: Inducible COSTimulator (*Extrait de Fazilleau et al., 2009*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

seront contre-sélectionnées et mourront par apoptose (pour revue Victora and Nussenzweig, 2012). D'une façon générale, les GC apparaissent deux jours après l'immunisation et quelques semaines plus tard ces structures régressent et finissent par disparaître (Zotos and Tarlinton, 2012).

Histologiquement, les GC sont divisés en deux compartiments distincts : **la zone sombre** (DZ pour « *Dark Zone* ») et **la zone claire** (LZ pour « *Light Zone* ») (**Figure 11**).

(1) La **DZ**, située à proximité de la zone T, est constituée des cellules B en prolifération exprimant peu d'Ig de surface appelées centroblastes. Ces cellules vont subir des modifications au niveau des gènes codant les gènes d'Ig : la SHM qui s'effectue grâce à l'introduction des mutations ponctuelles au sein des régions variables des chaînes lourdes et légères d'Ig afin d'améliorer leur affinité pour l'Ag (pour revue Di Noia and Neuberger, 2007).

(2) La **LZ** est proche de la zone marginale de la rate, les lymphocytes B qui y siègent s'appellent centrocytes (cellules en quiescence), capables de se différencier en plasmocytes ou en cellules B mémoires. Dans cette zone, les cellules B sont en compétition pour la sélection clonale, dépendante de la capacité du BCR à reconnaître son Ag. A ce stade les cellules vont subir la commutation de classe (CSR), qui permet la production d'un isotype d'Ig différent de l'IgM/IgD, afin d'acquérir de nouvelles fonctions effectrices en conservant l'affinité pour l'Ag (Chaudhuri and Alt, 2004; Chaudhuri et al., 2007). Ces deux mécanismes génétiques (SHM et CSR), très importants pour la diversification des anticorps, seront décrits ultérieurement.

Il est intéressant de noter que l'organisation DZ et LZ du GC est permise en particulier grâce à l'expression différentielle par les cellules B des récepteurs aux chimiokines CXCR5 (pour « *chemokine (C-X-C motif) Receptor 5* ») dans la LZ et CXCR4 dans la DZ (Allen et al., 2004). En effet, la distinction phénotypique des cellules de ces deux compartiments se fait sur la base de l'expression de CXCR4 et des marqueurs d'activation CD83 et CD86 (Victora et al., 2010). Chez la souris, les cellules B de la DZ expriment les marqueurs  $CXCR4^{hi}CD83^{low}CD86^{low}$  alors que les cellules B de la LZ présentent un profil  $CXCR4^{low}CD83^{hi}CD86^{hi}$ . Ainsi, les souris déficientes pour CXCR4 présentent des GC complètement désorganisés et les cellules B issues d'animaux  $CXCR5^{-/-}$  sont dans l'incapacité de s'accumuler dans la LZ (Allen et al., 2004). Les chimiokines CXCL13 (ligand du CXCR5) produites par les FDC interviennent dans la mise en place du GC et le recrutement des





## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

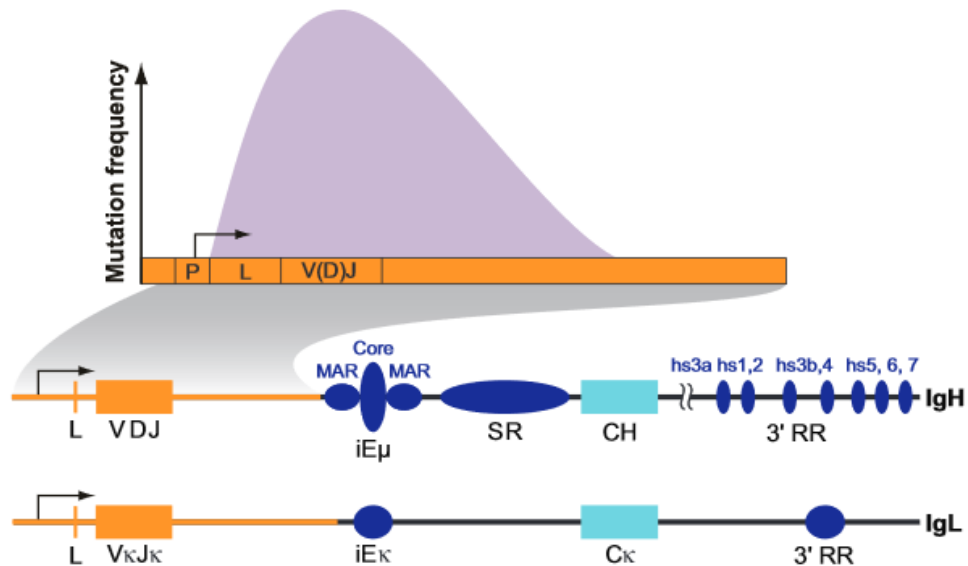
populations cellulaires dans la LZ (MacLennan, 1994). Le facteur de transcription *Bcl6* (pour « *B Cell Lymphoma 6* ») s'avère être l'un des acteurs principaux de la différenciation T<sub>FH</sub> et le master régulateur des cellules B du GC (Kitano et al., 2011). En son absence, les cellules B n'entrent pas dans les follicules et n'expriment pas CXCR4. *Bcl-6* inhibe l'expression du facteur anti-apoptotique *Bcl-2* (pour « *B Cell Lymphoma 2* »), permettant ainsi de maintenir un certain niveau de vigilance lors du processus de SHM. Cet état pro-apoptotique favorise l'élimination des cellules B exprimant un BCR défectueux ou de faible affinité et la sélection positive des cellules exprimant un BCR de haute affinité. *Bcl-6* inhibe également l'expression du facteur *Blimp-1* (pour « *B lymphocyte-induced maturation protein-1* ») nécessaire à la différenciation des cellules B en plasmocytes et régule ainsi la sortie des cellules du GC (Basso and Dalla-Favera, 2010; Victora and Nussenzweig, 2012).

Notons que le GC est une structure dynamique dans laquelle une migration interzone est autorisée. Des études ont montré que le mouvement de la zone sombre vers la zone claire n'est pas unidirectionnel et que les centrocytes de la LZ sélectionnés positivement peuvent retourner dans la DZ afin de subir un nouveau cycle de prolifération/mutation et d'exprimer un BCR encore plus affin pour l'Ag (pour revues Meyer-Hermann and Maini, 2005; De Silva and Klein, 2015). Ce phénomène appelé « *cyclic re-entry* » a été observé par l'équipe de Nussenzweig qui a montré, en utilisant des cellules photoactivables, qu'environ 50% des LB suivent le chemin classique DZ-LZ en 4h et que 10% font le chemin inverse (Victora et al., 2010).

Suivant leur localisation dans la DZ ou la LZ, les cellules B du GC sont caractérisées par une forte expression d'un glycanes sialilé (*2,6-linked N-acetylneuraminic acid*), reconnu par l'anticorps monoclonal GL7, et leur liaison à la PNA (pour « *PeaNut Agglutinin* »). Les cellules activées perdent l'expression de l'IgD et expriment le récepteur CD95 (ou Fas), impliqué dans l'apoptose (Naito et al., 2007). Ceci confirme leur sensibilité accrue à l'apoptose lors de la sélection clonale. Enfin les cellules B du GC expriment l'enzyme AID (pour « *Activation-Induced Deaminase* »), connue comme étant l'enzyme maîtresse du GC.

### 6- Réarrangements secondaires aux loci d'Ig

Bien que la SHM et la CSR ont des fonctions différentes, ces deux processus, critiques pour la diversification des anticorps nécessitent l'intervention de l'enzyme AID,



**Figure 13 : Profil des hypermutations somatiques induites par AID.**

Le profil et la fréquence de mutations au locus IgH et Igκ sont indiqués sur ce schéma (violet). Les régions variables réarrangées des chaînes lourdes (en haut: IgH) et légères (en bas: IgL) sont soumises à un taux élevé de mutations ponctuelles. Ces mutations observées lors de la SHM s'accumulent de 100 à 200 pb en aval du site d'initiation de la transcription et peuvent s'étendre jusqu'à environ 2 kb en aval de ce site. Les traits oranges représentent la zone de ciblage d'AID au locus IgH et Igκ, sur l'exon VDJ et VJ respectivement. Les *enhancers* E $\mu$  et E $\kappa$  ainsi que les parties constantes C $\mu$  et C $\kappa$  sont hors de portée de la région ciblée. L; Leader; SR: Switch Region; 3'RR: 3' Regulatory Region; MAR: Matrix Attachment Region (*Extrait de Peled et al., 2008*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

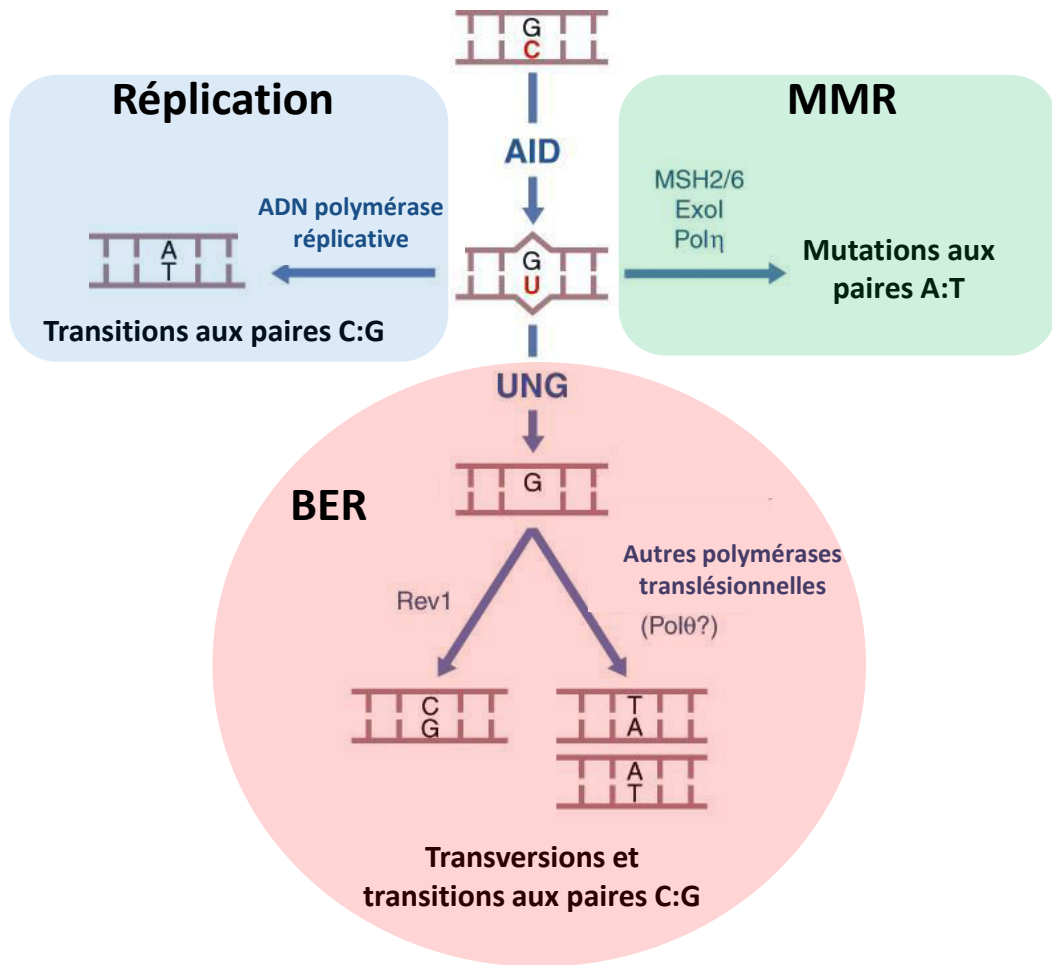
essentiellement exprimée au niveau des GC (Muramatsu et al., 1999). Sa délétion chez la souris n'affecte pas le développement B mais bloque la SHM et le CSR (Muramatsu et al., 2000).

Découverte par l'équipe de T. Honjo, en 1999, cette petite protéine de 26 kDa est codée par le gène *Aicda*. Elle appartient à la famille des déaminases éditrices d'ARN, APOBEC (pour « *APOLiloprotein B mRNA editing Enzyme-Catalytic* »). Cependant, il a été démontré qu'AID agissait sur l'ADN simple brin (ssDNA pour « *single strand DNA* ») (pour revue Di Noia and Neuberger, 2007). C'est une protéine dite « navette », elle est principalement localisée et maintenue au niveau du cytoplasme (Rada et al., 2002; Schrader et al., 2005), mais elle exerce son activité dans le noyau des cellules B activées (Ito et al., 2004; Patenaude and Di Noia, 2010). La fonction de cette enzyme est régulée par phosphorylation qui se fait *via* la protéine kinase-A (*c-AMP-dependent Protein Kinase A*) (Basu et al., 2005).

Sur le plan mécanistique, AID catalyse la déamination d'une Cytosine (C) en Uracile (U) sur des sites particuliers au niveau de l'ADN appelés points chauds autrement dits « *hotspots* » (Dörner et al., 1998). Ces séquences ont le motif suivant WRCY (W = weak = dA/dT, R = purine = dA/dG et Y = pyrimidine = dT/dC) (Hwang et al., 2015). Le mésappariement dU:dG résultant de l'action d'AID est ensuite pris en charge par différents systèmes de réparation de l'ADN afin de produire des mutations ponctuelles dans la partie variable des chaînes lourdes et légères d'Ig (cas de la SHM) ou des cassures doubles brins au sein des régions répétitives « *Switch* » au locus IgH (cas de la CSR) (Di Noia and Neuberger, 2007; Alt et al., 2013).

### i. Hypermutation somatique (SHM)

Les réarrangements des segments géniques déterminent le répertoire primaire des Ig. Afin d'accroître l'affinité de ces récepteurs à l'Ag, des mutations fréquentes (de l'ordre de 10 mutations pour 1000 pb) sont générées au niveau des gènes V : c'est le processus de SHM (pour « *Somatic HyperMutation* ») (pour revue Seki et al., 2005). La SHM se produit après la rencontre avec un antigène en périphérie et elle s'accumule au niveau des régions hypervariables (CDR pour « *Complementarity Determining Region* »). La **Figure 13** représente la fréquence des mutations introduites lors de la SHM. Ce processus nécessite l'aide des cellules T *via* l'interaction CD40 : CD40-ligand. Les mutations sont ensuite introduites ultérieurement durant la réplication lorsque se produit la réparation des résidus



**Figure 14 : Prise en charge des mésappariements générés lors de l'hypermutation somatique (SHM).**

AID initie les hypermutations somatiques par déamination des cytidines sur un brin d'ADN. Cette déamination conduit à l'apparition d'une uracile, donnant lieu à un mésappariement G:U. Ce mésappariement est pris en charge par trois voies différentes: la simple répllication, la MMR (*MisMatch Repair*) ou la BER (*Base Excision Repair*). UNG: Uracil DNA-Glycosylase; EXO1: Exonuclease 1; MSH: Homologue of Escherichia coli MutS; Polη: Polymerase (DNA-directed)- η (*Extrait de Di Noia and Neuberger, 2007*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

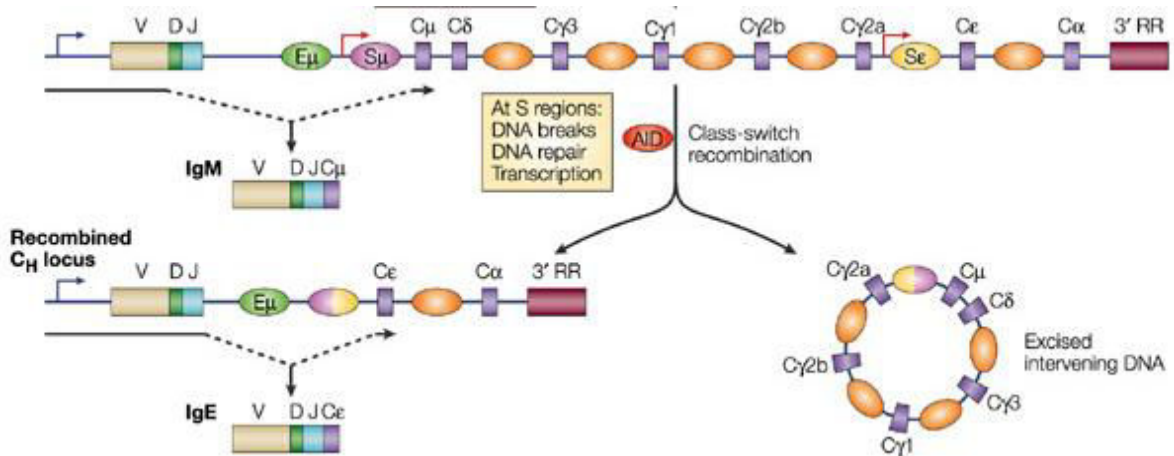
Uraciles (U) (Rada et al., 1998). Lors de la SHM, le mésappariement généré par AID peut être pris en charge par trois voies différentes (**Figure 14**) (pour revue Peled et al., 2008). Dans le cas où l'ADN contenant le mésappariement est simplement répliqué, l'Uracile peut être ignorée par l'ADN polymérase et elle est donc considérée comme une Thymine (mutation de type transition). Un deuxième cas de figure consiste en l'excision de la déoxyuridine par l'Uracile Glycosylase (UNG pour « *Uracil DNA-Glycosylase* »), créant ainsi un site abasique. Ce dernier est pris en charge par la voie BER (pour « *Base Excision Repair* ») qui fait intervenir des polymérases infidèles qui vont insérer une des quatre bases à la place de dU (mutation de type transition ou transversion) (Rada et al., 2002; Pérez-Durán et al., 2012). Enfin, le mésappariement peut être reconnu par la machinerie de réparation MMR (pour « *MisMatch Repair* »), qui fait intervenir un hétérodimère MSH2/MSH6 (pour « *MutS Homologue 2 et 6* »), puis le complexe protéique MLH1/PMS2 (pour « *Mut Homologue1/Post Meiotic Segregation2* »). Cet hétérotétramère ainsi formé permet l'élimination du fragment d'ADN contenant l'Uracile suite au recrutement de l'endonucléase 1 (EXO1), puis des polymérases infidèles interviennent afin de synthétiser un nouveau brin (mutation de type transition ou transversion) (Hwang et al., 2015; Rada et al., 1998).

Lorsque les mutations améliorent l'affinité pour un antigène particulier, les LB vont être sélectionnés positivement et survivre dans un microenvironnement du GC. En revanche, si les mutations accumulées lors de la SHM diminuent l'affinité du BCR, les LB seront éliminés par apoptose (MacLennan, 1994).

### ii. Commutation de classe (CSR)

La commutation de classe (CSR pour « *Class-Switch Recombination* ») permet l'expression de différents isotypes d'Ig, sans changer la spécificité antigénique. Le choix de l'isotype produit dépend de l'environnement cytokinique auquel les cellules B sont exposées. Par exemple, chez la souris, une stimulation des cellules B en présence de TGF $\beta$  favorise la transcription germinale C $\alpha$  et le *switch* vers IgA. Alternativement, une stimulation en présence d'IL-4 favorise le *switch* vers IgG1 et IgE (Grawunder et al., 1997). En réponse au lipopolysaccharide (LPS) sans addition de cytokines, les isotypes prédominants sont les IgG3 et IgG2b.

Les gènes codant pour les différents isotypes des Ig (gènes C<sub>H</sub>) sont localisés en aval de l'exon VDJ au niveau du locus IgH. Chez la souris, le locus C<sub>H</sub> est organisé de la façon suivante : 5'-V(D)J-C $\mu$ -C $\delta$ -C $\gamma$ 3-C $\gamma$ 1-C $\gamma$ 2b-C $\gamma$ 2a-C $\epsilon$ -C $\alpha$ -3'(**Figure 15**). En amont de chaque



**Figure 15 : Schéma de la recombinaison de classe au cours de la phase tardive du développement B.**

Suite à une rencontre avec l'Ag, les cellules B exprimant une IgM peuvent subir une commutation de classe (CSR) et seront donc capables de changer la région constante  $C_{\mu}$  par une autre région constante située en aval. L'exemple représenté ici est celui d'une commutation vers IgE. La recombinaison a lieu entre deux régions switch (S), une donneuse  $S_{\mu}$  (ovale rose) et une acceptrice  $S_{\epsilon}$  (ovale jaune). Elle nécessite l'intervention de l'enzyme AID (ovale orange), ce qui va créer des lésions au niveau des régions S qui précèdent les gènes de la région constante. Ces lésions vont induire des cassures double-brins, puis la formation d'une jonction entre les deux régions S partenaires. Ces cassures sont réparées et liguées et le fragment d'ADN intermédiaire, situé entre  $S_{\mu}$  et  $S_{\epsilon}$  est éliminé sous forme d'épisome. Après la CSR, un ARNm est initié à partir du promoteur V ( $\epsilon$ ARNm), ce qui permet la production d'une IgE. Les flèches coudées indiquent les sites d'initiation de la transcription (*Extrait de Chaudhuri et Alt, 2004*).

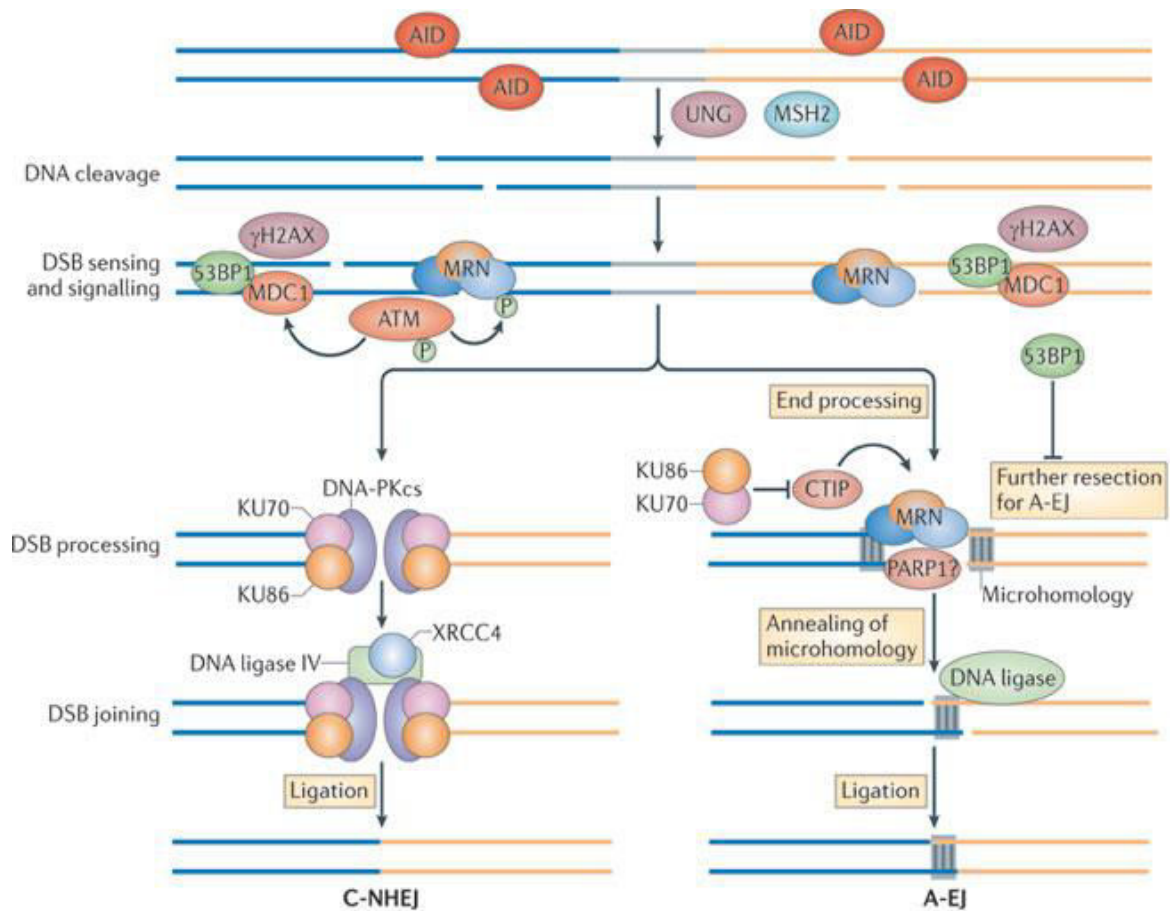
## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

région constante, sauf pour C $\delta$ , se trouve une région à l'extrémité 5' nommée *switch* (S). Ces régions S diffèrent entre les isotypes mais ont en commun, des séquences répétées, riches en G/C, dont la taille varie entre 1kb et 12kb, et qui sont la cible des mutations ponctuelles à l'origine des DSB (pour « *Double strand break* ») et de la CSR (Dunnick et al., 1993). En amont de chaque région S, on trouve un exon I et un promoteur, qui initient la production des transcrits germinaux, dits aussi transcrits stériles ou non codants du gène C<sub>H</sub> associé (Snapper et al., 1997; Manis et al., 2002). Comme ils sont antérieurs à la CSR, ils sont connus sous le nom des transcrits pré-switch (pour revue Chaudhuri and Alt, 2004). La génération de ces transcrits est nécessaire pour la mise en place de la CSR. Dans ce sens, il a été démontré que les cellules porteuses de mutations au niveau de l'exon I ou de son promoteur présentent un défaut de *switch* (Zhang et al., 1993; Bottaro et al., 1994). La transcription des régions S permet d'exposer un brin d'ADN à l'action de l'enzyme AID qui va initier la création de multiples lésions de l'ADN (pour revue Chaudhuri and Alt, 2004). Ce phénomène conduit à l'apparition des DSB au niveau de la région S dite « donneuse » et au niveau d'une région S dite « acceptrice ». Ces DSB ainsi formées seront majoritairement réparées par la voie du C-NHEJ (pour « *Classical Non-Homologous End Joining* ») (**Figure 16**). Cependant, l'absence d'un des facteurs impliqués dans cette voie tels que Ku70 diminue l'efficacité de la CSR mais ne l'abolit pas complètement. Cela suggère que la voie de C-NHEJ peut être suppléée par une seconde voie alternative appelée A-EJ (pour « *Alternative End Joining* ») (Vaidyanathan et al., 2014).

La portion chromosomique, qui contient la séquence entre la région S $\mu$  et la région S cible est excisée sous forme de cercle appelé « épisode ». La CSR juxtapose ainsi l'exon VDJ réarrangé avec en aval un nouveau gène constant. La transcription et l'épissage de cette chaîne aboutit à l'expression d'un nouvel isotype d'Ig. La **Figure 15** illustre le processus de CSR avec l'exemple de *switch* de l'isotype IgM vers IgE.

Récemment, notre laboratoire a découvert un nouveau phénomène appelé recombinaison suicide ou LSR (pour « *Locus Suicide Recombination* »). Il s'avère qu'un processus similaire à celui observé lors de la CSR se produit entre la région S $\mu$  et des régions répétitives nommées LS (pour « *Like-Switch* ») localisées au niveau de la région 3'RR (pour « *Regulatory Region* »). Une telle recombinaison va induire la délétion de toutes les régions constantes du locus IgH, inhibant ainsi l'expression du BCR à la surface des lymphocytes B et entraînant la mort cellulaire par apoptose (Péron et al., 2012). Des études sont en cours au laboratoire pour tenter d'identifier les mécanismes responsables de ce suicide cellulaire.





**Figure 16 : Résolution des cassures double-brins.**

AID induit des cassures double-brins dans les régions switch ciblées par le processus de CSR. La résolution de ces cassures fait intervenir la machinerie de réparation qui se fait soit par la voie C-NHEJ (gauche du schéma), soit par la voie A-EJ (droite du schéma). C-NHEJ: Classical Non Homologous End Joining; A-EJ: Alternative End Joining (*Extrait de Xu et al., 2012*).

### 7- Sortie des centres germinatifs : plasmocytes et lymphocytes B mémoires

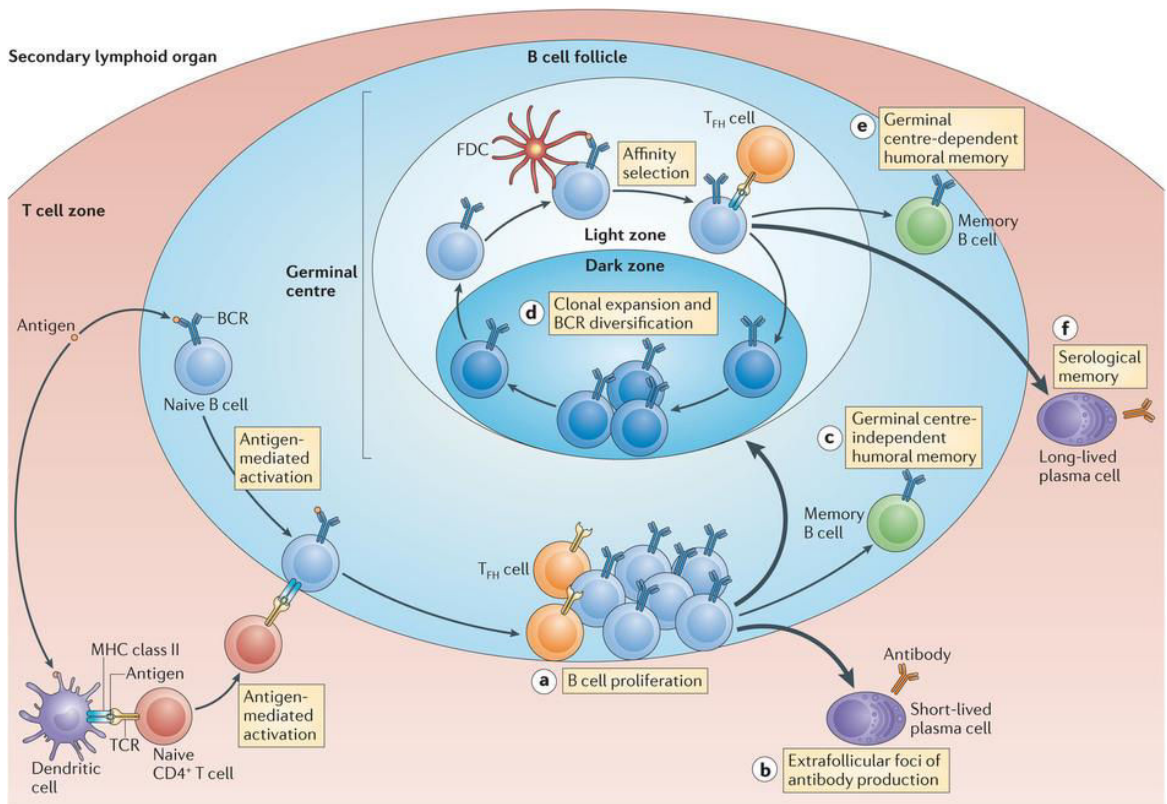
Les dernières étapes de la lymphopoïèse B sont caractérisées par la génération des plasmocytes et des cellules B mémoires (pour revue Shlomchik and Weisel, 2012).

#### i. Les lymphocytes B mémoires

Les cellules B mémoires ont une longue durée de vie et fournissent une protection spécifique lors de la réponse immunitaire secondaire (*i.e.* 2<sup>ème</sup> rencontre avec le même Ag). Elles sont capables de se différencier rapidement en plasmocytes ou de rentrer à nouveau dans les GC afin de subir des remaniements secondaires dans le but d'améliorer leur affinité antigénique (Dogan et al., 2009). Le pool des cellules B mémoires peut être constitué de plusieurs sous-populations phénotypiquement distinctes (pour revue Kurosaki et al., 2015). Chez l'homme, la plupart des cellules B mémoires expriment un marqueur de surface, appartenant à la famille des récepteurs TNF : le CD27 (Klein et al., 1998). Néanmoins, aucun marqueur spécifique caractérise les B mémoires de souris, bien que des études suggèrent que les phénotypes CD38<sup>low</sup> et CD38<sup>high</sup> sont représentatives des cellules B du GC et des cellules B mémoires respectivement (Ridderstad and Tarlinton, 1998).

La plupart des cellules B mémoires de souris sont générées au sein des GC (**Figure 17**) suite à une réponse antigénique de type T-dépendant. La caractéristique la plus fiable de ces cellules est qu'elles portent des mutations au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères des Ig (McHeyzer-Williams et al., 1993). Cependant, l'existence de cellules B mémoires sans hypermutation somatique au niveau de leur région variable d'Ig suggère que certaines cellules peuvent constituer le compartiment B mémoire indépendamment du GC (Pape et al., 2011; Taylor et al., 2012).

Les cellules B mémoires sont sélectionnées sur leur capacité à résister à l'apoptose, après une sélection positive dans le GC. Il a en effet été démontré que l'expression renforcée du transgène *Bcl2* (inhibiteur de la mort cellulaire) permet d'avoir environ vingt fois plus de cellules B mémoires que dans des conditions normales, cependant le nombre de plasmocytes à longue durée de vie demeure inchangé (Smith et al., 2000). Ce même modèle de surexpression de *Bcl2* a permis de mettre en évidence que les plasmocytes expriment des Ig de plus haute affinité que celles des cellules B mémoires. Bien que les mécanismes contrôlant la différenciation plasmocytaire soient relativement bien décrits (*cf* prochain paragraphe),



**Figure 17: Génération des cellules B mémoires et différenciation plasmocytaire.**

Suite à une stimulation antigénique de type T-dépendant, les cellules B activées migrent vers les bords des follicules B et vers les zones des cellules T des organes lymphoïdes secondaires. Ensuite les cellules B activées et les cellules T migrent vers l'extérieur des follicules, où les cellules B subissent une prolifération (**partie a**). Une partie des cellules B proliférantes se différencient en plasmocytes à courte durée de vie (**partie b**), qui donnent lieu à des foyers extrafolliculaire, et d'autres se différencient en cellules B mémoire (**partie c**; cellules B mémoires indépendantes du centre germinatif GC). Alternativement, les cellules B activées rentrent au sein des follicules et peuvent subir une prolifération rapide pour former le GC (**partie d**). Après les événements de CSR et de SHM qui vont avoir lieu au sein des GC, les cellules B quittent cette structure dynamique et se différencient soit en cellules B mémoires (**partie e**, cellules B mémoires dépendantes du GC) soit en plasmocytes à longue durée de vie (**partie f**). La force des signaux que les cellules B reçoivent est susceptible de décider leur destin; des signaux forts (indiqués par les flèches en gras) sont en faveur d'une différenciation en plasmocytes ou en cellules B du GC, tandis que les signaux les plus faibles (indiqués par les flèches fines) déterminent la différenciation en cellules B mémoires (*Extrait de Kurosaki et al., 2015*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

ceux conduisant à la différenciation en cellules B mémoires sont moins connus. Cet état de différenciation pourrait être le reflet d'un évènement stochastique de survie de cellules ayant reçues les signaux nécessaires pour sortir du GC, mais pas suffisants pour induire leur différenciation en plasmocytes.

### ii. Les plasmocytes

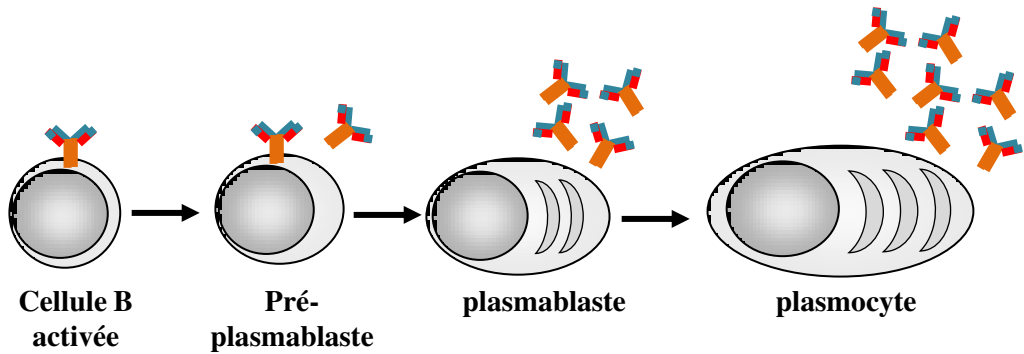
L'engagement dans la différenciation plasmocytaire débute par une étape de prolifération et s'accompagne d'un changement morphologique des cellules. Une fraction de ces cellules proliférantes commence aussi à sécréter des quantités détectables d'anticorps. Ces cellules ont un phénotype mixte de blastes et de cellules sécrétrices d'Ig, d'où leur dénomination : les plasmablastes (PB). Ces derniers, en arrêtant leur cycle cellulaire, peuvent se différencier en plasmocytes (PC). Les PC représentent le stade final de la maturation des lymphocytes B et forment une population hétérogène de cellules qui se divisent en deux sous-populations : les PC à courte durée de vie et ceux à longue durée de vie (Oracki et al., 2010a).

La capacité des cellules B à se transformer en un type spécifique de PC est influencée par la nature de l'antigène, l'environnement et le sous-population de cellules B dont elles sont issues. Par exemple, les cellules B de la zone MZ semblent prédisposées à se différencier rapidement en PC à courte durée de vie, indépendamment de l'aide des lymphocytes T (Gunn and Brewer, 2006; Oliver et al., 1997). D'autre part, les cellules B FO activées, ayant reçu l'aide des cellules T, peuvent former des plasmablastes qui peuvent éventuellement se développer en PC à courte ou à longue durée de vie, avec une haute affinité antigénique ; ou en cellules B mémoires, qui participeront à la reconstitution du pool des PC après une réexposition à un Ag spécifique.

Bien qu'il soit admis que seules les cellules B qui se différencient au sein des GC, à l'issue d'une réponse immunitaire de type T-dépendant, pourraient se différencier en PC à longue durée de vie, des études récentes ont démontré que les deux types de réponses immunitaires (T-dépendants et T-indépendants), peuvent être impliqués dans la formation des PC à longue durée de vie, en absence de la réaction du GC (Bortnick et al., 2012).

### iii. Les différentes populations plasmocytaires

Les plasmablastes sont des cellules à courte durée de vie, trouvées principalement dans la rate, les ganglions lymphatiques, la lamina propria, les sites inflammatoires et le sang (pour revue Nutt et al., 2015). Elles expriment le marqueur plasmocytaire CD138 (*syndecan*



<b>Prolifération</b>	+	+	+	-/+
<b>Durée de vie</b>	jours	jours	jours	jours (courte durée de vie) mois-années (longue durée de vie)
<b>Marqueurs</b>	B220 <sup>hi</sup> CMH-II <sup>hi</sup> CD138 <sup>-</sup> CXCR4 <sup>-</sup>	B220 <sup>hi</sup> CMH-II <sup>hi</sup> CD138 <sup>-</sup> CXCR4 <sup>-</sup>	B220 <sup>int</sup> CMH-II <sup>int</sup> CD138 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup>	B220 <sup>lo</sup> CMH-II <sup>lo</sup> CD138 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>++</sup>
<b>Localisation</b>	Rate Ganglions Plaques de Peyer	Rate Ganglions Plaques de Peyer	Rate Ganglions Sang	Rate Ganglions Sang Lamina propria Moelle osseuse
<b>Facteurs de transcription</b>	<i>Pax5</i> <sup>hi</sup> <i>Bach2</i> <sup>+</sup> <i>Irf4</i> <sup>+</sup> <i>Blimp1</i> <sup>-</sup> <i>Xbp1</i> <sup>lo</sup>	<i>Pax5</i> <sup>lo</sup> <i>Bach2</i> <sup>lo</sup> <i>Irf4</i> <sup>++</sup> <i>Blimp1</i> <sup>-</sup> <i>Xbp1</i> <sup>int</sup>	<i>Pax5</i> <sup>-</sup> <i>Bach2</i> <sup>-</sup> <i>Irf4</i> <sup>+++</sup> <i>Blimp1</i> <sup>int</sup> <i>Xbp1</i> <sup>hi</sup>	<i>Pax5</i> <sup>-</sup> <i>Bach2</i> <sup>-</sup> <i>Irf4</i> <sup>+++</sup> <i>Blimp1</i> <sup>hi</sup> <i>Xbp1</i> <sup>hi</sup>

**Figure 18 : De la cellule B à la génération des plasmocytes.**

Schéma représentatif de la maturation des plasmocytes sur la base de différents critères qui influencent le devenir des cellules (durée de vie, localisation, marqueurs...). Tout au long de la différenciation plasmocytaire, l'expression du facteur de transcription *Pax5*, qui maintient le programme génétique des cellules B, diminue en faveur de *Blimp1*, *Irf4* et *Xbp1* (principaux acteurs du programme transcriptionnel des plasmocytes) (Adapté de Nutt et al., 2015).

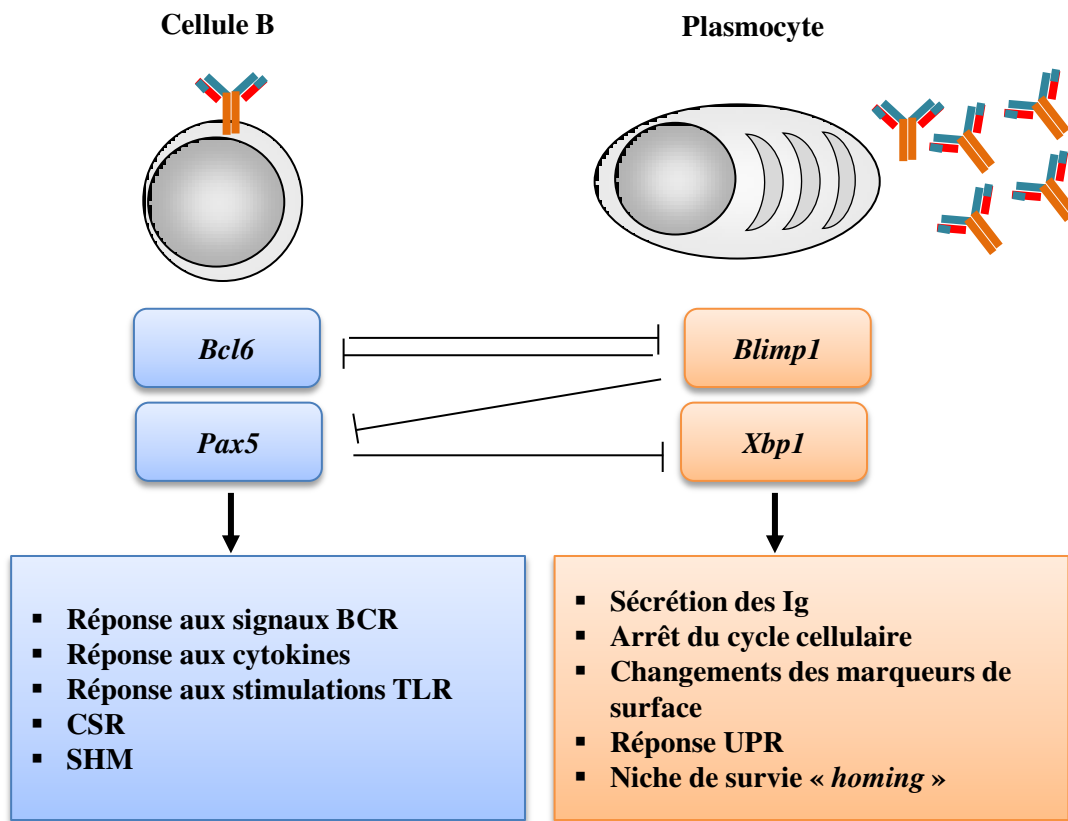
1) à leur surface et présentent encore différents marqueurs du lignage B y compris le récepteur des cellules B (BCR), les molécules de co-stimulation comme CD80/86 et le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII) (Oracki et al., 2010a). Ce stade précède le stade de plasmocyte mature et il correspond à un niveau intermédiaire entre la cellule B et le plasmocyte. Des expériences de culture *in vitro* ont permis de caractériser ces populations. En effet, la stimulation des cellules B déclenche la prolifération rapide et l'apparition des PB à courte durée de vie (Hasbold et al., 2004; Tangye and Hodgkin, 2004). La fréquence de division de ces cellules est dépendante de la nature du mitogène et peut être ainsi modulée par les cytokines. Par exemple, les Interleukines 5 et 21 (IL-5 et IL-21) sont des activateurs puissants de la formation des PB (Bryant et al., 2007; Ettinger et al., 2005). Cependant, l'observation des PB *in vivo*, est un processus plus complexe ; généralement, ces ASC (pour « *Antibody Secreting Cells* ») sont caractérisées par l'expression du marqueur de division cellulaire (Ki-67) (Hasbold et al., 2004)

Les plasmocytes sont des ASC post-mitotiques (Fagraeus, 1948). Ces cellules sont rencontrées au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques et surtout dans la moelle osseuse, qui constitue le site privilégié pour la maintenance des PC à longue durée de vie (Kallies et al., 2004). A ce stade, les cellules présentent le marqueur CD138 (*syndecan 1*) mais perdent l'expression des marqueurs de la lignée B (B220 et CD19) (Smith et al., 1996). Ces cellules ont un large réticulum endoplasmique (RE) indispensable à leur forte production d'anticorps, protéines effectrices de l'immunité humorale (**Figure 18**) (Shaffer et al., 2004).

#### iv. Le programme transcriptionnel impliqué lors de la différenciation plasmocytaire

La différenciation plasmocytaire dans les GC est un processus hautement contrôlé, qui passe par une combinaison de signaux fournis par les différents acteurs du GC (les FDC, les T<sub>FH</sub>) mais aussi par la force du signal transmis par le BCR. En effet, des travaux publiés en 2013, de substitution de promoteur, ont montré qu'un signal BCR de faible intensité permet d'augmenter la différenciation plasmocytaire (Lechouane et al., 2013).

La découverte du facteur de transcription *Blimp-1* a été un événement critique pour la compréhension du programme génétique qui régit la différenciation plasmocytaire (Turner et al., 1994). *Blimp-1* est un facteur de transcription en doigt de zinc codé par le gène *prdm1*. Il est souvent décrit comme étant le maître régulateur de la différenciation plasmocytaire. L'inactivation de *Blimp-1* chez la souris provoque une diminution très marquée du nombre de



**Figure 19 : Programme transcriptionnel lors de la différenciation plasmocytaire.**

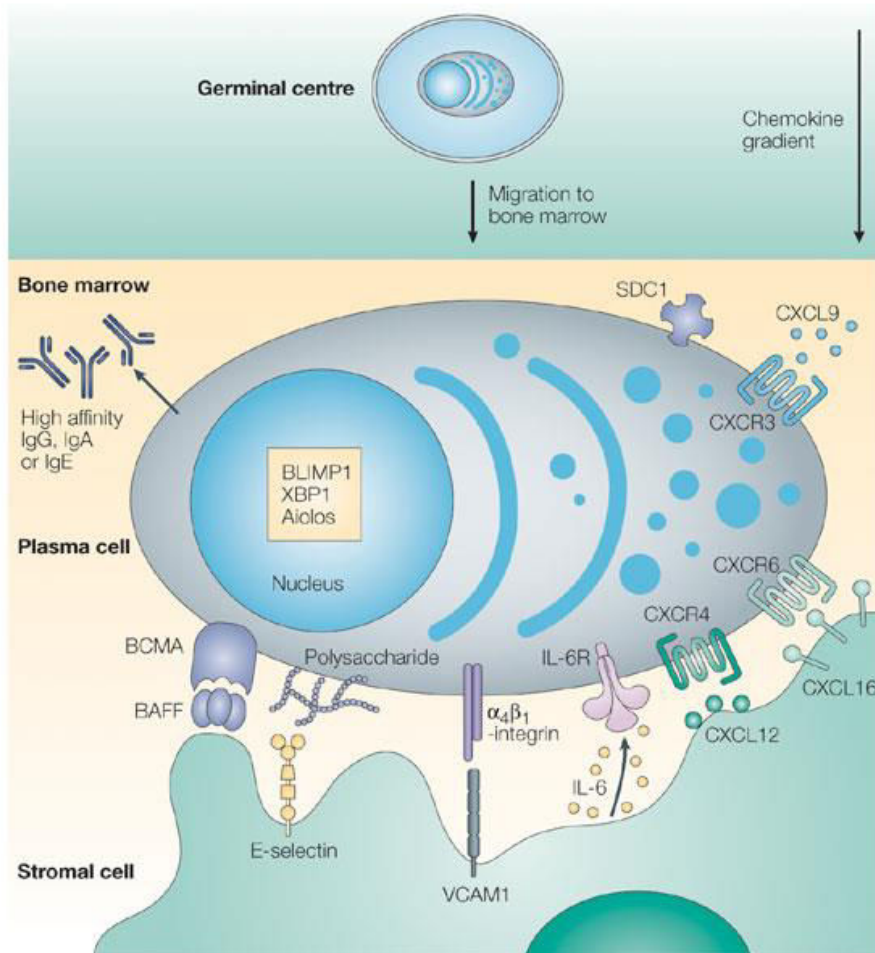
Le facteur de transcription *Bcl6* (B-cell lymphoma 6) réprime *Blimp1* (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), un régulateur majeur de la différenciation plasmocytaire. A son tour, *Blimp1* inhibe l'expression des gènes impliqués dans la maintenance de l'identité B, *Pax5* (*Paired box protein 5*) et *Bcl6*. Cette répression mutuelle empêche la formation des plasmocytes au sein des centres germinatifs, ainsi que la dédifférenciation des plasmocytes en cellules B. *Blimp1*, *Xbp1* (X-box-binding protein 1) et *Irf4* (Interferon-regulatory factor 4) induisent l'expression des gènes impliqués dans la différenciation plasmocytaire (rectangle orange), tout en inhibant les principaux marqueurs B et du centre germinatif (encadré bleu) (Modifié de Shapiro-Shelef M and Calame.K, 2005).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

plasmocytes (Shapiro-Shelef et al., 2003; Savitsky and Calame, 2006). *Blimp-1* favorise la différenciation plasmocytaire en réprimant les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, tel que *c-myc* (dans la formation du GC), *Bcl6* (régulateur négatif de la différenciation plasmocytaire) ou *Pax5* (dans l'engagement et le maintien de l'identité des cellules B) (**Figure 19**) (Lin et al., 1997, 2002a; Shaffer et al., 2002). Malgré son importance au cours de la différenciation des cellules B en PC, *Blimp-1* n'est pas indispensable pour l'engagement initial en « *PC fate* » (Kallies et al., 2007). En effet, en 2007, l'équipe de Nutt a trouvé une quantité non négligeable d'Ig dans les souris *Rag1<sup>-/-</sup>* reconstituées par des cellules B *Blimp1<sup>-/-</sup>*. Dans ces souris, il a été également montré que les cellules B qui se différencient en PB ont un programme transcriptionnel similaire à celui trouvé dans les PC, à savoir une augmentation de l'expression de la chaîne J (pour « *Joining* », qui assemble les pentamères d'IgM ou les dimères d'IgA), de *Xbp-1* (pour « *X-box binding protein* ») et des transcrits de chaînes lourdes codant pour la forme sécrétée des Ig. Cette augmentation s'accompagne également d'une disparition du facteur de transcription *Pax5* (Kallies et al., 2007). Sur la base de ces résultats, il a été proposé que l'élément primaire de la différenciation plasmocytaire n'est pas l'expression de *Blimp1* mais plutôt l'inhibition de la fonction de *Pax5*. La différenciation plasmocytaire dépendra donc de la balance entre ces deux programmes.

*Pax5* réprime le programme de différenciation plasmocytaire dans les cellules B matures (Nera et al., 2006; Schebesta et al., 2007). Par conséquent, l'arrêt de son expression est nécessaire pour lever la répression des différents gènes cibles dont le facteur de transcription *Xbp-1*. Ce dernier est un acteur majeur de la différenciation des cellules B en ASC, il va permettre la production et la sécrétion de très grandes quantités d'anticorps (Shaffer et al., 2004) (Reimold et al., 1996). Il est également impliqué dans la réponse UPR (pour « *Unfolded Protein Response* »), à laquelle une partie de ce chapitre sera consacrée (pour revues: Todd et al., 2008; Hetz, 2012). Bien que l'absence de *Xbp-1* ait dans un premier temps été décrite comme délétère pour la différenciation plasmocytaire (Reimold et al., 1996; Hu et al., 2009), des travaux plus récents ont démontré que l'établissement des plasmocytes était possible en absence de *Xbp-1*. Cependant, ces plasmocytes présentent un RE peu développé et un déficit majeur de sécrétion d'Ig (Taubenheim et al., 2012). L'activation de *Xbp-1* lors de la différenciation terminale des cellules B permet donc d'augmenter la sécrétion des Ig tout en favorisant les changements morphologiques associés à cette synthèse massive.





**Figure 20 : Niche de survie plasmocytaire dans la moelle osseuse.**

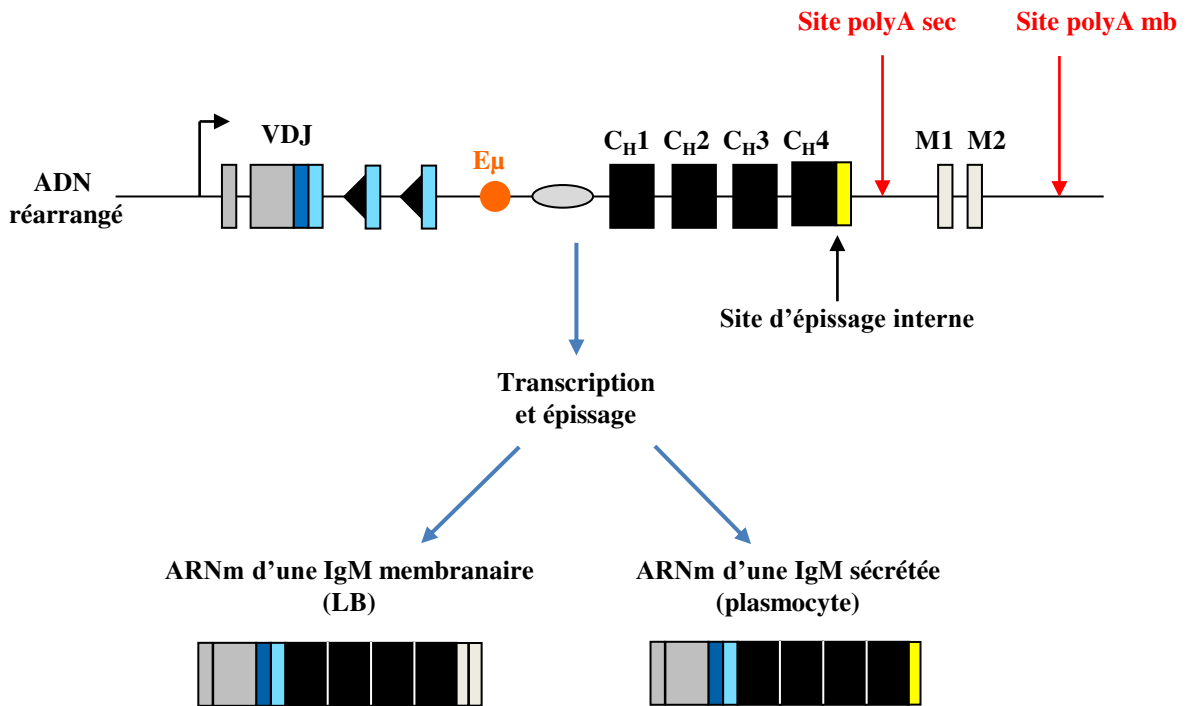
Les cellules B ayant subi la CSR et la SHM, perdent l'expression du CXCR5 (CXCR5 = chemokine receptor 5), ce qui facilite leur sortie du GC. Grâce à l'augmentation du niveau d'expression du CXCR4, et du récepteur de CXCL12 produit par les cellules stromales, ces cellules sont capables de migrer au niveau de la moelle osseuse. Les E-sélectine (Endothelial-cell selectin), ainsi que les molécules d'adhésion VCAM1 (Vascular Cell-Adhesion Molecule-1) exprimées à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse sont importantes pour la rétention des plasmocytes dans ces niches, grâce à l'association avec des polysaccharides et des intégrines exprimées à la surface des plasmocytes. BAFF (B-cell-Activating Factor), produit par les macrophages ou par les cellules dendritiques, active le récepteur BCMA (B-Cell Maturation Antigen). Conjointement avec l'IL-6, produit par les cellules stromales, ils facilitent la survie des plasmocytes dans la moelle osseuse (*Extrait de Shapiro-Shelef M and Calame K, 2005*).

### v. Localisation et survie des plasmocytes (niches)

Pour assurer leur survie, les plasmocytes doivent se retrouver dans un microenvironnement spécialisé qui se trouve dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT pour « *Mucosa-Associated Lymphoid Tissues* »), dans les amygdales ainsi que dans la moelle osseuse. Ces organes fournissent aux plasmocytes un nid protecteur. Etant donnée que la moelle osseuse contient 80 à 90% des plasmocytes, les niches retrouvées au niveau de cet organe sont les plus étudiées (pour revues Manz et al., 1997; Oracki et al., 2010).

La niche des plasmocytes est un microenvironnement où la synergie de plusieurs facteurs dont les cytokines (*i.e.* IL-5, IL-6), les chimiokines (*i.e.* CXCL12 pour « *Chemokine CXC-Chemokine Ligand 12* »), et les molécules d'adhésion (*i.e.* VLA4 pour « *Very Late Antigen 4* », l'antigène CD44) assurent la survie de ces cellules centrales de la mémoire immunologique humorale (**Figure 20**) (Minges Wols et al., 2002; Cassese et al., 2003; Belnoue et al., 2012). Ces molécules peuvent être présentes au niveau des tissus inflammatoires, ce qui pourrait expliquer la présence des PC dans ces sites (Horuk, 1998; Brennan et al., 1999; Cassese et al., 2001). Il a été proposé que les sites d'inflammation contiennent un certain nombre de niches où les PC peuvent survivre et sécréter des anticorps permettant de lutter contre l'agent responsable de l'inflammation (Hauser et al., 2003). Suite à la clairance de l'agent pathogène et à la résolution de l'inflammation, les niches de survie sont détruites, ce qui déclenchent la mort des PC au niveau des sites d'inflammation. Dans ce cas, la protection humorale à long terme, est fournie par les PC qui ont migré de leur site de genèse vers la moelle osseuse. Dans les maladies auto-immunes, la stabilité des niches de survie des PC permettrait à ces derniers de persister et donc de maintenir la production d'auto-anticorps (Cassese et al., 2001; Hauser et al., 2003). Il est intéressant de noter que les PC de la moelle osseuse sont en contact direct avec les cellules stromales qui sécrètent la chimiokine CXCL12, dont le récepteur CXCR4 est exprimé par les PC (pour revue Nutt et al., 2015). CXCL12 permet d'attirer les plasmablastes nouvellement générés au niveau de la moelle osseuse (Hargreaves et al., 2001; Hauser et al., 2002; Tokoyoda et al., 2004). Des études ont démontré que les PC issus de souris déficientes pour CXCR4 ne parviennent pas à migrer vers la moelle osseuse (Nie et al., 2004).

Parmi les facteurs essentiels à la survie des PC, on distingue notamment APRIL (pour « *A Proliferation - Inducing Ligand* ») et l'IL-6 sécrétés par les cellules stromales et certaines



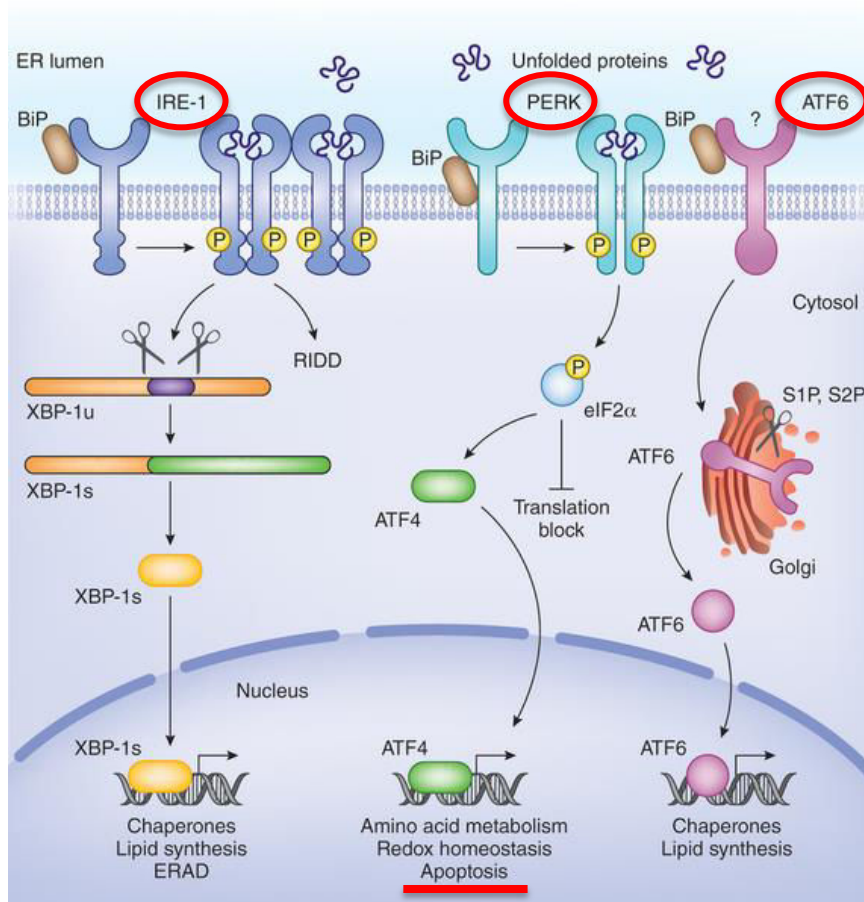
**Figure 21 : Passage de la forme membranaire à la forme sécrétée d'une IgM.**

Les IgM des LB sont majoritairement produites sous forme membranaire par utilisation du site donneur d'épissage interne à l'exon  $C_H4$  qui est épissé sur le premier exon membranaire (M1), le site de polyadénylation (polyA) utilisé dans ce cas est situé après les domaines transmembranaires (M1 et M2). Les plasmocytes quand à eux, produisent essentiellement des Ig sous forme sécrétée. Dans le cas de l'IgM, le site d'épissage interne au  $C_H4$  n'est pas utilisé, le transcrit comprend ainsi la dernière partie de cet exon ( $C_H$ -S représentée en jaune) et utilise le site de polyA situé directement en aval. Cependant, dans tous les cas, la région VDJ utilisée est la même et donc, la spécificité de l'anticorps restera la même (*Adapté de Lefranc et al., 1999*).

cellules de la lignée hématopoïétique tels que les éosinophiles (Chu and Berek, 2012), les mégacaryocytes (Winter et al., 2010) et les neutrophiles (Huard et al., 2008) ou les basophiles (Rodriguez Gomez et al., 2010). Des expériences réalisées, *in vivo* et *in vitro*, ont montré qu'APRIL augmente la survie des plasmocytes et qu'inversement, les souris déficientes en APRIL présentent une diminution drastique du nombre de PC dans la moelle osseuse (Belnoue et al., 2008 Chu et al., 2011). L'IL-6 est considéré comme le facteur le plus efficace pour améliorer la survie des PC. L'ajout d'IL-6 recombinante dans le milieu de culture des PC isolés de la moelle osseuse permet de prolonger leur survie (Cassese et al., 2003). De plus, les PC de la moelle osseuse expriment fortement la molécule CD44, un facteur ubiquitaire dont les différents isoformes sont générées par épissage alternatif d'un seul gène (pour revue Zöller, 2011). CD44 est le ligand principal de l'acide hyaluronique, un composant de la matrice extracellulaire. Il permet aux PC d'interagir avec les cellules présentes dans leur niche de survie (Manz et al., 1998; Medina et al., 2002). Il s'avère que l'expression de l'isoforme CD44v9 chez les patients atteints de Myélome Multiple (MM) est en corrélation avec un mauvais pronostic (Stauder et al., 1996).

### 8- Sécrétion des Ig et activation de la réponse UPR

La fonction ultime des plasmocytes est de produire des grandes quantités d'anticorps. Il existe deux formes d'Ig, membranaires et sécrétées. Ces deux formes se différencient par la nature de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde. Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée se fait par épissage alternatif du transcrit primaire IgH et par la sélection du site de polyadénylation (**Figure 21**) (Danner and Leder, 1985). Il a été démontré que le facteur d'élongation de la transcription ELL2 (pour « *Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia protein 2* »), induit par *Blimp1* (Shaffer et al., 2004), participe au passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig (Martincic et al., 2009). Son absence provoque une réduction de la forme sécrétée de chaînes lourdes d'Ig. Les travaux du groupe de Milcarek ont montré que ELL2 est essentiel au recrutement du facteur de polyadénylation CstF-64 (pour « *Clivage Stimulating Factor 64* ») sur l'ARNpol II (pour « *RNA polymerase II* ») au niveau du promoteur IgH dans les plasmocytes. Ainsi, le recrutement de ce facteur de clivage sur l'ARNpol II contribuerait à promouvoir l'utilisation du site de poly (A) de la forme sécrétée des Ig spécifiquement dans les PC alors que ce site n'est pas reconnu dans les cellules B (Martincic et al., 2009; Milcarek et al., 2011; Park et al., 2014).



**Figure 22 : La réponse UPR activée lors d'un stress du RE.**

La réponse aux protéines mal repliées (réponse UPR) implique trois voies principales: IRE1, ATF6 et PERK. Dans les cellules non stressées, ces molécules s'associent avec la protéine chaperonne BiP. Suite à l'accumulation des protéines mal repliées dans le RE, PERK et IRE1 libèrent BiP et s'oligomérisent. IRE1 est une endonucléase qui, une fois activée, va permettre l'excision de 26nt de l'ARNm de *Xbp1*, générant une forme épissée (*Xbp1-s*), plus stable et plus active que son précurseur non clivé. Parallèlement, la dissociation de ATF6 de BiP, assure son déplacement vers l'appareil de Golgi, où il va être clivé par deux protéases (S1P, S2P). Le facteur de transcription résultant de ce clivage est actif et va permettre l'expression de diverses protéines chaperonnes et des gènes cibles de la réponse UPR. Enfin, la voie PERK, faiblement active dans les plasmocytes, aboutit à une diminution de la synthèse protéique par phosphorylation de eIF2 $\alpha$ . L'atténuation globale de la traduction inhibe la dégradation de l'ARNm d'ATF4 par NMD. La stabilisation d'ATF4 augmente l'expression de divers gènes cibles de l'UPR et notamment le facteur pro-apoptotique *Chop*, qui déclenche le mécanisme d'apoptose lors d'un stress exacerbé du RE. ERAD: ER Associated Degradation; GLS: Golgi Localization Signal (*Extrait de Janssens et al., 2014*).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

Nous avons déjà vu que les facteurs *Blimp1* et *Xbp-1* sont impliqués dans la sécrétion des Ig. *Blimp1* permet une forte expression des Ig (IgH et IgL) en réprimant le facteur de transcription *Pax5* (Rinkenberger et al., 1996; Lin et al., 2002). Il induit également l'expression de *Irf4* (pour « *Interferon Regulatory Factor-4* ») (Kallies et al., 2004b; Sciammas and Davis, 2004), qui active les enhancers des loci IgL  $\kappa$  et  $\lambda$  et de *Xbp-1* dont le rôle principal est de promouvoir l'expansion du RE suite à la forte production d'Ig par les plasmocytes (Shaffer et al., 2004). Dans les plasmocytes, la synthèse massive des Ig va déclencher un stress du RE. En réponse au stress cellulaire, une cascade de signalisation bien établie, est activée ; on parle de la réponse aux protéines mal repliées (UPR pour « *Unfolded Protein Response* »). Ce mécanisme complexe est un moyen important pour rétablir l'homéostasie du RE, essentiel pour la survie cellulaire. Si cette réponse est incapable d'atténuer le stress du RE, un mécanisme de mort cellulaire va se déclencher (Harding et al., 2002; Gass et al., 2004; Janssens et al., 2014).

La réponse UPR vise à rétablir le fonctionnement normal du RE, en utilisant des multiples stratégies. Elle a pour finalité d'augmenter l'expression des protéines chaperonnes pour favoriser le repliement et l'assemblage des protéines synthétisées en abondance dans le RE (Gass et al., 2004). La réponse UPR peut se mettre en place à partir de trois branches distinctes : (1) la voie IRE1 $\alpha$  (pour « *Inositol-Requiring Enzyme 1 $\alpha$*  »), (2) la voie ATF6 (pour « *Activating Transcription Factor 6* ») et (3) la voie PERK (pour « *RNA-dependent protein kinase (PKR)-like Endoplasmic Reticulum (ER) Kinase* ») (**Figure 22**) (pour revue Hetz, 2012).

(1) La voie IRE1 $\alpha$  est la voie la plus conservée. En effet, l'endonucléase IRE1 détecte les protéines mal repliées dans la lumière du RE. Dans les conditions normales, IRE1 est réprimée suite à son association à la protéine chaperonne BiP (pour « *Binding immunoglobulin Protein* »). Par contre, sous des conditions de stress, BiP se dissocie d'IRE1 $\alpha$  afin de prendre en charge les protéines anormales accumulées dans le RE. Dans ce cas, l'activité RNase d'IRE1 favorise l'excision de 26 nucléotides de l'ARNm codant pour XBP1. Cet épissage crée un décalage du cadre de lecture, ce qui aboutit à la production d'une forme épissée de *Xbp1*, plus active et plus stable, *Xbp1-s* (s pour « *spliced* »), qui contient un nouveau domaine d'activation transcriptionnel à l'extrémité C-terminale (Calton et al., 2002; He et al., 2010). *Xbp1-s* est un activateur transcriptionnel qui joue un rôle fondamental dans l'activation d'une grande variété de gènes cibles de l'UPR, ainsi que les gènes impliqués dans le mécanisme ERAD (pour « *ER Associated Degradation* »). Il induit l'expression des gènes



impliqués dans la translocation vers le RE, le repliement des protéines, la dégradation des protéines mal repliées et le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi (Shaffer et al., 2004). L'expression de ces gènes est à l'origine des transformations morphologiques des cellules B lors de leur différenciation en plasmocytes, permettant le passage d'une petite cellule avec peu de cytoplasme à une grosse cellule riche en organites. Cependant, XBP1 n'est pas la seule cible d'IRE1 $\alpha$ . D'une façon intéressante, IRE1 $\alpha$  contrôle sa propre expression en clivant son propre ARNm (Tirasophon et al., 1998). De plus, l'expression de ces gènes (*Irel1* et *Xbp1*) est à l'origine de la transformation des cellules B en plasmocytes, ce qui explique leur surexpression lors de la différenciation plasmocytaire pour faire face à la synthèse massive d'Ig (Lee et al., 2005).

