



HAL
open science

Régulation de l'expression des immunoglobulines au cours du développement lymphocytaire B tardif

Mohamad Omar Ashi

► **To cite this version:**

Mohamad Omar Ashi. Régulation de l'expression des immunoglobulines au cours du développement lymphocytaire B tardif. Immunologie. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0008 . tel-02122795

HAL Id: tel-02122795

<https://theses.hal.science/tel-02122795>

Submitted on 7 May 2019

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
École Doctorale Sciences Biologiques et Santé (SBS) (ED 615)
Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS)
UMR CNRS 7276 & INSERM U 1262 – CRIBL
Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline : Biologie Sciences Santé
Spécialité : Immunologie, oncologie et infectiologie

Présentée et soutenue par
Mohamad Omar ASHI

Le 30 mars 2018

**Régulation de l'expression des immunoglobulines au cours du
développement lymphocytaire B tardif**

Thèse dirigée par Dr. Laurent DELPY

JURY :

Président du jury

Pr. Michel Cogné, Professeur des Universités / Directeur de Recherche CNRS - Limoges

Rapporteurs

Dr. Jérôme Moreaux, Maître de Conférences - Université Montpellier 1

Dr. Fabrice Lejeune, Chargé de Recherche INSERM - Institut de Biologie de Lille

Directeur de thèse

Dr. Laurent DELPY, Directeur de Recherche CNRS - Limoges

Université de Limoges
École Doctorale Sciences Biologiques et Santé (SBS) (ED 615)
Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS)
UMR CNRS 7276 & INSERM U 1262 – CRIBL
Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline : Biologie Sciences Santé
Spécialité : Immunologie, oncologie et infectiologie

Présentée et soutenue par
Mohamad Omar ASHI

Le 30 mars 2018

**Régulation de l'expression des immunoglobulines au cours du
développement lymphocytaire B tardif**

Thèse dirigée par Dr. Laurent DELPY

JURY :

Président du jury

Pr. Michel Cogné, Professeur des Universités / Directeur de Recherche CNRS - Limoges

Rapporteurs

Dr. Jérôme Moreaux, Maître de Conférences - Université Montpellier 1

Dr. Fabrice Lejeune, Chargé de Recherche INSERM - Institut de Biologie de Lille

Directeur de thèse

Dr. Laurent DELPY, Directeur de Recherche CNRS - Limoges



MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE

Au cours de ces travaux de thèse, j'ai bénéficié pendant les trois premières années d'un financement par la Société libanaise privée 'Ashi Textile General Company S.A.R.L'. J'ai par la suite obtenu une bourse de fin de thèse de la Société Française d'Hématologie (SFH) 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 & INSERM U 1262
Faculté de Médecine, CBRS : Centre de Biologie et de Recherche en Santé
2, rue du Docteur Marcland
87025 LIMOGES Cedex



Résumé

Le processus aléatoire des recombinaisons V(D)J permet d'obtenir un répertoire d'anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) hautement diversifié. En revanche, le caractère imprécis des jonctions V(D)J conduit à l'apparition de décalages du cadre de lecture dans deux tiers des cas. Ainsi, la plupart des cellules B hébergent des allèles d'Ig avec des réarrangements V(D)J non-productifs au sein de leur génome. Plusieurs études incluant celles menées au laboratoire ont montré que ces allèles non-productifs sont transcrits mais subissent une régulation post-transcriptionnelle impliquant le mécanisme de dégradation des ARNm appelé NMD « Nonsense-Mediated mRNA Decay ». Cette surveillance ARN diminue ainsi le taux d'ARNm codant pour des chaînes d'Ig tronquées. En revanche, l'impact de l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs sur la production d'Ig aberrantes reste jusqu'ici peu exploré. L'étude de ce processus appelé NAS (« Nonsense-associated Altered Splicing »), et en particulier du phénomène de saut d'exon, présente un grand intérêt car cet épissage alternatif peut permettre la synthèse d'Ig tronquées présentant des délétions internes.

Les projets développés lors de cette thèse ont révélé la toxicité des chaînes d'Ig dépourvues de domaine variable (V) dans les plasmocytes, et mis en évidence l'existence d'un nouveau point de contrôle au cours de la différenciation plasmocytaire. Ce phénomène nommé TIE-checkpoint (Truncated-Ig Exclusion) conduisant à l'élimination des plasmocytes exprimant des Ig tronquées, est la conséquence d'un saut d'exon lors de l'épissage des transcrits Igk non-productifs. Pour étudier les événements de NAS lors de l'épissage des transcrits d'Ig dans les plasmocytes, il faut par conséquent limiter l'activation du TIE-checkpoint. A l'aide d'un modèle murin présentant un exon non-sens additionnel au locus IgH, nous avons pu analyser *in vivo* l'épissage alternatif par « saut d'exon » des transcrits d'Ig non-productifs. En effet, l'élimination de cet exon additionnel aboutit à la synthèse d'une chaîne d'Ig normale et non à la production de chaînes tronquées. Cette étude a été menée dans des cellules B primaires et des plasmocytes. Les résultats obtenus ont révélé que l'hypertranscription des gènes d'Ig, qui accompagne la différenciation plasmocytaire, favorise l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs, par un phénomène de saut d'exon.

Nous avons également étudié les éventuelles connexions entre le mécanisme de NMD, impliqué dans la surveillance des ARNm, et l'UPR (« Unfolded Protein Response ») permettant de réguler l'homéostasie protéique dans les plasmocytes. De façon originale, nous avons identifié une boucle de régulation positive entre les processus de surveillance ARN (NMD) et protéique (UPR, autophagie, protéasome). La mise en évidence de cette coopération dans les plasmocytes constitue un exemple unique au vu de la littérature et, aurait pour effet de limiter la synthèse d'Ig tronquées tout en autorisant la synthèse massive d'Ig.

Enfin, nous avons étudié le rôle de l'épissage des transcrits d'Ig non-codants (appelés transcrits I « germinaux ») au cours du processus de CSR « Class Switch Recombination ».

Cette étude a apporté des précisions sur le rôle des sites donneurs d'épissage des exons I et révélé que la reconnaissance de ces sites d'épissage module l'intensité de la transcription de la région « switch » S adjacente, et par conséquent, son accessibilité à AID « Activation-Induced cytidine Deaminase » lors de la CSR.

Mots clefs : Immunoglobulines (Ig), Plasmocytes, NAS (Nonsense-associated Altered Splicing), Épissage alternatif, Saut d'exon, NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response).

Abstract

The random V(D)J recombination process contributes to the generation of a vast immunoglobulin (Ig) repertoire. However, imprecise V(D)J junctions lead to the appearance of frameshift mutations in two-third of the cases. Hence, numerous B-lineage cells retain non-productively V(D)J rearranged Ig alleles in their genome. Several studies including ours have shown that these non-productive alleles are transcribed but rapidly degraded by NMD « Nonsense-Mediated mRNA Decay », thus decreasing the level of mRNA encoding truncated Ig. However, less is known about the impact of alternative splicing on non-productive Ig transcripts, and especially « exon skipping », with regard to the production of truncated Ig with internal deletions.

During my thesis, we have shown that truncated Ig chains lacking variable (V) domain exhibited toxic effects in plasma cells revealing a new « Truncated-Ig Exclusion » (TIE-) checkpoint during plasma cell differentiation. The TIE-checkpoint eliminates plasma cell-expressing truncated Ig, as a consequence of exon skipping during splicing of non-productive Igk transcripts. However, the TIE checkpoint activation limits the analysis of NAS (« Nonsense associated Altered Splicing ») of Ig transcripts in plasma cells. Using a mouse model harboring an additional frameshift-inducing V exon at the IgH chain locus, we could analyze NAS of non-productive Ig transcripts in primary B cells and plasma cells. This study revealed that hypertranscription of Ig genes accompanying plasma cell differentiation favors alternative splicing of non-productive Ig transcripts.

We also investigated potential connections between the NMD mechanism, involved in mRNA surveillance, and the UPR (« Unfolded Protein Response ») pathway that regulates protein homeostasis in plasma cells. Interestingly, we identified a positive regulatory loop between RNA (NMD) and protein (UPR, autophagy, proteasome) surveillance processes. In view of the literature, the occurrence of such cooperation is unique to plasma cells, and this should help to limit the expression of truncated Ig while allowing massive Ig synthesis.

Finally, we studied other aspects of Ig RNA splicing, and investigated the role of splice donor site on non-coding « germline » I transcripts during CSR (« Class Switch Recombination »). Using dedicated mouse models, we found that the deletion of I γ 1 splice donor site drastically decreased CSR to IgG1. Overall, this study demonstrated that the recognition of I exon donor splice site enhances transcription of « switch » regions S, facilitating their opening and the subsequent recruitment of AID « Activation-Induced cytidine Deaminase » during CSR.

Keywords: Immunoglobulins (Ig), Plasma Cells, NAS (Nonsense-associated Altered Splicing), Alternative Splicing, Exon skipping, NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Laurent Delpy pour son encadrement tout au long de ma thèse. Merci pour tes conseils, ta confiance, ta patience, et tes encouragements.

Je remercie également le Pr Michel Cogné de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Ensuite je tiens à remercier le Dr Jérôme Moreaux et le Dr Fabrice Lejeune d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à mon travail et le temps que vous y avez consacré.

Je voudrais ensuite remercier sincèrement et chaleureusement tous les membres de l'UMR CNRS 7276 (et INSERM U1262 maintenant le double label). La thèse est certes un travail personnel, mais qui ne peut se réaliser seul. Merci donc à tous ceux qui ont pu m'apporter leur aide et leurs conseils au cours de ces années.

Merci à Eric, toujours souriant et ouvert à toutes les discussions scientifiques (un grand Chokran ; Inneh). Un grand merci à Claire pour ton aide en cytométrie et toutes les manipes du FACS. Merci à Cendrine pour les ELISA surtout en temps « rush ». Merci également à Jeanny pour la correction de l'anglais et les moments « English Friday Lunch ». Je ne peux pas oublier le nouveau membre de B cell Design Miyou : mille merci et bon courage pour la suite. Merci également à Yves pour vos discussions politiques et vos conseils. Merci également à Jean-Claude et Sandrine (nouvelle maman). Je tiens à remercier sincèrement Alexis (King of ChIP, qui m'a appris cette technique). Je voudrais également remercier Armand (futur médecin). Merci à François, Bastien et Erwan pour vos aides en BioInfo. Je tiens à remercier également Christelle Oblet pour ses conseils en ce qui concerne le Western Blot. Merci à Julie pour toutes les injections et à Zéliha de s'être occupée de la décontamination de nos lignées murines. Merci particulièrement à Anne Druilhe (il n'y aura pas un relais de vie prochain ?) pour ta gentillesse et ton humanité. Pour Sophie et Guillaume, merci du fond de mon cœur pour vos écoutes, votre gentillesse et votre soutien durant toute ma thèse.

Je souhaite également bon courage à ceux qui n'ont pas encore soutenu leur thèse, et dont le tour viendra rapidement: Anderson, Batoul, Hënd, Iman, Zeinab, Ophélie, Nour, Hussein et Lina. Une pensée également pour ceux qui m'ont précédé de peu : Faten, Amélie (merci pour tes conseils), Nicolas A., Héloïse, Rachà et Nicolas DL. Merci également à tous les membres du « CARAT » : Stéphanie, Audrey, Jérémy et Magalie. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre bureau pour rédiger ma thèse au calme. Une pensée à Christian, Aurore et Sarah, merci pour la gestion de notre laboratoire et de toutes les commandes.

Merci aux animaliers : Bernadette, David et Karine. Je remercie chaleureusement Sylvie pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci d'avoir s'occuper de nos souris. Je voudrais également remercier Hrepsime de s'être occupée de notre verrerie.

A la « Krap's Team » : Je tiens à remercier Christophe (Krap) pour toutes nos discussions scientifiques. Merci Seb pour ton aide en tout ce qui concerne la Bio Mol. Bon courage à toi Victoria (la thèse ça va vite !!) et à Vincent.

A la « Delpy's Team » : Je tiens à remercier chaleureusement Jean-Marie (frero) pour ton soutien et ton aide tout au long de ma thèse (surtout les moments difficiles), bon courage pour la thèse (j'attends ta brioche lol!). Merci également à toi Anne et bon courage pour ta thèse. Merci à Marion (toujours de bonne humeur) pour ton aide, bon courage pour la suite (go or no go). Je dois également citer Nivine, ancienne voisine de bureau, merci et bon courage pour ton post-doc. Merci également à Jérôme Saulière. Je voudrais remercier Faraj Terro (le tampon ça tourne !!!) : c'était avec plaisir qu'on a travaillé ensemble, MERCI infiniment. Mention spéciale pour les nouveaux entrants dans la « Delpy's Team », Soazig et Audrey B (bon courage pour ta nouvelle thèse). Je remercie également Marie (toujours souriante), bon courage pour la suite.

Grand Merci à l'équipe de Jean, Nathalie, Chantal, Robin, Christelle, Cathy, Ahmed et Oussama. Bon courage aux futurs docteurs : Emilie et Lilian.

A mes amis : Sofia Jawhari (merci pour tes conseils), Mohamad Dhaiby, Hussein Akhrass, Marine Aitamer (bon courage pour la thèse), et Rafik Ghezali (grand fan du CSP !), merci pour votre gentillesse, vos soutiens lors de ma thèse, merci pour les bons moments que nous avons passé ensemble. Grand merci chers sœurs et frères.

Mes plus sincères remerciements vont à mes parents qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études, ainsi que pour leur aide, leur compréhension et leur soutien. Papa et Maman, vous m'avez offert plus que tout ce que je pouvais désirer et mériter. Evidemment tout ce que j'ai acquis grâce à vous, je ne pourrais vous le rendre, mais j'appliquerai ce que vous m'avez appris, je le transmettrai à mes enfants.

A mes sœurs Souraya (our best Engineer), Amina (avec son petit bébé) et Alaa, à mes frères Mohamad-Alaa Eddine (Abu Hassan) et Mohamad-Osman, à ma grande mère Souraya et ma tante zamto Amina, à ma petite nièce Mia, un grand merci du fond de mon cœur. Merci d'être toujours à côté de moi et de me soutenir quand j'avais besoin. Mention spéciale à Ziad, Ragheb, Ghazal et Maya, merci chers frères et sœurs pour votre soutien et votre gentillesse.

A toi « Hazzourti », Merci mon Amour, merci pour ton soutien, ta tendresse et ton affection qui me comblent au quotidien. Tu es vraiment la perle rare de ma vie. Tu es simplement le pilier de toutes mes constructions et la base de tous mes projets. Sans toi à mes côtés, cette réalisation n'aurait pas été à la même saveur. Grand merci Hazar, Je t'aime ♥♥♥.

A mes futurs beaux-parents, qui m'ont accueilli au sein de leur famille. Je m'y suis tout de suite senti à l'aise, chez moi. Merci pour votre soutien et votre gentillesse. Oncle Khaled Al Mohamad, mart zammo Fatima (Taffoum), Hanady, Dima (our best Engineer) et Hani grand merci.

*« Tout grand progrès scientifique
est né d'une nouvelle audace de l'imagination. »*

John Dewey

A mon père,

A ma mère,

A mon amour ♥ HAZAR ♥

A mes frères et sœurs

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATIONS | 1 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 5 |
| PREAMBULE | 7 |
| CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE | 11 |
| Chapitre 1. La Lymphopoïèse B | 12 |
| 1- Généralités sur les Immunoglobulines | 12 |
| i. Structure des Immunoglobulines..... | 12 |
| ii. Organisation des loci d'Immunoglobulines..... | 13 |
| • Le locus des chaînes légères Kappa (Igκ)..... | 13 |
| • Le locus des chaînes légères Lambda (Igλ) | 13 |
| • Le locus des chaînes lourdes IgH..... | 13 |
| 2- Le développement B précoce | 14 |
| i. Les recombinaisons V(D)J | 14 |
| ii. Réarrangements au locus IgH et expression du pré-BCR | 15 |
| 3- Le développement tardif : maturation des cellules B..... | 18 |
| i. Le stade B transitionnel..... | 18 |
| ii. Le stade B mature..... | 19 |
| • Les cellules B-1..... | 19 |
| • Les cellules B-2..... | 20 |
| 4- Recombinaisons secondaires aux loci d'Ig : SHM et CSR | 22 |
| i. AID : enzyme clé des recombinaisons secondaires..... | 22 |
| ii. Hypermutation somatique (SHM) | 23 |
| iii. Commutation de classe (CSR) | 24 |
| • Les régions « switch » (S) | 24 |
| • Les transcrits germinaux | 25 |
| • L'épissage des transcrits germinaux et la CSR..... | 26 |
| • Régulation de la transcription germinale | 27 |
| • Génération des cassures double brins (DSB)..... | 28 |
| • Les modifications de la chromatine | 29 |
| 5- La différenciation finale : mémoire immunitaire et sécrétion d'anticorps | 30 |
| i. Les lymphocytes B mémoires | 30 |
| ii. Les plasmocytes | 31 |
| iii. Le programme transcriptionnel impliqué au cours de la différenciation plasmocytaire..... | 32 |
| 6- La réponse UPR et la production des Ig..... | 33 |
| • La voie IRE1α..... | 34 |
| • La voie PERK | 35 |
| • La voie ATF6..... | 36 |
| 7- Autophagie, UPR et différenciation plasmocytaire | 37 |
| i. Le mécanisme d'Autophagie (« self-eating ») | 37 |

| | |
|--|-----------|
| ii. L'Autophagie et la réponse UPR..... | 38 |
| iii. L'Autophagie et la différenciation plasmocytaire..... | 39 |
| 8- Dyscrasies des plasmocytes | 39 |
| i. Le Myélome Multiple (MM)..... | 40 |
| Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs..... | 43 |
| 1- Epissages des ARN pré-messagers (« Splicing »)..... | 43 |
| i. La réaction d'épissage | 43 |
| ii. Le spliceosome | 44 |
| 2- L'épissage alternatif..... | 45 |
| i. Les différents types d'épissage alternatif | 46 |
| ii. Régulation de l'épissage alternatif | 47 |
| • Les éléments cis-régulateurs | 47 |
| • Les éléments trans-régulateurs | 48 |
| • Les régulateurs co-transcriptionnels | 49 |
| • L'épissage alternatif et les modifications de la chromatine | 50 |
| 3- Modification d'épissage par administration d'oligonucléotides antisens (AON)..... | 51 |
| 4- Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs..... | 52 |
| i. Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA (NMUP) | 53 |
| 5- Nonsense-associated Altered Splicing (NAS)..... | 54 |
| i. Le NAS de classe I | 55 |
| ii. Le NAS de classe II..... | 55 |
| 6- Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) | 56 |
| i. Les acteurs majeurs du NMD | 57 |
| • Les protéines UPF..... | 57 |
| • Les protéines SMG..... | 59 |
| ii. La règle de position du PTC..... | 60 |
| iii. Premier tour de traduction : détection des PTC et déclenchement du NMD | 61 |
| iv. Dégradation par NMD des transcrits d'Ig non-productifs..... | 63 |
| • Dégradation par NMD des ARNm IgH porteurs de PTCs..... | 63 |
| • Dégradation par NMD indépendante de l'EJC : cas des ARNm Igk non-productifs | 63 |
| PROBLEMATIQUES..... | 65 |
| RESULTATS..... | 67 |
| DISCUSSION & PERSPECTIVES | 77 |
| 1- Étude in vivo du NAS et le « TIE Checkpoint » | 78 |
| 2- « Cross-talk » entre le NMD et la réponse UPR..... | 82 |
| i. Les Ig mal-repliées, le NMD et la réponse UPR..... | 82 |
| ii. Les Ig mal-repliées et l'autophagie | 84 |
| 3- Étude du rôle des sites donneurs d'épissage des exons I lors de la CSR | 85 |
| CONCLUSION GENERALE..... | 88 |
| ANNEXES | 89 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 91 |

Abréviations

α : alpha

β : beta

γ : gamma

δ : delta

ε : epsilon

η : eta

κ : kappa

λ : lambda

μ : mu

53BP1 : p53-Binding Protein 1

7AAD : 7-Aminoactinomycin D

ΔV - κ LC : V domain-less κ Light Chain

A

Ac : Anticorps

ADNc : ADN complémentaire

A-EJ : Alternative End Joining

Ag : Antigène

AID : Activation Induced cytidine Deaminase

AON : Antisense Oligonucleotides

APOBEC : APOlipoprotein B mRNA editing Enzyme-Catalytic Component

ARNi : ARN interférent

ARN pol : ARN polymérase

AS : Alternative Splicing

ASC : Antibody Secreting Cells

ATF : Activating transcription factor

ATG : AuTophagy-related

ATP : Adenosine tri-phosphate

B

BBP : Branchpoint Binding Protein

Bcl2 : B cell lymphoma 2

BCR : B Cell Receptor

BER : Base Excision Repair

BiP : Binding immunoglobulin Protein

BrdU : Bromodésoxyuridine

BSAP : B-cell specific activation protein

C

C : région constante

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

cAMP : Adénosine monophosphate cyclique

CBP : Cap-Binding Protein

CDR : Complementarity Determining Region

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

ChIP : Chromatin Immunoprecipitation

CHOP : C/EBP Homologous Protein

CHX : cycloheximide

CLP : Précurseurs Communs Lymphoïdes

CMHII : Complexe Majeur d'Histocompatibilité II

C-NHEJ : Classical Non-Homologous End Joining

COPII : Coat Proteins type II

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSR : Class Switch Recombination

CstF-64 : Clivage Stimulating Factor 64

CTD : Carboxy-Terminal Domain

CTNBL1 : catenin (cadherin-associated protein), β -like 1

D

D : segment de diversité

Da : Daltons

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

DBR1 : debranching RNA lariats 1

DCP2 : Decapping mRNA 2

DECID : Decay Inducing complex

DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne

DR5 : Death Receptor 5

DRiPs : Defective Ribosomal Products

DSB : double strand break

dss : donor splice site

DZ : Dark Zone

E

E2A: E box binding protein 2A

EBF: early B cell factor

EBV : Epstein-Barr Virus

EDEM1 : ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like protein 1

eIF : elongation Initiation Factor

eIF2 α : eukaryotic translation Initiation Factor 2 α

EJC : Exon Junction Complex

ELL2 : Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia protein 2

ERAD : ER Associated Degradation

eRF : elongation Release Factor

ESE : Exonic Splicing Enhancers

ESS : Exonic Splicing Silencers

F

FACT : FACilitates Chromatin Transcription complex

FDC : Follicular Dendritic Cell

FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3

FISH : Fluorescent in situ Hybridization

FO : Follicular B Cells

FR : Framework Regions

G

G : Guanine

GADD34 : Growth Arrest and DNA damage 34

GC : Germinal Center

GRP78 : 78 kDa Glucose-Regulated Protein

H

H : Heavy

H2AX : Histone 2A family member X

HCDD : Heavy Chain Deposition Disease

Herp : Homocysteine-Inducible ER Protein

hMT : human Methallothionein

hnRNP : Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins

HP1 : Heterochromatin Protein 1

HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Hsp 70 : Heat shock protein 70

I

Ifr4 : Interferon Regulatory Factor-4

Ig : Immunoglobulines

IRE1 : Inositol-requiring enzyme 1

ISE : Intronic Splicing Enhancers

ISS : Intonic Splicing Silencers

iTIE : inducible Truncated Ig Exclusion

IκB : Inhibitor of kappa B

J

J : segment de jonction

K

KAP1 : KRAB domain Associated Protein 1

Kb : Kilobases

KO : Knock-out

L

L : Leader

L : Light

LAMP-2A : Lysosome-associated membrane protein 2

LB : Lymphocytes B

LC3 : Light Chain 3

LCDD : Light Chain Deposition Disease

LHCDD : Light and Heavy Chain Deposition Disease

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

LT_{FH} : Lymphocytes T Follicular Helper

LZ : Light Zone

M

Mb : Mégabases

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MGUS : Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

MIDD : Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease

MIF4G : middle of eIF4G-like

MM : Myélome Multiple

MMR : MisMatch Repair

MSH : MutS Homologue

MZ : Marginal zone B cells

N

NAS : Nonsense-associated Altered Splicing

NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule

neo^r : gène de résistance à la Néomycine

NF-κB : Nuclear Factor kappa B

NK : Natural Killer

NLS : Nuclear Localization Sequence

NMD : non-sense mediated mRNA decay

NMUP : Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA

P

PABPC1 : Poly (A)-Binding Protein Cytoplasmic 1

PABPN1 : Poly (A)-Binding Protein Nuclear 1

PALS : Periarterial Lymphatic Sheaths

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PARP-1 : Poly ADP-Ribose Polymerase I

Pax5: paired-box gene 5

PB : Plasmablasts

pb : paire de bases

PC : Plasma Cells

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR : Polymerase Chain Reaction

PERK : PKR-like ER kinase

pGLT : primary Germline Transcript

PI : Proteasome Inhibitor

PIKK : phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases

PKR : Protein Kinase R

PP2A : Phosphatase Protein 2A

PTBP2 : Polypyrimidine Tract Binding Protein 2

PTC : Premature Termination Codon

PTIP : PAX Interaction with Transcription-activation domain Protein

PU1: purine box factor 1

pV_H : promoteur des régions Variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines

R

RAG : Recombination-Activating gene

RE : Reticulum Endoplasmique

RENT1 : Regulator of Nonsense Transcripts 1

RNP : Ribonucleoprotein

RNPS1 : RNA-binding Protein with Ser-rich domain 1

RR : Regulatory Region

RRM : RNA Recognition Motif

RS : Arginine (R)-Serine (S)

RSS : Recombination Signal Sequence

RT-PCR : Reverse Transcription – PCR

S

SCNM1 : Sodium channel Modifier 1

SF1 : Splicing Factor 1

SHM : Somatic Hypermutation

SI : Système Immunitaire

SMG : Suppressor of Morphological defects on Genitalia

snRNP : small nuclear RiboNucleoProteins

SPT6 : Suppressor of Ty 6

SR : Serin Arginin rich

ss : splice site

ssDNA : single strand DNA

T

T : Thymine

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

TCR : T Cell Receptor

TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TGFβ : Transforming Growth Factor β

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TSS : Transcription Start Site

U

U : Uracile

U2AF : U2 Auxiliary Factor 2

UNG : Uracile N-Glycosylase

UPF1 : Up-frameshift Protein 1

UPR : Unfolded Protein Response

UTR : UnTranslated Regions

V

V : Variable

VLR : Variable Lymphocyte Receptor

X

Xbp1s : X-box binding protein 1 spliced

XRCC1 : X-ray Repair Cross Complementing Protein 1

Table des illustrations

Introduction

- Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline, exemple d'une IgG1.
- Figure 2 : Représentation schématique des différents loci d'immunoglobulines.
- Figure 3 : L'ontogénie B.
- Figure 4 : Les réarrangements VDJ au locus des chaînes lourdes d'Ig (IgH).
- Figure 5 : Réarrangements V(D)J ordonnés et phénomène d'exclusion allélique.
- Figure 6 : Edition du BCR dans la moelle osseuse.
- Figure 7 : Mécanisme d'épissage alternatif permettant l'expression simultanée d'IgM et IgD.
- Figure 8 : Marqueurs exprimés par les principales sous-populations de cellules B chez la souris.
- Figure 9 : Représentation schématique de l'architecture de la rate.
- Figure 10 : Développement distinct des cellules B-1 et B-2.
- Figure 11 : Prolifération et différenciation des cellules B dans les centres germinatifs.
- Figure 12 : Principaux acteurs de l'interaction T_{FH}-B au sein du centre germinatif.
- Figure 13 : Les séquences ciblées par AID lors des processus de maturation d'affinité ou de commutation isotypique des Ig.
- Figure 14 : Localisation des hypermutations somatiques au niveau des exons VDJ réarrangés.
- Figure 15 : Principales étapes intervenant dans le processus d'hypermutations somatiques.
- Figure 16 : Mécanisme général de la commutation isotypique ou CSR (Class Switch Recombinaison).
- Figure 17 : Représentation schématique d'une boucle R (R-Loop).
- Figure 18 : Transcription germinale initiée à partir des promoteurs I.
- Figure 19 : Structure chromatinienne et acteurs intervenant dans le ciblage d'AID lors de la CSR.
- Figure 20 : Ciblage d'AID par des ARN « guides » non codants.
- Figure 21 : Modification conformationnelle du locus IgH lors de la CSR.
- Figure 22 : Protéines impliquées dans la reconnaissance des cassures d'ADN double brin lors de la CSR.
- Figure 23 : Résolution des cassures double-brins lors de la CSR.
- Figure 24 : Principales étapes intervenant dans la différenciation en cellules B mémoires et en plasmocytes.
- Figure 25 : Caractéristiques principales de la différenciation des cellules B en plasmocytes.
- Figure 26 : Modifications transcriptionnelles lors de la différenciation plasmocytaire.
- Figure 27 : De la forme membranaire à la forme sécrétée, exemple d'une IgM.
- Figure 28 : Activation de l'UPR (« unfolded protein response ») lors d'un stress du réticulum endoplasmique (RE).
- Figure 29 : Structure du protéasome 26S.
- Figure 30 : Représentation schématique du mécanisme d'Autophagie.
- Figure 31 : Le développement du Myélome Multiple (MM).
- Figure 32 : Les séquences consensus impliquées dans l'épissage.
- Figure 33 : Assemblage du spliceosome et réactions d'épissage.
- Figure 34 : Représentation schématique du modèle d'assemblage séquentiel du spliceosome.
- Figure 35 : Représentation schématique des différents types d'épissage alternatif.
- Figure 36 : Les différentes séquences régulatrices d'épissage des pré-ARNm.
- Figure 37 : Modèle de régulation de l'épissage alternatif par la vitesse d'élongation de l'ARN

polymérase II.