(2) La voie ATF6 est également impliquée en réponse à l'accumulation des protéines mal repliées dans le RE. Dans les cellules normales (non stressées), ATF6 est localisé à la membrane du RE en liaison avec la protéine chaperonne BiP. Suite à un stress du RE, la dissociation de BiP permet son passage vers l'appareil de Golgi où il est clivé par deux protéases S1P et S2P (pour « *Site-1 or Site-2 Proteases* ») (**Figure 22**) (Li et al., 2000). Les deux formes, ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$ , générées après clivage passent ensuite dans le noyau et activent les gènes cibles parmi lesquels figurent la GRP78 (pour « *78 kDa Glucose-Regulated Protein* »), le facteur pro-apoptotique *Chop* et la protéine EDEM1 (pour « *ER Degradation-Enhancing  $\alpha$ -Mannosidase-like protein 1* »).

(3) La voie PERK est associée à une atténuation transitoire de la traduction protéique dans la lumière du RE pour permettre aux cellules de surmonter le stress. L'activation de cette voie conduit à la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (pour « *eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$*  »). Cette phosphorylation au niveau de la Serine 52 permet de diminuer globalement la traduction protéique (Harding et al., 1999, 2000a). PERK est une Sérine/Thréonine protéine kinase associée au RE. Suite à l'accumulation des protéines anormales dans la lumière du RE, la dimérisation et la trans-autophosphorylation de PERK conduit à l'activation de sa fonction de phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2 (**Figure 22**) (Harding et al., 2000a, 2000b). En plus de son rôle dans l'inhibition de la traduction protéique, PERK induit également environ un tiers des gènes dépendants de l'UPR (Harding et al., 1999; Ron, 2002), ainsi que l'activation du facteur pro-apoptotique *Chop* (« pour *C/EBP homologous protein* ») (Marciniak et al., 2004; Shore et al., 2011). Cette voie est réprimée dans les plasmocytes qui synthétisent des fortes quantités d'Ig (Ma et al., 2010). Si la réponse UPR ne parvient pas à résoudre le mauvais repliement des protéines, c'est la





## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

voie PERK médiée par CHOP, qui va être activée conduisant à l'apoptose (Ron and Habener, 1992; Ma et al., 2002b). Dans ce sens, il a été démontré que les cellules déficientes en *Chop* sont protégées contre l'apoptose (Zinszner et al., 1998), ce qui indique l'importance de cette voie en réponse à un stress exacerbé du RE. Bien que le mécanisme précis par lequel *Chop* induit l'apoptose est encore mal connu, *Chop* est connu pour activer la transcription de plusieurs gènes qui peuvent potentialiser l'apoptose tels que GADD34 (« pour Growth Arrest and DNA damage 34 »), qui intervient dans la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$ , ce qui favorise la synthèse protéique (Novoa et al., 2001). La synthèse de protéines durant la période de stress active chroniquement la voie UPR, ce qui induit la mort cellulaire. *Chop* est également impliqué dans la répression de la transcription du facteur anti-apoptotique *Bcl2* (McCullough et al., 2001) et il peut être activé par DR5 (pour « Death Receptor 5 ») qui code pour un récepteur de mort cellulaire et déclenche les cascades des caspases (Marciniak et al., 2004). Il est établi qu'à la fin d'une réponse immunitaire humorale, la mort des PC est étroitement coordonnée avec l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire pour assurer leur élimination rapide (Manz et al., 1997). Dans ce sens, les travaux de Siegel ont fourni une explication des mécanismes qui contrôlent la mort des PC. Ils ont montré que l'expression de DR5 est maintenue dans les PC de souris générés lors d'une réponse immune T-dépendante, ainsi que dans les PC humains, et que l'inhibition de ce récepteur limite leur apoptose (Ursini-Siegel et al., 2002).

Il est important de noter que le protéasome peut également jouer un rôle essentiel dans la dégradation des protéines aberrantes ou mal repliées néo-synthétisées, nommées DRiPs (pour « Defective Ribosomal Products »). La dégradation par le protéasome se fait après ubiquitinylation des protéines aberrantes (pour revue Sitia and Braakman, 2003). Il existe une forte corrélation entre la synthèse d'Ig et la sensibilité aux inhibiteurs du protéasome (Meister et al., 2007; Cenci et al., 2012). Dans ce sens, le bortézomib, capable d'inhiber l'activité chymotrypsine-like du protéasome 26S des cellules des mammifères, est utilisé couramment dans le traitement du Myélome Multiple (MM) (pour revue Moreau et al., 2012). En inhibant la dégradation de I $\kappa$ b, cette molécule bloque l'activation de NF- $\kappa$ B (pour « Nuclear Factor kappa B ») et diminue la survie des cellules de myélome et leur résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie (Adams, 2001; Mitsiades et al., 2002). Les inhibiteurs du protéasome, en diminuant la dégradation des protéines mal repliées, provoquent une surcharge du RE et active la voie pro-apoptotique médiée par *Chop* (Zhou et al., 2014). Dans ce sens, nous avons participé à une étude récente mettant en évidence une sensibilité accrue au bortézomib des



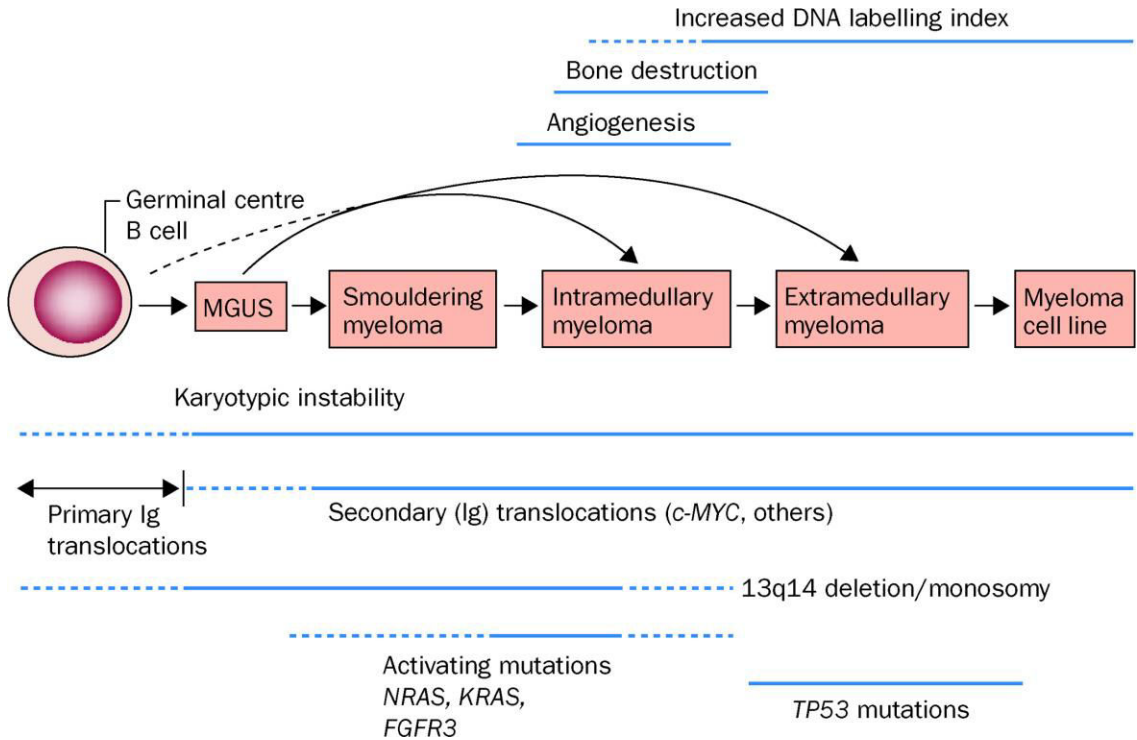
plasmocytes exprimant une chaîne lourde d'Ig aberrante, dépourvue du domaine CH1 (Bonaud et al., 2015, cf *Annexe*).

Nous verrons dans la partie résultats (Article 1 de cette thèse), que l'accumulation des Ig tronquées induit un stress UPR terminal et active l'apoptose *via* le facteur pro-apoptotique *Chop*.

### 9- Le Myélome Multiple et ses dérivés

Le MM est un cancer des plasmocytes caractérisé par une production élevée d'Ig monoclonale dans la plupart des cas. Le MM est la contrepartie tumorale des plasmocytes à longue durée de vie. L'âge médian des patients atteints de MM est de 65 ans (Kyle et al., 2003; Lin et al., 2004). Cette pathologie affecte plus les hommes que les femmes (rapport 3:2). Le MM est encore une maladie incurable, la rémission complète n'est observée que dans seulement 5% des cas. La durée médiane de survie après le diagnostic est de trois à cinq ans (Fonseca et al., 2009). Bien que des facteurs génétiques et environnementaux y soient impliqués, la cause de ce cancer est jusqu'à nos jours inconnu. Le MM est généralement précédé par une tumeur bénigne nommée gammopathie monoclonale de signification indéterminée ou MGUS (pour « *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* »), qui est présent chez 1% des adultes de plus de 25 ans (Röllig et al., 2015). Bien que MGUS puisse être efficacement diagnostiqué par un simple test sanguin, caractérisé par un pic monoclonal d'Ig sérique, il est impossible d'empêcher sa progression ou de prédire quand la progression vers un MM se produira. Ces deux types de cancer, MGUS et MM sécrètent la même Ig monoclonale qui peut être de type IgG, IgA, chaînes légères seules, IgD, IgM et exceptionnellement IgE. Le MM se distingue du MGUS par une teneur élevée de cellules tumorales intramédullaire (>10%), le développement des lésions osseuses, une calcémie élevée, une anémie, une immunodéficience et une atteinte de la fonction rénale (critères « CRAB ») (International Myeloma Working Group, 2003). Les atteintes rénales apparaissent fréquemment suite aux dépôts d'Ig monoclonales (Hutchison et al., 2012).

Le MM résulte d'une transformation maligne qui touche les plasmocytes à longue durée de vie, qui sont en association avec les cellules stromales au niveau de la moelle osseuse. Les cellules de myélome sont principalement de type post-GC de part la présence de nombreuses mutations somatiques et de la grande proportion des cellules ayant subi la commutation de classe (1% des MM sont de type IgM) (Kuehl and Bergsagel, 2012).



**Figure 23 : Le développement du Myélome Multiple (MM).**

Caractérisation des différents étapes allant vers la progression d'un MM. L'apparition d'un MM peut se produire à partir d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) ou directement à partir d'une cellule B post-GC. L'accumulation des plasmocytes au niveau de la moelle osseuse (myélome intramédullaire), conduit à la manifestation des signes cliniques. A ce stade, le MM est généralement chimiosensible et peut rentrer dans une phase de quiescence. Le myélome extramédullaire se caractérise par une localisation de la tumeur au niveau du sang, du liquide pleural et de la peau. Cette phase est caractérisée par une résistance à la chimiothérapie et à l'apoptose, et à une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance. Les différentes modifications structurales impliquées dans la progression du MGUS en MM sont représentées sur le schéma. Les mutations activatrices comme NRAS, KRAS, les dérégulations *c-Myc* et *Bcl-2* et les délétions de TP53 et des gènes suppresseurs de tumeur sont fréquemment associées au stade extramédullaire du MM (Extrait de Sirohi and Powles, 2004).

## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

Comme les plasmocytes sains à longue durée de vie, les cellules de MM ont subi de nombreux événements induisant des cassures de l'ADN : les recombinaisons V(D)J, les hypermutations somatiques des régions variables et la commutation de classe (Kuehl and Bergsagel, 2012). Les erreurs produites au cours de ces processus peuvent conduire à des réarrangements chromosomiques aberrants, comme des translocation qui favorisent le développement tumoral. L'instabilité génomique apparaît dès les premières étapes du MM et augmente avec la progression de la maladie. Chez environ 50% des patients atteints de MGUS et 65% des patients atteints de myélome, des translocations au niveau du locus IgH peuvent être observés sur le chromosome 14q32 et l'un des cinq chromosomes partenaires, 11q13 (la cycline D1, la plus commune à toutes les formes de prolifération plasmocytaire), 4p16.3 (FGFR3 pour «*Fibroblast Growth Factor Receptor 3* »), 6p21 (la cycline D3), 16q23 (*c-maf*) et 20q11 (*mafB*) (Facon et al., 2001; Avet-Loiseau et al., 2007; Walker et al., 2013). D'autres translocations impliquent les loci de chaînes légères, IgL $\kappa$  (2p12) et IgL $\lambda$  (22q11); elles sont moins fréquentes et moins étudiées (**Figure 23**).

Les translocations primaires dérèglent simultanément une variété d'oncogènes en les mettant sous le contrôle des éléments régulateurs forts du locus IgH *i.e.* l'enhancer E $\mu$  et la région 3'RR. Ceci permet la survie et la prolifération des cellules entraînant une immortalisation du clone malin (Walker et al., 2013). A un stade ultérieur de la maladie, des translocations secondaires, indépendantes des processus spécifiques des cellules B, peuvent se produire. Ces changements génétiques sont caractérisés par des dérégulations de *c-myc*, *fas*, *bcl-2*, et *PTEN* (pour «*Phosphatase and TENsin homolog* »); gène suppresseur de tumeurs) et des mutations activatrices de NRAS ou KRAS2 (**Figure 23**) (Sirohi and Powles, 2004; Rasmussen et al., 2005; Chesi et al., 2008). Notons que les anomalies génomiques comprennent également des délétions partielles. Par exemple, la monosomie du chromosome 13 est fréquente et semble indiquer la présence probable d'un gène suppresseur de tumeur sur ce chromosome.

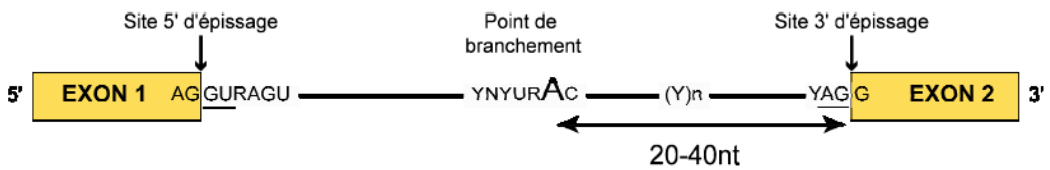
Les premiers médicaments utilisés dans le traitement du MM ont été développés dans les années 1960. Dès lors, plusieurs composés ont été introduits pour lutter contre ce cancer tel que les agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide) et les glucocorticoïdes (prednisonne et la dexaméthasone). La plupart de ces agents sont relativement inefficaces s'ils sont administrés seuls (Kyle et al., 2003; Moreau et al., 2012). Actuellement, le traitement de choix du myélome est la chimiothérapie suivie d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT pour «*Haematopoietic Stem Cell Transplantation* »). Une



## Chapitre 1- Ontogénèse B et développement plasmocytaire

chimiothérapie conventionnelle, basée sur le traitement par de nouvelles molécules (*i.e.* thalidomide, bortézomib) peut éventuellement être utilisée. Ces molécules ont une tolérance acceptable et peuvent être utilisés successivement ou en combinaison avec d'autres médicaments en vue d'une meilleure efficacité (Kyle et al., 2003). Aujourd'hui, le bortézomib est classiquement utilisé en première ligne de traitement du MM en combinaison avec des chimiothérapies plus classiques (Melphalan et corticoïdes en particulier). L'effet pro-apoptotique présumé du bortézomib serait provoqué par une accumulation excessive d'Ig mal repliées dans les plasmocytes. Cette surcharge de protéines aberrantes pourrait induire un stress UPR terminal et expliquer la forte sensibilité des cellules de MM aux traitements par inhibiteurs du protéasome (Meister et al., 2007; Zhou et al., 2014). D'autre part, des inhibiteurs du protéasome de nouvelle génération, potentiellement moins toxiques ou plus efficaces que le bortézomib, font leur entrée en thérapeutique humaine. On peut citer par exemple le carfilzomib (Kyprolis™), le marizomib, l'ixazomib (MLN-978), le delanzomib (CEP-18770) et l'ONX-912 (Metcalf et al., 2014; Ria et al., 2014; Röllig et al., 2015).





**Figure 24 : Séquences consensuelles d'épissage au niveau des pré-ARNm.**

Les dinucléotides introniques invariants GU et AG sont soulignés. Le A correspond au point de branchement. La distance optimale entre celui-ci et le site 3' est indiquée. **Y:** pyrimidines: C, U ; **N:** A, C, G, U ; **R:** purines: A, G

### Chapitre 2. Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

*Contrôler, inhiber, épisser, dégrader....*

#### 1- Epissages conventionnels et alternatifs des ARN pré-messagers

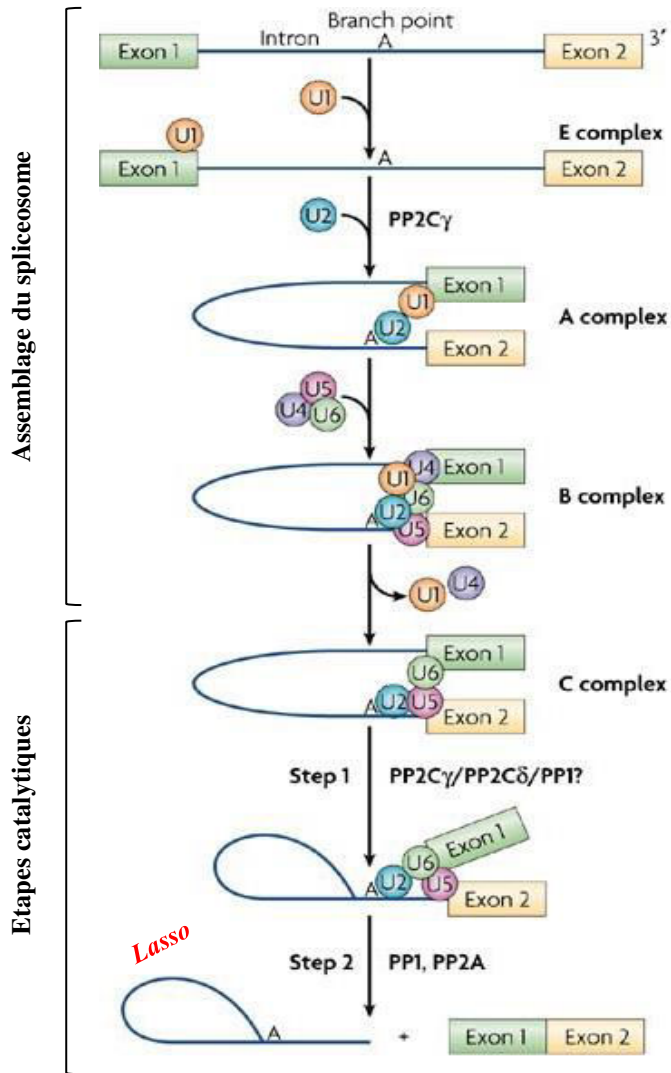
Chez les eucaryotes supérieurs, l'ADN, support de l'information génétique contenue dans le noyau, est transcrit en ARN. Trois types d'ARN polymérases (ARNpol) interviennent dans la synthèse de ces molécules : (1) l'ARNpol I pour les ARN ribosomiques transcrits dans le nucléole (28S, 18S et 5,8S) (Werner et al., 2009), (2) l'ARNpol II pour les ARN pré-messagers (pré-ARNm) (pour revue Plaschka et al., 2016) et (3) l'ARNpol III pour les ARN de transfert et les petits ARN (pour revue White, 2011).

Intéressons-nous plus particulièrement aux ARN messagers (ARNm) qui sont des ARN codants. Leur maturation se déroule en plusieurs étapes dont la principale consiste à éliminer les séquences introniques. Durant cette étape d'épissage, les pré-ARNm ne sont pas « nus » mais plutôt en interaction avec un certain nombre de protéines afin de former des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) qui évoluent au cours du temps. Le processus d'épissage nécessite l'assemblage dynamique du complexe RNP, connu sous le nom de 'spliceosome', qui catalyse l'élimination des introns et la ligature des régions codantes (Wahl et al., 2009).

Trois déterminants de séquence sont requis pour la reconnaissance et l'élimination des introns par la machinerie d'épissage (pour revue Wahl et al., 2009) : (1) le site donneur d'épissage en 5' : GU (5'ss pour « *splice site* »), qui marque la jonction exon/intron de le pré-ARNm (2) le site accepteur d'épissage en 3' : AG (3'ss) qui se trouve au niveau de la jonction intron/exon et (3) la région du point de branchement, région riche en pyrimidines, située entre 20 et 40 nucléotides en amont de l'extrémité 3' de l'intron. Les motifs consensus de ces régions sont représentés dans la **Figure 24**.

##### i. La réaction d'épissage

La réaction d'épissage se fait en deux réactions de transestérification durant lequel une liaison phosphodiester est échangée contre une autre (Moore and Sharp, 1993). Lors de la première étape, le groupement 2' hydroxyle libre de l'adénosine du point de branchement attaque le groupement phosphate de la guanosine du site 5' d'épissage, ce qui aboutit à la



**Figure 25 : Modèle d'assemblage séquentiel du spliceosome.**

La maturation d'un pré-ARNm contenant deux exons et un intron est représentée. L'épissage conduit à la jonction des exons et à la libération de l'intron structuré en forme de « *Lasso* ». Les complexes macromoléculaires correspondant aux intermédiaires d'épissage: complexes E, A, B, et C ainsi que les deux étapes catalytiques d'épissage sont aussi représentés (*Extrait de Moorheat et al., 2007*)

libération de l'exon 5' et à la formation d'un intermédiaire en « *lasso* ». Dans la seconde étape, un autre attaque nucléophile se produit entre le groupement 3' hydroxyle de l'exon 5' et le groupement phosphate de l'exon 3', ce qui permet la ligation des deux exons et la libération de l'intron en *lasso*. Ces deux réactions sont réalisées au sein du spliceosome (**Figure 25**).

### ii. Le spliceosome

Le spliceosome est un complexe formé de 5 petits ARN nucléaires riches en Uridine : U1, U2, U4, U5 et U6 appelés snRNA (pour « *small nuclear RNA* ») associés à un cortège de protéines pour former des particules ribonucléoprotéiques snRNP (pour « *small nuclear ribonucleoprotein* ») (Nilsen, 2002). Le spliceosome contient également des protéines impliquées dans la transcription, dans le processus de clivage/polyadénylation et dans l'export, interagissant transitoirement avec le corps du snRNP. Chez la levure, environ 90 protéines sont impliquées dans la machinerie d'épissage (Fabrizio et al., 2009), tandis que chez les métazoaires ce nombre est plus élevé : environ 170 (pour revues Jurica and Moore, 2003; Wahl et al., 2009).

La réaction d'épissage fait intervenir 8 ARN hélicases hautement conservées (« *RNA-dependent DExD/H-box Helicases* ») : Sub2/UAP56, Prp5, Brr2/U5-200K, Prp28/U5-100K, PRP2, Prp16, Prp22, Prp43) qui agissent lors de l'assemblage du spliceosome afin de promouvoir des interactions ARN-ARN, ARN-protéines et protéines-protéines (pour revues Staley and Guthrie, 1998; Cordin et al., 2012).

Il existe deux modèles qui expliqueraient l'assemblage du spliceosome sur le pré-ARNm. Un grand nombre de preuves soutient le fait que le spliceosome s'assemble d'une façon séquentielle sur l'intron à épisser (Konarska and Sharp, 1987; Lacadie and Rosbash, 2005; Matlin and Moore, 2007; Hoskins et al., 2011). Cependant, il existe également des preuves en faveur de l'existence d'un spliceosome déjà pré-assemblé dans le noyau (Stevens et al., 2002). Les principaux aspects de l'assemblage du spliceosome sont décrits ci-dessous.

La mise en place du spliceosome proprement dit débute par la formation du complexe d'engagement, appelé complexe E. Cette première étape se produit d'une façon ATP-indépendante. Elle favorise la reconnaissance du site 5' d'épissage par la snRNP U1 (pour revue Rosbash and Séraphin, 1991). Le point de branchement est reconnu par le facteur d'épissage 1 SF1 (pour « *Splicing Factor 1* ») et la protéine BBP (pour « *Branchpoint Binding Protein* ») et la région 3' de l'épissage est reconnue par le complexe hétérodimérique



## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

U2AF (pour « *U2 snRNP Auxiliary Factor* »), composé de deux sous-unités U2AF65 et U2AF35 (Krämer and Utans, 1991; Zamore et al., 1992; Berglund et al., 1998; Wu et al., 1999). Ces différentes interactions sont renforcées par d'autres protéines supplémentaires, telles que les protéines SR (pour « *Serine (S)-Arginine (R) Rich* ») qui sont membres de la famille des protéines riches en serine et arginine, et qui ont de multiples fonctions dans l'épissage constitutif et alternatif des pré-ARNm (Lin and Fu, 2007).

En présence d'ATP, et suite aux interactions entre la snRNA U2 et le point de branchement, le complexe A va donc se former (**Figure 25**) (Barabino et al., 1990; Chiara et al., 1996). L'association entre la snRNA U2 et le pré-ARNm coïncide avec la dissociation du SF1 (Liu et al., 2001b; Rutz and Séraphin, 1999). Elle est en outre stabilisée par des composants protéiques présents au sein de la snRNP U2 interagissant avec l'adénosine du point de branchement et U2AF65 (Valcárcel et al., 1996; Shen et al., 2004). Cette interaction semble indispensable pour la première étape catalytique d'épissage.

L'interaction du complexe tri-snRNPP pré-associé, composé de U4/U6 et U5, avec le pré-ARNm conduit à la formation du complexe B (**Figure 25**) (Bindereif and Green, 1987; Cheng and Abelson, 1987). Environ 50 protéines supplémentaires peuvent être détectées au niveau de ce complexe, et à ce stade, les cinq snRNP sont associés avec le pré-ARNm (Deckert et al., 2006). Cependant, le spliceosome n'est pas dans une configuration active et nécessite donc de nombreux réarrangements ATP-dépendants : (1) le relargage des snRNP U1 et U4 ; (2) le remplacement de la snRNP U1 par la snRNP U6, qui va interagir avec le site 5' d'épissage et (3) l'interaction entre les snRNP U2 et U6. Plusieurs ARN hélicases sont impliquées dans ces réarrangements générant ainsi le complexe B\* (ou B activé) (pour revue Matlin and Moore, 2007). Les snRNP U2 et U6 avec la protéine Prp8 (« *Pre-mRNA Processing factor* ») (associée à la snRNP U5) forment le complexe catalytique du spliceosome, ce qui induit la première réaction de transestérification permettant ainsi le relargage de l'intron en *lasso* et le désassemblage du spliceosome (Abelson, 2008; Wen et al., 2008). Cette première étape catalytique de l'épissage marque la formation du complexe C. A ce stade, une deuxième réaction de transestérification se produira, aboutissant au rapprochement des exons 5' et 3' (**Figure 25**) (Rhode et al., 2006). Une fois cette réaction accomplie, un complexe de jonction exon-exon EJC (pour « *Exon Junction Complex* ») vient s'ajouter dans une région de 24 nucléotides en amont de la jonction, où l'épissage aura lieu (Tange et al., 2004; Le Hir and Séraphin, 2008). Les interactions entre les snRNP U2, U5 et



## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

U6 avec le pré-ARNm sont alors stabilisées permettant aux snRNP d'être recyclés et assemblés pour une future utilisation lors d'un deuxième cycle d'épissage.

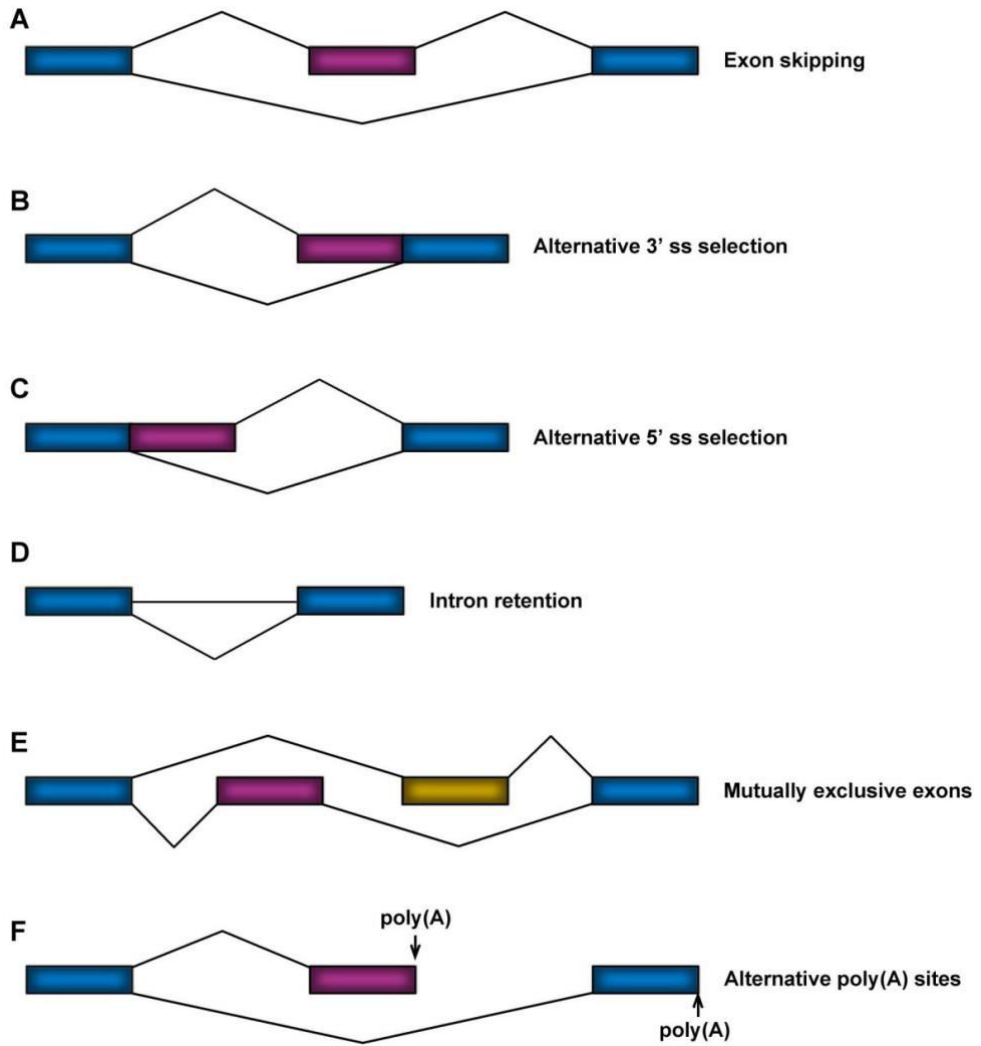
Le second modèle d'assemblage repose sur l'existence d'un spliceosome pré-assemblé. Dans ce modèle, les snRNP U2, U4, U5 et U6 interagissent entre eux sans le pré-ARNm, générant un complexe nommé « pseudospliceosome » (Konarska and Sharp, 1988). Une autre étude chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a mis en évidence la présence d'un complexe pentamérique préformé composé des cinq snRNP et de 76 protéines associées (Stevens et al., 2002). L'existence d'une spliceosome pré-assemblé autour d'un pré-ARNm a été également démontrée *in vitro* par microscopie électronique, permettant l'excision des introns suite à un scan du pré-ARNm au cours de synthèse (Azubel et al., 2006). Cependant, l'existence de ces deux modèles n'est pas contradictoire. Ils reflètent les différents stades de stabilisation/déstabilisation des snRNP et des facteurs d'épissage avec le pré-ARNm expliquant la mise en place du spliceosome. Ainsi le modèle séquentiel représente un bon modèle fournissant une image claire du recrutement stable des snRNP individuels au niveau du pré-ARNm (Rino et al., 2007).

### 2- L'épissage alternatif

A la fin des années 70, Walter Gilbert a mis en évidence le mécanisme de l'épissage alternatif (AS pour « *Alternative Splicing* ») (Gilbert, 1978). Il est défini comme le processus par lequel une séquence génomique unique est capable de produire de multiples ARNm correspondant à des protéines distinctes. A ce jour, l'épissage alternatif est considéré comme la source principale contribuant à la diversification du protéome (pour revue Soller, 2006). Un exemple extrême de l'épissage alternatif chez la drosophile est le gène *Dscam* (pour « *Down syndrome cell adhesion molecule* »), qui a la capacité de générer 38 016 isoformes d'ARNm (Schmucker et al., 2000). Ce mécanisme permet d'expliquer la complexité de certains organismes comme l'Homme qui a relativement peu de gènes (environ 22 000), mais qui sont capables de coder pour plus de 100 000 protéines (Pan et al., 2008; Wang et al., 2008). En effet, on estime que plus de 95% des gènes multiexoniques chez l'Homme sont épissés d'une manière alternative générant plusieurs ARNm (McManus and Graveley, 2011).

En plus de la diversité protéomique, l'épissage alternatif médie la régulation de l'expression des gènes non seulement par l'introduction de codons de stop précoces (PTC





**Figure 26 : Les différents types d'épissage alternatif.**

Les exons constitutifs sont représentés par des cases bleues et les exons alternatifs en rose ou jaune. Les lignes pleines représentent les options d'épissage. Poly(A): signal de polyadénylation (*Extrait de Keren et al., 2010*).

pour « *Premature Termination codon* »), dirigeant ainsi les ARNm vers les mécanismes de dégradation, mais encore par la modification des régions non traduites des ARNm en 5' ou en 3' (UTR pour « *UnTranslated Regions* »), affectant ainsi leur stabilité, leur localisation ou leur efficacité traductionnelle (Lejeune and Maquat, 2005; Stamm et al., 2005). Comme tous les autres processus de régulation génique, les mutations qui perturbent le processus d'épissage alternatif peuvent induire différentes pathologies (pour revue Cooper et al., 2009).

### i. Les différents types d'épissage alternatif

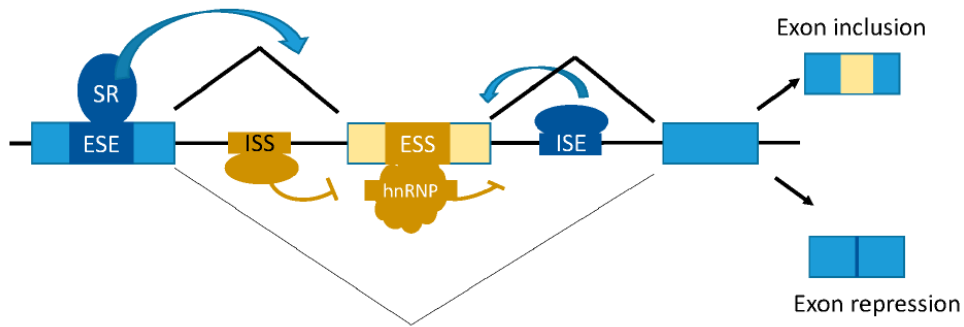
Plusieurs types d'épissage alternatif ont été décrits chez les eucaryotes supérieurs (**Figure 26**) (Keren et al., 2010) :

- **Les exons cassettes** : Ces exons sont soit inclus soit exclus du transcrit final (**Figure 26A**). Lorsque l'exon est épissé du pré-ARNm, l'épissage prend le nom du phénomène de « saut d'exon ». Ce dernier représente 40% des événements d'épissage alternatif chez les eucaryotes supérieurs.

- **Les exons définis par des sites 5' ou 3' d'épissage alternatifs** : Les exons peuvent posséder deux sites 5' ou deux sites 3' d'épissage, qui sont en compétition pour être reconnus (**Figure 26B et C**). Ainsi, selon le site d'épissage sélectionné par la machinerie d'épissage, l'exon pourra être allongé ou raccourci. Ces événements ont lieu sur le pré-ARNm de Bcl-x chez l'Homme où deux sites 5' d'épissage sont présents (Boise et al., 1993).

- **La rétention d'intron** : La machinerie d'épissage peut ignorer certains sites d'épissage, aboutissant ainsi à la conservation de l'intron au niveau de l'ARNm mature (**Figure 26D**). La rétention d'intron est la forme la plus rare de l'épissage alternatif chez les vertébrés et les invertébrés constituant moins de 5% des événements d'épissage mais c'est le mode le plus utilisé chez les plantes, les champignons et les protozoaires.

- **Les exons mutuellement exclusifs** : Ces exons, généralement de taille similaire, ne sont jamais présents simultanément dans un ARNm ; un seul exon sera donc retenu lors de l'épissage. Cet événement change peu la taille du transcrit mature mais modifie les propriétés de la protéine produite (**Figure 26E**). Par exemple l'exon 6A du pré-ARNm de la  $\beta$ -tropomyosine est utilisé dans les cellules non musculaires, tandis que l'exon 6B est inclus dans l'ARNm des cellules musculaires (Libri et al., 1989).



**Figure 27 : Les régulateurs de l'épissage des pré-ARNm.**

Représentation schématique d'un transcrit primaire. Les éléments *cis*-régulateurs qui contrôlent l'épissage alternatif sont composés de séquences activatrices: ESE et ISE (bleu foncé) et inhibitrices ESS et ISS (marron). Les facteurs agissant en *trans* tels que les protéines SR et hnRNP sont également représentés. Les protéines SR favorisent l'inclusion d'exon donnant naissance dans cet exemple à un polypeptide formé de 3 exons. A l'inverse, les facteurs hnRNP peuvent promouvoir le saut d'exon donnant lieu à une protéine avec 2 exons. SR: Serine Arginin Rich; hnRNP: heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins, ESE: Exonic Splicing Enhancer; ISE: Intronic Splicing Enhancer; ESS: Exonic Splicing Silencer; ISS: Intronic Splicing Silencer (*Extrait de Yabas et al., 2015*).

- **Les exons composites internes/terminaux** : Ces gènes contiennent généralement, un site 5' d'épissage interne suivi d'un site de polyadénylation, ce qui leur permet d'être utilisés soit comme des exons internes lorsque le site 5' d'épissage est reconnu, soit comme des exons 3' terminaux quand le signal de polyadénylation est sélectionné (**Figure 26F**). Ce profil d'épissage est utilisé lors du passage de la forme membranaire à la forme sécrétée de la chaîne lourde  $\mu$  des Ig où un seul gène pourra donner deux formes alternatives de transcrits matures qui diffèrent par leur région 3' (**Figure 21**) (Tsurushita and Korn, 1987). Dans les lymphocytes B, l'exon C<sub>H</sub>4 est utilisé en tant qu'exon interne et il est épissé aux exons M1 et M2. Dans ce cas l'ARNm code pour un récepteur membranaire. Dans les plasmocytes, ce même exon est considéré comme un exon 3' terminal et code pour la forme sécrétée des IgM.

### ii. Les régulateurs de l'épissage alternatif

La régulation de l'épissage alternatif est le fruit des interactions combinatoires entre des éléments agissant en *cis* et des facteurs régulateurs agissant en *trans*. La perturbation de ces interactions affecte l'épissage alternatif et est souvent associée à de nombreuses maladies humaines. Par conséquent, ces éléments régulateurs représentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour moduler l'épissage de gènes impliqués dans de nombreux cancers et maladies génétiques (Garcia-Blanco et al., 2004; House and Lynch, 2008; Zaharieva et al., 2012).

- **Les éléments *cis*-régulateurs**

La force des sites d'épissage 5' et 3' des exons alternatifs est proportionnelle au degré de complémentarité avec la snRNA U1 (Hertel, 2008). Des séquences additionnelles, agissant précocement lors de la mise en place du complexe d'épissage, permettent de favoriser ou d'inhiber l'épissage des exons alternatifs (Voelker et al., 2012). Ces éléments régulateurs localisés dans les séquences introniques ou exoniques sont répartis en quatre catégories : les séquences exoniques activatrices d'épissage (ESE pour « *Exonic Splicing Enhancers* »), les séquences exoniques inhibitrices (ESS pour « *Exonic Splicing Silencers* »), les séquences introniques activatrices (ISE pour « *Intronic Splicing Enhancers* ») et les séquences introniques inhibitrices (ISS pour « *Intronic Splicing Silencers* ») (**Figure 27**). L'étude des séquences exoniques a montré que les ESE sont généralement liées à la famille des protéines SR, elles favorisent l'assemblage du spliceosome et l'inclusion des exons (Garcia-Blanco et al., 2004). A l'inverse, les ESS sont reconnus par des protéines de la famille hnRNP (pour

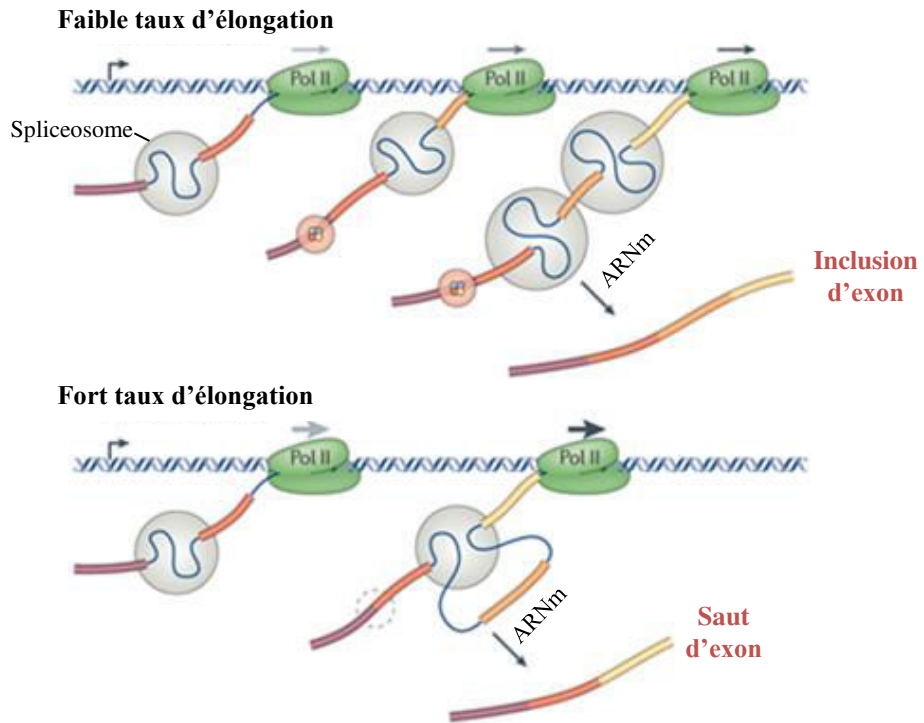


« *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* »), elles bloquent l'assemblage du spliceosome et répriment l'inclusion des exons (Garcia-Blanco et al., 2004). Les séquences introniques ISE et ISS ont des fonctions similaires à leurs homologues exoniques. Les ISS sont reconnus par des protéines de la famille des hnRNP, comme les protéines hnRNP I (ou PTB), hnRNP A1 ou hnRNP L (pour revue Matlin et al., 2005). Les ISE, quand à eux, sont reconnus par la protéine hnRNP L (Hung et al., 2008) et par d'autres protéines de la famille des hnRNP.

### • Les éléments *trans*-régulateurs

Les événements d'épissage alternatif sont contrôlés suite aux interactions entre des facteurs protéiques et les éléments *cis*-régulateurs décrits précédemment. Il existe deux grandes familles de protéines régulatrices d'épissage : les protéines SR et les protéines hnRNP (**Figure 27**) (Mayeda et al., 1999). Les protéines SR sont considérées comme des facteurs activateurs interagissant principalement avec les ESE. Elles possèdent une structure modulaire constituée d'un ou de deux motifs de reconnaissance de l'ARN (motifs RRM pour « *RNA recognition motifs* ») et d'un domaine protéique RS (pour « *Arginine (R)-Serine (S)* »), facilitant ainsi les interactions protéine-ARN et protéine-protéine qui vont avoir lieu pendant le recrutement du spliceosome (Mayeda et al., 1999). Les protéines hnRNP inhibent généralement l'épissage. Il a été démontré que l'exon variable 4 (v4) du gène humain CD45 contient un ESS qui permet la fixation d'hnRNP L et l'élimination de cet exon par un épissage alternatif de type « saut d'exon » (Rothrock et al., 2005). CD45 est un récepteur tyrosine phosphatase exprimé spécifiquement à la surface des cellules hématopoïétiques et de leurs précurseurs. Le transcrit CD45 est composé de trois cassettes d'exons variables (exons 4, 5 et 6) qui codent pour trois isoformes distincts : CD45RA, RB et RC (Alexander, 2000; McNeill et al., 2004; Liu et al., 2006). Dans les lymphocytes B, les trois exons de CD45 sont inclus après l'épissage donnant lieu à B220 ou à CD45RABC (Cyster et al., 1996). Les cellules T naïves expriment des isoformes incluant une (CD45RB) à deux (CD45RAB/CD45RBC) cassettes d'exons (Beverley et al., 1992; McNeill et al., 2004). En revanche, les lymphocytes T mémoires expriment l'isoforme CD45RO dépourvue des trois exons.

La régulation de l'épissage alternatif peut également être dépendante de nombreux stimuli extérieurs reçus par la cellule. Un exemple type de régulation d'un gène par une voie de signalisation est l'exon variable 5 (v5) du pré-ARNm CD44. CD44 est largement exprimé par les lymphocytes, il joue un rôle dans la migration vers les tissus lymphoïdes. Il est



**Figure 28 : Modèle de régulation de l'épissage alternatif par la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II.**

Une vitesse d'élongation importante conduit à l'élimination d'un exon alternatif par saut d'exon (partie du bas), alors qu'une faible vitesse d'élongation de l'ARNpol II autorise son inclusion lors de l'épissage (partie du haut) (*Modifié de Le Hir et al., 2016*).

également impliqué dans le développement embryonnaire et certaines isoformes sont présentes spécifiquement au sein des tumeurs (Arch et al., 1992; Cooper and Dougherty, 1995; Sherman et al., 1996, 1998). La protéine transmembranaire CD44 est le produit d'un seul gène formé de dix exons variables et dont l'expression est régulée par épissage alternatif. Cependant, l'exon v5 est le plus étudié et son épissage est lié aux voies de signalisation TCR (Sherman et al., 1996; Weg-Remers et al., 2001). Suite à une stimulation des cellules T, la cascade de signalisation Ras-ERK est activée et favorise la phosphorylation du facteur Sam68 (pour « *Src-Associated Protein in Mitosis of 68 kDa* »). Sam68 se fixe au niveau des ESE de l'exon 5 et provoque son inclusion (Matter et al., 2002). En revanche, la protéine hnRNP A1, en se fixant sur le même élément de séquence favorise l'exclusion de l'exon v5 de CD44 (Matter et al., 2000, pour revues Cheng and Sharp, 2006; Blaustein et al., 2007).

- **Les régulateurs co-transcriptionnels**

La régulation de l'épissage alternatif ne dépend pas seulement des interactions entre les facteurs d'épissage et leurs séquences cibles présentes au niveau des pré-ARNm, mais est aussi dépendante de la transcription. Le lien entre l'épissage et la transcription a été démontré par une étude montrant que l'absence du domaine carboxy terminal (CTD pour « *Carboxy-Terminal Domain* ») de la grosse sous-unité de l'ARNpol II conduit à un blocage de l'épissage (McCracken et al., 1997). La cinétique et/ou la processivité de l'ARNpol II lors de la transcription peut réguler l'épissage alternatif. Un modèle putatif suggère que si l'ARNpol II est peu processive ou si elle effectue une pause durant l'élongation, elle favorise l'inclusion d'exons alternatifs même si les sites d'épissage sont peu efficaces. A l'inverse, un fort taux d'élongation de l'ARNpol II ou l'absence de pause dans l'élongation se traduit par un saut d'exon (**Figure 28**) (Nogués et al., 2003). L'exon 9 du gène CFTR (pour « *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* ») représente une exception à cette règle où un faible taux d'élongation de l'ARNpol II favorise le saut d'exon (Dujardin et al., 2014).

- **La structure de la chromatine et les modifications des histones**

Comme indiqué ci-dessus, le taux d'élongation de l'ARNpol II et les pauses imposées lors de la transcription constituent des facteurs importants dans la régulation de l'épissage alternatif. Ainsi, dans cette section, nous allons discuter les changements touchant la chromatine, telles que les modifications d'histones qui affectent la transcription et jouent un rôle décisif dans l'épissage alternatif (pour revue Luco et al., 2011).





## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

Généralement, l'ADN est emballé avec un octamère de protéines hautement conservées appelées histones (deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4) pour former l'unité de base de la chromatine appelée « le nucléosome ». Des modifications post-traductionnelles (méthylation, acétylation ou phosphorylation) affectent les histones à plusieurs niveaux, en particulier à leur extrémité N-terminale. Une modification du degré de ces modifications semble réguler les événements de l'épissage alternatif (Hnilicová and Staněk, 2011). Ces marques spécifiques des histones permettent de faire la distinction entre les exons et les introns, facilitant ainsi le processus d'épissage. Une étude réalisée chez *Caenorhabditis, elegans*, utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a montré que les exons sont préférentiellement marqués avec la H3K36me3 (tri-méthylation de la lysine 36 de l'histone H3) comparativement aux introns (Kolasinska-Zwierz et al., 2009). D'autres modifications de méthylation des histones telles que H3K27me1, H3K27me2, H4K20me1 et H3K79me1 ont également été signalées pour marquer favorablement les exons. De même, il a été observé que le saut d'exon 18 du gène murin *NCAM* (pour « *Neural Cell Adhesion Molecule* ») observé lors de la dépolarisation des cellules neuronales est accompagné par une hyper-acétylation de la lysine 9 de l'Histone H3 (H3K9ac) (Schor et al., 2009), soulignant ainsi l'importance de la structure de la chromatine sur la régulation de l'épissage alternatif.

### 3- Le saut d'exon thérapeutique

Comme indiqué précédemment, le processus d'épissage peut être régulé par différents facteurs agissant en *cis* et/ou en *trans* qui vont influencer le choix du site d'épissage (Johnson et al., 2009). De même de nombreuses mutations ponctuelles, localisées sur les sites d'épissage ou dans les séquences régulatrices « *enhancer* » (ESE, ISE) ou « *silencer* » (ESS, ISS), peuvent être la cause de différentes pathologies. Modifier l'épissage présente également un intérêt thérapeutique considérable et cette chirurgie de l'ARN fait l'objet de nombreuses études depuis plus de 20 ans. Ces approches reposent souvent sur l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens (AON pour « *Antisense OligoNucleotide* ») pour modifier l'épissage.

La modification d'épissage par administration d'AON a été examinée dans un certain nombre de maladies mais le travail le plus avancé concerne la découverte de deux candidats pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD pour « *Duchenne*



## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

*Muscular Dystrophy* ») (Wilton et al., 1999; Muntoni and Wood, 2011; Kole et al., 2012; Kole and Leppert, 2012; Falzarano et al., 2015). La DMD est une maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Elle est causée par des mutations dans le gène de la dystrophine (Aartsma-Rus et al., 2006), provenant de suppressions (65%), de duplications (15%) ou de mutations non-sens et d'autres petites mutations (20%). Les délétions les plus fréquentes qui causent la DMD touchent l'exon 50 et englobent les couples d'exons 49-50, 48-50, 47-50, 45-50 et la délétion de l'exon 52 (Aartsma-Rus and van Ommen, 2009). Toutes ces mutations vont perturber le cadre ouvert de lecture et finalement aboutir à l'absence d'une dystrophine fonctionnelle, qui se caractérise par une perte de la fonction musculaire. Parmi de nombreuses approches différentes pour le traitement de la DMD, le saut d'exon est une des méthodes les plus prometteuses pour la restauration de l'expression de la dystrophine (Sugita and Takeda, 2010; Wood et al., 2010). Cette stratégie consiste à enlever sélectivement un ou plusieurs exons mutés, afin de générer des transcrits courts avec un cadre de lecture normal. De tels ARNm permettent de produire des dystrophines, certes tronquées, mais suffisamment stables, fonctionnelles et analogues à celles trouvées dans une forme clinique bénigne de la dystrophie musculaire de Becker (BMD pour «*Becker Muscular Dystrophy*»). Deux médicaments candidats ont déjà fait l'objet de tests cliniques : (1) le Drisapersen (2'-O-methyl-phosphorothiate oligonucleotide : 2'OMePS), développé par la société «*Prosensa Holding N.V*»; et (2) l'Eteplirsén (phosphorodiamitade morpholino oligomère : PMO) développé par «*Sarepta therapeutics*». Ces 2 molécules permettent d'induire un saut d'exon pour corriger des mutations autour de l'exon 51 du gène de la dystrophine. Ces mutations sont retrouvées chez ~13% des personnes atteintes de DMD (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Aartsma-Rus et al., 2009).

Les stratégies thérapeutiques par saut d'exon utilisent des AONs capables de s'hybrider sur des sites d'épissage, des points de branchement ou des séquences d'exons internes essentielles à la machinerie d'épissage (Aartsma-Rus, 2010). Ces stratégies visent le plus souvent à induire un saut d'exon. Bien que cette thérapie soit prometteuse, des études cliniques récentes ont signalé que le bénéfice des traitements AON n'a pas encore été atteint (pour revue Lu et al., 2014). L'absorption au niveau tissulaire et la faible pénétration intranucléaire des AONs reste le principal défaut de ces approches. Néanmoins, Goyenvallée et al. ont récemment montré que l'administration systémique d'une nouvelle classe d'AON : (le tricyclo-ADN, tc-ADN) permettait de restaurer significativement l'expression de la



## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

dystrophine chez des souris reproduisant la DMD. Cette augmentation est retrouvée dans l'ensemble de la musculature squelettique y compris dans le coeur (Goyenvalle et al., 2015a, 2015b).

Mes travaux de thèse ont permis de montrer que le saut d'exon pouvait favoriser la synthèse d'Ig tronquées et induire une toxicité dans les plasmocytes (*cf* Article 1). A la lumière de ces résultats, nous avons déposé une demande de brevet reposant sur l'administration d'AON pour provoquer la synthèse d'Ig tronquées dans les cellules de myélome (*cf* Brevet). Cette thérapie revêt un caractère original et diffère des approches conventionnelles de saut d'exon visant à restaurer la production d'une protéine fonctionnelle, comme décrit précédemment pour la dystrophine dans le cadre du traitement de la myopathie de Duchenne (Goyenvalle et al., 2015a, 2015b).

### 4- Le rôle de l'épissage alternatif dans les cellules B

Comme présenté précédemment, les cellules B matures co-expriment des IgM et des IgD à leur surface, puis l'expression d'IgD diminue après leur activation antigénique. Cette co-expression d'IgM et d'IgD résulte d'un épissage alternatif d'un long transcrite primaire IgH (Maki et al., 1981; Moore et al., 1981). Cependant les facteurs régulant cet épissage ne sont pas bien connus. Récemment, deux groupes indépendants ont identifié une protéine en doigt de zinc ZFP318 (pour « *Zing-Finger Protein* »), capable d'agir comme un régulateur de l'expression IgD dans les cellules B matures (Enders et al., 2014; Pioli et al., 2014). ZFP318 est impliquée lors de la spermatogenèse et son absence provoque l'infertilité chez la souris (Ishizuka et al., 2003). Au cours du développement B, l'expression de ZFP318 augmente et les cellules B matures des souris déficientes en ZFP318 ne parviennent pas à exprimer IgD (Jojic et al., 2013). Cette manque d'expression d'IgD résulte d'une utilisation préférentielle du site de terminaison de la transcription situé au niveau de l'exon terminal IgM, bloquant ainsi la synthèse du long transcrite IgH et donc la production d'IgD. Ces données suggèrent que la protéine ZFP318 bloque la reconnaissance du site de terminaison de la transcription en aval de C $\mu$ . Ce blocage autorise donc la transcription de la région codante C $\delta$  par l'ARNPol II et l'expression d'IgD après épissage alternatif (Enders et al., 2014; Pioli et al., 2014).

Lors d'une stimulation antigénique, les transcrits IgH codant la forme membranaire et sécrétée des Ig sont contrôlés par l'utilisation mutuellement exclusive d'un site d'épissage par



## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

rapport à un site de clivage/polyadénylation (poly (A)) à l'extrémité 3' du pré-ARNm IgH (Alt et al., 1980; Early et al., 1980; Lamson and Koshland, 1984). Dans les LB immatures, l'exon C<sub>H</sub>4 est utilisé en tant qu'exon interne et épissé aux exons M1 et M2. L'ARNm ainsi formé code pour un récepteur membranaire. Dans les PC, la terminaison de la plupart des transcrits a lieu au sein de l'intron séparant le dernier exon C<sub>H</sub>4 de l'exon M1, ce qui donne accès au site de polyadénylation secrété (Poly A sec) (pour revue Santos et al., 2011). Afin d'identifier les régulateurs d'épissage au cours de la maturation des cellules B, le groupe de Rao a réalisé une analyse comparative des profils transcriptomiques des PC de la moelle osseuse et des cellules B naïves. Cette analyse a révélé une augmentation significative dans les PC, de l'expression du facteur hnRNP LL (pour « *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like* ») et du facteur d'élongation de la transcription ELL2 (Benson et al., 2012). Le facteur hnRNP LL intervient dans l'exclusion de l'exon 4 de la protéine CD45 au cours de la différenciation plasmocytaire, ce qui se traduit par une diminution de l'expression du B220 (isoforme CD45RABC) (Chang et al., 2015). En revanche, hnRNP LL se lie aux transcrits IgG2b et favorise une augmentation de l'isoforme membranaire. De façon intéressante, l'expression d'ELL2 neutralise l'effet d'hnRNP LL sur les transcrits d'Ig et permet d'augmenter la production de l'isoforme sécrétée par les plasmocytes (Martincic et al., 2009; Benson et al., 2012; Park et al., 2014). Ainsi, la production optimale de la forme sécrétée des Ig dans les plasmocytes résulte d'une compétition entre ces différents facteurs régulateurs agissant en *trans*.

### 5- Transcription, épissage et dégradation des transcrits d'Ig non-productifs

Les mécanismes impliqués dans les jonctions de l'ADN lors des réarrangements V(D)J sont imprécis (*cf* chapitre 1). Cette imprécision jonctionnelle participe à la diversification du répertoire des récepteurs à l'antigène. Néanmoins, elle entraîne 2 fois sur 3 un décalage du cadre de lecture, aboutissant à l'apparition de codons non-sens (PTC) sur les transcrits matures.

De part leur propension à héberger des allèles d'Ig présentant des réarrangements V(D)J non-productifs, les cellules B sont des excellents modèles pour étudier les mécanismes de surveillance des ARNm. En effet, ~40-50% des lymphocytes B présentent des réarrangements bi-alléliques au niveau des régions variables de leur gènes d'Ig (Daly et al.,





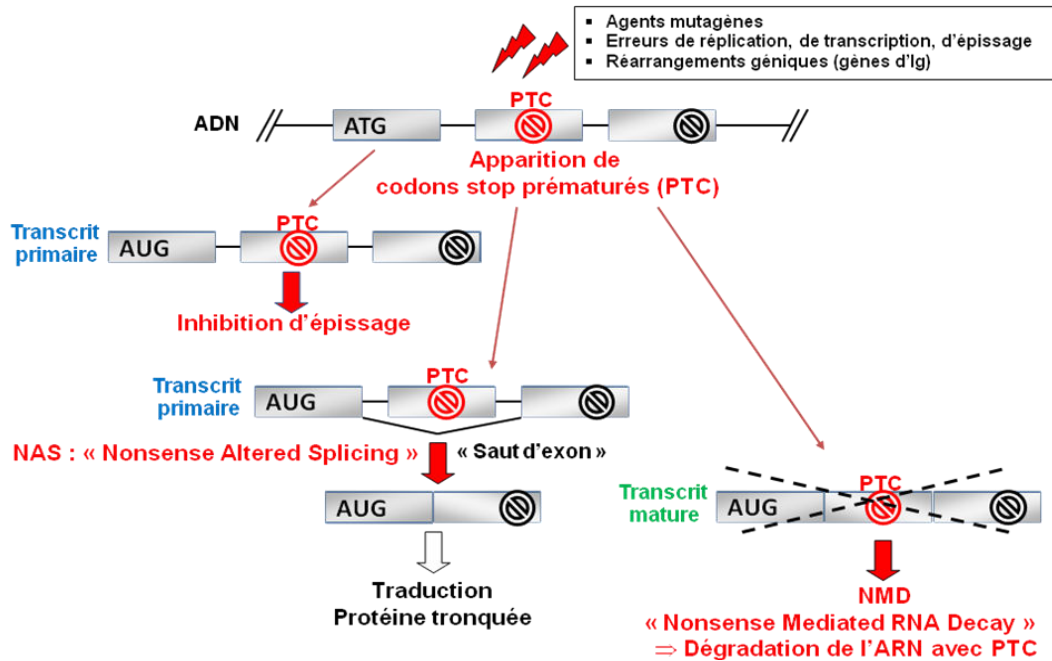
## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

2007; Mostoslavsky et al., 2004a). La configuration des allèles d'Ig dans de telles cellules est dite productive/non-productive ou VDJ<sup>+</sup>/VDJ<sup>-</sup> (chaînes lourdes) ou VJ<sup>+</sup>/VJ<sup>-</sup> (chaînes légères). Ainsi, environ la moitié de la population des lymphocytes B peut exprimer un allèle codant une Ig tronquée potentiellement néfaste.

La communauté scientifique a longtemps associé le phénomène d'exclusion allélique à une mise sous silence des allèles non-productifs. Des études menées par Skok et collaborateurs ont montré, en utilisant des techniques combinées de « *DNA et RNA FISH* » (pour « *Fluorescent in situ Hybridization* »), que les allèles d'Ig réarrangés d'une façon non fonctionnelle (VDJ<sup>-</sup> au locus IgH ou VJ<sup>-</sup> au locus IgL) sont recrutés au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique et pourraient être placés sous silence (Roldán et al., 2005; Skok et al., 2001). Ces données sur l'extinction ou le « *silencing* » des allèles non-productifs restent cependant controversées.

En effet, de nombreuses études ont révélé une transcription active des allèles non-productifs durant tout le développement B, invalidant ainsi l'hypothèse du « *silencing* » des allèles exclus (Delpy et al., 2004a, 2004b; Daly et al., 2007; Eberle et al., 2009a). Par les mêmes techniques de *DNA et RNA-FISH*, Daly et al. ont observé une transcription bi-allélique des allèles IgH dans des cellules B primaires (Daly et al., 2007). Eberle et al. ont également montré que la transcription s'effectue de façon similaire sur les deux allèles (VDJ<sup>+</sup> et VDJ<sup>-</sup>) dans une lignée pro-B. Par des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), ces auteurs ont observé une occupation comparable de l'ARN polymérase II et de l'acétylation de l'histone H3 sur les deux allèles (Eberle et al., 2009a). Les travaux menés au laboratoire par Tinguely et al. sur des cellules B primaires, ont révélé une transcription active des allèles non-productifs à tous les stades du développement B. Cette analyse physiologique a également confirmé que les 2 allèles présentent une charge équivalente de RNA polymérase II et un profil d'acétylation de l'histone H3 similaire (Tinguely et al., 2012). Par des analyses haut débit (technique de 4C-seq...), Holwerda et al. ont montré une localisation nucléaire symétrique des allèles productifs et non-productifs IgH, dans un environnement de chromatine active (Holwerda et al., 2013) et donc une absence générale de « *silencing* ».

La transcription des allèles d'Ig non-productifs a également été observée au niveau des chaînes légères. L'équipe de Chess, par des techniques de *RT-PCR* et de *RNA-FISH*, a observé une transcription germinale biallélique au locus  $\kappa$  dans les cellules B immatures de souris *wild-type* et dans les cellules B issues de souris déficientes en RAG (RAG<sup>-/-</sup>) (Singh et



**Figure 29 : Les différents mécanismes de surveillance des ARN.**

La surveillance des transcrits présentant des codons stop prématurés (PTC) peut s'effectuer à différents stades de l'expression génique. Les transcrits primaires hors phase peuvent subir un phénomène d'inhibition d'épissage. Au cours de l'épissage, le phénomène de NAS permet d'éliminer l'exon contenant un PTC par saut d'exon. Enfin, les transcrits matures contenant un PTC sont dégradés par NMD. PTC: Premature Termination Codon

## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

al., 2003). Excluant également le « *silencing* » transcriptionnel des allèles Ig $\kappa$  non-productifs, nous avons observé un taux important de pré-ARNm Ig $\kappa$  hors-phase, en analysant la longueur des CDR3 au cours du développement B (Delpy et al., 2004b et données non publiées). Ainsi, le maintien de l'exclusion allélique ne s'opère pas au niveau transcriptionnel. L'ensemble des données suggère donc que l'exclusion allélique agit uniquement au cours des réarrangements V(D)J, pour permettre d'initier les recombinaisons sur un seul allèle d'Ig (V vers DJ pour les chaînes lourdes, et/ou V vers J pour les chaînes légères).

Bien que la transcription des allèles semble principalement bi-allélique, les transcrits matures provenant des allèles non-productifs (VDJ<sup>-</sup> ou VJ<sup>-</sup>) sont quasi-indétectables dans les cellules B matures (Li and Wilkinson, 1998; Delpy et al., 2004b; Eberle et al., 2009a; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). Cette absence est le reflet de l'activation des mécanismes de surveillance des ARN permettant d'assurer la fidélité de l'expression génique. En effet, de nombreux travaux ont démontré la forte activité de ces mécanismes de « contrôle qualité » des ARN dans la lignée B (**Figure 29**).

Cette surveillance commence par un processus d'inhibition préférentielle de l'épissage des transcrits d'Ig contenant des PTC (apparenté au NMUP pour « *Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA* »). Au cours de l'épissage, un phénomène d'épissage alternatif appelé NAS (pour « *Nonsense-associated Altered Splicing* ») peut intervenir, et par exemple, éliminer l'exon contenant un PTC par saut d'exon. Enfin, le mécanisme de NMD (pour « *Nonsense-Mediated mRNA Decay* ») assure la dégradation des transcrits matures contenant des PTC. Ces trois processus peuvent coexister au sein d'une même cellule afin d'assurer un contrôle qualité efficace des ARN, tout en évitant la synthèse d'Ig tronquées (Baumann et al., 1985; Jäck et al., 1989; Lozano et al., 1994; Aoufouchi et al., 1996; Li and Wilkinson, 1998; Delpy et al., 2004b; Eberle et al., 2009a; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012).

### 6- Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA (NMUP)

De nombreuses observations soulignent le fait que l'apparition de mutations, comme des mutations non-sens, peut modifier dans le noyau l'épissage des ARN. Ainsi, leur présence au niveau des gènes Ig $\kappa$ , Ig $\mu$  et TCR $\beta$  entraîne une inhibition d'épissage et une



## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

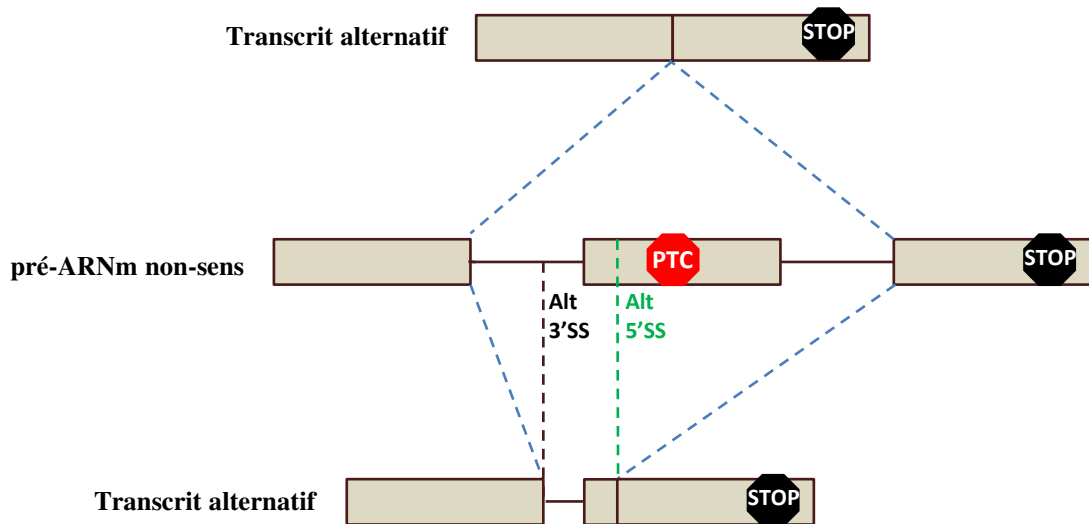
accumulation de transcrits primaires (Lozano et al., 1994; Aoufouchi et al., 1996; Mühlemann et al., 2001). Ce phénomène est également appelé NMUP. En accord avec ces résultats, des expériences de *RNA FISH* ont montré que la présence de mutations non-sens, mais pas de mutations faux-sens, se traduit par une accumulation de pré-ARNm Igu au niveau ou à proximité du site de transcription (Mühlemann et al., 2001). Cette accumulation des transcrits primaires Igu est observée pour différentes mutations non-sens situées dans plusieurs exons. (Mühlemann et al., 2001). Le NMUP dans ce cas semble indépendant de la position du PTC.

Dans un contexte physiologique, notre laboratoire a également observé une accumulation préférentielle de transcrits primaires Ig $\kappa$  et Igu contenant des mutations non-sens, acquises par décalage du cadre de lecture lors des réarrangements V(D)J (Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). De façon intéressante, cette accumulation est maximale dans les cellules B au repos qui présentent une faible activité transcriptionnelle du locus IgH. En revanche, cette accumulation de pré-ARNm non-sens devient moins marquée dans des cellules B activées présentant une forte transcription des gènes d'Ig. Ces résultats ont permis de montrer que l'activation du NMUP est inversement proportionnelle à l'intensité de transcription (Tinguely et al., 2012).

Néanmoins, les perturbations touchant les cadres de lecture ne sont pas seules responsables d'une accumulation de pré-ARNm. Ainsi, Wilkinson et *al.* ont montré que des mutations modifiant des séquences *cis*-régulatrices de l'épissage, comme des ESE ou ISE, peuvent également aboutir à une augmentation du taux de pré-ARNm du TCR- $\beta$  (Imam et al., 2010).

### 7- Nonsense-associated Altered Splicing (NAS)

Le NAS (pour « *Nonsense-associated Altered Splicing* ») représente un autre mécanisme nucléaire de surveillance des ARNs. L'intégration du NAS parmi les mécanismes de contrôle qualité des ARN demeure discutable puisque ce phénomène d'épissage alternatif peut favoriser l'apparition de protéines tronquées, potentiellement néfastes pour la cellule (pour revue Maquat, 2002). En effet, un épissage alternatif visant à éliminer l'exon contenant la mutation non-sens permettra la traduction active de protéines aberrantes (**Figure 30**).



**Figure 30 : Exclusion d'un exon contenant un PTC par le processus de NAS.**

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

## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

Comme précédemment décrit pour l'inhibition d'épissage, l'activation du NAS est provoquée par la présence d'une mutation non-sens (NAS de type II) mais des mutations au niveau des séquences *cis*-régulatrices de l'épissage vont aussi aboutir à des épissages alternatifs similaires (NAS de type I). Dans le NAS de type I, l'épissage alternatif est déclenché par des mutations qui perturbent les ESE (pour revues Valentine, 1998; Cartegni et al., 2002). Ces ESE favorisent l'épissage en recrutant des protéines SR, qui à leur tour, vont recruter les composants du spliceosome (Blencowe, 2000; Graveley, 2000; Cartegni et al., 2002; Zheng, 2004). Cet épissage alternatif est indépendant de la synthèse protéique et a été décrit pour les transcrits codant la fibrilline-1, le SCN1M1 (pour « *Sodium channel Modifier 1* »), le CFTR, les gènes I $\mu$  et TCR  $\beta$  (Liu et al., 2001a; Caputi et al., 2002; Buchner et al., 2003; Pagani et al., 2003; Bühler and Mühlemann, 2005; Mohn et al., 2005; Chang et al., 2007a).

Plusieurs études ont mis en évidence une activation du NAS de type II pour des mutations non-sens mais pas pour des mutations faux-sens à des positions équivalentes (Dietz and Kendzior, 1994; Gersappe and Pintel, 1999; Maquat, 2002; Mendell et al., 2002; Wang et al., 2002a, 2002b). Contrairement au NAS de type I, ce type d'épissage alternatif dépend de la traduction protéique et peut être inhibé par suppression des ARNt, par des mutations qui touchent le site AUG d'initiation de la traduction ou les séquences consensus de Kozak (Gersappe et al., 1999; Wang et al., 2002a, 2002b). En accord avec son lien étroit avec la synthèse protéique, le NAS de type II fait intervenir UPF1 (« *Up-frameshift protein 1* ») un acteur majeur du NMD. D'une façon intéressante, la substitution d'un acide aminé spécifique d'UPF1, inactive le NMD mais n'affecte pas le NAS de type II, indiquant l'existence des fonctions génétiquement séparables d'UPF1 dans ces deux processus (Mendell et al., 2002). En revanche, d'autres facteurs impliqués dans le NMD (UPF2, UPF3, SMG1 ou eIF4A3) ne jouent pas un rôle indispensable dans la mise en place du NAS (Mendell et al., 2002; Chang et al., 2007a). Bien qu'étant déclenchés par le même signal (une mutation non-sens), les phénomènes de NAS et de NMD semblent donc être des mécanismes distincts mais non exclusifs.

Le NAS de type II a été également étudié par notre laboratoire, en analysant l'épissage alternatif des transcrits I $\gamma$ k porteurs de mutations non-sens. Ce NAS caractérisé par l'élimination de l'exon variable contenant le PTC est nettement plus marqué dans les lignées plasmocytaires par rapport aux lignées B. Ces données montrent que cet épissage alternatif par saut d'exon est favorisé par une forte activité transcriptionnelle (Chemin et al., 2010).





Ainsi, le NAS de type II est soumis aux mêmes règles que l'épissage conventionnel et est influencé par la vitesse d'élongation de l'ARNpol II (pour revue Shukla and Oberdoerffer, 2012).

### 8- Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)

Les gènes d'Ig et les TCR hébergent fréquemment des mutations non-sens suite à un décalage du cadre de lecture lors des recombinaisons V(D)J. Les transcrits matures provenant de ces allèles réarrangés de manière non-productive contiennent alors des PTC. De nombreuses études ont montré que ces ARNm, codant des récepteurs aberrants à l'antigène, sont éliminés par un mécanisme de dégradation appelé NMD (pour « *Nonsense-Mediated mRNA Decay* ») (pour revue Li and Wilkinson, 1998).

Le NMD est un acteur ubiquitaire majeur du contrôle qualité de l'expression génique. L'activation de ce mécanisme de dégradation des ARNm porteurs de PTC diminue la synthèse de protéines tronquées. Ce processus est impliqué dans un nombre important de maladies génétiques chez l'Homme puisque des mutations non-sens sont rencontrées fréquemment dans ces pathologies (environ 1/3 des cas) (Frischmeyer and Dietz, 1999; Khajavi et al., 2006; Bhuvanagiri et al., 2010; Nicholson et al., 2010). L'activation du NMD et la dégradation de l'ARNm contenant des PTC peut avoir un rôle protecteur si les transcrits éliminés codent des proto-oncogènes. Cependant, cette dégradation drastique peut également aggraver le phénotype de certaines maladies, comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), en éliminant les ARNm codant pour des protéines tronquées partiellement fonctionnelles (Holbrook et al., 2004; Khajavi et al., 2006).

#### i. Les acteurs essentiels du NMD

Des facteurs agissant en *trans* impliqués dans le processus du NMD ont été initialement identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (UPF1, UPF2 et UPF3) et chez *Caenorhabditis elegans* (SMG1, SMG5, SMG6 et SMG7 : SMG pour « *Suppressor of Morphological defects on Genitalia* ») (Culbertson et al., 1980; Hodgkin et al., 1989; Leeds et al., 1991; Pulak and Anderson, 1993; Cali et al., 1999; Grimson et al., 2004). Les orthologues humains ont été identifiés plus tard sur la base de similarité de séquences (Applequist et al., 1997; Lykke-Andersen et al., 2000; Denning et al., 2001; Yamashita et al., 2001; Anders et al., 2003; Chiu et al., 2003; Ohnishi et al., 2003).



### • Les protéines UPF

Les protéines UPF constituent le cœur de la machinerie du NMD, où UPF1 est considéré comme le facteur clé pour le mécanisme de NMD et est donc le facteur UPF le plus conservé entre les espèces (Culbertson and Leeds, 2003; Conti and Izaurralde, 2005). **UPF1** contient une phosphoprotéine avec une activité ATPase dépendante de l'ARN et une activité hélicase (Bhattacharya et al., 2000). En effet, une mutation (R844C) abolissant cette activité hélicase confère un dominant négatif d'UPF1 qui va inhiber l'activité NMD dans les cellules de mammifères (Sun et al., 1998). Bien qu'UPF1 soit principalement considérée comme une protéine cytoplasmique, il a été démontré qu'elle était capable de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau (Mendell et al., 2002). D'une façon similaire à UPF1, **UPF2** est une phosphoprotéine qui agit généralement comme un adaptateur moléculaire et fait le lien entre UPF1 et UPF3 (Kadlec et al., 2004; Kashima et al., 2006; Wittmann et al., 2006). **UPF3** est la moins conservée des protéines UPF. Les mammifères ont deux isoformes d'UPF3 issus d'un épissage alternatif appelés UPF3A et UPF3B (également connus sous le nom d'UPF3 et d'UPF3X chez l'homme), alors que *Saccharomyces cerevisiae* et *Caenorhabditis elegans* ont seulement un seul isoforme (Lykke-Andersen et al., 2000; Serin et al., 2001). Les deux protéines UPF3 sont caractérisées par la présence d'un domaine conservé RRM (pour « *RNA Recognition Motif* ») (Lykke-Andersen et al., 2000). Bien que ce type de domaine soit généralement impliqué dans liaison à l'ARN, il a été montré que les deux protéines UPF3A et UPF3B ne se lient pas directement à l'ARN (Kadlec et al., 2004). En revanche, ce domaine est responsable de leur interaction avec UPF2. En outre, UPF3 fait partie des composants du complexe EJC qui se dépose sur l'ARNm au cours de l'épissage (Le Hir et al., 2001a). Notamment, les domaines C-terminal d'UPF3A et UPF3B, qui sont impliqués dans l'assemblage du complexe contenant les protéines Y14 et Magoh de l'EJC (Gehring et al., 2003) sont divergents. Cette divergence explique la faible capacité d'UPF3A à déclencher le NMD, comparativement à UPF3B (Lykke-Andersen et al., 2000; Kunz et al., 2006).

Plusieurs observations indiquent que les protéines UPF1, UPF2 et UPF3 forment un complexe trimérique (Lykke-Andersen et al., 2000; Serin et al., 2001), et que l'association d'UPF2 et UPF3 à UPF1 stimule les activités ATPase et hélicase d'UPF1, déclenchant ainsi le processus de NMD (Chamieh et al., 2008). Notons que les protéines UPF montrent une distribution subcellulaire distincte. UPF1 est principalement localisé au niveau du cytoplasme, UPF2 est concentrée dans la région périnucléaire, tandis qu'UPF3 est majoritairement nucléaire mais peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Lykke-



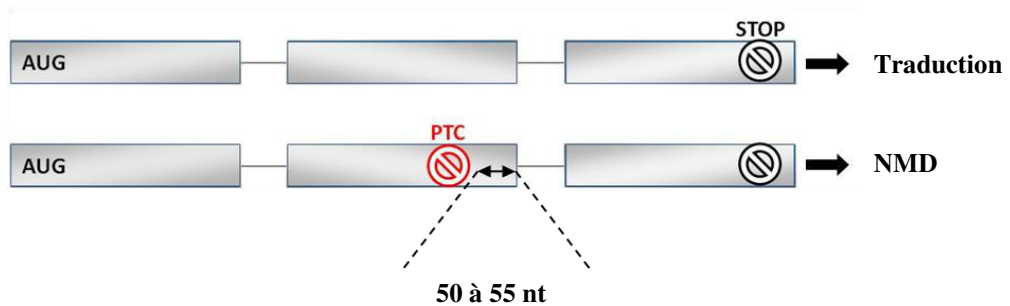
## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

Andersen et al., 2000; Mendell et al., 2000; Serin et al., 2001). Ces données suggèrent que les deux protéines UPF2 et UPF3 rejoignent l'EJC dans différents compartiments cellulaires : UPF3A/B est chargé sur l'ARNm dans le noyau au cours de l'épissage *via* l'interaction avec les composants de l'EJC ; UPF2 peut rejoindre le complexe après l'export vers le cytoplasme ; plus tard à la fin de la traduction, UPF1 semble être recrutée au niveau du complexe de terminaison où il se lie au complexe EJC associé aux facteurs du NMD, établissant la formation du complexe de surveillance qui induit le NMD (Lykke-Andersen et al., 2000). En outre, UPF1 est recrutée sur l'ARNm *via* l'interaction avec les protéines eRF (pour « *eucaryotic Release Factor* ») et fonctionne comme un pont moléculaire entre le ribosome et le complexe d'EJC associé aux UPF2 et UPF3, situé en aval (Kashima et al., 2006). Cette association participe à la formation d'un complexe actif de NMD responsable de la dégradation rapide de l'ARNm (Kashima et al., 2006; Chamieh et al., 2008). Récemment, il a été montré que durant l'apoptose, les deux facteurs UPF1 et UPF2 peuvent être clivés par des caspases. Ce clivage a pour conséquence une inhibition du NMD conduisant à la stabilisation des transcrits contenant des PTC (Jia et al., 2015).

### • Les protéines SMG

Selon les données obtenues sur les cellules humaines, le cycle de phosphorylation et de déphosphorylation d'UPF1, qui contribue au remodelage du complexe de surveillance de l'ARNm, est indispensable pour le déclenchement du NMD chez les mammifères (Ohnishi et al., 2003). La phosphorylation et la déphosphorylation des protéines UPF est médiée par les protéines SMG, dont la délétion inhibe le NMD (Cali et al., 1999; Chiu et al., 2003; Unterholzner and Izaurralde, 2004). Six protéines SMG ont été identifiées : SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8 et SMG9.

**SMG1** est une kinase qui catalyse la phosphorylation d'UPF1 (Denning et al., 2001; Yamashita et al., 2001; Grimson et al., 2004). En outre, **SMG5**, **SMG6** et **SMG7** sont des protéines non redondantes qui sont impliquées dans la déphosphorylation d'UPF1 (Anders et al., 2003; Chiu et al., 2003; Fukuhara et al., 2005). Ces protéines SMG ne sont pas des phosphatases mais sont capables de promouvoir la déphosphorylation d'UPF1 en recrutant des protéines phosphatases telles que PP2A (pour « *Phosphatase Protein 2A* »), considérée comme le facteur crucial impliqué dans la déphosphorylation d'UPF1 (Chiu et al., 2003; Ohnishi et al., 2003; Conti and Izaurralde, 2005). Deux protéines supplémentaires, **SMG8** et **SMG9**, ont également la capacité de se lier à SMG1 (Yamashita et al., 2009). Ces protéines



**Figure 31 : La dégradation par NMD dépend de la position des PTC.**

Pour qu'un ARNm soit pris en charge par le processus classique de NMD, les transcrits doivent présenter des PTC situés à plus de 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon. Ainsi, cette règle de position permet de définir si un ARNm contenant des PTC peut être considéré comme un substrat de NMD (*Extrait de Kuzmiak and Maquat, 2006*).

## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

suppriment l'activité de la kinase SMG1 et interviennent dans la mise en place du complexe d'induction du NMD nommé « **SURF** » au niveau du PTC. Ce complexe protéique contient les facteurs de NMD : SMG1, UPF1, et les facteurs eRF2 et eRF3 (Kashima et al., 2006; Yamashita et al., 2009). SMG8 semble également jouer un rôle important dans l'interaction entre le complexe SURF et l'EJC (Yamashita et al., 2009).

### ii. La règle du NMD

Une question clé dans le domaine du NMD consiste à savoir comment la cellule parvient à différencier un PTC d'un codon stop physiologique. Dans les cellules de mammifères, avant même l'identification du mécanisme moléculaire du NMD, plusieurs études ont mis en évidence la dépendance du NMD au processus d'épissage. Par la suite, il a été rapporté qu'afin de déclencher la dégradation des ARNm par NMD, le PTC doit être localisé à plus de 50 à 55 nucléotides (nt) en amont du dernier intron (Carter et al., 1996; Zhang and Maquat, 1996; Li and Wilkinson, 1998; Nagy and Maquat, 1998; Thermann et al., 1998; Zhang et al., 1998). Ces résultats ont démontré que la reconnaissance d'un PTC dépend de la définition de jonctions exon-exon, suggérant le rôle crucial de l'épissage de l'ARNm au cours du NMD des mammifères. Sur la base de ces observations, une règle générale pour l'identification du PTC déclenchant le NMD a été postulée : si le PTC est situé à plus de 50 à 55 nt en amont de la dernière jonction exon-exon, l'ARNm sera dégradé par NMD (**Figure 31**). Ceci explique le fait que les codons stop physiologiques situés dans le dernier exon sont peu sensibles au NMD (Maquat and Li, 2001). Cette règle de position est définie par la fixation du complexe EJC en amont (20-24 nucléotides) de chaque jonction exon-exon. Pour permettre une traduction active des ARNm, la première étape de lecture par le ribosome doit avoir déplacé tous les EJC présents sur le transcrit (Singh and Lykke-Andersen, 2003). A l'inverse, la rencontre prématurée d'un codon stop lors de cette étape de lecture recrute le complexe de terminaison de la traduction (eRF1, eRF3) et permet de former le complexe SURF. Cet arrêt de la traduction ne permet pas d'éliminer les complexes EJC situés en aval sur l'ARNm. L'interaction entre les membres des complexes EJC et SURF crée un nouveau complexe appelé **DECID** (pour « *Decay Inducing complex* ») et conduit au déclenchement du NMD (pour revue Maquat, 2004).

### iii. Rôle de l'EJC dans le NMD

Comme nous l'avons énoncé précédemment, la règle de position du PTC est due à la fixation d'un complexe protéique appelé EJC (pour « *Exon-junction Complex* ») à environ 20





## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

à 24 nt en amont de chaque jonction exon-exon, (Le Hir et al., 2000a, 2000b, 2001a). Le cœur de l'EJC comprend au moins quatre protéines essentielles conservées : MAGOH, Y14, eIF4AIII et MLN51. Ce complexe s'associe à l'ARNm dans le noyau et se déplace avec le mRNP (pour « *messenger RiboNucleoProtein particule* ») vers le cytoplasme (Bono et al., 2006). En outre, plus d'une douzaine de protéines ont été identifiées comme composants périphériques de l'EJC, y compris les facteurs liés à l'épissage RNPS1 (pour « *RNA-bindin Protein with Ser-rich domain 1* »), SRM 160, PININ et UAP56, également connu sous le nom de DDX39B, les protéines liées à l'export de l'ARNm ALY/REF et TAP, et les facteurs de localisation de l'ARNm (Tange et al., 2004; pour revue Le Hir et al., 2016). Comme l'EJC est une structure dynamique, ces facteurs supplémentaires pourraient s'associer avec l'ARNm d'une manière transitoire, par assemblage dans le noyau et dissociation lors de l'export de l'ARNm ou par fixation sur l'EJC lors du métabolisme de l'ARNm dans le cytoplasme (Le Hir et al., 2000a, 2000b, 2001a, 2001b; Palacios et al., 2004; Tange et al., 2004; Chang et al., 2007b). L'assemblage de l'EJC apparaît donc comme un processus séquentiel, coordonné par l'épissage et implique la formation d'un complexe primaire : le pré-EJC. Le pré-EJC contient le facteur eIF4AIII (pour « *eukaryotic translation Initiation Factor 4AIII* ») qui se fixe directement sur l'ARNm et sert d'ancre pour les autres composants de l'EJC (Shibuya et al., 2004) et un hétérodimère Y14 : MAGOH, qui lui est assemblé avant la ligature de l'exon et sert de plate-forme pour la fixation des composants périphériques de l'EJC (Gehring et al., 2009). Dans un ARNm normal, tous les EJC fixés vont être éliminés lors du premier tour de traduction (Dostie and Dreyfuss, 2002; Lejeune et al., 2002; Bono and Gehring, 2011). En revanche, la présence d'au moins un seul EJC situé en aval du PTC déclenche la dégradation rapide de l'ARNm par NMD (Nicholson and Mühlemann, 2010).

Le complexe d'EJC représente un « *nœud* » de régulations post-transcriptionnelles (pour revue Le Hir et al., 2016). En effet, il intervient au cours de la traduction, le transport de l'ARNm (Nott et al., 2004; Tange et al., 2004) et fournit également un lien direct entre l'épissage et le NMD. Plusieurs études ont montré que la délétion de MAGOH, MLN51 et eIF4AIII dans les cellules de mammifères perturbent le mécanisme de NMD (Gehring et al., 2003; Ferraiuolo et al., 2004; Palacios et al., 2004; Shibuya et al., 2004). L'EJC sert de site d'ancrage pour les facteurs de NMD *i.e.* UPF2 et UPF3 (Kim et al., 2001; Le Hir et al., 2001a; Tange et al., 2004). Un domaine conservé d'UPF3 va s'associer avec Y14 et cette interaction est essentielle pour le NMD. D'autre part, les protéines UPF2 et UPF3 vont former un pont moléculaire entre l'EJC et le complexe de terminaison de la traduction *via*

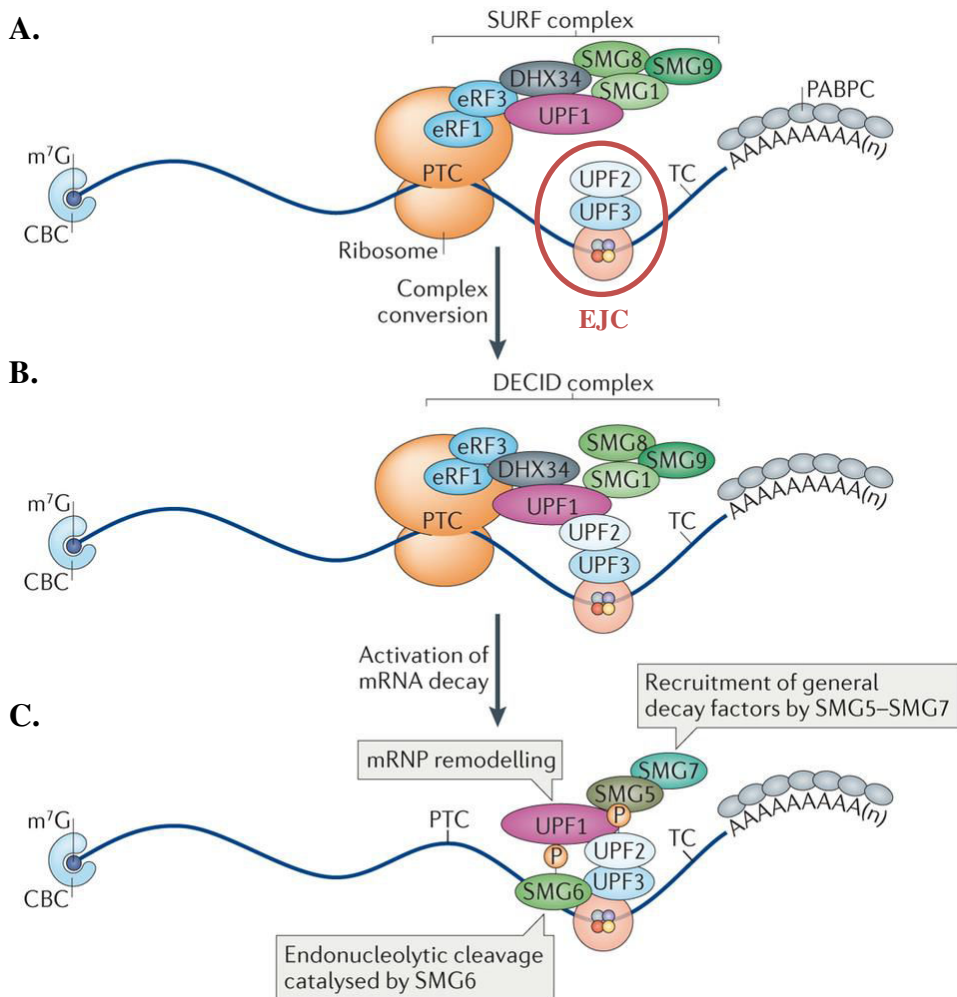


UPF1 (Gehring et al., 2003; Singh et al., 2007). Cette interaction est essentielle pour l'activité hélicase d'UPF1 et induit la formation du complexe SURF (Kashima et al., 2006; Chamieh et al., 2008).

### iv. Premier tour de traduction et déclenchement du NMD

Le mécanisme du NMD est dépendant de la première étape de lecture par le ribosome. Les drogues capables d'inhiber la traduction comme le cycloheximide (CHX) ou la puromycine vont donc constituer de puissants inhibiteurs de la dégradation des ARNm contenant un PTC (Belgrader et al., 1993; Carter et al., 1995). En outre, il a été proposé que la reconnaissance du PTC et l'activation du NMD auront lieu au cours du premier tour de la traduction (Ishigaki et al., 2001). A l'issue de cette primo-lecture de l'ARNm par le ribosome, la présence ou non de complexe EJC oriente le devenir de l'ARNm. En absence de PTC, l'hétérodimère CBP80:CBP20 fixé sur la coiffe 5' de l'ARN néosynthétisé est remplacé par eIF4E qui permet une synthèse protéique intense (Ishigaki et al., 2001; Maquat, 2004; Isken et al., 2008). A l'extrémité 3' de l'ARNm, la protéine PABPN1 (pour « *Poly (A)-Binding Protein Nuclear 1* ») qui se lie uniquement sur des ARNm fixés par CBP80 (pour « *Cap-Binding Protein* ») est alors remplacée par PABPC1 (pour « *Poly (A)-Binding Protein Cytoplasmic 1* ») qui a la capacité de se fixer à la fois sur les transcrits liés à CBP80 et à eIF4E (Chiu et al., 2004; Kashima et al., 2006). Si aucun PTC n'est rencontré, ce premier tour de la traduction favorise l'émergence d'ARNm, contenant eIF4E et PABC1, aptes à subir de multiples étapes de traduction (Sato and Maquat, 2009).

En revanche, la présence de PTC empêche ces modifications de l'ARNm. Plusieurs études indiquent que le mécanisme de NMD est déclenché uniquement sur les ARNm fixés par CBP80, indiquant que seuls les ARNm nouvellement synthétisés sont sensibles au NMD (Ishigaki et al., 2001; Chiu et al., 2004; Hosoda et al., 2005). De même, les ARNm liés à eIF4E sont insensibles au NMD (Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2002; Chiu et al., 2004; Hosoda et al., 2005). Les protéines CBP jouent donc un rôle essentiel au cours du NMD. La protéine CBP80 interagit directement avec le facteur clé du NMD : UPF1 et favorise également l'interaction entre UPF1 et UPF2 (Hosoda et al., 2005). Dans ce sens, les travaux de Maquat ont suggéré que l'interaction de CBP80 avec UPF1 favorise le NMD en deux étapes séquentielles (pour revue Hwang and Maquat, 2011). Tout d'abord, CBP80 semble stimuler l'association de SMG1-UPF1 avec eRF1-eRF3 au sein du PTC pour former le complexe protéique SURF. Dans un deuxième temps, CBP80 rejoint physiquement l'EJC



**Figure 32 : Mise en place du complexe de surveillance lors du NMD.**

**A.** Le premier tour de la traduction agit comme un *scanner* et permet de détecter la présence de codons stop prématurés (PTC) au niveau de l'ARNm. Dans ce cas, le ribosome reste bloqué sur le PTC et provoque la formation du complexe SURF (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3) avec SMG8-SMG9. L'EJC est situé en aval du complexe SURF et en amont du codon de terminaison normal (TC).

**B.** Le complexe SURF est remodelé pour former le complexe DECID dans lequel UPF1 interagit avec UPF2-UPF3. Cela déclenche la phosphorylation d'UPF1 par la kinase SMG1.

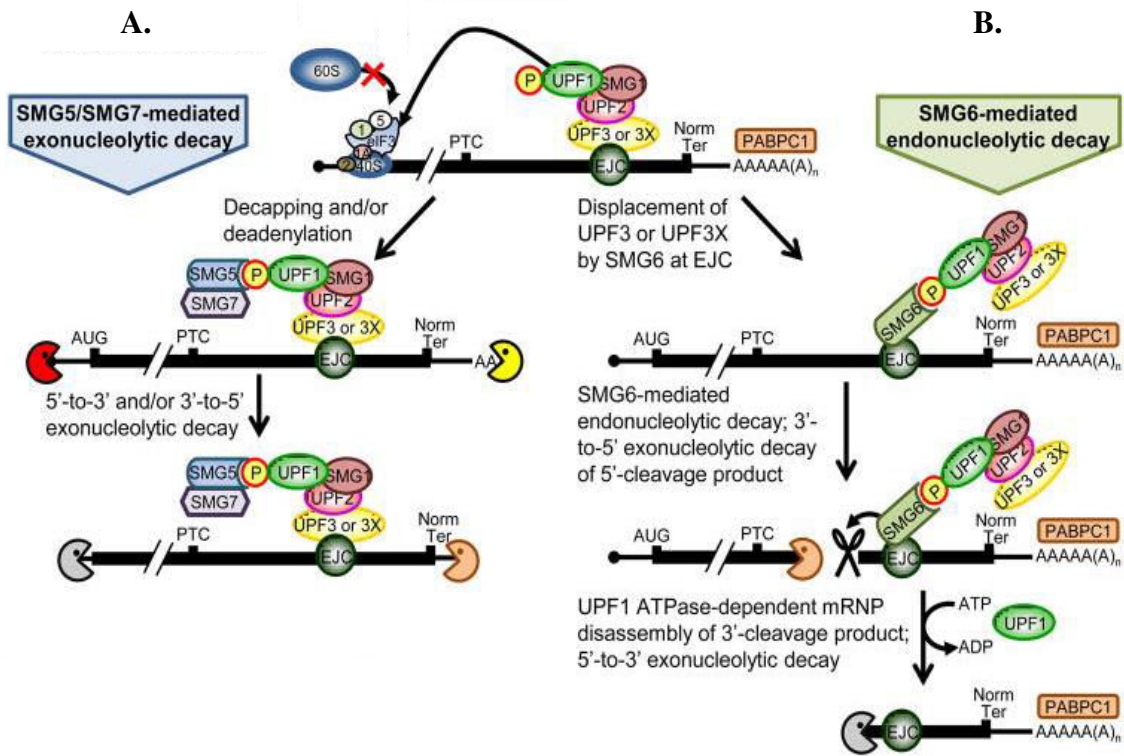
**C.** Par la suite, UPF1 est activé par UPF2. Cela conduit au remodelage des particules ribonucléoprotéiques (mRNP), et au recrutement de SMG6 et du complexe SMG5-SMG7 responsable de la dégradation endonucléolytique et exonucléolytique respectivement des transcrits contenant des PTC. CBC: Cap-Binding Complex; EJC: Exon Junction Complex; eRF: eukaryotic Release Factor; m<sup>7</sup>G: 7-methylGuanosine; PABPC: cytoplasmic poly(A)-binding protein (*Extrait de Le Hir et al., 2016*).

situé en aval tout en chaperonnant SMG1-UPF1, ce qui entraîne la phosphorylation d'UPF1 par SMG1. Cette phosphorylation d'UPF1 inhibe la traduction non-sens et favorise la dégradation rapide des ARNm par NMD (Behm-Ansmant and Izaurralde, 2006; Kashima et al., 2006; Isken et al., 2008). L'inhibition de la traduction est provoquée par la fixation d'UPF1 phosphorylé au niveau du facteur d'initiation de la traduction eIF3 empêchant ainsi la lecture par le ribosome (Isken et al., 2008). La phosphorylation d'UPF1 par SMG1 favorise également le remodelage du complexe de surveillance, essentiel pour rendre accessible les transcrits non-sens à la machinerie de dégradation par NMD (**Figure 32**) (Ohnishi et al., 2003; Behm-Ansmant and Izaurralde, 2006; Kashima et al., 2006). Ce remodelage impliquant la dissociation du complexe DECID (ribosome : SURF : EJC) est médiée par les cycles de phosphorylation et de déphosphorylation séquentiels d'UPF1. Une fois phosphorylé, UPF1 va interagir avec les facteurs SMG5, SMG6 et SMG7, responsables de sa déphosphorylation, essentiellement par le recrutement de la phosphatase PP2A (Anders et al., 2003; Chiu et al., 2003; Ohnishi et al., 2003; Kashima et al., 2006). Par conséquent, les cycles de phosphorylation/déphosphorylation d'UPF1, par SMG1 et PP2A respectivement, contribuent au recyclage du ribosome, des facteurs eRF et des acteurs du NMD. Ces étapes conduisent ensuite au recrutement des enzymes de déadénylation et de decapping (élimination de la coiffe), et à la dégradation de l'ARNm selon 2 voies : par des exonucléases 5'-3' et 3'-5' et par clivage endonucléolytique (**Figure 33**) (Lejeune et al., 2003; Unterholzner and Izaurralde, 2004; Glavan et al., 2006; Huntzinger et al., 2008; Eberle et al., 2009).

### v. Le NMD des transcrits d'Ig non-productifs

Le NMD joue un rôle crucial dans le maintien d'un répertoire fonctionnel de récepteurs d'Ig *via* la dégradation des transcrits non-productifs (Li and Wilkinson, 1998). Pour les chaînes lourdes d'Ig (IgH), les décalages du cadre de lecture lors des jonctions V, D et J entraîne l'apparition de PTC soit au niveau de l'exon VDJ, soit dans le premier exon codant le domaine constant (C<sub>H1</sub>). Dans les deux cas, les transcrits non-sens respectent la règle de position du PTC à plus de 50-55 nt de la dernière jonction exon-exon et peuvent être efficacement dégradés par un mécanisme de NMD conventionnel. Cette dégradation implique les mêmes étapes que celles décrites précédemment et permet d'éliminer la quasi-totalité (>95%) des ARNm IgH porteurs de PTC (Bühler et al., 2004; Tinguely et al., 2012).

Pour les gènes de chaînes légères, la jonction entre les segments V et J peut induire des décalages du cadre lecture et l'apparition de PTC soit dans le dernier exon codant le



**Figure 33 : Dégradation des transcrits contenant de PTC après phosphorylation d'UPF1.**

UPF1 phosphorylé se fixe sur eIF3 et réprime la traduction en inhibant la formation des ribosomes. Deux voies sont possibles:

**A.** La phosphorylation d'UPF1 permet le recrutement du complexe SMG5-SMG7, qui provoque la déadénylation et l'élimination de la coiffe « *decapping* », suivies respectivement par la dégradation de l'ARNm non sens par les exonucléases 5'-3' et 3'-5'.

**B.** Une voie alternative et/ou supplémentaire implique SMG6 qui entraîne un clivage endonucléolytique à proximité du PTC et génère deux fragments d'ARNm qui seront ensuite dégradés par des exonucléases (*Extrait de Hwang and Maquat 2011*).

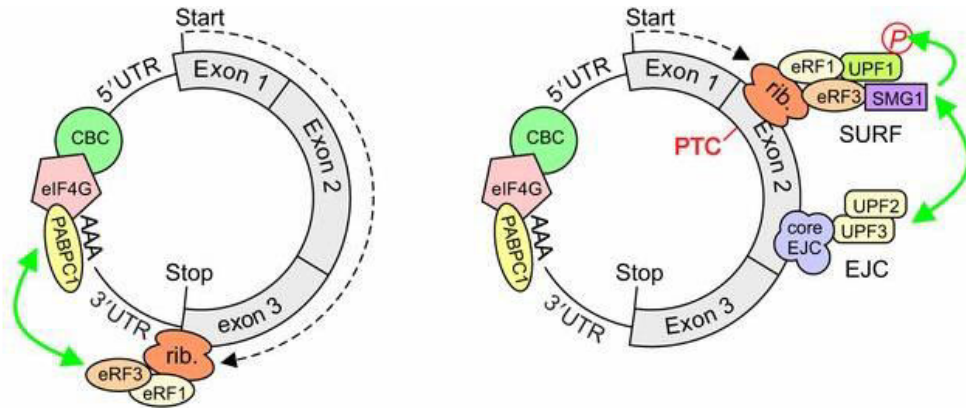
## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

domaine constant (C $\kappa$ ), soit trois nucleotides en amont de la dernière jonction exon-exon. Dans ces 2 cas, les PTC sont retrouvés en aval du dernier site de fixation de l'EJC sur l'ARNm et ne suivent pas la règle de position des PTC (50-55 nucleotides). Bien que ces transcrits ne permettent pas le déclenchement du mécanisme de NMD dépendant de l'EJC, nous avons montré qu'ils étaient dégradés par un mécanisme apparenté au NMD, dépendant également de la traduction protéique (Chemin et al., 2010; Delpy et al., 2004b). Néanmoins, leur dégradation s'avère moins efficace (environ 50%) que celle des transcrits non-sens IgH. Ces résultats soulignent l'existence d'une voie alternative du NMD qui ne repose pas sur les interactions des complexes SURF-EJC (Zhang et al., 1998; Bühler et al., 2006; Eberle et al., 2008; Singh et al., 2008). La dégradation des ARNm non-sens par ce type de NMD « EJC-indépendant » dépend de la synthèse protéique et repose sur des interactions entre le ribosome, les facteurs de terminaison de la traduction et les protéines associées à la queue poly (A) (Amrani et al., 2004, 2006). La distance physique entre un PTC et la queue poly (A) est un déterminant crucial pour l'activation du NMD EJC-indépendant. Dans ce sens, les travaux de Bühler ont montré que le rallongement de la partie 3'UTR d'un « minigène » d'Ig provoque la reconnaissance du codon stop normal comme un PTC et déclenche ainsi le NMD. A l'inverse, la dégradation des transcrits contenant des PTC peut être inhibée en ramenant la queue poly (A) au voisinage du PTC (Bühler et al., 2006; Eberle et al., 2008).

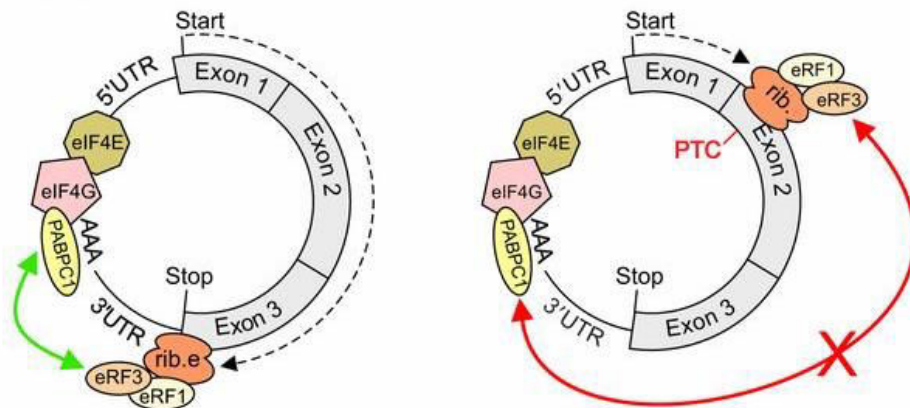
Au cœur du modèle de NMD EJC-indépendant, il y a une compétition cinétique entre PABPC1, eRF3 et UPF1 le facteur clé du NMD (Ivanov et al., 2008; Singh et al., 2008). En absence du PTC sur l'ARNm, la faible distance entre le codon stop normal et la queue poly (A) facilite les interactions entre eRF3 et PABPC1, aboutissant à la terminaison normale de la traduction (Hoshino et al., 1999; Cosson et al., 2002; Mangus et al., 2003). En revanche, l'apparition d'un PTC à une distance anormalement longue de la queue poly (A) empêche cette interaction (**Figure 34**). Dans ce cas, le ribosome reste bloqué au niveau du PTC et favorise les interactions entre UPF1 et eRF3 et la mise en place du complexe SURF. Par la suite, UPF1 va recruter d'autres acteurs du NMD comme UPF2 et UPF3 et permettre la dégradation de l'ARNm (Amrani et al., 2004, 2006; Nicholson et al., 2010). Par conséquent, si la distance entre eRF3 et la protéine PABPC1 fixée sur la queue poly (A) est importante, leur contact diminue et favorise les interactions entre eRF3 et UPF1. De même, l'absence de PABPC1 permet à UPF1 d'interagir facilement avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (Singh et al., 2008).



## A. Modèle EJC-dépendant



## B. Modèle EJC-Indépendant



**Figure 34 : Comparaison entre NMD EJC-dépendant et NMD EJC-indépendant.**

Les sites d'initiation et de terminaison de la traduction sont présentés et les flèches pointillées indiquent le sens du déplacement du ribosome lors de la traduction.

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

**A.** Lors du NMD EJC-dépendant, la présence d'un PTC exige le dépôt du complexe EJC 20 à 24 nt en amont de la jonction exon-exon. Cet EJC recrute les effecteurs de NMD: UPF2 et UPF3 et favorise la mise en place du complexe SURF. L'interaction EJC-SURF (flèche verte, schéma de droite) induit la phosphorylation d'UPF1 par SMG1, ce qui initie la dégradation des transcrits non-sens.

**B.** Lors du NMD EJC-indépendant, la distance anormalement longue entre le PTC et la queue poly(A) ne permet pas aux protéines PABPC d'interagir avec eRF3 et de transmettre le signal de terminaison (flèche rouge schéma de droite). Dans ce cas, le ribosome est bloqué au niveau du PTC permettant ainsi le recrutement d'UPF1 et SMG1, puis d'UPF2 et UPF3. Une fois le complexe de surveillance est mis en place, UPF1 est phosphorylée et la dégradation peut s'initier (*Extrait de Fang et al., 2013*).

## Chapitre 2- Mécanismes de surveillance des transcrits d'Ig

De nouvelles données obtenues par la technique de CLIP-seq (pour « *CrossLinking and ImmunoPrecipitation* ») ont montré que la fixation du complexe EJC au niveau de l'ARNm ne se fait pas toujours à des positions canoniques situées à ~ 24 nt en amont d'une jonction exon-exon. En effet, la protéine eIF4AIII située au cœur de l'EJC peut également se fixer à des positions non canoniques, à des distances variables en amont et en aval des jonctions d'épissages et notamment au niveau des séquences codantes CDS (pour « *coding sequences* »), 5' UTR et 3' UTR (Saulière et al., 2012).



## *Position du problème*

---

---



Le processus de recombinaison V(D)J des gènes d'Ig est caractérisé par une grande imprécision des jonctions codantes. Bien que cette imprécision permette d'augmenter la diversité des récepteurs à l'antigène, un décalage du cadre de lecture peut se produire dans deux tiers des cas et donner lieu à une jonction non productive ou « hors phase ». De ce fait, environ la moitié des cellules B en périphérie hébergent des réarrangements V(D)J « hors phase ». Plusieurs études ont montré que les deux allèles productifs et non-productifs sont activement transcrits (Delpy et al., 2004a; Daly et al., 2007; Eberle et al., 2009a; Tinguely et al., 2012; Holwerda et al., 2013). La transcription des allèles d'Ig non-productifs génère des transcrits non-sens codant potentiellement pour des chaînes tronquées. Néanmoins, ces ARNm contenant des codons non-sens (PTC pour « *Premature Termination Codon* ») sont efficacement pris en charge par un mécanisme de surveillance appelé NMD pour « *Nonsense-Mediated mRNA Decay* ». Ce mécanisme de dégradation prévient donc l'apparition d'Ig tronquées au cours de l'ontogénie B. En revanche, aucune étude n'a jusqu'ici analysé l'impact de l'épissage alternatif, et en particulier du phénomène de saut d'exon (« *exon-skipping* »), sur la production d'Ig tronquées, présentant des délétions internes du domaine variable (V).

Mon travail de thèse s'inscrit dans cette thématique et a permis d'étudier l'épissage alternatif des transcrits d'Ig et l'impact de ce mécanisme générateur d'Ig tronquées au cours du développement B. Ces travaux ont révélé la toxicité de chaînes d'Ig dépourvues de domaine variable dans les plasmocytes, et mis en évidence l'existence d'un nouveau point de contrôle permettant d'optimiser la production d'anticorps (Srouf et al., J Exp Med 2015 et Article 2 en préparation). A l'issue de cette étude, un brevet concernant une nouvelle approche thérapeutique par saut d'exon a été déposé (FR n° 1561252) dans le cadre du traitement de Myélome Multiple et d'autres cancers touchant le lignage B. Cette stratégie repose sur l'utilisation des oligonucléotides anti-sens (AON) dans le but de forcer le saut d'exon et donc la production d'Ig tronquées toxiques. Enfin, une autre étude a mis pour la première fois en évidence une boucle de régulation entre deux mécanismes de surveillance, agissant au niveau des ARNm (NMD) et au niveau protéique (réponse UPR). Cette coopération a pour effet de limiter la synthèse d'Ig tronquées (Article 3, en préparation).



## *Résultats*

---

---





## Résultats

- ✚ **Article 1. A plasma cell differentiation quality control ablates B-cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production**

Nivine Srour<sup>1</sup>, Guillaume Chemin<sup>1,\*</sup>, Aurélien Tinguely<sup>1,\*</sup>, Mohamad Omar Ashi<sup>1</sup>, Zéliha Oruc<sup>1</sup>, Sophie Péron<sup>1</sup>, Christophe Sirac<sup>1</sup>, Michel Cogné<sup>1,2,\*\*</sup> and Laurent Delpy<sup>1,\*\*</sup>

*The Journal of Experimental Medicine (JEM), 2015*

- ✚ **Article 2. Hypertranscription of Ig genes favors nonsense-associated exon skipping in plasma cells**

Nivine Srour<sup>1</sup>, Mohamad Omar Ashi<sup>1</sup>, Claire Carrion<sup>1</sup>, XXX, Christophe Sirac<sup>1</sup>, Michel Cogné<sup>1,2</sup> and Laurent Delpy<sup>1</sup>

*En préparation*

- ✚ **Brevet. Utilisation d'oligonucléotides antisens pour produire des Ig tronquées par saut d'exon pour le traitement de maladies impliquant des cellules de la lignée B**

*Demande prioritaire de brevet (FR n° 1561252), déposée le 23/11/2015*

- ✚ **Article 3. Crosstalk between unfolded protein response and nonsense-mediated mRNA decay in plasma cells**

Nivine Srour<sup>1</sup>, Mohamad Omar Ashi<sup>1</sup>, Estelle Troadec<sup>1</sup>, XXX, Christophe Sirac<sup>1</sup>, Michel Cogné<sup>1,2</sup> and Laurent Delpy<sup>1</sup>

*En préparation*



**Article 1. A plasma cell differentiation quality control ablates B-cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production**

**Nivine Srour**<sup>1</sup>, Guillaume Chemin<sup>1,\*</sup>, Aurélien Tinguely<sup>1,\*</sup>, Mohamad Omar Ashi<sup>1</sup>, Zéliha Oruc<sup>1</sup>, Sophie Péron<sup>1</sup>, Christophe Sirac<sup>1</sup>, Michel Cagné<sup>1,2,\*\*</sup> and Laurent Delpy<sup>1,\*\*</sup>

*The Journal of Experimental Medicine (JEM), 2015*

**Ces résultats ont fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées. Deux prix ont été gagnés lors de ces présentations :**

- ✓ Prix du meilleur Poster : 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Vienna, 2015, Septembre 6-9.
- ✓ Prix du meilleur Poster : 2<sup>ème</sup> Journée Institut GEIST, Limoges, 5 septembre 2014.

---

**Objectifs :**

La transcription des gènes d'Ig non-productifs, contenant un réarrangement V(D)J hors phase au niveau de l'exon variable, est fréquente et touche plus de la moitié des cellules B. La transcription de ces allèles « passagers » était supposée sans risque puisque l'activation du mécanisme de NMD permettait d'éviter la synthèse des Ig tronquées, en dégradant efficacement les ARNm d'Ig contenant des codons non-sens (PTC pour « *Premature Termination Codon* »). Par conséquent, l'impact que la transcription des allèles d'Ig non-productifs pourrait engendrer sur le développement lymphocytaire B n'avait jamais été étudié.

Néanmoins, une étude antérieure réalisée au sein de notre laboratoire avait montré qu'un épissage alternatif par saut d'exon entraînait l'élimination de l'exon variable des transcrits Igk contenant un PTC (Chemin et al., 2010). Le saut d'exon permettant d'éliminer le codon non-sens, la traduction active de ces transcrits alternatifs pourraient générer des chaînes d'Ig tronquées présentant une délétion du domaine variable. L'objectif principal de mon travail consistait à vérifier cette hypothèse en analysant l'impact des Ig tronquées codées par ces transcrits « courts » sur le développement lymphocytaire B. Pour mener à bien ce



projet, j'ai également étudié les mécanismes d'activation de ce saut d'exon apparenté au NAS et développé un nouveau modèle de souris.

### Méthodologie :

Dans un premier temps, nous avons utilisé des constructions plasmidiques mimant des réarrangements VJ $\kappa$ 5 en phase (productifs, sans PTC) et hors phase entraînant l'apparition de PTC au niveau de l'exon variable ( $V^{PTC}$ ) ou de l'exon constant ( $C^{PTC}$ ). Le locus Ig kappa (Ig $\kappa$ ) a été choisi comme un modèle simple d'étude composé seulement de trois exons: "Leader" (L), "Variable" (V) et "Constant" (C). Ces constructions ont été co-transfectées dans des lignées B matures (A20) et plasmocytaires (S194) et les transcrits alternatifs dépourvus de domaine V ( $\Delta V$ - $\kappa$ LC mRNA : *V domain-less  $\kappa$  light chain*) ont été détectés par RT-PCR. Ensuite, par les techniques de Western Blot et d'ELISA, nous avons pu détecter la présence de la protéine tronquée ( $\Delta V$ - $\kappa$ LC) dans les lysats cellulaires ou les surnageants de culture des lignées transfectées. La sensibilité à la mort de ces lignées traitées avec un inhibiteur du protéasome (MG132) a été analysée par des marquages Annexine V par la technique de cytométrie en flux.

D'autre part, le répertoire Ig $\kappa$  a été analysé dans des souris sauvages (C57BL/6) et des souris DH-LMP2A. Dans ce modèle, la protéine de l'Epstein-Bar Virus (EBV) mime le signal tonique du BCR et permet aux cellules B de se développer sans aucune chaîne IgH (Casola et al., 2004). Dans ces deux modèles, l'analyse des jonctions VJ $\kappa$ 5 productives et non-productives a été réalisée en déterminant la longueur du CDR3 par séquençage. Les PCR ont été faites à partir d'ADN génomique de différentes populations B triées (cellules B et plasmocytes), en utilisant un oligonucléotide sens V $\kappa$  consensus et un oligonucléotide anti-sens situé en aval du segment J $\kappa$ 5.

Afin d'étendre cette étude, nous avons créé un modèle murin knock-in (iTIE pour « *inducible Truncated Ig Exclusion* ») permettant une production inductible de chaînes légères Ig $\kappa$  tronquées, dépourvues de domaine variable. Ce nouveau modèle offre ainsi l'opportunité d'étudier l'effet de ces chaînes d'Ig aberrantes au cours du développement lymphocytaire B. Dans ce modèle, tous les segments J $\kappa$  ont été remplacés par une cassette contenant un exon leader humain placé sous le contrôle du promoteur pV<sub>H</sub> et un gène de



résistance à la néomycine ( $neo^R$ ) flanqué de deux sites *loxP*. La transcription du gène  $neo^R$ , en orientation opposée, permet de bloquer la transcription et/ou l'épissage de l'exon leader. Chez ces souris, le développement B a été analysé après croisement avec des souris exprimant la Cre recombinase pour éliminer le gène  $neo^R$ . La disparition du gène néo permet la transcription et l'épissage de l'exon C $\kappa$  favorisant ainsi la production des Ig tronquées de type  $\Delta V$ - $\kappa LC$ .

### Résultats:

*In vitro*, notre analyse a révélé un fort taux de transcrits alternatifs ( $\Delta V$ - $\kappa LC$  mRNA) dans les lignées transfectées avec les constructions  $V^{PTC}$  et un taux quasi-indétectable dans les lignées  $C^{PTC}$ . Ces données montrent que l'efficacité du NAS est influencée par la position du PTC, ce qui est plutôt en faveur d'un NAS dépendant du cadre de lecture. De plus, la quantification de ces transcrits a mis en évidence une efficacité du NAS nettement plus marquée dans les lignées plasmocytaires (S194) comparativement aux lignées B (A20), ce qui est en accord avec la forte intensité de transcription des gènes d'Ig au cours de la différenciation plasmocytaire. Nous avons également montré que les Ig tronquées, codées par les ARNm  $\Delta V$ - $\kappa LC$ , sont dégradées par le protéasome. De façon intéressante, les cellules exprimant des Ig tronquées sont très sensibles au traitement par un inhibiteur du protéasome (le MG132). En effet, les cellules transfectées par des constructions de type  $V^{PTC}$ , présentent un niveau d'apoptose supérieur à celui des cellules non transfectées (NT) ou exprimant les constructions  $C^{PTC}$ . Cette apoptose semble consécutive à un stress élevé au niveau du RE qui sensibilise les plasmocytes à l'apoptose dépendante de CHOP.

*In vivo*, l'analyse des jonctions VJ $\kappa 5$  a montré une disparition des plasmocytes hébergeant des réarrangements non-productifs de type  $V^{PTC}$  soulignant ainsi un effet toxique des Ig $\kappa$  tronquées. Pour analyser si les effets toxiques des chaînes légères tronquées sont dus à un défaut d'assemblage chaînes lourdes/chaînes légères, nous avons analysé ces jonctions VJ $\kappa 5$  dans le modèle DH-LMP2A n'exprimant pas de chaînes lourdes. Cette étude a révélé une fois encore une disparition sélective des plasmocytes porteurs de réarrangements  $V^{PTC}$ . Ainsi, nous avons mis en évidence que la toxicité est intrinsèque aux chaînes légères tronquées et qu'elle est indépendante de l'expression des chaînes lourdes. Comme expliqué dans l'introduction bibliographique de cette thèse, la survie des plasmocytes dépend de leur





capacité à surmonter le stress du RE suite à la synthèse massive d'Ig (Cenci et al., 2012). De ce fait, nous avons voulu montrer si les Ig tronquées pouvaient exercer un impact sur la survie des plasmocytes. A cette fin, nous avons montré que l'expression forcée des Ig tronquées dépourvues de domaine V ( $\Delta V$ - $\kappa LC$ ), par les plasmocytes des souris iTIE affecte la survie des plasmocytes normaux et la réponse humorale. L'expression de ces protéines aberrantes semble être associée à l'expression des marqueurs du stress du RE (*Chop*, *Herp*, *Bip*, *Xbp1s*) qui conduit à l'apoptose des plasmocytes. En outre, l'analyse BrdU au niveau de la moelle osseuse de ces souris montre que cette disparition sélective des PC touche principalement les plasmocytes à longue durée de vie, sécrétant de grandes quantités d'anticorps.

### **Conclusion:**

Nos résultats ont permis d'identifier un nouveau point de contrôle au cours du développement B que nous avons appelé TIE-checkpoint (*Truncated-Ig-Exclusion checkpoint*). Le TIE-checkpoint façonne le répertoire Ig $\kappa$  en sélectionnant négativement les plasmocytes exprimant des allèles Ig $\kappa$  non-productifs. La découverte de ce nouveau mécanisme conduisant à l'élimination des plasmocytes produisant des Ig tronquées a servi de base pour la conceptualisation d'une approche thérapeutique par saut d'exon dans le traitement du Myélome Multiple (*cf* Brevet).



# A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production

Nivine Srour,<sup>1</sup> Guillaume Chemin,<sup>1\*</sup> Aurélien Tinguely,<sup>1\*</sup> Mohamad Omar Ashi,<sup>1</sup> Zéliha Oruc,<sup>1</sup> Sophie Péron,<sup>1</sup> Christophe Sirac,<sup>1</sup> Michel Cogné,<sup>1,2\*\*</sup> and Laurent Delpy<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7276 and <sup>2</sup>Institut Universitaire de France, Université de Limoges, 87000 Limoges, France

**Aberrantly rearranged immunoglobulin (Ig) alleles are frequent. They are usually considered sterile and innocuous as a result of nonsense-mediated mRNA decay. However, alternative splicing can yield internally deleted proteins from such nonproductively V(D)J-rearranged loci. We show that nonsense codons from variable (V) Ig $\kappa$  exons promote exon-skipping and synthesis of V domain-less  $\kappa$  light chains ( $\Delta$ V- $\kappa$ LCs). Unexpectedly, such  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs inhibit plasma cell (PC) differentiation. Accordingly, in wild-type mice, rearrangements encoding  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs are rare in PCs, but frequent in B cells. Likewise, enforcing expression of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs impaired PC differentiation and antibody responses without disturbing germinal center reactions. In addition, PCs expressing  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs synthesize low levels of Ig and are mostly found among short-lived plasmablasts.  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs have intrinsic toxic effects in PCs unrelated to Ig assembly, but mediated by ER stress-associated apoptosis, making PCs producing  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs highly sensitive to proteasome inhibitors. Altogether, these findings demonstrate a quality control checkpoint blunting terminal PC differentiation by eliminating those cells expressing nonfunctionally rearranged Ig $\kappa$  alleles. This truncated Ig exclusion (TIE) checkpoint ablates PC clones with  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs production and exacerbated ER stress response. The TIE checkpoint thus mediates selection of long-lived PCs with limited ER stress supporting high Ig secretion, but with a cost in terms of antigen-independent narrowing of the repertoire.**

During early B cell maturation, Ig loci undergo programmed DNA rearrangements of germline V (variable), D (diversity), and J (joining) gene segments. This error-prone program generates random V(D)J junctions and a diversified primary antibody repertoire (Jung et al., 2006). Functional Ig heavy (H) and light (L) chains are controlled at the stages of pre-B cell receptor (preBCR) and BCR expression, respectively (Melchers et al., 2000). These early checkpoints ensure expansion of B cells expressing functional Ig chains, while limiting the development of autoreactive clones (Rajewsky, 1996). Once positively selected, immature B cells transit to the periphery and join the mature B cell pool. Upon antigen (Ag) stimulation, germinal center (GC) B cells diversify their receptors through activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation (SHM) and class-switch recombination (CSR; Manis et al., 2002; Pavri and Nussen-

weig, 2011; Andrews et al., 2013). Self-reactive clones are also tightly controlled in mature and GC B cells, and BCR-signal strength regulates these late tolerance checkpoints, eventually leading to anergy or elimination of B cells (Allen et al., 2007; Victoria and Nussenzweig, 2012). Our group has recently demonstrated that a recombination by IgH locus suicide recombination (LSR) participates actively in the late elimination of GC B cells (Péron et al., 2012). Cells that survive negative selection further differentiate into either memory B cells or plasma cells (PCs) secreting high-affinity antibodies. PCs are antibody-producing factories in which a massive expansion of the endoplasmic reticulum (ER), together with elevated production of chaperone proteins such as GRP78/BiP (glucose-regulated protein 78 kD/binding immunoglobulin protein), ensures proper folding and secretion of large amounts of Ig (Gass et al., 2002; Ron and Walter, 2007; Todd et al., 2009). Major transcriptional changes accompany PC differentiation, including a boost of Ig gene expression and modification of their splicing pattern, from membrane-type toward secretory-type Ig mRNAs (Santos et al., 2011).

Random nucleotide additions or deletions at V(D)J junctions inherently yield frameshifts and premature stop codons in two thirds of cases (Jung et al., 2006). When a nonproductive

\*G. Chemin and A. Tinguely contributed equally to this paper.

\*\*M. Cogné and L. Delpy contributed equally to this paper.

Correspondence to Laurent Delpy: laurent.delpy@unilim.fr; or Michel Cogné: michel.cogne@unilim.fr

Abbreviations used: Ag, antigen; AID, activation-induced cytidine deaminase; AS, alternative splicing; CHOP, C/EBP homologous protein; CSR, class-switch recombination;  $\Delta$ V- $\kappa$ LC, variable domain-less Ig $\kappa$  light chain; ER, endoplasmic reticulum; GC, germinal center;  $\kappa$ LC, Ig $\kappa$  light chain; LSR, locus suicide recombination; NAS, nonsense-associated altered splicing; NMD, nonsense-mediated mRNA decay; PC, plasma cell; PI, proteasome inhibitor; PTC, premature termination codon; SHM, somatic hypermutation; TIE, truncated Ig exclusion.

© 2016 Srour et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

V(D)J junction first affects one Ig allele, the second allele can still productively rearrange and support B cell maturation. Such biallelic V(D)J rearrangements, including a nonproductive allele, are retrieved in ~40–50% of B lymphocytes (Mostoslavsky et al., 2004; Daly et al., 2007). It is now well accepted that nonproductive Ig alleles are actively transcribed during B cell development (Singh et al., 2003; Delpy et al., 2004a,b; Daly et al., 2007; Eberle et al., 2009; Tinguely et al., 2012; Holwerda et al., 2013). The nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway ensures efficient degradation of the resulting Ig mRNAs harboring premature termination codons (PTCs), and hence limits the production of truncated Ig with C-terminal deletions (Li and Wilkinson, 1998). NMD likely protects lymphoid cells from adverse effects of aberrant Ig transcripts. Indeed, disruption of lymphocyte development was observed upon either expression of an UPF1 (up-frameshift protein 1) dominant-negative isoform (Frischmeyer-Guerrero et al., 2011) or conditional deletion of *Upf2* (Weischenfeldt et al., 2008), two major NMD actors. In addition, Lutz et al. (2011) observed that the persistence of nonsense  $\mu$ H mRNAs escaping effective NMD degradation impairs pro-B cell differentiation.

Abnormal RNA splicing is elicited upon recognition of nonsense mutations by the RNA surveillance machinery, leading to the accumulation of unspliced PTC-containing premRNAs or to the appearance of alternatively spliced mRNAs (Valentine, 1998; Maquat, 2002; Lejeune and Maquat, 2005). Several studies, including ours, have documented that in addition to NMD, nonproductive Ig transcripts are surveyed by the cooperative action of splicing inhibition and nonsense-associated altered splicing (NAS; Aoufouchi et al., 1996; Mühlemann et al., 2001; Bühler and Mühlemann, 2005; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). Unlike NMD, which prevents the translation of prematurely terminated Ig polypeptides, nothing is known about the consequence of NAS and exon skipping with regard to the production of mRNAs and proteins with internal deletions. Production of shortened Ig chains and exon skipping occurs in pathologies such as heavy chain diseases and monoclonal Ig deposition diseases (Cogné et al., 1988, 1992). In contrast, truncated Ig chains have never been documented in normal B cells, and whether aberrant Ig transcripts from excluded alleles end up with aberrant peptides is an open question. To address this issue during B cell development and PC differentiation, we analyzed the splicing pattern of Ig $\kappa$  transcripts. These simplest RNA molecules include only three exons: leader (L), variable (V), and constant (C). We found that the presence of nonsense codons within the V exon modified the splicing of Ig $\kappa$  transcripts and strongly enhanced exon skipping. Interestingly, the production of V domain-less  $\kappa$  light chains ( $\Delta$ V- $\kappa$ LCs) exacerbated the ER stress response and severely impaired PC differentiation. Thus, the transcription of nonproductively rearranged Ig alleles can be detrimental at some differentiation stages. Collectively, these findings reveal a late quality control process dedicated to truncated Ig exclusion (TIE). This TIE checkpoint blunts ~20–25% of terminally differentiated PCs

by eliminating in an Ag-independent manner half of those 40–50% cells with biallelic rearrangements of Ig $\kappa$  alleles.

## RESULTS

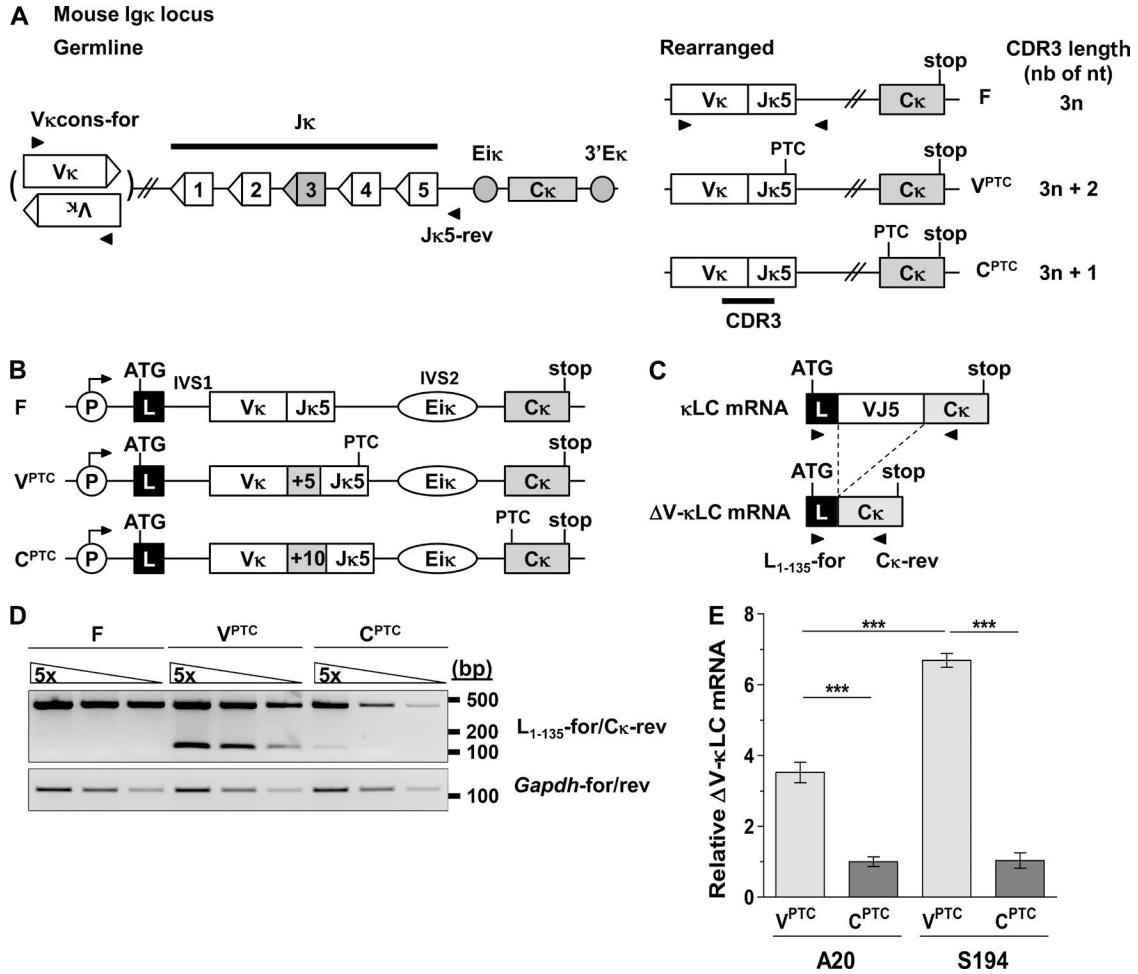
### Nonsense codons located within V regions enhance exon skipping of Ig $\kappa$ transcripts

We previously showed in normal B lineage cells that upon skipping of some noncoding V exons, so called excluded alleles often yield shortened  $\kappa$  mRNAs which would translate into  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs (Chemin et al., 2010). Observing such shortened mRNAs is surprising because the production of truncated Ig is usually considered a specific feature of some lymphoproliferative diseases (Cogné et al., 1992). To extend this study, we further analyzed the conditions of exon skipping, checked whether shortened Ig $\kappa$  transcripts were translated into  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs, and addressed whether the latter affects B cell differentiation. Out-of-frame V $\kappa$ -to-J $\kappa$  rearrangements result in nonsense codons affecting either the 3'-end of the V exon ( $V^{PTC}$ ) or the C exon ( $C^{PTC}$ ; Delpy et al., 2004a; Fig. 1 A). We compared  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNA levels in cell lines transfected with constructs mimicking nonproductive V $\kappa$ J $\kappa$ 5 rearrangements from both the  $V^{PTC}$  and the  $C^{PTC}$  class (Fig. 1, B and C). This revealed high  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs in  $V^{PTC}$ -expressing cells, whereas such transcripts were barely detectable in  $C^{PTC}$ -expressing cells and absent in cell lines expressing productive Ig $\kappa$  genes (Fig. 1 D).  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNA levels were quantified using capillary electrophoresis after normalization to the amount of productive  $\kappa$ LC mRNAs, as previously described (Chemin et al., 2010). Compared with  $C^{PTC}$ -expressing cells,  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs were ~3.5- and 6.7-fold higher in  $V^{PTC}$ -expressing B (A20) and PC (S194) lines, respectively (Fig. 1 E). Hence, skipping of the V exon occurs mostly when this exon itself carries the PTC, and with an efficiency approximately two times higher in PCs than in B cells.

### Exacerbated ER stress response in PCs expressing $\Delta$ V- $\kappa$ LCs

Next, we checked whether  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs were indeed translated into ofV domain-less truncated Ig, thus expected to mostly show up in  $V^{PTC}$ -expressing PCs. Consistent with data in Fig. 1, complete  $\kappa$ LCs (~25 kD) and truncated  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs (~12 kD) were detected in cells transfected with productive and  $V^{PTC}$  constructs, respectively (Fig. 2 A). In contrast, no  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs (or a background level similar to nonsecretory Sp2/0 cells) was observed in untreated  $C^{PTC}$ -expressing cells (Fig. 2 A). We further explored whether  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs were routed toward proteasomal degradation. In  $V^{PTC}$ -expressing cells, treatment with MG132 induced an approximately two- to four-fold increase of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs in cell pellets and culture supernatants, respectively (Fig. 2, A and B). In contrast in  $C^{PTC}$ -expressing cells, very low amounts of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs were found in cell pellets, and only upon treatment with MG132 (Fig. 2 A). For controls, no major changes were observed for complete  $\kappa$ LCs (Fig. 2, A and B).

The survival of PCs depends on their ability to alleviate the ER stress response associated with massive Ig synthesis



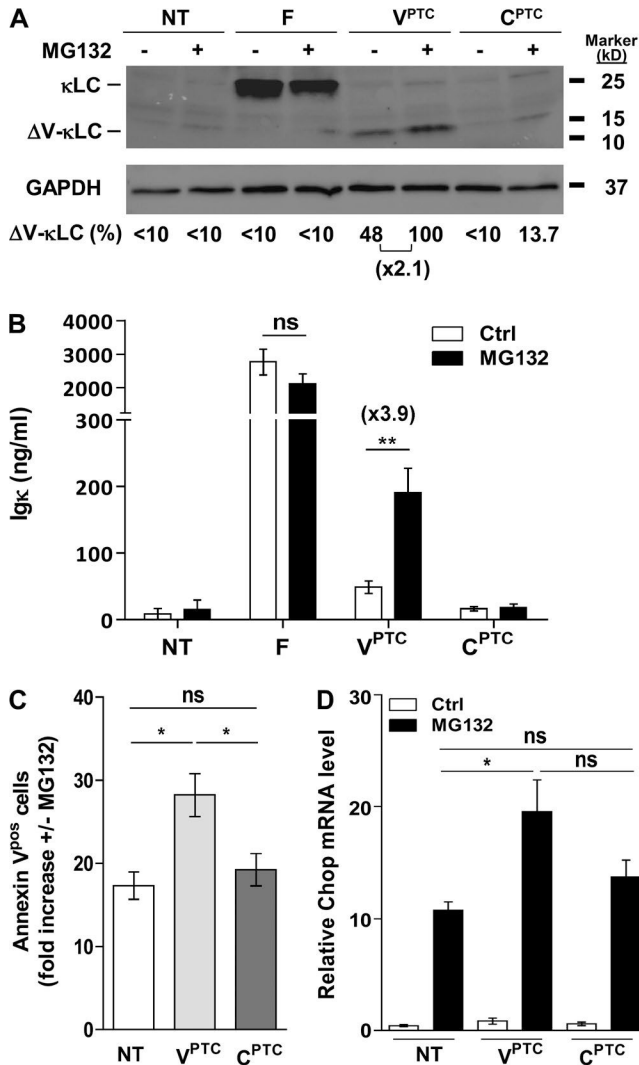
**Figure 1. Alternative splicing of nonproductive Igκ transcripts in B cell and plasma cell lines.** (A, left) Mouse Igκ locus showing V<sub>κ</sub> segments (in normal and inverse orientations), the four functional J<sub>κ</sub> segments, the intronic κ enhancer (E<sub>ικ</sub>), and the constant C<sub>κ</sub> exon. (right) In-frame (F) and out-of-frame (V<sup>PTC</sup> and C<sup>PTC</sup>) V<sub>κ</sub>J<sub>κ</sub>5 junctions are depicted, and the position of normal stop codons (stop) and PTCs are shown. Primers used are indicated (black arrows). (B) Representation of in-frame (F), V<sup>PTC</sup>, and C<sup>PTC</sup> mini-gene constructs. Out-of-frame junctions were created by inserting 5 nt (V<sup>PTC</sup>) or 10 nt (C<sup>PTC</sup>) at V<sub>κ</sub>J<sub>κ</sub>5 junctions. (C) RT-PCR was performed using L<sub>1-135</sub>-for/C<sub>κ</sub>-rev primers to identify full-length (κLC) and alternatively spliced (ΔV-κLC) mRNAs simultaneously. (D) Semiquantitative RT-PCR analysis of S194 cell lines transfected with F, V<sup>PTC</sup>, and C<sup>PTC</sup> constructs. (E) A20 (mature B) and S194 (PC) cell lines were cotransfected with F and either V<sup>PTC</sup> or C<sup>PTC</sup> constructs (A20-F+V<sup>PTC</sup>, n = 9; A20-F+C<sup>PTC</sup>, n = 5; S194-F+V<sup>PTC</sup>, n = 6; S194-F+C<sup>PTC</sup>, n = 5). Relative ΔV-κLC mRNA levels were quantified using capillary electrophoresis by dividing areas of peaks corresponding to ΔV-κLC mRNAs to those of control functional (F) κLC mRNAs (ΔV-κLC/F ratios) as previously described (Chemin et al., 2010); part of these data (A20-F+V<sup>PTC</sup>, n = 4; S194-F+V<sup>PTC</sup>, n = 3) comes from this previous study. Data are representative of at least three independent experiments (n = 5–9). Bars represent mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*\*\*, P < 0.001.