Figure 38 : Approche thérapeutique par saut d'exon dans le traitement du myélome multiple.

Figure 39 : Les différents mécanismes de surveillance des ARN.

Figure 40 : Elimination d'un exon contenant un PTC par le phénomène de NAS.

Figure 41 : La dégradation par NMD dépend de la position des PTC.

Figure 42 : Mise en place du complexe de surveillance.

Figure 43 : Dégradation des transcrits porteurs de PTC.

Figure 44 : Dégradation par NMD dépendante ou indépendante de l'EJC.

Préambule



Pour assurer la défense de l'organisme, les cellules du système immunitaire (SI) possèdent la capacité de reconnaissance de signaux de danger, portés par des agents pathogènes (bactéries, virus ou parasites) ou les cellules tumorales. La réponse immune repose donc essentiellement sur la tolérance des antigènes (Ag) du « soi » et l'élimination des antigènes du « non-soi ». Ce système de défense complexe (constitué d'organes, de tissus, de cellules et de molécules spécialisées) s'articule autour de deux types d'immunités : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les lymphocytes T (LT) et B (LB) sont les acteurs de l'immunité adaptative et expriment des récepteurs antigéniques appelés TCR (pour « T-Cell Receptor ») ou BCR (pour « B-Cell Receptor »). Au cours de la réaction immunitaire, les lymphocytes peuvent se différencier en cellules mémoire qui permettront de mieux lutter en cas d'agression ultérieure par un même pathogène. 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) appelée BCR puis sécrètent des Ig solubles ou anticorps (Ac) lorsqu'elles se différencient en plasmocytes. Ces molécules sont capables de lier spécifiquement un Ag dans le but de le neutraliser ou de l'éliminer.

Les gènes d'Ig ne sont pas fonctionnels dans leur configuration germinale et de nombreux réarrangements intra-géniques sont nécessaires pour permettre la production de chaînes d'Ig fonctionnelles. Les premiers réarrangements ont lieu au cours du développement B précoce et permettent à chaque cellule B d'exprimer un BCR unique (Jung et al., 2006). Ce processus appelé recombinaisons V(D)J implique les enzymes RAG (pour « Recombination-Activating Gene ») et permet d'assembler les segments V, D et J pour former les domaines variables de chaînes lourdes et légères d'Ig. Le caractère aléatoire et imprécis des recombinaisons V(D)J contribue à la génération d'un répertoire d'Ig hautement diversifié. Néanmoins, cette imprécision jonctionnelle provoque des décalages du cadre de lecture dans deux tiers des cas et l'apparition de codons stop prématurés (PTC pour « Premature Termination Codon ») sur les transcrits d'Ig. Pour limiter la synthèse d'Ig tronquées, les mécanismes de « surveillance des ARN », tels que la dégradation des ARNm non-sens par NMD (pour « Nonsense-Mediated mRNA Decay ») sont très actifs dans la lignée B (Tinguely et al., 2012).

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette thématique, en mettant l'accent sur la régulation de l'expression des Ig au cours du développement lymphocytaire B tardif. Au cours de ma première année de thèse, j'ai participé à une étude révélant que la présence de PTC perturbe l'épissage des transcrits d'Ig et provoque un « saut d'exon », conduisant à

l'élimination de l'exon variable (V) porteur du codon non-sens (cf Annexe 1). De façon intéressante, les chaînes d'Ig tronquées codées par ces transcrits alternatifs dépourvus de l'exon V sont particulièrement toxiques et provoquent un stress du réticulum endoplasmique (RE) conduisant à la mort des cellules plasmocytaires (Srouf et al., 2016). L'ensemble de ces observations a permis de proposer l'existence d'un nouveau point de contrôle lors de la différenciation plasmocytaire : le TIE-checkpoint (« Truncated-Ig Exclusion »). Ce processus de sélection négative permettant d'éliminer les plasmocytes défectueux exprimant des Ig tronquées permettrait d'optimiser les réponses anticorps en favorisant l'émergence de plasmocytes à longue durée de vie supportant une forte sécrétion d'Ig. En recherche clinique, ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de saut d'exon thérapeutique ciblant les transcrits d'Ig dans le traitement des maladies plasmocytaires (cancer, maladies auto-immunes, allergies ...). Un dépôt de brevet a été effectué afin de protéger cette stratégie innovante, basée sur l'administration d'oligonucléotides antisens (AON pour « Antisense OligoNucleotides ») pour forcer l'élimination de l'exon variable des transcrits d'Ig dans le traitement du Myélome Multiple (MM) (Delpy et al, 23/11/2015, brevet WO2017/089359). Le MM est un cancer incurable des cellules plasmocytaires caractérisé 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 ».

Afin de poursuivre cette thématique, j'ai consacré une majeure partie de ma thèse à étudier l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-codants au cours du développement B tardif. Les résultats obtenus ont révélé que l'hypertranscription globale des gènes d'Ig (productifs et non-productifs), qui accompagne la différenciation plasmocytaire, favorise le saut d'exon sur les transcrits d'Ig non-productifs. En lien avec les aspects valorisation et les applications thérapeutiques du saut d'exon ciblant les transcrits d'Ig, nous avons validé un protocole permettant l'administration passive d'AON (in-vitro et in-vivo) et observé un « saut d'exon » beaucoup plus fort dans les cellules plasmocytaires, comparativement aux cellules B. (Ashi et al., soumis : Article 1).

En complément de ces études, j'ai obtenu différents résultats montrant l'existence d'un rétrocontrôle positif entre le mécanisme de NMD, contrôlant la qualité des ARNm par dégradation des transcrits non-productifs, et les mécanismes assurant le maintien de la

protéostasie cellulaire (réponse UPR pour « Unfolded Protein Response », activation du protéasome, autophagie) dans les plasmocytes. Ces données révélant pour la première fois une coopération entre la surveillance ARN et protéique sont présentés dans la section résultats (Ashi et al., Manuscrit en préparation : Article 2). En agissant à deux niveaux, cette coopération permettrait de limiter efficacement l'apparition d'Ig tronquées et/ou mal-repliées et, par conséquent, l'élimination massive de plasmocytes par activation du « TIE checkpoint ».

Au sein des organes lymphoïdes secondaires, les LB activés par l'Ag vont pouvoir améliorer l'affinité et/ou changer les propriétés effectrices de leur BCR grâce aux mécanismes d'hypermutations somatiques (SHM pour « Somatic Hypermutation ») et de commutation de classe (CSR pour « Class Switch Recombination »). Contrairement aux réarrangements V(D)J impliquant les enzymes RAG, cette seconde vague de remaniements géniques dépend de l'activité de l'enzyme AID (pour « Activation Induced Cytidine Deaminase ») (Di Noia and Neuberger, 2007; Stavnezer et al., 2008). Au cours de ma thèse, je me suis également intéressé au rôle de l'épissage des transcrits d'Ig germinaux au cours du processus de CSR. Nous avons analysé finement le rôle des sites donneurs d'épissage sur les transcrits germinaux et l'ensemble de nos résultats montre que la reconnaissance du site donneur d'épissage sur l'exon I γ 1 augmente l'accessibilité de la région « switch » S γ 1 à l'enzyme AID. Nous avons également mis en évidence que la présence de site donneur d'épissage active la transcription de toute la région S γ 1, en agissant telle une boucle amplificatrice sur le promoteur I situé en amont. (Ashi et al., Manuscrit en préparation : section résultats Article 3).

La capacité particulière des LB à façonner leur génome est génératrice de nombreuses cassures de l'ADN. Ces mécanismes doivent donc être finement régulés et contrôlés afin d'éviter des erreurs telles que des translocations d'oncogènes et limiter l'émergence de cellules tumorales.

Contexte Bibliographique

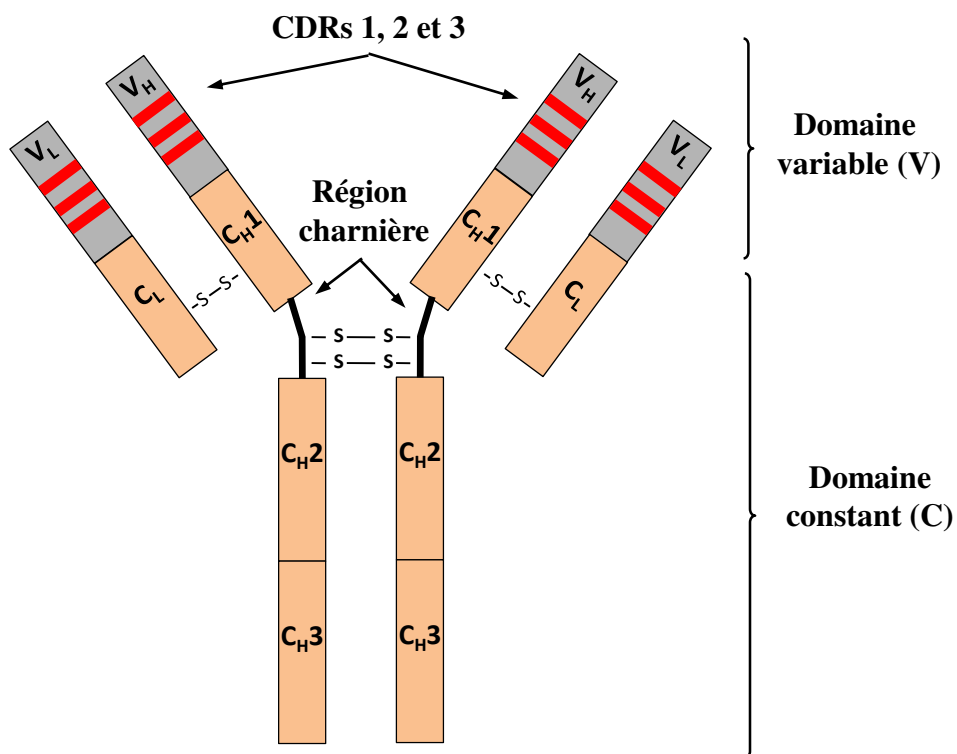


Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline, exemple d'une IgG1

Le domaine variable (représenté en gris et rouge) est composé des régions variables de chaînes lourdes et légères, respectivement V_H et V_L. Chacune de ces régions contient trois régions hypervariables (représentées en rouge) nommées CDR 1 à 3 ("Complementarity Determining Region"), séparant quatre régions moins variables appelées FR 1 à 4 ("Framework Region" ou région de charpente).

Le domaine constant (représenté orange) est composé des régions constantes des chaînes lourdes et légères (respectivement C_H et C_L). La région charnière conférant une flexibilité à l'Ig est située entre les domaines C_H1 et C_H2.

Chapitre 1. La Lymphopoïèse B

1- Généralités sur les Immunoglobulines

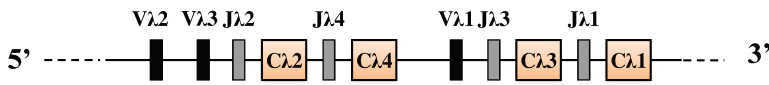
i. Structure des Immunoglobulines

Les Immunoglobulines (Ig) sont créées par assemblage de deux chaînes lourdes identiques (IgH pour « Heavy ») associées à 2 chaînes légères identiques (IgL pour « Light ») par des ponts disulfures. Il existe également des liaisons covalentes (S-S) entre les deux chaînes lourdes et l'ensemble forme un tétramère d'environ 150 kDa (**Figure 1**).

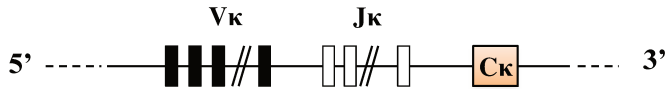
Chaque chaîne d'Ig est composée d'une région variable (V) et d'une région constante C (**Figure 1**). L'association des domaines V des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'Ag tandis que les domaines constants des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline, telles que l'activation du complément ou la liaison aux récepteurs Fc. Il existe deux isotypes de chaînes légères : kappa (κ) et lambda (λ), et cinq isotypes de chaînes lourdes : mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alpha (α) et epsilon (ϵ), correspondant respectivement aux IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois à quatre domaines C_H : (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} et C_{H4}).

Sur le plan structural, les régions variables et constantes partagent une structure tridimensionnelle répondant à la définition de la superfamille des Ig et caractérisée par des domaines d'homologie d'une longueur d'environ 110 acides aminés organisés en feuillets β -plissés. La structure tertiaire de ces domaines est maintenue par quatre régions très conservées : les régions d'armature ou "framework regions" (FR1, FR2, FR3, FR4). Au sein des parties variables, trois régions d'une dizaine d'acides aminés, dites hypervariables ou encore appelées régions déterminant la complémentarité avec l'Ag (CDR1, CDR2, CDR3), s'associent pour former le site de liaison à l'Ag. Il est également important de noter que les exons V sont précédés d'une séquence de 60 à 90 paires de bases (pb), nommé exon L (pour « Leader »), qui code la majeure partie du peptide signal de la protéine.

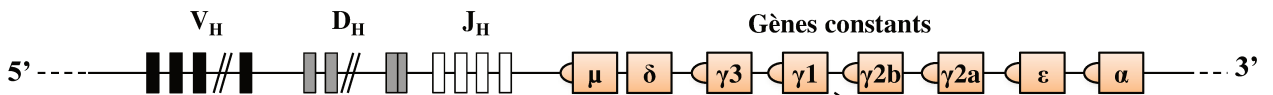
A. Locus Igλ (chromosome 16)



B. Locus Igκ (chromosome 6)



C. Locus IgH (chromosome 12)



D. Gènes C_H : exemple de C_{γ1}

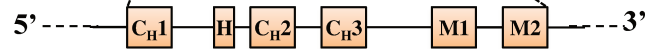


Figure 2 : Représentation schématique des différents loci d'immunoglobulines

A. Le locus Igλ dans sa configuration germinale (localisé sur le chromosome 16). Les segments Vλ, Jλ et les gènes constants Cλ sont représentés respectivement par des rectangles noir, gris et orange.

B. Le locus Igκ dans sa configuration germinale (localisé sur le chromosome 6). Les rectangles noir, blanc et orange représentent respectivement les segments Vκ, Jκ et l'exon Cκ.

C. Le locus IgH dans sa configuration germinale (localisé sur le chromosome 12). Les segments codant la partie variable et les gènes constants sont représentés par des rectangles: segments V_H (noir), segments D_H (gris), segments J_H (blanc) et les gènes constants (orange). Les gènes constants sont précédés par des ellipses oranges représentant les différentes régions S ("Switch"), impliquées dans le processus de commutation isotypique ou CSR ("Class Switch Recombination").

D. Représentation schématique de la structure d'un gène constant (C_H) ici C_{γ1}, avec différents exons C_H1 à 3, l'exon charnière H ("Hinge") et deux exons de membrane M1 et M2.

ii. Organisation des loci d'Immunoglobulines

Chez la souris comme chez l'Homme, les gènes d'Ig sont regroupés en trois loci distincts, localisés sur trois chromosomes. On distingue deux loci codant les chaînes légères, le locus $Ig\kappa$ et le locus $Ig\lambda$, et un codant les chaînes lourdes, le locus IgH . 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). Je détaillerai donc ici uniquement l'organisation des loci d'Ig murins, sur lesquels j'ai travaillé.

• Le locus des chaînes légères Kappa ($Ig\kappa$)

Le locus Kappa murin ($Ig\kappa$), situé sur le chromosome 6 (chromosome 2 chez l'homme), comporte dans sa conformation germinale 176 segments $V\kappa$ (dont 94 à 96 sont fonctionnels) et 5 segments $J\kappa$ (dont 4 fonctionnels). La région constante est codée par un seul segment $C\kappa$ (**Figure 2B**) (Thiebe et al., 1999; Giudicelli et al., 2005; 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 des chaînes légères Lambda ($Ig\lambda$)

Le locus lambda murin ($Ig\lambda$), situé sur le chromosome 16 (chromosome 22 chez l'homme), est assez petit de 200 Kilobases (Kb) et présente une diversité limitée (**Figure 2A**). Il possède une structure particulière, et est constitué de trois segments $V\lambda$ et de 4 familles comprenant chacune une paire de segment $J\lambda$ et $C\lambda$ (noté chacun de 1 à 4). Il est organisé en 2 clusters ordonnés : $V\lambda 2-V\lambda 3-J\lambda 2-C\lambda 2-J\lambda 4-C\lambda 4$ et $V\lambda 1-J\lambda 3-C\lambda 3-J\lambda 1-C\lambda 1$ (Eisen and Reilly, 1985).

• Le locus des chaînes lourdes IgH

Le locus des chaînes lourdes IgH murin (**Figure 2C**) est situé sur le chromosome 12 (chromosome 14 chez l'homme), où il s'étend sur environ 2,8 Mégabases (Mb). Il comprend plus de 200 segments V_H (dont une trentaine de pseudogènes), une douzaine de segments D_H (segments dits de " diversité " propres au locus de chaînes lourdes) regroupés en 4 familles (DFL16, DSP2, DST4 et DQ52) (pour revue Lefranc, 2009) et un groupe de quatre segments J_H tous fonctionnels. Plus de la moitié des segments V_H appartiennent à la famille J558 (Johnston et al., 2006).

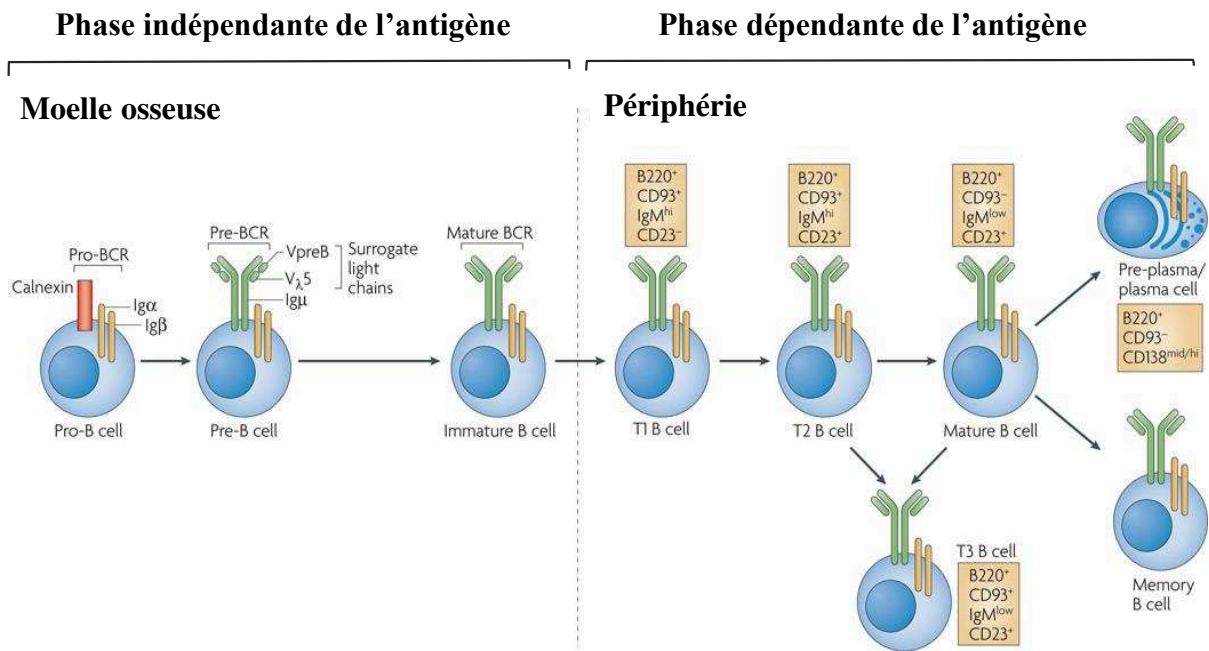


Figure 3 : L'ontogénie B

Le développement lymphocytaire B est divisé en deux phases principales: une phase précoce indépendante de l'antigène se déroulant au niveau de la moelle osseuse et, une phase tardive dépendante d'une stimulation antigénique dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, plaques de Peyer). Les différents marqueurs de surface pour chaque type cellulaire B sont indiqués sur le schéma. Adaptée d'après Cambier et al., 2007

En 3' des segments VDJ, on trouve huit gènes codant les régions constantes répartis selon l'ordre suivant: μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ , et α (Brodeur and Riblet, 1984; Retter et al., 2007; Collins et al., 2015). Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde ainsi que les régions charnières pour les IgG. Enfin les exons de membrane (M1 et M2) codent les régions trans-membranaires et intracytoplasmiques des BCRs et, leur absence provoquée par utilisation de sites de polyadénylation (poly-A) alternatifs, permet la sécrétion des anticorps (**Figure 2D**).

2- Le développement B précoce

L'ontogénèse des lymphocytes B peut être séparée en deux phases principales, dépendantes ou non de la présence d'antigène (**Figure 3**). La première phase de maturation indépendante de l'antigène se déroule au niveau de la moelle osseuse et du foie fœtal. Les précurseurs B subissent plusieurs étapes marquées par les réarrangements ordonnés des gènes d'Ig (pour revue Hardy and Hayakawa, 2001, Rolink et al., 2004). Plusieurs points de contrôle permettent d'évaluer la qualité du BCR et notamment l'absence d'autoréactivité (Nemazee and Weigert, 2000).

i. Les recombinaisons V(D)J

La lymphopoïèse B précoce est un processus multi-étapes permettant la prolifération et la maturation des lymphocytes B indépendamment de la présence d'un antigène. Pour devenir fonctionnels, les gènes d'Ig subissent des remaniements géniques ordonnés au niveau des segments variables V (variable), D (diversité) et J (jonction). Ces recombinaisons V(D)J vont ponctuer les stades précoces du développement B.

D'un point de vue moléculaire, les recombinaisons VDJ sont initiées par les endonucléases RAG (pour « Recombination Activating Gene ») codées par les gènes Rag1 et Rag2 dont l'expression est restreinte aux seules lignées lymphoïdes B et T (Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990). Ces enzymes vont introduire des cassures doubles brins (DSB, pour « Double-Strand Breaks ») précisément entre une séquence spécifique nommée séquence signal de recombinaison ou RSS (pour « Recombination Signal Sequence ») et une séquence codante (dans ce cas le segment D_H ou le segment J_H). Ces RSS qui bordent tous les segments V, D et J sont constituées d'un heptamère (CACAGTG) et d'un nonamère (ACAAAACC) tous deux extrêmement conservés et séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides

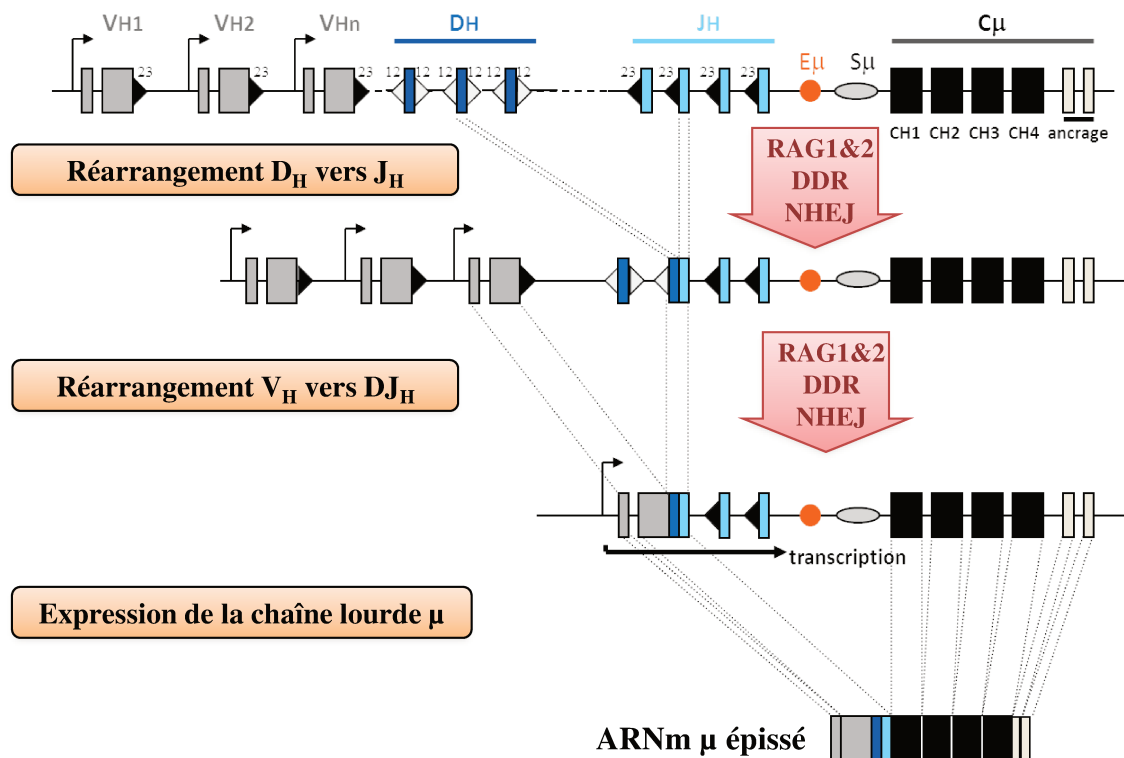


Figure 4 : Les réarrangements VDJ au locus des chaînes lourdes d'Ig (IgH)

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 transcriptionnel $E\mu$ par un cercle orange. Les réarrangements débutent par assemblage aléatoire de segments D_H et J_H (bleu), et sont poursuivis par assemblage d'un segment V_H (gris) sur le bloc réarrangé DJ_H . A noter que les segments V_H sont précédés par un exon « leader » (L, rectangle gris), codant la quasi-totalité du peptide signal impliqué dans la translocation des Ig dans le réticulum endoplasmique lors de la traduction. La machinerie enzymatique catalysant les recombinaisons V(D)J est présentée par une flèche rose. Adaptée d'après Dudley et al., 2005

nommée « espaceur » (pour revue Tonegawa, 1983). La longueur des espaceurs tient une place importante dans ce processus puisqu'un réarrangement ne peut subvenir qu'entre deux segments dont les RSS possèdent des espaceurs de longueurs différentes (i.e entre une RSS-12 et une RSS-23) selon la règle dite « 12/23 ». Or au locus IgH, les segments V_H et J_H sont flanqués par une RSS-23 alors que les segments D_H sont encadrés par des RSS-12, si bien qu'un segment V_H ne pourra jamais s'associer avec un segment J_H (pour revue Jung and Alt, 2004; Schatz and Ji, 2011; Schatz and Swanson, 2011).

ii. Réarrangements au locus IgH et expression du pré-BCR

L'entrée dans le lignage lymphoïde commence par la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en progéniteurs lymphoïdes communs dits « CLP » (communs aux LB, LT et cellules NK pour « Natural Killer »). L'expression de facteurs de transcription (comme E2A, EBF1, PU1, Ikaros, Pax5) permet ensuite l'engagement vers la lignée B et l'expression de Pax5 (nommé également BSAP pour « B-cell Specific Activation Protein ») joue un rôle essentiel dans le maintien de l'identité B (pour revue Fuxa and Skok, 2007; Hardy et al., 2007; Nutt and Kee, 2007; Mandel and Grosschedl, 2010).