(Cenci et al., 2011). PC survival might thus be impacted by the production of proteins with abnormal structures and folding. To address this issue, we analyzed the apoptotic index of S194 PCs with regard to the abundance of ΔV-κLCs. Interestingly, V<sup>PTC</sup>-expressing cells exhibit higher apoptosis than nontransfected and C<sup>PTC</sup>-expressing cells, upon treatment with MG132 (Fig. 2 C). In addition, mRNA levels of *C/EBP homologous protein (Chop)*, a transcription factor involved in ER-stress induced apoptosis (Obeng et al., 2006), were approximately two-fold higher in V<sup>PTC</sup>-expressing cells than in nontransfected cells upon treatment with MG132 (Fig. 2 D).

As expected, *Chop* expression in C<sup>PTC</sup>-expressing cells was intermediate, in between nontransfected and V<sup>PTC</sup>-expressing cells (Fig. 2 D). Therefore, the presence of ΔV-κLCs likely provokes excessive ER-stress that sensitizes plasma cells to CHOP-dependent apoptosis upon proteasome inhibition.

**A TIE checkpoint counterselects those PCs expressing V<sup>PTC</sup>-rearranged Igκ alleles**

Differential sensitivity to apoptosis can hardly be followed in vivo due to immediate phagocytosis of apoptotic cells. However, such differences would be expected to result in a bias in



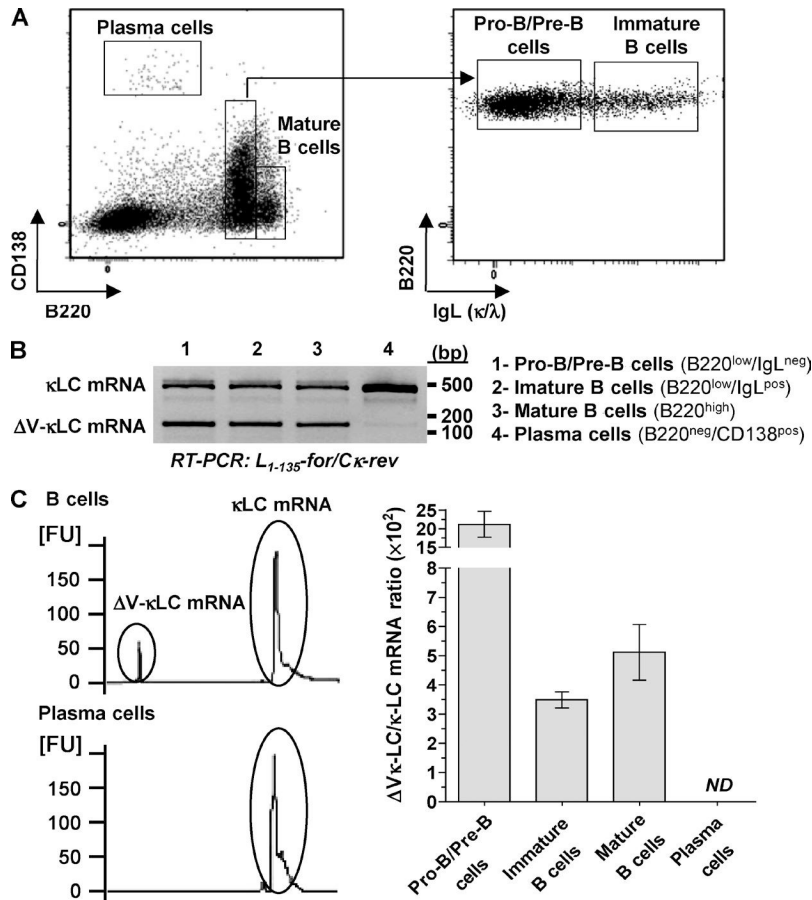
**Figure 2. Production of truncated Ig and exacerbated ER stress response in V<sup>PTC</sup>-expressing cells lines.** Sp2/0 (hybridoma) clones isolated after transfection with F ( $n = 5$ ), V<sup>PTC</sup> ( $n = 6$ ), or C<sup>PTC</sup> ( $n = 5$ ) constructs were treated or not with MG132 (1  $\mu$ M, 8 h). Complete  $\kappa$ LCs (25 kD) and truncated  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs (12 kD) were assessed by Western blot (A) and ELISA (B) on cell pellets and culture supernatants, respectively. (A) A representative experiment from a pool of four clones per group is shown. (B) ELISA assays were performed in all transfected cells using anti-Ig $\kappa$  Abs. (C) Annexin V staining was performed in S194 cells either nontransfected (NT) or transfected with V<sup>PTC</sup> ( $n = 9$ ) and C<sup>PTC</sup> ( $n = 6$ ) constructs, and treated or not with MG132 (1  $\mu$ M, 5 h). (D) In those cells, *Chop* mRNA levels were assessed by Q-PCR. Data are representative of two (A and B) or three (C and D) independent experiments ( $n = 5$ –9). Bars represent mean expression  $\pm$  SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

the selection of terminally differentiated cells, thus providing indirect arguments for a TIE checkpoint. To address this issue, we analyzed the Ig $\kappa$  repertoire at the DNA level in B cells and PCs from WT animals. We determined CDR3 lengths and distinguished in-frame (F or VJ<sup>+</sup>)V<sup>PTC</sup> and C<sup>PTC</sup>V $\kappa$ J $\kappa$  junctions

(Fig. 1 A). In agreement with previous works (Chen et al., 1993; Ehlich et al., 1993; Novobrantseva et al., 1999; Bertocci et al., 2003; Delpy et al., 2004a), V $\kappa$ J $\kappa$ 5 junctions were readily detectable in precursor B cells that did not express a BCR (pro-B/pre-B cells: B220<sup>lo</sup>/IgL<sup>neg</sup>). As expected, numerous (~66.6%) out-of-frame junctions were retrieved in the absence of BCR-mediated selection, with an equivalent repartition of V<sup>PTC</sup> and C<sup>PTC</sup> subclasses (Table 1). In contrast, the percentage of F junctions was much higher in GC B cells (B220<sup>hi</sup>/PNA<sup>hi</sup>) having been selected for functional BCR expression, with a reciprocal fall of V<sup>PTC</sup> and C<sup>PTC</sup> subclasses (Table 1). Unexpectedly, the frequency of V<sup>PTC</sup> junctions still more drastically decreased in PCs (B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup>; approximately nine-fold lower than GC B cells;  $P < 0.01$ ), whereas that of C<sup>PTC</sup> junctions was unchanged (Table 1). Next, we addressed whether the disappearance of PCs harboring V<sup>PTC</sup>-rearranged Ig $\kappa$  alleles prone to exon-skipping correlated with a decrease in  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs.  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNA levels were analyzed by RT-PCR in sorted B cell populations and PCs (Fig. 3 A). Although, a short band corresponding to  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs was readily detectable in B cell populations, these alternative transcripts were not retrieved in PCs (Fig. 3, B and C). The complete loss of  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs in PCs was consistent with the drastic disappearance of V<sup>PTC</sup> junctions in their repertoire. Altogether, the selective elimination of PCs with biallelic Ig $\kappa$  rearrangements in VJ<sup>+</sup>/V<sup>PTC</sup> configuration, likely reflects toxic effects of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs. This suggests that, independently of B cell functionality and specificity for antigen, a late TIE checkpoint counterselects B lineage cells producing aberrant Ig and prevents their survival as terminally differentiated PCs.

#### Impaired PC differentiation upon inducible expression of $\Delta$ V- $\kappa$ LCs

According to previous observations showing that ~40–50% of B lymphocytes exhibit biallelic V(D)J rearrangements of Ig genes (Mostoslavsky et al., 2004; Daly et al., 2007), approximately half of these B cell clones (~20–25%), i.e., those harboring V<sup>PTC</sup>-rearranged Ig $\kappa$  alleles, are candidates for an Ag-independent TIE checkpoint, eventually leading to their elimination at the step of PC differentiation. However, the rarity of V<sup>PTC</sup> junctions in PCs at the DNA level is only an indirect proof that cells go through such a checkpoint. To directly address the impact of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs on late B cell development and on humoral responses, we created Ig $\kappa$  knock-in mice allowing inducible expression of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs in B lineage cells (Fig. 4 A). In these mutants, later referred as inducible TIE (iTIE) mice, the replacement of endogenous J $\kappa$  segments by a leader exon (L<sub>1-33</sub>) under the control of a pV<sub>H</sub> promoter led to enforced expression of  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs and proteins. Conditional Cre-mediated expression of  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNAs was achieved by inserting a loxP-flanked neomycin-resistance (NeoR) cassette that blocks transcription and splicing of the L<sub>1-33</sub> exon (Fig. 4 A). In heterozygous (iTIE/+ ) animals, the WT allele (+) supports normal Ig $\kappa$  expression during B



**Figure 3. Exon skipping of Ig $\kappa$  transcripts occurs in normal B cells but not in PCs.** (A) Primary B and plasma cells were isolated from bone marrow and sorted after staining with anti-B220, anti-IgL ( $\kappa$  and  $\lambda$ ), and anti-CD138 mAbs. Representative dot plots and gates used for cell sorting are depicted. The purity of sorted populations was always >90%. (B) RT-PCR was performed using  $L_{1-135}$  forward and constant  $C\kappa$  reverse primers to analyze both full-length  $\kappa$ LC and  $\Delta V$ - $\kappa$ LC mRNA levels in sorted cell populations. One representative experiment is shown. (C) Quantification of amplification products was done using an Agilent Bioanalyzer (left).  $\Delta V$ - $\kappa$ LC/ $\kappa$ LC mRNA ratios were determined for each sorted populations ( $n = 3$ ; right). FU, fluorescence unit. Bars represent mean expression  $\pm$  SEM. Data are representative of three independent experiments using a pool of two B6 mice per experiment.

cell development, whereas the knock-in (iTIE) allele allows Cre-dependent expression of  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs. After mating iTIE/+ mice with a CMV-Cre-expressing strain, high  $\Delta V$ - $\kappa$ LC mRNA levels and significant truncated Ig synthesis were observed in Cre-positive ( $Cre^{pos}$ ) B lineage cells, with no major leakiness in Cre-negative ( $Cre^{neg}$ ) controls (Fig. 4 B). In agreement with the aforementioned data from transfected cells (Fig. 2),  $\Delta V$ - $\kappa$ LC amounts increased after treatment with the proteasome inhibitor bortezomib (Bz; Fig. 4 B). Interestingly, these knock-in mice mimic the outcome of the physiological TIE checkpoint, as the production of  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs severely impairs PC differentiation without perturbing B cell development and GC formation (Fig. 4, C and D). In controls,

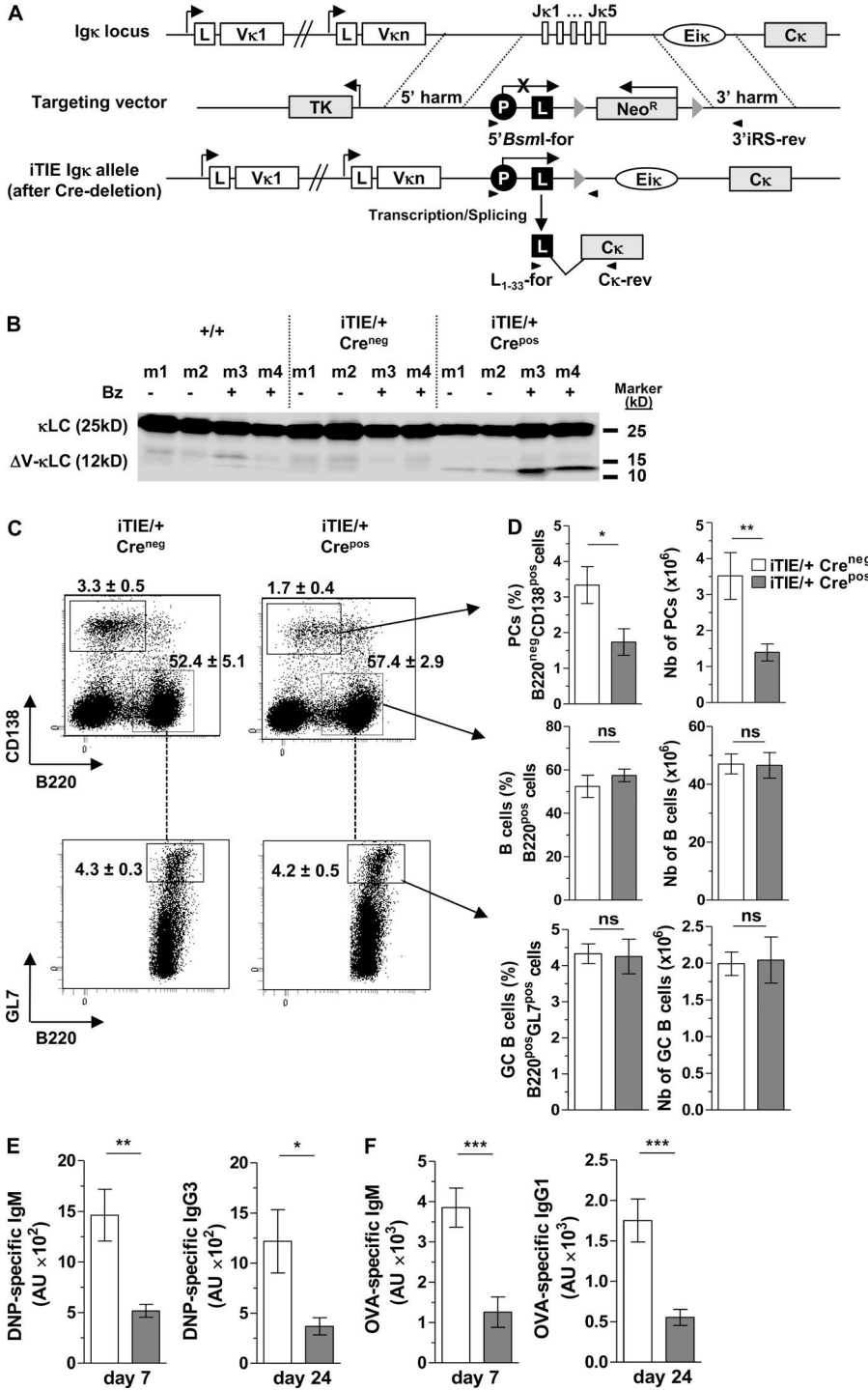
the sole expression of Cre-recombinase affected neither total  $B220^{pos}$  and GC B cells nor PCs (unpublished data). Consistent with a global defect in PC differentiation,  $Cre^{pos}$  iTIE/+ mice exhibited significantly lower T cell-independent and T cell-dependent antibody responses than  $Cre^{neg}$  iTIE/+ controls (Fig. 4, E and F). These findings were further confirmed in competitive experiments mimicking the occurrence of the TIE checkpoint during late B cell differentiation and in only a fraction of terminally differentiated PCs. For that, we analyzed B cell and PC contents after mating iTIE mice with AID-Cre-EYFP mice, allowing conditional Cre-recombinase expression in GC B cells upon treatment with tamoxifen (Dogana et al., 2009). We found significantly lower amounts of

**Table 1. Analysis of productive and nonproductive V $\kappa$ J $\kappa$ 5 junctions in B and plasma cells from WT mice**

Cell type	Total	In-frame	V <sup>PTC</sup>	C <sup>PTC</sup>
	<i>n</i>	%	%	%
Pro-B/pre-B cells	51	33.3	31.4	35.3
GC B cells	53	60.4	18.9	20.7
Plasma cells	47	72.3	2.1	25.5

Pro-B/pre-B cells ( $B220^{low}/IgL^{neg}$ ) and PCs ( $B220^{neg}/CD138^{pos}$ ) were isolated from bone marrow and GC B cells ( $B220^{hi}/PNA^{hi}$ ) from Peyer's patches, and PCRs were performed on genomic DNA using V $\kappa$ cons-for/J $\kappa$ 5-rev primers (Fig. 1 A). Productive V $\kappa$ J $\kappa$ 5 junctions were assigned as in-frame and nonproductive junctions as V<sup>PTC</sup> and C<sup>PTC</sup>. Data are from two independent cell sorting experiments. *n* = total number of sequences.





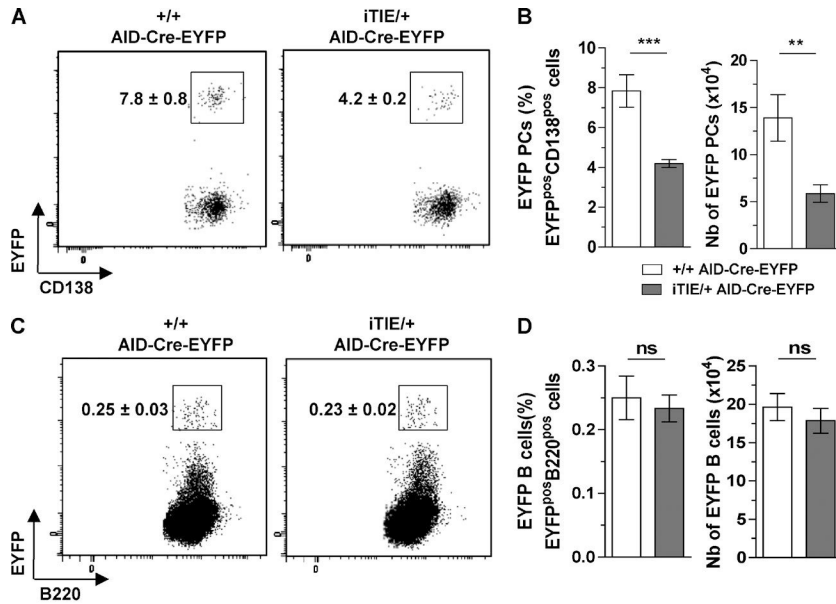
**Figure 4. Altered plasma cell differentiation and antibody responses in model mice reproducing the TIE checkpoint.** (A) Gene targeting strategy. Map of the Igκ locus in germline configuration (top), after Jκ replacement (middle), and Cre-mediated recombination of the loxP-flanked *hsvTK-Neo<sup>R</sup>* cassette (bottom). (B) Western blot analysis of complete κLCs and truncated ΔV-κLCs performed on spleen cells from WT (+/+) and iTIE/+ mice 6 d after IP injection of SRBCs. At day 4 and 5, mice received additional IP injections of PBS (-) or bortezomib (+Bz). A representative experiment using four mice per genotype is shown. (C) FACS analysis was performed on spleen cells isolated 6 to 7 d after SRBC injection. (D) The percentage (left) and absolute numbers (right) of PCs (B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup>; top), B cells (B220<sup>pos</sup>; middle), and GC B cells (B220<sup>pos</sup>/GL7<sup>pos</sup>; bottom) are shown for Cre<sup>pos</sup> (gray bars) and Cre<sup>neg</sup> iTIE/+ (empty bars; *n* = 16 mice/group). (E and F) Cre<sup>pos</sup> (gray) and Cre<sup>neg</sup> (empty) iTIE/+ mice (*n* = 8/group) were immunized with two IP injections (day 0 and 14) of DNP-Ficoll (E) and OVA (F). Sera were collected at day 7 and 24 and ELISA assays were performed to determine DNP- (E) and OVA- (F) specific IgM (left), IgG3 (E, right), and IgG1 (F, right) titers. Data are from two (B) and at least three (C-F) independent experiments. *n* = 8–16. Bars represent mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.

Downloaded from jem.rupress.org on January 22, 2016

EYFP-positive PCs in AID-Cre-EYFP iTIE/+ mice, compared with AID-Cre-EYFP +/+ littermates (Fig. 5, A and B). In contrast, similar frequency and absolute numbers of EYFP-positive B cells were retrieved in these animals (Fig. 5, C and D). Thus, the PC defect observed in Cre<sup>pos</sup> iTIE mice confirms that the production of ΔV-κLCs induces deleterious effects in terminally differentiated B lineage cells.

**Short lifespan and low levels of Ig secretion in PCs expressing ΔV-κLCs**

Next, we sought to elucidate how these truncated Ig control plasma cell maturation using the iTIE mouse model with enforced ΔV-κLC expression. Experiments were performed in homozygous iTIE/iTIE animals that have no functional Igκ alleles and exhibit only Igλ-expressing B lineage cells. Like



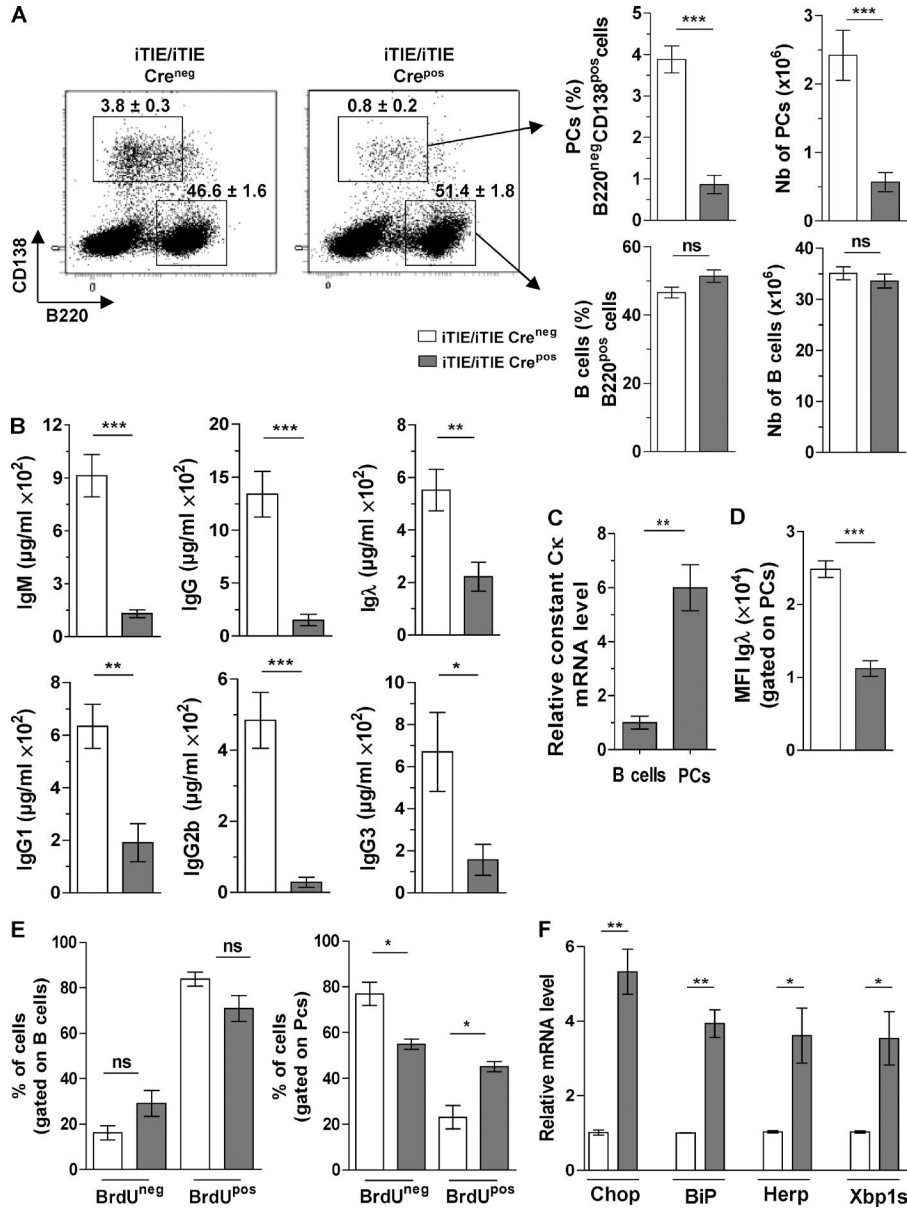
**Figure 5. Altered plasma cell differentiation after inducible production of truncated Ig in germinal center B cells.** FACS analysis was performed on spleen cells after gating on B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup> PCs (A) or B220<sup>pos</sup> B cells (C), as depicted in Fig. 4 C. The frequency and absolute numbers of EYFP<sup>pos</sup> PCs (B) and EYFP<sup>pos</sup> B cells (D) were determined 7 d after IP injections of SRBCs in tamoxifen-treated WT (+/+;  $n = 6$ ) and iTIE/+ ( $n = 6$ ) mice on AID-Cre-EYFP background. Data are from two independent experiments. Bars represent mean expression  $\pm$  SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

heterozygous mutant mice (Cre<sup>pos</sup> iTIE/+), but to a higher extent, homozygous animals (Cre<sup>pos</sup> iTIE/iTIE) exhibited very low amounts of B220<sup>neg</sup>CD138<sup>pos</sup> PCs (Fig. 6 A) together with a strong reduction in serum Ig levels (Fig. 6 B), compared with Cre<sup>neg</sup> controls.  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNA amounts were determined by qPCR in B cells and PCs isolated from bone marrow of Cre<sup>pos</sup> iTIE/iTIE mice. We found that the remaining PCs exhibited approximately five-fold higher  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNA levels compared with sorted B cells (Fig. 6 C). To evaluate whether  $\Delta$ V- $\kappa$ LC production in PCs affected Ig synthesis, we analyzed the expression of Ig $\lambda$  in Cre<sup>pos</sup> and Cre<sup>neg</sup> iTIE/iTIE B220<sup>neg</sup>CD138<sup>pos</sup> PCs. Interestingly, we found an approximately two-fold lower mean fluorescence intensity (MFI) for intracellular Ig $\lambda$  in Cre<sup>pos</sup> iTIE/iTIE PCs, compared with Cre<sup>neg</sup> iTIE/iTIE counterparts (Fig. 6 D). Hence, PCs expressing  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs synthesized low levels of Ig. Next, we evaluated whether the truncated Ig impaired the renewal or survival of PCs in Cre<sup>pos</sup> and Cre<sup>neg</sup> iTIE/iTIE mice injected with BrdU. Similar amounts of BrdU<sup>neg</sup> and BrdU<sup>pos</sup> B cells were retrieved for both strains (Fig. 6 E). In contrast, the frequency of BrdU<sup>pos</sup> (cycling) B220<sup>neg</sup>CD138<sup>pos</sup> cells was significantly increased in Cre<sup>pos</sup> iTIE mice compared with Cre<sup>neg</sup> controls, indicating higher proportion of recently divided plasmablasts (PBs) upon production of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs. Inversely, we found lower amounts of noncycling BrdU<sup>neg</sup> PCs in Cre<sup>pos</sup> iTIE mice. Next, we sought to elucidate how the production of truncated Ig limited the lifespan of PCs. We analyzed the expression of ER stress markers, together with unfolded protein response (UPR) components in sorted PCs (B220<sup>neg</sup>CD138<sup>pos</sup>). In agreement with an exacerbated ER stress response upon production of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs, *Chop*, *homocysteine-induced ER protein (Herp)*, *X-box binding protein 1 spliced (Xbp1s)*, and *BiP* mRNA levels were strongly increased in PCs isolated from Cre<sup>pos</sup> iTIE mice (Fig. 6 F). Thus,

the rise of ER stress as a result of the production of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs is transiently tolerated in early differentiating PBs but clearly compromises their survival as noncycling long-lived PCs secreting high Ig amounts (Nutt et al., 2015).

#### Intrinsic toxicity of truncated Ig in plasma cells

$\Delta$ V- $\kappa$ LCs can induce multiple deleterious effects. On one hand, their presence could impede the normal assembly of IgH and IgL chains and relate to the classical quality control of BCR assembly (Melchers et al., 2000). On the other hand, the TIE checkpoint could involve an intrinsic toxicity of truncated Ig independent of BCR expression. To distinguish between these two hypotheses, we determined whether the elimination of PCs containing V<sup>PTC</sup>-rearranged Ig $\kappa$  alleles also occurred in the absence of IgH chain expression. Ig $\kappa$  repertoires were thus compared between B cells (B220<sup>pos</sup>) and PCs (B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup>) isolated from spleens of DH-LMP2A mice (Lechouane et al., 2013). In this model, the Epstein-Barr virus LMP2A protein mimics the BCR tonic signal and B lymphocytes develop without any IgH chain (Casola et al., 2004). As expected upon such a by-pass of BCR-driven positive selection, approximately two thirds of V $\kappa$ J $\kappa$ 5 junctions were out-of-frame in DH-LMP2A B cells, with an equivalent repartition of V<sup>PTC</sup> and C<sup>PTC</sup> subclasses (Table 2). Regarding nonproductive junctions, we found again that the V<sup>PTC</sup> class was drastically decreased in PCs, compared with B cells (Table 2). In addition, we confirmed that the sole presence of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs impaired PC differentiation by breeding iTIE mice on a DH-LMP2A background (Fig. 7 A). Thus, the elimination of PCs containing V<sup>PTC</sup>-rearranged Ig $\kappa$  alleles occurred independent of IgH expression and BCR assembly. According to an exacerbated ER stress response and activation of the UPR, CHOP, HERP, BiP, *Xbp1s*, and IRE1 $\alpha$  expression were strongly increased upon production of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs (Fig. 7).



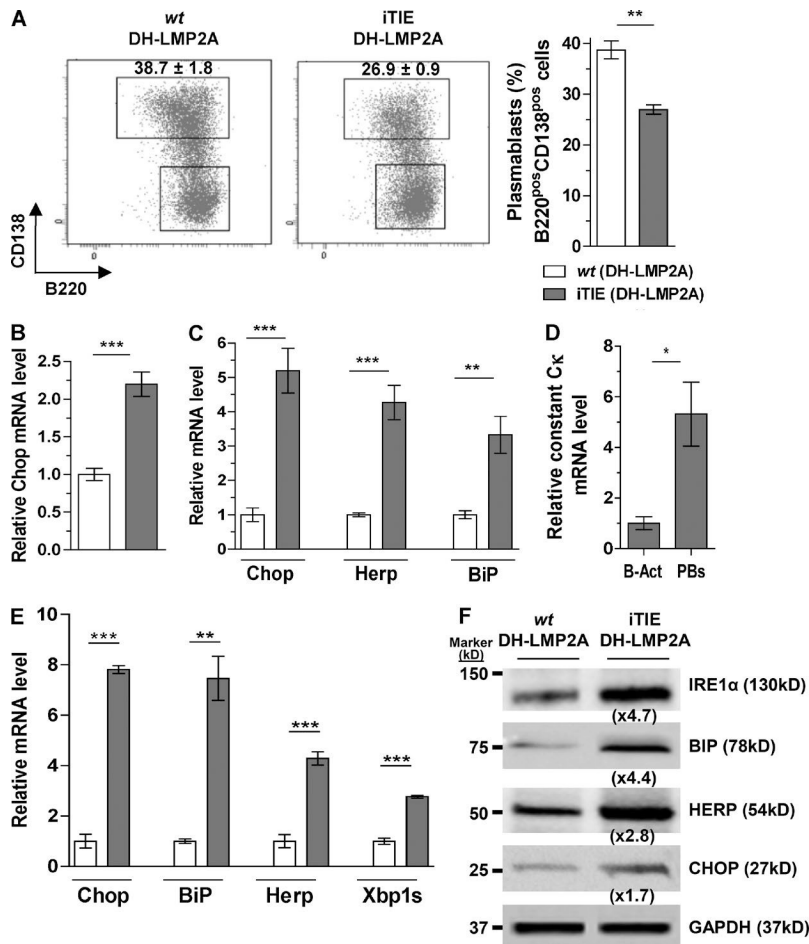
**Figure 6. PCs expressing  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs synthesize low amounts of Ig and preferentially accumulate as short-lived plasmablasts.**

(A) Representative FACS analysis of spleen cells isolated from Cre<sup>pos</sup> and Cre<sup>neg</sup> homozygous iTIE/iTIE mice after staining with anti-B220 and anti-CD138 mAbs. The percentage and absolute numbers of B cells (B220<sup>pos</sup>/CD138<sup>neg</sup>) and PCs (B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup>) were determined on spleen cells ( $n = 6$ /group) isolated 7 d after IP injection of SRBCs. (B) ELISA assays were performed in sera from 8-wk-old Cre<sup>neg</sup> ( $n = 9$ ) and Cre<sup>pos</sup> ( $n = 9$ ) iTIE/iTIE mice to determine the amounts of Ig isotypes (IgM, IgG, IgG1, IgG2b, IgG3, and total IgG). (C) Relative  $\Delta V$ - $\kappa$ LC mRNA levels were determined in purified B cells (B220<sup>pos</sup>/CD138<sup>neg</sup>;  $n = 3$ ) and PCs (B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup>;  $n = 3$ ) sorted from spleens of iTIE/iTIE Cre<sup>pos</sup> mice, 7 d after SRBC injection. RT-qPCR was performed using constant C $\kappa$  primers, after normalization to *Gapdh* transcripts. (D) Intracellular contents of Ig $\lambda$  were assessed by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) in splenic Cre<sup>pos</sup> (gray) and Cre<sup>neg</sup> (empty) iTIE/iTIE B220<sup>neg</sup>CD138<sup>pos</sup> PCs ( $n = 6$ /group), 7 d after SRBC injection. (E) Cre<sup>pos</sup> and Cre<sup>neg</sup> iTIE/iTIE mice ( $n = 4$ /group) were injected with BrdU as described in experimental procedures. At day 10, the frequency of BrdU<sup>pos</sup> (cycling) and BrdU<sup>neg</sup> (noncycling) cells was analyzed in B cells (B220<sup>pos</sup>CD138<sup>neg</sup>; left) and PCs (B220<sup>neg</sup>CD138<sup>pos</sup>; right) isolated from bone marrow. (F) Relative mRNA levels of ER stress markers were assessed in purified PCs (B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup>) sorted from spleens of Cre<sup>pos</sup> (gray;  $n = 3$ ) and Cre<sup>neg</sup> (empty;  $n = 3$ ) iTIE/iTIE mice, 7 d after SRBC injection. Data are representative of at least two independent experiments.  $n = 3$ –9. Bars represent mean expression  $\pm$  SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

**Table 2. Analysis of productive and nonproductive V $\kappa$ J $\kappa$ 5 junctions in B and plasma cells from DH-LMP2A mice**

Cell type	Total	In-frame	V <sup>PTC</sup>	C <sup>PTC</sup>
	<i>n</i>	%	%	%
B cells	53	35.8	32.1	32.1
Plasma cells	55	67.3	5.4	27.3

B cells (B220<sup>pos</sup>/CD138<sup>neg</sup>) and PCs (B220<sup>neg</sup>/CD138<sup>pos</sup>) were isolated from spleens of DH-LMP2A mice and PCRs were performed on genomic DNA using V $\kappa$ cons-for/J $\kappa$ 5rev primers (Fig. 1 A). Productive and nonproductive V $\kappa$ J $\kappa$ 5 junctions were assigned as in-frame, V<sup>PTC</sup>, and C<sup>PTC</sup> junctions, as described in Table 1. Data are from two independent cell sorting experiments.  $n =$  total number of sequences.



**Figure 7. Intrinsic toxicity of truncated Ig encoded by  $\Delta V$ - $\kappa$ LC mRNAs.** Experiments were performed on the DH-LMP2A background lacking IgH expression to analyze intrinsic effects of  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs in terminally differentiated B lineage cells. (A) The frequency of (B220<sup>pos</sup>/CD138<sup>pos</sup>) plasmablasts (PBs) was determined in purified splenic B cells from iTIE/iTIE::DH-LMP2A (gray bars;  $n = 4$ ) and wt/wt::DH-LMP2A (empty bars;  $n = 4$ ) mice 4 d after LPS stimulation (1  $\mu$ g/ml). The gates used are depicted in dot plots. (B and C) In those purified B cells, relative mRNA levels of ER stress markers were assessed at day 0 (B) or 4 d after LPS-stimulation (C). (D and E) The expression of  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs (D) and ER stress markers (E) was assessed in activated B cells (B-act: B220<sup>pos</sup>/CD138<sup>neg</sup>) and PBs (B220<sup>pos</sup>/CD138<sup>pos</sup>) sorted 4 d after LPS stimulation of B cells. (D)  $\Delta V$ - $\kappa$ LC mRNA levels were assessed in the iTIE/iTIE::DH-LMP2A model by qPCR using C $\kappa$  primers, as described in Fig. 6 C. (E) *Chop*, *BiP*, *Herp*, and *Xbp1s* mRNA levels were assessed in purified PBs from iTIE/iTIE::DH-LMP2A mice (gray;  $n = 3$ ), and compared with DH-LMP2A controls (empty;  $n = 3$ ). Relative mRNA levels were determined after normalization to *Gapdh* transcripts. (F) To analyze CHOP, BiP, HERP, and IRE1 $\alpha$  at the protein level, Western blots were performed in total LPS-stimulated B cells (day 4). A representative experiment is shown. Mean fold-change between iTIE/iTIE::DH-LMP2A ( $n = 3$ ) and DH-LMP2A ( $n = 3$ ) was calculated after normalization to GAPDH, using ImageJ software (National Institutes of Health). Data are representative of at least two independent experiments.  $n = 3$ –4. Bars represent mean expression  $\pm$  SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Likewise, high  $\Delta V$ - $\kappa$ LC mRNA levels were correlated with a strong expression of ER stress markers, in PBs sorted 4 d after LPS stimulation (Fig. 7, D and E). Altogether, these findings indicate that the TIE checkpoint is unrelated to a disturbed IgH/IgL assembly, but rather to a toxic ER stress provoked by the sole presence of  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs.

## DISCUSSION

The allelic exclusion of Ig genes is stringently established before or during early B cell maturation and ensures the monospecificity of B lymphocytes through stepwise V(D)J recombination of Ig alleles. In cells harboring biallelic V(D)J rearrangements, the noise coming from transcription of nonproductive alleles has long been neglected because these transcripts are either degraded by NMD or do not encode functional Ig chains (Jäck et al., 1989; Li and Wilkinson, 1998; Delpy et al., 2004a; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). However, we report here that alternative splicing of these passenger transcripts leads to the production of aberrant Ig chains that seriously impede PC differentiation. These findings identify a novel TIE checkpoint that eliminates ~20–25% of terminally differentiated B lineage cells, i.e., those transcribing nonproductive Ig $\kappa$  alleles prone to exon skipping. Consistent

with an Ag-independent checkpoint,  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs exert intrinsic toxic effects in PCs, likely mediated by ER stress-induced apoptosis. In addition, PCs expressing  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs synthesize low amounts of Ig and are mostly found among short-lived PBs. We propose that the TIE-checkpoint favors the selection of long-lived PCs with limited basal ER stress supporting high levels of Ig secretion.

Regarding nonproductively rearranged Ig $\kappa$  alleles, V<sup>PTC</sup> and C<sup>PTC</sup> junctions are highly similar and often exhibit a single nucleotide difference within the CDR3 sequences. Despite minor changes at the DNA level, we found that exon skipping was only enhanced for V<sup>PTC</sup> class transcripts, with higher magnitude in PCs than in mature B cells. Although the molecular mechanisms underlying NAS are not completely understood, this response is triggered by two distinct pathways referred as class I and class II NAS (Maquat, 2002; Wang et al., 2002; Chang et al., 2007). Class I NAS occurs upon disruption of splicing motifs, such as exonic/intronic splicing enhancers/silencers, by either nonsense or missense mutations, whereas class II NAS is a reading frame-dependent process strictly induced by nonsense mutations (Chang et al., 2007). Thus, our data strongly suggest that a class II NAS response occurs for nonproductive Ig $\kappa$  transcripts that

further relies on PTC recognition within the skipped V exon, but not within the downstream C $\kappa$  exon. We also observed an approximately two-fold increase in  $\Delta$ V- $\kappa$ LC mRNA levels in S194 plasma cells, compared with A20 B cells. In PCs, Ig genes are localized in transcription factories near the nuclear pore, and these specialized areas authorize cooperation of enhancers and facilitate Ig gene transcription (Park et al., 2014). In addition, a rise of exon skipping has been observed for highly transcribed genes, leading to the assumption that alternative splicing is closely correlated to the rate of RNA polymerase II elongation (Nogués et al., 2003; Shukla and Oberdoerffer, 2012). Altogether, we suggest that the boost of Ig gene transcription accompanying PC differentiation detrimentally promotes exon skipping during splicing of non-productive Ig $\kappa$  premRNAs.

Biallelic Ig $\kappa$  rearrangements with a VJ<sup>+</sup>/V<sup>PTC</sup> configuration represent around 20–25% of mature B cells (Mostoslavsky et al., 2004) and hereby yield the population affected by the TIE checkpoint in terminally differentiated PCs. Sensitivity to prolonged ER stress likely explains the elimination of PCs producing  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs. Accordingly, ER stress markers and UPR components such as CHOP, BIP, HERP, and XBP1/IRE1 $\alpha$  are up-regulated upon production of  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs in PCs. In addition, we found that *Chop* mRNA levels were already elevated in B cells expressing truncated Ig, suggesting that the early expression of this proapoptotic factor could influence the fate of differentiating PCs. Although a previous study showed that CHOP is dispensable for the development of LPS-induced plasmablasts (Masciarelli et al., 2010), our data are in agreement with a recent work highlighting its role in differentiating PCs (Gaudette et al., 2014) and also demonstrating that BCL-XL expression protects PCs from CHOP-associated apoptosis. The iTIE mouse model described herein should be useful to decipher the complex interplay between pro- and anti-apoptotic factors during PC differentiation.

With regard to PC dyscrasias, truncated Ig have been observed in some cases of myeloma (Cogné et al., 1988, 1992; Cogné and Guglielmi, 1993). However, it is a rare feature of primary PC dyscrasias and of malignant PC lines, suggesting that the TIE checkpoint also shapes the human Ig repertoire and that PCs producing aberrant Ig molecules are rarely rescued by oncogenic events (Decourt et al., 2004). Accordingly, we found that  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs were harmful for survival of normal PCs but exerted no obvious effect when expressed in tumor PCs in the absence of PI treatment. The survival of normal and malignant PCs is influenced by ER stress and the balance between load versus capacity of the proteasome (Cenci and Sitia, 2007). Being able to modulate ER stress and proteasome activity is of considerable interest for multiple myeloma (MM) patients (Meister et al., 2007) and new therapeutic strategies have emerged combining inhibitors of chaperones (Hsp90: Heat shock protein 90) or factors involved in unfolded protein response (IRE1 $\alpha$ ) with PI (Ishii et al., 2012; Mimura et al., 2012). Our findings are consistent with these

combined approaches, increasing the amount of aberrant proteins while decreasing their proteasomal degradation, and suggest that splicing modulators or NMD inhibitors could also be useful tools to reinforce the production of truncated proteins including  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs.

Interestingly, the late TIE checkpoint stands as a quality control of individual and unassembled  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs and is not a result of a disturbance of BCR or secreted Ig assembly (which could then be viewed as a failed Ag response). Thus, the late occurrence of the TIE checkpoint, at the terminal differentiation stage, can be considered an intrinsic waste and weakness of the immune system. It allows uncensored B cells to accumulate as mature B cells carrying V<sup>PTC</sup>-rearranged Ig $\kappa$  alleles, to potentially respond to Ag, and undergo affinity maturation in GCs, while being unable to yield long-lived PCs secreting high amounts of Ig (Nutt et al., 2015). The TIE checkpoint then cuts off the diversity of PCs arising from Ag-stimulated B cells for reasons unrelated to Ag recognition and affinity.

Whereas NMD basically protects cells from truncated protein synthesis, we show that activation of NAS herein exerts an opposite effect, finally ending with loss of  $\Delta$ V- $\kappa$ LC-expressing PCs. This study thus shows that transcription and splicing of nonproductive Ig alleles, although often neglected or considered to be under control, are in fact often inappropriately handled by RNA surveillance pathways, allows production of truncated Ig and ends with a PC wastage.

## MATERIALS AND METHODS

**Gene targeting.** Homologous recombination at the Ig $\kappa$  light chain locus was performed as described previously (Sirac et al., 2006). In brief, a 12.7-kb BamHI genomic fragment corresponding to the germline mouse J $\kappa$ C $\kappa$  cluster was used to generate the iTIE targeting construct (Van Ness et al., 1982). A 2.2-kb BsmI–SacII fragment spanning all the J $\kappa$  segments was replaced with a cassette containing a V<sub>H</sub> promoter (pV<sub>H</sub>), a human leader exon (L<sub>1-33</sub>), and a *loxP*-flanked neomycin-resistance gene driven by the Herpes simplex thymidine kinase promoter (*hsvTk*-neoR). The *hsvTk*-neoR cassette was inserted in opposite orientation to block the transcription and/or splicing of the L<sub>1-33</sub> exon (Fig. 4 A). Mouse embryonic stem cells (E14) were transfected with the linearized vector by electroporation and selected using 300  $\mu$ g/ml Ganciclovir and 2  $\mu$ M ganciclovir.

**Mice.** 2–3-month-old mice were used in all experiments and maintained in our animal facilities, at 21–23°C with a 12-h light/dark cycle. Experiments were performed according to the guidelines of the ethics committee in Animal Experimentation of Limousin (registered by the National Committee under the number C2EA-33) and were approved as part of the protocol registered under the number CREEAL 6-07-2012. Heterozygous mutant mice (iTIE/+) were backcrossed to C57BL/6 (B6) for at least three generations, and then mated with Cre-expressing mice to induce deletion of the *hsvTk*-neoR cassette. B6 CMV-Cre mice were obtained

from the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). B6 AID-Cre-EYFP mice, harboring a tamoxifen-inducible Cre recombinase enzyme controlled by the *Aicda* (activation-induced cytidine deaminase) promoter and a loxP-flanked EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) reporter gene, have been described elsewhere (Dogan et al., 2009). B6 AID-Cre-EYFP mice were obtained from the Imagine Institute (Paris, France). In DH-LMP2A mice (with mixed B6/BALB/c backgrounds), the Epstein-Barr virus LMP2A protein drives B cell development and plasma cell differentiation, as previously described (Casola et al., 2004; Lechouane et al., 2013). DH-LMP2A mice were obtained from the Institute of Molecular Oncology Foundation (Milano, Italy).

**Cell transfection.** A20, S194, and Sp2/0 murine cell lines were cultured ( $10^6$  cells/ml) in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen), sodium pyruvate, nonessential amino acids,  $\beta$ -mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco). Cells ( $2 \times 10^6$ ) were stably transfected by electroporation according to the manufacturer's instructions (Amaxa). Transfections were performed using in-frame (F),  $V^{PTC}$ , and  $C^{PTC}$  linear plasmid constructs separately, or using equimolar ratios of F and nonproductive constructs as previously described (Chemin et al., 2010).  $V\kappa J\kappa 5$  junctions were built by artificially joining the  $V\kappa_{1-135}$  and  $J\kappa 5$  segments. To create a reading frameshift, 5 and 10 additional nt were introduced at the  $V\kappa J\kappa$  junction in  $V^{PTC}$  and  $C^{PTC}$  constructs, respectively (Fig. 1 B). Cells ( $10^6$  cells/ml) were treated or not with MG132 (1  $\mu$ g/ml) for 5 or 8 h, as indicated, and control cells were treated with DMSO alone (dilution factor 1/1,000).

**Flow cytometry and cell sorting.** The frequency of apoptotic cells was determined after staining with Annexin V (BD) and propidium iodide using a LSRII Fortessa (BD). Data were analyzed with FACSDiva software (BD). Bone marrow B cell precursors and PCs were sorted on a FACS Vantage (BD) after staining with anti-mouse B220 (RA3-6B2; BioLegend), anti-mouse Ig $\kappa$  (187-1; Beckman Coulter), anti-mouse Ig $\lambda$  (JC5-1; Beckman Coulter), and anti-mouse CD138 (281-2; BD) mAbs. The gates used for cell sorting are indicated in Fig. 3 A. GC B cells were isolated from Peyer's patches after staining with anti-mouse B220 and PNA (peanut agglutinin; Sigma-Aldrich) as previously described (Delpy et al., 2004b). In all experiments, purity of sorted cells was >90%. B cells were also isolated from spleens by negative selection using anti-CD43 microbeads (Miltenyi Biotec) and stimulated ( $0.5 \times 10^6$  cells/ml) with 1  $\mu$ g/ml of LPS (LPS-EB Ultra-pure; InvivoGen) for 4 d.

To determine the frequency of GC B cells and PCs, erythrocyte-depleted spleen cells were stained with anti-mouse GL7 (GL7; BD), anti-B220, and anti-CD138 mAbs, 7 d after intraperitoneal (IP) injection of sheep red blood cells (SRBCs; bioMérieux). When indicated, mice received additional subcutaneous bortezomib (Sillag) injections at

day 5 and 6 (0.5 mg/kg). To induce nuclear translocation of Cre-recombinase, AID-Cre-EYFP mice were treated with Tamoxifen (1  $\mu$ g/mouse, IP; Sigma-Aldrich) at day 2, 4, and 6 after SRBC immunization.

To analyze the renewal of B lineage cells in bone marrow, mice received i.p. BrdU (Sigma-Aldrich) injections (1 mg/mouse at day 0, then 0.5 mg every 48 h) for 10 d. Cells were then stained according to the BrdU Flow kit (BD) protocol. Cells were treated with DNase I before staining with anti-BrdU mAb. Intracellular Ig $\lambda$  staining was performed in bone marrow cells isolated from homozygous iTIE/iTIE mice using the Cytotfix/Cytoperm kit (BD).

**Western blot.** For Western blot analysis, a 4–20% Mini-PRO TEANTGX polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories) was used. Each sample was then denatured at 94°C for 3 min before being loaded. Gels were blotted onto TransBlot Turbo polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad Laboratories), and blocked in PBST buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 0.1% Tween 20, pH 7.42) containing 5% nonfat dry milk. The signal was measured by chemoluminescence (ECL plus; GE Healthcare). Western blots were performed using rabbit anti-mouse HERP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), CHOP, BIP, IRE1 $\alpha$  (Cell Signaling Technology), goat anti-mouse Ig $\kappa$  (Beckman Coulter), and using goat anti-mouse GAPDH (R&D Systems) Abs for normalization.

**ELISA assays.** Ig titers were determined in culture supernatants and mouse sera using unlabeled and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse Abs (IgM, IgG1, IgG3, IgG2b, Ig $\kappa$ , Ig $\lambda$ , and total IgG; Southern Biotech) as described (Pinaud et al., 2001; Sirac et al., 2006). Total Ig amounts were revealed by the addition of p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich), and plates were read at 405 nm.

To analyze T cell-dependent humoral responses, mice received two IP injections with 10  $\mu$ g hen egg OVA (Sigma-Aldrich) emulsified in 50% CFA (day 0) and IFA (day 14). For T cell-independent responses, mice received two IP injections (days 0 and 14) with 50  $\mu$ g of 2,4, Dinitrophenyl-Amino-Ethyl-Carboxy-Methyl-Ficoll (DNP-Ficoll; Biosearch Technologies) emulsified in 50% IFA. Blood samples were collected (day 7 and 24) and antigen-specific antibody titers were determined in polycarbonate 96 multi-well plates (Maxisorp; Nunc) coated overnight at 4°C with OVA or albumin-DNP (Sigma-Aldrich) solution (10  $\mu$ g/ml), in carbonate buffer.

**PCR and RT-PCR.** Genomic DNA and total RNA were prepared using standard proteinase K (Eurogentec) and Tri-reagent (Invitrogen) procedures, respectively. RT-PCR was performed on DNase I-treated (Invitrogen) RNA and was negative in the absence of reverse transcription, ruling out contamination by genomic DNA. Reverse transcription was performed using Superscript II (Invitrogen) on 1 to 5

μg of total RNA. Priming for reverse transcription was done with random hexamers.

Amplifications and capillary electrophoresis were performed as previously described (Chemin et al., 2010). Quantification of PCR products was also performed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) according to the Agilent High Sensitivity DNA kit instructions. Sequences of VκJκ5 junctions were analyzed after cloning of PCR products into pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen), using V-QUEST software (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system). Real-time PCR were performed on a ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Life Technologies). Transcripts were quantified according to the standard  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method after normalization to *Gapdh*. Sequences of primers and probes are available upon request.

**Statistical analysis.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and overall differences between variables were evaluated by a two-tailed unpaired Student's *t* test using Prism GraphPad software. A  $\chi^2$  test was done to analyze the distribution of F<sub>V<sup>PTC</sup></sub>, and C<sup>PTC</sup>VκJκ junctions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of our animal facility, as well as C. Carrion and C. Ouk-Martin for technical assistance with microscopy and cell cytometry. We also thank K. Rajewsky (The Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany) and S. Casola (Institute of Molecular Oncology Foundation, Milano, Italy) for providing DH-LMP2A mice. AID-Cre-EYFP mice were kindly provided by CA Reynaud and JC Weill (Imagine Institute, Paris, France). We are grateful to J. Cook-Moreau (Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7276, Limoges, France) for proofreading of the manuscript.

This work was supported by grants from Fondation ARC (#PGA120150202338 and SFI20121205821), Ligue Contre le Cancer (comité Haute-Vienne), Comité d'Organisation de la Recherche sur le Cancer du Limousin (CORC), and Fondation pour la Recherche Médicale. N. Srour was funded by Conseil Régional du Limousin. A. Tinguely and G. Chemin were funded by French government fellowships.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 17 July 2013

Accepted: 12 November 2015

#### REFERENCES

- Allen, C.D.C., T. Okada, and J.G. Cyster. 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 27:190–202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.009>
- Andrews, S.F., Q. Zhang, S. Lim, L. Li, J.-H. Lee, N.-Y. Zheng, M. Huang, W.M. Taylor, A.D. Farris, D. Ni, et al. 2013. Global analysis of B cell selection using an immunoglobulin light chain-mediated model of autoreactivity. *J. Exp. Med.* 210:125–142. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20120525>
- Aoufouchi, S., J. Yélamos, and C. Milstein. 1996. Nonsense mutations inhibit RNA splicing in a cell-free system: recognition of mutant codon is independent of protein synthesis. *Cell*. 85:415–422. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81119-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81119-8)
- Bertocci, B., A. De Smet, C. Berek, J.-C. Weill, and C.-A. Reynaud. 2003. Immunoglobulin κ light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity*. 19:203–211. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00203-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00203-6)
- Bühler, M., and O. Mühlemann. 2005. Alternative splicing induced by nonsense mutations in the immunoglobulin muVDJ exon is independent of truncation of the open reading frame. *RNA*. 11:139–146. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.718380515613538>
- Casola, S., K.L. Otipoby, M. Alimzhanov, S. Humme, N. Uyttersprot, J.L. Kutok, M.C. Carroll, and K. Rajewsky. 2004. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* 5:317–327. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1036>
- Cenci, S., and R. Sitia. 2007. Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett.* 581:3652–3657. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.031>
- Cenci, S., E. van Anken, and R. Sitia. 2011. Proteostasis and plasma cell pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:216–222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cceb.2010.11.004>
- Chang, Y.-F., W.-K. Chan, J.S. Imam, and M.F. Wilkinson. 2007. Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame. *J. Biol. Chem.* 282:29738–29747. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M704372200>
- Chemin, G., A. Tinguely, C. Sirac, F. Lechouane, S. Duchez, M. Cogné, and L. Delpy. 2010. Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig κ transcripts. *J. Immunol.* 184:5009–5017. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0902949>
- Chen, J., M. Trounstein, F.W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J.F. Loring, and D. Huszar. 1993. Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int. Immunol.* 5:647–656. <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/5.6.647>
- Cogné, M., and P. Guglielmi. 1993. Exon skipping without splice site mutation accounting for abnormal immunoglobulin chains in nonsecretory human myeloma. *Eur. J. Immunol.* 23:1289–1293. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830230615>
- Cogné, M., A. Bakhshi, S.J. Korsmeyer, and P. Guglielmi. 1988. Gene mutations and alternate RNA splicing result in truncated Ig L chains in human gamma H chain disease. *J. Immunol.* 141:1738–1744. <http://dx.doi.org/10.1093/jimmunol.141.1738-1744.3137264>
- Cogné, M., C. Silvain, A.A. Khamlichi, and J.L. Preud'homme. 1992. Structurally abnormal immunoglobulins in human immunoproliferative disorders. *Blood*. 79:2181–2195. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V79.11.2181-2195>
- Daly, J., S. Licence, A. Nanou, G. Morgan, and I.-L. Mårtensson. 2007. Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26:4273–4282. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601846>
- Decourt, C., H.R. Galea, C. Sirac, and M. Cogné. 2004. Immunologic basis for the rare occurrence of true nonsecretory plasma cell dyscrasias. *J. Leukoc. Biol.* 76:528–536. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0803382>
- Delpy, L., C. Sirac, E. Magnoux, S. Duchez, and M. Cogné. 2004a. RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional kappa alleles and detects premature termination within the last κ exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:7375–7380. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0305586101>
- Delpy, L., C. Sirac, C. Le Morvan, and M. Cogné. 2004b. Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol.* 173:1842–1848. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1842>
- Dogan, I., B. Bertocci, V. Vilmont, F. Delbos, J. Mégret, S. Storck, C.-A. Reynaud, and J.-C. Weill. 2009. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10:1292–1299. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1814>
- Eberle, A.B., K. Herrmann, H.-M. Jäck, and O. Mühlemann. 2009. Equal transcription rates of productively and nonproductively rearranged immunoglobulin mu heavy chain alleles in a pro-B cell line. *RNA*. 15:1021–1028. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.151640919363217>
- Ehlich, A., S. Schaal, H. Gu, D. Kitamura, W. Müller, and K. Rajewsky. 1993. Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at

- early stages of B cell development. *Cell*. 72:695–704. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90398-A](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90398-A)
- Frischmeyer-Guerrero, P.A., R.A. Montgomery, D.S. Warren, S.K. Cooke, J. Lutz, C.J. Sonnenday, A.L. Guerrero, and H.C. Dietz. 2011. Perturbation of thymocyte development in nonsense-mediated decay (NMD)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:10638–10643. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019352108>
- Gass, J.N., N.M. Gifford, and J.W. Brewer. 2002. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J. Biol. Chem.* 277:49047–49054. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205011200>
- Gaudette, B.T., N.N. Iwakoshi, and L.H. Boise. 2014. Bcl-xL protein protects from C/EBP homologous protein (CHOP)-dependent apoptosis during plasma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 289:23629–23640. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.569376>
- Holwerda, S.J.B., H.J.G. van de Werken, C. Ribeiro de Almeida, I.M. Bergen, M.J.W. de Bruijn, M.J.A.M. Verstegen, M. Simonis, E. Splinter, P.J. Wijchers, R.W. Hendriks, and W. de Laat. 2013. Allelic exclusion of the immunoglobulin heavy chain locus is independent of its nuclear localization in mature B cells. *Nucleic Acids Res.* 41:6905–6916. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt491>
- Ishii, T., T. Seike, T. Nakashima, S. Juliger, L. Maharaj, S. Soga, S. Akinaga, J. Cavenagh, S. Joel, and Y. Shiotsu. 2012. Anti-tumor activity against multiple myeloma by combination of KW-2478, an Hsp90 inhibitor, with bortezomib. *Blood Cancer J*. 2:e68. <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2012.13>
- Jäck, H.M., J. Berg, and M. Wabl. 1989. Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* 19:843–847. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830190510>
- Jung, D., C. Giallourakis, R. Mostoslavsky, and F.W. Alt. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24:541–570. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830>
- Lechouane, F., A. Bonaud, L. Delpy, S. Casola, Z. Oruc, G. Chemin, M. Cogné, and C. Sirac. 2013. B cell receptor signal strength influences terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* 43:619–628. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201242912>
- Lejeune, F., and L.E. Maquat. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:309–315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccb.2005.03.002>
- Li, S., and M.F. Wilkinson. 1998. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity*. 8:135–141. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80466-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80466-5)
- Lutz, J., M.R. Heideman, E. Roth, P. van den Berk, W. Müller, C. Raman, M. Wabl, H. Jacobs, and H.-M. Jäck. 2011. Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:10644–10649. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019224108>
- Manis, J.P., M. Tian, and F.W. Alt. 2002. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 23:31–39. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02111-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02111-1)
- Maquat, L.E. 2002. NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes Dev.* 16:1743–1753. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1014502>
- Masciarelli, S., A.M. Fra, N. Pengo, M. Bertolotti, S. Cenci, C. Fagioli, D. Ron, L.M. Hendershot, and R. Sitia. 2010. CHOP-independent apoptosis and pathway-selective induction of the UPR in developing plasma cells. *Mol. Immunol.* 47:1356–1365. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2009.12.003>
- Meister, S., U. Schubert, K. Neubert, K. Herrmann, R. Burger, M. Gramatzki, S. Hahn, S. Schreiber, S. Wilhelm, M. Herrmann, et al. 2007. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* 67:1783–1792. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2258>
- Melchers, F., E. ten Boekel, T. Seidl, X.C. Kong, T. Yamagami, K. Onishi, T. Shimizu, A.G. Rolink, and J. Andersson. 2000. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol. Rev.* 175:33–46. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2000.imr017510.x>
- Mimura, N., M. Fulciniti, G. Gorgun, Y.-T. Tai, D. Cirstea, L. Santo, Y. Hu, C. Fabre, J. Minami, H. Ohguchi, et al. 2012. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 $\alpha$  is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. 119:5772–5781. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-07-366633>
- Mostoslavsky, R., F.W. Alt, and K. Rajewsky. 2004. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell*. 118:539–544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.023>
- Mühlemann, O., C.S. Mock-Casagrande, J. Wang, S. Li, N. Custódio, M. Carmo-Fonseca, M.E. Wilkinson, and M.J. Moore. 2001. Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol. Cell*. 8:33–43. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00288-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00288-X)
- Nogués, G., S. Kadener, P. Cramer, M. de la Mata, J.P. Fededa, M. Blaustein, A. Srebrow, and A.R. Kornblihtt. 2003. Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life*. 55:235–241. <http://dx.doi.org/10.1080/1521654031000119830>
- Novobrantseva, T.I., V.M. Martin, R. Pelanda, W. Müller, K. Rajewsky, and A. Ehlich. 1999. Rearrangement and expression of immunoglobulin light chain genes can precede heavy chain expression during normal B cell development in mice. *J. Exp. Med.* 189:75–88. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.189.1.75>
- Nutt, S.L., P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton, and L.M. Corcoran. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15:160–171. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3795>
- Obeng, E.A., L.M. Carlson, D.M. Gutman, W.J.J. Harrington Jr., K.P. Lee, and L.H. Boise. 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 107:4907–4916. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-08-3531>
- Park, S.-K., Y. Xiang, X. Feng, and W.T. Garrard. 2014. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 28:1159–1164. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.237479.114>
- Pavri, R., and M.C. Nussenzweig. 2011. AID targeting in antibody diversity. *Adv. Immunol.* 110:1–26. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00005-3>
- Péron, S., B. Laffleur, N. Denis-Lagache, J. Cook-Moreau, A. Tinguely, L. Delpy, Y. Denizot, E. Pinaud, and M. Cogné. 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science*. 336:931–934. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218692>
- Pinaud, E., A.A. Khamlichi, C. Le Morvan, M. Drouet, V. Nalesso, M. Le Bert, and M. Cogné. 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*. 15:187–199. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00181-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00181-9)
- Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 381:751–758. <http://dx.doi.org/10.1038/381751a0>
- Ron, D., and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:519–529. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2199>
- Santos, P., F. Arumemi, K.S. Park, L. Borghesi, and C. Milcarek. 2011. Transcriptional and epigenetic regulation of B cell development. *Immunol. Res.* 50:105–112. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-011-8225-y>



- Shukla, S., and S. Oberdoerffer. 2012. Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1819:673–683. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.01.014>
- Singh, N., Y. Bergman, H. Cedar, and A. Chess. 2003. Biallelic germline transcription at the  $\kappa$  immunoglobulin locus. *J. Exp. Med.* 197:743–750. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20021392>
- Sirac, C., F. Bridoux, C. Carrion, O. Devuyst, B. Fernandez, J.-M. Goujon, C. El Hamel, J.-C. Aldigier, G. Touchard, and M. Cogné. 2006. 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. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-11-4419>
- Tinguely, A., G. Chemin, S. Péron, C. Sirac, S. Reynaud, M. Cogné, and L. Delpy. 2012. Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* 32:107–117. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.06138-11>
- Todd, D.J., L.J. McHeyzer-Williams, C. Kowal, A.-H. Lee, B.T. Volpe, B. Diamond, M.G. McHeyzer-Williams, and L.H. Glimcher. 2009. XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* 206:2151–2159. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20090738>
- Valentine, C.R. 1998. The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* 411:87–117. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(98\)00010-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00010-6)
- Van Ness, B.G., C. Coleclough, R.P. Perry, and M. Weigert. 1982. 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. USA.* 79:262–266. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.79.2.262>
- Victoria, G.D., and M.C. Nussenzweig. 2012. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30:429–457. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
- Wang, J., J.I. Hamilton, M.S. Carter, S. Li, and M.F. Wilkinson. 2002. Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. *Science.* 297:108–110. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069757>
- Weischenfeldt, J., I. Damgaard, D. Bryder, K. Theilgaard-Mönch, L.A. Thoren, F.C. Nielsen, S.E.W. Jacobsen, C. Nerlov, and B.T. Porse. 2008. NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes Dev.* 22:1381–1396. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.468808>

## Article 2. Hypertranscription of Ig genes favors nonsense-associated exon skipping in plasma cells

Nivine Srour<sup>1</sup>, Mohamad Omar Ashi<sup>1</sup>, Claire Carrion<sup>1</sup>, XXX, Christophe Sirac<sup>1</sup>, Michel Cogné<sup>1,2</sup> and Laurent Delpy<sup>1</sup>

*En préparation*

### Objectifs :

Ce travail est en lien avec l'Article 1 montrant que la présence de codon non-sens sur les transcrits Igk conduit à un saut d'exon de type NAS (pour « *Nonsense-associated Altered Splicing* »), et à la disparition des plasmocytes hébergeant des réarrangements non-productifs au locus Igk par activation du TIE-checkpoint. En engendrant l'élimination des plasmocytes, la production d'Ig tronquées par saut d'exon ne permet pas l'analyse *in vivo* de l'action du NAS sur les transcrits d'Ig non-sens. Pour contourner ce problème et comparer l'efficacité du NAS dans des cellules B primaires et des plasmocytes, nous avons utilisé un modèle murin précédemment réalisé au laboratoire. Ce modèle Knock-in (IgH<sup>frVκ</sup>) présente un exon « *frameshift* » additionnel au locus IgH (Tinguely et al., 2012) et l'élimination de cet exon non-sens, par un saut d'exon de type NAS, restaure la production de chaînes lourdes normales. Ainsi, nous avons pu analyser le NAS des transcrits d'Ig non-sens sans entraîner l'apparition des Ig tronquées et donc en découplant ce phénomène de saut d'exon de l'activation du TIE-Checkpoint.

### Méthodologie :

Les expériences ont été réalisées chez les souris IgH<sup>frVκ/wt</sup>. Ce modèle knock-in présente une insertion d'un exon additionnel (exon « frVκ » pour « *frameshift Vκ* ») entre le dernier segment J<sub>H</sub> et le gène codant pour la région constante C<sub>μ</sub> du locus IgH. L'épissage de cet exon frVκ entraîne l'apparition de PTC sur les transcrits IgH quelque soit la nature du réarrangement VDJ (en phase ou hors phase) (Delpy et al., 2003; Tinguely et al., 2012). En revanche, l'élimination de cet exon additionnel par un saut d'exon de type NAS entraîne



l'apparition de transcrits IgH normaux, si le réarrangement VDJ respecte le cadre ouvert de lecture. La présence de ces transcrits IgH produits par épissage alternatif peut donc être facilement détectée, leur traduction également puisqu'elle permet la synthèse de chaînes lourdes complètes. Pour explorer l'activité transcriptionnelle de l'allèle non-productif  $IgH^{frV\kappa}$ , nous avons d'abord quantifier le taux de pré-ARNm par q-PCR dans différentes populations isolées de rate des souris  $IgH^{frV\kappa/wt}$  : les cellules B naïves ( $B220^+/GL7^-/FAS^-/CD138^-$ ), les cellules B du GC ( $B220^+/GL7^+/FAS^+/CD138^-$ ) et les plasmocytes ( $B220^-/CD138^+$ ), 7 jours après immunisation par injection intra-péritonéale de globules rouges de mouton. En parallèle, des tests ELISA ont été réalisés pour analyser spécifiquement les IgM codées par les transcrits alternatifs  $IgH^{frV\kappa}$ . Ces transcrits ayant éliminé l'exon  $frV\kappa$  par saut d'exon codent des  $IgM^a$  (l'allotype « a » provient du fond génétique 129 correspondant à la lignée ES d'origine). Les ARNm issus de l'allèle  $IgH^{wt}$  codent eux des  $IgM^b$  (l'allotype « b » provenant du fond génétique C57BL/6). La détection des  $IgM^a$  traduit donc l'activité du saut d'exon se produisant lors de l'épissage des transcrits IgH non-sens, par un mécanisme de NAS. Afin de faciliter l'analyse du NAS dans les cellules B et dans les plasmocytes normaux *in vivo*, nous avons croisé les souris  $IgH^{frV\kappa}$  avec des souris DH-LMP2A. Ces deux modèles présentent des insertions au sein du locus IgH et les souris issues de ces croisements possèdent le génotype suivant :  $IgH^{frV\kappa/DH-LMP2A}$ . Chez ces souris la maturation B et la différenciation plasmocytaire sont dictées par l'expression de la protéine LMP2A à partir de l'allèle  $IgH^{DH-LMP2A}$  (Casola et al., 2004; Lechouane et al., 2013). L'allèle non fonctionnel  $IgH^{frV\kappa}$ , quant à lui, peut subir des réarrangements VDJ et être exprimé librement. Ce modèle  $IgH^{frV\kappa/DH-LMP2A}$ , présentant une double hétérozygotie au locus IgH, permet donc de suivre aisément le devenir des transcrits IgH non-sens. La quantification des transcrits alternatifs a été réalisée par RT-PCR (amorce sens située dans le segment  $V_{H7183}$  et amorce anti-sens localisée dans l'exon constant  $C_{H1}$ ), sur des cellules B et des plasmocytes isolés de rate des souris hétérozygotes  $IgH^{frV\kappa/DH-LMP2A}$ .

### Résultats:

Dans les souris  $IgH^{frV\kappa/DH-LMP2A}$ , l'analyse par PCR semi-quantitative a révélé une efficacité du NAS dans les plasmocytes nettement plus marquée que dans les cellules B. Ce mécanisme est dépendant de l'intensité de transcription qui atteint son maximum lors de la différenciation plasmocytaire. Afin de prouver que le saut d'exon des transcrits IgH non-sens n'est pas restreint à quelques plasmocytes, nous avons cloné et séquencé les réarrangements



VDJ impliqués. De nombreuses jonctions différentes ont été obtenues suggérant une oligoclonalité des transcrits alternatifs. Par conséquent, l'activation du NAS semble générale et touche l'ensemble des transcrits IgH issus d'allèles non-productifs. Confirmant ces résultats, des analyses en microscopie confocale montrent que les plasmocytes de souris  $\text{IgH}^{\text{frV}\kappa/\text{DH-LMP2A}}$  expriment des IgM codées par les transcrits alternatifs de l'allèle  $\text{IgH}^{\text{frV}\kappa}$ . Comme attendu, aucun marquage IgM n'est détecté chez les plasmocytes de souris homozygotes DH-LMP2A ( $\text{IgH}^{\text{DH-LMP2A}/\text{DH-LMP2A}}$ ) qui expriment uniquement des Igk libres.

### Conclusion:

En résumé, nos résultats ont permis d'étudier le NAS des transcrits d'Ig non-productifs indépendamment du TIE-checkpoint. Cette étude *in vivo* a révélé une nette augmentation de l'épissage alternatif par saut d'exon dans les plasmocytes, comparativement aux cellules B. La forte activité de ce phénomène de NAS est en corrélation avec le « *boost* » transcriptionnel des gènes d'Ig qui accompagne la différenciation plasmocytaire. Notre analyse de l'épissage des transcrits d'Ig non-productifs montre une fréquence élevée de saut d'exon dans les plasmocytes. Cette étude souligne donc l'importance du TIE-checkpoint pour sélectionner négativement les plasmocytes producteurs d'Ig tronquées.



## **Hypertranscription of Ig genes favors nonsense-associated exon skipping in plasma cells**

Nivine Srour, Mohamad Omar Ashi, Claire Carrion, XXX, Christophe Sirac, Michel Cogné and  
Laurent Delpy

<sup>a</sup> Université de Limoges - CNRS UMR 7276, Limoges, France.

<sup>1</sup> Corresponding author: Laurent Delpy, Université de Limoges - CNRS UMR 7276, 2 rue du Dr.  
Marcland, F-87025 Limoges, France, Fax # 33 555 435 897; Phone # 33 519 564 214.

e-mail: [laurent.delpy@unilim.fr](mailto:laurent.delpy@unilim.fr)

Running title: **High levels of Ig exon skipping in living plasma cells**

### **Abbreviations:**

NAS, Nonsense-associated Altered Splicing; Trunc-Ig, truncated immunoglobulin; PTC, Premature Termination Codon; PC, Plasma cell; ER, endoplasmic reticulum (ER).



## Abstract

The error-prone V(D)J recombination process generates numerous out-of-frame V(D)J junctions leading to the appearance of premature termination codons in immunoglobulin (Ig) transcripts. Whereas the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway ensures efficient degradation of nonproductive Ig mRNAs, less is known about the impact of alternative splicing with regard to the production of truncated Ig with internal deletions. We previously found that variable domain-less Ig *kappa* light chains ( $\Delta V$ - $\kappa$ LCs) are produced upon exon-skipping of nonproductive Ig $\kappa$  transcripts.  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs induce plasma cell (PC) death through endoplasmic reticulum (ER) stress-associated apoptosis. The elimination of PCs expressing non-functionally rearranged Ig $\kappa$  alleles precludes the analysis of exon skipping in those antibody secreting cells. We addressed this issue using a dedicated mouse model harboring an additional frameshift exon in the Ig heavy (IgH) chain locus. We show that skipping of this supplemental exon during splicing restores the production of complete IgM. Interestingly, we observed higher levels of exon skipping in living PCs compared to B cells. The rise of exon skipping for Ig transcripts is correlated with the boost of IgH transcription accompanying PC differentiation. Thus, increasing the transcription of Ig genes favors antibody production but detrimentally promotes exon skipping of non-functionally rearranged Ig transcripts.

## Introduction

Random nucleotide additions or deletions during the error-prone V(D)J recombination program generate numerous out-of-frame junctions. The nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway ensures efficient degradation of nonproductively rearranged immunoglobulin (Ig) mRNA, and hence limits the synthesis of truncated immunoglobulins (Trunc-Ig). NMD is activated after recognition of a premature termination codon (PTC) during the pioneer round of translation. Several reports including ours have demonstrated that NMD accelerated up to 100-fold the degradation of nonproductive Ig mRNA (Baumann et al., 1985; Jäck et al., 1989; Lozano et al., 1994; Delpy et al., 2004a). This active degradation likely explains observations that nonproductively V(D)J-rearranged sequences are frequently cloned from genomic libraries but are virtually absent from cDNA libraries or RT-PCR experiments.

Contrasting with the above mentioned beneficial effects of NMD, we recently provide evidence for Trunc-Ig production upon activation of an additional RNA surveillance mechanism called Nonsense-associated Altered Splicing (NAS) (Srour et al., 2015). Activation of the NAS pathway often promotes the skipping of PTC-containing exons during splicing. Hence, NAS activation prevents the maturation of full length mRNA, while generating mRNA and proteins with internal deletions (Valentine, 1998; Maquat, 2002; Chang et al., 2007; Chemin et al., 2010). Unlike NMD which protects cells by degrading aberrant Ig mRNA and preventing the appearance of Trunc-Ig during B cell ontogeny, less is known about the impact of alternative splicing with regard to production of truncated Ig with internal deletions. We showed that the presence of PTCs promoted skipping of variable (V) exon during splicing of Ig pre-mRNAs (Chemin et al., 2010; Srour et al., 2015). These shortened

transcripts encode V-domain less Ig chains that exhibit toxic effects in antibody-secreting cells (Srouf et al., 2015). Accordingly, the production of  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs blunts PC differentiation through activation of an antigen-independent checkpoint referred as “truncated-Ig exclusion (TIE) checkpoint”. This novel quality control eliminates around 20-25% of PC expressing nonfunctional rearranged Ig $\kappa$  alleles. We further demonstrated that the activation of the TIE-checkpoint is unrelated to Ig assembly but mediated by endoplasmic reticulum (ER) stress-associated apoptosis, making PCs producing  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs highly sensitive to proteasome inhibitors. PC differentiation entails a spectacular enlargement of the ER to sustain massive Ig synthesis. In addition, the survival of normal and malignant PCs is controlled by ER stress and the balance between load versus proteasome activity (Cenci et al., 2006; Cenci and Sitia, 2007). Because PCs expressing Trunc-Ig disappear after activation of the TIE-checkpoint, this precludes analysis of exon skipping in those antibody secreting cells *in vivo*. Therefore, to decipher how Ig exon skipping is regulated during plasma cell differentiation, we studied a dedicated mouse model harboring an additional frameshift exon in the Ig heavy (IgH) chain locus (IgH<sup>fr $\kappa$</sup>  knock-in mice). Because skipping of this supplemental exon restores the production of complete IgM, this model allows uncoupling of NAS during splicing of nonsense Ig transcripts to the activation of the TIE-checkpoint. Interestingly, we observed a rise of exon skipping for non-productive Ig transcripts in plasma cells compared to B cells and this is correlated to the boost of IgH transcription accompanying PC differentiation. Thus, increasing the transcription of Ig genes favors antibody production but detrimentally promotes exon skipping of non-functionally rearranged Ig transcripts.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Monitoring NAS for Ig transcripts *in vivo*, using IgH<sup>frVκ/wt</sup> mice.

Although alternatively spliced mRNAs encoding structurally abnormal Ig was often observed in various lymphoproliferative disorders including Myeloma and Burkitt lymphoma (Cogné et al., 1988, 1992), the activation of NAS can hardly be followed in non-malignant B lineage cells due to the elimination of PCs expressing Trunc-Ig by activation of the TIE-checkpoint. To directly quantify NAS in living plasma cells, we took advantage of a model where NAS does not produce Trunc-Ig but instead complete Ig. IgH<sup>frVκ</sup> knock-in animals harbor a targeted insertion of an additional “frameshift-inducing Vκ exon” (frVκ) between J<sub>H</sub>4 and E<sub>μ</sub> that results in a sterile IgH locus (Delpy et al., 2003). Full-length IgH<sup>frVκ</sup> transcripts including the frVκ exon do not yield normal Ig, while NAS can yield functional IgH chains by eliminating the frVκ exon from transcripts with in-frame VDJ junctions (**Fig. 1A**). Altogether, no Trunc-Ig can arise after exon skipping of nonsense IgH<sup>frVκ</sup> transcripts and activate the TIE-checkpoint. To study the transcriptional regulation of non-productive IgH<sup>frVκ</sup> allele, we analyzed those pre-mRNA levels in naive B cells (B220<sup>+</sup>/GL7<sup>-</sup>/FAS<sup>-</sup>/CD138<sup>-</sup>), GC-B cells (B220<sup>+</sup>/GL7<sup>+</sup>/FAS<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>) and PCs (B220<sup>-</sup>/CD138<sup>+</sup>) sorted from spleens of IgH<sup>frVκ/wt</sup> mice, 7 days after SRBC injection. We found a significant increase of IgH<sup>frVκ</sup> pre-mRNAs in PCs compared to other B cell populations including GC B-cells (**Fig. 1B**). These data indicate that nonproductively rearranged IgH alleles are actively transcribed at late steps of B cell development. Thus, a transcriptional boost occurs for both productive and nonproductive IgH alleles in terminally differentiated PCs. In IgH<sup>frVκ/wt</sup> mice, productive VDJ rearrangements allow IgM<sup>b</sup> expression from the IgH<sup>wt</sup> allele (the *b* allotype comes from the C57BL/6 background), and IgM<sup>a</sup> is produced upon exon skipping of IgH<sup>frVκ</sup> transcripts (the *a* allotype comes from the 129Sv background of IgH<sup>frVκ</sup> alleles). To evaluate whether exon skipping

occurs during splicing of nonproductive IgH<sup>frVκ</sup> transcripts, we determined the amounts of complete IgM<sup>a</sup> in sera of IgH<sup>frVκ/wt</sup> mice, using allotype-specific ELISA assays (**Fig.1C**). High levels of IgM<sup>a</sup> were found in IgH<sup>frVκ/wt</sup> sera, indicating that alternative splicing of nonproductive IgH<sup>frVκ</sup> transcripts occurs *in vivo*. Hence, by uncoupling activation of the NAS pathway to the production of Trunc-Ig, this model allows to monitor the extent of this RNA surveillance pathway in living PCs. We showed that the elevated transcription from nonproductive IgH<sup>frVκ</sup> alleles promotes exon skipping and secretion of IgM<sup>a</sup> in PCs.

### Quantitative analysis of exon skipping in living PCs.

To facilitate the analysis of NAS mechanism *in vivo* regardless to Trunc-Ig production, IgH<sup>frVκ</sup> knock-in mice were crossed with DH-LMP2A mice (Lechouane et al., 2013). These mice exhibit an insertion of the EBV LMP2A gene within the IgH locus and the Epstein-Barr virus LMP2A protein mimics the BCR tonic signal and B lymphocytes develop without any IgH chain (Casola et al., 2004). In this heterozygous IgH<sup>frVκ/DH-LMP2A</sup> mice model, we determined alternatively spliced IgH<sup>frVκ</sup> mRNA (alt-mRNA) levels in B (B220<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>) and plasma cells (B220<sup>-</sup>/CD138<sup>+</sup>) isolated from spleens (**Fig. 2A, upper panel**) using semi-quantitative RT-PCR. We found around 5-fold higher levels of short band corresponding to alt-mRNA in PCs, compared to B cells (**Fig. 2A, bottom panel**). Substantial IgM amounts were found in sera of IgH<sup>frVκ/DH-LMP2A</sup> animals, confirming active translation of these alt-mRNAs (**Fig. 2B**). Compared to homozygous DH-LMP2A mice, in which plasma cells express Igκ chains but can't produce IgM, both IgM and Igκ are detected in IgH<sup>frVκ/DH-LMP2A</sup> plasma cells, as in *wt* (IgM,κ) PCs (**Fig. 2C**). Thus, these data demonstrate that nonproductive Ig transcripts are controlled by NAS in living PCs. In addition, the rise of alt-mRNAs in PCs is in agreement with previous findings in cell lines, showing more abundant alternative splicing of nonsense Igκ transcripts ( $\Delta V$ -κLC

mRNA) in S194 PCs compared to A20 mature B cells (Chemin et al., 2010; Srour et al., 2015). Thus, the boost of Ig genes transcription in PCs favors exon skipping during splicing of nonproductive Ig transcripts. It is now well accepted that transcription and splicing are connected and that the modulation of RNAPol II (pol II) elongation rate changes the pattern of alternative splicing (Nogués et al., 2003; Pandit et al., 2008; Shukla and Oberdoerffer, 2012). In PCs, Benson et al. have observed a significant increase of the expression of the splicing factor hnRNP LL factor (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like) and the transcription elongation factor ELL2 (eleven nineteen lysine-rich leukemia gene) (Benson et al., 2012). High levels of ELL2 in PCs enhance the recruitment of proteins involved in the co-transcriptional splicing onto Ig RNA molecules (Martincic et al., 2009; Park et al., 2014). Altogether, we propose that co-transcriptional splicing of highly transcribed IgH genes in PCs supports the strong elimination of nonsense codons by exon skipping.

### **Generalized exon skipping of nonproductive Ig transcripts.**

To investigate whether these alt-mRNAs arise from rare clones amplified after mutations or from oligoclonal plasma cells; we cloned and sequenced these transcripts to analyze their CDR3 junctions. We found various and mostly in-frame CDR3 junctions, supporting the hypothesis that skipping of nonfunctional exons within Ig transcripts is highly and broadly active in polyclonal plasma cells (**Fig. 3A**). Because those artificial alt-mRNAs are readily detectable in living PCs, these findings confirm that the production of Trunc-Ig but not the activation of NAS by itself is responsible for the elimination of plasma cells as a TIE-checkpoint.

To obtain a more complete view of the NAS regulatory mechanism and to understand the strong susceptibility of PCs to exon-skipping compared to B cells, a more global approach

to identify splicing environment of those cells is required. Microarray analyses of RNA from B cells and PCs can be used to identify differentially expressed genes involved in transcriptional and RNA processing regulation. We found that ELL2 was significantly overexpressed in PCs compared to B-cells, using GenomicScape tools (**Fig.3B**). Thus, B and plasma cell splicing environments are distinct and the rise of exon skipping in PCs is correlated with high expression of RNA processing regulators.

In the current work, we show that NAS of nonproductive Ig transcripts strongly occurs in living PCs. Altogether, we propose that the hypertranscription of Ig genes accompanying PC differentiation detrimentally promotes exon skipping during splicing of non-productive Ig pre-mRNAs. Indeed, activation of the NAS pathway seems “purposeless” because these shortened transcripts should encode Trunc-Ig and induce deleterious effects in terminally differentiated B lineage cells (Srouf et al., 2015).

## LEGENDS OF FIGURES

### **Figure 1: Significant Ig production upon exon skipping of non-productive Ig transcripts.**

(A) Gene targeting strategy. Map of wild-type (*b* allotype) and targeted (*a* allotype) IgH loci. IgH<sup>frV $\kappa$ /wt</sup> knock-in mice were created by insertion of an additional frameshift inducing V $\kappa$  exon between J<sub>H</sub>4 and E $\mu$  of IgH Locus. After VDJ recombination, the activation of NAS leads to the skipping of frV $\kappa$  exon. (B) Naive B-cells, GC B-cells and PCs were isolated from spleen of IgH<sup>frV $\kappa$ /wt</sup> and sorted 7 d after SRBC injection after staining with anti-B220, anti-GL7, anti-FAS and anti-CD138 mAbs. Representative dot plots and gates used for cell sorting are depicted (left). The purity of sorted populations was always >90%. Relative IgH pre-mRNA levels of nonproductive allele were determined in those sorted cells (right) (n=3) after normalization to *Gapdh* and values obtained for naive B-cells served as a reference, and their

mean was set to 1. Primers and probes (black arrows and short rectangles) used for allele-specific qPCR assays are represented on IgH<sup>frVκ</sup> allele. (C) ELISA assays were performed in sera from 6 to 8-wk-old IgH<sup>frVκ/wt</sup> (*frVκ<sup>a</sup>/wt<sup>b</sup>*), 129 (*wt<sup>a</sup>/wt<sup>a</sup>*), C57BL/6 (*wt<sup>b</sup>/wt<sup>b</sup>*) and F1 hybrid (*wt<sup>a</sup>/wt<sup>b</sup>*) mice (n=3-4/group), to determine the amounts of total IgM and allotype-specific isotypes (IgM<sup>a</sup> and IgM<sup>b</sup>). *UD*: undetermined; dotted line represents the negative threshold for IgM<sup>a</sup> expression, obtained using sera from C57BL/6 mice that do not express IgM<sup>a</sup>. Data are representative of at least two independent experiments (n= 3-4). Bars represent mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*, P<0,05; \*\*\*, P<0,001.

**Figure 2 : Nonproductive Ig transcripts exhibit high levels of exon skipping in plasma cells.**

(A) B-cells and PCs were isolated from spleen of IgH<sup>frVκ/DHLM2A</sup> after staining with anti-B220 and anti-CD138 mAbs (upper panel). Representative dot plot and gates used for cell sorting are depicted. The purity of sorted populations was always >90%. Semiquantitative RT-PCR analysis was performed in sorted cells using VH7183-for/Cμ-rev primers to identify alternatively spliced mRNA. Primers are depicted in Fig.1A. Two independent cell sorting experiments, each performed using a pool of 3 mice, are represented (bottom panel). (B) Sera of IgH<sup>frVκ/DHLM2A</sup> were collected and ELISA assays were performed to determine the amounts of IgM isotype (n=3-12/group). (C) Confocal analysis on spleen sections of heterozygous IgH<sup>frVκ/DHLM2A</sup>, homozygous IgH<sup>DHLM2A/DHLM2A</sup> and wild-type (C57BL/6) mice after co-staining with anti-IgM and anti-Igκ. Data are representative of at least two independent experiments (n= 3-4). Bars represent mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's test was performed to determine significance. \*, P<0,05.



### **Figure 3 : Generalized exon skipping of nonproductive Ig transcripts.**

(A) PCR products obtained after VH 7183-for/C $\mu$ -rev as described in Fig.2A were cloned and sequenced for analysis of VDJ junctions. Sequences of CDR3 junctions were then analyzed using V-QUEST software (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system) (left panel). The number of productive and non-productive junctions is represented in a pie chart (right panel). Data are from two independent cell sorting experiments (n=24, total number of sequences). (B) Comparative analysis of ELL2 was performed in B and plasma cells using GeneticScape tools.

### **MATERIALS AND METHODS**

**Mice.** The analysis of IgH<sup>frV $\kappa$</sup>  mice have been described elsewhere previously (Tinguely et al., 2012) and were created by targeted insertion of an additional frameshift inducing V $\kappa$  exon between J<sub>H</sub>4 and E $\mu$ . Heterozygous IgH<sup>frV $\kappa$ /wt</sup> mice were backcrossed to C57BL/6 (B6) for several generations. IgH<sup>frV $\kappa$ /DHMP2A</sup> model was obtained after crossing IgH<sup>frV $\kappa$</sup>  and DH-LMP2A mice. These mice harbor a replacement of J<sub>H</sub> segments by the Epstein-Barr virus LMP2A gene. This protein drives B cell development and plasma cell differentiation as previously described (Casola et al., 2004; Lehouane et al., 2013). For allotype-specific ELISA assays, F1 hybrid (*wt<sup>a</sup>/wt<sup>b</sup>*) mice were obtained after crossing 129Sv and B6 mice. Two- to three-month-old mice were used in all experiments and maintained in our animal facilities, at 21–23°C with a 12-h light/dark cycle. Experiments were performed according to the guidelines of our institutional review board for animal experimentation (N° CREEAL 6-07-2012).

**Flow cytometry and cell sorting.** Naive B-cells, GC B-cells and PCs were sorted on a FACS-Vantage (BD Biosciences) after staining spleen cells with anti-mouse B220 (RA3-6B2;

Biolegend), anti-mouse T and B cells Activating Ag (GL7; BD Biosciences), anti-mouse FAS (Jo2; BD Pharmingen) and anti-mouse CD138 (281-2; BD Biosciences) mAbs. The gates used for cell sorting are indicated in Fig.1B and 2A. In all experiments, purity of sorted cells was above 90%. To determine IgH<sup>frvκ</sup> pre-mRNA levels in B-cells, GC B-cells and PCs, IgH<sup>frvκ/wt</sup> mice received intraperitoneal (i.p.) injection of sheep red blood cells (SRBCs, bioMérieux®SA-France), 7 days before cell sorting experiments.

**ELISA assays.** Sera from IgH<sup>frvκ/wt</sup> (*frVκ<sup>a</sup>/wt<sup>b</sup>*), 129 (*wt<sup>a</sup>/wt<sup>a</sup>*), C57BL/6 (*wt<sup>b</sup>/wt<sup>b</sup>*) and F1 hybrid (*wt<sup>a</sup>/wt<sup>b</sup>*) mice were collected 7 days after SRBC injection and were analyzed for the presence of “a” or “b” allotype IgM or total IgM by ELISA. Ig titers were determined in polycarbonate 96 multiwell plates (Maxisorp, Nunc, Denmark) using unlabeled IgM, IgM<sup>a</sup> or IgM<sup>b</sup> Abs (Southern Biotechnology) and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgM Abs (Southern Biotechnology) as described (Pinaud et al., 2001; Sirac et al., 2006). Total Ig amounts were revealed by the addition of p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) and blocked with addition of 3 M NaOH; optic density was measured at 405 nm. Serum samples from IgH<sup>frvκ/DHLMp2A</sup> mice were also collected to determine IgM levels.

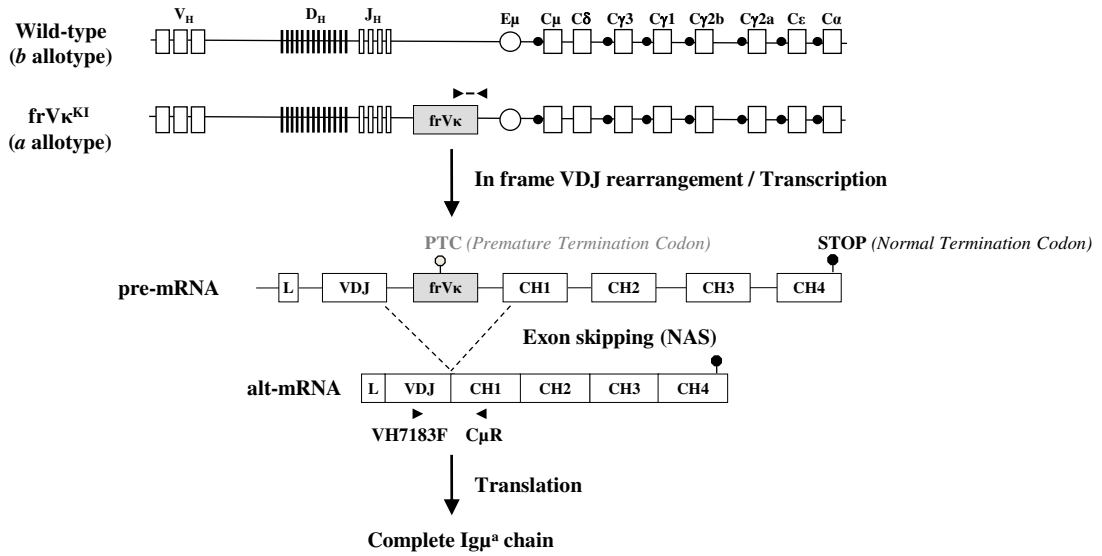
**PCR and RT-PCR.** Total RNA were prepared using Tri-reagent (Invitrogen) procedures. RT-PCR was carried out on 1 to 3 µg of DNase I (Invitrogen) -treated RNA, using Superscript II (Invitrogen). Priming for reverse transcription was done with random hexamers. IgH<sup>frvκ</sup> pre-mRNA levels were determined as described (Tinguely et al., 2012). Quantitative PCR were performed on cDNA samples equivalent to 10ng RNA per reaction, using TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems) on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied

Biosystems). Transcripts were quantified according to the standard  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method after normalization to *Gapdh* (Mm99999915\_g1).

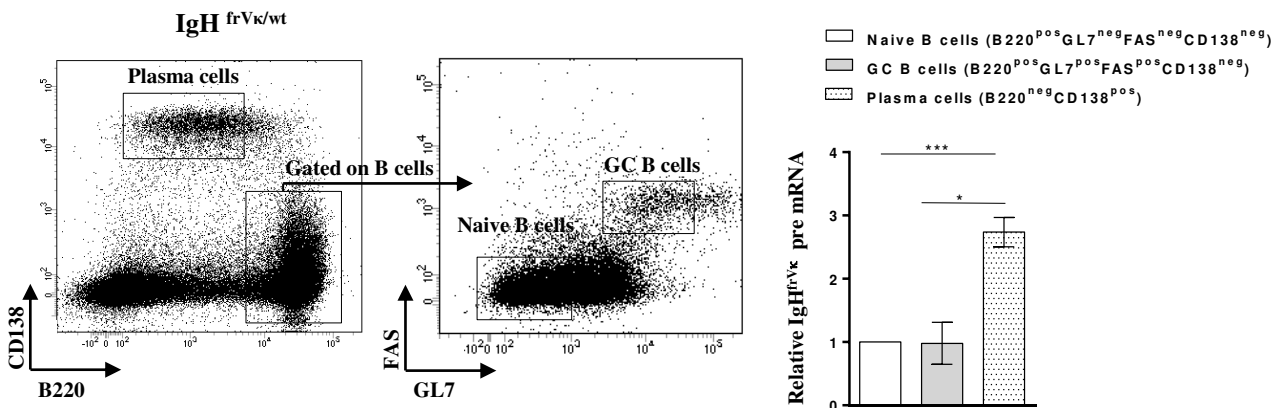
Sequencing of VDJ junctions were analyzed after cloning of RT-PCR products (VH<sub>7183</sub>-for: 5' CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC 3'/C $\mu$ -rev: 5' AGACGAGGGGGAAGACATTT 3') into pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen), using V-QUEST software (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®; <http://www.imgt.org>).

**Statistical analysis.** Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and overall differences between variables were evaluated by a two-tailed unpaired Student's t test using Prism GraphPad software (San Diego, CA).

### A Mouse IgH locus



### B



### C

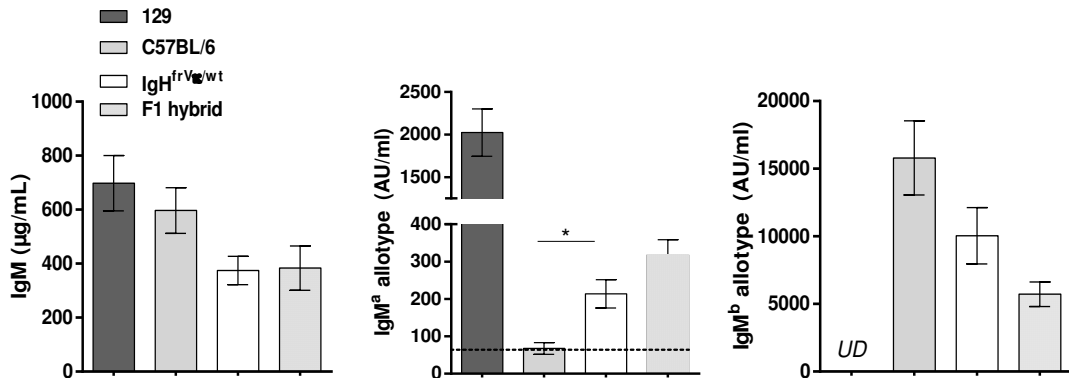
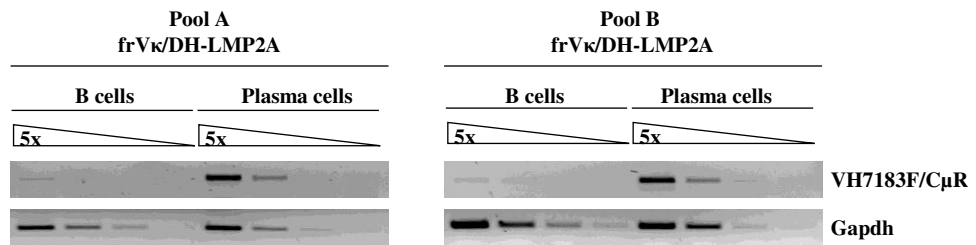
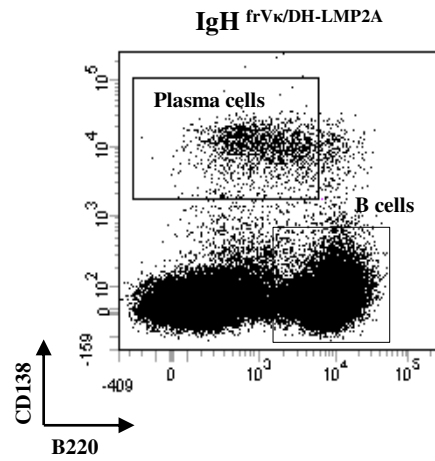
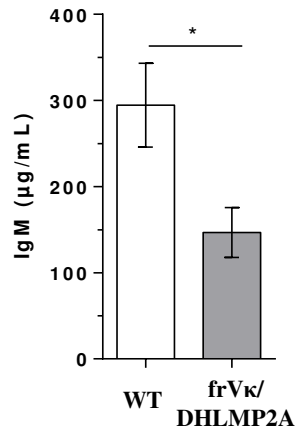
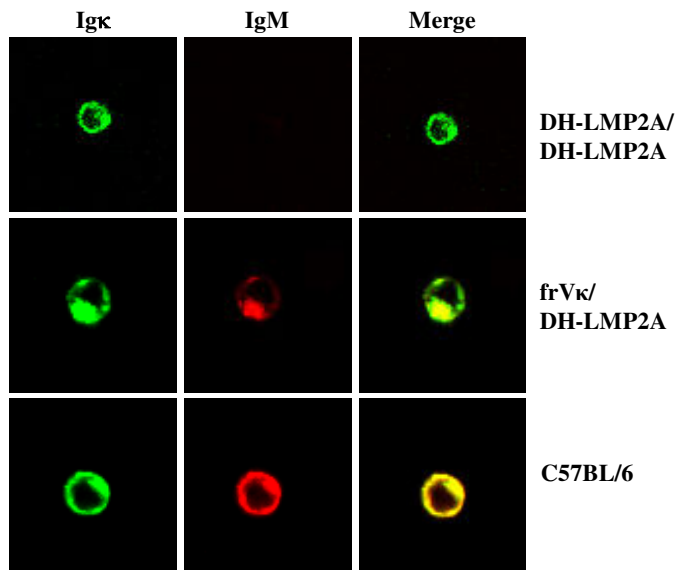


Figure 1

**A****B****C****Figure 2**

A

**CDR3 amino acids**

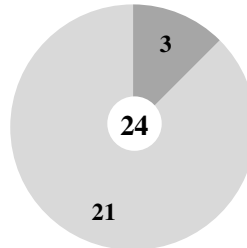
**Productive**

CARHGRGYDDEGFCCW  
CARQGMDYW  
CARYYGNPYYAMDYW  
CARSRGYGNIDYW  
CANSWFAYW  
CTRGEFAYW  
CTRDPYSGNYDLYYFDYW  
CSRRGYDYGYAMDYW  
CARKPSYAMDYW  
CTGEGYLYYFDVW  
CARDTFDYW  
CARDHLPNWFYFDVW  
CARKVPDAYW  
CARGGSMVTTTFAYW  
CAGKVPDAYW  
CARQASHRYDEDYW  
CARLRWYDVAYW  
CARSTIGTTGW  
CARLANWDSAWFAYW  
CARQGAAYRYDGYFDYW  
CARDHLPNWFYFDVW

**Non-productive**

CAREG\*YGNFYFDYW  
CASPL\*LRRGYFDYW  
CASQVR#DYW

Productive  
Non-productive



B

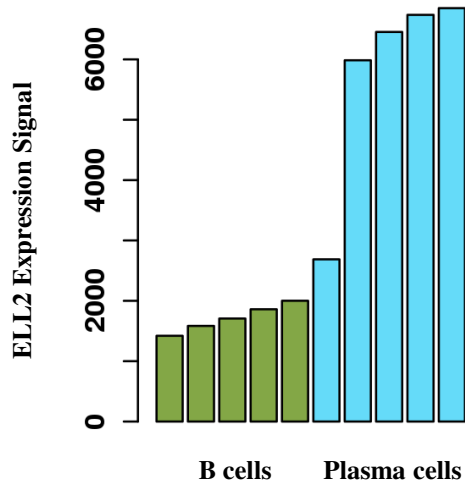


Figure 3

## References

- Baumann, B., Potash, M.J., and Köhler, G. (1985). Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J.* *4*, 351–359.
- Benson, M.J., Aijö, T., Chang, X., Gagnon, J., Pape, U.J., Anantharaman, V., Aravind, L., Pursiheimo, J.-P., Oberdoerffer, S., Liu, X.S., et al. (2012). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like (hnRNPLL) and elongation factor, RNA polymerase II, 2 (ELL2) are regulators of mRNA processing in plasma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16252–16257.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* *5*, 317–327.
- Cenci, S., and Sitia, R. (2007). Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett.* *581*, 3652–3657.
- Cenci, S., Mezghrani, A., Cascio, P., Bianchi, G., Cerruti, F., Fra, A., Lelouard, H., Masciarelli, S., Mattioli, L., Oliva, L., et al. (2006). Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *EMBO J.* *25*, 1104–1113.
- Chang, Y.-F., Chan, W.-K., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame. *J. Biol. Chem.* *282*, 29738–29747.
- 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.
- Cogné, M., Bakhshi, A., Korsmeyer, S.J., and Guglielmi, P. (1988). 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., Silvain, C., Khamlichi, A.A., and Preud'homme, J.L. (1992). Structurally abnormal immunoglobulins in human immunoproliferative disorders. *Blood* *79*, 2181–2195.
- Delpy, L., Le Bert, M., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2003). Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2108–2113.
- Delpy, L., Sirac, C., Magnoux, E., Duchez, S., and Cogné, M. (2004a). RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional kappa alleles and detects premature termination within the last kappa exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7375–7380.

- Delpy, L., Sirac, C., Le Morvan, C., and Cogné, M. (2004b). Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 1842–1848.
- Eberle, A.B., Herrmann, K., Jäck, H.-M., and Mühlemann, O. (2009). Equal transcription rates of productively and nonproductively rearranged immunoglobulin mu heavy chain alleles in a pro-B cell line. *RNA N. Y. N* *15*, 1021–1028.
- Jäck, H.M., Berg, J., and Wabl, M. (1989). Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* *19*, 843–847.
- 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.
- Lozano, F., Maertzdorf, B., Pannell, R., and Milstein, C. (1994). Low cytoplasmic mRNA levels of immunoglobulin kappa light chain genes containing nonsense codons correlate with inefficient splicing. *EMBO J.* *13*, 4617–4622.
- Maquat, L.E. (2002). NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes Dev.* *16*, 1743–1753.
- Martincic, K., Alkan, S.A., Cheatle, A., Borghesi, L., and Milcarek, C. (2009). Transcription elongation factor ELL2 directs immunoglobulin secretion in plasma cells by stimulating altered RNA processing. *Nat. Immunol.* *10*, 1102–1109.
- Nogués, G., Kadener, S., Cramer, P., de la Mata, M., Fededa, J.P., Blaustein, M., Srebrow, A., and Kornblihtt, A.R. (2003). Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life* *55*, 235–241.
- Pandit, S., Wang, D., and Fu, X.-D. (2008). Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 260–265.
- Park, K.S., Bayles, I., Szlachta-McGinn, A., Paul, J., Boiko, J., Santos, P., Liu, J., Wang, Z., Borghesi, L., and Milcarek, C. (2014). Transcription elongation factor ELL2 drives Ig secretory-specific mRNA production and the unfolded protein response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 4663–4674.
- 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.
- Reynaud, S., Delpy, L., Fleury, L., Dougier, H.-L., Sirac, C., and Cogné, M. (2005). Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 6176–6183.
- Shukla, S., and Oberdoerffer, S. (2012). Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 673–683.



- Singh, N., Bergman, Y., Cedar, H., and Chess, A. (2003). Biallelic germline transcription at the kappa immunoglobulin locus. *J. Exp. Med.* *197*, 743–750.
- Sirac, C., Bridoux, F., Carrion, C., Devuyst, O., Fernandez, B., Goujon, J.-M., El Hamel, C., Aldigier, J.-C., Touchard, G., and Cogné, M. (2006). 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.
- Srour, N., Chemin, G., Tinguely, A., Ashi, M.O., Oruc, Z., Péron, S., Sirac, C., Cogné, M., and Delpy, L. (2015). A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.*
- 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.
- Valentine, C.R. (1998). The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* *411*, 87–117.

**Brevet. Utilisation d'oligonucléotides antisens pour produire des Ig tronquées par saut d'exon pour le traitement de maladies impliquant des cellules de la lignée B**

*Demande prioritaire déposée le 23/11/2015 (FR n°1561252)*

**Résumé:**

Les résultats présentés précédemment ont permis d'identifier un nouveau point de contrôle (TIE-checkpoint) qui agit à un stade tardif de la différenciation plasmocytaire. Ce mécanisme façonne le répertoire d'Ig en contre-sélectionnant les plasmocytes exprimant des allèles I $\kappa$ k non-productifs. Ces transcrits d'Ig non-sens vont induire un épissage alternatif par saut d'exon et coder des chaînes d'Ig aberrantes dépourvues de domaine variable ( $\Delta$ V- $\kappa$ LC). L'élimination des plasmocytes reflète la toxicité intrinsèque des Ig tronquées et la grande sensibilité de ces cellules sécrétrices à des dérèglements de la synthèse protéique.

Sur la base de ces conclusions, une demande de brevet a été déposée concernant une nouvelle approche thérapeutique par saut d'exon dans le traitement du Myélome Multiple (MM) et d'autres troubles lymphoprolifératifs. Cette stratégie consiste à utiliser des oligonucléotides antisens (AON) capables de provoquer un saut d'exon dans les régions variables de chaînes lourdes ou légères d'Ig. Le saut d'exon va forcer la production d'Ig tronquées, se traduisant par une disparition des plasmocytes pathologiques suite à l'engorgement du RE. La preuve de concept a été démontrée dans des lignées cellulaires de MM (RPMI 8226).

Cette thérapie antisens est très prometteuse et ouvre la porte à une médecine personnalisée pour le traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B. Ci-joint une description détaillée de l'invention illustrée par différents exemples visant à produire des chaînes lourdes ou légères tronquées.





# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITE

### Réception électronique de la soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou d'un certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été automatiquement attribués.

Numéro de demande	1561252	
Numéro de soumission	1000321920	
Date de réception	23 novembre 2015	
Vos références	EMTII-F2052-2FR	
Demandeur	UNIVERSITE DE LIMOGES	
Pays	FR	
Titre de l'invention	UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS POUR PRODUIRE DES IG TRONQUEES PAR SAUT D'EXON POUR LE TRAITEMENT DE MALADIES IMPLIQUANT DES CELLULES DE LA LIGNEE B.	
Documents envoyés	package-data.xml application-body.xml requetefr.pdf (4 p.) comment.pdf (1 p.) fr-office-specific-info.xml textebrevet.pdf (23 p.) SEQLTXT.txt redtax-2.pdf (1 p.)	requetefr.xml fr-fee-sheet.xml validation-log.xml indication-bio-deposit.xml dessins.pdf (8 p.) SEQLPDF.pdf (1 p.) redtax-1.pdf (1 p.) others-1.pdf (1 p.)
Déposé par	EMAIL=veronique.marcade@cabinet-ores.com,CN=Veronique MARCADE,O=CABINET ORES,C=FR	
Méthode de dépôt	Dépôt électronique	
Date et heure de réception électronique	23 novembre 2015, 16:52:44 (CET)	
Empreinte officielle du dépôt	20:21:DE:B4:0F:3D:1E:44:8C:D8:7D:62:DB:7F:69:BF:50:C1:AF:E6	

## **UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS POUR PRODUIRE DES IG TRONQUEES PAR SAUT D'EXON POUR LE TRAITEMENT DE MALADIES IMPLIQUANT DES CELLULES DE LA LIGNEE B.**

La présente invention a trait au traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B, lymphocytes B ou plasmocytes. Elle concerne en particulier l'utilisation d'oligonucléotides antisens (AON) capable d'induire un saut d'exon dans les régions variables ou constantes des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines pour traiter des maladies impliquant des cellules de la lignée B, ainsi que des mélanges de tels AON. Enfin, l'invention concerne une méthode de sensibilisation au traitement par la voie des inhibiteurs du protéasome dans le cadre du traitement du myélome multiple.

### **ART ANTERIEUR**

#### Le myélome multiple

Le myélome multiple (MM) est un cancer incurable caractérisé par la présence dans la moelle osseuse d'un clone tumoral de cellules plasmocytaires. Il représente environ 1% des cancers et 10 % des hémopathies malignes, faisant de cette néoplasie B le second cancer d'origine hématopoïétique après les lymphomes (Kyle and Rajkumar, 2009). L'incidence du MM présente une grande variation allant de 0,4 à 6,3 cas pour 100 000 personnes. Le risque de développer un MM augmente avec l'âge avec un âge médian au diagnostic > 65 ans. L'incidence du MM est également plus élevée chez l'homme que chez la femme. Les personnes exposées à des niveaux élevés de radiations (radiations ionisantes, nucléaires) et aux pesticides semblent également présenter des risques plus élevés de développer un MM. Chez la majorité des patients atteints de MM, la maladie débute par un stade asymptomatique appelé MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance), avant de progresser vers le myélome (Landgren, 2013).

Les manifestations cliniques communément rencontrées chez les patients atteints de MM sont : une hypercalcémie, une insuffisance rénale, une anémie et des lésions osseuses. D'autres symptômes tels que des douleurs osseuses, une grande fatigabilité, des infections récurrentes et une perte de poids sont fréquemment constatés (Bird et al, 2011 ; Rajkumar, 2011). Ces manifestations cliniques sont provoqués par la production anormale d'une Ig monoclonale (historiquement appelée protéine M) par le clone plasmocytaire.

Bien que le MM demeure encore une maladie incurable, les récentes avancées en cancérologie et l'apparition de nouveaux agents thérapeutiques ont permis d'améliorer la survie globale des patients (Kumar et al, 2014).

Le diagnostic d'un MM est basé sur la détection et l'évaluation d'un composant monoclonal (protéine M) par électrophorèse et immunofixation sur sérum et/ou urine de patients, la caractérisation et la quantification des Ig (par exemple : IgM, IgG, IgA, chaînes légères Ig $\kappa$  ou Ig $\lambda$ , taux chaînes légères « libres »...). Des biopsies de moelle osseuse sont réalisées pour évaluer l'infiltration plasmocytaire en tant que marqueur de progression et d'agressivité de la maladie. Les lésions osseuses sont évaluées par imagerie (radiographie, RMN, tomographie). La concentration sérique d'autres facteurs biologiques ( $\beta$ 2-microglobuline, albumine, protéine C réactive, créatinine, hémoglobine, calcium, lactate déshydrogénase) permet de classifier le stade de la maladie et de pronostiquer son évolution. La recherche d'anomalies chromosomiques (translocation, délétion, hypo/hyperdiploïdie) permet également de classifier les risques de progression de la maladie. La majorité de ces critères sont utilisés dans les systèmes internationaux de classification du MM : « International Staging System : ISS » (Greipp et al., 2005) et « The Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy : mSMART (Mikhael et al., 2013).

Le traitement des patients atteints de myélome inclut souvent trois étapes :

- Une phase d'induction : destinée à réduire la masse tumorale avant une autogreffe de cellules souches. Cette chimiothérapie inclut généralement des agents immunomodulateurs (comme le Thalidomide), des inhibiteurs du protéasomes (comme le Bortezomib commercialisé sous le nom de Velcade®) et de la Dexaméthasone.
- Une éventuelle autogreffe de cellules souches, réalisée chez les patients éligibles ayant répondu de façon satisfaisante à la phase d'induction.
- Une phase de maintenance : consistant en une combinaison de chimiothérapie et d'agents immunomodulateurs pouvant inclure les agents alkylants et le Lenalidomide. Ce traitement est maintenu jusqu'à la rechute des patients.

Différents traitements peuvent être ensuite administrés chez les patients en rechute (Dispenzieri et al., 2009).

Les agents utilisés dans le traitement du MM se divisent en 5 classes principales : les agents alkylants, les anthracyclines, les corticostéroïdes, les agents immunomodulateurs et les inhibiteurs du protéasome.

### La réponse immunitaire humorale

La réponse immunitaire humorale implique d'abord la forme membranaire des immunoglobulines (Ig) et repose ensuite sur la sécrétion d'Ig solubles : les anticorps. Les Ig sont des protéines hétérodimériques composées de 4 chaînes polypeptidiques dont 2 chaînes légères identiques et 2 chaînes lourdes identiques réunies entre elles par un nombre variable de ponts disulfures. Les Ig possèdent des régions variables porteuses de la spécificité antigénique et des régions constantes qui, pour les chaînes lourdes, déterminent la fonction effectrice des anticorps sécrétés. D'après la structure des régions constantes, on distingue deux types de chaînes légères (*kappa* ou *lambda*) et 5 types majeurs de chaînes lourdes ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$ ) définissant la classe des Ig. S'ils s'avèrent fonctionnels, les réarrangements successifs des gènes codant les régions variables (VJ pour les chaînes légères ; DJ, puis V(D)J pour les chaînes lourdes) forment un exon variable qui pourra être transcrit et épissé sur les gènes codant les régions constantes. Au niveau du locus des chaînes lourdes, cet exon s'exprime d'abord avec le gène constant  $C\mu$  situé immédiatement en aval. Ensuite, un second type de réarrangement appelé « commutation de classe » ou « commutation isotypique » peut intervenir. Il entraîne la délétion du gène  $C\mu$  et permet l'expression d'un nouveau gène constant (par exemple  $C\gamma$ ) avec la même région variable réarrangée. Ces multiples étapes de recombinaison des gènes d'Ig sont finement régulées au cours de la maturation des lymphocytes B, allant du stade de progéniteurs lymphoïdes B à celui de plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

### Organisation des gènes d'Ig :

Les gènes codant les différentes chaînes des immunoglobulines occupent 3 loci situés sur des chromosomes distincts. Ils présentent une structure générale commune et sont spécifiquement exprimés dans la lignée lymphocytaire B. Chacun est constitué de multiples segments de gènes codant pour la partie variable des récepteurs pour l'antigène et de un ou plusieurs gènes codant la partie constante. Dans leur disposition germinale, les gènes des chaînes lourdes et légères d'Ig ne sont pas directement fonctionnels. Pour devenir complètement fonctionnels, ces gènes doivent subir des modifications internes ou réarrangements intra-géniques. Ces réarrangements ont lieu aux stades précoces de l'ontogénie B, entre les segments codant la partie variable des chaînes lourdes et légères, on parle de recombinaisons V(D)J.

- Locus humain des chaînes lourdes d'Ig (chr. 14) : les gènes des chaînes lourdes comprennent de très nombreux segments V (variables) et D (ces segments dits « de diversité » sont propres au locus de chaînes lourdes) et un groupe de 6 segments J, on trouve ensuite 9 gènes codant des régions constantes. Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux

propres à chaque chaîne lourde. Lors des recombinaisons V(D)J, un segment est associé au hasard avec un des 6 segments J, puis le réarrangement de cette association D-JH s'effectue avec un segment V. La partie variable est associée à la région constante par épissage de l'ARN messenger. Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig s'effectue par épissage alternatif d'un même transcrit primaire de chaîne lourde.

- Locus des chaînes légères *kappa* (chr. 2) : les gènes des chaînes légères  $\kappa$  comprennent de nombreux segments V et 5 segments J fonctionnels, on trouve ensuite un seul gène constant C $\kappa$ . Lors des réarrangements des gènes des chaînes légères, un segment V est accolé au hasard à un des 5 segments J.
- Locus des chaînes légères *lambda* (chr. 22) : les gènes de chaînes légères  $\lambda$  présentent une architecture relativement différente des deux autres locus, dite groupée. On dénombre de nombreux segments V (29-33) et 4-5 segments J et C fonctionnels.

#### Différenciation des lymphocytes B en plasmocytes

L'origine du clone plasmocytaire est un lymphocyte B post-centre germinatif. La différenciation des lymphocytes B s'effectue selon deux phases : une phase indépendante de l'antigène dans la moelle osseuse et une phase dépendante de l'activation antigénique dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques...). Au cours de la phase indépendante de l'antigène, les précurseurs B subissent des réarrangements de leurs gènes d'Ig. Ces recombinaisons se font par un assemblage ordonné des segments V (variable), D (diversité) et J (jonction) pour les chaînes lourdes d'Ig et des segments V et J pour les loci des chaînes légères. Ces jonctions V(D)J sont hautement diversifiées et permettent l'expression d'une multitude d'Ig capables de reconnaître un nombre quasi infini d'antigènes. Chaque cellule B synthétisant une Ig unique, généralement dépourvue de réactivité vis-à-vis des antigènes du soi, est sélectionnée positivement. Après différentes étapes de prolifération, cette cellule B donnera naissance à des clones exprimant la même Ig.

La reconnaissance de l'antigène par l'immunoglobuline de surface aboutit ensuite à l'entrée des lymphocytes B activés dans les centres germinatifs où plusieurs processus de modifications génétiques se produisent. Les lymphocytes B activés peuvent notamment subir des réarrangements au niveau des gènes constants de chaînes lourdes. Ces recombinaisons génétiques sont influencées par de nombreuses cytokines et permettent l'expression de classes nouvelles d'immunoglobulines autres qu'IgM. Les mécanismes de commutation de classe sont fondés sur l'accolement des régions Switch situées en 5' des segments constants et l'élimination des régions intervenantes, sous forme d'ADN circulaire extrachromosomique. Dans les centres germinatifs, des mutations somatiques, qui



correspondent à des modifications nucléotidiques ponctuelles ou à de courtes insertions ou délétions situées essentiellement au niveau des segments variables, permettent d'augmenter l'affinité du récepteur des cellules B pour l'antigène et de constituer un pool de cellules B mémoire de haute affinité. Les lymphocytes B activés peuvent également se différencier en plasmocytes qui synthétisent et sécrètent dans le sérum des quantités très importantes d'immunoglobulines. Les plasmocytes peuvent ensuite rejoindre la moelle osseuse où ils reçoivent des signaux de survie tels que l'interleukine-6 produite par les cellules stromales. Ces plasmocytes à longue durée de vie peuvent persister plusieurs mois voire plusieurs années dans l'organisme. En accord avec leur statut post-centre germinatif, les cellules de myélome produisent des IgG et IgA, plus rarement des IgD et IgE, et présentent des taux élevés d'hypermutations somatiques au niveau de leur gènes d'immunoglobuline (Anderson et Carrasco, 2011).

La synthèse massive d'Ig par les plasmocytes doit être finement régulée afin d'éviter une surcharge du réticulum endoplasmique (RE) préjudiciable à la survie des plasmocytes.

Les inventeurs ont maintenant obtenu des résultats innovants soulignant la toxicité des Ig tronquées au cours de la différenciation physiologique des plasmocytes (Srour et al., J Exp Med, 2015, publication acceptée). De façon intéressante, la production d'Ig tronquées par les plasmocytes induit un stress cellulaire et provoque l'apoptose de ces plasmocytes.

Sur la base de ces résultats, les inventeurs ont mis au point une nouvelle approche thérapeutique qui consiste à induire la production d'Ig tronquées pour éliminer les plasmocytes pathologiques à l'aide d'oligonucléotides antisens (AON « ou OAS en français »). Ces AON sont capables de provoquer un saut d'exon au niveau de l'ARN des chaînes lourdes ou légères des Ig, se traduisant par l'expression d'Ig tronquées.

#### **DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION**

La présente invention a pour objet une méthode de traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B comprenant l'administration chez un patient d'au moins un AON capable d'induire un saut d'exon dans l'une des régions variables ou constantes de l'une des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines.

Par « cellules de la lignée B », on entend les lymphocytes B et les plasmocytes.

Dans un premier mode de réalisation, la présente invention concerne l'utilisation d'un AON permettant l'élimination de la région variable des chaînes légères ou lourdes des Ig.

Les résultats de la partie expérimentale illustrent une telle approche, notamment à l'Exemple 3. En particulier, les inventeurs ont montré qu'en transfectant une lignée myéloïde avec un AON capable de s'hybrider spécifiquement avec la séquence du site donneur d'épissage de l'exon VJ de la chaîne légère exprimée par ce clone, les cellules produisent des Ig tronquées qui provoquent leur mort par apoptose. Ce résultat constitue la preuve de concept de la présente invention.

La présente invention concerne donc l'utilisation d'un AON ciblant la partie variable VJ des chaînes légères des Ig pour éliminer un clone de la lignée B. Une telle approche est illustrée à l'Exemple 4.1.

Dans un mode préféré de réalisation, l'invention consiste à utiliser un AON dirigé contre le site donneur d'épissage de l'exon variable situé sur la chaîne légère  $\lambda$ . Un AON préféré pour cette utilisation est l'AON de séquence SEQ ID NO.5.

De même, la présente invention peut être mise en œuvre en utilisant un AON capable d'induire un saut d'exon de sorte que l'Ig produite soit dépourvue de la partie variable VDJ des chaînes lourdes. Une telle stratégie est illustrée à l'Exemple 4.2.2.

Par « AON capable d'induire un saut d'exon », on entend tout AON se liant spécifiquement à la région ciblée de sorte que l'ARMm mature obtenu après épissage ne permette pas la traduction du domaine protéique que l'on souhaite éliminer. Par « domaine à éliminer », on entend soit la région variable d'une chaîne lourde ou légère, soit au moins une partie de la région constante d'une chaîne lourde. La séquence ciblée par l'AON peut contenir le site donneur d'épissage, le site accepteur d'épissage ou des séquences régulatrices d'épissage, par exemple activatrices (dites « enhancer »), situées dans les régions introniques ou exoniques. De plus, un AON selon l'invention est capable d'induire un saut d'exon en s'hybridant avec une séquence qui comprend un site donneur d'épissage, un site accepteur d'épissage ou des séquences régulatrices d'épissage situées dans les régions introniques ou exoniques des régions variables ou constantes des chaînes des immunoglobulines. Cet AON peut être utilisé dans le traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B.

L'approche thérapeutique visant à faire produire par les cellules de la lignée B une Ig dépourvue de domaine variable peut être mise en œuvre dans le cadre d'une médecine personnalisée. Une fois que le clone B responsable de la maladie a été identifié, un séquençage de la région variable est effectué et un AON capable de s'hybrider spécifiquement à cette séquence peut être sélectionné et administré en tant que médicament.

Par exemple, dans le cas du MM, l'Ig monoclonale produite par le clone tumoral (par exemple : IgG, IgA, chaînes légères  $Ig\kappa$  ou  $Ig\lambda$ ) est recherchée par électrophorèse et immunofixation sur sérum de

patients. Des biopsies de moelle osseuse permettent ensuite d'évaluer l'infiltration plasmocytaire, et de caractériser les réarrangements V(D)J du clone tumoral par amplification spécifique des transcrits d'Ig (Van Dogen JJM et al, Leukemia 2003 ; Bridoux et al, Am J Kidney Dis 2005). Après identification des réarrangements V(D)J portés par le clone tumoral, un AON spécifique du réarrangement ciblé est utilisé pour produire une Ig tronquée dépourvue de domaine variable.

Une même approche préalable, par amplification des transcrits d'Ig, est applicable à la caractérisation des réarrangements V(D)J de toute cellule B tumorale.

Ainsi, de manière générale, le type d'Ig produite par le clone pathologique peut être déterminé à partir d'un échantillon sanguin ou d'un tissu lymphoïde du patient. Il s'agit alors de déterminer le type de la chaîne légère ou lourde du clone incriminé. De plus, dans le cadre d'une approche de médecine personnalisée du traitement d'un cancer myéloïde, la séquence variable spécifique du clone tumoral peut être obtenue à partir d'une biopsie médullaire du patient. Après identification des réarrangements V(D)J portés par les gènes de chaînes lourdes et légères d'Ig du clone tumoral, l'élimination de l'exon variable est réalisée à l'aide d'un AON dirigé, par exemple, contre le site donneur d'épissage du segment J impliqué dans le réarrangement.

Ainsi, dans le cadre d'une approche de médecine personnalisée, l'utilisation d'un AON selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- a. Identification du clone cellulaire B responsable de la maladie à partir d'un échantillon d'un patient : identification des isotypes de chaînes lourdes et légères de l'Ig monoclonale produite par ce clone;
- b. Caractérisation du réarrangement particulier de la région variable des chaînes lourdes ou légères, exprimée par ledit clone cellulaire B ;
- c. Fourniture d'au moins un AON capable d'induire un saut d'exon dans l'une des régions variables de l'une des chaînes des immunoglobulines dudit clone ;
- d. Administration dudit AON ou mélange d'AON au patient.

Ces approches thérapeutiques de médecine personnalisée permettant l'élimination du domaine variable sont basées sur l'identification du réarrangement V(D)J d'une cellule tumorale. Ces stratégies tiennent donc compte des éventuelles mutations somatiques introduites sur les exons variables au cours du processus de maturation d'affinité des Ig.

Ainsi, une approche thérapeutique consistant en l'administration d'un AON capable d'induire un saut d'exon dans la région variable des chaînes légères ou lourdes des Ig est particulièrement adapté

dans le cadre du traitement du myélome multiple, de l'amylose AL, des lymphomes non Hodgkiniens, de la leucémie lymphoïde chronique, de la maladie de Waldenström et de tout autre type de cancers touchant les cellules de la lignée B et impliquant la production d'une Ig monoclonale.

Cette approche personnalisée a l'avantage de permettre d'éliminer spécifiquement le clone tumoral en épargnant les cellules B saines et par conséquent en préservant les défenses immunitaires du patient. Cette approche thérapeutique ciblée représente donc une innovation majeure, contrastant avec les thérapies « lourdes » actuellement utilisées dans les cancers de la lignée B.

Dans un second mode de réalisation, la présente invention concerne l'utilisation d'un AON permettant l'élimination d'au moins un exon de la région constante des chaînes lourdes des Ig pour traiter des maladies impliquant des cellules de la lignée B.

Les inventeurs ont mis en évidence que la production d'une Ig tronquée par une cellule de la lignée B entraîne un stress au niveau du RE qui conduit à la mort de ladite cellule par apoptose. Ainsi, l'une des hypothèses expliquant la toxicité de ces Ig tronquées est que la cellule serait sensible à la production de protéines mal repliées (du fait de l'absence de certains domaines). Dans ce contexte, on peut prédire qu'une cellule de la lignée B produisant des Ig dépourvues d'au moins une partie de leur domaine constant présentera le même phénotype qu'une cellule exprimant des Ig dépourvues de leur domaine variable.

Ainsi dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un AON capable d'induire un saut d'exon dans la région constante de la chaîne lourde pour éliminer au moins l'un des exons CH1, CH2 ou CH3. L'approche visant à faire produire des Ig dépourvues d'au moins une partie de leur domaine constant est illustrée à l'Exemple 4.2.3.

Cette stratégie thérapeutique permettant l'élimination d'un exon constant des chaînes lourdes d'Ig présente un spectre d'action plus large que la médecine personnalisée précédemment décrite pour l'élimination du domaine variable, basée sur l'identification du réarrangement V(D)J d'une cellule tumorale. En effet, l'élimination d'un exon constant permet de cibler spécifiquement les lymphocytes B exprimant soit des IgM, des IgG, des IgA ou des IgE.

Pour la différencier l'approche de type « médecine personnalisée », on appellera « médecine générique » l'approche qui permet de traiter une pathologie en fonction de critères indépendants des réarrangements des régions variables. Le choix de la région à cibler dépendra alors des isotypes de chaînes lourdes ou légères d'Ig produites par les cellules B pathologiques.

Cette stratégie générique est applicable pour le traitement des cancers de la lignée lymphoïde B (alternativement à l'approche de médecine personnalisée telle que définie précédemment) mais aussi pour traiter un grand nombre de pathologies impliquant des cellules B non cancéreuses.

Ainsi, dans une mise en œuvre particulière, la présente invention consiste à utiliser des AON médicaments ciblant les gènes constants de chaînes lourdes d'Ig ; cette approche thérapeutique pourrait s'appliquer à de nombreuses pathologies telles que:

- l'allergie immédiate en ciblant les cellules B produisant des IgE,
- certaines pathologies immuno-allergiques impliquant des dépôts d'IgA (néphropathie à IgA, purpura rhumatoïde...) ou des propriétés immunopathologiques spécifiques des IgA (dermatite herpétiforme, maladies cutanées à dépôts linéaires d'IgA...) en ciblant les cellules B produisant des IgA,
- les maladies auto-immunes spécifiques de tissus en ciblant les cellules productrices d'une classe d'auto-anticorps ayant une pathogénicité directe démontrée (par exemple thyroïdite auto-immune, maladie de Biermer, cytopénie auto-immune, etc...)
- les pathologies liées à des dépôts tissulaires (rénaux, cardiaques, hépatiques, ou autres...) de chaînes d'immunoglobulines monoclonales (amylose, syndrome de Fanconi, syndrome de Randall, cryoglobulinémies, etc...)
- en transplantation (rejet aigu impliquant des allo-anticorps de classe IgG).

La présente invention a pour autre objet un AON capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères ou d'au moins une partie de sa région sur les chaînes lourdes, pour son utilisation dans le traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un AON capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères ou d'au moins une partie de sa région constante sur les chaînes lourdes, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B.

Au regard de ce qui précède, les applications thérapeutiques des AONs ciblant les transcrits d'Ig pour provoquer un saut d'exon et la production d'Ig tronquées peuvent couvrir la quasi-totalité des maladies touchant les cellules de la lignée B.

Dans le cadre d'une approche générique telle que définie précédemment, la présente invention peut être mise en œuvre en proposant les mélanges d'AON en tant que médicaments.

Ainsi, la présente invention a pour autre objet un mélange d'OAN capable d'induire spécifiquement la production d'une Ig tronquée.

Des mélanges d'AON peuvent être fournis pour élargir le spectre d'action et/ou augmenter la toxicité de ces approches thérapeutiques. Les combinaisons sont multiples, ci-après une présentation de quelques mélanges présentant un grand intérêt thérapeutique et/ou un fort potentiel en tant que médicaments génériques « industrialisables ».

- Mélange d'AON ciblant les segments J impliqués dans les réarrangements V(D)J de chaînes lourdes et légères d'un clone B

Un tel mélange serait particulièrement intéressant dans le cadre d'une approche de médecine personnalisée pour augmenter la toxicité du traitement, donc son efficacité.

- Mélange d'AON ciblant tous les segments J de chaînes légères *kappa*

Un tel mélange permettrait de détruire sélectivement la population  $Ig\kappa$  qui représente environ 60% des cellules de la lignée B. L'avantage d'une telle approche générique est qu'elle permet d'éliminer le clone tumoral tout en préservant les lymphocytes B exprimant des  $Ig\lambda$  (soit environ 40% de la population B totale). Il est utile pour traiter les maladies dans lesquelles l'Ig incriminée est une  $Ig\kappa$ .

- Mélange d'AON ciblant tous les segments J de chaînes légères *lambda*

Un tel mélange permettrait de détruire sélectivement la population  $Ig\lambda$  qui représente environ 40% des cellules de la lignée B. L'avantage d'une telle approche générique est qu'elle permet d'éliminer le clone tumoral tout en préservant les lymphocytes B exprimant des  $Ig\kappa$  (soit environ 60% de la population B totale). Il est utile pour traiter les maladies dans lesquelles l'Ig incriminée est une  $Ig\lambda$ .

- Mélange d'AON ciblant tous les segments J de chaînes lourdes

Une telle approche permettrait de détruire l'ensemble des lymphocytes B, c'est-à-dire de réaliser une immunosuppression.

Ainsi, il est à noter que dans le cadre de l'invention, le terme « un AON » peut être remplacé par « un mélange d'AON » sans que cela n'affecte les utilisations et méthodes décrites.

Le choix de l'AON permettant le ciblage des séquences décrites précédemment est à la portée de l'homme du métier. De tels AON peuvent être obtenus auprès de sociétés commerciales spécialisées dans la préparation d'AON à façon.

La présente invention a également pour objet une méthode de sensibilisation pour le traitement du MM par la voie des inhibiteurs du protéasome, consistant à administrer un AON capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères ou d'au moins une partie de sa région constante sur les chaînes lourdes, au sein du clone B responsable du MM.

L'invention concerne également un AON capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères ou d'une partie de sa région constante sur les chaînes lourdes, pour son utilisation dans le traitement du myélome multiple en combinaison avec un inhibiteur de la voie du protéasome.

Le traitement de choix pour le MM est actuellement le Bortezomib (Bz), un inhibiteur du protéasome. Toutefois, ce traitement présente des effets secondaires importants et certains patients sont ou deviennent résistants.

Il est à noter que l'utilisation conjointe d'un inhibiteur de hsp90 et du Bortezomib (Bz) présente des effets synergiques, en provoquant respectivement une augmentation du taux de protéines mal repliées et une diminution de leur dégradation par le protéasome (Richardson DG et al., Br J Haematol 2011). Par conséquent, des protocoles thérapeutiques visant à augmenter le stress cellulaire pour sensibiliser les cellules au traitement Bz semblent donc très prometteurs, et particulièrement adaptés aux patients résistants au Bz. Ces traitements combinés pourraient également permettre d'administrer aux patients atteints de MM des doses plus faibles de Bz ou d'espacer les périodes de traitements. Par « traitement combiné », on entend une administration concomitante de l'inhibiteur du protéasome et de l'AON ou d'un mélange d'AON selon l'invention, ou l'administration séquentielle de ces médicaments.

Dans ce contexte, les inventeurs proposent d'utiliser l'approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'AON telle que décrite dans la présente invention en combinaison avec un traitement au Bz chez les patients atteints de MM.

Cette approche combinée peut être réalisée avec du Bz mais aussi avec tout autre inhibiteur du protéasome.

Parmi les autres inhibiteurs de protéasome qui pourraient être utilisés en association avec un AON ou un mélange d'AON selon l'invention, on peut citer le carfilzomib (Kyprolis™), et d'autres molécules actuellement en développement telles que le marizomib, l'ixazomib (MLN-978), le delanzomib (CEP-18770) et l'ONX-912.

Les avantages de la présente invention ressortent de l'exposé de ces modes de réalisation et de ses applications. En particulier, les approches thérapeutiques proposées sont non-invasives et permettent un ciblage précis de la population de cellules de la lignée B à détruire. Ainsi, les effets secondaires devraient être limités. De plus, l'efficacité peut être modulée en administrant des mélanges d'AON. Ces caractéristiques rendent cette approche très attractive par rapport aux traitements actuels, en particulier du fait qu'ils sont généralement lourds à supporter pour les patients et sans être satisfaisants d'un point de vue thérapeutique.

Les AON utiles dans la cadre de la présente invention peuvent être administrés sous toute forme galénique appropriée. Actuellement, de nombreuses approches thérapeutiques utilisant des AON sont en cours d'essais précliniques et/ou cliniques (Moreno et Pêgo, 2014).

Les exemples qui suivent ont pour but d'illustrer certains modes de réalisation de l'invention et ne doivent pas être considérés comme limitant sa portée.

## LEGENDES DES FIGURES

**Figure 1: Mise en évidence du saut d'exon et analyse de l'impact des Ig tronquées dans des lignées B de souris.** A) Constructions utilisées pour la transfection des lignées B de souris (S194, Sp2/O). Les différentes constructions permettent l'expression des transcrits de chaînes légères Ig $\kappa$  fonctionnels (F) ou non-fonctionnels (V<sup>stop\*</sup>, C<sup>stop\*</sup>). B) Analyse par RT-PCR de l'expression des ARN messagers Ig $\kappa$ , normaux ou dépourvus de l'exon variable («  $\Delta V$ - $\kappa$ LC : V domain-less  $\kappa$  light chains »). C) Analyse protéique (Western Blot anti-Ig $\kappa$  de souris) des chaînes légères Ig $\kappa$  normales ( $\kappa$ LC : ~25 KD) et tronquées ( $\Delta V$ - $\kappa$ LC : ~12 KD) réalisées sur les cellules SP2/O transfectées ou non (NT), avec ou sans traitement par un inhibiteur du protéasome (MG132 : 1 $\mu$ M, 8h). D) Index apoptotique des cellules S194 représentant l'augmentation des cellules S194 Annexin V positives (%) après traitement par du MG132 (1 $\mu$ M, 5h). E) L'expression relative de Chop a été analysé par PCR quantitative sur les cellules S194 traitées ou non au MG132 (1 $\mu$ M, 5h). « stop\* : codon stop prématuré consécutif à un décalage du cadre ouvert de lecture lors de la jonction des segments V et J ».

**Figure 2: Génération et analyse du modèle de souris iTIE (« inducible Truncated-Ig expression ») permettant l'expression inductible d'une Ig tronquée.** A) Schéma représentatif du modèle permettant de produire une Ig tronquée (L : exon leader ; C $\kappa$  : exon constant C $\kappa$ ). Les animaux iTIE/+ ont été croisés avec des souris exprimant la recombinaison Cre pour éliminer le gène NeoR et permettre l'expression des transcrits courts L-C $\kappa$  sans exon variable. B) Mise en évidence des Ig



tronquées («  $\Delta V$ - $\kappa$ LC : . V domain-less  $\kappa$  light chains ») uniquement dans les souris exprimant la recombinaison Cre ( $Cre^{pos}$ ). Analyse protéique (Western Blot anti-Ig $\kappa$  de souris) des chaînes légères Ig $\kappa$  normales ( $\kappa$ LC : ~25 kD) et tronquées ( $\Delta V$ - $\kappa$ LC : ~12 kD) par Western Blot (anti-Ig $\kappa$  de souris). L'administration de Bortezomib (Bz) a été réalisée par voie intrapéritonéale chez les souris iTIE comme indiqué dans la partie « méthodes ». C) Analyse par cytométrie en flux des populations de cellules B ( $B220^{pos}$ ) et de plasmocytes ( $B220^{neg}$  CD138 $^{pos}$ ), réalisée sur des cellules de rate d'animaux homozygotes iTIE/iTIE exprimant ou non la recombinaison Cre, 7 jours après immunisation par des globules rouges de mouton. D) Analyse des taux d'Ig réalisée sur sérum de souris âgées de 8 à 12 semaines, réalisée par ELISA comme indiqué dans la partie « méthodes ». E) Les plasmocytes ont été triés comme indiqué dans le panel C et l'analyse des transcrits a été réalisée par PCR quantitative après normalisation par rapport à l'expression de Gapdh.