L'engagement des CLP dans le lignage B est caractérisé par l'expression à la surface du marqueur B220 (récepteur du CD45), on parlera alors de cellules **pré-pro-B**. Précurseurs B les plus immatures, elles expriment notamment les marqueurs c-kit et CD43 mais n'expriment pas encore CD19 (Hardy et al., 1991, 2007; Rumfelt et al., 2006; Audzevich et al., 2017). Le stade pré-pro-B marque le début des réarrangements des gènes d'Ig. Ils ont d'abord lieu au locus IgH entre un segment D_H et un segment J_H et s'opèrent simultanément sur les deux allèles. Ils aboutissent à la formation de segments réarrangés DJ_H . Ce premier évènement caractérise le stade **pro-B dit « précoce »** (pour revue Jung et al., 2006).

Le locus IgH subit ensuite un second réarrangement intra-génique entre un segment V_H et le segment DJ_H préexistant. Cette étape achève ainsi la formation de l'exon codant la région variable de la chaîne lourde (**Figure 4**) et caractérise le stade **pro-B dit « tardif »**. Contrairement aux réarrangements bi-alléliques DJ_H , le réarrangement V_H-DJ_H se produit de façon asynchrone sur un seul allèle IgH.

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 répllication au cours de la division cellulaire (Mostoslavsky et al., 2001). Ces auteurs ont fait

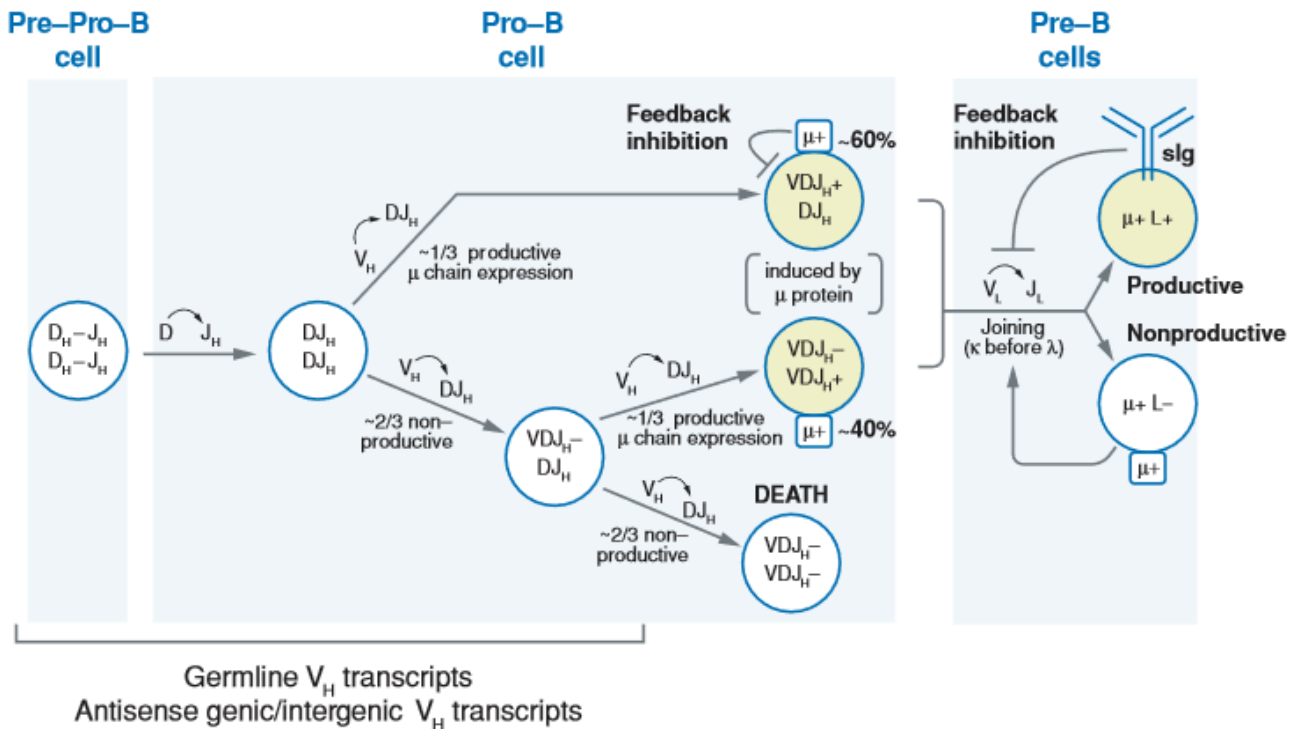


Figure 5 : Réarrangements V(D)J ordonnés et phénomène d'exclusion allélique

Cette figure montre que le réarrangement D_H vers J_H a lieu 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 allèle (phénomène d'exclusion allélique) durant le stade pro-B. Si ce réarrangement est productif (VDJ^+ , partie du haut) et que la chaîne lourde peut s'associer à la pseudo-chaîne légère pour former le pré-BCR, la signalisation en aval de ce récepteur pré-B 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, le réarrangement VDJ 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. Ensuite le réarrangement sur le locus des chaînes légères a lieu au niveau du stade pré-B. 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. D'après Jung et al., 2006

le constat que tous les loci d'Ig subissent une réplication asynchrone. Il en est de même pour les allèles contenant les gènes TCR β (pour « T Cell Receptor β ») (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 réplication 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 réplication rapide, augmentant ainsi leur accessibilité aux enzymes RAG (Mostoslavsky et al., 1998, 2001).

Suite à ces recombinaisons, la transcription d'un ARN pré-messager (pré-ARNm) est initiée à partir du promoteur situé en 5' de la région variable réarrangée (i.e. le promoteur du segment V_H recombiné ou pV_H). L'exon VDJ ainsi formé est associé à la région constante par épissage du pré-ARNm (Weichhold et al., 1990; Huber et al., 1993; pour revue Zachau, 1993; Dudley et al., 2005).

Si le réarrangement V_HDJ_H est « productif » l'expression d'une chaîne lourde μ capable de s'associer à une pseudo chaîne légère, formée par les protéines Vpré-B (CD179a) et $\lambda 5$ (CD179b), va alors permettre l'adressage membranaire du pré-BCR et valider l'entrée de la cellule au **stade pré-B**. L'association du pré-BCR aux molécules de transduction du signal Ig α (CD79a) et Ig β (CD79b) permet une cascade de signalisation 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 de laisser l'autre allèle IgH dans un statut de réarrangement incomplet (DJ) (**Figure 5**) (pour revue Jung et al., 2006). Ce processus d'exclusion allélique permet la synthèse d'une seule chaîne lourde au sein d'une même cellule B. En revanche, dans le cas où le réarrangement VDJ_H sur le premier allèle est non-productif, l'absence d'expression de pré-BCR autorise les réarrangements V_H vers DJ_H sur le second allèle. Si ce dernier est productif et permet l'expression du pré-BCR, la cellule B poursuit sa maturation et hébergeant des réarrangements bi-alléliques de type VDJ⁻/VDJ⁺. En absence de réarrangement productif sur les 2 allèles IgH, la cellule est éliminée par apoptose (Alt et al., 1984; Ehlich et al., 1993; Rajewsky, 1996). La prise en charge des transcrits issus de l'allèle non-productif par les différents mécanismes de surveillance des ARN sera décrite au chapitre 2.

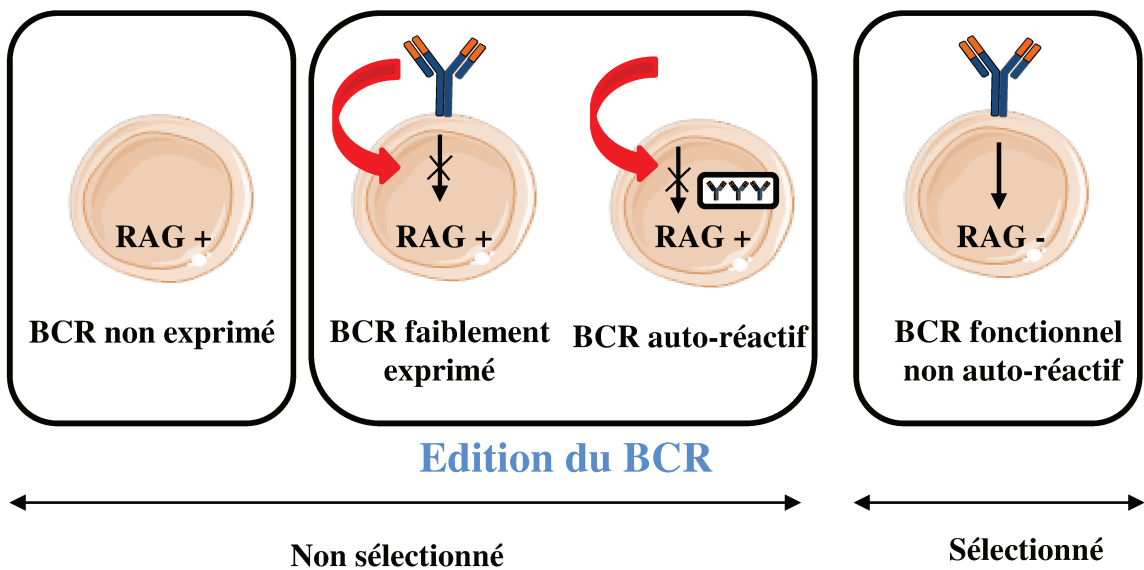


Figure 6 : Edition du BCR dans la moelle osseuse

L'absence de BCR en surface des cellules B, sa faible expression ou son autoréactivité n'inhibent pas l'expression des enzymes RAG, autorisant ainsi des réarrangements secondaires touchant principalement les chaînes légères d'Ig. Par contre, une signalisation optimale synonyme d'expression suffisante d'un BCR non auto-réactif induit l'arrêt des réarrangements, par inhibition de l'expression des enzymes RAG. Adaptée d'après Nemazee et Hogquist, 2003

La signalisation en aval du pré-BCR joue un rôle crucial dans le maintien de l'exclusion allélique des allèles IgH. Cette étape permet de s'assurer qu'une cellule pré-B exprime une chaîne lourde unique et fonctionnelle avant d'initier les réarrangements sur le locus des chaînes légères (Mårtensson et al., 2007). 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 des 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. Les réarrangements de chaînes légères se produisent d'abord au locus Ig κ , puis au locus Ig λ si les premiers s'avèrent défectueux. Un réarrangement V_κ vers J_κ productif, codant une chaîne légère κ capable de s'associer avec la chaîne lourde μ , 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 κ . Si les échecs se répètent, c'est le locus λ qui sera réarrangé selon le même principe. Ainsi, une même cellule exprime un seul type de chaîne légère κ ou λ (Gorman and Alt, 1998; Mostoslavsky et al., 2004; Jung et al., 2006). A la différence des jonctions VDJ de chaînes lourdes qui présentent une grande diversité grâce à l'action de l'enzyme TdT (pour « Terminal deoxynucleotidyl Transferase »), les jonctions VJ aux loci des chaînes légères présentent très peu de « N-diversité ».

Les cellules **B immatures** exprimant un BCR fonctionnel de type IgM vont subir un deuxième point de contrôle visant à limiter l'expression de BCR auto-réactifs (i.e. qui reconnaissent des Ag du soi).

Au cours de ce point de contrôle un phénomène de sauvetage connu sous le nom de l'édition du BCR (« Receptor Editing ») peut se produire au locus Ig κ (**Figure 6**) (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

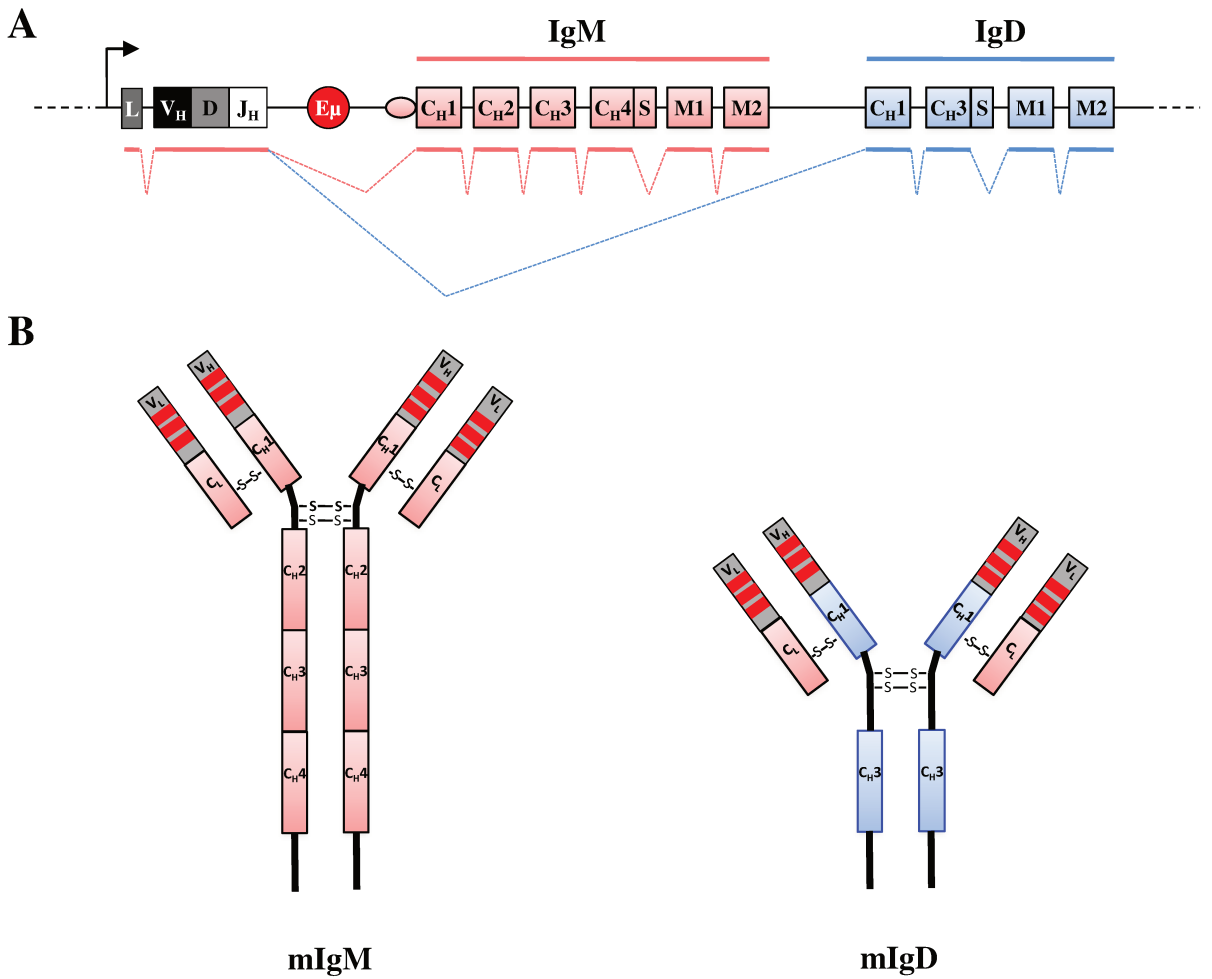


Figure 7 : Mécanisme d'épissage alternatif permettant l'expression simultanée d'IgM et IgD

A. Les lignes pointillées rose et bleue représentent les évènements d'épissage alternatif permettant la synthèse d'IgM et d'IgD, respectivement. Les traits pleins représentent les exons conservés après épissage.

B. L'IgM contient 4 domaines C_H , tandis que l'IgD n'en contient que deux (le deuxième étant quand même noté C_H3) et possède une région charnière plus longue.

réarrangements secondaires visant à modifier le réarrangement $V\kappa J\kappa$ afin de produire des nouvelles chaînes légères et d'exprimer un BCR compatible avec les éléments du soi. Le locus $Ig\kappa$ peut également subir des réarrangements de type kappa-RS (RS pour « Recombining Sequence »), durant lesquels un segment $V\kappa$ se recombine avec la séquence κRS inactivant ainsi le locus $Ig\kappa$, et autorisant des réarrangements sur l'autre allèle $Ig\kappa$ ou au locus $Ig\lambda$ (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).

Les cellules B immatures exprimant un BCR fonctionnel et non auto-réactif quittent alors la moelle osseuse afin de rejoindre la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, plaques de Peyer) pour devenir des cellules B matures.

3- Le développement tardif : maturation des cellules B

Au sein des organes lymphoïdes secondaires, les cellules B matures peuvent s'activer par la liaison de leur BCR avec un Ag. Ce développement tardif est donc dépendant des Ag et permet une différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou 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 § 4-ii et 4-iii).

i. Le stade B transitionnel

Les cellules **B transitionnelles** font le lien entre les cellules B immatures de la moelle osseuse et les cellules B matures périphériques. A ce stade, ces cellules sont caractérisées par l'expression de marqueurs de surface AA4.1 (CD93) et HSA (CD24) (Allman et al., 1992; Norvell and Monroe, 1996; Allman et al., 2001), et la co-expression d'un BCR de classe IgD en plus de l' IgM grâce à un mécanisme d'épissage alternatif des exons constants $C\mu$ et $C\delta$ (**Figure 7**) (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 sous-populations : les cellules B transitionnelles de type 1 (**T1**) [$IgM^{high}IgD^{low}CD23^{-}$], de type 2 (**T2**) [$IgM^{high}IgD^{high}CD23^{+}$] et de type 3 (**T3**) [$IgM^{low}IgD^{high}CD23^{+}$] (**Figure 8**) (Allman et al., 2001).

| Localisation | Sous-ensemble des cellules B | Phénotype Moléculaire |
|--------------------|--------------------------------|---|
| Rate | B transitionnel type 1 (T1) | CD19 ⁺ CD93 ⁺ IgM ^{hi} CD21 ⁻ CD23 ⁻ |
| | B transitionnel type 2 (T2) | CD19 ⁺ CD93 ⁺ IgM ^{hi} CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} |
| | B de la zone folliculaire (FO) | CD19 ⁺ IgD ^{hi} IgM ^{low} CD21 ⁺ CD23 ^{hi} CD1d ^{low} |
| | B de la zone marginale (MZ) | CD19 ⁺ IgD ^{low} IgM ^{hi} CD21 ^{hi} CD23 ^{low} CD1d ^{hi} |
| | Plasmablaste | CD19 ^{low/-} CD138 ⁺ CD93 ⁺ MHCII ⁺ Ki67 ⁺ |
| | Plasmocyte | CD19 ^{low/-} CD138 ⁺ CD93 ⁺ |
| Cavité péritonéale | B-1a | CD19 ⁺ CD11b ⁺ CD5 ⁺ |
| | B-1b | CD19 ⁺ CD11b ⁺ CD5 ⁻ |
| | B-2 (ou B "conventionnelles") | CD19 ⁺ CD11b ⁻ CD5 ⁻ |

Figure 8 : Marqueurs exprimés par les principales sous-populations de cellules B chez la souris

Les principales sous-populations de cellules B murines retrouvées dans la rate ou la cavité péritonéale et leur phénotype moléculaire sont présentés. Adaptée d'après Ping Shen et Simon Fillatreau, 2015

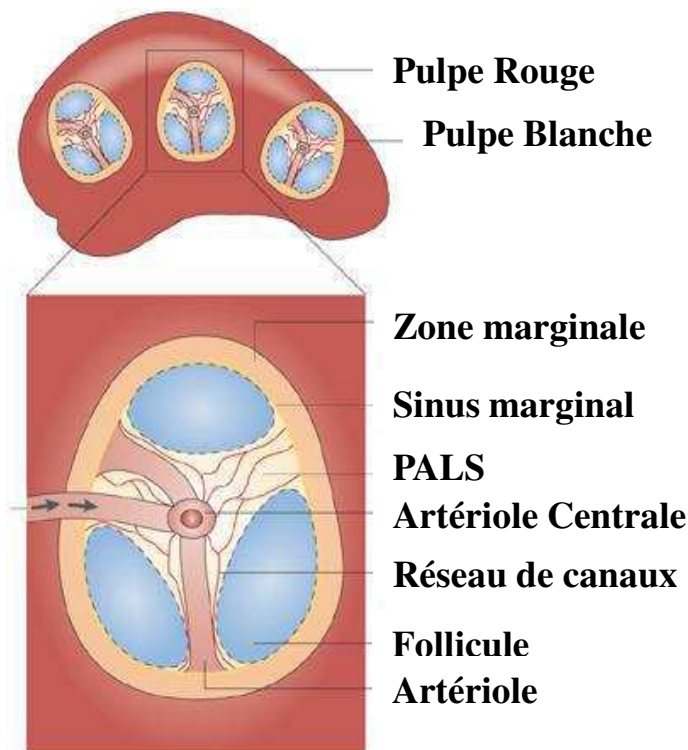


Figure 9 : Représentation schématique de l'architecture de la rate

(Haut) Schéma d'une rate représentant les deux zones, la pulpe blanche et la pulpe rouge.

(Bas) Un zoom sur la pulpe blanche avec notamment, la localisation de la zone marginale, frontière entre les pulpes blanche et rouge, contenant les lymphocytes B de la zone marginale (MZ). Dans la pulpe blanche seront retrouvés également, des PALS (pour Periarteriolar Lymphoid Sheath), des follicules dans lesquels sont localisés les lymphocytes B dit folliculaires (FO) ainsi qu'un réseau de canaux. Adaptée d'après Batista et Harwood, 2009

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 (**Figure 9**), 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 ayant passé ce point de contrôle rentrent alors dans les follicules de la rate et deviennent des cellules 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 « Marginal zone B cells ») (Su et al., 2004; Srivastava et al., 2005).

Différentes théories ont été proposées quant à la nature des cellules B transitionnelles T3 (pour revue Allman and Pillai, 2008). Basé sur des expériences de marquage BrdU (pour « Bromodésoxyuridine »), il a été proposé que les T3 représentent une partie intermédiaire de la scène de développement T1=> T2 => T3=> 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. Le stade B mature

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; Baumgarth, 2016) 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 10**) (Pillai and Cariappa, 2009).

• Les cellules B-1

Les **cellules B-1** sont majoritairement rencontrées au niveau de la cavité péritonéale et pleurale (Martin and Kearney, 2001) où elles peuvent représenter jusqu'à 30 à 60% de la population B (Baumgarth, 2013, 2016). Les cellules B-1 sont extrêmement rares au niveau de la rate et des autres organes lymphoïdes (0,2 à 1% des LB totaux). Ces cellules représentent une population hétérogène divisée en deux sous-classes sur la base de l'expression du marqueur

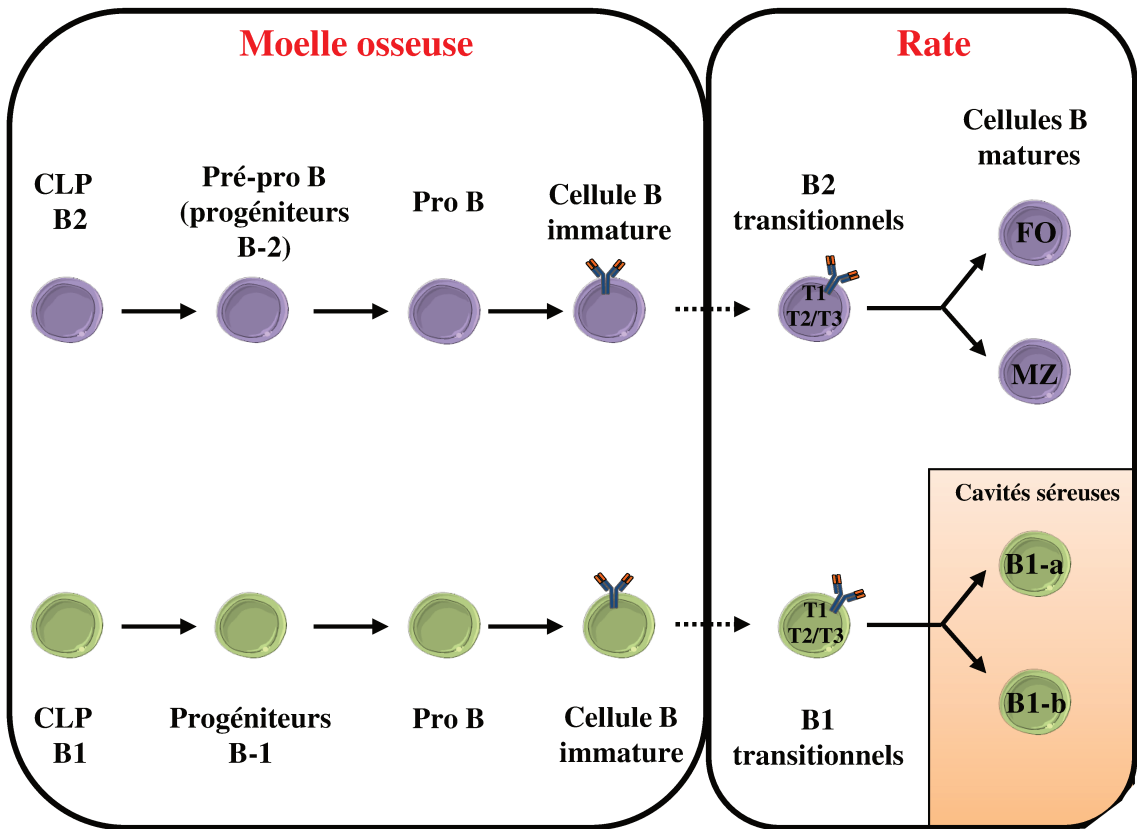


Figure 10 : Développement distinct des cellules B-1 et B-2

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. Adaptée d'après Montecino-Rodriguez et Dorshkind, 2012.

de surface CD5 (B-1a CD5⁺ et B-1b CD5⁻) (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). Bien que l'origine de ces cellules soit encore controversée, elles sont facilement générées à partir des précurseurs de foie fœtal et leur production est réduite à l'âge adulte (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012).

• Les cellules B-2

Les **cellules B-2** appelées aussi « cellules B conventionnelles » 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 10**).

- Les cellules B de la zone marginale (MZ)

Les **cellules B MZ** représentent 5 à 10% des cellules B de la rate et sont localisées à l'interface de la pulpe blanche et la pulpe rouge (**Figure 9**) (Cerutti et al., 2013).

Les cellules B MZ possèdent des fonctions similaires aux cellules B-1 et présentent toutes deux des faibles taux d'hypermutations au niveau de leurs gènes d'Ig. De même, leur BCR présente souvent une polyréactivité voire une faible autoréactivité. Ces cellules sont ainsi capables de reconnaître des motifs communs à de nombreux pathogènes (les PAMP) ou des débris de cellules apoptotiques (DAMP) (Martin and Kearney, 2002; Pillai and Cariappa, 2009). Ces cellules sont caractérisées également par une forte expression de récepteurs TLR (pour « Toll Like Receptor »), capables de reconnaître des molécules d'origine bactériennes telles que les lipopolysaccharides (LPS) ou encore certaines séquences d'ADN (CpG) (Genestier et al., 2007; Rubtsov et al., 2008; Braun et al., 2017). L'activation simultanée du BCR et des TLRs va induire une différenciation rapide en plasmablastes sécréteurs d'anticorps à courte durée de vie, majoritairement de façon T indépendante (Martin et al., 2001; Balázs et al., 2002). La majorité des Ig sécrétées seront d'isotype IgM, mais une partie des cellules B MZ peut sécréter des IgG ou des IgA après avoir subi une CSR (MacLennan et al., 2003). La sécrétion en grande quantité d'Ig de faible affinité constitue une réponse rapide T indépendante à la rencontre d'antigènes transportés par le sang, et représente le rôle principal des B MZ (Cerutti et al., 2013).