**Figure 3: Elaboration d'un AON ciblant le site donneur d'épissage du segment J $\lambda$ 2.** Schéma représentant la séquence d'ADN des transcrits Ig $\lambda$  identifiés dans la lignée RPMI8226 (en majuscule : la séquence du segment J $\lambda$ 2 ; en minuscule : la séquence intronique située en 3' de J $\lambda$ 2). Un AON (en gras) capable de s'hybrider sur les transcrits primaires, au niveau du site donneur d'épissage du segment J $\lambda$ 2 (séquence soulignée) a été synthétisé. (L: exon « leader » ; VJ : exon variable ; C : exon constant). La séquence de cet AON correspond à la SEQ ID NO.5.

**Figure 4: Administration d'un AON dans les cellules de myélome RPMI8226.** A) Transfection des cellules par un AON capable de s'hybrider sur les transcrits primaires Ig $\lambda$ , en ciblant le site donneur d'épissage du segment J $\lambda$ 2. L'AON a été synthétisé par l'entreprise Gene Tools. B-C) RT-PCR (B) et analyse protéique par Western Blot (C, anti-hIg $\lambda$ ) mettant en évidence l'élimination de l'exon variable par saut d'exon après la transfection des cellules par l'AON. D) Analyse par PCR quantitative des transcrits Chop et BiP normalisée par rapport à l'expression de Gapdh. (E) Schéma d'élaboration d'un AON ciblant le site donneur d'épissage du segment J $\lambda$ 2 représentant la séquence d'ADN des transcrits Ig $\lambda$  identifiés dans la lignée RPMI8226 (en majuscule : la séquence du segment J $\lambda$ 2 ; en minuscule : la séquence intronique située en 3' de J $\lambda$ 2). Un AON (en gras) capable de s'hybrider sur les transcrits primaires, au niveau du site donneur d'épissage du segment J $\lambda$ 2 (séquence soulignée) a été synthétisé. (L: exon « leader » ; VJ : exon variable ; C : exon constant).

**Figure 5: Forcer le saut d'exon pour produire des Ig tronquées toxiques dans les plasmocytes.** Schéma représentant l'administration d'un oligonucléotide antisens (AON) ciblant le site donneur d'épissage du segment J $\kappa$ 5. L'hybridation de l'AON sur les transcrits primaires Ig $\kappa$  provoque

l'élimination de l'exon variable VJ lors de l'épissage. Les transcrits courts permettent la synthèse massive d'une chaîne d'Ig dépourvue de domaine variable toxique dans la lignée lymphoïde B.

**Figure 6: Expression d'une chaîne lourde  $\mu$  et passage de la forme membranaire à la forme sécrétée.** Dans les lymphocytes B et les plasmocytes, les Ig (ici une chaîne lourde  $\mu$ ) sont respectivement produites sous forme membranaire et sécrétée. Les Ig membranaire sont produites par utilisation du site donneur d'épissage interne au CH4 qui est épissé sur le premier exon de membrane (M1), le site de polyadénylation (polyA) utilisé se situant ainsi après le deuxième exon de membrane (M2). Les plasmocytes quant à eux produisent essentiellement des Ig sous forme sécrétée. Dans le cas d'une chaîne lourde  $\mu$  sécrétée, le site d'épissage interne au CH4 n'est pas utilisé, le transcrit comprend ainsi la partie 3' de cet exon (représentée en jaune) et utilise le site de polyA situé directement en aval (adapté de Lefranc et al., 1999).

**Figure 7: Forcer le saut d'exon pour produire des chaînes lourdes tronquées dépourvues de domaine V.** Schéma représentant l'administration d'un oligonucléotide antisens (AON) ciblant le site donneur d'épissage du segment J. L'hybridation de l'AON sur les transcrits primaires provoque l'élimination de l'exon variable VDJ lors de l'épissage. Les transcrits courts permettent la synthèse massive d'une chaîne d'Ig dépourvue de domaine variable.

**Figure 8: Forcer le saut d'exon pour produire des chaînes lourdes tronquées au niveau d'un exon du domaine constant.** Schéma représentant l'administration d'un oligonucléotide antisens (AON) ciblant le site donneur d'épissage d'un exon constant (CH1). L'hybridation de l'AON sur les transcrits primaires provoque l'élimination de l'exon constant (CH1) lors de l'épissage. Les transcrits courts permettent la synthèse massive d'une chaîne d'Ig dépourvue d'un des domaines constants (CH1).

## MATERIELS ET METHODES

### Obtention et analyse des souris transgéniques iTIE

Le modèle de souris iTIE (inducible Truncated-Ig expression) présente une modification génétique au locus des chaînes légères  $Ig\kappa$ , obtenue par recombinaison homologue comme décrit précédemment (Sirac et al., 2006). Les segments  $J\kappa$  de souris ont été remplacés par une cassette contenant un promoteur (pVH), un exon leader (L1-33) et un gène de résistance à la néomycine (NeoR) entouré de sites loxP. La transcription du gène NeoR, en orientation opposée, permet de bloquer la transcription et/ou l'épissage de l'exon leader (Figure 2A).

Des souris âgées de 2 ou 3 mois ont été utilisées dans toutes les expériences, réalisées conformément aux Directives du Comité d'éthique pour l'expérimentation animale du Limousin (enregistrées par le comité national sous le numéro C2EA-33) et approuvés en tant que partie du protocole enregistré sous le numéro CREEAL 6-07-2012. Les souris mutantes hétérozygotes (iTIE/+) ont été croisées avec des souris C57BL/6 (B6) pendant au moins 3 générations, et croisées ensuite avec des souris exprimant un Cre pour induire la délétion de la cassette NeoR. Les souris B6 CMV-Cre proviennent de la Clinique de la souris (Illkirch, France).

Pour analyser le développement tardif des lymphocytes B, les cellules ont été isolées à partir de rate de souris iTIE, 7 jours après leur immunisation par injection intra-péritonéale (200  $\mu$ l/souris) de globules rouge de mouton (GR, BioMérieux®SA-France). Dans la figure 2B, les souris ont reçu des injections additionnelles de Bortezomib (Sillag), par voie sous-cutanée (0.5 mg/kg) aux jours 5 et 6. L'analyse des cellules B et des plasmocytes a été réalisée par cytométrie en flux, après marquage par des anticorps anti-GL7, anti-B220 et anti-CD138 (BD Biosciences).

### **Transfection cellulaire**

Les lignées murines (A20, S194 and Sp2/0) ont été cultivées ( $10^6$  cellules/ml) dans un milieu RPMI complété avec 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), du pyruvate de sodium, des acides aminés non essentiels, du  $\beta$ -mercaptoethanol, 100 U/ml de pénicilline et and 100  $\mu$ g/ml de streptomycine (Gibco). Les cellules ( $2 \times 10^6$ ) ont été transfectées de manière stable par électroporation conformément aux instructions du fabricant (Amaxa). Les réarrangements  $V_{\kappa}J_{\kappa}5$  sont créés par jonction des segments  $V_{\kappa 1-135}$  et  $J_{\kappa}5$ . Lors de la jonction, des nucléotides sont intégrés pour créer un décalage du cadre de lecture mimant des réarrangements non-fonctionnels. Les transfections ont été réalisées en utilisant une construction plasmidique respectant le cadre de lecture (F), et les constructions non-productives  $V^{PTC}$  et  $C^{PTC}$  soit séparément, soit en mélange équimolaire de F et de  $V^{PTC}$  ou  $C^{PTC}$  comme décrit précédemment (Chemin et al., 2010). Les cellules transfectées ( $1 \times 10^6$ /ml) ont été traitées par un inhibiteur du protéasome le MG132 (Sigma-Aldrich) (1 $\mu$ M).

Les cellules ( $3 \times 10^6$ ) de myélome (lignée RPMI8226) ont été transfectées avec différentes concentrations d'oligonucléotide antisens (1, 5 ou 10  $\mu$ M d'AON-J $\lambda$ 2 : 5'AGAAGAGACTCACGTAGGACGGTCA (SEQ ID NO.5); GeneTools, LLC), par électroporation conformément aux instructions du fabricant (Amaxa). Les analyses ont ensuite été réalisées 24 et 48h après la transfection.

### Analyse protéique

Pour l'analyse Western Blot, des gels de polyacrylamide 4-20% (Biorad) ont été utilisés. Chaque échantillon a ensuite été dénaturé à 94 ° C pendant 3 minutes avant d'être chargé. Les gels ont été transférés sur des membranes de fluorure de polyvinylidène (Biorad) avec un appareil TransBlot® Turbo™. Le blocage des membranes a été réalisé dans un tampon PBST (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1à mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% de Tween® 20, pH 7,4) contenant 5% de lait écrémé en poudre. Le signal a été mesurée par chimioluminescence (ECL plus ; GE Healthcare). Des anticorps de lapin dirigés contre les protéines de souris HERP (Santa Cruz Biotechnology), CHOP, BIP, IRE1α (Cell Signaling Technology), de chèvre anti-Igκ (Beckman Coulter) et anti-GAPDH (R & D Systems) de souris. L'intensité du signal GAPDH a été utilisée pour la normalisation entre les échantillons.

Les analyses par ELISA permettant de déterminer les taux d'Ig ont été réalisées à partir de sérum ou de surnageants de culture, en utilisant des anticorps de mouton dirigés contre les Ig de souris (IgM, IgG1, IgG3, IgG2b, Igκ, Igλ and total IgG) (Southern Biotechnology) comme indiqué précédemment (Pinaud et al., 2001; Sirac et al., 2006). Après addition de p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) pour permettre la révélation enzymatique, les plaques ont été lues à une longueur d'onde de 405 nm.

### PCR and RT-PCR

Pour analyser les réarrangements VJ, les amplifications ont été réalisées à l'aide de couples spécifiques des Igλ humaines (Sens Leader-consensus : 5'-ATGGCCTGGDYVYDCTVYTYCT (SEQ ID NO.1); avec D = A ou G ou T, Y = C ou T, V = A ou C ou G, et antisens Cλ-AS : 5'-CTCCGGGTAGAAAGTCACT (SQ ID NO.2)), ou spécifiques des Igκ de souris (L<sub>1-135</sub>-S : 5'-TCGGTTACCATTGGACAAC (SEQ ID NO.3) et Cκ-AS : 5'-GCACCTCCAGATGGTTAACTGC (SEQ ID NO.4)). Après clonage des produits d'amplification dans le vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) et séquençage, les jonctions VJ ont été analysées en utilisant le logiciel V-QUEST (The international ImMunoGeneTics information system®).

Les PCR quantitatives ont été réalisées sur un appareil ABI PRISM 7000 en utilisant des amorces et des sondes Taqman spécifiques de chaque gène, commercialisées par Life Technologies. La quantité relative des différents transcrits a été déterminée par la méthode standard  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  après normalisation sur l'expression de Gapdh.

## Analyse statistique

La moyenne et l'écart type de la moyenne sont représentés. L'analyse statistique des différences entre les valeurs a été calculée à l'aide d'un test de Student en utilisant le logiciel Prism GraphPad (San Diego, CA).

## RESULTATS

### **Exemple 1 : Impact de l'expression d'Ig tronquées dans des plasmocytes normaux.**

#### **1.1 Production d'Ig tronquées *in vitro***

Afin d'analyser les conditions du saut d'exon, des lignées cellulaires B de souris (S194 et Sp2/O) ont été transfectées avec des constructions permettant l'expression de différents types de transcrits de chaînes légères Ig $\kappa$  (Figure 1A) :

- des transcrits Ig $\kappa$  fonctionnels avec un réarrangement VJ en phase
- des transcrits Ig $\kappa$  non-fonctionnels avec des codons non-sens, soit à l'extrémité 3' de l'exon VJ (construction V<sup>stop\*</sup>), soit dans l'exon C (construction C<sup>stop\*</sup>), issus d'un décalage du cadre de lecture lors de la jonction des segments V et J.

L'analyse au niveau transcriptionnel (Figure 1B) et protéique (Figure 1C) montre que la délétion de la région V, consécutive à un « saut » de l'exon VJ lors de l'épissage, est effective principalement lorsque l'exon V lui-même contient un codon non-sens (construction V<sup>stop\*</sup>).

Il est connu que la survie des plasmocytes dépend de leur capacité à supporter la réponse au stress au niveau du RE associée à la synthèse massive d'Ig (Cenci et al., 2011). De ce fait, les inventeurs ont voulu vérifier si la production d'Ig tronquées, *i.e.* avec des structures et des repliements anormaux, pouvait impacter la survie des plasmocytes. A cette fin, ils ont analysé l'index apoptotique au regard de l'abondance des chaînes Ig $\kappa$  tronquées («  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs : V-domain less  $\kappa$  light chains »). Ils ont ainsi montré que les cellules exprimant la construction V<sup>PTC</sup> présentent un niveau d'apoptose supérieur à celui des cellules non transfectées (NT) ou exprimant la construction C<sup>stop\*</sup> (Figure 1D). De plus, la quantification des ARNm de Chop (C/EBP homologous protein), un facteur de transcription impliqué dans l'apoptose induite par un stress du RE (Figure 1E), révèle une augmentation de l'expression de cet ARNm d'un facteur de plus de 2 par rapport à la quantité présente dans les cellules non transfectées. Par conséquent, la présence de chaînes  $\Delta$ V- $\kappa$ LCs semble provoquer une augmentation du stress au niveau du RE qui sensibilise les plasmocytes à l'apoptose dépendante de CHOP.

## 1.2 Production d'Ig dans un modèle murin iTIE

Afin d'étudier l'impact de la production d'Ig tronquées sur le développement des lymphocytes B et la réponse humorale, un modèle animal présentant une modification génétique au locus des chaînes légères Ig $\kappa$  a été utilisé. Celui-ci permet d'induire à dessein la synthèse d'Ig tronquées. La stratégie utilisée pour construire ce modèle animal iTIE (inducible Truncated-Ig Expression) est présentée à la Figure 2A. L'activation de la transcription du locus Ig $\kappa$  modifié à l'aide d'une recombinaison Cre permet l'expression d'un ARNm dépourvu de la région V (Figure 2A) ainsi que celle d'une protéine tronquée correspondante (Figure 2B). Ce modèle a permis de mettre en évidence que l'expression d'Ig tronquées ( $\Delta$ V- $\kappa$ LCs) affecte la survie des plasmocytes normaux (Figure 2C) et la réponse humorale (Figure 2D). Cette toxicité peut être associée à l'expression de marqueurs du stress existant dans le RE, en particulier Chop, BiP, Herp et Xbp1s, comme le montre la Figure 2E. Ces résultats *in vivo* confirment le fait que l'expression d'Ig tronquées provoque un stress au niveau du RE qui conduit à l'apoptose des plasmocytes.

### **Exemple 2 : Augmentation de la sensibilité de lignées plasmocytaires exprimant une Ig tronquée vis-à-vis d'un traitement au Bz**

Des travaux menés par l'équipe du Dr Sirac ont mis en évidence une grande sensibilité au Bz de plasmocytes exprimant une chaîne lourde d'Ig tronquée (Bonaud *et al.*, Blood, 2015).

Les inventeurs ont maintenant montré que la présence d'Ig tronquées dépourvues de domaine variable, codées par des transcrits courts de chaînes légères Kappa sans exon variable, augmente l'apoptose des lignées plasmocytaires traitées par du MG132, un inhibiteur du protéasome (Figure 1C). En accord avec ces résultats, les Ig tronquées sont activement dégradées par le protéasome et leur quantité augmente considérablement après administration de Bz (par voie intrapéritonéale) chez les souris iTIE (Figure 2B).

### **Exemple 3 : Etude de faisabilité d'une stratégie par saut d'exon pour augmenter la synthèse d'Ig tronquée dans des plasmocytes tumoraux.**

Afin de valider le concept d'administration d'1 AON pour induire la production d'Ig tronquées, un modèle cellulaire a été utilisé. Cette expérience a consisté à éliminer l'exon variable VJ et forcer la synthèse d'Ig aberrantes dans la lignée de myélome (RPMI 8226). Cette lignée de myélome exprime une Ig $\lambda$ . Par RT-PCR, nous avons amplifié les transcrits Ig $\lambda$  pour identifier le réarrangement VJ. Après clonage et séquençage du produit d'amplification, le réarrangement VJ a été analysé sur le site IMGT. La lignée RPMI-8226 exprime un réarrangement VJ $\lambda$ 2 (IGLV2-14, IGLJ2). Ces cellules ont été

transfectées avec un AON dirigé contre le site donneur d'épissage du segment J $\lambda$ 2 (Figure 4A). Une représentation détaillée de l'hybridation de l'AON sur le transcrit primaire est présentée sur la Figure 3 et la séquence de l'AON utilisé correspond à la séquence SEQ ID NO.5. De façon intéressante, l'AON perturbe efficacement l'épissage et induit une forte augmentation des transcrits courts dépourvus de l'exon variable VJ (bande à 253 paires de bases ; Figure 4B). Au niveau protéique, l'administration d'AON induit la production des Ig tronquées sans domaine variable (Figure 4C). Les cellules transfectées avec l'AON présentent des taux élevés du facteur pro-apoptotique Chop et de la protéine chaperone BiP, soulignant ainsi le stress cellulaire consécutif à la production des Ig aberrantes (Figure 4D).

#### **Exemple 4 : Stratégies permettant l'obtention d'Ig tronquées à visée thérapeutique**

##### **4.1 Fourniture d'un AON capable d'induire un saut d'exon visant à produire des chaînes légères Ig $\kappa$ ou Ig $\lambda$ tronquées, sans domaine variable.**

Les transcrits de chaînes légères d'Ig sont composés de 3 exons : L (« leader »), VJ (variable) et C (constant).

Afin de produire une chaîne légère tronquée dépourvue du domaine variable, des oligonucléotides antisens (AON) ciblant le site donneur d'épissage de l'exon VJ peuvent être utilisés pour éliminer les exons VJ lors de l'épissage. D'un point de vue mécanistique, les inventeurs ont montré que les plasmocytes exprimant ces Ig aberrantes meurent par apoptose (Srour et al, J Exp Med, publication acceptée). Cette stratégie est représentée à la Figure 5.

##### **4.2 Fourniture d'un AON capable d'induire un saut d'exon visant à produire des chaînes lourdes tronquées.**

Une même stratégie peut être appliquée au ciblage des chaînes lourdes. Dans ce cas, les AON peuvent cibler soit l'exon variable VDJ, soit les exons constants (CH1, CH2 ou CH3).

###### **4.2.1 Rappel du mécanisme de production des chaînes lourdes $\mu$ dans les lymphocytes B et les plasmocytes.**

Le processus d'expression des chaînes lourdes  $\mu$ , soit sous forme membranaire dans les lymphocytes B, soit sous forme sécrétée dans les plasmocytes, repose sur un épissage alternatif des ARNm, comme représenté à la Figure 6.

#### **4.2.2 Fourniture d'un AON capable d'induire un saut d'exon visant à produire des chaînes lourdes tronquées, sans domaine variable.**

La production d'Ig tronquées peut aussi être induite en forçant l'élimination du domaine variable des chaînes lourdes.

L'élimination des exons variables peut être obtenue à l'aide d'un AON dirigé contre le site donneur d'épissage du segment J impliqué dans le réarrangement, après avoir identifié le réarrangement VDJ porté par le clone tumoral. Ainsi, l'ARNm mature ne contient pas de domaine variable. Cette stratégie est illustrée à la Figure 7.

#### **4.2.3 Fourniture d'un AON capable d'induire un saut d'exon visant à produire des chaînes lourdes tronquées, dépourvues d'un des domaines constants.**

La production d'Ig tronquées peut aussi être obtenue en éliminant l'un des domaines constants des chaînes lourdes des Ig, comme cela est représenté à la Figure 8.



**REVENDEICATIONS**

1. Oligonucléotide antisens ou mélange d'oligonucléotides antisens capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères, ou d'au moins une partie de sa région constante, pour son utilisation dans le traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B.
2. Oligonucléotide antisens selon la revendication 1, pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire un saut d'exon dans la région variable VJ de la chaîne légère ou VDJ de la chaîne lourde.
3. Oligonucléotide antisens selon la revendication 1, pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire un saut d'exon dans la région constante de la chaîne lourde.
4. Oligonucléotide antisens selon l'une des revendications 1 à 3, pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire un saut d'exon en s'hybridant avec une séquence qui comprend un site donneur d'épissage, un site accepteur d'épissage ou des séquences régulatrices d'épissage situées dans les régions introniques ou exoniques des régions variables ou constantes des chaînes des immunoglobulines.
5. L'oligonucléotide antisens selon la revendication 2, pour son utilisation selon la revendication 2, dans laquelle les maladies impliquant des cellules de la lignée B sont choisies parmi le myélome multiple, l'amylose AL, les lymphomes non Hodgkiniens, la leucémie lymphoïde chronique, la maladie de Waldenström et de tout autre type de cancers touchant les cellules de la lignée B et impliquant la production d'une Ig monoclonale.
6. L'oligonucléotide antisens selon la revendication 3, pour son utilisation selon la revendication 3, dans laquelle les maladies impliquant des cellules de la lignée B sont choisies parmi (i) l'allergie immédiate en ciblant les cellules B produisant des IgE, (ii) certaines pathologies immuno-allergiques impliquant des dépôts d'IgA ou impliquant des propriétés immunopathologiques spécifiques des IgA, (iii) les maladies auto-immunes spécifiques de tissus, (iv) les pathologies liées à des dépôts tissulaires de chaînes d'immunoglobulines monoclonales et (v) en transplantation.
7. Méthode de traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B comprenant l'administration chez un patient d'au moins un oligonucléotide antisens capable d'induire un saut d'exon dans l'une des régions variables ou constantes de l'une des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines.

8. Méthode selon la revendication 7 comprenant les étapes suivantes :
  - a. Identification du clone cellulaire B responsable de la maladie à partir d'un échantillon d'un patient ;
  - b. Caractérisation du réarrangement particulier de la région variable des chaînes lourdes ou légères de l'Ig exprimée par ledit clone cellulaire B ;
  - c. Fourniture d'au moins un oligonucléotide antisens capable d'induire un saut d'exon dans l'une des régions variables de l'une des chaînes des immunoglobulines dudit clone
  - d. Administration dudit oligonucléotide antisens ou mélange oligonucléotides antisens au patient.
9. Mélange d'OAN capable d'induire spécifiquement la production d'une Ig tronquée.
10. Oligonucléotide antisens ou mélange d'oligonucléotides antisens capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères ou d'une partie de sa région constante sur les chaînes lourdes, pour son utilisation dans le traitement du myélome multiple en combinaison avec un inhibiteur de la voie du protéasome.
11. Méthode de sensibilisation pour le traitement du myélome multiple par la voie des inhibiteurs du protéasome consistant à administrer un AON capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères, ou d'au moins une partie de sa région constante sur les chaînes lourdes, au sein du clone B responsable du myélome multiple.

## ABRÉGÉ

La présente invention concerne un traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B, lymphocytes B ou plasmocytes. Elle concerne en particulier un oligonucléotide antisens ou un mélange d'oligonucléotides antisens capable d'induire la production d'une immunoglobuline dépourvue de région variable sur les chaînes lourdes ou légères, ou d'au moins une partie de sa région constante, pour son utilisation dans le traitement des maladies impliquant des cellules de la lignée B.

Listage de sequences\_ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Université de Limoges  
Centre National de la Recherche Scientifique

<120> UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS POUR PRODUIRE DES IG  
TRONQUEES PAR SAUT D'EXON POUR LE TRAITEMENT DE MALADIES  
IMPLIQUANT DES CELLULES DE LA LIGNEE B.

<130> F2052/2-EMT/11

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> synthetic

<400> 1  
atggcctggd yyvydctvyt yct 23

<210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> human

<400> 2  
ctcccgggta gaagtcact 19

<210> 3  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> mouse

<400> 3  
tcggttacca ttggacaac 19

<210> 4  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> mouse

<400> 4  
gcacctccag atggttaact gc 22

<210> 5  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> human

<400> 5  
agaagagact cacgtaggac ggtca 25

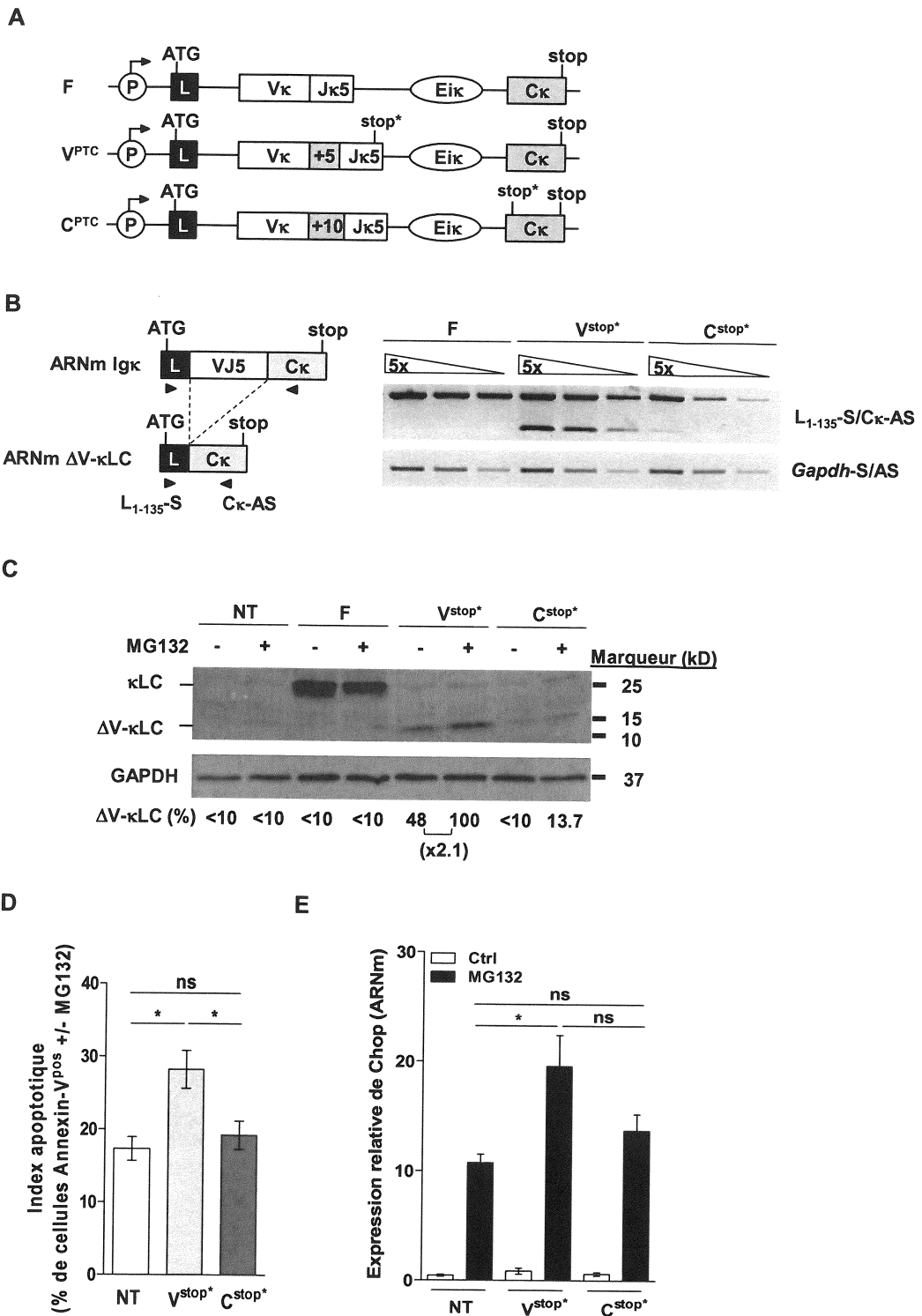


Figure 1

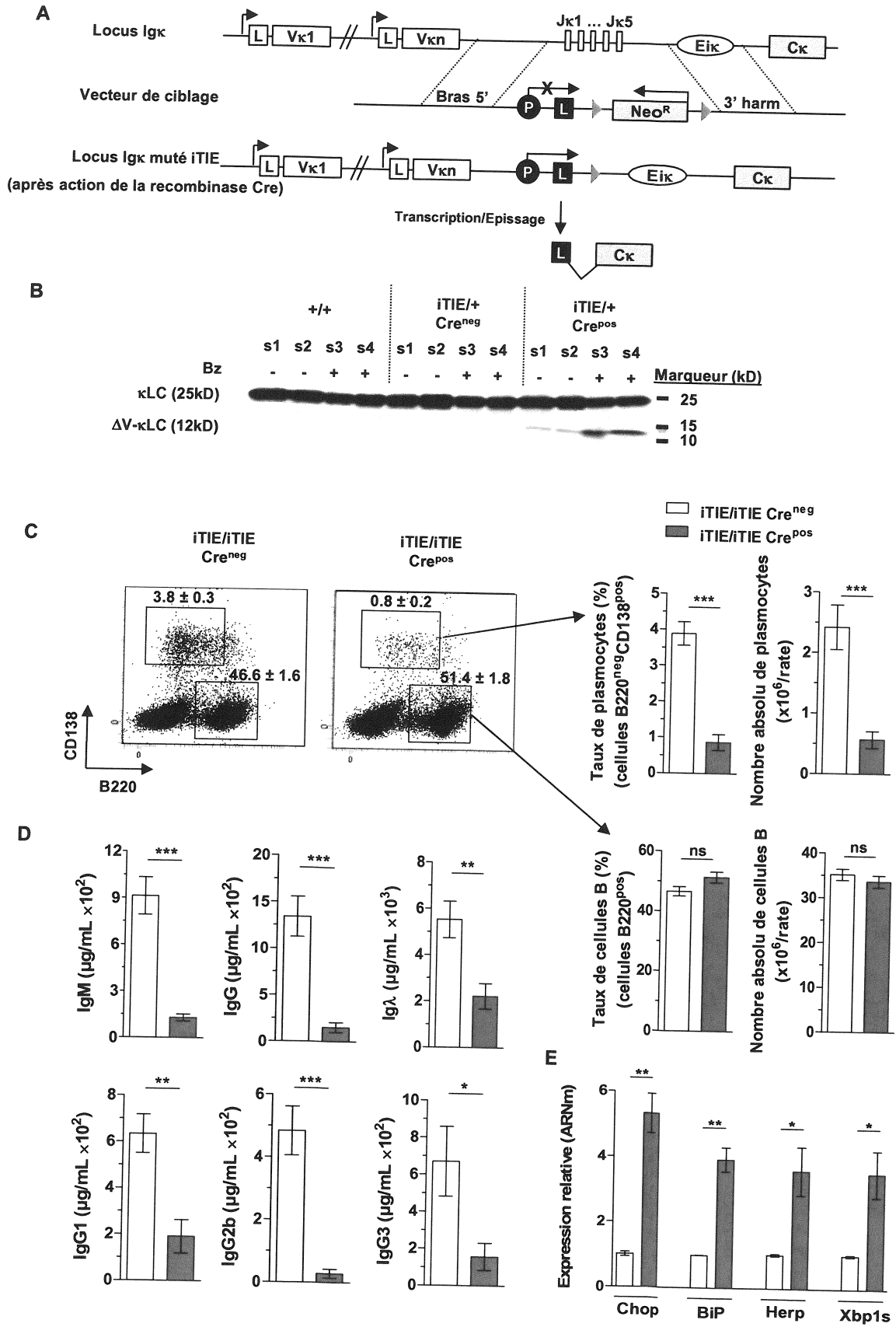


Figure 2

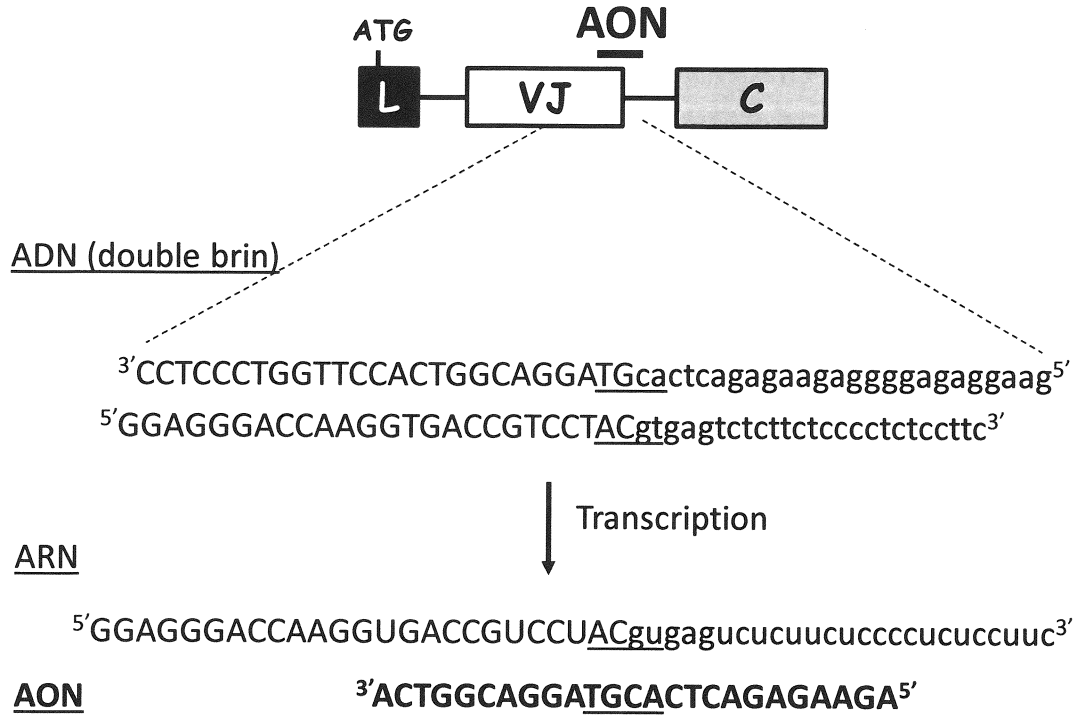


Figure 3

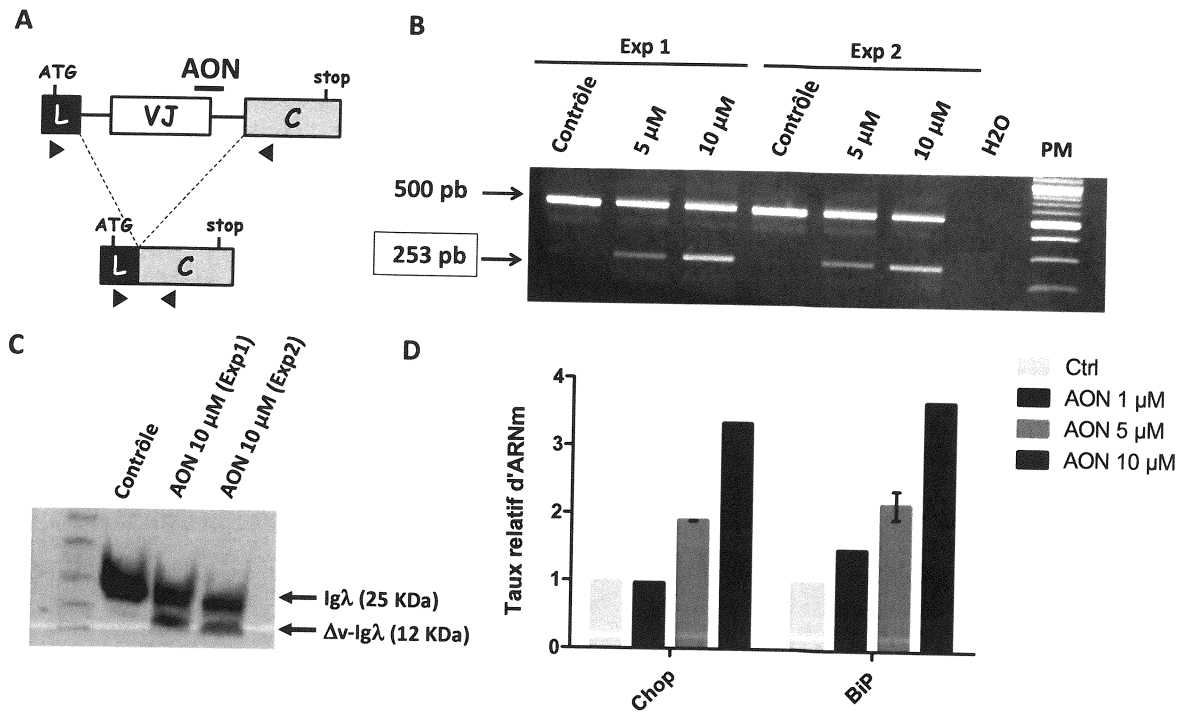


Figure 4



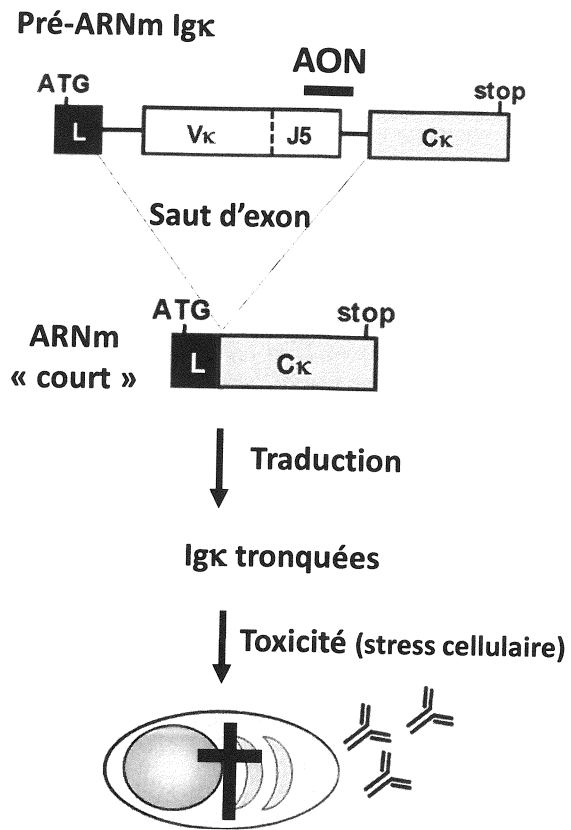


Figure 5

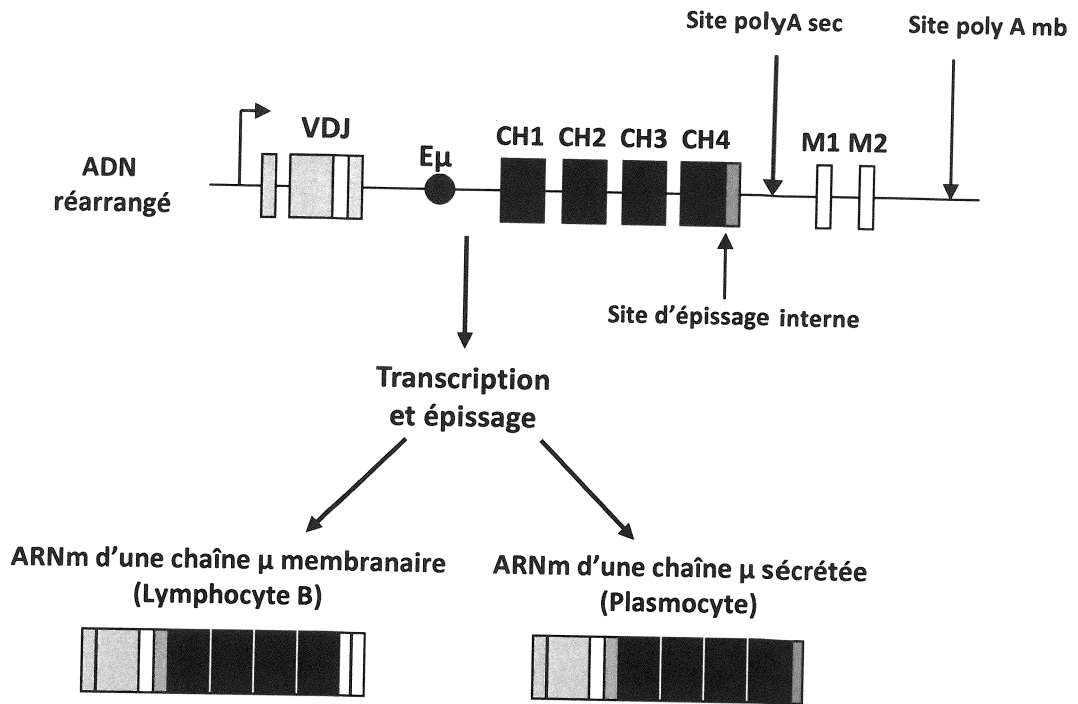


Figure 6

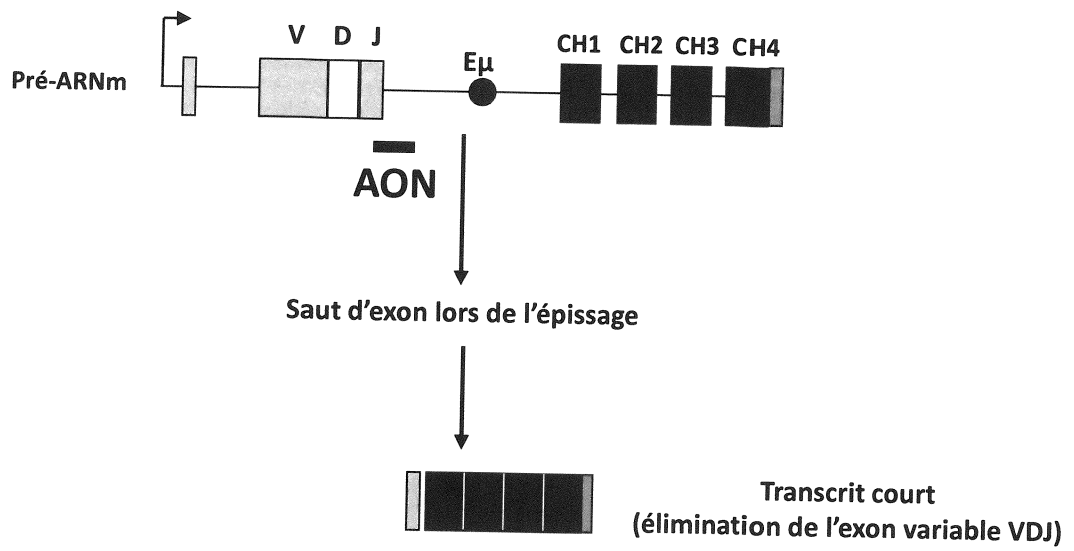


Figure 7

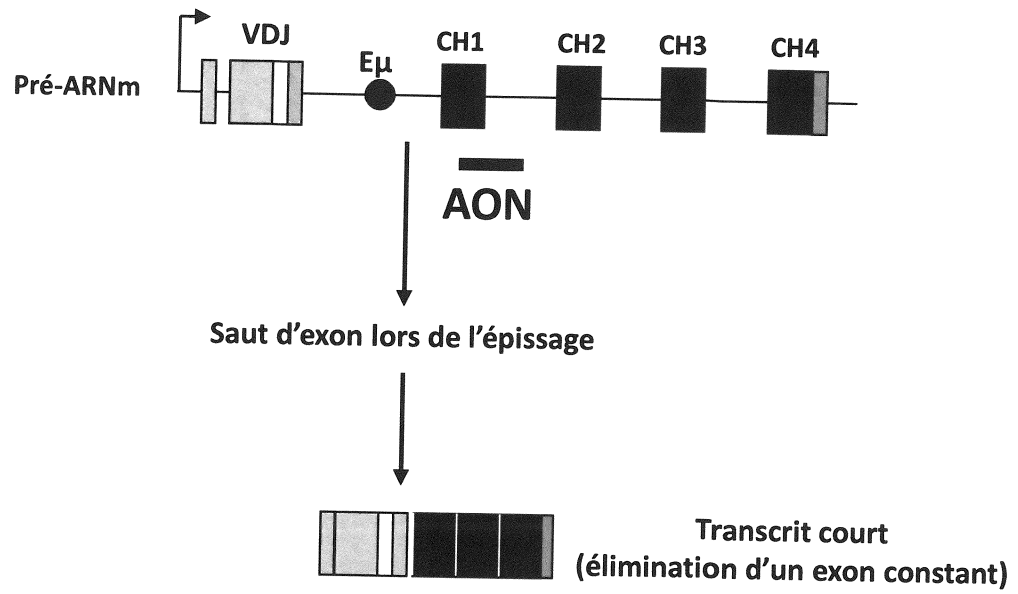


Figure 8



### Article 3. Crosstalk between unfolded protein response and nonsense-mediated mRNA decay in plasma cells

Nivine Srouf<sup>1</sup>, Mohamad Omar Ashi<sup>1</sup>, Estelle Troadec<sup>1</sup>, XXX, Christophe Sirac<sup>1</sup>, Michel Cogné<sup>1,2</sup> and Laurent Delpy<sup>1</sup>

*En préparation*

#### Objectifs :

Il est désormais admis que la dégradation des transcrits d'Ig non-sens par activation du mécanisme de NMD évite la synthèse d'Ig tronquées, et par conséquent le stress du réticulum endoplasmique (RE) (Tinguely et al., 2012). En revanche, aucune étude n'a analysé si les mécanismes impliqués dans le contrôle qualité des protéines (réponse UPR pour « *Unfolded Protein Response* », protéasome, autophagie) pouvaient influencer en retour l'efficacité de dégradation des ARNm d'Ig non-sens par NMD. Pour aborder cette question, nous avons analysé la coopération entre ces mécanismes de surveillance, agissant sur les ARNm (NMD) et sur les protéines (UPR) pour assurer le maintien de l'homéostasie cellulaire. Nous avons utilisé le modèle iTIE décrit dans l'Article 1 pour créer une situation de stress protéique. Dans ce modèle la production d'Ig tronquées augmente l'expression de marqueurs de stress du RE et de la réponse UPR dans les cellules de lignage B. Dans cette étude, nous avons croisé le modèle iTIE avec le modèle IgH<sup>frvk</sup> pour évaluer la dégradation par NMD des ARNm IgH<sup>frvk</sup> non-sens dans un contexte de stress du RE.

#### Méthodologie :

L'activation des cellules B entraîne une augmentation massive de la synthèse d'Ig. Parallèlement, ces cellules blastiques expriment fortement des marqueurs de stress du RE et de la réponse UPR. Afin de tester notre hypothèse, nous avons étudié l'impact de la stimulation des cellules B sur l'efficacité du NMD. Pour cela nous avons utilisé le modèle murin KI IgH<sup>frvk/wt</sup> (**Figure 1A**), permettant de quantifier l'efficacité du NMD sur des cellules B primaires (Tinguely et al., 2012). Dans ce modèle, l'expression de l'allèle *wild-type* permet un développement B normal et la dégradation des transcrits non-productifs (ou



efficacité du NMD) est mesurée suite au traitement des cellules avec des inhibiteurs du NMD : le cycloheximide (CHX), inhibiteur de la traduction, utilisé classiquement pour inhiber le NMD et la wortmannin (Wort), moins toxique que le CHX. Cette molécule inhibe la phosphorylation d'Upf1 *via* la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-related kinase Smg1. La dégradation par NMD des ARNm IgH<sup>frVκ</sup> a été analysée par q-PCR après 3 jours de stimulation des cellules B spléniques dans différentes conditions (LPS : 1μg/ml, LPS+IL-4 :20ng/ml ou αCD40 5μg/ml +IL-4). L'expression des marqueurs impliqués dans le stress du RE et dans la réponse UPR a été analysée par q-PCR et par Western Blot. La même stratégie a été appliquée dans le modèle iTIE::IgH<sup>frVκ</sup>. Ce modèle permet d'étudier l'activité du NMD dans des conditions de stress protéique.

### Résultats:

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité du NMD des transcrits IgH non-sens dans des cellules B spléniques de souris IgH<sup>frVκ/wt</sup>, stimulées 3 jours avec différents stimuli. Nos résultats montrent une dégradation efficace des ARNm non-sens IgH<sup>frVκ</sup> dans les cellules B activées quelle que soit la nature du stimulus, T indépendant ou T-dépendant (**Figure 1B**). Nous avons également montré que cette activation est suivie par une augmentation de l'expression des facteurs impliqués dans la réponse UPR (**Figure 1C**). Dans un second temps, nous avons étudié la dégradation des transcrits non-sens IgH<sup>frVκ</sup> dans un contexte de stress. Pour cela, nous avons utilisé le modèle iTIE::IgH<sup>frVκ</sup>. Nous avons d'abord quantifié les taux de pré-ARNm IgH<sup>frVκ</sup> pour vérifier que la transcription de cet allèle non-productif est similaire dans les modèles IgH<sup>frVκ</sup> et iTIE::IgH<sup>frVκ</sup>, et que le traitement avec la Wort n'a pas d'impact sur cette transcription (**Figure 2A**). Après avoir contrôlé ces niveaux de pré-ARNm, nous avons ensuite analysé la dégradation par NMD des ARNm IgH<sup>frVκ</sup>. De façon intéressante, cette dégradation des transcrits IgH non-sens est plus marquée dans les souris iTIE::IgH<sup>frVκ</sup> comparativement aux souris IgH<sup>frVκ/wt</sup> (**Figure 2B**). En parallèle, nous avons suivi par q-PCR et par Western Blot l'expression des facteurs de la réponse UPR. En accord avec les données obtenues précédemment lors de l'Article 1, la quantification montre une augmentation de l'expression des gènes de la réponse UPR dans le modèle iTIE::IgH<sup>frVκ</sup> (**Figure 2C-D**). Ces résultats mettent donc en évidence une augmentation simultanée de la dégradation des transcrits IgH non-sens par NMD et de la réponse UPR.





## Discussion & Conclusion :

Ces données montrent pour la première fois une coopération entre les mécanismes de NMD et de surveillance protéique dans les cellules B activées (**Figure 3**). En d'autres termes, la synthèse massive des Ig s'accompagne d'un renforcement des mécanismes de surveillance, pour limiter l'apparition excessive d'Ig mal repliées ou tronquées et de l'apoptose des cellules par activation du TIE-checkpoint.

Plusieurs études ont démontré que les principaux composants de la réponse UPR sont activés dans les cellules B stimulées, produisant de grandes quantités d'anticorps (Gass et al., 2002, 2004; Aragon et al., 2012). L'expression accrue des protéines chaperonnes BiP et GRP94, ainsi que du facteur de transcription *Xbp-1* vont initier le programme de différenciation plasmocytaire et permettre la synthèse massive d'Ig. Au cours de cette différenciation, deux évènements majeurs vont avoir lieu : (i) un clivage de la protéine ATF6 $\alpha$  et (ii) un épissage non conventionnel de l'ARNm *Xbp-1* donnant lieu à une forme épissée, *Xbp-1s*, activateur majeur de la voie UPR. Dans ce même contexte, Gass *et al.*, ont démontré qu'au contraire la voie PERK conduisant à une inhibition de la synthèse protéique par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , n'est pas induite dans les plasmocytes (Gass et al., 2008). L'activation sélective des voies IRE1 $\alpha$  et ATF6 de l'UPR permet donc une sécrétion maximale d'anticorps par les plasmocytes. Nos résultats montrent pour la première fois que la dégradation par NMD des transcrits IgH non-sens augmente en situation de stress protéique. Ces données suggèrent donc l'existence d'une boucle de régulation qui permet d'atténuer le stress du RE en limitant l'expression d'Ig tronquées, et a pour conséquence de maintenir l'homéostasie cellulaire en évitant l'activation du TIE-checkpoint.

En revanche, d'autres études ont mis en évidence une corrélation inverse entre la réponse UPR et l'activité du NMD des cellules non lymphoïdes (Gardner, 2008; Oren et al., 2014; Karam et al., 2015). Dans ces cellules, l'inhibition du NMD est la conséquence d'une activation de la voie PERK et de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  pour diminuer globalement la traduction et atténuer ainsi le stress du RE. Le mécanisme de NMD étant dépendant de la

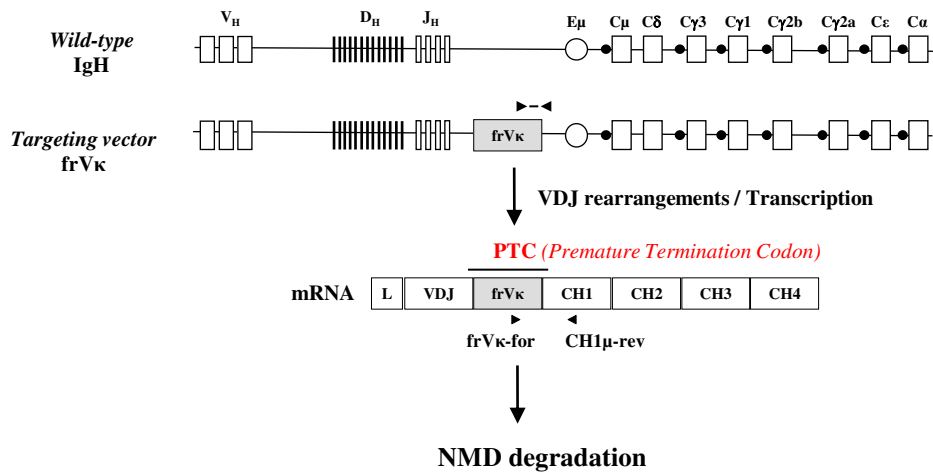


traduction, la diminution globale de la synthèse protéique par phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  conduit à une inhibition de ce mécanisme de surveillance des ARNm.

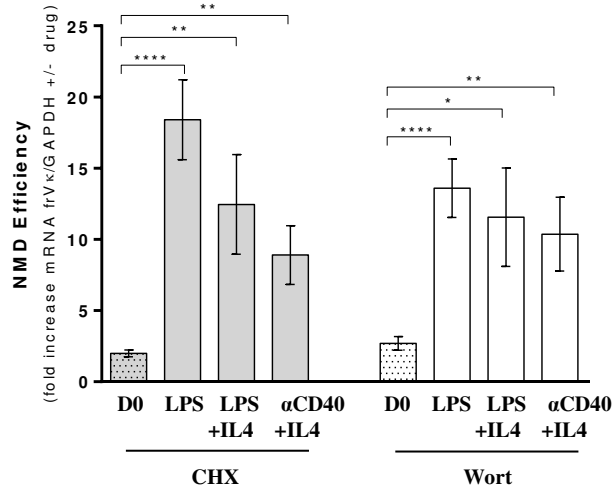
La voie PERK étant réprimée dans les plasmocytes afin de permettre la synthèse massive d'Ig (Gass et al., 2008; Ma et al., 2010), l'ensemble de nos données suggère que selon la voie activée lors de la réponse UPR, la dégradation par NMD peut être soit activée (voies IRE1 $\alpha$  et ATF6) soit inhibée (voie PERK). Dans les cellules sécrétrices d'anticorps, l'activation du NMD apparaît comme un moyen de survie efficace, limitant l'apparition d'Ig tronquées et l'apoptose associée à un stress excessif du RE. Cette coopération entre NMD et réponse UPR empêche donc une activation généralisée du TIE-checkpoint qui conduirait à l'élimination massive des plasmocytes.



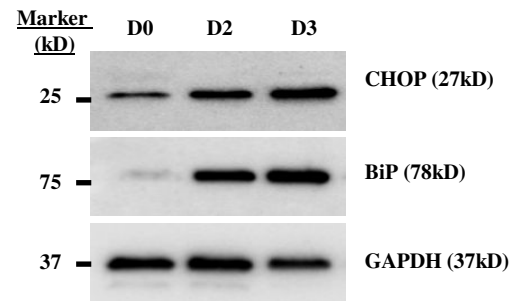
**A Heterozygous mouse IgH<sup>frVκ/wt</sup>**



**B**



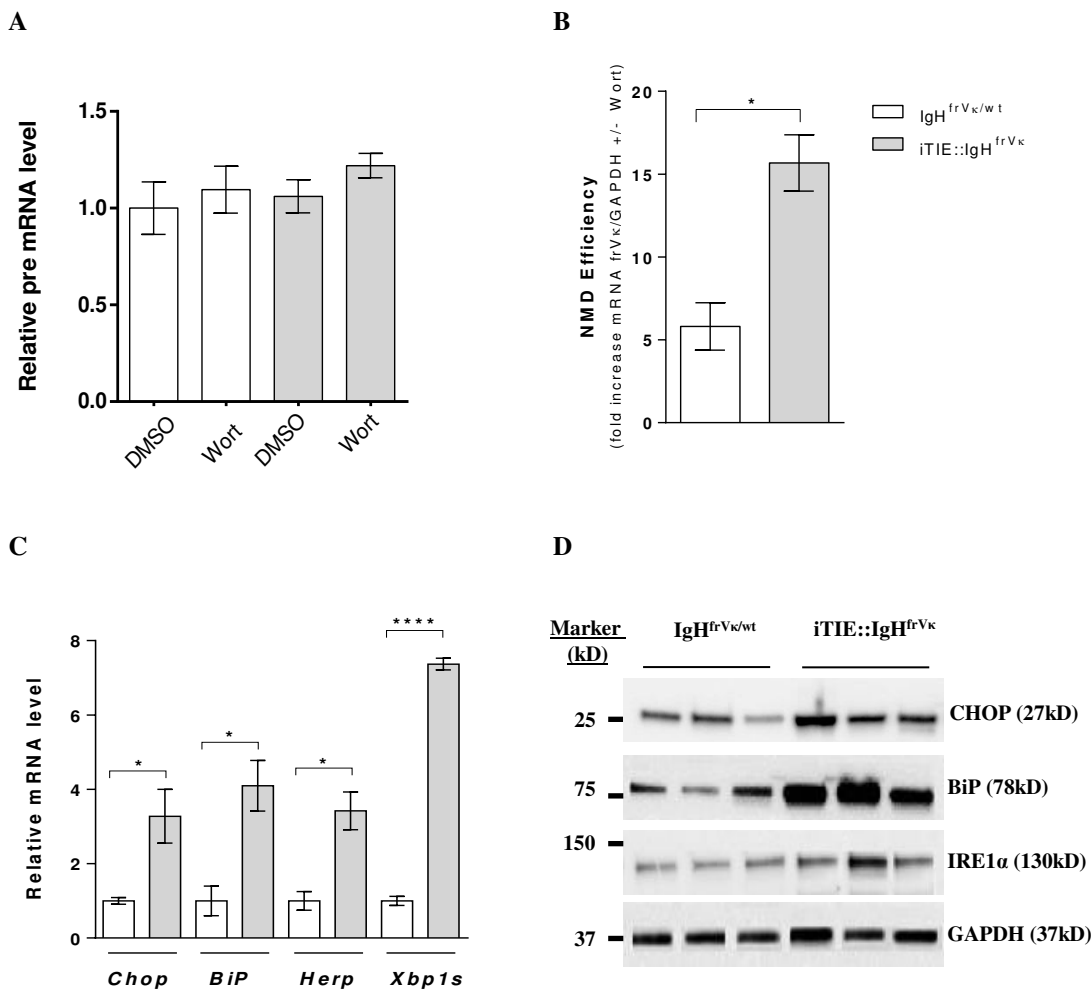
**C**



**Figure 1. Increase of both NMD degradation and UPR response upon B cell activation.**

(A) Schematic representation of wild-type and targeted IgH loci in IgH<sup>frVκ/wt</sup> knock-in mice. In this model, B cells develop normally through the expression of wild-type allele. After VDJ recombination, premature termination codons (PTC) appear on IgH<sup>frVκ</sup> allele and these nonsense transcripts can be degraded by NMD. (B) The degradation of nonproductive IgH mRNA (referred as NMD efficiency) was assessed by RT-qPCR using primers frVκ-for and Cμ-rev represented by black arrows in resting (D0, dotted bars) and stimulated B-cells (empty bars) (D3; LPS, LPS+IL-4 and αCD40+IL-4) after treatment with Cycloheximide (CHX 100μg/ml, grey bars) or Wortmannin (Wort 20μg/ml, white bars). (C) Western blots of CHOP and BiP were performed in total LPS-stimulated B cells (D2 and D3) compared to resting B-cells (D0) in IgH<sup>frVκ/wt</sup> mice. A representative experiment is shown. Data are representative of at least six independent experiments (n= 14-18). Bars represent mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. \*, P<0,05; \*\*, P<0,01; \*\*\*\*, P<0,0001.



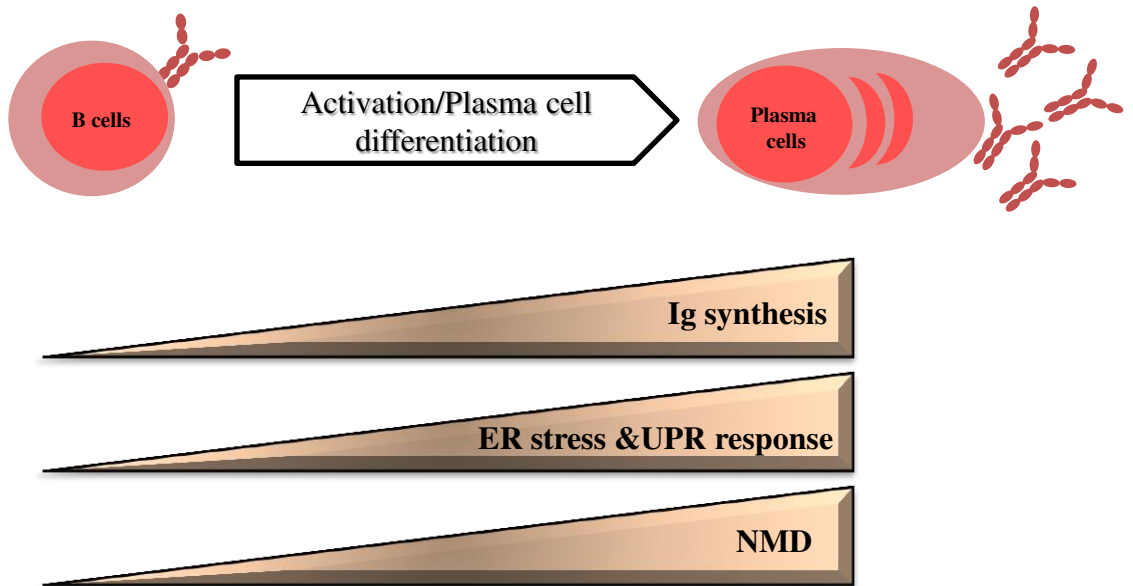


**Figure 2. Prolonged ER stress enhances the degradation by NMD and the activation of UPR response.**

(A) Quantification of IgH<sup>frVκ</sup> pre-mRNA levels was performed 3 days after LPS stimulation of splenic B cells, in presence or absence of Wortmannin (Wort) treatment (20μg/ml for 4h). (B) The degradation of nonproductive IgH mRNAs was assessed in stimulated B cells (day 3) of IgH<sup>frVκ/wt</sup> (empty bars) and iTIE::IgH<sup>frVκ</sup> mice (gray bars). RT-qPCRs were performed on stimulated B cells treated or not with Wort 20μg/ml for 4h. The NMD efficiency represents the fold increase of IgH<sup>frVκ</sup> mRNA after drug treatment. Relative mRNA levels were normalized to *Gapdh* transcripts. (C) Relative mRNA levels of ER stress markers (*Chop*, *BiP*, *Herp*, *Xbp1s*) were assessed on splenic B cells 3 days after LPS stimulation, by qPCR after normalization to *Gapdh* transcripts. Values obtained for IgH<sup>frVκ/wt</sup> were set to 1. (D) The protein levels of ER stress factors CHOP, BiP, and IRE1α were analyzed by Western blot after LPS stimulation (Day 3). Data are representative of at least two independent experiments (n= 3/group). Bars represent mean expression ±SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. \*, P<0,05; \*\*\*\*, P<0,0001.







**Figure 3. Cooperation between RNA and protein surveillance pathways upon B cell activation.**

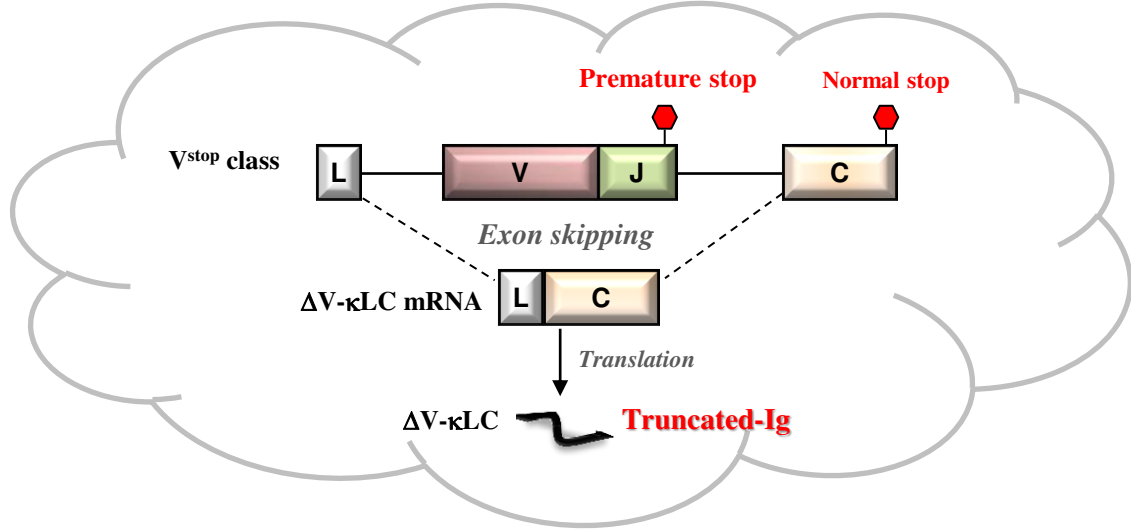
Activation of both NMD and UPR pathways during B cell activation and plasma cell differentiation. This model shows that high levels of Ig synthesis is accompanied by elevation of UPR response and a simultaneous increase of degradation by NMD. Therefore, under ER stress conditions, the NMD pathway is greatly activated in order to decrease the level of aberrant proteins and to maintain cellular homeostasis. This cooperation between NMD and UPR prevents a generalized activation of the TIE-checkpoint, leading to the massive elimination of plasma cells.



## *Discussion & Perspectives*

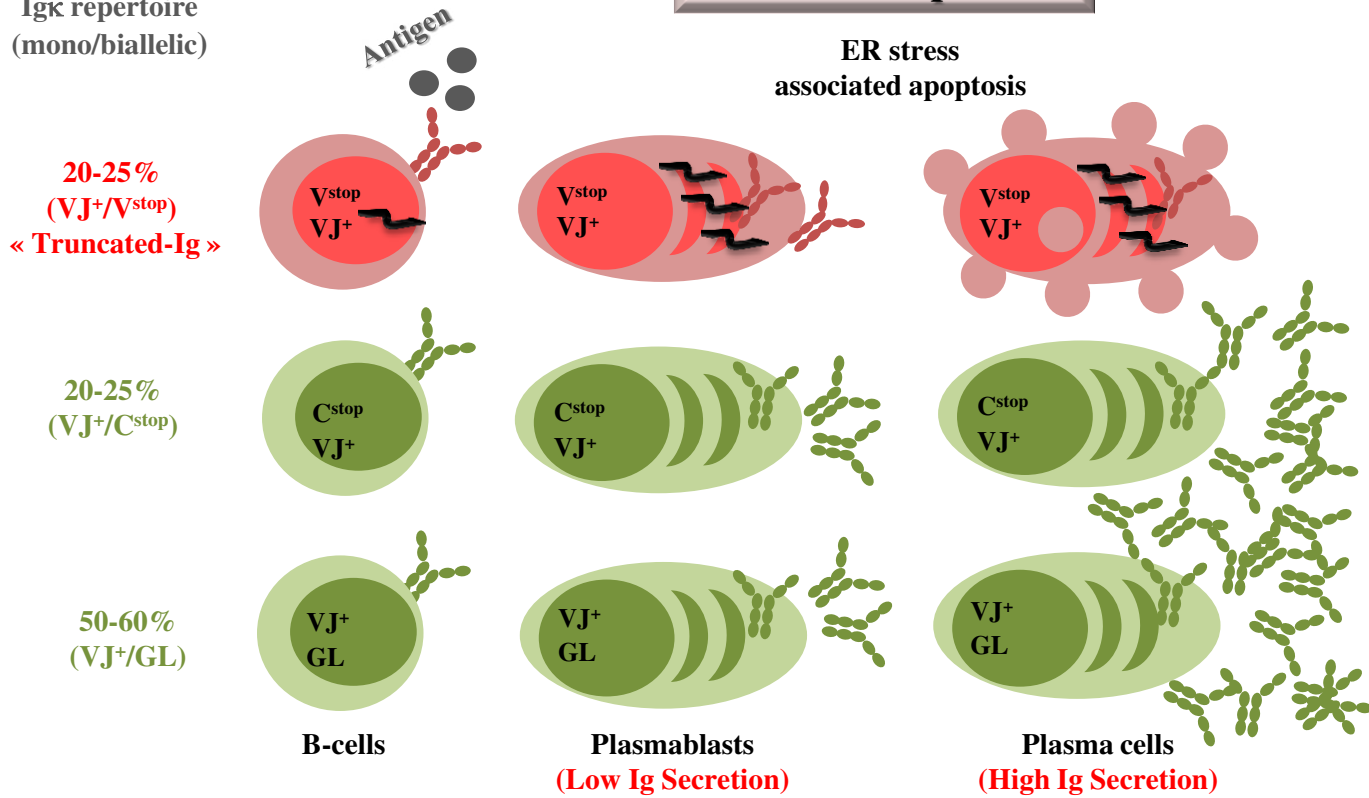
---

---





**TIE checkpoint**

**Igκ repertoire (mono/biallelic)**



**Plasma cell differentiation**

**Legend:**

TIE: truncated-Ig exclusion		Immunoglobulins
ER: endoplasmic reticulum		ΔV-κLC (Variable domain-less Ig kappa light chain)
GL: germline		

**Figure 35 : Représentation schématique du mécanisme TIE-checkpoint.**

## 1- Epissage alternatif des transcrits d'Ig et activation du TIE checkpoint

Mes travaux de thèse ont permis d'évaluer l'impact des Ig tronquées sur la survie des cellules plasmocytaires. Ces Ig sont codées par des allèles de chaînes lourdes et légères réarrangés de façon non productive. Ces réarrangements V(D)J non-productifs induisant un décalage du cadre de lecture et l'apparition de codon stop prématurés (PTC : « *Premature Termination Codon* ») sont présents dans de nombreux lymphocytes B (40-50%) (Tinguely et al., 2012). Notre laboratoire possède une bonne expertise dans l'étude des mécanismes de surveillance des ARNm, des travaux antérieurs ont montré que les transcrits d'Ig contenant des PTC sont efficacement dégradés par le mécanisme de NMD (pour « *Nonsense-mediated mRNA decay* ») (Delpy et al., 2004b; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). Ce processus aboutissant à une disparition quasi complète des transcrits matures hors phase, prévient donc l'apparition d'Ig tronquées au cours de l'ontogénie B. Néanmoins, aucune étude n'a jusqu'ici analysé l'impact de l'épissage alternatif et en particulier du phénomène de saut d'exon (« *exon-skipping* ») sur la production d'Ig tronquées présentant des délétions du domaine variable (V). Nos données ont montré que la présence d'un PTC augmente considérablement l'épissage alternatif des transcrits de chaînes légères *kappa* (Ig $\kappa$ ) et conduit à la synthèse d'Ig tronquées. L'étude de l'impact des Ig tronquées a ensuite révélé un nouveau point de contrôle lors de la différenciation terminale des plasmocytes, nommé TIE-checkpoint pour « *Truncated-Immunoglobulins Exclusion checkpoint* ». Ce mécanisme est illustré dans la **Figure 35**. Bien que le TIE-checkpoint soit un mécanisme de protection, puisqu'il permet d'éliminer les PC capables de produire des Ig tronquées potentiellement toxiques pour la cellule, sa survenue tardive pourrait être considérée comme une faiblesse et un gaspillage du système immunitaire. En effet, ce contrôle permet aux cellules B hébergeant des allèles Ig $\kappa$  non-productifs de type V<sup>PTC</sup>, de répondre aux stimulations antigéniques et de subir les processus de maturation d'affinité au cours du GC, alors qu'elles sont incapables de se différencier en plasmocytes à longue durée de vie.