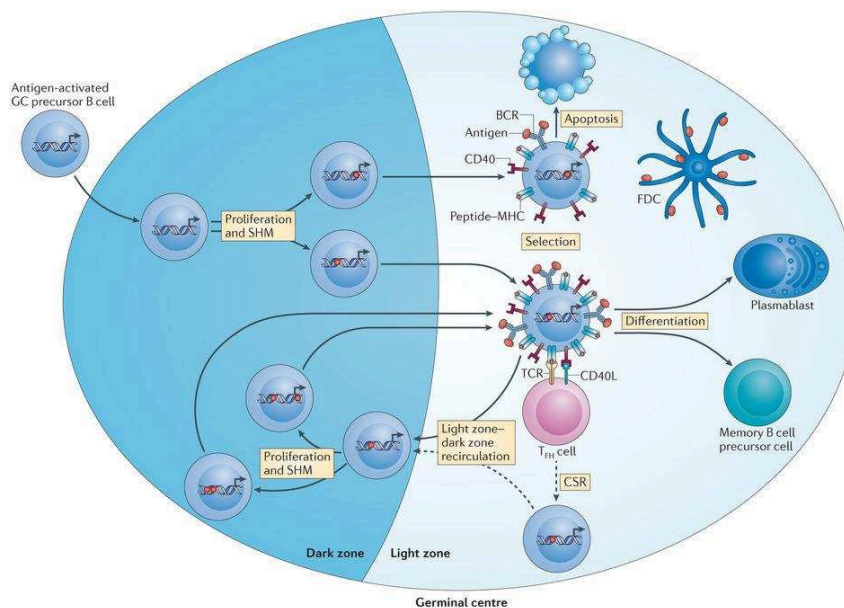


Figure 11 : Prolifération et différenciation des cellules B dans les centres germinatifs

Les lymphocytes B activés par la rencontre avec l'Ag vont former la population des centroblastes qui prolifèrent dans la zone sombre du centre germinatif (Dark Zone) et vont subir le processus d'hypermutations somatiques (SHM). Ces cellules vont ensuite migrer dans la zone claire (Light Zone) et former la population des centrocytes. Ces derniers vont être sélectionnés pour leur affinité avec l'Ag, avec l'aide des FDC (cellules dendritiques folliculaires) et des TFH (LT auxiliaires folliculaires). Ils ont alors la capacité de retourner dans la zone sombre. Les centrocytes sélectionnés peuvent ensuite subir des événements de CSR puis se différencier en cellules B mémoires ou en plasmablastes. D'après De Silva et Klein, 2015

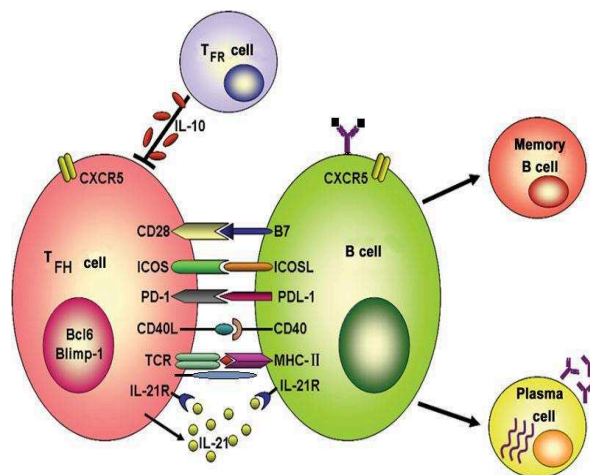


Figure 12 : Principaux acteurs de l'interaction T_{FH} -B au sein du centre germinatif

Les différentes interactions entre les cellules T_{FH} (T-cell Follicular Helper) et B sont consécutives à l'internalisation de l'Ag par le BCR. Cet Ag est apprêté et présenté via le CMH de classe II aux cellules T_{FH} exprimant un TCR spécifique de ce complexe antigénique peptide/CMHII. Les cellules T_{FH} sont caractérisées par la sécrétion d'IL-21 et l'expression du récepteur aux chimiokines 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. D'après Sudhanshu Shekhar et Xi Yang, 2012

- Les cellules B de la zone folliculaire (FO) et formation du centre germinatif (GC)

Les **cellules B FO** représentent la majorité des cellules B de la rate (Allman and Pillai, 2008). L'activation de ces cellules par un antigène va entraîner la formation d'un centre germinatif (GC, pour « germinal center ») qui constitue un foyer de prolifération intense dans lequel les LB interagissent avec les cellules Tfh (pour « Lymphocytes T follicular helper ») (**Figure 11**) (Okada and Cyster, 2006; Qi et al., 2008; pour revues : Batista and Harwood, 2009; Qi, 2012).

Au cours de la réaction du GC, les gènes d'Ig peuvent subir des réarrangements secondaires comme le SHM permettant de favoriser le développement des cellules exprimant les Ig de plus haute affinité pour l'antigène. En effet, les cellules B du GC expriment fortement l'enzyme AID (pour « Activation-Induced cytidine Deaminase »), indispensable aux processus de SHM et de CSR. La prolifération et la sélection des clones sont séparées physiquement : la prolifération a lieu dans la « zone sombre » ou DZ (pour « Dark Zone ») du GC, tandis que la sélection a lieu dans la « zone claire » ou LZ (pour « Light Zone »), en présence de LTfh et de cellules dendritiques folliculaires (FDC) (**Figure 11**). Les LB peuvent effectuer plusieurs allers-retours entre les deux zones afin de sélectionner les clones les plus affins pour l'antigène. En effet, le GC est une structure dynamique dans laquelle une migration interzone est autorisée. Plusieurs études ont montré que le mouvement DZ vers LZ n'est pas unidirectionnel et que les centrocytes de LZ sélectionnés positivement peuvent retourner dans la DZ afin de subir un nouveau cycle de prolifération/mutation et d'exprimer un BCR encore plus affiné 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 M. 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). Après une phase de prolifération dans la DZ, les cellules B vont entrer en compétition dans la LZ pour interagir avec les LTfh et les FDC (**Figure 12**) (pour revue MacLennan, 1994; Victora and Nussenzweig, 2012; Victora and Mesin, 2014). Ces interactions fourniront les signaux de survie nécessaires et permettront de sélectionner les LB ayant un BCR de forte affinité vis-à-vis de l'Ag. A l'inverse, les cellules B du GC expriment fortement le récepteur pro-apoptotique Fas (CD95) (Naito et al., 2007) et, en absence de signaux de survie, les cellules B exprimant un BCR de faible affinité (ou auto-réactif) entreront en apoptose. Le processus de CSR permettant de modifier les propriétés effectrices des Ig se déroule également dans les GCs. Ce

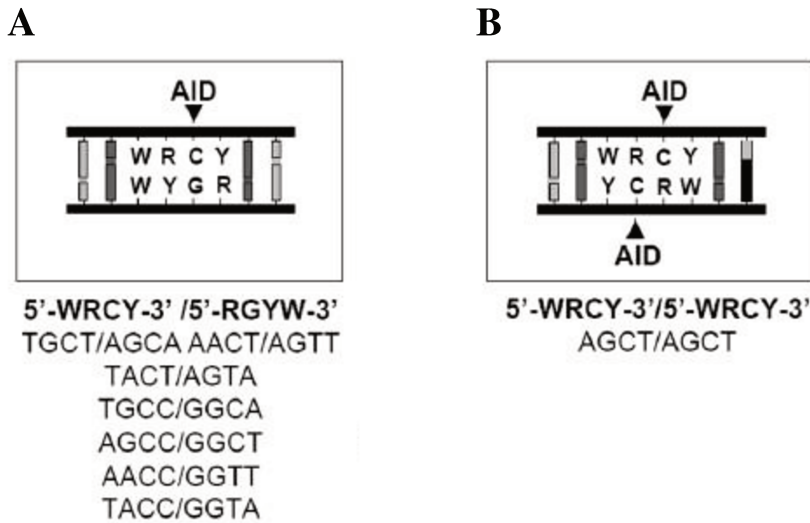


Figure 13 : Les séquences ciblées par AID lors des processus de maturation d'affinité ou de commutation isotypique des Ig

Lors de la SHM (A) ou la CSR (B), l'enzyme AID désamine les résidus Cytosines (C) en Uraciles (U) sur des sites préférentiels de l'ADN appelés points chauds autrement dits « hotspots ». Ces courtes séquences portent un motif particulier WRCY (W = dA/dT ; R = dA/dG ; Y = dT/dC/dA).

A. Motifs ciblés par AID dans lesquels une seule déamination est possible.

B. Motifs dans lesquels AID peut cibler les deux brins d'ADN, comme indiqué sur la figure. Les régions S (switch) contiennent une densité importante du motif AGCT souvent répétés en tandem.

D'après Basu et al., 2009 (SHM : Somatic HyperMutation ; CSR : Class Switch Recombination ; AID : Activation-Induced cytidine Deaminase).

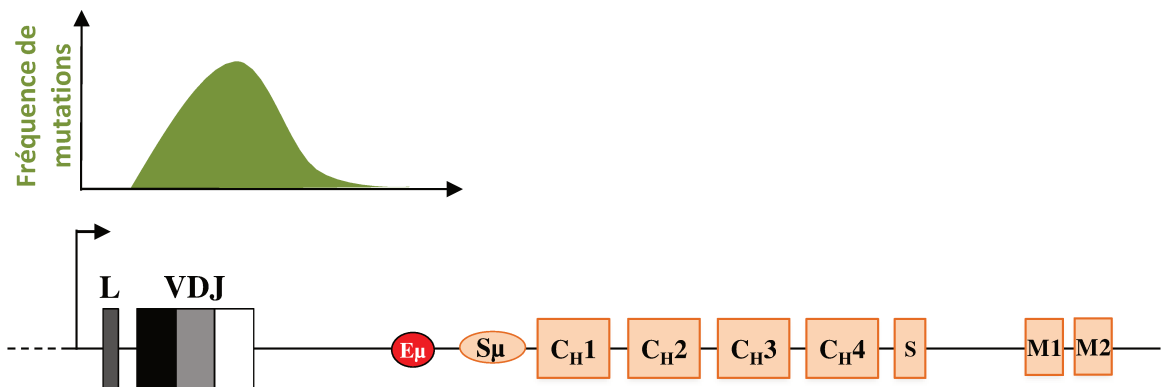


Figure 14 : Localisation des hypermutations somatiques au niveau des exons VDJ réarrangés

Les mutations observées lors de la SHM s'étendent de 150 pb à environ 1,5 kb après le site d'initiation de la transcription (flèche noire). L'exemple du locus IgH réarrangé illustre le ciblage de l'activité d'AID sur l'exon VDJ. L'activateur transcriptionnel intronique E_{μ} et la partie constante C_{μ} ne sont pas touchés par les mutations. Adapté d'après Peled et al., 2008

phénomène sera détaillé au § 4-iii. La réaction du GC aboutit au final à la différenciation des cellules B activées en cellules B mémoires ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (pour revues : De Silva and Klein, 2015; Mesin et al., 2016).

4- Recombinaisons secondaires aux loci d'Ig : SHM et CSR

Comme énoncé précédemment, les cellules B activées peuvent subir des remaniements secondaires au niveau de leur gènes d'Ig : l'hypermutation somatique (SHM) et la commutation isotypique (CSR ou « switch »). La SHM correspond à l'induction de mutations dans la séquence codant les régions variables des chaînes lourdes et légères d'Ig, permettant d'augmenter l'affinité pour l'antigène. La CSR est une recombinaison permettant de changer l'isotype de l'Ig exprimée, en remplaçant le gène C μ par un gène localisé en aval codant un autre isotype, sans modifier la région variable.

i. AID : enzyme clé des recombinaisons secondaires

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, 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). Cette petite protéine de 26 kDa (198 acides aminés) est codée par le gène *Aicda* et appartient à la famille des déaminases éditrices d'ARN, APOBEC (pour « APOlipoprotein B mRNA editing Enzyme-Catalytic Component ») qui est un sous-groupe d'une superfamille de déaminases Zinc-dépendantes (Conticello et al., 2007).

L'apparition des protéines AID/APOBEC au cours de l'évolution a eu lieu simultanément à l'apparition de l'immunité adaptative, chez les premiers vertébrés (pour revue Conticello, 2008). Les plus anciens homologues d'AID ont été identifiés chez les poissons cartilagineux et chez les agnathes (poissons sans mâchoires, tels que les lamproies). Leur découverte chez les agnathes est particulièrement remarquable puisque l'immunité de ces vertébrés ne repose pas sur des Ig, mais sur des récepteurs variables nommés VLR (pour « Variable Lymphocyte Receptor ») (Conticello et al., 2005; Rogozin et al., 2007).

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 petite protéine dite « navette »,

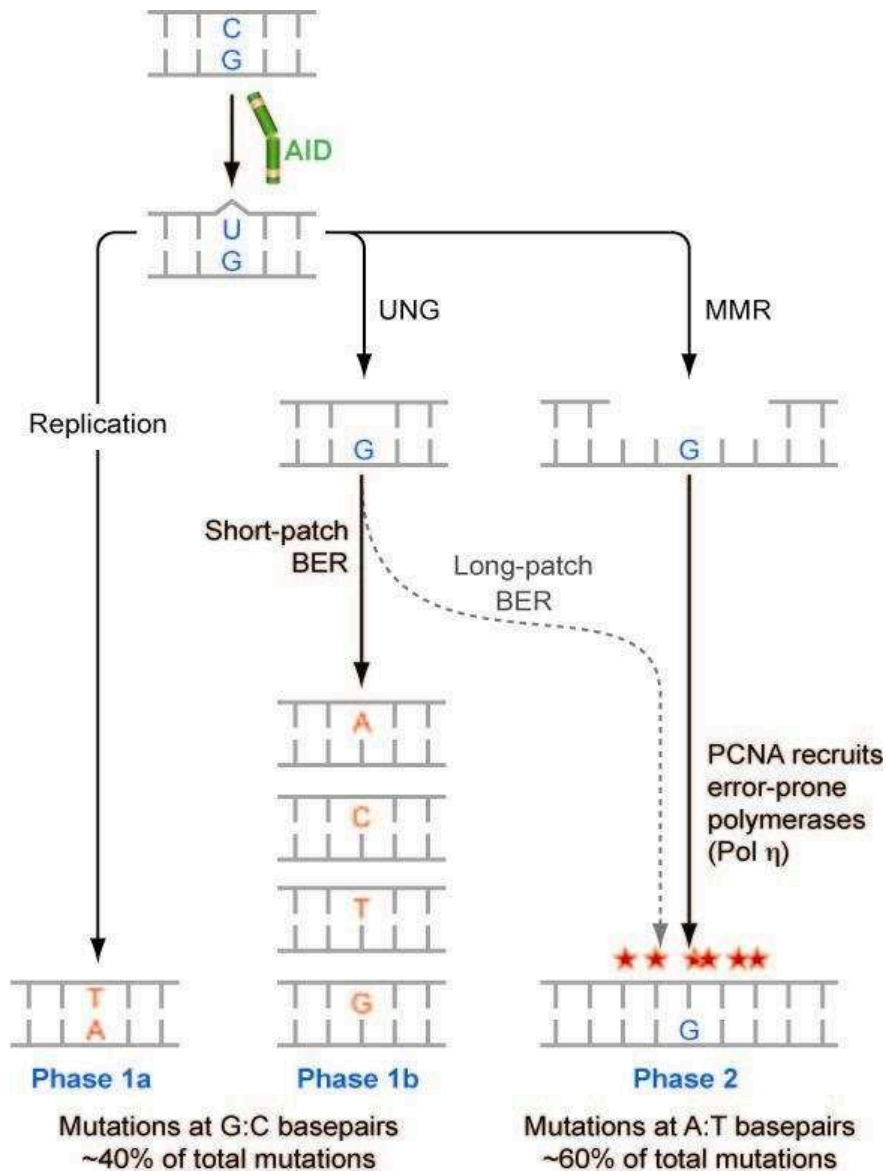


Figure 15 : Principales étapes intervenant dans le processus d'hypermutations somatiques

AID initie les hypermutations somatiques par déamination des cytidines (C) sur un brin d'ADN. La déamination de C conduit à l'apparition d'uracile (U), donnant lieu à un mésappariement G:U. Ce mésappariement sera pris en charge par trois voies différentes : la simple réplication, le mécanisme du BER (pour « Base Excision Repair »), ou la MMR (pour « MisMatch Repair »).

UNG: Uracil DNA Glycosylase ; EXO1: Exonuclease 1; MSH: homologue of Escherichia coli MutS ; POLη: polymérase (DNA directed)-η. PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen. D'après Peled et al., 2008

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).

L'enzyme 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) (**Figure 13**) (Basu et al., 2009; 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). Les différences entre ces deux mécanismes sont principalement dues aux régions ciblées par AID et la façon dont seront traités les mésappariements.

ii. Hypermutation somatique (SHM)

Les recombinaisons des segments géniques V(D)J déterminent le répertoire primaire des Ig. Afin d'augmenter l'affinité de ces récepteurs à l'Ag, des mutations sont générées au niveau des gènes de la région variable par le processus de SHM. Ces mutations sont de l'ordre de 10 mutations pour 1000 pb (pour revue Seki et al., 2005) et s'accumulent dans les régions hypervariables CDR (pour « Complementarity Determining Region »). La fréquence de ces mutations est maximale au niveau des régions variables et diminue ensuite de manière de façon à ne pas affecter la partie constante des Ig (**Figure 14**) (Rada and Milstein, 2001; Peled et al., 2008).

Les mutations sont la résultante de la prise en charge des mésappariements dU:dG qui découlent directement de la déamination des cytosines sur l'ADN simple brin par AID. Ensuite, ces mutations sont introduites ultérieurement durant la réplication lorsque se produit la réparation des résidus Uraciles (**Figure 15**) (Rada et al., 1998; Hwang et al., 2015). Les Uraciles générés vont, soit être ignorés par la polymérase qui va les considérer comme une Thymine (T) et ainsi insérer une Adénine (A) et donc créer une transition C:T (Cytosine : Thymine), soit être excisés par l'Uracile Glycosylase (UNG pour « Uracil-DNA glycosylases

Locus IgH dans des LB exprimant une IgM et/ou une IgD

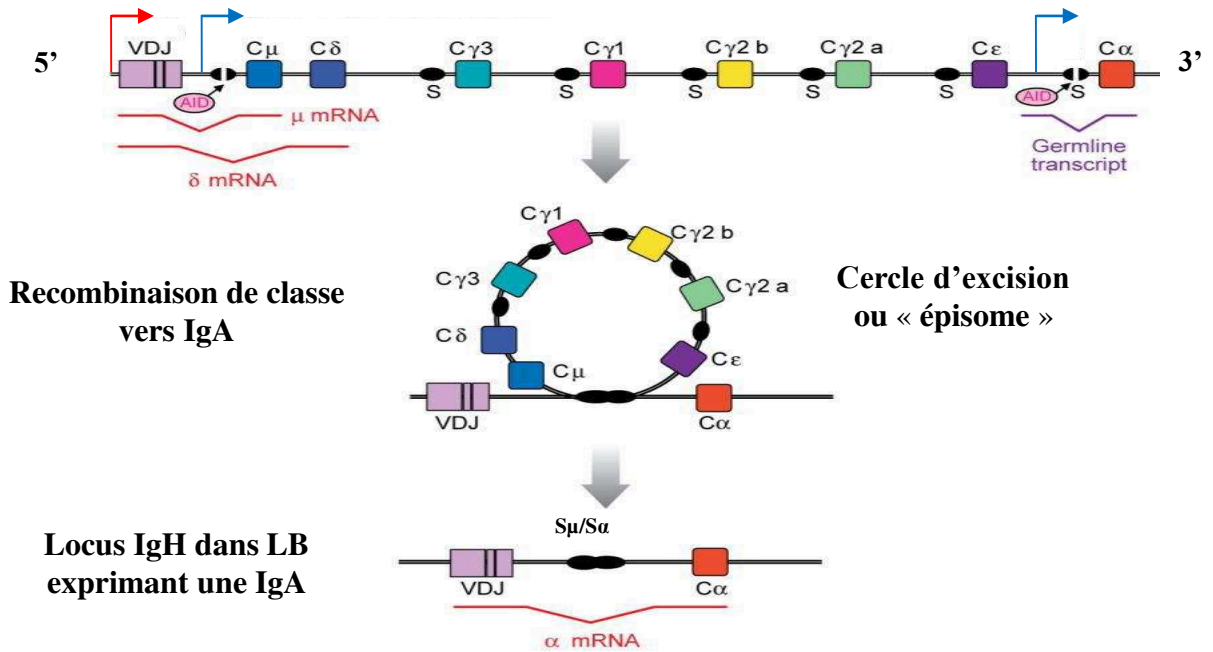


Figure 16 : Mécanisme général de la commutation isotypique ou CSR (Class Switch Recombinaison)

L'exemple d'un évènement de CSR vers IgA est représenté. La flèche rouge symbolise l'initiation de la transcription à partir du promoteur pV_H. Les promoteurs situés en amont de S μ et S α (flèches bleue) vont initier la transcription de deux régions S ciblées par le processus de CSR. Les schémas d'épissage des ARNm μ , δ et du transcrit germinale α sont représentés sous le locus, en haut de la figure. La transcription germinale permet à l'enzyme AID d'initier des cassures dans les régions S. Ces régions vont ensuite être recombinaisonnées entre elles, rapprochant ainsi le gène codant C α , du pV_H et de l'exon VDJ réarrangé pour permettre la production d'IgA. Un cercle d'excision appelé épisode intervient dans l'élimination de la partie située entre les deux régions S. Adaptée d'après Stavnezer et al., 2008

»). Dans ce second cas, des sites abasiques vont être générés et pris en charge par le mécanisme du BER (pour « Base Excision Repair ») qui grâce à l'action de polymérases peu fidèles, telles que REV1, pol β (pour « DNA polymerase Beta »), pol η (pour « DNA polymerase eta»), vont remplacer le site abasique par une base aléatoirement choisie A, C, T ou G (Weller et al., 2008; Chahwan et al., 2012) et donc induire des transitions (remplacement d'une purine par une purine ou d'une pyrimidine par une pyrimidine) ou des transversions (purine remplacée par pyrimidine ou pyrimidine par purine). Les bases entourant le site abasique peuvent également être la cible de ces polymérases, dans ce cas les mutations induites seront dite "long-patch repair" (Peled et al., 2008). Enfin, une dernière possibilité peut résoudre ces sites abasiques, il s'agit du MMR (pour « MisMatch Repair »). Dans le cas du MMR, les mésappariements sont reconnus par l'hétérodimère MSH2/MSH6 (pour « MutS Homologue 2 et 6 »), les changements conformationnels médiés par l'ATP promeuvent le recrutement de PCNA (pour « Proliferating Cell Nuclear Antigen ») et de l'exonucléase EXO1, qui vont exciser le mésappariement ainsi que les 20 à 30 nucléotides voisins de la cassure. Des polymérases infidèles seront alors recrutées pour combler ces lésions et particulièrement la polymérase η (**Figure 15**) (Peled et al., 2008).

iii. 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 β (pour « *Transforming Growth Factor β* ») favorise une CSR vers IgA (**Figure 16**). Alternativement, une stimulation en présence d'IL-4 favorise la CSR vers IgG1 et IgE (Grawunder et al., 1997). En réponse au LPS sans addition de cytokines, les isotypes prédominants sont les IgG3 et IgG2b.

- **Les régions « switch » (S)**

En amont de chaque région constante, sauf pour C δ , se trouve une région S (« switch ») constituée de nombreuses séquences répétées riches en G/C. Les séquences S présentent des tailles comprises entre 1kb et 12kb et sont la cible des mutations induites par AID, à l'origine des cassures double-brins (DSB) requises pour la CSR (Dunnick et al., 1993).

De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance de l'orientation, de la longueur et du caractère répétitif des régions S notamment pour l'établissement des structures appelées

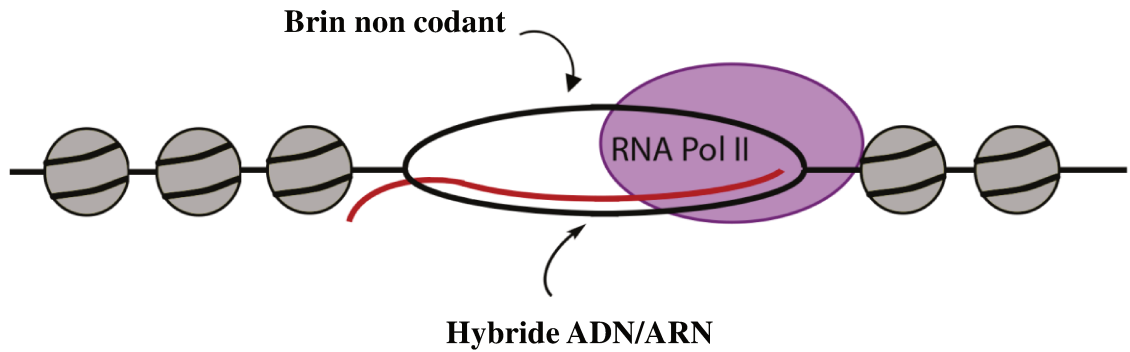


Figure 17 : Représentation schématique d'une boucle R (R-Loop)

La RNA pol II est représentée en violet, les octamères d'histones en gris, et l'ARN néosynthétisé en rouge. La nature riche en G des régions S permet à cet ARN de former une structure hybride ADN/ARN très stable, facilitant le mécanisme de CSR. Adaptée d'après Vertino et Wade, 2012

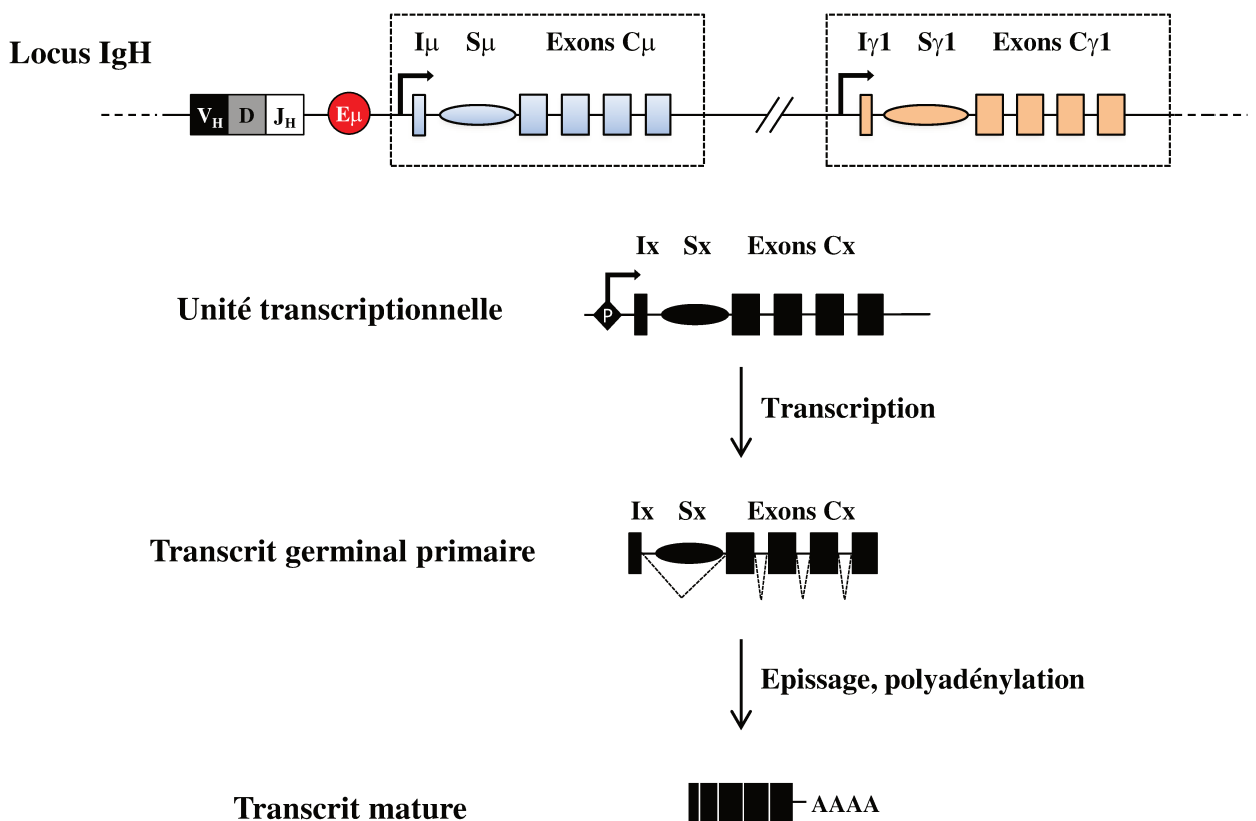


Figure 18 : Transcription germinale initiée à partir des promoteurs I

Chaque région switch (S) située en amont des gènes constants possède sa propre unité transcriptionnelle, formée d'un promoteur I inductible (P), d'un exon I non codant, d'une région S et des exons constants C_H. Le transcrit primaire est épissé pour former un transcrit mature non codant. x représente n'importe quel isotype sauf δ . Adaptée d'après Matthews et al., 2014

« boucles R » (ou « R-loops ») (**Figure 17**) (Luby et al., 2001; Shinkura et al., 2003; Khamlichi et al., 2004; Zarrin et al., 2005, 2008). En effet, lors de la transcription de ces régions S, des hybrides ADN-ARN vont se former et stabiliser ces « R-loops » dans lesquelles le brin non-matrice d'ADN va être isolé et rendu accessible à AID (pour revues : Odegard and Schatz, 2006; Vertino and Wade, 2012; Pavri, 2017). La richesse en G du brin matrice est essentielle pour maintenir ces structures stables (Zhang et al., 2014) d'où l'importance de l'orientation des régions S, une inversion de celle-ci conduisant à une inhibition de la CSR (Daniels and Lieber, 1995; Kinoshita et al., 1998; Yu et al., 2003; Zarrin et al., 2004). Les régions S sont donc requises pour permettre une CSR optimale (Luby et al., 2001; Shinkura et al., 2003; Khamlichi et al., 2004; Zarrin et al., 2005, 2008; pour revue Chaudhuri et al., 2007; Grigera et al., 2017).

• Les transcrits germinaux

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_H associé (Snapper et al., 1997; Manis et al., 2002). Tous les transcrits germinaux lors de la CSR ont une structure analogue. Le TSS (pour « Transcription Start Site ») est localisé en 5' de chaque région S au niveau du promoteur I. Après initiation, la transcription se poursuit à travers l'exon I non codant, traverse la région S intronique et les différents exons constants C_H et s'achève au site de polyadénylation normal des ARNm (**Figure 18**) (Matthews et al., 2014).

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). Ces transcrits matures pré-switch ne semblent coder aucune protéine car ils présentent de nombreux codons stop au niveau des exons I (Lennon and Perry, 1985; Stavnezer-Nordgren and Sirlin, 1986; Lutzker and Alt, 1988; Stavnezer et al., 1988; Radcliffe et al., 1990; Xu and Stavnezer, 1992; pour revue Chaudhuri and Alt, 2004).

Un second type de transcrits est produit suite à la recombinaison, ce sont les transcrits **post-switch**, qui sont initiés par le promoteur I_μ , traversent l'exon I_μ puis la région S hybride (S_μ/S_x) formée par le réarrangement et les exons codant l'isotype nouvellement recombiné. Après épissage, ces ARNm de type $I_\mu-C_x$ sont également stériles (Li et al., 1994; pour revue Chaudhuri et al., 2007). La détection des transcrits pré- et post-switch est classiquement utilisée pour estimer l'activité d'une unité transcriptionnelle et l'efficacité de la CSR respectivement.

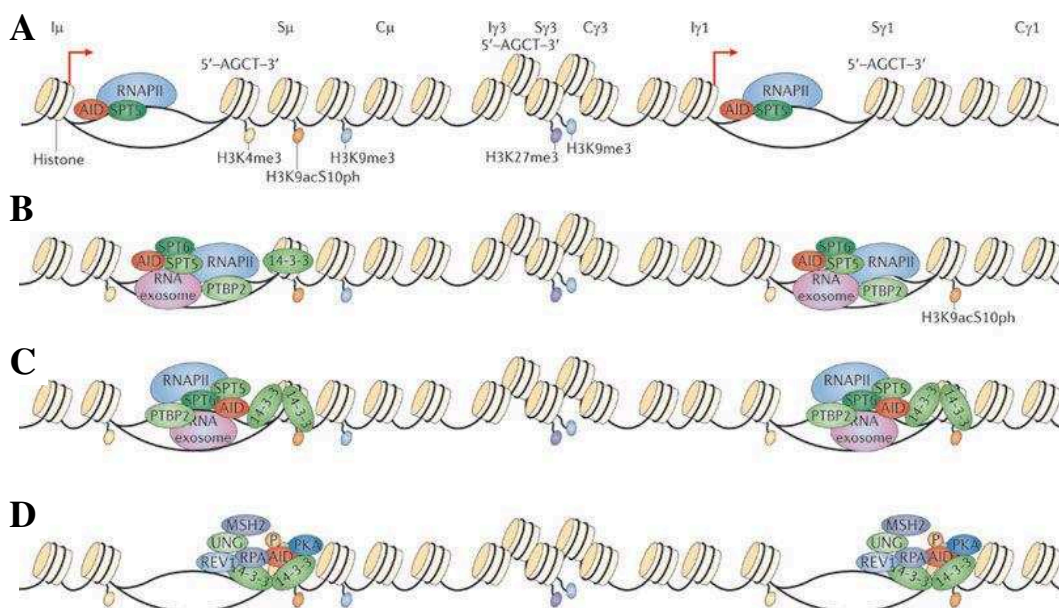


Figure 19 : Structure chromatinienne et acteurs intervenant dans le ciblage d'AID lors de la CSR

Cette figure illustre un évènement de CSR vers IgG1.

A. L'ARN pol II et des enzymes impliquées dans le remodelage chromatinien (histones acétyl-transférases et méthyl-transférases) sont recrutées au niveau du promoteur I γ 1 pour initier la transcription germinale de la région S γ 1 et catalyser les modifications des histones au niveau de cette dernière. La région S μ est quant à elle constitutivement transcrite. Grâce au facteur d'élongation de la transcription SPT5, l'ARN pol II s'associe avec AID au niveau des promoteurs I μ et I γ 1.

B. Pendant l'élongation de la transcription, l'ARN pol II peut marquer une pause et former un complexe macromoléculaire avec SPT5 et, vraisemblablement, SPT6, PTBP2 et le « RNA exosome », au niveau des régions S μ et S γ 1. Cette pause pourrait permettre la mise en place de modifications chromatiennes permissives (H3K4me3: ovales jaune et H3K9acS10ph: ovales orange). Ces modifications associées à la perte de modifications répressives comme H3K9me3 (ovales bleu clair) et H3K27me3 (ovales pourpre) reflètent une chromatine ouverte au niveau de S μ et S γ 1 permettant l'accès à AID et à d'autres facteurs de la CSR. L'interaction d'AID avec la machinerie transcriptionnelle favorise son recrutement au niveau des régions S. Le « backtracking » de l'ARN pol II lors de la pause permettrait le recrutement du « RNA exosome » et rendrait le brin matrice accessible à AID.

C et D. La présence d'adaptateurs protéiques de la famille 14-3-3 (par leurs interactions avec des répétitions 5'-AGCT-3') favorisait également la stabilisation d'AID au niveau des régions S. Ces dernières recrutent PKA qui peut phosphoryler AID et permettre l'interaction entre AID et RPA fixé au niveau de l'ADN simple brin. D'après Xu et al., 2012

Outre les transcrits germinaux sens, des transcrits antisens (vraisemblablement non épissés) peuvent également être détectés au niveau des régions S, suivant le même profil d'expression que les transcrits sens (Perlot et al., 2008). En revanche, les exons C μ (localisés en aval de la région switch S μ) qui ne sont pas ciblés par AID, ne sont pas transcrits en orientation antisens. Ces données ont donc suggéré que la transcription antisens des régions S contribuerait à leur ciblage par AID (**Figure 19**). Cependant, Haddad et al. ont démontré que seule la transcription sens de la région S γ 3 est essentielle et suffisante pour induire la CSR vers IgG3 *in vivo*. En effet, lorsque ces auteurs bloquent spécifiquement la transcription sens au niveau S γ 3, en insérant une cassette de polyadénylation et de pause transcriptionnelle en amont de cette région, la CSR vers IgG3 est totalement abolie. Par contre, le blocage de la transcription antisens par l'insertion de la même cassette en aval de S γ 3 n'affecte pas la CSR vers cet isotype (Haddad et al., 2011).

Enfin, il est à noter que notre laboratoire a montré précédemment que ce phénomène de transcription germinale touche aussi bien l'allèle productif que l'allèle non-productif et qu'il n'est pas rare que les deux allèles IgH recombinent vers le même gène constant (Delpy et al., 2003).

• L'épissage des transcrits germinaux et la CSR

Bien qu'essentielle, la transcription germinale en elle-même n'est pas suffisante pour induire la CSR de façon optimale. En effet, le remplacement de l'exon I ϵ par un promoteur efficace (E μ associé à un promoteur pV_H) conduit à une transcription normale, pourtant la CSR vers IgE est diminuée d'un facteur 10 à 100 dans ce modèle murin (Bottaro et al., 1994). Cette dichotomie entre le caractère obligatoire de la transcription germinale et le fait qu'elle ne soit pas à elle seule suffisante pour permettre la recombinaison peut s'expliquer par les travaux du groupe de Radbruch sur l'importance de la maturation des transcrits germinaux dans la CSR. Ces auteurs ont démontré que l'épissage des transcrits pré-switch, et/ou la machinerie d'épissage, est requis pour induire ce processus (Lorenz et al., 1995; Hein et al., 1998).

Par des approches indirectes, d'autres études ont confirmé le rôle clé de l'épissage des transcrits pré-switch dans la CSR (Qiu et al., 1999; Kuzin et al., 2000; Samara et al., 2006). Bien que des travaux récents tendent vers une implication de la machinerie d'épissage dans le recrutement d'AID au niveau des régions S, le rôle de cette maturation des ARN dans la CSR reste encore méconnu (Conticello et al., 2008; Nowak et al., 2011). Par ailleurs, il a été démontré que la présence d'un site donneur d'épissage à proximité d'un promoteur facilite le

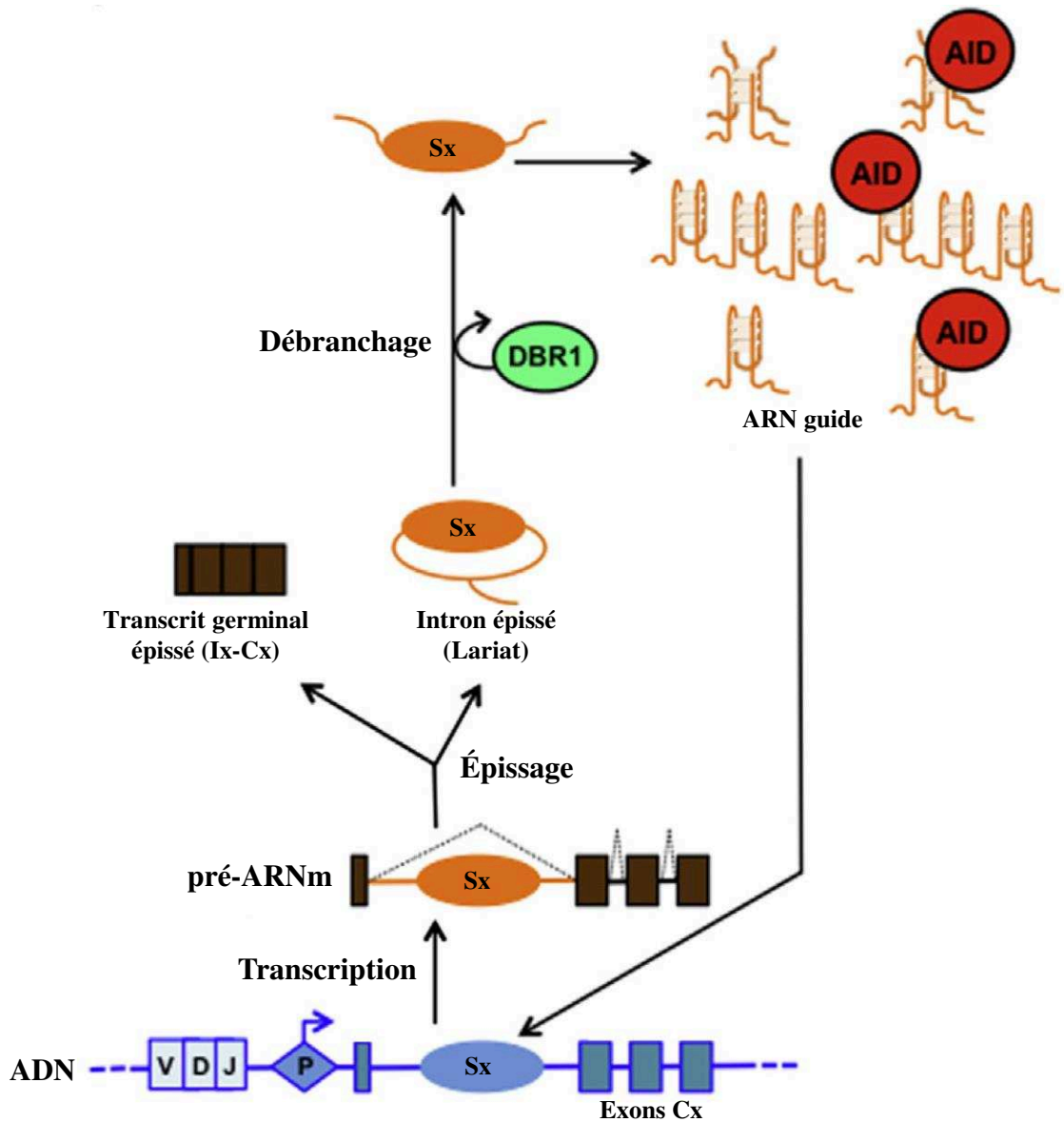


Figure 20 : Ciblage d'AID par des ARN « guides » non codants

L'épissage des transcrits germinaux forme le transcrit germlinal mature (Ix-Cx), et un intron sous forme de « lasso » (Lariat). La linéarisation de ce structure en boucle par l'enzyme DBR1 (« débranchage »), peut former des ARN « guides » capables d'interagir avec AID et de cibler son action sur les régions switch (S_x) complémentaires. Adaptée d'après Zheng et al., 2015

recrutement du complexe d'initiation de la transcription et ainsi augmente le taux de transcription (Furger et al., 2002; Damgaard et al., 2008). Ces observations ont été renforcées par la découverte que CTNNLB1 (pour « catenin (cadherin-associated protein), β -like 1 ») et PTBP2 (pour « Polypyrimidine Tract Binding Protein 2 »), des protéines associées au spliceosome et impliquées respectivement dans l'épissage et sa régulation, sont requises pour une CSR efficace puisqu'elles fixent la protéine AID (Conticello et al., 2008; Nowak et al., 2011).

Si le mécanisme exact par lequel le spliceosome favorise le recrutement d'AID n'est pas encore bien connu, un rôle a récemment été identifié pour les transcrits germinaux non codants. Les régions introniques épissées sont générées sous forme de lassos, dites structures de « **Lariats** » (**Figure 20**). Cette forme circulaire va être linéarisée par l'enzyme DBR1 (pour « debranching RNA lariats 1 »). L'ARN linéaire ainsi formé, riche en G, va former des quadruplexes de G qui lui permettront de se lier à l'enzyme AID et ainsi de servir de « **guide** » à l'enzyme pour la diriger vers les régions S ciblées (Zheng et al., 2015).

Si ces travaux révèlent la contribution de l'épissage dans le processus de CSR, les mécanismes sous-jacents restent encore méconnus et ont fait l'objet d'une partie de mes travaux de thèse présentés dans la partie Résultats (cf Article 3).

• **Régulation de la transcription germinale**

La transcription initiée au niveau des promoteurs I est permise grâce à une série d'éléments cis-régulateurs agissant après activation des cellules B. La région régulatrice située en 3' du locus IgH (3'RR pour « Regulatory Region ») apparaît aujourd'hui comme le principal élément cis-régulateur du locus IgH intervenant au cours de la CSR (Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009). Cette région régulatrice a fait l'objet de nombreuses études au sein de notre laboratoire. Elle se compose de quatre enhanceurs (hs3a, hs1,2, hs3b et hs4) et trois isolateurs (hs5, hs6, hs7) qui contrôlent l'expression des chaînes lourdes et plus particulièrement la transcription au niveau du locus IgH.

Des modèles murins KO (pour « Knock-Out ») des différents éléments composant la région 3'RR ont été réalisés mais n'ont montré que peu d'effets individuellement (Cogné et al., 1994; Manis et al., 1998; Pinaud et al., 2001; Morvan et al., 2003; Vincent-Fabert et al., 2009; Bébin et al., 2010). Par contre, l'action synergique des quatre enhanceurs est nécessaire pour les événements de CSR et de SHM (Vincent-Fabert et al., 2010; Pinaud et al., 2011;

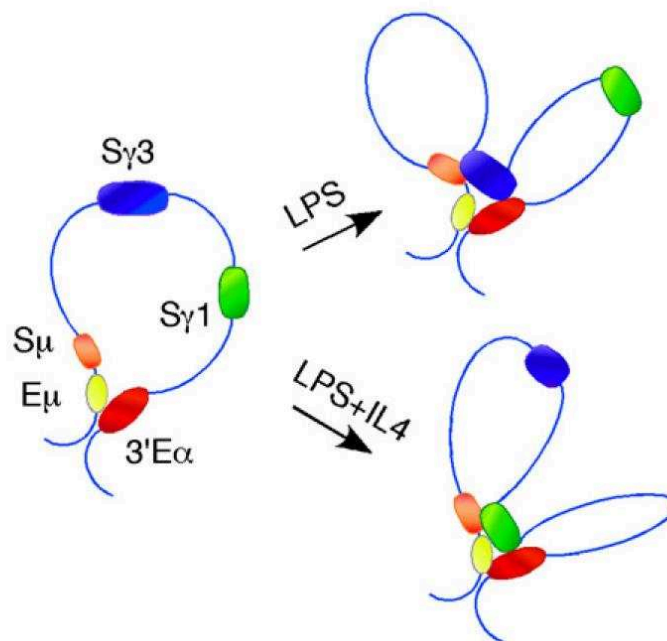


Figure 21 : Modification conformationnelle du locus IgH lors de la CSR

Dans les cellules B au repos, les régions E μ , 3'RR et S μ présentent une conformation rapprochée. En revanche après stimulation (LPS, LPS+IL4), la conformation du locus IgH est modifiée. Le rapprochement des régions switch (S μ et S α) ciblées par le processus de CSR favorise ainsi la recombinaison. D'après Wuerffel et al., 2007

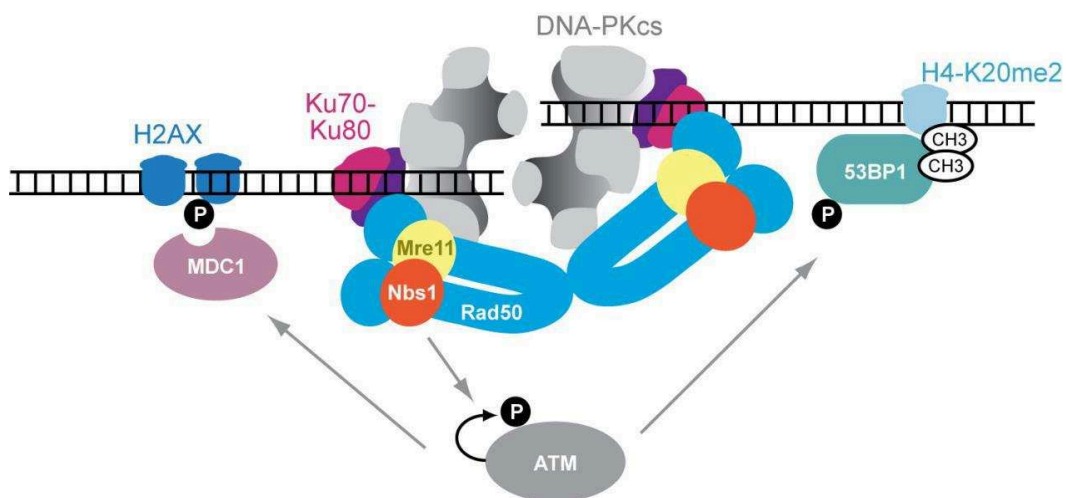


Figure 22 : Protéines impliquées dans la reconnaissance des cassures d'ADN double brin lors de la CSR

Les complexes DNA-PK (DNA-PKcs-Ku70-K80) et MRN (MRE11-NBS1-RAD50) au niveau des cassures de l'ADN et recrutent ATM qui peut alors phosphoryler H2AX, 53BP1 et MDC1. La présence de RAD50 permet aux deux extrémités d'ADN de rester proches et favorise la formation d'une synapse entre deux régions switch (S). D'après Stavnezer et al., 2008

Rouaud et al., 2013). En effet, les souris pour lesquelles plusieurs éléments ou la totalité de la 3'RR ont été invalidés présentent un défaut de CSR et/ou de SHM (Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2010; Rouaud et al., 2013; Saintamand et al., 2016). Ce déficit de CSR peut s'expliquer par l'effet délétère de l'absence de la 3'RR sur la transcription du locus IgH en général et des transcrits germinaux en particulier. En effet, des travaux publiés en 2015, ont montré que la région 3'RR agit sur la transcription germinale initiée à partir des promoteurs germinaux I mais pas sur la phase de réparation (Saintamand et al., 2015).

Cependant, l'absence de SHM est plus complexe à comprendre, la transcription des régions variables n'étant que faiblement diminuée malgré une absence totale de SHM (Rouaud et al., 2013). Cela révèle qu'au-delà de l'effet sur la transcription, la 3'RR pourrait jouer un rôle dans l'organisation tridimensionnelle du locus, facilitant le phénomène de SHM et possiblement, celui de la CSR (Wuerffel et al., 2007). L'hypothèse qui prévaut aujourd'hui pour expliquer l'efficacité des recombinaisons entre la région donneuse S μ et les régions S acceptrices serait celle d'une conformation 3D adaptée dans laquelle les régions S sont maintenues à proximité l'une de l'autre par interaction physique avec la 3'RR (**Figure 21**) (Ju et al., 2007; Wuerffel et al., 2007; Kenter et al., 2012; Thomas-Claudepierre et al., 2016).

• Génération des cassures double brins (DSB)

La transcription des régions S permet d'exposer le brin d'ADN non transcrit à l'action de l'enzyme AID et ceci va initier la création de multiples lésions de l'ADN (pour revue Chaudhuri and Alt, 2004). La dégradation de l'ARN formant une R-loop avec le le brin d'ADN transcrit est ensuite assurée par le RNA exosome (Basu et al., 2011). Cette étape rend ainsi accessible le brin d'ADN transcrit et permettant l'apparition des DSB au niveau des deux régions S (donneuse et acceptrice). Ces DSB sont reconnus par le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) qui vient se localiser au niveau de la cassure, où il recrute et active ATM (pour « Ataxia Telangiectasia Mutated ») (Dinkelmann et al., 2009). ATM phosphoryle ensuite l'histone H2AX (pour « Histone 2A family member X ») et la protéine 53BP1 (pour « p53-Binding Protein 1 »), ce qui aboutit à la formation de foyers de réparation qui vont stabiliser les DSB (**Figure 22**) (Reina-San-Martin et al., 2003, 2004, 2005; Lähdesmäki et al., 2004; Franco et al., 2006; pour revues : Stavnezer et al., 2008; Khan and Ali, 2017).

La réparation des cassures et par conséquent la jonction entre les deux régions S clivées fait appel à la voie de réparation C-NHEJ (pour « Classical Non-Homologous End Joining »). Cependant, l'absence d'un des facteurs impliqués dans cette voie tels que Ku70 diminue

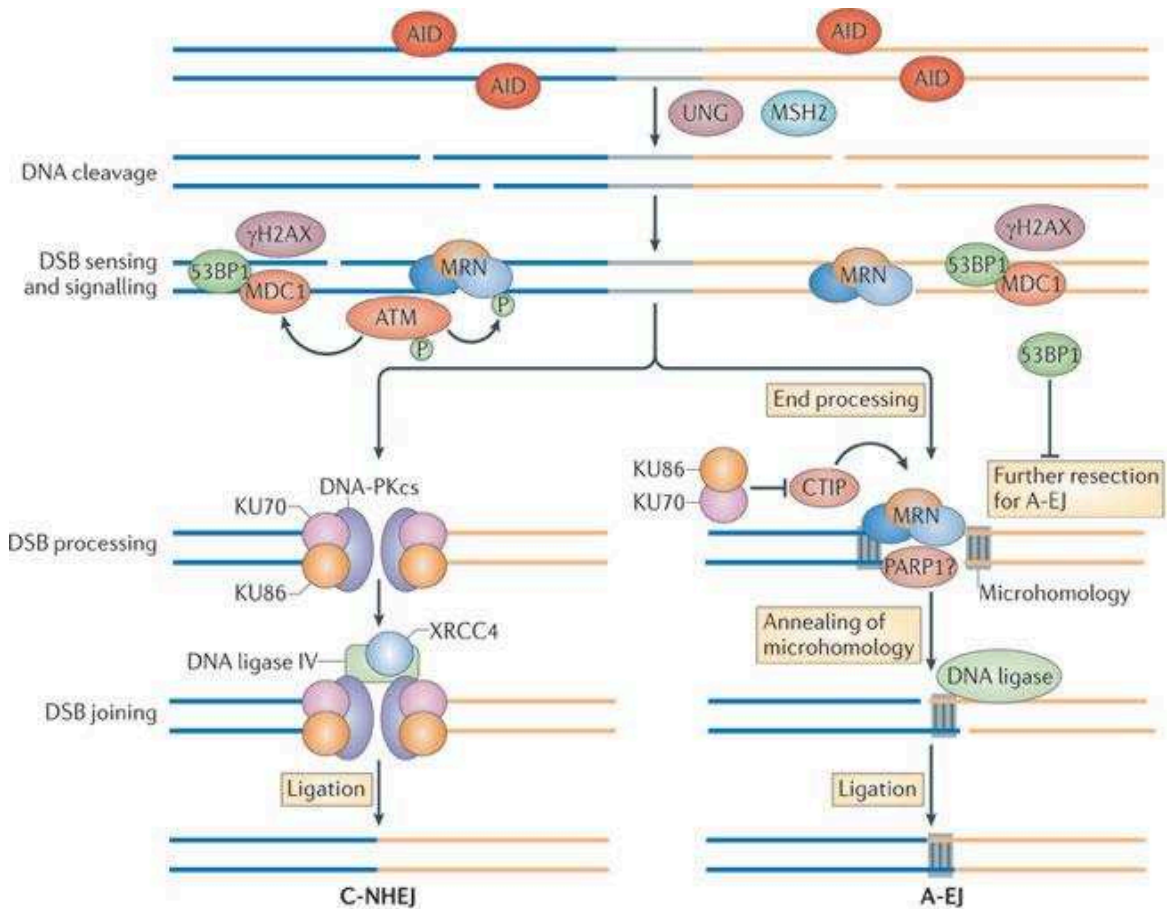


Figure 23 : Résolution des cassures double-brins lors de la CSR

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 par les voies C-NHEJ (gauche du schéma) ou A-EJ (droite du schéma). C-NHEJ: Classical Non Homologous End Joining; A-EJ: Alternative End Joining. D'après Xu et al., 2012

l'efficacité de la CSR mais ne l'abolit pas totalement. Cela suggère que la voie de C-NHEJ peut être suppléée par une seconde voie alternative appelée A-EJ (pour « Alternative End Joining ») (**Figure 23**) (Vaidyanathan et al., 2014). Le complexe MRN, PARP-1 (pour « Poly ADP-Rribose Polymerase I »), XRCC1 (pour « X-ray Repair Cross Complementing Protein 1 ») et les ligases I et III interviendraient dans la voie de l'A-EJ (Audebert et al., 2004; Robert et al., 2009; pour revue Boboila et al., 2012).

• Les modifications de la chromatine

A la liste des éléments permettant le recrutement de l'enzyme AID sur les régions S s'ajoute la régulation épigénétique et l'accessibilité des régions S. En effet, seules les régions S visées par le processus de CSR présentent des marques de chromatine ouverte. Ces régions perdent ainsi les marques d'histone dites « répressives » telles que H3K27me3 au profit de marques « activatrices » (H3ac, H4ac, H3K9ac, H3K4me3, H3K36me3, H3K27ac, ...) (Nambu et al., 2003; Chowdhury et al., 2008; Kuang et al., 2009; Daniel et al., 2010; Pavri et al., 2010; Stanlie et al., 2010; Yamane et al., 2011; Wang et al., 2006, 2009, 2014; pour revues : Li et al., 2013; Vaidyanathan et al., 2014; Zan and Casali, 2015). L'induction concomitante des modifications d'histones et de la transcription germinale suggère une régulation coordonnée de ces deux processus par des facteurs de transcription qui se fixent sur les promoteurs I. De tels facteurs pourraient recruter PTIP (pour « PAX Interaction with Transcription-activation domain Protein ») qui a un rôle crucial dans l'initiation de la transcription germinale et dans la génération de multiples modifications d'histones (H3K4me3, H3K36me3, H3K27ac) dans les régions S (Daniel et al., 2010). D'autres facteurs semblent réguler l'accessibilité des régions S et, il a été montré que le complexe FACT (pour « FAcilitates Chromatin Transcription complex »), la méthyl-transférase SET1 ou bien encore le facteur SPT6 (pour « Suppressor of Ty 6 ») semblent jouer un rôle dans la mise en place du motif activateur H3K4me3 au niveau des régions S (Stanlie et al., 2010; Okazaki et al., 2011; Begum et al., 2012; pour revues : Kenter, 2012; Xu et al., 2012; Kato et al., 2013).