Afin d'évaluer l'impact du TIE-checkpoint sur la réponse immune, nous avons élaboré un modèle de souris knock-in exprimant des Ig tronquées de façon inductible. Ces animaux reproduisant de façon élégante le « TIE-checkpoint » ont permis de confirmer que la production d'Ig tronquées affecte considérablement la différenciation plasmocytaire et la sécrétion d'anticorps. Ce modèle de souris se révèle un outil de choix pour étudier la toxicité



des Ig tronquées dans un contexte normal et tumoral. Cet aspect pathologique sera détaillé ultérieurement.

Nous avons choisi d'étudier l'épissage alternatif des transcrits Ig $\kappa$ . Ces ARN présentent l'avantage d'avoir une structure simple composée de 3 exons codant le peptide leader (L), le domaine variable (V) et le domaine constant (C $\kappa$ ). Au locus Ig $\kappa$ , les réarrangements aléatoires génèrent des jonctions V $\kappa$ J $\kappa$  en phase (F) et deux types de jonctions hors phase avec un PTC localisé soit dans l'exon V (V<sup>PTC</sup>) soit dans l'exon C $\kappa$  (C<sup>PTC</sup>). Comme ces PTC ne respectent pas la règle de position (50-55nt) du NMD classique (Isken and Maquat, 2007), ces transcrits aberrants sont alors pris en charge par un mécanisme alternatif de NMD (NMD EJC-indépendant) comme décrit précédemment pour les transcrits d'Ig hébergeant des PTC dans le dernier exon constant (Bühler et al., 2006). Cependant les travaux de Chemin *et al* ont démontré que l'activation du NAS entraîne l'élimination de l'exon VJ $\kappa$  contenant le PTC par saut d'exon, donnant ainsi naissance à des transcrits alternatifs de type  $\Delta$ V- $\kappa$ LC (Chemin et al., 2010). Dans ce contexte, nous avons analysé comparativement le taux de transcrits alternatifs  $\Delta$ V- $\kappa$ LC dans des lignées transfectées avec des constructions permettant l'expression de transcrits de type F, V<sup>PTC</sup> et C<sup>PTC</sup>. Ces travaux ont montré que le phénomène de saut d'exon est induit exclusivement en présence d'un PTC dans l'exon V. Cette activation préférentielle plaiderait plutôt en faveur d'un NAS dépendant du cadre de lecture (NAS de type II). Nous avons également montré que les transcrits alternatifs sont deux fois plus abondants dans les cellules plasmocytaires (S194) que dans les cellules B (A20). Nos résultats laissent donc supposer que l'épissage alternatif de type NAS, touchant les transcrits Ig $\kappa$  non-sens, respecte les mêmes règles que l'épissage conventionnel et semble étroitement corrélé au taux d'élongation de l'ARNpol II. Des travaux ont démontré qu'une vitesse d'élongation rapide favorise l'exclusion des exons alternatifs alors qu'une vitesse plus lente permet d'inclure les exons alternatifs (Nogués et al., 2003; Shukla and Oberdoerffer, 2012). Dans les PC, la transcription active des gènes d'Ig s'accompagne d'une relocalisation à proximité des pores nucléaires. Ces domaines spécialisés facilitent la coopération avec des *enhancers* et permettent une hypertranscription des gènes d'Ig (Park et al., 2014). Sur la base de ces données, nous suggérons que le fort taux de transcription qui accompagne la différenciation plasmocytaire favoriserait le saut d'exon lors de l'épissage des allèles Ig $\kappa$  non-productifs.





De façon originale, la traduction des transcrits alternatifs  $\Delta V$ - $\kappa$ LC permet la production des Ig tronquées dépourvues de domaine V. Cette synthèse d'Ig aberrantes n'est pas sans conséquence puisqu'elle augmente fortement l'expression des facteurs impliqués lors d'un stress prolongé du RE (CHOP, BIP, HERP, XBP1/IRE1 $\alpha$ ). Ce stress cellulaire très marqué conduit à l'apoptose des PC exprimant des chaînes tronquées, par activation du TIE-checkpoint. Dans cette étude, nous avons observé que la production d'Ig tronquées augmente l'expression de marqueurs de la réponse UPR comme *Xbp1-s* et le facteur pro-apoptotique *Chop* dans des cellules B naïves. Cette expression précoce et marquée des gènes de la réponse UPR pourrait donc influencer le devenir des cellules B activées et leur différenciation en plasmocytes. Il est maintenant bien établi que la différenciation plasmocytaire, accompagnée d'une forte sécrétion d'Ig, nécessite l'activation de la réponse UPR. Plusieurs études ont ainsi démontré que XBP1, ATF6 et IRE1 $\alpha$  sont nécessaires pour la formation des PC (Gass et al., 2002; Lee et al., 2002). Une étude publiée en 2010 a montré que l'activation de *Chop* est nécessaire pour une différenciation efficace en plasmocytes et que les souris déficientes en *Chop* produisent moins d'Ig que les souris *wild-type* (Masciarelli et al., 2010). L'activation de *Chop* semble induire les protéines pro-apoptotiques telles que Bim, et inhiber les protéines anti-apoptotiques comme BCL-2, conduisant ainsi à l'apoptose (McCullough et al., 2001; Puthalakath et al., 2007). D'autre part, Cenci et al., ont montré que l'expression de *Chop* est maximale durant les premiers jours de la différenciation plasmocytaire puis elle diminue progressivement (Cenci et al., 2006). Ainsi, les aspects pro-apoptotiques de *Chop* permettent de limiter les réponses anticorps en favorisant l'émergence de plasmocytes à courte durée de vie. En revanche, l'expression de ce facteur doit cesser pour permettre la différenciation des plasmocytes à longue durée de vie. Néanmoins, la régulation de la balance survie/apoptose n'est que partiellement comprise et d'autres facteurs influencent activement la différenciation plasmocytaire. Une étude récente a souligné le rôle majeur joué par la protéine Bcl-X<sub>L</sub> lors de la différenciation des cellules B en PC. En effet Gaudette et al., ont montré que Bcl-X<sub>L</sub> peut séquestrer Bim et protéger les PC de l'apoptose induite par *Chop* (Gaudette et al., 2014). Au vu de nos résultats montrant une expression élevée du facteur *Chop* dans les cellules B et les PC provenant de souris iTIE, nous pouvons supposer que la disparition des PC exprimant des Ig tronquées est le reflet d'une dérégulation de l'équilibre qui règne entre la machinerie de survie et la machinerie apoptotique. Le modèle iTIE pourrait donc être utile pour étudier la connexion entre les facteurs pro et anti-apoptotiques impliqués lors de la différenciation plasmocytaire.



De façon intéressante, le TIE-checkpoint élimine les cellules hébergeant des réarrangements Ig $\kappa$  bi-alléliques (VJ<sup>+</sup>/V<sup>PTC</sup>), qui représentent environ 20-25% de cellules B matures (Mostoslavsky et al., 2004). Ce même résultat a été également observé dans les souris DH-LMP2A, ce qui suggère une toxicité intrinsèque des Ig tronquées, indépendante d'un défaut d'assemblage de chaînes lourdes et légères. La survie des PC dépend de leur capacité à surmonter le stress du RE induit par une synthèse massive d'Ig, et de la balance entre la charge *versus* la capacité du protéasome (Cenci and Sitia, 2007; Cenci et al., 2012). En se basant sur ces données, nous suggérons que la toxicité des Ig tronquées produites par les PC hébergeant des réarrangements bi-alléliques engorgerait le RE et provoquerait l'apoptose de ces PC. Afin d'approfondir cette étude, nous tenterons de bloquer le programme apoptotique des plasmocytes producteurs d'Ig tronquées dans le but d'étudier les conséquences d'une absence de TIE-checkpoint sur la réponse immune. La survie de ces plasmocytes produisant des Ig tronquées pourrait exercer des effets multiples comme une diminution globale de la réponse humorale ou encore une mauvaise colonisation des niches médullaires. Nous analyserons ces différents paramètres après croisement des souris iTIE avec des souris surexprimant le gène anti-apoptotique *Bcl-2* dans les cellules B, récemment générées au laboratoire. Ces dernières sont en cours de caractérisation et présentent une importante hyperplasie B.

Nous avons constaté que l'expression des chaînes tronquées de type  $\Delta V$ - $\kappa$ LCs était toxique pour la survie des PC normaux et sensibilisait les lignées tumorales au traitement par les inhibiteurs du protéasome (PI). Pour élargir cette étude et explorer l'impact des Ig tronquées sur le développement tumoral, nous souhaitons réaliser des accouplements entre le modèle iTIE et un modèle murin de gammopathies monoclonales apparentées au myélome (MGUS et MM), le modèle transgénique V $\kappa$ \*Myc (Chesi et al., 2008). Des démarches sont en cours auprès du laboratoire du Dr. Peter Leif Bergsagel (Arizona, USA) pour l'obtention de ce dernier modèle. Une analyse sera effectuée sur des cohortes d'animaux pour suivre comparativement l'apparition de pics d'Ig monoclonales traduisant l'émergence de tumeurs plasmocytaires. Nous compléterons cette étude en analysant les compartiments plasmocytaires dans la moelle osseuse et dans d'autres organes lymphoïdes. Nous tenterons d'identifier si l'expression d'Ig tronquées a une influence (négative) sur l'émergence de clones plasmocytaires et sur leur évolution tumorale.

Nos travaux présentés dans l'Article 1, mettent en évidence que l'activation du TIE-checkpoint provoque une disparition des PC produisant des Ig tronquées. L'élimination de



ces PC ne permet donc pas d'étudier le saut d'exon des transcrits d'Ig non-sens dans un contexte physiologique. Pour analyser l'efficacité de cet épissage alternatif de type NAS *in vivo*, nous avons tiré profit du modèle murin IgH<sup>frVκ/wt</sup> (Tinguely et al., 2012) qui permet d'analyser le devenir des transcrits IgH contenant des PTC (Article 2 en préparation). L'allèle IgH<sup>frVκ</sup> contient un exon « *frameshift* » additionnel (frVκ). L'activation du saut d'exon lors de l'épissage des transcrits IgH<sup>frVκ</sup> peut éliminer cet exon additionnel et permettre ainsi l'expression de transcrits IgH conventionnels, qui peuvent coder pour des chaînes lourdes complètes en cas de réarrangement VDJ productif. En accord avec une traduction active de ces transcrits alternatifs, nous avons pu détecter un taux non négligeable d'IgM<sup>a</sup> dans le sérum de ces souris, par dosage ELISA. Dans cette étude, nous avons également montré que les transcrits alternatifs sont plus abondants dans les plasmocytes comparativement aux cellules B. De même, nous avons montré une augmentation du taux de transcription de l'allèle IgH au cours de la différenciation plasmocytaire. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant que l'épissage et la transcription peuvent être concomitants et sont influencés par la vitesse d'élongation de l'ARNpol II (Nogués et al., 2003; Shukla and Oberdoerffer, 2012). Dans ce sens, de nombreuses études ont observé une surexpression du facteur d'élongation de la transcription ELL2 dans les plasmocytes. Cette surexpression pourrait entraîner le recrutement de protéines impliquées dans l'épissage co-transcriptionnel et favoriser l'épissage alternatif des gènes d'Ig (Martincic et al., 2009; Park et al., 2014). D'ailleurs, les analyses de RNA-seq sur une lignée plasmocytaire dans laquelle ELL2 est inactivée montrent clairement que ce facteur modifie le patron d'épissage pour environ 12% des transcrits dont les ARNm IgH et BCMA (pour « *B cell MAaturation protein* ») (Benson et al., 2012). En effet, il a été démontré que ELL2 favorise la liaison du facteur de polyadénylation CstF-64 et provoque l'utilisation du site poly (A) secrété situé en aval du dernier exon C<sub>H</sub>, ce qui permet ainsi une sécrétion optimale d'Ig lors de la différenciation plasmocytaire. ELL2 semble aussi nécessaire pour l'expression de BCMA, qui en se fixant sur ses ligands BAFF « *B-Cell Activation Factor* » et APRIL, fournit les signaux de survie nécessaires pour maintenir les PC dans la moelle osseuse (Benson et al., 2012).

Les modifications épigénétiques des histones apparaissent également comme des régulateurs potentiels de l'épissage alternatif (pour revue Luco et al., 2011). De manière intéressante, la marque H3K36me3 est enrichie dans les exons constitutifs par rapport aux exons alternatifs, permettant ainsi de distinguer facilement ces deux types d'exons (Kolasinska-Zwierz et al., 2009). Différentes expériences ont pu mettre en évidence un rôle



de la signature des histones sur l'épissage alternatif. L'un des exemples concerne l'étude des deux isoformes mutuellement exclusifs du récepteur humain FGFR2 (pour « *Fibroblast Growth Factor Receptor 2* ») (FGFR2-IIIb et IIIc). Dans les cellules épithéliales, c'est l'exon IIIb qui est inclus. A l'inverse, dans les cellules mésenchymateuses, cet exon est exclu et c'est l'exon IIIc qui est exclusivement utilisé. L'utilisation différentielle de ces deux exons est régulée par des modifications des histones au niveau de la région alternativement épissée. Ainsi l'inclusion de l'exon alternatif IIIb est corrélée avec un enrichissement en modifications H3K27me3 et H3K4me3 alors que l'exclusion de cet exon est corrélée avec un taux élevé de la marque H3K36me3 (Luco et al., 2010). Un second exemple concerne le gène CD44 où les exons alternatifs sont marqués par des niveaux élevés de la marque H3K9me3 et sont associés à HP1 $\gamma$ , une protéine de la chromatine aboutissant à une inclusion de l'exon alternatif au niveau de l'ARN mature de CD44 (Saint-André et al., 2011). Ainsi, l'enrichissement de marques particulières autour des exons va déterminer à quelle fréquence ils seront utilisés ou éliminés lors de l'épissage. En s'appuyant sur ces données, nous envisageons d'analyser ces différentes marques au niveau de l'exon alternatif frV $\kappa$  dans notre modèle de souris IgHfr<sup>V $\kappa$ /wt</sup> (cf Article 2, en préparation). Nous analyserons s'il existe des corrélations entre l'épissage alternatif de cet exon non-sens et la présence de marques spécifiques au niveau de la chromatine. Cette étude sur cellules primaires devrait permettre de définir les règles du saut d'exon au cours de la maturation B.

### 2- « *Cross-talk* » entre la réponse UPR et le NMD

Notre modèle de souris knock-in : iTIE détaillé dans l'Article 1 se présente comme un outil de choix pour étudier l'impact des Ig tronquées sur l'activation de la réponse UPR. Nos résultats ont révélé une sensibilité aux inhibiteurs du protéasomes (PI) des PC produisant des Ig tronquées sans domaine variable (Article 1 et Annexe 1 : Bonaud et al., 2015). Cette sensibilité semble s'expliquer par un stress du RE naturellement plus marqué que celui observé dans les cellules produisant des Ig complètes. Ces observations nous ont poussé à explorer la voie UPR, qui engage à la fois des facteurs de survie et des facteurs pro-apoptotiques.

A l'heure actuelle, perturber l'homéostasie du RE ou l'activité du protéasome représente une piste pertinente dans le traitement du MM (Meister et al., 2007; pour revue Taouji and Chevet, 2015). Ainsi, l'utilisation conjointe des inhibiteurs de protéines





chaperones *i.e.* Hsp90 (pour « *Heat Shock Protein* ») ou des facteurs impliqués dans la réponse UPR *i.e.* IRE1 $\alpha$  avec des PI offrent des perspectives intéressantes, pour augmenter l'activité anti-tumorale des traitements (Ishii et al., 2012).

### **i. Les Ig tronquées et le NMD**

De nombreux travaux réalisés sur des cellules tumorales ou des modèles murins ont montré une potentielle corrélation entre le mécanisme du NMD et le stress du RE (Belgrader et al., 1993; Harding et al., 2003; Gardner, 2008; Oren et al., 2014). L'objectif de cette étude est d'analyser s'il existe un dialogue entre les mécanismes de surveillance agissant au niveau des ARNm et au niveau protéique. Afin d'aborder cette question, nous avons croisé des souris iTIE, caractérisées par une production forcée des Ig tronquées accompagnée par un stress exacerbé du RE, avec des animaux IgH<sup>frV $\kappa$ /wt</sup>, précédemment décrits comme un bon modèle pour étudier la dégradation des transcrits IgH non-sens par NMD (Tinguely et al., 2012). Nos observations ont mis en évidence une dégradation très efficace des transcrits IgH non-productifs dans des cellules B activées. Cette activité du NMD plus marquée dans les cellules B stimulées est en accord avec les travaux de Weischenfeldt *et al.*, qui montrent que la délétion d'UPF2, un acteur majeur du NMD, affecte la survie des cellules T et B activées mais n'a que peu d'effet lorsque les cellules sont quiescentes (Weischenfeldt et al., 2008).

La stimulation des cellules B (LPS...) ainsi que la forte efficacité du NMD sont associées à une augmentation de l'expression des facteurs impliqués dans la voie UPR. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Nakayama *et al.* qui montrent que le traitement *in vitro* des macrophages de souris avec du LPS active la réponse au stress du RE mais réprime la voie PERK (Nakayama et al., 2010). Ceci est à rapprocher de ce qui est observé dans les plasmocytes où la voie PERK est réprimée pour favoriser la synthèse massive d'Ig (Gass et al., 2008; Ma et al., 2010). Plusieurs travaux ont donc mis en exergue cette activation sélective de la réponse UPR pour permettre une forte synthèse protéique tout en limitant le stress cellulaire. Cependant, si cette réponse adaptative échoue et que le stress du RE persiste, les voies induisant la mort cellulaire programmée seront alors activées (Xu et al., 2005; pour revue Tabas and Ron, 2011).

Nos observations montrent que la stimulation des cellules B induit une augmentation parallèle de l'activité du NMD et de la réponse UPR. Afin d'élucider le rôle joué par le stress du RE sur l'activation du NMD, nous avons croisé des souris IgH<sup>frV $\kappa$</sup>  avec des souris iTIE. Ce modèle (iTIE::IgH<sup>frV $\kappa$</sup> ) permet d'étudier la dégradation par NMD des transcrits IgH<sup>frV $\kappa$</sup>  dans



une situation de stress cellulaire. L'efficacité du NMD a été suivie par q-PCR dans des cellules B issues de souris IgH<sup>frVκ</sup> ou double transgéniques iTIE::IgH<sup>frVκ</sup>. Nos données confirment que la forte expression des facteurs UPR, en réponse à l'expression des Ig tronquées, s'accompagne d'une augmentation importante de la dégradation des transcrits non-sens par NMD (*cf* Article 3 en préparation). Ces résultats suggèrent une coopération entre les mécanismes de surveillance agissant au niveau des ARNm (NMD) et des protéines (réponse UPR). Nous spéculons qu'en situation de stress protéique, la cellule pourrait activer la voie de NMD pour dégrader les transcrits non-sens et ainsi éviter un apport additionnel de protéines aberrantes.

Nos résultats peuvent paraître en opposition avec les études montrant une corrélation inverse entre l'UPR et le NMD (Gardner, 2008, 2010; Oren et al., 2014). Néanmoins, ces analyses ont montré que l'activation de la voie PERK lors d'un stress du RE, conduisait à la phosphorylation du facteur d'élongation eIF2 $\alpha$  pour atténuer la synthèse protéique globale. Cette activation de la voie PERK permettrait donc à la cellule de s'accomoder au stress du RE en diminuant la traduction. Le mécanisme de dégradation par NMD étant activé lors de la traduction protéique, la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  conduit à une inhibition du NMD. Ainsi, la divergence entre ces différentes études pourrait être expliquée par la répression ou non de la voie PERK. Dans les plasmocytes, la coopération entre le mécanisme de NMD et la réponse UPR permettrait de pouvoir supporter le stress lié à la forte production d'Ig (Ma et al., 2010).

### ii. Les Ig tronquées et l'autophagie

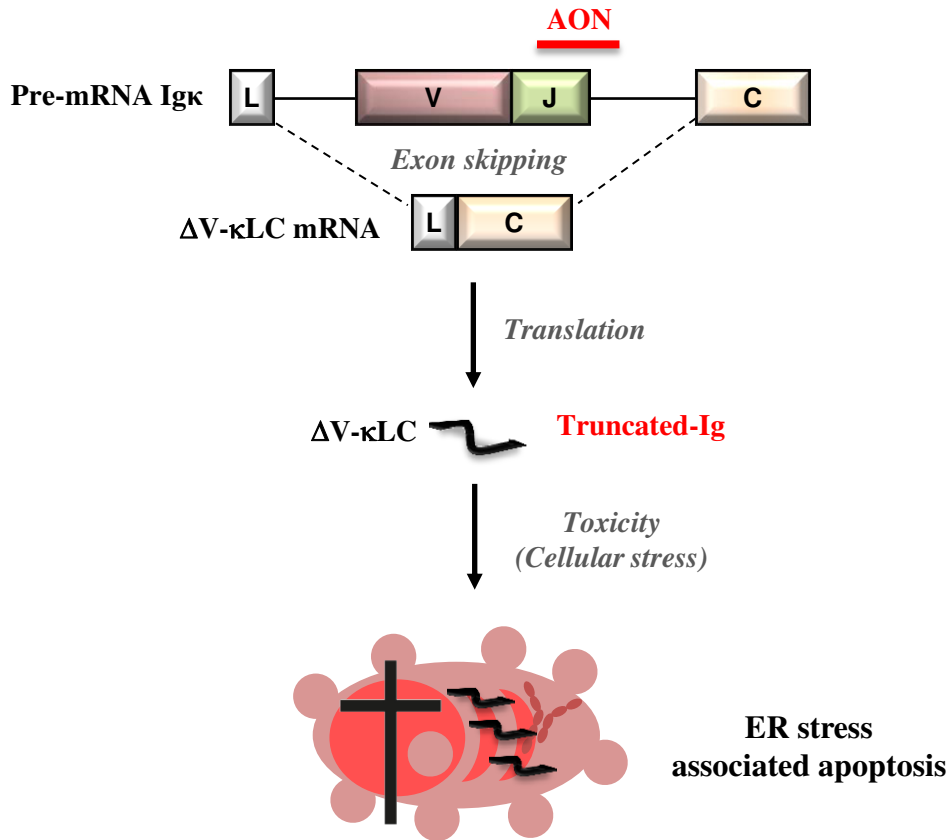
L'autophagie est un processus de dégradation hautement régulé impliqué dans le renouvellement des organites intracellulaires et peut être une voie alternative dont dispose la cellule pour éliminer les protéines mal repliées qui s'accumuleraient dans le RE. Cette voie participe également à la régulation de l'immunité innée et adaptative (pour revue Levine et al., 2011). Récemment, l'équipe de Cenci, a étudié son rôle au cours de la différenciation plasmocytaire (Pengo et al., 2013). En effet, les souris Atg5<sup>fl/fl</sup> CD19-Cre, présentant une délétion conditionnelle (KO) du gène Atg5, acteur majeur de l'autophagie, dans les cellules B matures, produisent moins d'Ig en réponse à des immunisations de type T-dépendant et T-indépendant. En parallèle, une autre étude a confirmé ces observations en montrant dans le même modèle KO de souris, une baisse des anticorps produits suite à une stimulation antigénique (Conway et al., 2013).



D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence un « *cross-talk* » entre l'autophagie et la réponse au stress RE (Yorimitsu et al., 2006; Kawakami et al., 2009; Senft and Ronai, 2015). Dans ce sens, il a été démontré que la voie IRE1 $\alpha$  est nécessaire à l'activation de l'autophagie (Ogata et al., 2006) et que les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en IRE1 $\alpha$  présentent une absence d'accumulation de LC3 (facteur clé de l'autophagie), suite au traitement avec la thapsigargine pour induire un stress du RE. Cependant, d'autres études ont révélé une inhibition du flux autophagique suite à un stress prolongé du RE (Lee et al., 2012). Une autre étude a également démontré que la combinaison des inhibiteurs du protéasome avec des inhibiteurs du flux autophagique dans des cellules de MM induit un stress du RE *via* l'activation du facteur de transcription *Chop* (Moriya et al., 2013). Cependant, le rôle de l'autophagie dans la survie et la mort cellulaire reste un sujet complexe et très controversé (Shen and Codogno, 2011). En s'appuyant sur ces données, nous souhaitons évaluer l'effet des Ig tronquées sur l'activation de l'autophagie. Pour cela, des expériences seront réalisées sur des cellules B de souris iTIE (stimulées ou non) avec ou sans traitement avec la bafilomycine, un inhibiteur du flux autophagique. De plus, nous avons croisé notre lignée iTIE productrice d'Ig tronquées, avec le modèle murin Atg5<sup>ff</sup> CD19-Cre, disponible au laboratoire et permettant d'invalider l'autophagie uniquement dans les cellules B. Nous supposons que les cellules B et PC survivants chez les souris iTIE pourraient activer l'autophagie comme un moyen de survie. Par conséquent, l'inhibition de cette voie protectrice pourrait aggraver le déficit en PC des animaux iTIE voire affecter d'autres compartiments B.

### 3- Les Ig tronquées : Une cible thérapeutique

Comme nous l'avions présenté dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, le Myélome Multiple (MM) est un cancer incurable, caractérisé par la présence dans la moelle osseuse d'un clone tumoral de cellules plasmocytaires. Moduler la réponse UPR et la capacité du protéasome présente un intérêt thérapeutique majeur dans le MM surtout que les protocoles de traitement incluent très fréquemment des inhibiteurs du protéasome. En effet, ces dernières années ont vu l'apparition d'une nouvelle molécule prometteuse dans le traitement du MM : le bortezomib (Bz) commercialisé sous le nom de Velcade®. Il s'agit d'un inhibiteur transitoire de la sous-unité 26S du protéasome. Bien que les mécanismes d'action de ce dernier ne soient pas complètement élucidés, l'accumulation de protéines (et d'Ig) mal repliées semble induire un stress du RE délétère conduisant à l'apoptose des



**Figure 36 : Approche thérapeutique par saut d'exon dans le traitement du myélome.**

Schéma représentatif de l'administration d'un oligonucléotide anti-sens (AON) ciblant le site donneur d'épissage du segment J $\kappa$ . Son hybridation au niveau du transcrit primaire entraîne l'élimination de l'exon variable VJ lors de l'épissage. Les transcrits alternatifs courts ( $\Delta$ V- $\kappa$ LC) permettent la synthèse d'Ig tronquées dépourvues de domaine V. Ces Ig tronquées vont alors provoquer une toxicité et conduire à l'apoptose des plasmocytes.

cellules de MM *via* le facteur pro-apoptotique *Chop* (Moriya et al., 2013). En se basant sur nos résultats innovants révélant une toxicité des Igk tronquées au cours de la différenciation physiologique des PC (Article 1), nous envisageons de tester si l'administration d'AON (oligonucléotides antisens) pourrait provoquer l'autodestruction des cellules de myélome en les forçant à produire des Ig aberrantes et toxiques.

Pour tenter de transposer nos résultats obtenus en laboratoire vers le lit du malade, nous souhaitons faire produire des Ig aberrantes et toxiques, dépourvues de domaine variable, par des cellules de myélome. Notre stratégie originale s'inscrit dans une approche de médecine personnalisée. Elle est basée sur l'identification des réarrangements V(D)J de l'Ig monoclonale exprimée par la tumeur et sur l'administration des AON spécifiques, permettant d'éliminer l'exon variable lors de l'épissage des transcrits d'Ig. Ce nouveau concept de modification d'anticorps par saut d'exon fait l'objet d'une demande de brevet dans le traitement du myélome (FR n°1561252, date de dépôt 23/11/2015). L'établissement d'une telle approche thérapeutique permettrait de tester entre autres, les divers effets toxiques des Ig tronquées dans l'élimination des plasmocytes tumoraux (**Figure 36**). Cette preuve de concept a été obtenue en utilisant la lignée de myélome RPMI 8226. Ces cellules ont été transfectées avec un AON dirigé contre le site donneur d'épissage de l'exon VJ de la chaîne légère  $\lambda$ . De façon intéressante, l'administration d'un AON spécifique perturbe efficacement l'épissage et induit une forte augmentation des transcrits courts dépourvus de l'exon variable VJ. En accord avec un stress protéique provoqué par la production d'Ig tronquées, l'expression du facteur pro-apoptotique *Chop* et de la protéine chaperonne BiP augmente dans les cellules transfectées avec l' AON spécifique.

Afin d'étendre l'étude princeps réalisée sur la lignée RPMI 8226, nous envisageons de tester les effets *in vitro* et *in vivo* de différents traitements AON seuls ou en combinaison avec des inhibiteurs du protéasome (Bz ...). Les AON sont conçus pour s'hybrider aux transcrits primaires (pré-ARNm) codant pour l'Ig monoclonale produite par la tumeur. Les séquences nucléotidiques des AON entourent le site donneur d'épissage du segment J pour permettre d'éliminer l'exon variable lors de l'épissage. La preuve de concept ayant été établie à l'aide d'AON spécifiques des chaînes légères  $\lambda$ , nous souhaitons réaliser des expériences similaires et tester la capacité des AON à forcer le saut d'exon des transcrits de chaînes lourdes et de chaînes légères  $\kappa$ . Nous analyserons ensuite l'inhibition de la croissance





tumorale en mesurant la réponse proliférative et l'apoptose des cellules de myélome après administration de ces AON seuls ou en combinaison avec le Bz.

Pour mener à bien ce projet, nous disposons d'une large collection de lignées tumorales dérivées de patients MM (lignées XG1 à XG7...) (Moreaux et al., 2011). Une collaboration internationale est en cours avec le Dr. De Bruyne Elke (laboratoire d'hématologie et d'immunologie, Belgique), afin de mettre en place cette stratégie thérapeutique sur des lignées murines de myélome 5TMM (5T2 et 5T33). Ces deux modèles murins sont originaires de myélome développé spontanément chez des souris âgées, qui se propagent par transfert *in vivo* des cellules de myélome dans des souris syngéniques jeunes. Ils ressemblent étroitement au myélome humain avec une infiltration dans la moelle osseuse (Vanderkerken et al., 1997, 2003). Récemment, nous avons reçu des ADN issus de PC triés de moelle osseuse de ces souris. Nous sommes en train de caractériser les réarrangements V(D)J des clones tumoraux par amplification spécifique des transcrits d'Ig afin d'identifier un AON spécifique du réarrangement ciblé pour produire une Ig tronquée dépourvue de son domaine variable.

Etant donné que la formulation des AON est compatible avec une utilisation *in vitro* ou une administration systémique chez l'animal (injection intraveineuse -IV- ou intrapéritoneale -IP-), les analyses *in vivo* seront réalisées par implantation des cellules tumorales humaines chez des souris immunodéficientes ( $Rag2^{-/-} \gamma c^{-/-}$ ) (Reijmers et al., 2010). Ces souris greffées subiront ensuite des injections avec différents mélanges d'AON (AON ciblant les chaînes lourdes d'Ig, AON ciblant les chaînes légères d'Ig, ou un mélange d'AON ciblant à la fois les chaînes lourdes et légères d'Ig) et recevront ou non un traitement Bz (IP). La croissance tumorale sera analysée en mesurant le taux sérique d'Ig monoclonale et par numération. Seront également utilisées les souris B6 C57BL/KaLwRij pour la greffe syngénique des cellules murines 5T2 et 5T33 (Vanderkerken et al., 1997). Ce modèle présentant des atteintes osseuses caractéristiques du MM permettra d'évaluer l'efficacité des traitements AON pour cibler ces niches tumorales. Les souris receveuses étant immunocompétentes, nous étudierons les effets secondaires éventuels des traitements AON sur le compartiment lymphocytaire B normal. Nous envisageons également de tester des AON de troisième génération (AON-tricyclo-ADN) à travers une collaboration avec l'équipe du Dr Luis Garcia (INSERM UMR 1179- Université de Versailles St-Quentin-en-Yvelines, Paris).



Les approches par saut d'exon visant à corriger les mutations du gène de la dystrophine présentent des bénéfices cliniques limités dans le traitement de la myopathie de Duchenne. L'administration d'oligonucléotides antisens n'a jusqu'ici pas démontré d'amélioration de la capacité musculaire des patients. Les laboratoires *Prosensa* ont d'ailleurs annoncé en 2013 l'arrêt de l'essai clinique de phase III utilisant le Drisapersen, faute d'avoir atteint son objectif. Néanmoins, nous pensons que notre stratégie destructrice pourrait s'avérer bien plus efficace que celles visant à restaurer sur le long terme l'expression de protéines fonctionnelles. En effet, l'action des AON spécifiques d'Ig devrait être brève et efficace, puisqu'elle repose sur une synthèse ponctuelle d'Ig tronquées pour provoquer la mort des cellules tumorales. Au final, nous espérons que ce projet de recherche ouvrira des perspectives thérapeutiques innovantes dans le traitement du myélome.



## *Conclusion Générale*

Les travaux réalisés au cours de ces années de thèse m'ont permis d'appréhender des aspects très différents mais complémentaires du développement plasmocytaire. Ainsi j'ai pu participer à l'élaboration d'un modèle murin exprimant une chaîne tronquée d'une façon inductible reflétant un effet toxique des Ig tronquées produites après épissage alternatif. L'exploration de ce modèle a permis d'identifier un nouveau point de contrôle agissant principalement lors de la différenciation plasmocytaire terminale (*TIE-checkpoint*) éliminant 20-25% des plasmocytes présentant des réarrangements bi-alléliques. Outre son intérêt pour la compréhension de la disparition des plasmocytes générant des Ig tronquées, ce modèle a ouvert une nouvelle voie d'exploration de la réponse UPR activée lors d'un stress du RE, et il nous a permis d'approfondir le lien entre les mécanismes de surveillance des ARNm (NAS, NMD) et ceux de surveillance protéique (UPR, autophagie). Cette coopération évite la synthèse d'Ig tronquées permettant ainsi une réponse humorale optimale. A l'issue de ces résultats, nous avons forcé le TIE-checkpoint dans un contexte pathologique en utilisant des oligonucléotides anti-sens (AON) capable d'induire un saut d'exon et de produire des Ig tronquées. Cette invention s'inscrit dans la thématique de la « médecine personnalisée » et ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le traitement du MM et de tout autre type de cancer touchant les cellules de la lignée B. En conclusion, nous espérons avoir apporté un peu de lumière sur l'activation des mécanismes de surveillance des ARN et sur l'impact des Ig tronquées au cours du développement lymphocytaire B, dans un contexte normal et tumoral.



## *Annexe*

---

---







# blood

2015 126: 757-765

doi:10.1182/blood-2015-03-630277 originally published  
online June 25, 2015

## **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

---

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/126/6/757.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Immunobiology](#) (5368 articles)

[Lymphoid Neoplasia](#) (2215 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub\\_requests](http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

## IMMUNOBIOLOGY

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

Amélie Bonaud,<sup>1,2</sup> Sébastien Bender,<sup>1,2</sup> Guy Touchard,<sup>3</sup> Corinne Lacombe,<sup>2,4</sup> Nivine Srour,<sup>1</sup> Laurent Delpy,<sup>1</sup> Christelle Oblet,<sup>1</sup> Anne Druilhe,<sup>1</sup> Nathalie Quellard,<sup>2,5</sup> Vincent Javaugue,<sup>2,3</sup> Michel Cogné,<sup>1</sup> Frank Bridoux,<sup>1,2,3</sup> and Christophe Sirac<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7276, Université de Limoges, Limoges, France; <sup>2</sup>Centre National de Référence Amylose AL et Autres Maladies par Dépôt d'Immunoglobulines Monoclonales, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France; and <sup>3</sup>Service de Néphrologie et Transplantation, <sup>4</sup>Service d'Immunologie, and <sup>5</sup>Service d'Anatomo-Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, France

## 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 a terminal unfolded protein response.

Randall-type heavy chain deposition disease (HCDD) is a rare disorder characterized by glomerular and peritubular amorphous deposits of a truncated monoclonal immunoglobulin 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 immunoglobulin  $\kappa$  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, histologic 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 pathophysiologic 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. (*Blood*. 2015;126(6):757-765)

## Introduction

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

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 the solvent-exposed complementary determining region, *N*-glycosylation, or small protein truncation.<sup>7,12-16</sup> Few studies also revealed a striking elevated isoelectric point of LCDD LCs compared with other pathogenic LCs, which may facilitate interactions with anionic proteoglycans of renal basement membranes.<sup>17,18</sup> In HCDD, the most striking molecular characteristic of the pathogenic HC is the deletion of the first constant (CH1) domain, invariably found by immunofluorescence studies of kidney biopsies and molecular studies of bone marrow.<sup>8,9,11,19</sup> 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 the GRP78/Bip chaperone.<sup>20-22</sup> The V domain also plays a critical role in the pathogenesis of HCDD. Indeed, to date, HC tissue deposition has never been reported in HC disease, a condition

Submitted February 28, 2015; accepted June 23, 2015. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 25, 2015; DOI 10.1182/blood-2015-03-630277.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2015 by The American Society of Hematology

associated with various lymphoproliferative disorders and characterized by a partial or complete deletion of the VH domain.<sup>23</sup>

Seminal studies by Herrera and colleagues have highlighted a specific phenotypic modification of mesangial cells on exposure to LCDD LCs.<sup>24-29</sup> These changes appeared similar to those observed in diabetic nephropathy, which features glomerular lesions close to those observed in MIDD.<sup>30,31</sup> LCDD LCs were shown to induce the production of transforming growth factor  $\beta$  and platelet-derived growth factor  $\beta$ , leading to an increased production of extracellular matrix (ECM) proteins including the unconventional tenascin-C together with an inhibition of the matrix metalloproteinase 7 production/activity.<sup>25-28,30,32,33</sup> This profound ECM remodeling is supposed to contribute, together with the monoclonal immunoglobulin deposits, to the pattern of nodular glomerulosclerosis frequently observed in MIDD. However, it remains difficult to depict the pathophysiologic 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.<sup>34,35</sup> However, the poor general condition and short survival of animals due to rapid tumor growth prevented full characterization 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.<sup>36</sup> We targeted insertion of the human LC gene in the mouse  $\kappa$  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  $\kappa$  locus of a  $\gamma$ IHC 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 exploration of the effect of the production of an isolated truncated monoclonal HC by plasma cells.

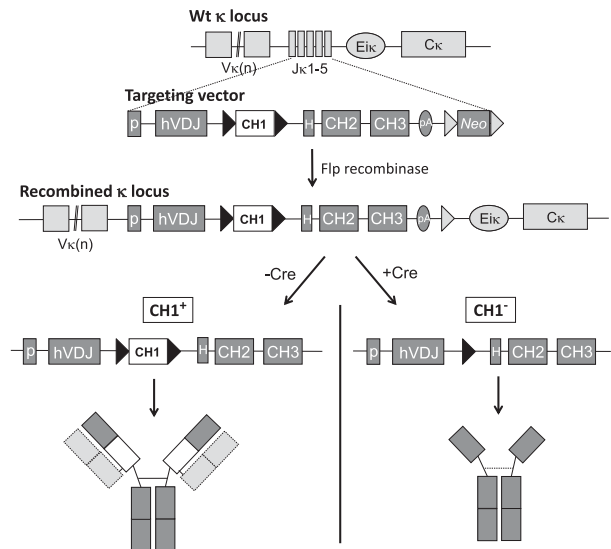
## Materials and methods

### Mice

Gene targeting into the murine Ig $\kappa$  locus was performed as previously described.<sup>36</sup> Briefly, the gene coding the secreted form of a human monoclonal  $\gamma$ IHC extracted from a patient with HCDD was introduced in place of the mouse J $\kappa$  segments (Figure 1). The step-by-step procedure to reconstitute the complete human  $\gamma$ HC, comprising a floxed *CHI* domain, is detailed in the supplemental Methods available on the *Blood* Web site, and primers are listed in supplemental Table 1. DH-LMP2A mice<sup>37</sup> were kindly provided by S. Casola (IFOM, Milan, Italy). All the protocols used were approved by our institutional review board for animal experimentation (Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale du Limousin). 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-week-old mice as previously described.<sup>38</sup> The removed kidneys were collected, and nephrectomized mice



**Figure 1. Structure of the targeted locus (not to scale).** (Top) Representation of the WT unrearranged  $\kappa$  locus and the structure of the inserted human  $\gamma$ HC gene replacing the J $\kappa$  region. (Middle) Resulting  $\kappa$  locus after targeted recombination is shown. The absence of J $\kappa$  segments precludes any Ig $\kappa$  LC rearrangement and expression. (Bottom) Cre-mediated deletion of the CH1 domain leads to the production of a truncated  $\gamma$ IHC as seen in the patient. In the absence of Cre-mediated deletion, a complete  $\gamma$ HC is produced. Association with murine LCs is only depicted for the complete  $\gamma$ HC (dashed boxes). The hypothetical disulfide bound between monomers of truncated  $\gamma$ HC is also indicated (dashed line). Black triangles correspond to LoxP sites, and gray triangles are Frt sites.

were euthanized 4 months later. Bortezomib (Velcade; Janssen Cilag) and cyclophosphamide (Endoxan; Baxter) (2 mg/kg) were injected subcutaneously at the indicated times. We used a bortezomib dose of 0.75 mg/kg per injection, which was previously shown to efficiently deplete plasma cells in another mouse model,<sup>39</sup> and which, in our hands, induced a >90% depletion of plasma cells at 24 hours. To test the sensitivity of plasma cells to bortezomib, we set up a protocol using 2 daily injections of a suboptimal dose (0.5 mg/kg) of bortezomib, leading to a depletion of ~70% of plasma cells in wild-type (WT) mice (supplemental Figure 1). Mice were euthanized for analysis 24 hours 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 enzyme-linked immunosorbent assay kit (Abcam), respectively, according to the manufacturer's recommendations.

### Flow cytometry and cell sorting

Splenocytes were isolated and stained as previously described<sup>40</sup> with appropriate antibodies (supplemental Table 2). All the antibodies used to detect the human  $\gamma$ HC were directed against the Fc part of immunoglobulin (Ig)G. 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).

### Pathologic studies

Kidney samples were processed for light microscopic examination, immunofluorescence, and electron microscopic studies, as previously described.<sup>35,36</sup> Briefly, immunofluorescence was performed on organs included in optimal cutting temperature compound and snap frozen in liquid nitrogen. Cryosections of 8  $\mu$ m were fixed with cold acetone, blocked with phosphate-buffered saline (PBS) and 3% bovine serum albumin, 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 electron microscopy studies, incubated with anti- $\gamma$  gold-conjugated,

and examined with a JEOL JEM-1010 electron microscope as previously described.<sup>41</sup> Toluidine blue-stained semithin sections were prepared and examined by light microscopy using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss) as previously described.<sup>36</sup> Description of scores of fluorescence intensity can be found in the supplemental Methods.

### In vitro stimulations

Spleen B cells were magnetically enriched using the CD43 depletion kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations and stimulated *in vitro* ( $5 \times 10^5$  cell/mL) with 5  $\mu$ g/mL lipopolysaccharide (LPS) (InVivoGen) for 4 days in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum;  $1 \times 10^6$  cells were used for flow cytometry analyzes, and the remaining cells were used for transcriptional analyzes.

### Enzyme-linked immunosorbent assay

Serum were analyzed for the presence of human IgG (Fc), as previously described.<sup>36</sup> To reveal hybrid immunoglobulins composed of the human  $\gamma$ HC associated with a murine  $\kappa$ LC, we adapted the same protocol using coating with the anti-human IgG (Fc) and revelation with an anti-mouse  $\kappa$ LC. For short-term HC production analysis, spleen cells or 3-day stimulated cells were counted, washed twice in PBS, normalized for the number of CD138<sup>+</sup> secreting cells, and plated in complete medium for 6 hours. Supernatants were collected and dosed by enzyme-linked immunosorbent assay. All antibodies used in the study are depicted in supplemental Table 2. Plates were read at 405 nm with a Xenius spectrophotometer (Safas).

### Transcriptional analysis

Total RNA was extracted using TRI Reagent (Ambion). Reverse transcription was performed using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) on 3  $\mu$ g of total RNA, with random hexamers. Relative quantification was performed with TaqMan Universal or SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) on cDNA samples (20 ng per reaction). Quantification of the gene of interest was analyzed by the  $\Delta$ Ct method with *Gapdh* used as the housekeeper gene. TaqMan probes for *Gapdh* (Mm99999915\_g1), *CHOP* (Mm01135937\_g1), *Herp* (Mm01249592\_m1), and *BiP* (Mm01333324\_g1) were used. For *Xbp1*, a polymerase chain reaction assay amplifying both the unspliced (u) and spliced (s) forms of *Xbp1* was performed. Ratios of *Xbp1s*/*Xbp1u* were calculated by scanning the blots and measuring the relative density of each band using ImageJ software. The *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* gene was used as an internal loading control, and the primers are depicted in supplemental Table 1.

### Statistical analysis

The statistical tests used to evaluate differences between variables were done using Prism GraphPad software (GraphPad Software). *P* values between variables were determined using the unpaired Student *t* test. *P* < .05 was considered significant.

## Results

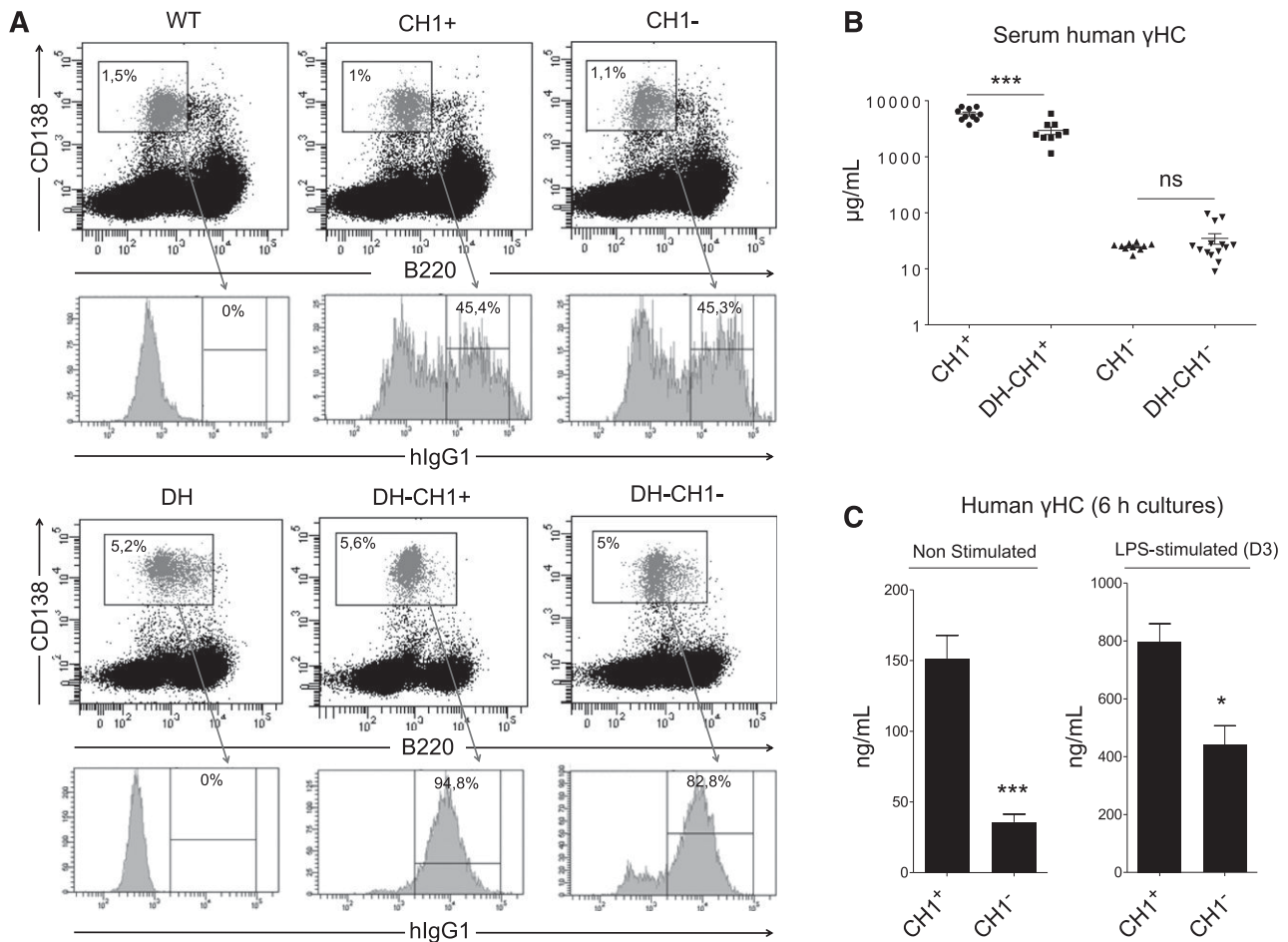
### Generation and characterization of transgenic mice expressing complete and truncated human monoclonal $\gamma$ 1HC

A genetically reconstituted gene encoding the *VDJ* sequence from a patient with HCDD associated with the complete secreted form of the human  $\gamma$ 1 constant region was inserted in the murine  $\kappa$  locus to force expression of the human  $\gamma$ 1HC throughout B-cell differentiation (CH1<sup>+</sup> mice). To generate a truncated  $\gamma$ HC similar to that extracted from the patient, we flanked the CH1 sequence with 2 loxP sites, allowing its Cre-mediated deletion (CH1<sup>-</sup> mice) (Figure 1; supplemental Figure 2A). About half of the CH1<sup>+</sup> and CH1<sup>-</sup> plasma cells were shown to express the human  $\gamma$ HC together with a murine immunoglobulin (Figure 2A; supplemental Figure 2B). 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 B-cell receptor signaling and allows complete B-cell development.<sup>37</sup> We recently showed that DH-LMP2A mice feature increased plasma cell differentiation despite the absence of endogenous HCs.<sup>40</sup> Consequently, DH-CH1<sup>-</sup> and DH-CH1<sup>+</sup> mice closely recapitulate the features of a monoclonal gammopathy with an elevated number of plasma cells producing the human monoclonal  $\gamma$ HC in the absence of endogenous murine HC (Figure 2B). Of note, the percentage of plasma cells is equivalent in all DH strains (Figure 2B), and only about 50% of plasma cells coexpressed a murine  $\kappa$ LC (supplemental Figure 2B). In sera, human  $\gamma$ HC rates were more elevated in CH1<sup>+</sup> than in DH-CH1<sup>+</sup> mice [ $5830 \pm 452$   $\mu$ g/mL (mean  $\pm$  standard error of the mean [SEM]) vs  $2949 \pm 451$   $\mu$ g/mL, respectively; Figure 2B]. This result may be related to the absence of endogenous LCs in  $\sim$ 50% of plasma cells in DH mice (supplemental Figure 2B) that likely precludes the secretion of the isolated HC due to intracellular retention by the chaperone protein BiP.<sup>20,42,43</sup> Cre-mediated deletion of the CH1 domain resulted in the production of the expected truncated human  $\gamma$ 1HC (supplemental Figure 2A). Strikingly, this deletion was associated with a massive decrease of serum human  $\gamma$ HCs in both CH1<sup>-</sup> ( $24.73 \pm 1.1$   $\mu$ g/mL) and DH-CH1<sup>-</sup> mice ( $34.88 \pm 8.8$   $\mu$ g/mL) (Figure 2B), which was partially due to a defective secretion by plasma cells as observed by dosage of human  $\gamma$ HCs in supernatants of 6-hour cultures of either spleen cells or 3-day LPS-stimulated B cells (Figure 2C). We detected only traces of human  $\gamma$ HC in urines in both CH1<sup>+</sup> and CH1<sup>-</sup> mice (supplemental Figure 2C), showing that the low level in sera is not due to an increased renal excretion. Similarly to previous observations,<sup>11,20</sup> we readily detected hybrid immunoglobulins composed of the truncated human  $\gamma$ HC associated with a murine LC (supplemental Figure 2D). However, in the absence of available standards, it remained difficult to precisely evaluate the proportion of these noncovalently linked HC/LC immunoglobulins compared with free HC.

### Truncated human $\gamma$ 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  $\gamma$ 1HCs in mice, immunofluorescence studies revealed typical linear HC deposits along the glomerular, vascular, and tubular BMs in CH1<sup>-</sup> (supplemental Figure 3A) and DH-CH1<sup>-</sup> kidneys (Figure 3A). These deposits were more pronounced in DH-CH1<sup>-</sup> than in CH1<sup>-</sup> kidneys (scores =  $3.6 \pm 0.19$  [mean  $\pm$  SEM] vs  $1.75 \pm 0.48$ , respectively; Figure 3B) and were not stained with anti-mouse  $\kappa$ LC (supplemental Figure 3A). Linear vascular  $\gamma$ 1HC deposits were also observed in lung and liver (supplemental Figure 3B). Immunoglobulin deposits were not observed in WT, DH, or DH-CH1<sup>+</sup> kidneys, demonstrating the specific pathogenicity of the truncated HC (Figure 3A-B). Discrete nonlinear deposits were observed in some CH1<sup>+</sup> glomeruli, likely related to immune complexes deposits because they partially colocalized with murine  $\kappa$ LC (supplemental Figure 3A) and were absent in DH-CH1<sup>+</sup> mice that lack murine immunoglobulin. Antibodies specific for human  $\gamma$ HC domains confirmed the absence of the CH1 domain in deposits, whereas similar staining patterns were observed with the anti- $\gamma$ CH2 and anti-human IgG conjugates (supplemental Figure 3C). Due to higher deposit scores, further studies were carried out in DH-CH1<sup>-</sup> mice and compared with DH mice as control, except when indicated. Linear glomerular and peritubular  $\gamma$ 1HC 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



**Figure 2. Characterization of the murine model of HCDD.** (A) Splenocytes from 6-month-old WT, CH1<sup>+</sup>, or CH1<sup>-</sup> (top) and DH, DH-CH1<sup>+</sup>, or DH-CH1<sup>-</sup> (bottom) mice were stained with the indicated antibodies and analyzed by flow cytometry. Representative results from 3 independent experiments with  $\geq 2$  mice of each strain are shown. Numbers indicate percentages of plasma cells on biparametric graphs and human  $\gamma$ HC-positive plasma cells on histograms. (B) Serum human  $\gamma$ HC production from 8- to 12-week-old mice. Each dot represents an individual mouse. Results are expressed in log scale as mean  $\pm$  SEM ( $\mu$ g/mL;  $n = 9-14$  per group in  $\geq 3$  independent experiments; ns, not significant; \*\*\* $P < .001$ ). (C) Human  $\gamma$ HC production in supernatants of 6-hour cultures of nonstimulated spleen cells (left) and 3-day LPS stimulated B cells (right). Plated cell counts were normalized on the number of secreting CD138<sup>+</sup> cells. Means  $\pm$  SEM (ng/mL) are shown ( $n = 4$  per strain in 2 independent experiments; \* $P < .05$ ; \*\*\* $P < .001$ ).

shown) or in mice unilaterally nephrectomized at 2 months of age and euthanized 4 months later (supplemental Figure 3D). Immunoelectron microscopy studies confirmed the presence of nonorganized linear deposits along tubular and glomerular BMs, which stained with the anti-human  $\gamma$ HC gold-labeled antibody, similar to those observed in the patient's kidney biopsy samples (Figure 3C-D). 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 3E), even in 18-month-old mice or unilaterally nephrectomized mice (data not shown).

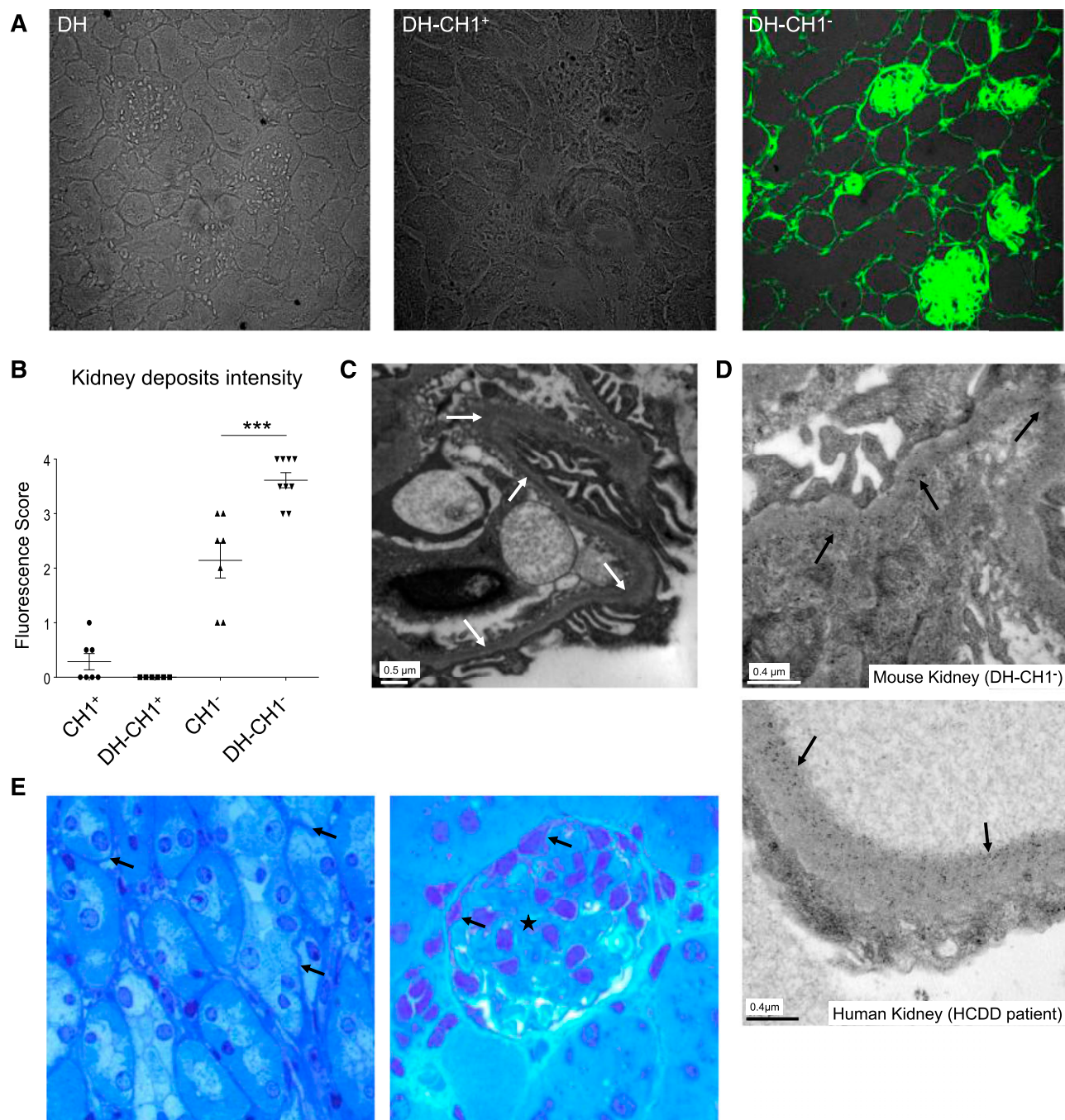
#### HCDD mice show early signs of glomerulosclerosis but no renal dysfunction

The increased production by mesangial cells of ECM proteins including laminin, collagen type IV, fibronectin, and, more specifically, tenascin-C is a hallmark of early glomerular changes in LCDD.<sup>25,28</sup> We therefore investigated the potential glomerular accumulation of tenascin-C in DH-CH1<sup>-</sup> kidneys. Immunofluorescence studies revealed a significant ( $P = .0002$ ) increase in tenascin-C in DH-CH1<sup>-</sup> compared with control DH kidneys (scores =  $2.11 \pm 0.22$  vs  $0.67 \pm 0.11$ ; mean  $\pm$  SEM; Figure 4A; supplemental Figure 3D). Because HCDD usually manifests with glomerular proteinuria, we compared the urine albumin/creatinine ratio of DH and DH-CH1<sup>-</sup> mice. We observed no significant difference

despite a trend toward the increase in DH-CH1<sup>-</sup> mice compared with DH mice ( $8560 \pm 1575$  vs  $22\,330 \pm 8283$ ; mean  $\pm$  SEM; Figure 4B).

#### Inhibition of kidney HC deposits on hematologic treatment

To validate the usefulness of our MIDD model for therapeutic investigations, we treated 5-month-old CH1<sup>-</sup> mice for 5 weeks using 2 injections of cyclophosphamide followed by repeated injections of bortezomib (Figure 5A), with the aim of reducing the production of the pathogenic human  $\gamma$ HC. This treatment was inspired by the CyBoRD (cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone) combination, which is widely used in the various disorders associated with monoclonal gammopathies.<sup>5,44-47</sup> Cyclophosphamide was shown to efficiently deplete B cells and to lower serum human  $\gamma$ HC (supplemental Figure 4A-B), and further repeated additions of bortezomib maintained a low level of human  $\gamma$ HC compared with nontreated mice (supplemental Figure 4B). After 5 weeks of treatment, animals were euthanized and analyzed for kidney deposits. We observed a significant inhibition of HC deposits in kidneys of treated mice compared with nontreated mice (scores =  $2.214 \pm 0.3058$  vs  $0.8333 \pm 0.2472$ ; mean  $\pm$  SEM;  $P = .0056$ ; Figure 5B). Although incomplete, recovery of kidney lesions correlated with partial hematologic response, as illustrated by persistence of detectable low serum level of human  $\gamma$ HC (supplemental Figure 4B).

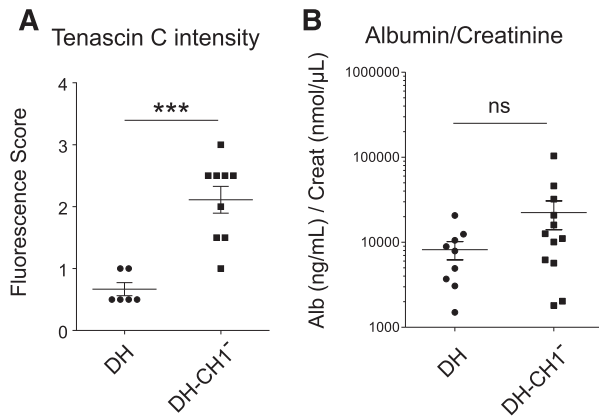


**Figure 3. HCDD transgenic mice reproduce human kidney lesions.** (A) Immunofluorescence microscopy on DH, DH-CH1<sup>+</sup>, or DH-CH1<sup>-</sup> kidney sections with an anti-human  $\gamma$ HC-fluorescein isothiocyanate. Fluorescence and differential interference contrast are merged. Original magnification,  $\times 400$ . Note the intense linear staining of tubular and glomerular BMs and in the mesangium of the DH-CH1<sup>-</sup> 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 Materials and Methods. Means  $\pm$  SEM are shown ( $n = 6-9$  mice in 3 independent experiments;  $***P < .001$ ). (C) Electron micrograph of kidney from a DH-CH1<sup>-</sup> mouse showing finely granular electron-dense deposits along the inner part of the lamina densa of a glomerular-capillary BMs (arrows). Original magnification,  $\times 20\,000$ ; scale bar is indicated. (D) Immunoelectron microscopy on kidney from a DH-CH1<sup>-</sup> mouse (top) and a renal biopsy of the corresponding HCDD patient (bottom). Note the presence of anti- $\gamma$ HC-conjugated gold particles along the BMs in both patient and mice kidneys. Original magnification,  $\times 50\,000$ ; scale bars are indicated. (E) 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,  $\times 600$ .

#### Truncated $\gamma$ 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.<sup>5,48</sup> We then sought to determine whether the production of an isolated truncated  $\gamma$ HC could influence the fate of plasma cells on proteasome inhibitor treatment. Spleen plasma cell count

was performed in WT, DH, and DH-CH1<sup>-</sup> mice after 2 daily injections of bortezomib (0.5 mg/kg) and compared with nontreated mice from the corresponding strains. At posttreatment day 3, we observed a more efficient depletion of plasma cells in DH-CH1<sup>-</sup> than in WT or DH mice (Figure 6A-B; supplemental Figure 5). 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  $\gamma$ HC.



**Figure 4. 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;  $***P < .001$ ). (B) Urine albumin to creatinine ratio was measured on overnight urine samples from DH and DH-CH1<sup>-</sup> mice. Each dot represents the result from an individual mouse. Values are indicated in ng/mL (albumin) per nmol/ $\mu$ L (creatinine). Means  $\pm$  SEM are shown ( $n = 9-12$  mice; ns, not significant).

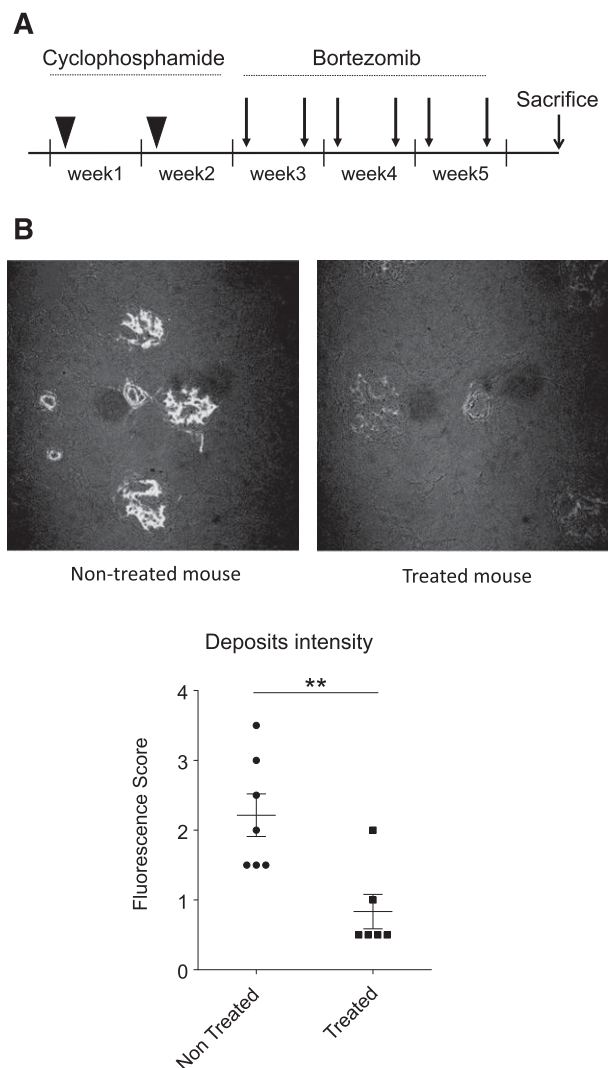
We analyzed the transcriptional expression of ER stress markers *Chop*, *BiP/GRP78*, *HERP*, and *Xbp1s* in 4-day LPS-stimulated B cells, a condition known to induce differentiation toward secreting plasmablasts.<sup>40</sup> As previously described,<sup>40</sup> we observed an increased plasmablast differentiation in DH mice compared with WT but also with DH-CH1<sup>-</sup> mice (supplemental Figure 6A-B). These differences seem to be due to an intrinsic higher propensity to terminal differentiation of DH cells and not to an increased apoptosis of WT and DH-CH1<sup>-</sup> cells during LPS stimulation (supplemental Figure 6C). Compared with WT cells that produce complete immunoglobulins, or DH cells producing either no immunoglobulin or isolated LCs (supplemental Figure 2B), we observed a significant increase in several ER stress markers in stimulated B cells of DH-CH1<sup>-</sup> mice (Figure 6C-D), including *BiP*, *Xbp1s*, or the proapoptotic transcription factor *Chop* known to be repressed during normal plasma cell differentiation.<sup>49</sup> The increase in *Xbp1s* and *Chop* was further confirmed in sorted plasma cells of DH-CH1<sup>-</sup> mice compared with WT or DH mice (Figure 6C-D). 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  $\kappa$  locus,<sup>36</sup> we introduced a sequence coding a human  $\gamma$ 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  $\gamma$ 1HC comprising the CH1 domain and its CH1-truncated counterpart. We demonstrated that mice secreting full-length  $\gamma$ 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 pathologic changes in HCDD, eg, amorphous linear deposits of the isolated  $\gamma$ HC along tubular and glomerular BMs and in the mesangium. The absence of glomerular proteinuria and glomerulosclerosis, 2 frequent features of HCDD, was probably related the mixed genetic

background of the transgenic mice because both *C57BL/6* and *129/Sv* mice were shown to be highly resistant in models of nephron reduction or diabetic nephropathy.<sup>50-52</sup> Whether backcrossing of our HCDD mouse model to nephropathy-prone genetic background like *DBA/2J* could overcome this issue remains to be confirmed.<sup>51</sup> Nevertheless,  $\gamma$ HC deposits were accompanied by glomerular accumulation of tenascin-C, a typical marker of ECM remodeling that precedes development of nodular glomerulosclerosis in LCDD.<sup>28</sup> Consequently, our model remains relevant to accurately study in vivo the early phenotypic modifications of mesangial cells (induction of transforming growth factor  $\beta$ , matrix metalloproteinase 7 activity, etc)<sup>25,27-29</sup> and to test new therapeutic approaches to prevent glomerular injury in MIDD.