Enfin, il faut souligner l'importance de la marque chromatiniennne inactive H3K9me3 au niveau du recrutement d'AID sur la région donneuse S μ . Cette marque permettrait le recrutement d'AID via une interaction avec les protéines HP1 (pour « Heterochromatin Protein 1 ») et KAP1 (pour « KRAB domain Associated Protein 1 ») (Jeevan-Raj et al., 2011).

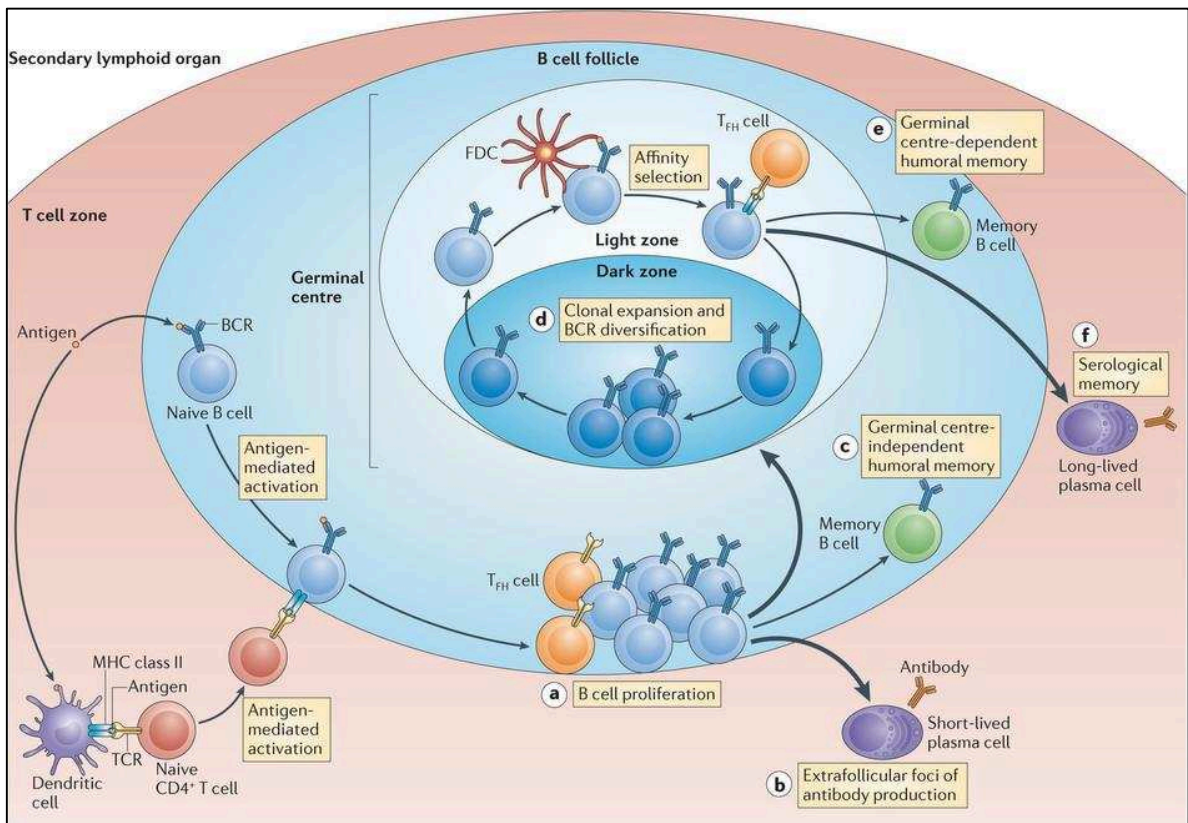


Figure 24 : Principales étapes intervenant dans la différenciation en cellules B mémoires et en plasmocytes

Suite à une stimulation antigénique de type T-dépendante, 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 de ces cellules peut se différencier en plasmocytes à courte durée de vie (**partie b**), donnant lieu à des foyers extrafolliculaires. Une autre partie peut se différencier en cellules B mémoires (**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 centre germinatif (GC) (**partie d**), siège des événements de CSR et de SHM. A la fin de la réaction du GC, les cellules B peuvent se différencier en cellules B mémoires (**partie e**, cellules B mémoires dépendantes du GC) ou en plasmocytes à longue durée de vie (**partie f**). La force des signaux reçus par les cellules B influence leur destin : des signaux forts (flèches épaisses) sont en faveur d'une différenciation en plasmocytes ou en cellules B du GC, tandis que des signaux plus faibles (flèches fines) orienterait vers une différenciation en cellules B mémoires. D'après Kurosaki et al., 2015

5- La différenciation finale : mémoire immunitaire et sécrétion d'anticorps

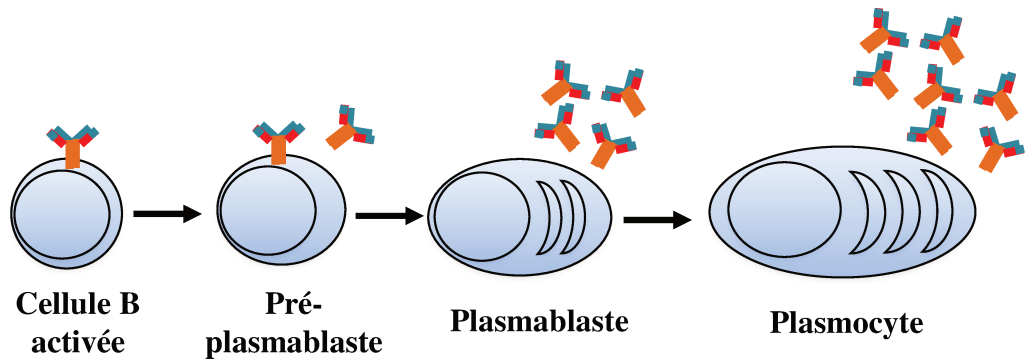
A l'issue de leur différenciation, les lymphocytes B auront deux grands rôles : d'une part la sécrétion d'anticorps pour lutter contre les pathogènes, et d'autre part la mise en place d'une mémoire immunitaire, qui permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une nouvelle rencontre avec le même antigène. Ainsi, les dernières étapes de la lymphopoïèse B sont caractérisées par la génération des **plasmocytes** et des **cellules B mémoires** (pour revues : Shlomchik and Weisel, 2012; Zhang et al., 2016).

i. Les lymphocytes B mémoires

Les lymphocytes B mémoires sont générés lors d'une réponse immunitaire primaire (1^{ère} rencontre avec l'antigène) et vont jouer un rôle très important lors de la réponse secondaire (2^{ème} rencontre avec le même antigène). Ces cellules sont capables de se différencier rapidement en plasmocytes et permettent ainsi une réponse plus rapide et efficace lors d'une nouvelle stimulation antigénique (Dogan et al., 2009; Good-Jacobson and Shlomchik, 2010; pour revues : Shlomchik and Weisel, 2012; Zhang et al., 2016).

Chez l'Homme, la plupart des lymphocytes B mémoires expriment un marqueur de surface, appartenant à la famille des récepteurs TNF (pour « Tumor Necrosis Factor »): le CD27 (Klein et al., 1998; Tangye et al., 1998). Néanmoins, aucun marqueur spécifique caractérise les B mémoires de souris, bien que des études suggèrent que les phénotypes CD38^{low} et CD38^{high} sont représentatives des cellules B du GC et des cellules B mémoires respectivement (Ridderstad and Tarlinton, 1998; Xiao et al., 2004). Plus récemment, de nombreuses études ont montré que plusieurs marqueurs incluant CD38, CD73, CD80 et PD-L2 aient été proposés pour définir au moins cinq sous-ensembles de cellules B mémoires (Anderson et al., 2007; Tomayko et al., 2010; Conter et al., 2014; Zuccarino-Catania et al., 2014).

La génération des cellules B mémoires de souris se fait au sein des GC, suite à une réponse antigénique de type T-dépendante (**Figure 24**). Ces cellules sont sélectionnées sur leur capacité à résister à l'apoptose, après une sélection positive dans le GC. En effet, il a été démontré que l'expression renforcée du transgène Bcl2 (pour « B cell lymphoma 2 ») qui est 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



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

Figure 25 : Caractéristiques principales de la différenciation des cellules B en 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). Adaptée d'après Nutt et al., 2015

demeure inchangé (Smith et al., 2000). Ce même modèle de surexpression de Bcl2 et d'autres études ont permis de mettre en évidence que les plasmocytes expriment des Ig de plus haute affinité que celles des LB mémoires (Smith et al., 2000; Phan et al., 2006; Kräutler et al., 2017). Dans ce sens, les résultats de l'équipe de Robert Brink ont permis de voir que seules les cellules B présentant la meilleure affinité possible peuvent se différencier en plasmocytes (Phan et al., 2006) et, que cette différenciation est complétée par les cellules Tfh (Kräutler et al., 2017).

ii. Les plasmocytes

La réponse humorale repose sur la sécrétion d'anticorps par les plasmocytes (PC : « Plasma Cells » ou ASC : « Antibody Secreting Cells »). Ces cellules représentent le stade final de la différenciation et la maturation des lymphocytes B. Elles sont responsables de la sécrétion massive des Ig et présentent une grande taille, ainsi qu'un réticulum endoplasmique (RE) développé. Les PC sont caractérisés par l'expression du marqueur CD138 (appelé aussi « syndecan 1 ») et n'expriment généralement plus les marqueurs B-spécifiques (B220 et CD19) (**Figure 25**) (Smith et al., 1996). Leur programme transcriptionnel diffère également de celui des lymphocytes B (cf chapitre 1 § 5-iii).

Les PC forment une population hétérogène de cellules à durée de vie longue ou courte. Les plasmocytes à longue durée de vie proviennent de la différenciation de LB activés ayant subi les processus des recombinaisons secondaires (CSR et SHM) au sein du GC. Ces derniers vont migrer dans la moelle osseuse et assurer la sécrétion d'Ig à long terme (pour revue Oracki et al., 2010). La capacité des LB à se transformer en un type spécifique de PC est influencée par la nature de l'antigène, l'environnement et les sous-populations de cellules B dont elles sont issues. Par exemple, les cellules B de la zone MZ semblent prédisposées à se différencier en PC à courte durée de vie, indépendamment de l'aide des lymphocytes T (Oliver et al., 1997; Gunn and Brewer, 2006).

Les PC à courte durée de vie également appelés plasmablastes (PB pour « Plasmablasts ») se situent principalement dans la rate, les ganglions lymphatiques, la lamina propria, le sang et les sites inflammatoires (pour revue Nutt et al., 2015). Les PB expriment le marqueur plasmocytaire CD138 à leur surface et présentent encore différents marqueurs du lignage B y compris le BCR, les molécules de co-stimulation comme CD80/86 et le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII) (**Figure 25**) (pour revue Oracki et al., 2010). Ce stade cellulaire précède le stade de plasmocyte mature et il correspond à un niveau intermédiaire entre la cellule B et le plasmocyte. La stimulation des cellules B in vitro déclenche la

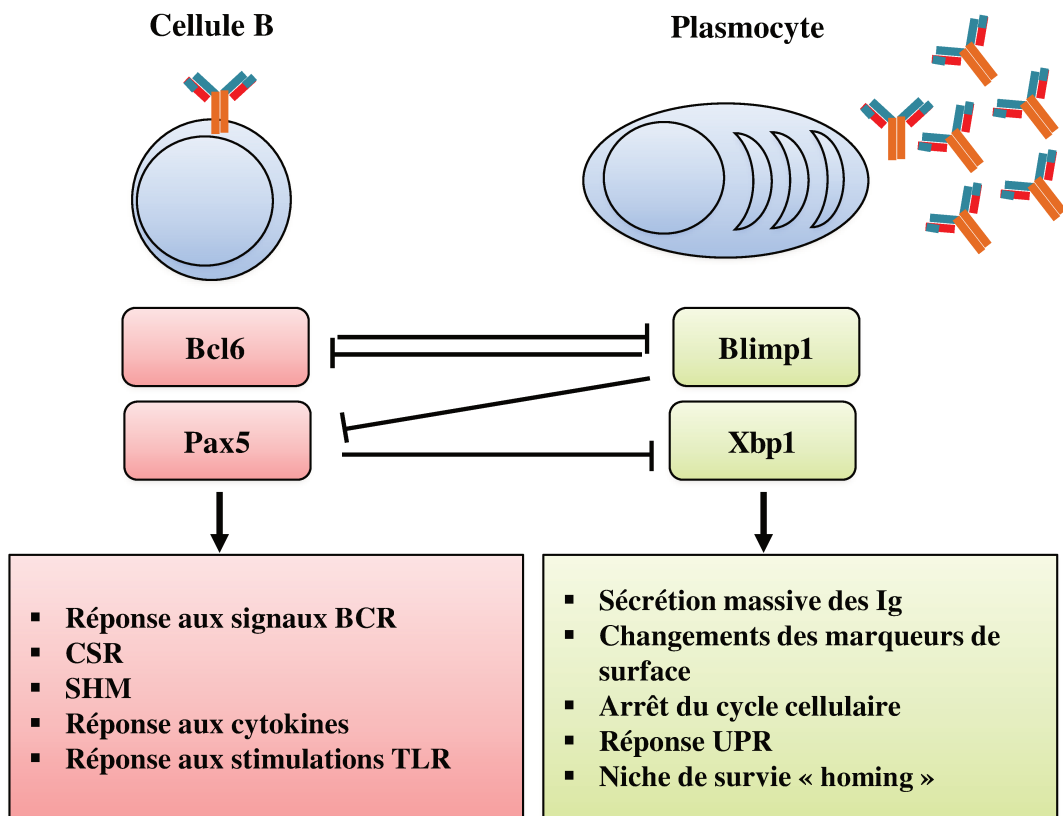


Figure 26 : Modifications transcriptionnelles lors de la différenciation plasmocytaire

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 maintien 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 vert), tout en inhibant les principaux marqueurs B et du centre germinatif (encadré rose). Adaptée d'après Shapiro-Shelef M et Calame.K, 2005

prolifération rapide et l'apparition des PB à courte durée de vie (Hasbold et al., 2004; pour revue Tangye and Hodgkin, 2004). La fréquence de division de ces cellules plasmablastiques est dépendante de la nature du mitogène et l'environnement cytokinique. Les Interleukines 5 et 21 (IL-5 et IL-21) sont des activateurs puissants de la formation des PB (Ettinger et al., 2005; Bryant et al., 2007).

iii. Le programme transcriptionnel impliqué au cours de la différenciation plasmocytaire

La différenciation plasmocytaire dans les GC est un mécanisme hautement contrôlé, qui passe par une combinaison de signaux fournis par les différents acteurs du GC (les FDC, les TFH) mais aussi par la présence d'un signal BCR de faible intensité (Lechouane et al., 2013).

Au niveau transcriptionnel, la perte de l'identité B est principalement provoquée par la diminution drastique de l'expression du facteur de transcription Pax5 (pour « paired-box gene 5 ») (Nera et al., 2006). A l'inverse, l'induction du facteur de transcription Blimp-1 joue un rôle majeur dans l'acquisition de l'identité plasmocytaire. Ces deux facteurs de transcription sont connus pour s'exclure mutuellement et, la différenciation plasmocytaire dépendra donc de la balance entre ces deux programmes (**Figure 26**).

Blimp-1 est un facteur de transcription en doigt de zinc codé par le gène *prdm1*. L'inactivation de Blimp-1 chez la souris provoque une diminution très marquée du nombre de plasmocytes (Shapiro-Shelef et al., 2003; Savitsky and Calame, 2006). Blimp-1 favorise la différenciation plasmocytaire en réprimant les gènes *c-myc*, *Bcl6* (régulateur négatif de la différenciation plasmocytaire) ou *Pax5* (**Figure 26**) (Lin et al., 1997, 2002; Shaffer et al., 2002; pour revue Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Malgré son importance, Blimp-1 n'est pas indispensable pour l'engagement initial de la différenciation plasmocytaire (Kallies et al., 2007). En effet, une quantité non négligeable d'Ig est retrouvée dans le sérum des souris *Rag1^{-/-}* reconstituées par des cellules B *Blimp-1^{-/-}*. Ces cellules différenciées en PB ont également un programme transcriptionnel similaire à celui trouvé des PC, à savoir une disparition de *Pax5* et 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 1 ») et des transcrits IgH sécrétés. Ces résultats ont permis de proposer que l'élément primaire de la

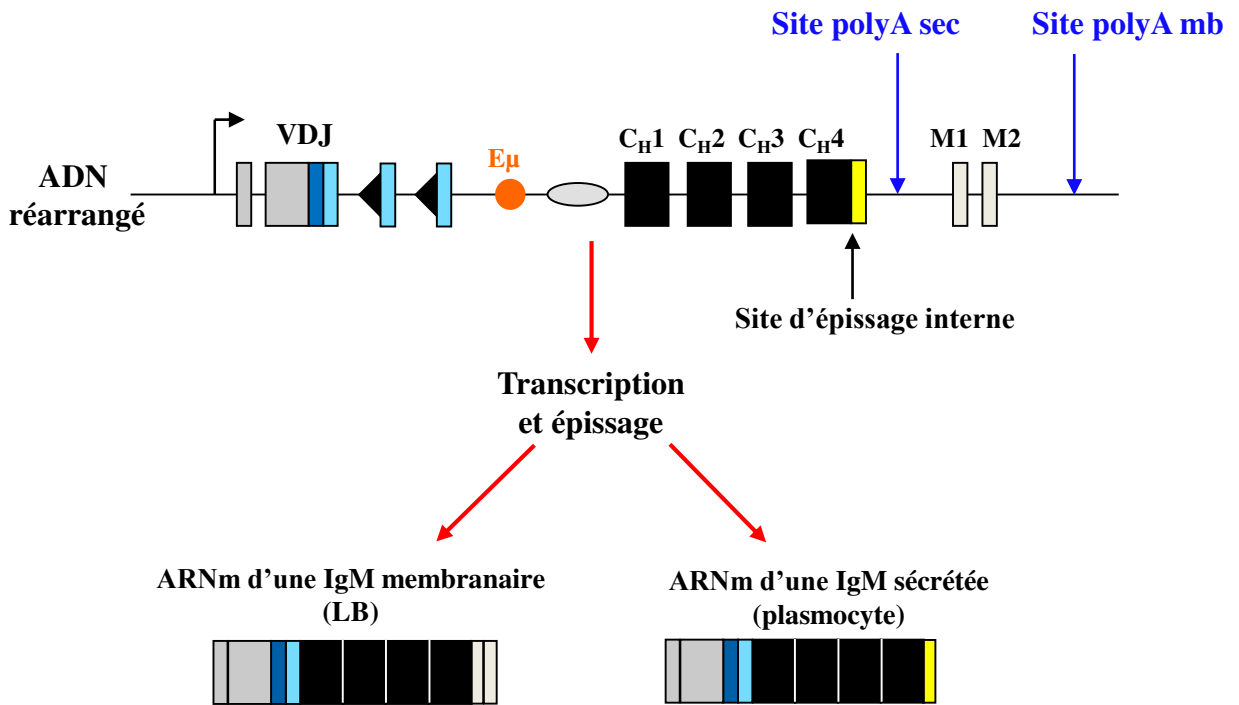


Figure 27 : De la forme membranaire à la forme sécrétée, exemple d'une IgM

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 (poly (A)) utilisé dans ce cas est situé après les domaines transmembranaires (M1 et M2). Les plasmocytes quand à eux, produisent essentiellement des Ig sécrétées ou anticorps. Dans le cas de l'IgM, le site d'épissage interne au C_H4 n'est pas utilisé, le transcrite comprend ainsi la dernière partie de cet exon (C_H-S représentée en jaune) et utilise le site de poly (A) situé directement en aval. Dans tous les cas, la spécificité de l'anticorps (région VDJ) reste identique. Adaptée d'après Lefranc et al., 1999

différenciation plasmocytaire n'est pas l'expression de Blimp-1 mais plutôt l'inhibition de la fonction de Pax5.

Xbp-1 est également un acteur majeur de la différenciation plasmocytaire, il est impliqué dans la réponse UPR (pour « Unfolded Protein Response », voir chapitre 1 § 6), contribuant ainsi à l'augmentation de la capacité de production d'anticorps (Reimold et al., 1996; Shaffer et al., 2004). 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 études plus récentes 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.

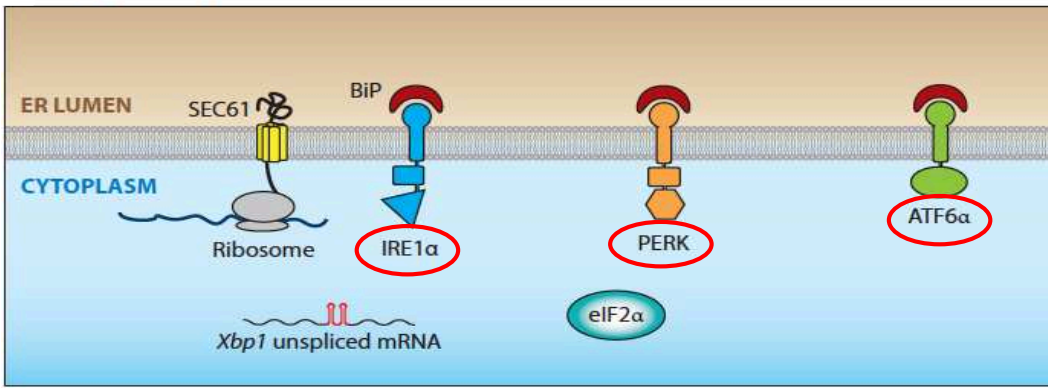
Il a été démontré que le facteur d'élongation de la transcription ELL2 (pour « Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia protein 2 »), induit par Blimp-1 (Shaffer et al., 2004), participe au passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig (Martincic et al., 2009; Minnich et al., 2016). Ce changement résulte d'un épissage alternatif du transcrit primaire IgH consécutif à une modification du site de polyadénylation (**Figure 27**). 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'ARN pol II (pour « RNA polymerase II ») au niveau du promoteur IgH dans les plasmocytes. Ainsi, le recrutement de ce facteur de clivage sur l'ARN pol 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).

Blimp1 permet une forte expression des Ig en induisant également l'expression de Irf4 (pour « Interferon Regulatory Factor-4 ») qui active les enhanceurs des loci IgL (κ et λ) et Xbp-1 (Kallies et al., 2004; Sciammas and Davis, 2004). IRF4 est capable d'induire ce dernier, afin de favoriser l'expansion du RE (Shaffer et al., 2004; Hu et al., 2009).

6- La réponse UPR et la production des Ig

La sécrétion massive d'anticorps engendre également une accumulation de protéines mal repliées au niveau du RE. Ce stress protéique est détecté, chez les mammifères, par le

A. Unstressed ER



B. Stressed ER

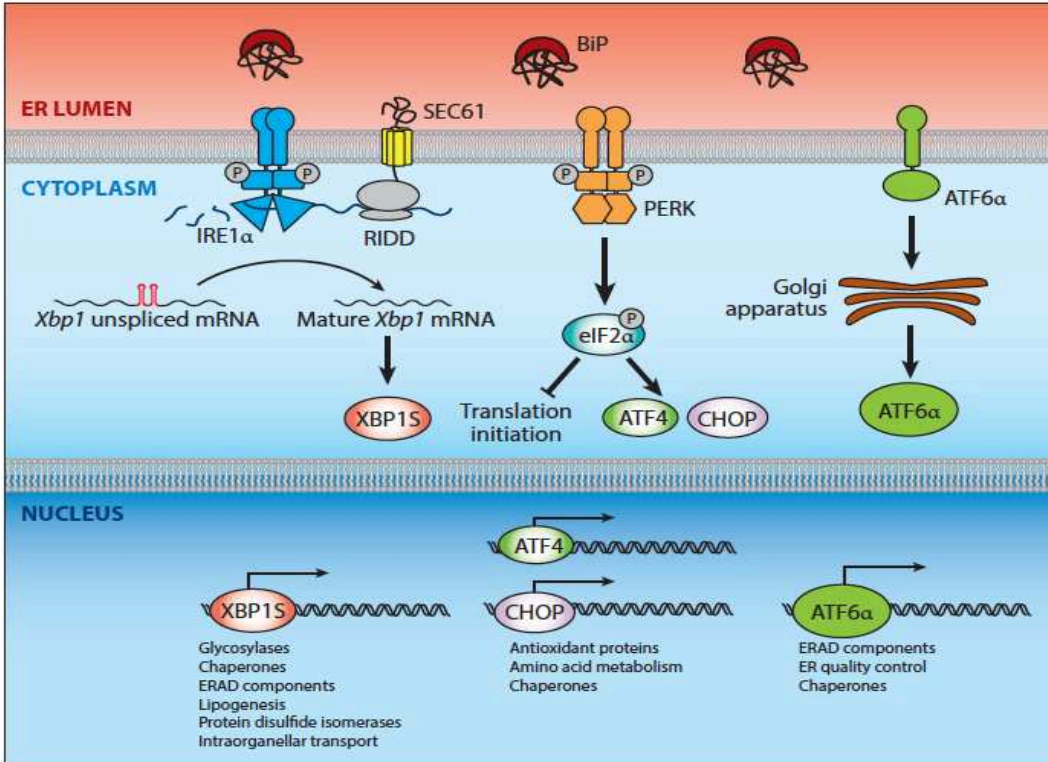


Figure 28 : Activation de l'UPR (« unfolded protein response ») lors d'un stress du réticulum endoplasmique (RE)

La réponse aux protéines mal repliées (réponse UPR) implique trois voies principales: IRE1, PERK et ATF6. Dans les cellules non stressées (**partie A**), ces molécules s'associent avec la protéine chaperonne BiP, et les protéines sécrétoires et transmembranaires sont traduites directement dans le RE via le translocon SEC61. 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 26 nt de l'ARNm de Xbp1, générant une forme courte (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 ; non représentées). 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 α . 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 (**partie B**). ERAD: ER Associated Degradation; SEC61: Super Elongation Complex 61. D'après Bettigole et Glimcher, 2015

domaine luminal de trois protéines transmembranaires du RE : IRE1 (pour « Inositol-Requiring Enzyme 1 »), PERK (pour « RNA-dependent protein kinase (PKR)-like Endoplasmic Reticulum (ER) Kinase ») et ATF6 (pour « Activating transcription factor 6 »). Ces trois acteurs sont capables de déclencher, via leur domaine cytoplasmique, les différentes voies de signalisation de l'UPR (**Figure 28**) (pour revues : Hetz, 2012; Bettigole and Glimcher, 2015; Martins et al., 2016).

L'activation de l'UPR permet de résoudre le stress du RE en diminuant de la charge protéique entrant dans le RE, en renforçant la capacité de repliement des protéines et, en augmentant la dégradation des protéines mal repliées par la voie ERAD (pour « ER Associated Degradation ») et par le mécanisme de l'autophagie (cf chapitre 1 § 7-i). Si le stress du RE reste insurmontable, la réponse UPR conduit à l'induction de l'apoptose (Harding et al., 2002; Gass et al., 2004; Janssens et al., 2014).

- **La voie IRE1 α**

IRE1 α est une endonucléase qui permet de détecter les protéines mal repliées dans la lumière du RE. Sa partie cytoplasmique comprend un domaine kinase et un domaine à activité endoribonucléase (Tirasophon et al., 1998). Dans les conditions normales, IRE1 est associée à la protéine chaperonne réticulaire BiP (pour « Binding immunoglobulin Protein ») encore appelée GRP78 (pour « 78 kDa Glucose-Regulated Protein »). La liaison de BiP au domaine luminal d'IRE1 la maintient inactive en l'empêchant de former des structures dimériques et oligomériques. L'accumulation de protéines mal repliées dans le RE entraîne la dissociation de la chaperonne BiP afin de prendre en charge ces protéines anormales. L'activation d'IRE1 dépend de cette dissociation (Oikawa et al., 2009) et son activité RNase favorise l'excision de 26 nucléotides de l'ARNm codant pour XBP1. Cet « épissage » non conventionnel crée un décalage du cadre de lecture et aboutit à la production d'une forme courte 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 (Calfon et al., 2002; He et al., 2010). Xbp1-s est un activateur transcriptionnel qui joue un rôle très important dans l'activation d'une grande variété de gènes cibles de l'UPR, ainsi que les gènes impliqués dans le mécanisme ERAD. 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 α . D'une façon intéressante, IRE1 α est capable de contrôler son expression en clivant son propre ARNm (Tirasophon et al., 1998). En effet, il est possible que l'expression d'*Irela* soit limitée en raison d'un processus d'autorégulation spécifique. Cette autorégulation rigoureuse de la synthèse d'IRE1 α est nécessaire pour la survie cellulaire, puisque sa surproduction entraîne une activité constante et continue de la réponse UPR et un retard de la croissance cellulaire (Shamu and Walter, 1996; Tirasophon et al., 1998).

• La voie PERK

Les protéines transmembranaires **PERK** et IRE1 se ressemblent en ce qui concerne leur organisation en domaines fonctionnels. Les domaines luminaux de ces deux senseurs sont d'ailleurs expérimentalement interchangeables (Bertolotti et al., 2000). PERK possède un domaine cytoplasmique à activité sérine/thréonine kinase, similaire au domaine kinase de la PKR (pour « Protein Kinase R ») (Harding et al., 1999).

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 α (pour « eukaryotic translation initiation factor 2 α »). Cette phosphorylation au niveau de la Serine 52 permet de diminuer globalement la traduction protéique (Harding et al., 1999, 2000a). 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 α d'eIF2 (**Figure 28**) (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).

La voie PERK est réprimée dans les plasmocytes qui synthétisent des grandes quantités d'Ig (Ma et al., 2010). Si la réponse UPR ne parvient pas à résoudre le mauvais repliement des protéines, c'est la voie PERK médiée par CHOP, qui va être activée conduisant à l'apoptose (Ron and Habener, 1992; Ma et al., 2002). 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

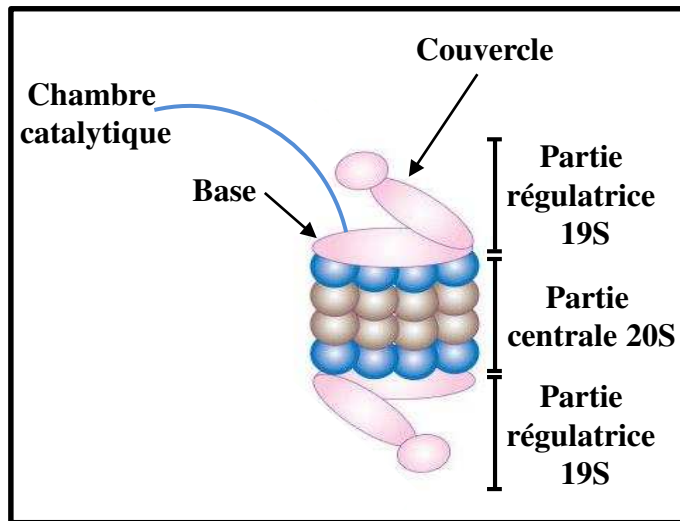


Figure 29 : Structure du protéasome 26S

Le protéasome 26S est composé d'une particule centrale 20S qui contient l'activité catalytique et d'une particule régulatrice subdivisée en une base surmontée d'un « couvercle » qui permet l'ouverture de la chambre catalytique et la reconnaissance du substrat ubiquitinylé. Adaptée d'après Boccadoro et al., 2005

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 α , ce qui favorise la synthèse protéique (Novoa et al., 2001). La synthèse de protéines durant la période de stress active 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). L'expression de DR5 est maintenue dans les PC de souris générés lors d'une réponse immunitaire T-dépendante, ainsi que dans les PC humains, et l'inhibition de ce récepteur limite leur entrée en 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 (**Figure 29**) des cellules des mammifères, est utilisé couramment dans le traitement du Myélome Multiple (MM) (pour revue Moreaux et al., 2012). En inhibant la dégradation de I κ B (pour « Inhibitor of kappa B »), cette molécule bloque l'activation de NF- κ 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, une étude récente menée par notre laboratoire, a mis en évidence une sensibilité accrue au bortézomib des plasmocytes exprimant une chaîne lourde d'Ig aberrante, dépourvue du domaine C_{H1} (Bonaud et al., 2015).

Nous verrons dans la partie Annexe de cette thèse, que l'accumulation des Ig tronquées produites par saut d'exon induit un stress UPR terminal et active l'apoptose via le facteur pro-apoptotique Chop (Srouf et al., 2016 : cf Annexe 1).

- **La voie ATF6**

La voie **ATF6** est aussi impliquée en réponse à l'accumulation des protéines mal repliées dans le RE. En absence de stress protéique, ATF6 est localisé à la membrane du RE

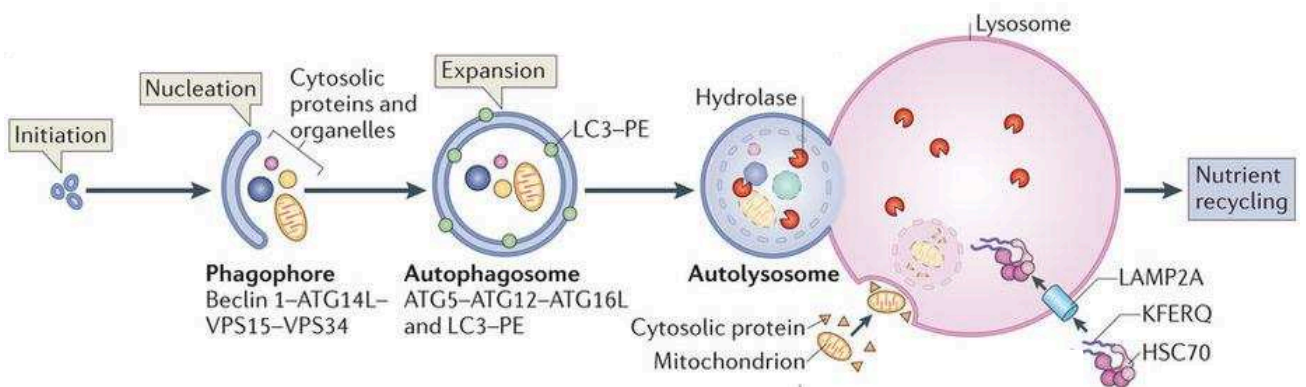


Figure 30 : Représentation schématique du mécanisme d'Autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation cellulaire multi-étapes impliquant au moins quatre phases principales. Ces phases sont contrôlées par plus de 30 protéines ATG (pour Autophagy-Related genes) et médiées par deux systèmes de conjugaisons de type ubiquitine : Atg12-Atg5 et Atg8/LC3. Les 4 phases sont : « l'initiation », « l'expansion et la complétion des vésicules », « la maturation et la fusion », et la « dégradation ultime de la membrane et de son contenu dans des lysosomes ». D'après Kaur et Debnath, 2015

en liaison avec la protéine chaperonne BiP. La dissociation de BiP du domaine luminal d'ATF6 démasque son signal d'adressage à l'appareil de Golgi et permet son trafic vers celui-ci dans des vésicules COPII (pour « Coat Proteins type II ») (Shen et al., 2002; Nakanaka et al., 2004). La partie cytoplasmique d'ATF6 est ensuite clivée par deux enzymes résidentes de l'appareil de Golgi, S1P et S2P (pour « Site-1 or Site-2 Proteases ») (Li et al., 2000). Les deux formes, ATF6 α et ATF6 β , générées après clivage passent ensuite dans le noyau et activent les gènes cibles parmi lesquels figurent BiP, Chop et Edem1 (pour « ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like protein 1 ») (**Figure 28**).

En résumé, les trois senseurs de stress du RE : IRE1, PERK et ATF6 partagent un même régulateur, la chaperonne réticulaire BiP. Malgré la remise en question d'une activation directe des voies d'IRE1 α et de PERK, et éventuellement d'ATF6 par les protéines mal repliées, il est admis que BiP ne peut pas être le seul régulateur de l'activation des trois voies de la réponse UPR. En effet, il a été montré que non seulement la cinétique mais également l'ordre d'activation de ces 3 voies dépend de l'agent inducteur du stress du RE. Ainsi, l'activation sélective des trois voies ne semble pas reposer uniquement sur des affinités différentielles entre la chaperonne BiP et les senseurs de l'UPR (DuRose et al., 2006).

7- Autophagie, UPR et différenciation plasmocytaire

i. Le mécanisme d'Autophagie (« self-eating »)

L'autophagie (du grec « se manger soi-même ») est un processus catabolique qui conduit à la dégradation de constituants cytoplasmiques dans les lysosomes (ou vacuole chez la levure et les plantes). L'autophagie a aussi une fonction de recyclage, car les métabolites issus de la dégradation lysosomiale sont recyclés vers le cytoplasme, où ils sont réutilisés dans le métabolisme cellulaire (**Figure 30**). Un niveau basal d'autophagie est nécessaire au maintien du « turn-over » des protéines et organites cellulaires. Diverses conditions de stress activent des voies de signalisation menant à l'activation de l'autophagie qui, généralement, contribue à rétablir l'homéostasie cellulaire. Malgré l'identification des acteurs impliqués dans l'autophagie, l'aspect mécanistique de ce processus reste incomplètement caractérisé.

Il existe plusieurs types d'autophagie qui diffèrent par la façon dont les constituants cytosoliques sont délivrés dans les lysosomes :

(1) La macroautophagie se traduit par la séquestration des constituants cytoplasmiques dans des vésicules à double membrane, les autophagosomes, qui vont fusionner avec les lysosomes (pour revue Klionsky and Codogno, 2013). Ce type d'autophagie permet de dégrader un large ensemble de « substrats » incluant des agrégats protéiques, des organites entiers ou des pathogènes intracellulaires.

(2) L'autophagie médiée par les chaperonnes consiste en la translocation de protéines cytosoliques dans les lysosomes, avec l'assistance de la chaperonne cytosolique Hsp70 (pour « Heat shock protein 70 »), via un canal formé dans la membrane lysosomale par l'oligomérisation de la protéine transmembranaire LAMP-2A (pour « Lysosome-associated membrane protein 2A ») (pour revue Dice, 2007).

(3) La microautophagie consiste en la délivrance de « substrats » dans les lysosomes directement par invagination de la membrane de ce compartiment (pour revues : Mijaljica et al., 2011; Li et al., 2012).

La caractérisation des mécanismes moléculaires de l'autophagie a débuté il y a moins d'une quinzaine d'années avec l'identification des protéines ATG (pour « AuTophagy-related ») par « screening » génétique chez la levure. A ce jour on compte plus de 30 protéines ATG chez la levure, dont la majorité est conservée chez les mammifères.

ii. L'Autophagie et la réponse UPR

Au cours de la réponse UPR, le RE subit une expansion pour s'adapter à une importante synthèse d'Ig et pour répondre à la demande accrue en membrane imposée par l'activité sécrétoire des PC. La réticulophagie (ou « autophagie du RE »), outre son rôle dans la dégradation des protéines du RE, est importante dans le maintien de l'homéostasie de ce compartiment car elle permet de réajuster sa taille, une fois le stress du RE résolu (pour revue Bernales et al., 2006).

Les trois voies de la réponse UPR, IRE1, PERK, et ATF6, activées lors d'un stress du RE, semblent activer l'autophagie. En effet, en réponse à l'hypoxie, l'activation de PERK entraîne la transcription des gènes codant deux protéines de l'autophagie LC3 (pour « Light Chain 3 ») et Atg5 via l'action respective des facteurs de transcription Atf4 (pour « Activating transcription factor 4 ») et Chop sélectivement traduits (Rouschop et al., 2010).

Plusieurs études ont mis en évidence un « cross-talk » entre l'autophagie et la réponse au stress du RE (Yorimitsu et al., 2006; Kawakami et al., 2009; Senft and Ronai, 2015). Dans ce sens, il a été démontré que la voie IRE1 α est nécessaire à l'activation de l'autophagie (Ogata et al., 2006) et que les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en IRE1 α 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).

iii. L'Autophagie et la différenciation plasmocytaire

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^{f/f} 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).

Autour de cette thématique, nous avons développés au laboratoire des projets qui consistent à évaluer l'effet des Ig tronquées sur l'activation de l'autophagie. Nous supposons que les cellules B et PC survivants chez les souris produisant des Ig tronquées pourraient activer l'autophagie comme un moyen de survie et pour limiter le stress dû à la production de ces protéines mal repliées par les cellules plasmocytaires (cf Résultats, Article 2).

8- Dyscrasies des plasmocytes

La prolifération anormale des PC est une situation assez fréquente observée chez environ 5% de la population âgée (>50 ans) (Dispenzieri et al., 2010). Les formes malignes des

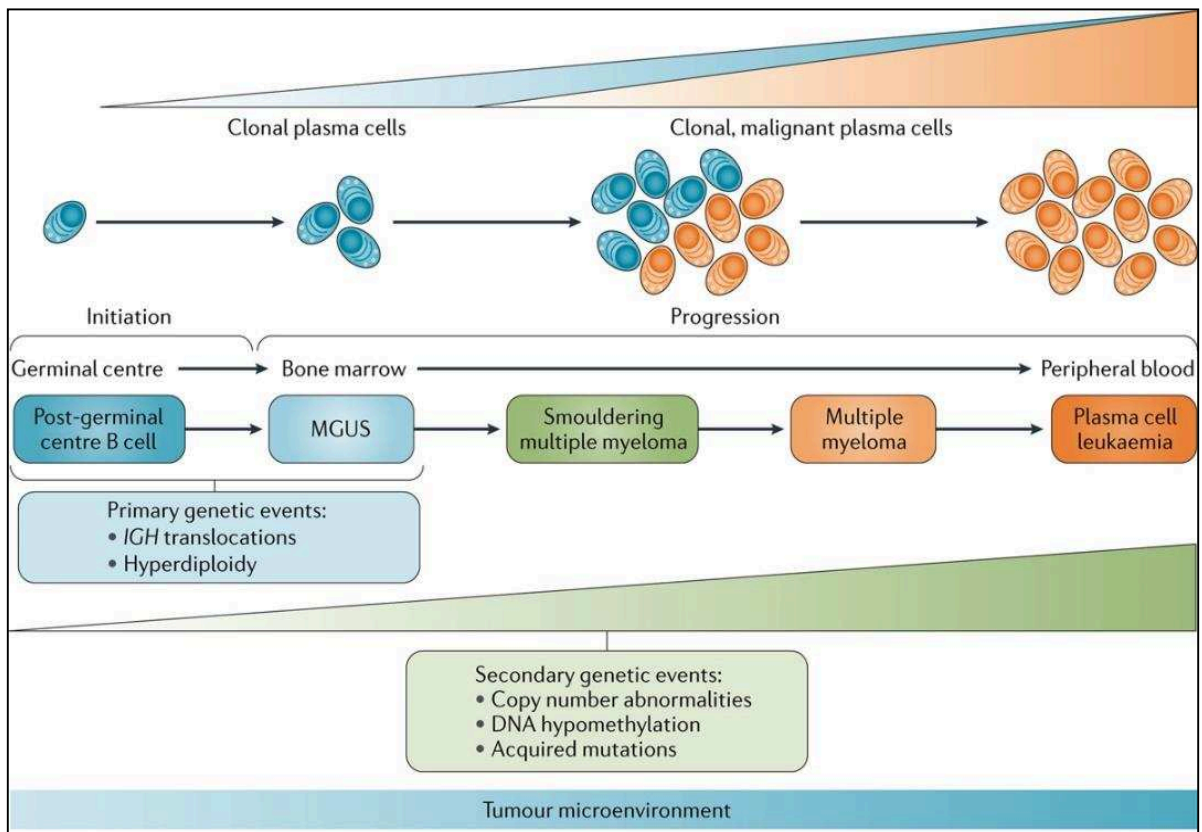


Figure 31 : Le développement du Myélome Multiple (MM)

Le développement du myélome multiple (MM), à partir d'une cellule B post-GC, est un processus multi-étapes commençant le plus souvent par des stades indolents nommés MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) et SMM (Smoldering Multiple Myeloma). La progression vers un MM se traduit par une accumulation importante de clones plasmocytaires dans la moelle osseuse et l'apparition de signes cliniques (douleurs osseuses...). A un stade très avancé de la maladie, le MM peut évoluer vers une leucémie plasmocytaire et une prolifération extramédullaire du clone tumoral. Les remaniements génétiques fréquemment retrouvés dans les cellules de MGUS, SMM et MM incluent des translocations chromosomiques impliquant les gènes de chaînes lourdes d'Ig (IgH) et l'hyperdiploïdie. Le nombre d'altérations génétiques secondaires augmente au cours de la progression du MGUS vers le MM. D'après Kumar et al., 2017

dyscrasies plasmocytaires sont en revanche plus rares et concernent, par ordre de fréquence, le myélome multiple (MM), la leucémie plasmocytaire et la macroglobulinémie de Waldenström.

i. Le Myélome Multiple (MM)

Le MM est un cancer des plasmocytes, actuellement incurable, caractérisé par la présence des clones tumoraux dans les niches de la moelle osseuse. Le MM représente environ 1% de tous les cancers et 13% de toutes les hémopathies malignes (Röllig et al., 2014). Chez presque tous les patients atteints de MM, la maladie est caractérisée par un taux élevé de la sécrétion d'Ig monoclonales. 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). 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 semblent impliqués, la cause de ce cancer reste jusqu'ici méconnue. Le MM est généralement précédé par une tumeur bénigne nommée gammopathie monoclonale de signification indéterminée ou MGUS (pour « Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance »), présente chez 1% des adultes de plus de 25 ans (**Figure 31**) (Röllig et al., 2015; pour revue Kumar et al., 2017). Le MGUS est caractérisé par la présence d'un pic d'Ig monoclonal dans le sérum, mais il est impossible d'empêcher sa progression ou de prédire quand la progression vers un MM se produira. Les Ig monoclonales sécrétées par les cellules de MGUS ou de MM sont par ordre décroissant : IgG > IgA > chaînes légères seules > IgD > IgM et exceptionnellement des 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). En effet, les atteintes rénales apparaissent fréquemment suite aux dépôts d'Ig monoclonales (Hutchison et al., 2012). Les cellules de myélome sont principalement de type post-GC et présentent un taux élevé de SHM et une grande proportion d'évènements de CSR. En effet, seulement 1% des cellules de MM sont de type IgM (Kuehl and Bergsagel, 2012).

Comme les plasmocytes sains à longue durée de vie, les cellules de MM ont subi de nombreux évènements induisant des cassures de l'ADN : les recombinaisons V(D)J, les hypermutations somatiques 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 translocations qui favorisent le développement tumoral. L'instabilité génomique apparaît dès les premières étapes du développement du MM

et augmente avec la progression de la maladie (**Figure 31**). 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 »), 16q23 (c-maf), 20q11 (mafB) et 6p21 (la cycline D3), (Facon et al., 2001; pour revue Bergsagel and Kuehl, 2001; Avet-Loiseau et al., 2007; Walker et al., 2013; Mikulasova et al., 2017). D'autres translocations impliquent les loci de chaînes légères, IgL λ (22q11) et IgL κ (2p12); elles sont moins fréquentes et moins étudiées.

Les premiers médicaments utilisés pour traiter le 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 (prednisone 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 »). Ces dernières années ont vu l'apparition d'une nouvelle molécule prometteuse dans le traitement du MM : le bortézomib. Cette molécule a une tolérance acceptable et peut être utilisée 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™), l'ONX-912, l'ixazomib (MLN-978), le marizomib, et le delanzomib (CEP-18770) (Metcalf et al., 2014; Ria et al., 2014; Röllig et al., 2015; Richardson et al., 2017).

Les progrès thérapeutiques tels que les greffes de moelle osseuse et les médicaments tels que le bortézomib et le lénalidomide ont amélioré le pronostic, mais la plupart des patients rechutent finalement. Cela a conduit à la recherche de nouvelles cibles dans la pharmacothérapie. L'une de ces cibles est la glycoprotéine CD38 que l'on trouve sur les cellules

Chapitre 1. La Lymphopoïèse B

de MM. Dans ce sens, le Daratumumab (Darzalex®), qui est un anticorps monoclonal IgG1 κ humain, se lie à l'épitope unique de CD38 et provoquait la mort des cellules tumorales exprimant CD38 (de Weers et al., 2011). Des nouveaux essais précliniques ont montré que le Daratumumab provoquait la mort des cellules de MM par des mécanismes multiples, y compris la phagocytose cellulaire dépendante d'Ac et l'apoptose (de Weers et al., 2011; Overdijk et al., 2015, 2016).

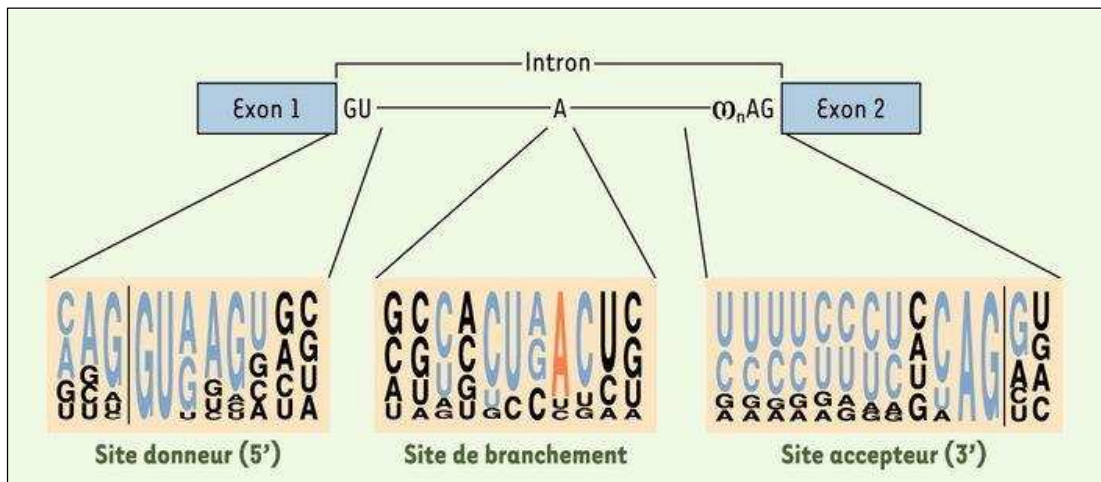
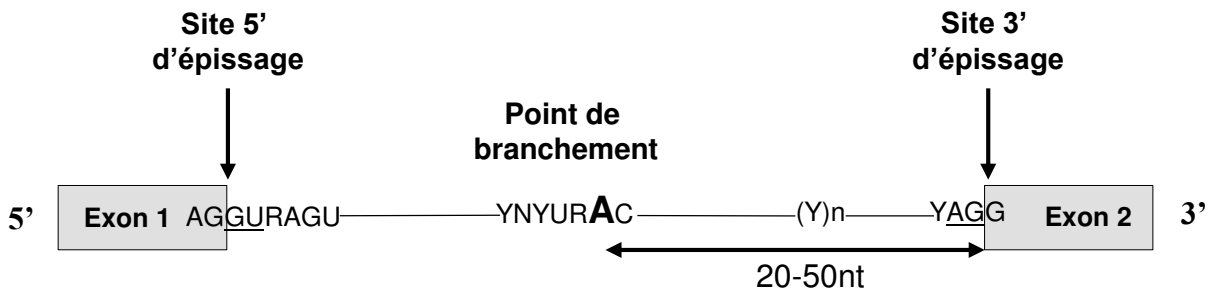


Figure 32 : Les séquences consensus impliquées dans l'épissage

Emplacement des séquences consensuelles au niveau des sites d'épissage situés en 5' (donneur) et 3' (accepteur), et du site de branchement intronique. À noter la présence de nucléotides invariants introniques : GU et AG (soulignés ou bleu), respectivement pour les sites 5' et 3' et, A (gras ou rouge) correspond au point de branchement. La distance optimale entre celui-ci et le site 3' d'épissage est indiquée. **Y**: pyrimidines: C, U ; **N**: A, C, G, U ; **R**: purines: A,G. Adaptée d'après Pozzoli et Sironi, 2005; et Houdayer et Stoppa-Lyonnet, 2005)

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

1- Epissages des ARN pré-messagers (« Splicing »)

Il existe trois types d'ARN polymérase (« ARN pol ») qui interviennent dans la synthèse d'ARN : (1) l'ARN pol I pour les ARN ribosomiques transcrits dans le nucléole (28S, 18S et 5,8S) (Werner et al., 2009), (2) l'ARN pol II pour les pré-ARNm (pour revue Plaschka et al., 2016) et (3) l'ARN pol III pour les ARN de transfert et les petits ARN (pour revue White, 2011). La transcription d'un gène par l'ARN pol II conduit à la synthèse d'un ARN pré-messager (pré-ARNm) qui subit plusieurs modifications covalentes dans le noyau avant d'atteindre le compartiment cytoplasmique sous forme d'un ARN messager (ARNm).

L'épissage des pré-ARNm consiste à éliminer les séquences introniques. Ce processus nécessite l'assemblage dynamique du complexe ribonucléoprotéique (RNP pour « RiboNucleoProteins »), connu sous le nom de 'spliceosome', qui catalyse l'élimination des introns et la ligature des régions codantes (pour revue Wahl et al., 2009).

Il existe trois déterminants de séquence qui sont requis pour la reconnaissance et l'élimination des introns par la machinerie d'épissage : (1) le site donneur d'épissage en extrémité 5' : GU (5'ss pour « splice site »), qui marque la jonction exon/intron du pré-ARNm, (2) le site accepteur d'épissage à l'extrémité 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 (pour revue Wahl et al., 2009). La **Figure 32** représente les motifs consensus de ces régions.

i. La réaction d'épissage

L'épissage d'un pré-ARNm nécessite deux réactions de transestérification durant lequel une liaison phosphodiester est échangée contre une autre (Moore and Sharp, 1993). Au cours de la première étape, le groupement 2'hydroxyle libre de l'adénosine (A) du point de branchement attaque le groupement phosphate de la guanosine (G) du site 5' d'épissage, ce qui aboutit à la libération de l'exon 5' et à la formation d'un intermédiaire en « lasso ». Dans la seconde étape, une autre attaque nucléophile se produit entre le groupement 3'hydroxyle de

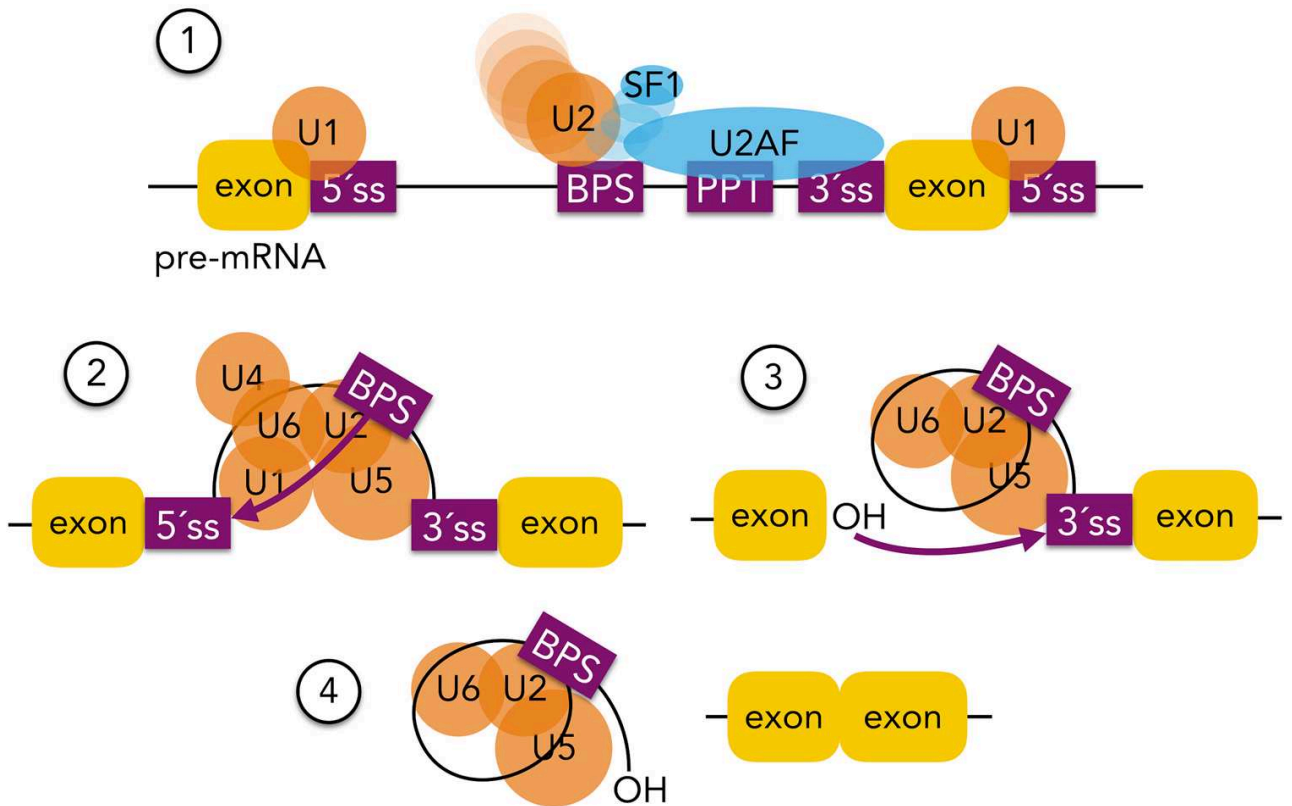


Figure 33 : Assemblage du spliceosome et réactions d'épissage

(1) La ribonucléoprotéine (RNP) U1 se lie au site donneur d'épissage 5'ss de l'exon en amont, tandis que la protéine U2AF et le facteur d'épissage SF1 se lient au point de branchement BPS, à la protéine PPT et au site 3'ss accepteur de l'exon en aval. L'interaction entre U1 et U2 conduit à la formation du pré-spliceosome.