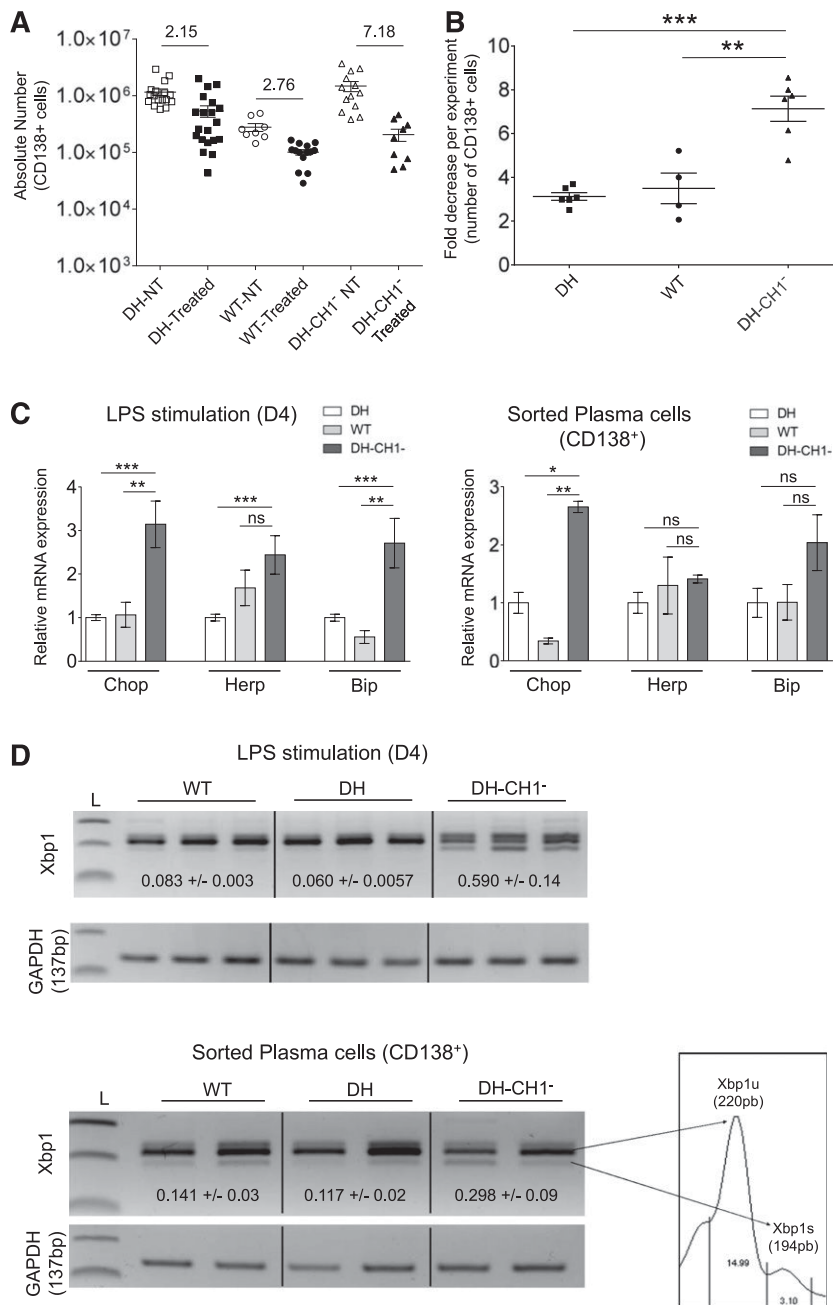
It was previously demonstrated that the ER resident chaperone protein BiP/GRP78 retains free HC by stable interaction with the CH1 domain, until a LC displaces this association and allows secretion of an entire immunoglobulin.<sup>42</sup> Monoclonal  $\gamma$ HC lacking the CH1 domain was consequently supposed to be freely secreted by plasma cells.<sup>20-22</sup> Accordingly, isolated HCs produced by plasma cells in human diseases



**Figure 5. Hematologic treatment reduces the onset of kidney deposits.** (A) Therapeutic protocol applied to deplete B and plasma cells in CH1<sup>-</sup> mice. (B) (Upper) Representative immunofluorescence on kidney sections of treated or nontreated CH1<sup>-</sup> mice with an anti-human  $\gamma$ 1HC-fluorescein isothiocyanate. Original magnification,  $\times 400$ . (Lower) Comparison of deposit intensity in kidney sections of treated vs nontreated CH1<sup>-</sup> mice. Each dot represents the score of fluorescence from an individual kidney. Means  $\pm$  SEM are shown ( $n = 6-7$  mice in 2 independent experiments;  $**P < .01$ ).



**Figure 6. Plasma cells producing a truncated  $\gamma$ HC are highly sensitive to bortezomib.** (A) Absolute number of spleen plasma cells in nontreated and bortezomib-treated mice. Each dot represents a mouse and numbers indicate the overall means of fold decrease in each strain ( $n = 8-17$  mice). (B) Fold decrease of spleen plasma cells on 48 hours of bortezomib treatment. Each dot represents the fold decrease of plasma cell number ( $CD138^+/B220^{low}$  cells) in an independent experiment with  $\geq 2$  treated and 2 nontreated mice. Means  $\pm$  SEM are shown ( $n = 4-6$  independent experiments;  $**P < .01$ ;  $***P < .001$ ). (C) Quantitative transcriptional analysis of ER stress markers in (left) 4-day LPS-stimulated B cells and (right) sorted  $CD138^+$  spleen plasma cells from DH (white bars), WT (light gray bars), and DH-CH1 $^-$  (dark gray bars) mice. Results are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments with (B) 2 mice of each strain and (C) 2 experiments of sorted plasma cells. ns, not significant;  $*P < .05$ ;  $**P < .01$ ;  $***P < .001$ . (D) Gel electrophoresis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction detecting full-length unspliced (u) and spliced (s) forms of *Xbp1* in 4-day (upper) LPS-stimulated B cells and (lower) sorted  $CD138^+$  spleen plasma cells from WT, DH, or DH-CH1 $^-$  mice. Numbers indicate the ratios of *Xbp1s/Xbp1u*. (Lower right) An example of quantification of band intensities is shown. The upper nonspecific band was excluded from the calculation. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* was used as a loading control. L, 100-bp ladder.



(HC disease 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  $\gamma$ HC, partially due to a defective secretion by plasma cells. Whether a defective interaction between CH1-truncated  $\gamma$ HCs and the neonatal Fc receptor (FcRn), known to protect IgG from degradation, could further explain this result remains to be explored.<sup>53</sup> As previously hypothesized, another nonexclusive possibility could be related to the high avidity for BMs of truncated HCs.<sup>11,54</sup> 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.<sup>31</sup> 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  $\gamma$ HC are more sensitive to bortezomib treatment than their WT

counterpart producing complete immunoglobulins. Accumulating evidence has linked protein synthesis to the responsiveness of proteasome inhibitors in multiple myeloma.<sup>55-58</sup> Moreover, proteasome inhibitors were shown to trigger the protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase-dependent branch of the unfolded protein response and CHOP, leading to a terminal ER stress response due to accumulation of unfolded proteins.<sup>57-59</sup> Here, we demonstrated that isolated truncated  $\gamma$ HCs are poorly secreted by plasma cells, which in turn, are intrinsically and basically stressed as observed by overexpression of CHOP and XBP1s. We then hypothesize that truncated  $\gamma$ HCs, due to their incomplete assembly<sup>11,20</sup> and/or their high propensity to aggregate, may represent exquisite substrates to trigger ER stress, lowering the threshold for terminal unfolded protein response on proteasome inhibitor treatments.<sup>58</sup> This could explain the efficacy of bortezomib-based regimens in HCDD.<sup>5,48</sup> 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 immunoglobulin fragments prone to misfolding and aggregation deserves to be explored in other monoclonal immunoglobulin-related diseases including light chain (AL) amyloidosis and LCDD, in which preliminary studies suggest that bortezomib-based therapy has a strong impact on renal and patient outcomes.<sup>44,60-62</sup> Transgenic mouse models could be of invaluable interest to explore this issue.<sup>36</sup>

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.

## Acknowledgments

The authors thank the staff of the animal facility, the cell cytometry facility of Limoges, J. M. Goujon at the Department of Pathology of Poitiers, M. Clavel, S. Lecardeur, and C. Carrion for technical assistance, Benoît Marin for help in statistical analyses, and A. Jaccard for helpful

discussion. This work was supported by grants from 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. A.B. and N.S. were funded by fellowships from the Ligue National Contre le Cancer, Région Limousin, and the French Ministry of Research.

## Authorship

Contribution: 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; and C.S. designed and supervised research and wrote the manuscript.

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

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

## References

- Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. *Blood*. 2006;108(8):2520-2530.
- Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, et al; International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood*. 2012;120(22):4292-4295.
- 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.
- Lin J, Markowitz GS, Valeri AM, et al. Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: the disease spectrum. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(7):1482-1492.
- 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*. 2012;7(2):231-239.
- Bridoux F, Leung N, Hutchison CA, et al; International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. Diagnosis of monoclonal gammopathy of renal significance. *Kidney Int*. 2015;87(4):698-711.
- 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.
- Aucouturier P, Khamlichi AA, Touchard G, et al. Brief report: heavy-chain deposition disease. *N Engl J Med*. 1993;329(19):1389-1393.
- Khamlichi AA, Aucouturier P, Preud'homme JL, Cogné M. Structure of abnormal heavy chains in human heavy-chain-deposition disease. *Eur J Biochem*. 1995;229(1):54-60.
- Tubbs RR, Berkley V, Valenzuela R, et al. Pseudo-gamma heavy chain (IgG4 lambda) deposition disease. *Mod Pathol*. 1992;5(2):185-190.
- 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*. 1999;10(3):519-528.
- 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.
- Déret S, Chomilier J, Huang DB, Preud'homme JL, Stevens FJ, Aucouturier P. Molecular modeling of immunoglobulin light chains implicates hydrophobic residues in non-amyloid light chain deposition disease. *Protein Eng*. 1997;10(10):1191-1197.
- 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.
- 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.
- Decourt C, Touchard G, Preud'homme J-L, et al. Complete primary sequences of two lambda immunoglobulin light chains in myelomas with nonamyloid (Randall-type) light chain deposition disease. *Am J Pathol*. 1998;153(1):313-318.
- 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.
- 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*. 2008;46(3):335-341.
- 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*. 2004;43(1):E10-E16.
- 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.
- 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.
- Feige MJ, Hendershot LM, Buchner J. How antibodies fold. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(4):189-198.
- Cogné M, Silvain C, Khamlichi AA, Preud'homme JL. Structurally abnormal immunoglobulins in human immunoproliferative disorders. *Blood*. 1992;79(9):2181-2195.
- Herrera GA, Shultz JJ, Soong SJ, Sanders PW. Growth factors in monoclonal light-chain-related renal diseases. *Hum Pathol*. 1994;25(9):883-892.
- 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.
- 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.
- Keeling J, Herrera GA. Matrix metalloproteinases and mesangial remodeling in light chain-related glomerular damage. *Kidney Int*. 2005;68(4):1590-1603.
- Keeling J, Herrera GA. An in vitro model of light chain deposition disease. *Kidney Int*. 2009;75(6):634-645.
- Russell WJ, Cardelli J, Harris E, Baier RJ, Herrera GA. Monoclonal light chain-mesangial cell interactions: early signaling events and subsequent pathologic effects. *Lab Invest*. 2001;81(5):689-703.
- 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.
- Ronco P, Plaisier E, Mougenot 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.* 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, Aucouturier P, Preud'homme JL, Cogné M. 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-F1017.
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.* 2013;43(3):619-628.
41. Bridoux F, Sirac C, Hugue V, et al. Fanconi's syndrome induced by a monoclonal V $\kappa$ 3 light chain in Waldenström's macroglobulinemia. *Am J Kidney Dis.* 2005;45(4):749-757.
42. 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.
43. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* 1983;306(5941):387-389.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.* 2014;64(1):123-127.
49. 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.
50. 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.
51. Qi Z, Fujita H, Jin J, et al. Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2005;54(9):2628-2637.
52. Ma L-J, Fogo AB. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int.* 2003;64(1):350-355.
53. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):715-725.
54. Kambham N, Markowitz GS, Appel GB, Kleiner MJ, Aucouturier P, D'agati VD. Heavy chain deposition disease: the disease spectrum. *Am J Kidney Dis.* 1999;33(5):954-962.
55. 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.
56. 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.
57. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ Jr, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood.* 2006;107(12):4907-4916.
58. Meister S, Schubert U, Neubert K, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* 2007;67(4):1783-1792.
59. Zhou P, Ma X, Iyer L, Chaulagain C, Comenzo RL. One siRNA pool targeting the  $\lambda$  constant region stops  $\lambda$  light-chain production and causes terminal endoplasmic reticulum stress. *Blood.* 2014;123(22):3440-3451.
60. Kastiris E, Terpos E, Dimopoulos MA. Current treatments for renal failure due to multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14(11):1477-1495.
61. Reece DE, Hegenbart U, Sanchawala 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.
62. 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.

## *Références Bibliographiques*

---

---



### A

- Aartsma-Rus, A. (2010). Antisense-mediated modulation of splicing: therapeutic implications for Duchenne muscular dystrophy. *RNA Biol.* 7, 453–461.
- Aartsma-Rus, A., and van Ommen, G.-J.B. (2009). Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol.* 8, 873–875.
- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C.T., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.-J.B., and Den Dunnen, J.T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144.
- Aartsma-Rus, A., Fokkema, I., Verschuuren, J., Ginjaar, I., van Deutekom, J., van Ommen, G.-J., and den Dunnen, J.T. (2009). Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 30, 293–299.
- Abelson, J. (2008). Is the spliceosome a ribonucleoprotein enzyme? *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1235–1237.
- Adams, J. (2001). Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. *Semin. Oncol.* 28, 613–619.
- Alexander, D.R. (2000). The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin. Immunol.* 12, 349–359.
- 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.
- Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 149–157.
- 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.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., and Cancro, M.P. (1992). Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 149, 2533–2540.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., Lentz, V.M., and Cancro, M.P. (1993). Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental

- intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 4431–4444.
- Alt, F.W., and Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 4118–4122.
- Alt, F.W., Bothwell, A.L., Knapp, M., Siden, E., Mather, E., Koshland, M., and Baltimore, D. (1980). Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* *20*, 293–301.
- Alt, F.W., 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.
- Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.-L., Guo, C., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of Programmed DNA Lesions and Genomic Instability in the Immune System. *Cell* *152*, 417–429.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., and Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* *432*, 112–118.
- Amrani, N., Sachs, M.S., and Jacobson, A. (2006). Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 415–425.
- Anders, K.R., Grimson, A., and Anderson, P. (2003). SMG-5, required for *C.elegans* nonsense-mediated mRNA decay, associates with SMG-2 and protein phosphatase 2A. *EMBO J.* *22*, 641–650.
- Aoki-Ota, M., Torkamani, A., Ota, T., Schork, N., and Nemazee, D. (2012). Skewed primary Ig $\kappa$  repertoire and V-J joining in C57BL/6 mice: implications for recombination accessibility and receptor editing. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 2305–2315.
- Aoufouchi, S., Yélamos, J., and Milstein, C. (1996). Nonsense mutations inhibit RNA splicing in a cell-free system: recognition of mutant codon is independent of protein synthesis. *Cell* *85*, 415–422.
- Applequist, S.E., Selg, M., Raman, C., and Jäck, H.M. (1997). Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. *Nucleic Acids Res.* *25*, 814–821.
- Aragon, I.V., Barrington, R.A., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2012). The specialized unfolded protein response of B lymphocytes: ATF6 $\alpha$ -independent development of antibody-secreting B cells. *Mol. Immunol.* *51*, 347–355.

- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P., and Zöller, M. (1992). Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257, 682–685.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., et al. (2007). Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 109, 3489–3495.
- Azubel, M., Habib, N., Sperling, R., and Sperling, J. (2006). Native spliceosomes assemble with pre-mRNA to form supraspliceosomes. *J. Mol. Biol.* 356, 955–966.

## **B**

- Baba, Y., Pelayo, R., and Kincade, P.W. (2004). Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol.* 25, 645–649.
- Barabino, S.M., Blencowe, B.J., Ryder, U., Sproat, B.S., and Lamond, A.I. (1990). Targeted snRNP depletion reveals an additional role for mammalian U1 snRNP in spliceosome assembly. *Cell* 63, 293–302.
- Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2010). BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv. Immunol.* 105, 193–210.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508–511.
- Baumann, B., Potash, M.J., and Köhler, G. (1985). Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J.* 4, 351–359.
- Baumgarth, N. (2013). Innate-like B cells and their rules of engagement. *Adv. Exp. Med. Biol.* 785, 57–66.
- Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2006). Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20, 391–398.
- Belgrader, P., Cheng, J., and Maquat, L.E. (1993). Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 482–486.
- Belnoue, E., Pihlgren, M., McGaha, T.L., Tougne, C., Rochat, A.-F., Bossen, C., Schneider, P., Huard, B., Lambert, P.-H., and Siegrist, C.-A. (2008). APRIL is critical for



- plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* *111*, 2755–2764.
- Belnoue, E., Tougne, C., Rochat, A.-F., Lambert, P.-H., Pinschewer, D.D., and Siegrist, C.-A. (2012). Homing and adhesion patterns determine the cellular composition of the bone marrow plasma cell niche. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1283–1291.
- Benson, M.J., Aijö, T., Chang, X., Gagnon, J., Pape, U.J., Anantharaman, V., Aravind, L., Pursiheimo, J.-P., Oberdoerffer, S., Liu, X.S., et al. (2012). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like (hnRNPLL) and elongation factor, RNA polymerase II, 2 (ELL2) are regulators of mRNA processing in plasma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16252–16257.
- Berglund, J.A., Abovich, N., and Rosbash, M. (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev.* *12*, 858–867.
- Beverley, P.C., Daser, A., Michie, C.A., and Wallace, D.L. (1992). Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem. Soc. Trans.* *20*, 184–187.
- Bhattacharya, A., Czaplinski, K., Trifillis, P., He, F., Jacobson, A., and Peltz, S.W. (2000). Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA N. Y. N* *6*, 1226–1235.
- Bhuvanagiri, M., Schlitter, A.M., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2010). NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem. J.* *430*, 365–377.
- Bindereif, A., and Green, M.R. (1987). An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. *EMBO J.* *6*, 2415–2424.
- Blaustein, M., Pelisch, F., and Srebrow, A. (2007). Signals, pathways and splicing regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 2031–2048.
- Blencowe, B.J. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 106–110.
- 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.
- Boekel, E. ten, Melchers, F., and Rolink, A.G. (1998). Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity* *8*, 199–207.
- Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., and Thompson, C.B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* *74*, 597–608.

- Bonaud, A., Bender, S., Touchard, G., Lacombe, C., Srouf, N., Delpy, L., Oblet, C., Druilhe, A., Quellard, N., Javaugue, V., et al. (2015). A mouse model recapitulating human monoclonal heavy chain deposition disease evidences the relevance of proteasome inhibitor therapy. *Blood* *126*, 757–765.
- Bono, F., and Gehring, N.H. (2011). Assembly, disassembly and recycling: the dynamics of exon junction complexes. *RNA Biol.* *8*, 24–29.
- Bono, F., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2006). The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* *126*, 713–725.
- 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.
- Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P., and Alt, F.W. (1994). S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J.* *13*, 665–674.
- Brennan, F.R., O’Neill, J.K., Allen, S.J., Butter, C., Nuki, G., and Baker, D. (1999). CD44 is involved in selective leucocyte extravasation during inflammatory central nervous system disease. *Immunology* *98*, 427–435.
- Brodeur, P.H., and Riblet, R. (1984). The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur. J. Immunol.* *14*, 922–930.
- Bryant, V.L., Ma, C.S., Avery, D.T., Li, Y., Good, K.L., Corcoran, L.M., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2007). Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 8180–8190.
- Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2010). Shaping up a lineage--lessons from B lymphopoiesis. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 148–153.
- Buchner, D.A., Trudeau, M., and Meisler, M.H. (2003). SCNM1, a putative RNA splicing factor that modifies disease severity in mice. *Science* *301*, 967–969.
- Bühler, M., and Mühlemann, O. (2005). Alternative splicing induced by nonsense mutations in the immunoglobulin mu VDJ exon is independent of truncation of the open reading frame. *RNA N. Y. N* *11*, 139–146.

Bühler, M., Paillusson, A., and Mühlemann, O. (2004). Efficient downregulation of immunoglobulin mu mRNA with premature translation-termination codons requires the 5'-half of the VDJ exon. *Nucleic Acids Res.* *32*, 3304–3315.

Bühler, M., Steiner, S., Mohn, F., Paillusson, A., and Mühlemann, O. (2006). EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 462–464.

## C

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.

Cali, B.M., Kuchma, S.L., Latham, J., and Anderson, P. (1999). smg-7 is required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *151*, 605–616.

Caputi, M., Kendzior, R.J., and Beemon, K.L. (2002). A nonsense mutation in the fibrillin-1 gene of a Marfan syndrome patient induces NMD and disrupts an exonic splicing enhancer. *Genes Dev.* *16*, 1754–1759.

Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 285–298.

Carter, M.S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S., and Wilkinson, M.F. (1995). A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J. Biol. Chem.* *270*, 28995–29003.

Carter, M.S., Li, S., and Wilkinson, M.F. (1996). A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *EMBO J.* *15*, 5965–5975.

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.

Cassese, G., Lindenau, S., de Boer, B., Arce, S., Hauser, A., Riemekasten, G., Berek, C., Hiepe, F., Krenn, V., Radbruch, A., et al. (2001). Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2726–2732.

Cassese, G., Arce, S., Hauser, A.E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2003). Plasma cell survival is

- mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 1684–1690.
- Cenci, S., and Sitia, R. (2007). Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett.* *581*, 3652–3657.
- Cenci, S., Mezghrani, A., Cascio, P., Bianchi, G., Cerruti, F., Fra, A., Lelouard, H., Masciarelli, S., Mattioli, L., Oliva, L., et al. (2006). Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *EMBO J.* *25*, 1104–1113.
- Cenci, S., 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., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 118–132.
- Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F., and Le Hir, H. (2008). NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 85–93.
- Chang, X., Li, B., and Rao, A. (2015). RNA-binding protein hnRNPLL regulates mRNA splicing and stability during B-cell to plasma-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E1888–E1897.
- Chang, Y.-F., Chan, W.-K., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007a). Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame. *J. Biol. Chem.* *282*, 29738–29747.
- Chang, Y.-F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007b). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 51–74.
- Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 541–552.
- Chaudhuri, J., 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.
- 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, K., and Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 345–352.

- Cheng, C., and Sharp, P.A. (2006). Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 362–370.
- Cheng, S.C., and Abelson, J. (1987). Spliceosome assembly in yeast. *Genes Dev.* *1*, 1014–1027.
- 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.
- Chiara, M.D., Gozani, O., Bennett, M., Champion-Arnaud, P., Palandjian, L., and Reed, R. (1996). Identification of proteins that interact with exon sequences, splice sites, and the branchpoint sequence during each stage of spliceosome assembly. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 3317–3326.
- Chiu, S.-Y., Serin, G., Ohara, O., and Maquat, L.E. (2003). Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA N. Y. N* *9*, 77–87.
- Chiu, S.-Y., Lejeune, F., Ranganathan, A.C., and Maquat, L.E. (2004). The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev.* *18*, 745–754.
- 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.
- Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* *24*, 343–349.
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., et al. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet Lond. Engl.* *378*, 595–605.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* *8*, 463–470.
- Conti, E., and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 316–325.
- Conway, K.L., Kuballa, P., Khor, B., Zhang, M., Shi, H.N., Virgin, H.W., and Xavier, R.J. (2013). ATG5 regulates plasma cell differentiation. *Autophagy* *9*, 528–537.
- Cooper, D.L., and Dougherty, G.J. (1995). To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. *Nat. Med.* *1*, 635–637.

- Cooper, T.A., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2009). RNA and disease. *Cell* 136, 777–793.
- Cordin, O., Hahn, D., and Beggs, J.D. (2012). Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 431–438.
- Cosson, B., Berkova, N., Couturier, A., Chabelskaya, S., Philippe, M., and Zhouravleva, G. (2002). Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 94, 205–216.
- Culbertson, M.R., and Leeds, P.F. (2003). Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 207–214.
- Culbertson, M.R., Underbrink, K.M., and Fink, G.R. (1980). Frameshift suppression *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic properties of group II suppressors. *Genetics* 95, 833–853.
- Cyster, J.G., Healy, J.I., Kishihara, K., Mak, T.W., Thomas, M.L., and Goodnow, C.C. (1996). Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature* 381, 325–328.

## **D**

- Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G., and Mårtensson, I.-L. (2007). Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26, 4273–4282.
- 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.
- Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C.L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2006). Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5528–5543.
- Delpy, L., Le Bert, M., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2003). Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.* 33, 2108–2113.
- Delpy, L., Sirac, C., Le Morvan, C., and Cogné, M. (2004a). Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 1842–1848.
- Delpy, L., Sirac, C., Magnoux, E., Duchez, S., and Cogné, M. (2004b). RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional kappa alleles and detects premature

- termination within the last kappa exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7375–7380.
- Denning, G., Jamieson, L., Maquat, L.E., Thompson, E.A., and Fields, A.P. (2001). Cloning of a novel phosphatidylinositol kinase-related kinase: characterization of the human SMG-1 RNA surveillance protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 22709–22714.
- Dietz, H.C., and Kendzior, R.J. (1994). Maintenance of an open reading frame as an additional level of scrutiny during splice site selection. *Nat. Genet.* *8*, 183–188.
- 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.
- Dörner, T., Foster, S.J., Farner, N.L., and Lipsky, P.E. (1998). Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: targeting of RGYW motifs on both DNA strands. *Eur. J. Immunol.* *28*, 3384–3396.
- Dostie, J., and Dreyfuss, G. (2002). Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr. Biol. CB* *12*, 1060–1067.
- Dujardin, G., Lafaille, C., de la Mata, M., Marasco, L.E., Muñoz, M.J., Le Jossic-Corcós, C., Corcos, L., and Kornblihtt, A.R. (2014). How slow RNA polymerase II elongation favors alternative exon skipping. *Mol. Cell* *54*, 683–690.
- Dunnick, W., Hertz, G.Z., Scappino, L., and Gritzmacher, C. (1993). DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res.* *21*, 365–372.

## **E**

- Early, P., Rogers, J., Davis, M., Calame, K., Bond, M., Wall, R., and Hood, L. (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* *20*, 313–319.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and Hood, L. (2004). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. 1980. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 6503–6514.
- Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z., and Mühlemann, O. (2008). Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol.* *6*, e92.
- Eberle, A.B., Herrmann, K., Jäck, H.-M., and Mühlemann, O. (2009a). Equal transcription rates of productively and nonproductively rearranged immunoglobulin mu heavy chain alleles in a pro-B cell line. *RNA N. Y. N* *15*, 1021–1028.

- Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., and Jensen, T.H. (2009b). SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 49–55.
- Edry, E., and Melamed, D. (2004). Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 4265–4271.
- Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Müller, W., and Rajewsky, K. (1993). Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell* *72*, 695–704.
- Eisen, H.N., and Reilly, E.B. (1985). Lambda chains and genes in inbred mice. *Annu. Rev. Immunol.* *3*, 337–365.
- Enders, A., Short, A., Miosge, L.A., Bergmann, H., Sontani, Y., Bertram, E.M., Whittle, B., Balakishnan, B., Yoshida, K., Sjollem, G., et al. (2014). Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 4513–4518.
- Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 7867–7879.

## **F**

- Fabrizio, P., Dannenberg, J., Dube, P., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2009). The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Mol. Cell* *36*, 593–608.
- Facon, T., Avet-Loiseau, H., Guillermin, G., Moreau, P., Geneviève, F., Zandecki, M., Lai, J.L., Leleu, X., Jouet, J.P., Bauters, F., et al. (2001). Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* *97*, 1566–1571.
- Fagraeus, A. (1948). The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *58*, 1–13.
- Falzarano, M.S., Scotton, C., Passarelli, C., and Ferlini, A. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Mol. Basel Switz.* *20*, 18168–18184.
- 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.



- Ferraiuolo, M.A., Lee, C.-S., Ler, L.W., Hsu, J.L., Costa-Mattioli, M., Luo, M.-J., Reed, R., and Sonenberg, N. (2004). A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4118–4123.
- Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A.K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., et al. (2009). International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* *23*, 2210–2221.
- Förster, I., and Rajewsky, K. (1990). The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4781–4784.
- Frischmeyer, P.A., and Dietz, H.C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1893–1900.
- Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., and Conti, E. (2005). SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell* *17*, 537–547.

## **G**

- Garcia-Blanco, M.A., Baraniak, A.P., and Lasda, E.L. (2004). Alternative splicing in disease and therapy. *Nat. Biotechnol.* *22*, 535–546.
- Gardner, L.B. (2008). Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3729–3741.
- Gardner, L.B. (2010). Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Mol. Cancer Res. MCR* *8*, 295–308.
- Gass, J.N., Gifford, N.M., and Brewer, J.W. (2002). Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 49047–49054.
- Gass, J.N., Gunn, K.E., Sriburi, R., and Brewer, J.W. (2004). Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response. *Trends Immunol.* *25*, 17–24.
- Gass, J.N., Jiang, H.-Y., Wek, R.C., and Brewer, J.W. (2008). The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol. Immunol.* *45*, 1035–1043.
- Gaudette, B.T., Iwakoshi, N.N., and Boise, L.H. (2014). Bcl-xL Protein Protects from C/EBP Homologous Protein (CHOP)-dependent Apoptosis during Plasma Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* *289*, 23629–23640.

- Geffroy-Luseau, A., Jégo, G., Bataille, R., Campion, L., and Pellat-Deceunynck, C. (2008). Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro. *Int. Immunol.* *20*, 775–782.
- Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2003). Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol. Cell* *11*, 939–949.
- Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2009). The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* *7*, e1000120.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* *79*, 143–156.
- Gersappe, A., and Pintel, D.J. (1999). A premature termination codon interferes with the nuclear function of an exon splicing enhancer in an open reading frame-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1640–1650.
- Gersappe, A., Burger, L., and Pintel, D.J. (1999). A premature termination codon in either exon of minute virus of mice P4 promoter-generated pre-mRNA can inhibit nuclear splicing of the intervening intron in an open reading frame-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *274*, 22452–22458.
- Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* *271*, 501.
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., and Conti, E. (2006). Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *EMBO J.* *25*, 5117–5125.
- Goemans, N.M., Tulinius, M., van den Akker, J.T., Burm, B.E., Ekhart, P.F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A.A., Platenburg, G.J., Sipkens, J.A., et al. (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1513–1522.
- Good-Jacobson, K.L., and Tarlinton, D.M. (2012). Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.* *24*, 403–408.
- 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.
- Gorman, J.R., and Alt, F.W. (1998). Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Adv. Immunol.* *69*, 113–181.

- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussenot, R., Ferry, A., Voit, T., et al. (2015a). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 21, 270–275.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Avril, A., Amthor, H., and Garcia, L. (2015b). [Functional correction and cognitive improvement in dystrophic mice using splice-switching tricyclo-DNA oligomers]. *Médecine Sci.* MS 31, 253–256.
- Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA N. Y.* N 6, 1197–1211.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388, 492–495.
- Grimson, A., O'Connor, S., Newman, C.L., and Anderson, P. (2004). SMG-1 is a phosphatidylinositol kinase-related protein kinase required for nonsense-mediated mRNA Decay in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7483–7490.
- Gunn, K.E., and Brewer, J.W. (2006). Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 3791–3798.

## H

- Haas, K.M. (2015). B-1 lymphocytes in mice and nonhuman primates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., and Tedder, T.F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7–18.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000a). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* 5, 897–904.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000b). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.
- Harding, H.P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I., and Ron, D. (2002). Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 575–599.

- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* *11*, 619–633.
- Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 595–621.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* *26*, 703–714.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (2012). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. 1991. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 3271–3283.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* *194*, 45–56.
- 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.
- Hasbold, J., Corcoran, L.M., Tarlinton, D.M., Tangye, S.G., and Hodgkin, P.D. (2004). Evidence from the generation of immunoglobulin G-secreting cells that stochastic mechanisms regulate lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* *5*, 55–63.
- Hauser, A.E., Debes, G.F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2002). Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 1277–1282.
- Hauser, A.E., Muehlinghaus, G., Manz, R.A., Cassese, G., Arce, S., Debes, G.F., Hamann, A., Berek, C., Lindenau, S., Doerner, T., et al. (2003). Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *987*, 266–269.
- 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.
- Heesters, B.A., Myers, R.C., and Carroll, M.C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 495–504.
- Hertel, K.J. (2008). Combinatorial control of exon recognition. *J. Biol. Chem.* *283*, 1211–1215.
- 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., Baumgarth, N., and Wilshire, J.A. (2000). B-1 cell origins and VH repertoire determination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 252, 3–13.
- Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 89–102.
- Hnilicová, J., and Staněk, D. (2011). Where splicing joins chromatin. *Nucl. Austin Tex* 2, 182–188.
- Hodgkin, J., Papp, A., Pulak, R., Ambros, V., and Anderson, P. (1989). A new kind of informational suppression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 123, 301–313.
- Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat. Genet.* 36, 801–808.
- Holwerda, S.J.B., van de Werken, H.J.G., Ribeiro de Almeida, C., Bergen, I.M., de Bruijn, M.J.W., Verstegen, M.J.A.M., Simonis, M., Splinter, E., Wijchers, P.J., Hendriks, R.W., et al. (2013). Allelic exclusion of the immunoglobulin heavy chain locus is independent of its nuclear localization in mature B cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 6905–6916.
- Horuk, R. (1998). Chemokines beyond inflammation. *Nature* 393, 524–525.
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., and Katada, T. (1999). The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 16677–16680.
- Hoskins, A.A., Friedman, L.J., Gallagher, S.S., Crawford, D.J., Anderson, E.G., Wombacher, R., Ramirez, N., Cornish, V.W., Gelles, J., and Moore, M.J. (2011). Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes. *Science* 331, 1289–1295.
- Hosoda, N., Kim, Y.K., Lejeune, F., and Maquat, L.E. (2005). CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 893–901.
- House, A.E., and Lynch, K.W. (2008). Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *J. Biol. Chem.* 283, 1217–1221.
- 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.

- 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.
- Hung, L.-H., Heiner, M., Hui, J., Schreiner, S., Benes, V., and Bindereif, A. (2008). Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: a combined microarray and RNAi analysis. *RNA N. Y. N* *14*, 284–296.
- Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Saulière, J., and Izaurralde, E. (2008). SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA N. Y. N* *14*, 2609–2617.
- Hutchison, C.A., Batuman, V., Behrens, J., Bridoux, F., Sirac, C., Dispenzieri, A., Herrera, G.A., Lachmann, H., Sanders, P.W., and International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group (2012). The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat. Rev. Nephrol.* *8*, 43–51.
- Hwang, J., and Maquat, L.E. (2011). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 422–430.
- Hwang, J.K., Alt, F.W., and Yeap, L.-S. (2015). Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol. Spectr.* *3*, MDNA3–MDNA0037 – 2014.

## I

- Imam, J.S., Gudikote, J.P., Chan, W.-K., and Wilkinson, M.F. (2010). Frame-disrupting mutations elicit pre-mRNA accumulation independently of frame disruption. *Nucleic Acids Res.* *38*, 1559–1574.
- 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.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L.E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* *106*, 607–617.
- Ishii, T., Seike, T., Nakashima, T., Juliger, S., Maharaj, L., Soga, S., Akinaga, S., Cavenagh, J., Joel, S., and Shiotsu, Y. (2012). Anti-tumor activity against multiple myeloma by combination of KW-2478, an Hsp90 inhibitor, with bortezomib. *Blood Cancer J.* *2*, e68.

- Ishizuka, M., Ohshima, H., Tamura, N., Nakada, T., Inoue, A., Hirose, S., and Hagiwara, H. (2003). Molecular cloning and characteristics of a novel zinc finger protein and its splice variant whose transcripts are expressed during spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *301*, 1079–1085.
- Isken, O., and Maquat, L.E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* *21*, 1833–1856.
- Isken, O., Kim, Y.K., Hosoda, N., Mayeur, G.L., Hershey, J.W.B., and Maquat, L.E. (2008). Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* *133*, 314–327.
- Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., and Honjo, T. (2004). Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1975–1980.
- Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* *27*, 736–747.

## J

- Jäck, H.M., Berg, J., and Wabl, M. (1989). Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* *19*, 843–847.
- Janssens, S., Pulendran, B., and Lambrecht, B.N. (2014). Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat. Immunol.* *15*, 910–919.
- Jia, J., Furlan, A., Gonzalez-Hilarion, S., Leroy, C., Gruenert, D.C., Tulasne, D., and Lejeune, F. (2015). Caspases shutdown nonsense-mediated mRNA decay during apoptosis. *Cell Death Differ.* *22*, 1754–1763.
- Johnson, M.B., Kawasaki, Y.I., Mason, C.E., Krsnik, Ž., Coppola, G., Bogdanović, D., Geschwind, D.H., Mane, S.M., State, M.W., and Šestan, N. (2009). Functional and Evolutionary Insights Into Human Brain Development Through Global Transcriptome Analysis. *Neuron* *62*, 494–509.
- Jojic, V., Shay, T., Sylvia, K., Zuk, O., Sun, X., Kang, J., Regev, A., Koller, D., Immunological Genome Project Consortium, Best, A.J., et al. (2013). Identification of transcriptional regulators in the mouse immune system. *Nat. Immunol.* *14*, 633–643.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 541–570.

Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* *12*, 5–14.

### **K**

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

Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2004a). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* *200*, 967–977.

Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2004b). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* *200*, 967–977.

Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., et al. (2007). Initiation of plasma cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* *26*, 555–566.

Karam, R., Lou, C.-H., Kroeger, H., Huang, L., Lin, J.H., and Wilkinson, M.F. (2015). The unfolded protein response is shaped by the NMD pathway. *EMBO Rep.* *16*, 599–609.

Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* *20*, 355–367.

Kawakami, T., Inagi, R., Takano, H., Sato, S., Ingelfinger, J.R., Fujita, T., and Nangaku, M. (2009). Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *24*, 2665–2672.

Keren, H., Lev-Maor, G., and Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 345–355.

Khajavi, M., Inoue, K., and Lupski, J.R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *14*, 1074–1081.

Kim, V.N., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* *293*, 1832–1836.



- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* *34*, 961–972.
- 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.
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S., and Ahringer, J. (2009). Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat. Genet.* *41*, 376–381.
- Kole, R., and Leppert, B.J. (2012). Targeting mRNA splicing as a potential treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Discov. Med.* *14*, 59–69.
- Kole, R., Krainer, A.R., and Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 125–140.
- Konarska, M.M., and Sharp, P.A. (1987). Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell* *49*, 763–774.
- Konarska, M.M., and Sharp, P.A. (1988). Association of U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins in a spliceosome-type complex in absence of precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 5459–5462.
- Krämer, A., and Utans, U. (1991). Three protein factors (SF1, SF3 and U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO J.* *10*, 1503–1509.
- Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2012). Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Invest.* *122*, 3456–3463.
- Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., and Gehring, N.H. (2006). Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA N. Y. N* *12*, 1015–1022.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 149–159.
- Kyle, R.A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Lust, J.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., et al. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.* *78*, 21–33.

**L**

- Lacadie, S.A., and Rosbash, M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast. *Mol. Cell* *19*, 65–75.
- 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.
- 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, A.-H., Chu, G.C., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2005). XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J.* *24*, 4368–4380.
- Lee, H., Noh, J.-Y., Oh, Y., Kim, Y., Chang, J.-W., Chung, C.-W., Lee, S.-T., Kim, M., Ryu, H., and Jung, Y.-K. (2012). IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 101–114.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* *16*, 452–466.
- Leeds, P., Peltz, S.W., Jacobson, A., and Culbertson, M.R. (1991). The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* *5*, 2303–2314.
- Lefranc, M.-P. (2009). [Antibody databases: IMGT, a French platform of world-wide interest]. *Médecine Sci. MS* *25*, 1020–1023.
- Le Hir, H., and Séraphin, B. (2008). EJC at the heart of translational control. *Cell* *133*, 213–216.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., and Moore, M.J. (2000a). The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* *19*, 6860–6869.
- Le Hir, H., Moore, M.J., and Maquat, L.E. (2000b). Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev.* *14*, 1098–1108.

- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M.J. (2001a). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* *20*, 4987–4997.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Braun, I.C., Forler, D., and Izaurralde, E. (2001b). The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep.* *2*, 1119–1124.
- Le Hir, H., Saulière, J., and Wang, Z. (2016). The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 41–54.
- Lejeune, F., and Maquat, L.E. (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 309–315.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., and Maquat, L.E. (2002). The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* *21*, 3536–3545.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* *12*, 675–687.
- Leu, T.M., and Schatz, D.G. (1995). rag-1 and rag-2 are components of a high-molecular-weight complex, and association of rag-2 with this complex is rag-1 dependent. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5657–5670.
- Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* *469*, 323–335.
- Lewis, S.M. (1994). P nucleotides, hairpin DNA and V(D)J joining: making the connection. *Semin. Immunol.* *6*, 131–141.
- Li, S., and Wilkinson, M.F. (1998). Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* *8*, 135–141.
- Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S., and Lee, A.S. (2000). ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5096–5106.
- Libri, D., Marie, J., Brody, E., and Fiszman, M.Y. (1989). A subfragment of the beta tropomyosin gene is alternatively spliced when transfected into differentiating muscle cells. *Nucleic Acids Res.* *17*, 6449–6462.
- Lin, S., and Fu, X.-D. (2007). SR proteins and related factors in alternative splicing. *Adv. Exp. Med. Biol.* *623*, 107–122.

- Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002a). 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.
- Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002b). 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.
- Lin, P., Owens, R., Tricot, G., and Wilson, C.S. (2004). Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 482–488.
- Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596–599.
- Liu, H., Schmidt-Supprian, M., Shi, Y., Hobeika, E., Barteneva, N., Jumaa, H., Pelanda, R., Reth, M., Skok, J., Rajewsky, K., et al. (2007). Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes Dev.* 21, 1179–1189.
- Liu, H.X., Cartegni, L., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2001a). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat. Genet.* 27, 55–58.
- Liu, Z., Luyten, I., Bottomley, M.J., Messias, A.C., Houngninou-Molango, S., Sprangers, R., Zanier, K., Krämer, A., and Sattler, M. (2001b). Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. *Science* 294, 1098–1102.
- Liu, Z., Dawes, R., Petrova, S., Beverley, P.C.L., and Tchilian, E.Z. (2006). CD45 regulates apoptosis in peripheral T lymphocytes. *Int. Immunol.* 18, 959–966.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 190, 75–89.
- Lozano, F., Maertzdorf, B., Pannell, R., and Milstein, C. (1994). Low cytoplasmic mRNA levels of immunoglobulin kappa light chain genes containing nonsense codons correlate with inefficient splicing. *EMBO J.* 13, 4617–4622.
- Lu, Q.-L., Cirak, S., and Partridge, T. (2014). What Can We Learn From Clinical Trials of Exon Skipping for DMD? *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3, e152.
- Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327, 996–1000.
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., and Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 144, 16–26.

Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., and Steitz, J.A. (2000). Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121–1131.

### M

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. (2002a). 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., Brewer, J.W., Diehl, J.A., and Hendershot, L.M. (2002b). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* 318, 1351–1365.

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.

Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W., and Tonegawa, S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 24, 353–365.

Mandel, E.M., and Grosschedl, R. (2010). Transcription control of early B cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 161–167.

Mangus, D.A., Evans, M.C., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4, 223.

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

Månsson, R., Hultquist, A., Luc, S., Yang, L., Anderson, K., Kharazi, S., Al-Hashmi, S., Liuba, K., Thorén, L., Adolfsson, J., et al. (2007). Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* 26, 407–419.

Manz, R.A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133–134.

- Manz, R.A., Löhning, M., Cassese, G., Thiel, A., and Radbruch, A. (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int. Immunol.* *10*, 1703–1711.
- Maquat, L.E. (2002). NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes Dev.* *16*, 1743–1753.
- Maquat, L.E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 89–99.
- Maquat, L.E., and Li, X. (2001). Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA N. Y. N* *7*, 445–456.
- 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.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007a). The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 137–142.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007b). The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 137–142.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 195–201.
- 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.
- Martincic, K., Alkan, S.A., Cheadle, A., Borghesi, L., and Milcarek, C. (2009). Transcription elongation factor ELL2 directs immunoglobulin secretion in plasma cells by stimulating altered RNA processing. *Nat. Immunol.* *10*, 1102–1109.
- Masciarelli, S., Fra, A.M., Pengo, N., Bertolotti, M., Cenci, S., Fagioli, C., Ron, D., Hendershot, L.M., and Sitia, R. (2010). CHOP-independent apoptosis and pathway-selective induction of the UPR in developing plasma cells. *Mol. Immunol.* *47*, 1356–1365.
- Matlin, A.J., and Moore, M.J. (2007). Spliceosome assembly and composition. *Adv. Exp. Med. Biol.* *623*, 14–35.
- Matlin, A.J., Clark, F., and Smith, C.W.J. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 386–398.

- Matter, N., Marx, M., Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P., and König, H. (2000). Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 35353–35360.
- Matter, N., Herrlich, P., and König, H. (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420, 691–695.
- Mayeda, A., Sreaton, G.R., Chandler, S.D., Fu, X.D., and Krainer, A.R. (1999). Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1853–1863.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387–395.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., and Bentley, D.L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357–361.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259.
- McHeyzer-Williams, M.G., McLean, M.J., Lalor, P.A., and Nossal, G.J. (1993). Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 178, 295–307.
- McManus, C.J., and Graveley, B.R. (2011). RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 373–379.
- McNeill, L., Cassady, R.L., Sarkardei, S., Cooper, J.C., Morgan, G., and Alexander, D.R. (2004). CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol. Lett.* 92, 125–134.
- Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I., and Brieva, J.A. (2002). The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99, 2154–2161.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., et al. (2007). Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* 67, 1783–1792.

- 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.
- Mendell, J.T., Medghalchi, S.M., Lake, R.G., Noensie, E.N., and Dietz, H.C. (2000). Novel Upf2p orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 8944–8957.
- Mendell, J.T., ap Rhys, C.M.J., and Dietz, H.C. (2002). Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* *298*, 419–422.
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., and Cambier, J.C. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* *25*, 953–962.
- Metcalf, R., Scott, L.M., Daniel, K.G., and Dou, Q.P. (2014). Proteasome inhibitor patents (2010 - present). *Expert Opin. Ther. Pat.* *24*, 369–382.
- 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.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., and Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* *297*, 110–113.
- Milcarek, C., Albring, M., Langer, C., and Park, K.S. (2011). The eleven-nineteen lysine-rich leukemia gene (ELL2) influences the histone H3 protein modifications accompanying the shift to secretory immunoglobulin heavy chain mRNA production. *J. Biol. Chem.* *286*, 33795–33803.
- Milne, C.D., and Paige, C.J. (2006). IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* *18*, 20–30.
- Minges Wols, H.A., Underhill, G.H., Kansas, G.S., and Witte, P.L. (2002). The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4213–4221.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P.G., Hideshima, T., Munshi, N., Treon, S.P., and Anderson, K.C. (2002). Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* *99*, 4079–4086.
- Mohn, F., Bühler, M., and Mühlemann, O. (2005). Nonsense-associated alternative splicing of T-cell receptor beta genes: no evidence for frame dependence. *RNA N. Y. N* *11*, 147–156.



- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2006). New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* 27, 428–433.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36, 13–21.
- Moore, M.J., and Sharp, P.A. (1993). Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* 365, 364–368.
- Moore, K.W., Rogers, J., Hunkapiller, T., Early, P., Nottenburg, C., Weissman, I., Bazin, H., Wall, R., and Hood, L.E. (1981). Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1800–1804.
- 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., Klein, B., Bataille, R., Descamps, G., Maïga, S., Hose, D., Goldschmidt, H., Jauch, A., Rème, T., Jourdan, M., et al. (2011). A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 96, 574–582.
- Moriya, S., Che, X.-F., Komatsu, S., Abe, A., Kawaguchi, T., Gotoh, A., Inazu, M., Tomoda, A., and Miyazawa, K. (2013). Macrolide antibiotics block autophagy flux and sensitize to bortezomib via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction in myeloma cells. *Int. J. Oncol.* 42, 1541–1550.
- 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.
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Kirillov, A., Pelanda, R., Cedar, H., Chess, A., and Bergman, Y. (1998). Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev.* 12, 1801–1811.
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Tenzen, T., Goldmit, M., Gabay, C., Elizur, S., Qi, P., Reubinoff, B.E., Chess, A., Cedar, H., et al. (2001). Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature* 414, 221–225.
- Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Rajewsky, K. (2004a). The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 118, 539–544.

- Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Rajewsky, K. (2004b). The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 118, 539–544.
- Motea, E.A., and Berdis, A.J. (2010). Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1151–1166.
- Mountz, J.D., Mushinski, J.F., Owens, J.D., and Finkelman, F.D. (1990). The in vivo generation of murine IgD-secreting cells is accompanied by deletion of the C mu gene and occasional deletion of the gene for the C delta 1 domain. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 145, 1583–1591.
- Mühlemann, O., Mock-Casagrande, C.S., Wang, J., Li, S., Custódio, N., Carmo-Fonseca, M., Wilkinson, M.F., and Moore, M.J. (2001). Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol. Cell* 8, 33–43.
- Muntoni, F., and Wood, M.J.A. (2011). Targeting RNA to treat neuromuscular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 621–637.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.

## N

- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 107–116.
- Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K.S., and Karasuyama, H. (1997). The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 7, 559–570.
- Nagy, E., and Maquat, L.E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* 23, 198–199.
- 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.

- Nakayama, Y., Endo, M., Tsukano, H., Mori, M., Oike, Y., and Gotoh, T. (2010). Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. *J. Biochem. (Tokyo)* *147*, 471–483.
- Nemazee, D.A., and Bürki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* *337*, 562–566.
- Nemazee, D., and Weigert, M. (2000). Revising B cell receptors. *J. Exp. Med.* *191*, 1813–1817.
- 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.
- Nicholson, P., and Mühlemann, O. (2010). Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1615–1620.
- Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metze, S., Zamudio Orozco, R., Kleinschmidt, N., and Mühlemann, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *67*, 677–700.
- Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M.-J., Littman, D.R., and Zou, Y.-R. (2004). The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J. Exp. Med.* *200*, 1145–1156.
- Nilsen, T.W. (2002). The spliceosome: no assembly required? *Mol. Cell* *9*, 8–9.
- Nogués, G., Kadener, S., Cramer, P., de la Mata, M., Fededa, J.P., Blaustein, M., Srebrow, A., and Kornblihtt, A.R. (2003). Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life* *55*, 235–241.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.
- Norio, P., Kosiyatrakul, S., Yang, Q., Guan, Z., Brown, N.M., Thomas, S., Riblet, R., and Schildkraut, C.L. (2005). Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development. *Mol. Cell* *20*, 575–587.
- Norvell, A., and Monroe, J.G. (1996). Acquisition of surface IgD fails to protect from tolerance-induction. Both surface IgM- and surface IgD-mediated signals induce apoptosis of immature murine B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* *156*, 1328–1332.

- 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.
- Nott, A., Le Hir, H., and Moore, M.J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev.* *18*, 210–222.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J. Cell Biol.* *153*, 1011–1022.
- Nutt, S.L., Thévenin, C., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* *198*, 227–235.
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 160–171.

## O

- 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.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9220–9231.
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P., and Ohno, S. (2003). Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* *12*, 1187–1200.
- Oliver, A.M., Martin, F., Gartland, G.L., Carter, R.H., and Kearney, J.F. (1997). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2366–2374.
- Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., and Tarlinton, D.M. (2010a). Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* *237*, 140–159.
- Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., and Tarlinton, D.M. (2010b). Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* *237*, 140–159.
- Oren, Y.S., McClure, M.L., Rowe, S.M., Sorscher, E.J., Bester, A.C., Manor, M., Kerem, E., Rivlin, J., Zahdeh, F., Mann, M., et al. (2014). The unfolded protein response affects readthrough of premature termination codons. *EMBO Mol. Med.* *6*, 685–701.

**P**

- Pagani, F., Buratti, E., Stuani, C., and Baralle, F.E. (2003). Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *J. Biol. Chem.* *278*, 26580–26588.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D., and Izaurralde, E. (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* *427*, 753–757.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* *40*, 1413–1415.
- 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.
- Park, K.S., Bayles, I., Szlachta-McGinn, A., Paul, J., Boiko, J., Santos, P., Liu, J., Wang, Z., Borghesi, L., and Milcarek, C. (2014). Transcription elongation factor ELL2 drives Ig secretory-specific mRNA production and the unfolded protein response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 4663–4674.
- Patenaude, A.-M., and Di Noia, J.M. (2010). The mechanisms regulating the subcellular localization of AID. *Nucl. Austin Tex* *1*, 325–331.
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 481–511.
- Pengo, N., Scolari, M., Oliva, L., Milan, E., Mainoldi, F., Raimondi, A., Fagioli, C., Merlini, A., Mariani, E., Pasqualetto, E., et al. (2013). Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat. Immunol.* *14*, 298–305.
- Pérez-Durán, P., Belver, L., de Yébenes, V.G., Delgado, P., Pisano, D.G., and Ramiro, A.R. (2012). UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *209*, 1379–1389.
- Perlot, T., and Alt, F.W. (2008). Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv. Immunol.* *99*, 1–32.
- 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.

- 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.
- Pioli, P.D., Debnath, I., Weis, J.J., and Weis, J.H. (2014). Zfp318 regulates IgD expression by abrogating transcription termination within the *Ighm/Ighd* locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 2546–2553.
- Plaschka, C., Nozawa, K., and Cramer, P. (2016). Mediator architecture and RNA polymerase II interaction. *J. Mol. Biol.*
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., et al. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* *11*, 299–308.
- Pulak, R., and Anderson, P. (1993). mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes Dev.* *7*, 1885–1897.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* *129*, 1337–1349.

## **R**

- Rada, C., Ehrenstein, M.R., Neuberger, M.S., and Milstein, C. (1998). Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting. *Immunity* *9*, 135–141.
- Rada, C., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., and Neuberger, M.S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol. CB* *12*, 1748–1755.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* *381*, 751–758.
- 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.
- Rauta, P.R., Nayak, B., and Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol. Lett.* *148*, 23–33.

- Reijmers, R.M., Groen, R.W.J., Rozemuller, H., Kuil, A., de Haan-Kramer, A., Csikós, T., Martens, A.C.M., Spaargaren, M., and Pals, S.T. (2010). Targeting EXT1 reveals a crucial role for heparan sulfate in the growth of multiple myeloma. *Blood* 115, 601–604.
- 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.
- Reth, M., and Nielsen, P. (2014a). Signaling circuits in early B-cell development. *Adv. Immunol.* 122, 129–175.
- Reth, M., and Nielsen, P. (2014b). Signaling circuits in early B-cell development. *Adv. Immunol.* 122, 129–175.
- Retter, I., Chevillard, C., Scharfe, M., Conrad, A., Hafner, M., Im, T.-H., Ludewig, M., Nordsiek, G., Severitt, S., Thies, S., et al. (2007). Sequence and characterization of the Ig heavy chain constant and partial variable region of the mouse strain 129S1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2419–2427.
- Reynaud, D., Demarco, I.A., Reddy, K.L., Schjerven, H., Bertolino, E., Chen, Z., Smale, S.T., Winandy, S., and Singh, H. (2008). Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat. Immunol.* 9, 927–936.
- Reynolds, A.E., Kuraoka, M., and Kelsoe, G. (2015). Natural IgM is produced by CD5-plasma cells that occupy a distinct survival niche in bone marrow. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 231–242.
- Rhode, B.M., Hartmuth, K., Westhof, E., and Lührmann, R. (2006). Proximity of conserved U6 and U2 snRNA elements to the 5' splice site region in activated spliceosomes. *EMBO J.* 25, 2475–2486.
- 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.
- Ridderstad, A., and Tarlinton, D.M. (1998). Kinetics of establishing the memory B cell population as revealed by CD38 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 4688–4695.
- 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.

- Rino, J., Carvalho, T., Braga, J., Desterro, J.M.P., Lührmann, R., and Carmo-Fonseca, M. (2007). A stochastic view of spliceosome assembly and recycling in the nucleus. *PLoS Comput. Biol.* 3, 2019–2031.
- 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.
- Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* 6, 31–41.
- Rolink, A., ten Boekel, E., Melchers, F., Fearon, D.T., Krop, I., and Andersson, J. (1996). A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* 183, 187–194.
- Rolink, A.G., Andersson, J., and Melchers, F. (2004). Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunol. Rev.* 197, 41–50.
- Röllig, C., Knop, S., and Bornhäuser, M. (2015). Multiple myeloma. *Lancet Lond. Engl.* 385, 2197–2208.
- Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* 110, 1383–1388.
- Ron, D., and Habener, J.F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6, 439–453.
- Rosbash, M., and Séraphin, B. (1991). Who’s on first? The U1 snRNP-5’ splice site interaction and splicing. *Trends Biochem. Sci.* 16, 187–190.
- Rothrock, C.R., House, A.E., and Lynch, K.W. (2005). HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *EMBO J.* 24, 2792–2802.
- Rozanski, C.H., Arens, R., Carlson, L.M., Nair, J., Boise, L.H., Chanan-Khan, A.A., Schoenberger, S.P., and Lee, K.P. (2011). Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J. Exp. Med.* 208, 1435–1446.
- Rumfelt, L.L., Zhou, Y., Rowley, B.M., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2006). Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J. Exp. Med.* 203, 675–687.
- Rutz, B., and Séraphin, B. (1999). Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly. *RNA N. Y. N* 5, 819–831.



**S**

- Saint-André, V., Batsché, E., Rachez, C., and Muchardt, C. (2011). Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 $\gamma$  favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 337–344.
- 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.
- Santos, P., Arumemi, F., Park, K.S., Borghesi, L., and Milcarek, C. (2011). Transcriptional and epigenetic regulation of B cell development. *Immunol. Res.* *50*, 105–112.
- Sato, H., and Maquat, L.E. (2009). Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev.* *23*, 2537–2550.
- Saulière, J., Murigneux, V., Wang, Z., Marquetet, E., Barbosa, I., Le Tonquèze, O., Audic, Y., Paillard, L., Roest Crolius, H., and Le Hir, H. (2012). CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1124–1131.
- Savitsky, D., and Calame, K. (2006). B-1 B lymphocytes require Blimp-1 for immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.* *203*, 2305–2314.
- Schatz, D.G., and Spanopoulou, E. (2005). Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *290*, 49–85.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* *59*, 1035–1048.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* *27*, 49–63.
- Schlissel, M.S. (2002). Does artemis end the hunt for the hairpin-opening activity in V(D)J recombination? *Cell* *109*, 1–4.
- Schlissel, M., Constantinescu, A., Morrow, T., Baxter, M., and Peng, A. (1993). Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev.* *7*, 2520–2532.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* *101*, 671–684.

- Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., and Kornblihtt, A.R. (2009). Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4325–4330.
- 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.
- Schwickert, T.A., Tagoh, H., Gültekin, S., Dakic, A., Axelsson, E., Minnich, M., Ebert, A., Werner, B., Roth, M., Cimmino, L., et al. (2014). Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nat. Immunol.* *15*, 283–293.
- Sciammas, R., and Davis, M.M. (2004). Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 5427–5440.
- Seki, M., Gearhart, P.J., and Wood, R.D. (2005). DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Rep.* *6*, 1143–1148.
- Senft, D., and Ronai, Z.A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 141–148.
- Serin, G., Gersappe, A., Black, J.D., Aronoff, R., and Maquat, L.E. (2001). Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.* *21*, 209–223.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* *17*, 51–62.
- 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. (2004a). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* *21*, 81–93.
- 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. (2004b). 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.

- Shen, H.-M., and Codogno, P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 7, 457–465.
- Shen, H., Kan, J.L.C., and Green, M.R. (2004). Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol. Cell* 13, 367–376.
- Sherman, L., Sleeman, J., Dall, P., Hekele, A., Moll, J., Ponta, H., and Herrlich, P. (1996). The CD44 proteins in embryonic development and in cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213 ( Pt 1), 249–269.
- Sherman, L., Wainwright, D., Ponta, H., and Herrlich, P. (1998). A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev.* 12, 1058–1071.
- Shibuya, T., Tange, T.Ø., Sonenberg, N., and Moore, M.J. (2004). eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 346–351.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867.
- 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.
- Shukla, S., and Oberdoerffer, S. (2012). Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 673–683.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.
- Singh, G., and Lykke-Andersen, J. (2003). New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes. *Trends Biochem. Sci.* 28, 464–466.
- Singh, G., Jakob, S., Kleedehn, M.G., and Lykke-Andersen, J. (2007). Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm. *Mol. Cell* 27, 780–792.
- Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 6, e111.

- Singh, N., Bergman, Y., Cedar, H., and Chess, A. (2003). Biallelic germline transcription at the kappa immunoglobulin locus. *J. Exp. Med.* 197, 743–750.
- Sirohi, B., and Powles, R. (2004). Multiple myeloma. *Lancet Lond. Engl.* 363, 875–887.
- Sitia, R., and Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891–894.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M., et al. (2001). Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2, 848–854.
- Smith, J.A. (2014). A new paradigm: innate immune sensing of viruses via the unfolded protein response. *Front. Microbiol.* 5, 222.
- 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.C., 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., Marcu, K.B., and Zelazowski, P. (1997). The immunoglobulin class switch: beyond “accessibility.” *Immunity* 6, 217–223.
- Soller, M. (2006). Pre-messenger RNA processing and its regulation: a genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 796–819.
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781–793.
- Srivastava, B., Quinn, W.J., Hazard, K., Erikson, J., and Allman, D. (2005). Characterization of marginal zone B cell precursors. *J. Exp. Med.* 202, 1225–1234.
- Srour, N., Chemin, G., Tinguely, A., Ashi, M.O., Oruc, Z., Péron, S., Sirac, C., Cogné, M., and Delpy, L. (2015). A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.*
- Staley, J.P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315–326.
- Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Thanaraj, T.A., and Soreq, H. (2005). Function of alternative splicing. *Gene* 344, 1–20.

- Stauder, R., Van Driel, M., Schwärzler, C., Thaler, J., Lokhorst, H.M., Kreuser, E.D., Bloem, A.C., Günthert, U., and Eisterer, W. (1996). Different CD44 splicing patterns define prognostic subgroups in multiple myeloma. *Blood* 88, 3101–3108.
- Stevens, S.W., Ryan, D.E., Ge, H.Y., Moore, R.E., Young, M.K., Lee, T.D., and Abelson, J. (2002). Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal pentasnrNP. *Mol. Cell* 9, 31–44.
- 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.
- Sugita, H., and Takeda, S. 'ichi (2010). Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86, 748–756.
- Sun, X., Perlick, H.A., Dietz, H.C., and Maquat, L.E. (1998). A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10009–10014.
- T**
- Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190.
- Tange, T.Ø., Nott, A., and Moore, M.J. (2004). The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 279–284.
- Tangye, S.G., and Hodgkin, P.D. (2004). Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses. *Immunology* 112, 509–520.
- Taouji, S., and Chevet, É. (2015). [Modulating endoplasmic reticulum stress in the treatment of cancer]. *Médecine Sci. MS* 31, 667–673.
- 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.
- Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* 209, 597–606.
- Teague, B.N., Pan, Y., Mudd, P.A., Nakken, B., Zhang, Q., Szodoray, P., Kim-Howard, X., Wilson, P.C., and Farris, A.D. (2007). Cutting edge: Transitional T3 B cells do not

- give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7511–7515.
- Thermann, R., Neu-Yilik, G., Deters, A., Frede, U., Wehr, K., Hagemeyer, C., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (1998). Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO J.* 17, 3484–3494.
- 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.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12, 1812–1824.
- Todd, D.J., Lee, A.-H., and Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 663–674.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707–718.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.
- Tsubata, T., and Reth, M. (1990). The products of pre-B cell-specific genes ( $\lambda$ 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J. Exp. Med.* 172, 973–976.
- Tsurushita, N., and Korn, L.J. (1987). Effects of intron length on differential processing of mouse mu heavy-chain mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2602–2605.
- 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.

## **U**

- Unterholzner, L., and Izaurralde, E. (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* 16, 587–596.
- Ursini-Siegel, J., Zhang, W., Altmeyer, A., Hatada, E.N., Do, R.K.G., Yagita, H., and Chen-Kiang, S. (2002). TRAIL/Apo-2 Ligand Induces Primary Plasma Cell Apoptosis. *J. Immunol.* 169, 5505–5513.

**V**

- Vaidyanathan, B., Yen, W.-F., Pucella, J.N., and Chaudhuri, J. (2014). AIDing Chromatin and Transcription-Coupled Orchestration of Immunoglobulin Class-Switch Recombination. *Front. Immunol.* 5, 120.
- Valcárcel, J., Gaur, R.K., Singh, R., and Green, M.R. (1996). Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected]. *Science* 273, 1706–1709.
- Valentine, C.R. (1998). The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* 411, 87–117.
- Vanderkerken, K., De Raeve, H., Goes, E., Van Meirvenne, S., Radl, J., Van Riet, I., Thielemans, K., and Van Camp, B. (1997). Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse. *Br. J. Cancer* 76, 451–460.
- Vanderkerken, K., Asosingh, K., Croucher, P., and Van Camp, B. (2003). Multiple myeloma biology: lessons from the 5TMM models. *Immunol. Rev.* 194, 196–206.
- Victoria, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.
- Victoria, 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.
- Voelker, R.B., Erkelenz, S., Reynoso, V., Schaal, H., and Berglund, J.A. (2012). Frequent gain and loss of intronic splicing regulatory elements during the evolution of vertebrates. *Genome Biol. Evol.* 4, 659–674.

**W**

- Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701–718.
- 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.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., and Burge, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470–476.

- Wang, J., Chang, Y.F., Hamilton, J.I., and Wilkinson, M.F. (2002a). Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol. Cell* 10, 951–957.
- Wang, J., Hamilton, J.I., Carter, M.S., Li, S., and Wilkinson, M.F. (2002b). Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. *Science* 297, 108–110.
- Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P., and König, H. (2001). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *EMBO J.* 20, 4194–4203.
- Weill, J.-C., Weller, S., and Reynaud, C.-A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285.
- Weischenfeldt, J., Damgaard, I., Bryder, D., Theilgaard-Mönch, K., Thoren, L.A., Nielsen, F.C., Jacobsen, S.E.W., Nerlov, C., and Porse, B.T. (2008). NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes Dev.* 22, 1381–1396.
- Welner, R.S., Pelayo, R., and Kincade, P.W. (2008). Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 95–106.
- Wen, X., Tannukit, S., and Paine, M.L. (2008). TFIP11 interacts with mDEAH9, an RNA helicase involved in spliceosome disassembly. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2105–2113.
- Werner, M., Thuriaux, P., and Soutourina, J. (2009). Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 740–745.
- Weterings, E., and Chen, D.J. (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* 18, 114–124.
- White, R.J. (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat. Rev. Genet.* 12, 459–463.
- Wilton, S.D., Lloyd, F., Carville, K., Fletcher, S., Honeyman, K., Agrawal, S., and Kole, R. (1999). Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul. Disord.* NMD 9, 330–338.
- 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.
- Wittmann, J., Hol, E.M., and Jäck, H.-M. (2006). hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1272–1287.



Wood, M.J.A., Gait, M.J., and Yin, H. (2010). RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain J. Neurol.* 133, 957–972.

Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., and Green, M.R. (1999). Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* 402, 832–835.

### X

Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 115, 2656–2664.

### Y

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

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

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* 281, 30299–30304.

### Z

Zaharieva, E., Chipman, J.K., and Soller, M. (2012). Alternative splicing interference by xenobiotics. *Toxicology* 296, 1–12.

Zamore, P.D., Patton, J.G., and Green, M.R. (1992). Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature* 355, 609–614.

Zhang, J., and Maquat, L.E. (1996). Evidence that the decay of nucleus-associated nonsense mRNA for human triosephosphate isomerase involves nonsense codon recognition after splicing. *RNA N. Y. N* 2, 235–243.

Zhang, J., Bottaro, A., Li, S., Stewart, V., and Alt, F.W. (1993). A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J.* 12, 3529–3537.

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

- Zheng, Z.-M. (2004). Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J. Biomed. Sci.* *11*, 278–294.
- Zhou, P., Ma, X., Iyer, L., Chaulagain, C., and Comenzo, R.L. (2014). One siRNA pool targeting the  $\lambda$  constant region stops  $\lambda$  light-chain production and causes terminal endoplasmic reticulum stress. *Blood* *123*, 3440–3451.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *12*, 982–995.
- Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* *11*, 254–267.
- Zotos, D., and Tarlinton, D.M. (2012). Determining germinal centre B cell fate. *Trends Immunol.* *33*, 281–288.

**Titre :** Impact de la production des immunoglobulines tronquées sur le développement lymphocytaire B normal et tumoral

---

## Résumé

Le processus de recombinaison V(D)J des gènes d'immunoglobulines (Ig) est caractérisé par une grande imprécision des jonctions entre les segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J). Deux fois sur trois, un décalage du cadre de lecture apparaît, aboutissant à une jonction non productive dite « hors phase ». Plusieurs études ont démontré que les deux allèles productifs et non-productifs sont activement transcrits. Les transcrits matures issus des allèles non-productifs sont pris en charge par un mécanisme de surveillance des ARNm appelé NMD « *Nonsense-Mediated mRNA Decay* ». En dégradant efficacement les ARNm d'Ig contenant des codons non-sens, ce mécanisme prévient l'apparition des Ig tronquées au cours de l'ontogénie B. Néanmoins, aucune étude n'a jusqu'ici analysé l'impact de l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs. Ce phénomène appelé NAS « *Nonsense-associated Altered Splicing* » peut conduire à une production d'Ig tronquées présentant des délétions internes du domaine variable (V).

Les projets développés lors de cette thèse ont montré que la présence d'un codon non-sens, au niveau de l'exon variable (VJ) des transcrits Ig $\kappa$ , favorise le saut d'exon et la production de chaînes légères dépourvues de domaine variable ( $\Delta$ V- $\kappa$ LCs). De façon intéressante, ces Ig tronquées provoquent un stress cellulaire et conduisent à l'apoptose des plasmocytes (Article 1). Ces observations ont permis d'identifier un nouveau point de contrôle agissant tardivement lors de la différenciation plasmocytaire : le TIE « *Truncated-Ig Exclusion* » checkpoint. Ce processus de contrôle provoque l'élimination des plasmocytes qui produisent des chaînes d'Ig tronquées. Nous avons également étudié l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs en l'absence de TIE-checkpoint (Article 2). Cette étude a révélé que l'hypertranscription des gènes d'Ig dans les plasmocytes favorise l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs. En utilisant un modèle d'expression forcée d'Ig tronquées, nous avons mis en évidence une coopération entre les mécanismes assurant la surveillance des ARNm (NMD) et la surveillance au niveau protéique (UPR : « *Unfolded Protein Response* », autophagie) (Article 3).

Sur la base de ces résultats, nous avons mis au point une nouvelle approche thérapeutique qui consiste à forcer la production d'Ig tronquées en utilisant des oligonucléotides anti-sens (AON) capables de provoquer l'élimination de l'exon variable lors de l'épissage. Cette invention pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques pertinentes dans le traitement du Myélome Multiple et d'autres pathologies touchant les plasmocytes.

**Mots clefs :** Plasmocytes, Immunoglobulines (Ig), Ig tronquées, Surveillance des ARN, NAS (Nonsense-associated Altered Splicing), TIE-checkpoint (Truncated-Ig Exclusion checkpoint), NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response).