(2) La première réaction d'épissage entre les deux exons est réalisée après le recrutement du complexe ribonucléoprotéique U4/5/6 par une attaque nucléophile de l'adénosine (A) existant dans BPS sur le site 5'ss de l'exon en amont.

(3) L'intron sous forme de « lasso » est alors formé. La deuxième réaction d'épissage est une attaque nucléophile entre le groupement libre 3' hydroxyle (OH) du site 5'ss de l'exon en amont et le groupement phosphate au niveau du site 3'ss de l'exon en aval.

(4) Finalement, l'intron en lasso est libéré et les deux exons sont ligaturés.

ss : splice site; U2AF : U2 Auxiliary Factor; SF1 : Splicing Factor 1; PPT : Polypyrimidine tract; BPS : branch point site. D'après Gallego-Paez et al., 2017

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

l'exon 5' et le groupement phosphate de l'exon 3', ce qui permet la ligature des deux exons et la libération de l'intron en lasso (**Figure 33**).

ii. Le spliceosome

Les sites d'épissage sont caractérisés par des petites séquences plus ou moins proches de séquences consensus en 5' et en 3' des régions introniques ainsi que par des points de branchement. La séquence consensus d'un site 5' d'épissage est la séquence GURAGU où le R est une base purique (A ou G). La séquence consensus d'un site 3' d'épissage est formée par une succession de bases pyrimidiques (C ou U : cytosine ou uracile) se terminant par une séquence CAG en amont de l'exon. Le point de branchement de l'épissage, est présent à 20-50 nucléotides en amont du site d'épissage en 3' (pour revues : Sharp, 1985, 1987; Pozzoli and Sironi, 2005; Pettigrew and Brown, 2008; Galej et al., 2014). Ces sites d'épissage sont reconnus par le spliceosome (**Figure 32**).

Le spliceosome est un complexe moléculaire constitué de cinq ribonucléoprotéines nucléaires appelées snRNP (pour « small nuclear RiboNucleoProteins ») riches en Uridine : U1, U2, U4, U5 et U6, et plus de cent-cinquante autres protéines associées (Nilsen, 2002; Gallego-Paez et al., 2017). Le spliceosome contient également des protéines impliquées dans la transcription, dans le processus de clivage/polyadénylation et dans l'export des ARNs.

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).

L'assemblage des différents complexes du spliceosome sur le pré-ARNm se fait en plusieurs étapes successives (pour revue Wahl et al., 2009). La première étape correspond à la liaison de la snRNP U1 avec le site donneur d'épissage. Cette liaison se fait par appariement de quelques nucléotides (4 à 7) entre le snRNP U1 et le site 5' donneur. La liaison est stabilisée par les protéines de la snRNP U1 ainsi que par d'autres protéines (Puig et al., 1999). Lors de cette même étape, les protéines SF1/BBP (pour « Splicing Factor 1 / Branchpoint Binding Protein ») et U2AF (pour « U2 Auxiliary Factor 2 ») lient respectivement le point de branchement et la séquence polypyrimidine. U2AF est composée de deux sous unités, dont U2AF65 qui lie la protéine SF1/BBP et U2AF35 liant le site accepteur en 3'. Cet ensemble

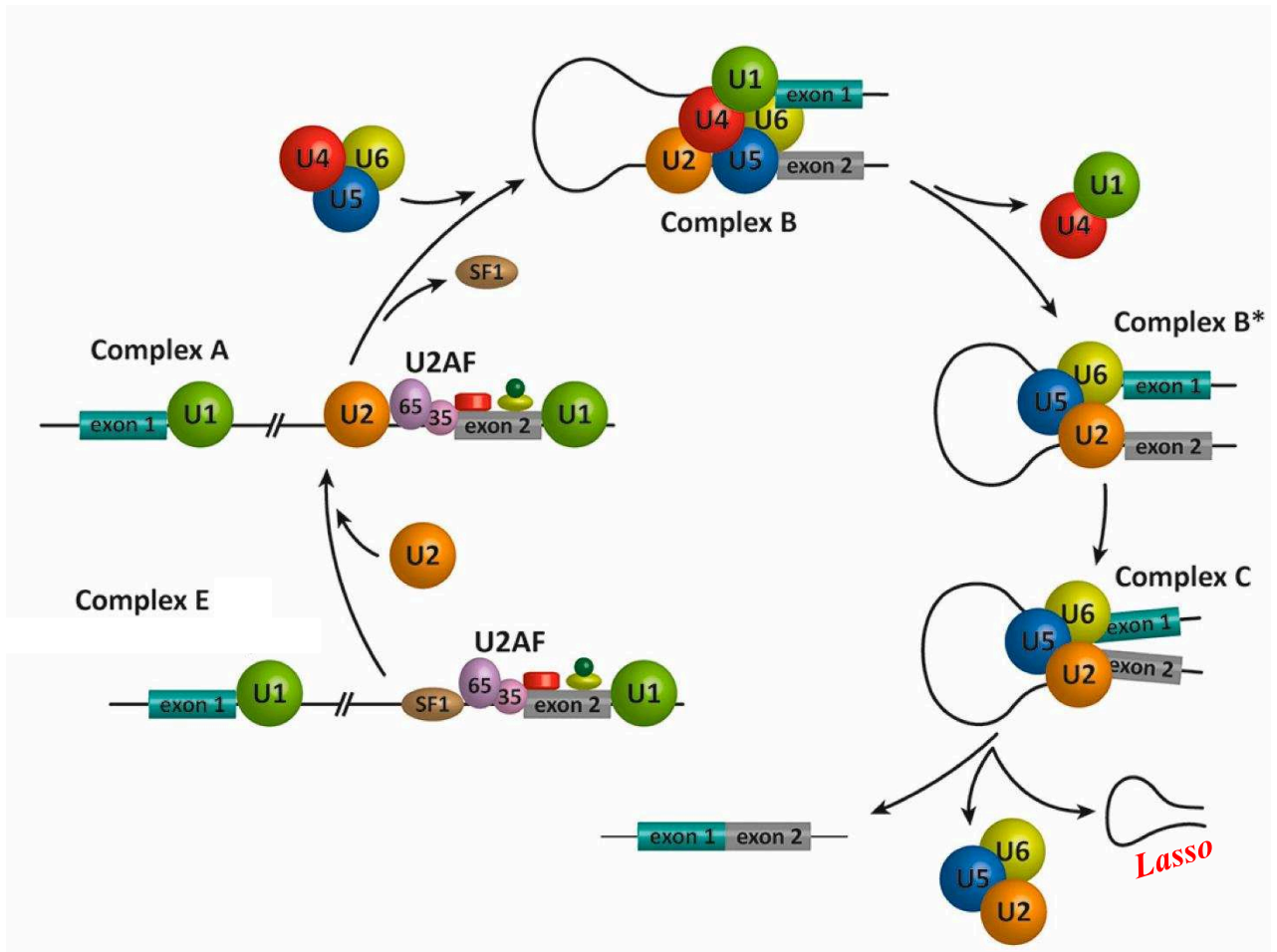


Figure 34 : Représentation schématique du modèle d'assemblage séquentiel du spliceosome

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, B* et C sont représentés. Adaptée d'après Suñé-Pou et al., 2017

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

mettant en exergue les 3 sites essentiels à l'épissage constitue le premier complexe du spliceosome appelé complexe E (Krämer and Utans, 1991; Zamore et al., 1992; Berglund et al., 1998; Wu et al., 1999).

En présence d'ATP, l'interaction entre snRNP U2 et le point de branchement, forme ensuite le complexe A (**Figure 34**) (Barabino et al., 1990; Chiara et al., 1996). Puis, snRNP U4/U6 et U5 sont recrutées ensemble pour constituer le complexe B. A ce stade, le complexe B demeure inactif et ne peut pas réaliser les réactions de transestérification. Lorsque snRNP U1 et U4 quittent ce complexe, un réarrangement conformationnel confère une activité catalytique au complexe B*. Le spliceosome effectue alors la première réaction de transestérification générant le complexe C (**Figure 34**). Enfin, un autre réarrangement permet d'effectuer la deuxième réaction de transestérification (Konarska et al., 2006). Une fois cette réaction accomplie, le spliceosome se dissocie libérant l'ARNm et les différents snRNP, et un complexe de jonction exon-exon EJC (pour « Exon Junction Complex ») vient s'ajouter dans une région située à environ 24 nucléotides (nt) en amont de la jonction d'épissage (Tange et al., 2004; Le Hir and Séraphin, 2008). Les interactions entre les snRNP U2, U5 et U6 avec le pré-ARNm sont alors stabilisées permettant aux snRNP d'être recyclés et assemblés pour une nouvelle réaction d'épissage (pour revue Suñé-Pou et al., 2017).

2- L'épissage alternatif

Depuis la mise en évidence de l'épissage alternatif (AS pour « Alternative Splicing ») par Gilbert (Gilbert, 1978), ce processus, par lequel une séquence génomique unique est capable de produire de multiples ARNm codant des protéines distinctes, est considéré comme la source principale de diversification du protéome (pour revue Soller, 2006). L'AS peut participer également à la régulation de l'expression génique par modification du cadre de lecture et introduction de codons de stop prématurés (PTC pour « Premature Termination codon ») : AS couplé à la dégradation par NMD (AS-NMD), ou par modification des régions non traduites des ARNm en 5' ou en 3' (UTR pour « UnTranslated Regions ») affectant la stabilité, la localisation ou l'efficacité de la traduction (Lejeune and Maquat, 2005; Stamm et al., 2005). De nombreuses mutations perturbant le processus d'épissage et inductrice d'AS sont impliquées dans de multiples pathologies (pour revue Cooper et al., 2009).

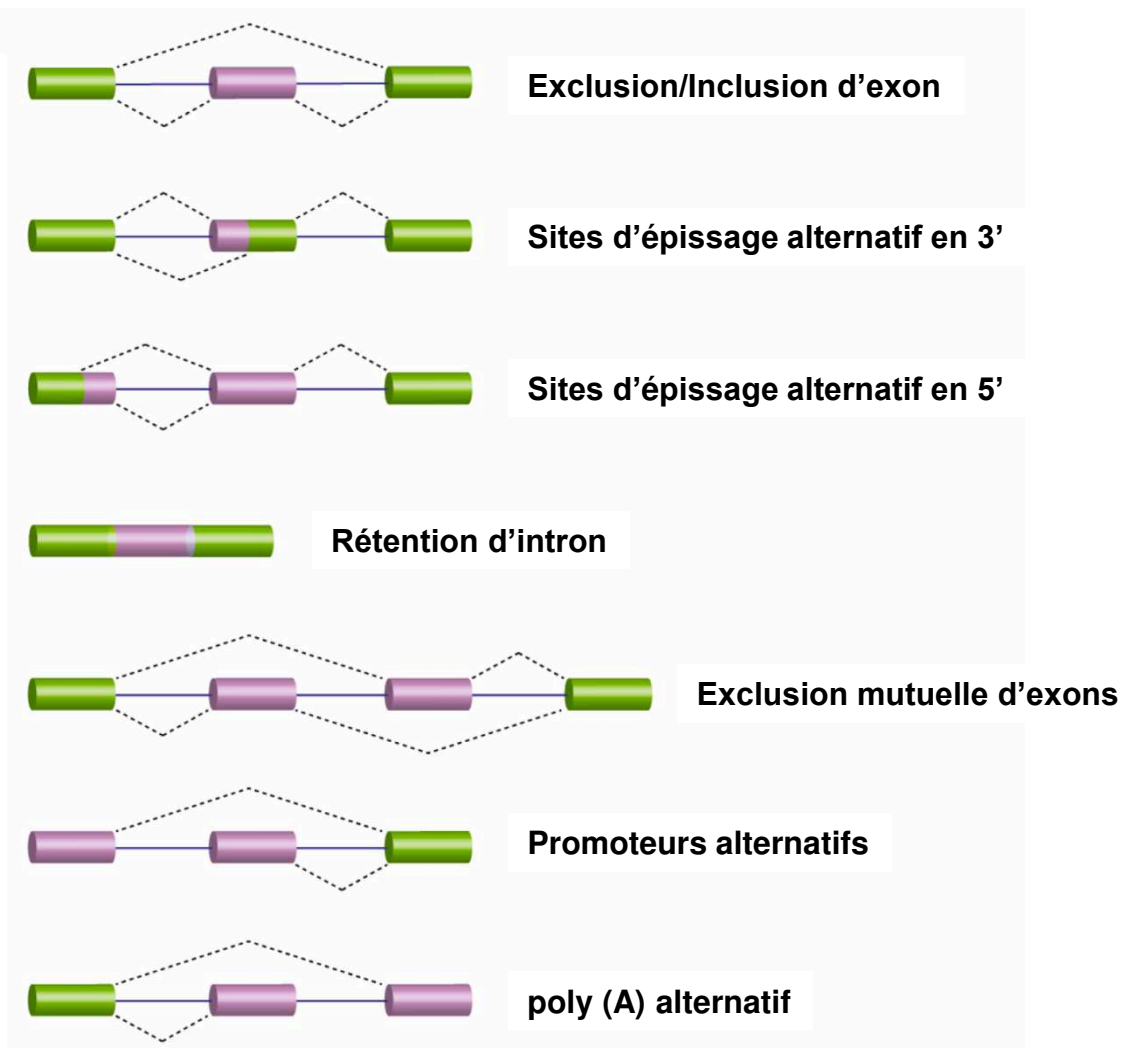


Figure 35 : Représentation schématique des différents types d'épissage alternatif

Les exons constitutifs sont représentés en vert et les exons alternatifs en violet. Les lignes en pointillé représentent les options d'épissage. Adaptée d'après Suñé-Pou et al., 2017

i. Les différents types d'épissage alternatif

Les profils d'utilisation des sites donneurs (5') et accepteurs (3') d'épissage donnent lieu à plusieurs types d'AS listés ci-dessous (**Figure 35**) (Keren et al., 2010; pour revue Suñé-Pou et al., 2017; Bergsma et al., 2018) :

- **Les exons définis par des promoteurs alternatifs** : L'initiation de la transcription au niveau de promoteurs différents, dits alternatifs, donne lieu à différents ARNm.

- **Les exons cassettes** : C'est le cas le plus fréquemment rencontré. Quand un exon est bordé par des sites 5' et 3' alternatifs, on l'appelle exon cassette. Cet exon est soit inclu soit exclu lors de l'épissage, le dernier cas correspond à un phénomène de « saut d'exon » et représente 40% des événements d'AS chez les eucaryotes supérieurs.

- **Les exons mutuellement exclusifs** : Ces exons ne sont jamais présents simultanément dans un ARNm ; un seul exon (ou groupe d'exons) sera donc retenu lors de l'épissage. Les exons concernés étant généralement de taille similaire, la longueur des ARNm générés varie peu. En revanche, la fonction des protéines codées par ces différents ARNm est généralement modifiée. Par exemple, ce type d'AS intervient dans la régulation tissulaire de l'expression de la β -tropomyosine, avec inclusion de l'exon 6A dans les cellules non musculaires, et de l'exon 6B dans les cellules musculaires (Libri et al., 1989). Un AS de ce type touchant 2 groupes d'exons constants $C\mu$ et $C\delta$ intervient dans les cellules B matures naïves. Le long transcrite primaire IgH dans lequel les exons sont mutuellement exclusifs avec les exons C (**Figure 7**). Comme indiqué précédemment dans le chapitre 1, les cellules B matures co-expriment des IgM et des IgD à leur surface, puis l'expression d'IgD diminue après leur activation antigénique. Pour exprimer une IgD, les exons $C\mu$ (groupe de 6 exons : C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4} , M1, M2) sont exclus lors de l'épissage du transcrite primaire IgH (**Figure 7**) (Moore et al., 1981; Maki et al., 1981; Mountz et al., 1990; pour revue Chen and Cerutti, 2011).

- **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 par le spliceosome. Les exons générés peuvent ainsi être raccourcis ou rallongés par utilisation de différents sites d'épissage. 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).

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

- **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. Cette séquence intronique pourra ainsi être traduite ou introduire un PTC. La rétention d'intron est la forme d'AS la plus rare chez les vertébrés et les invertébrés, constituant moins de 5% des événements, en revanche c'est le mode le plus utilisé chez les plantes, les champignons et les protozoaires (pour revue Berget, 1995)

- **Les exons composites internes/terminaux :** Cette situation fait intervenir un site 5' d'épissage interne suivi d'un site de polyadénylation « poly (A) ». Ainsi ces exons peuvent être utilisés comme des exons internes lorsque le site 5' d'épissage est reconnu, ou comme des exons terminaux quand le signal de poly(A) est sélectionné. Ce profil d'épissage est utilisé lors du passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des chaînes lourdes d'Ig. (**Figure 27**) (Tsurushita and Korn, 1987). Dans les lymphocytes B, l'exon C_{H4} est utilisé en tant qu'exon interne épissé sur les exons de membrane M1 et M2, alors que dans les plasmocytes, ce même exon est considéré comme un exon 3' terminal et code des IgM sécrétées. Ainsi, la différenciation plasmocytaire s'accompagne d'une modification du 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; pour revue Santos et al., 2011).

ii. Régulation de l'épissage alternatif

La régulation de l'AS fait intervenir des éléments régulateurs, agissant en cis et/ou en trans, qui 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**

Les séquences cis régulatrices participent à la régulation de l'AS et sont généralement présentes en plusieurs copies le long du pré-ARNm. Ces séquences, généralement conservées entre les espèces, peuvent être situées en amont ou en aval des exons régulés par AS. 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 »)

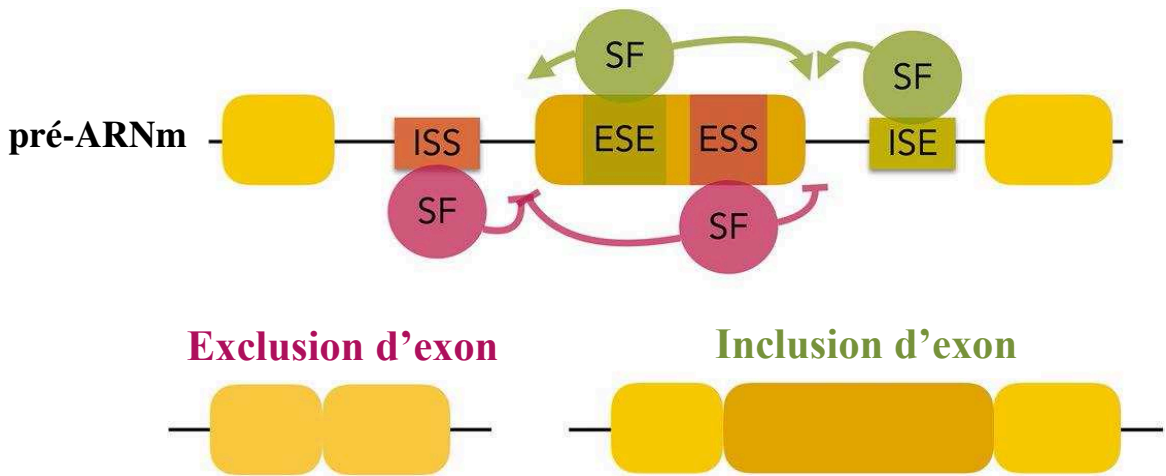


Figure 36 : Les différentes séquences régulatrices d'épissage des pré-ARNm

Représentation schématique d'un transcrit primaire et des éléments cis-régulateurs qui contrôlent l'épissage. Ces séquences peuvent être activatrices (ESE et ISE : exonic/intronic splicing enhancers) ou inhibitrices (ESS et ISS : exonic/intronic splicing silencers) d'épissage. Les facteurs d'épissage (SF : splicing factors) agissant en trans sont également représentés. La fixation de ces derniers sur les éléments ESE et ISE favorisent l'inclusion de l'exon alternatif, alors que ceux fixés sur les séquences ESS et ISS inhibent l'épissage de l'exon alternatif et favorise son exclusion. SF: Splicing Factors; ESE: Exonic Splicing Enhancer; ISE: Intronic Splicing Enhancer; ESS: Exonic Splicing Silencer; ISS: Intronic Splicing Silencer. Adaptée d'après Gallego-Paez et al., 2017

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

et les séquences introniques inhibitrices (ISS pour « Intonic Splicing Silencers») (**Figure 36**) (pour revue Gallego-Paez et al., 2017).

Les ESE sont généralement liés à la famille des protéines SR (pour « Serin Arginin rich ») et 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 ») qui 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, quant à eux, sont reconnus par la protéine hnRNP L (Hung et al., 2008) et par d'autres protéines de la famille des hnRNP. Ces séquences cis régulatrices peuvent donc exercer des effets activateurs ou inhibiteurs en recrutant des facteurs trans régulateurs.

• Les éléments trans-régulateurs

Il existe deux grandes familles de protéines régulatrices d'épissage : les protéines SR et les protéines hnRNP (Mayeda et al., 1999). Les protéines SR constituent la famille la plus étudiée qui comprend plus d'une vingtaine de membres, dont les plus connus sont SRp20, SRp30c, 9G8, SRp40, SRp55, SRp75, ASF/SF2 et SC35 (Zahler et al., 1992; pour revue Long and Caceres, 2009). Les protéines SR contiennent un ou deux domaines de liaison à l'ARN de type RRM (pour « RNA Recognition Motif ») suivis par un domaine protéique RS (pour « Arginine (R)-Serine (S) ») riche en dipeptides répétés Arginine/Sérine. Le domaine RS peut être phosphorylé, agissant ainsi sur l'activité en facilitant les interactions protéine-ARN et protéine-protéine nécessaires au recrutement du spliceosome (Mayeda et al., 1999; pour revue Shepard and Hertel, 2009).

Les protéines hnRNP sont très abondantes dans la cellule et inhibent généralement l'épissage. Cette famille comprend au moins une vingtaine de membres dont hnRNP A1 ou L, B, C, F, G, H, K, et hnRNP I aussi appelée PTB. Les hnRNP jouent des rôles variés, allant de la régulation de l'épissage à la maturation des extrémités 3' des ARNm (Bagga et al., 1998), et pouvant s'étendre à la transcription (Du et al., 1998) ou à la traduction (Ostareck et al., 1997; Collier et al., 1998; Ostareck-Lederer and Ostareck, 2004). La protéine hnRNP A1 a également été décrite pour jouer un rôle dans la conservation de la longueur des télomères (Dallaire et al., 2000).

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

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'exclusion 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 différents : 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.

Dans le but d'identifier les différents 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 PC (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 différents éléments trans-régulateurs.

• Les régulateurs co-transcriptionnels

Le lien entre transcription et AS a été illustré dans de nombreuses revues (pour revues : Proudfoot et al., 2002; Neugebauer, 2002). En effet, la phosphorylation du domaine carboxy terminal (CTD pour « Carboxy-Terminal Domain ») de la grosse sous-unité de l'ARN pol II influence le processus d'épissage. Dans ce sens, le groupe de Bentley a montré que l'épissage, l'arrivée vers l'extrémité 3' et la terminaison de la transcription sont tous inhibés en bloquant le domaine CTD de l'ARN pol II (McCracken et al., 1997). La cinétique et/ou la processivité de l'ARN pol II lors de la transcription peut réguler l'AS. Un modèle putatif suggère que la

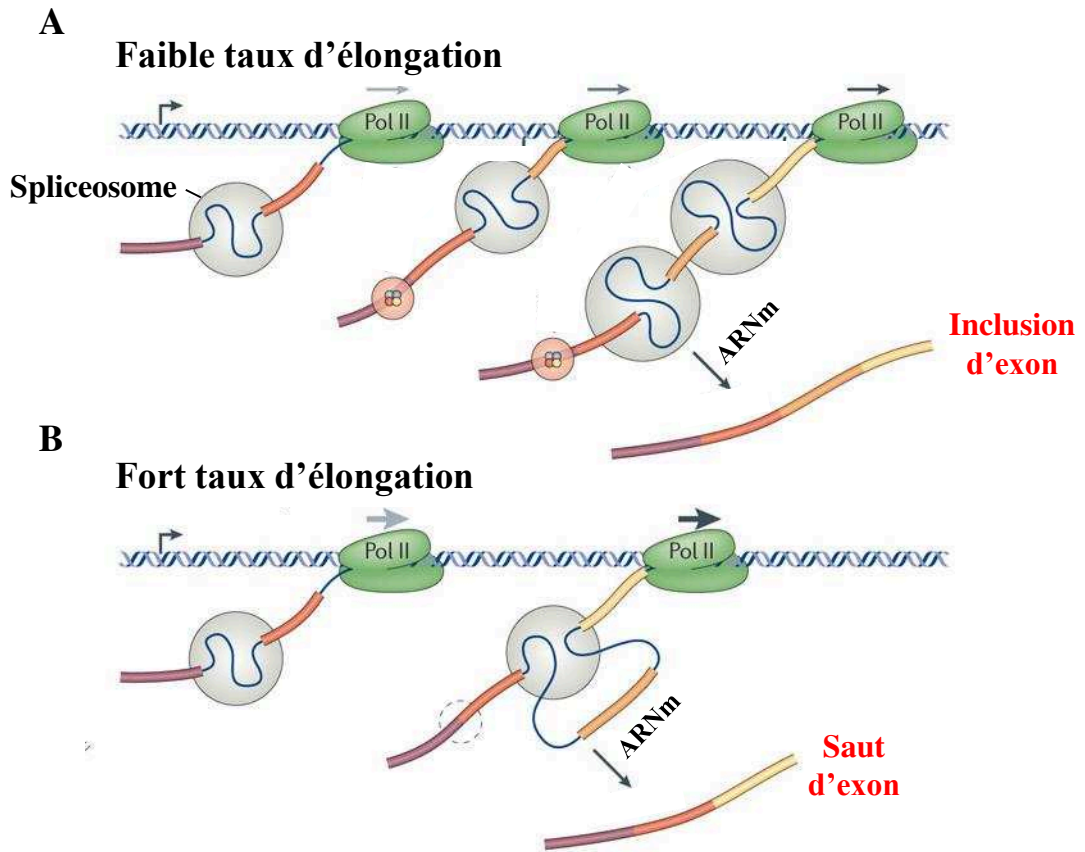


Figure 37 : Modèle de régulation de l'épissage alternatif par la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II

Selon ce modèle, l'épissage alternatif serait influencé par la processivité de la ARN pol II au cours de la transcription. Ainsi, une élongation rapide conduit à l'élimination d'un exon alternatif par saut d'exon (**B**), alors qu'une faible vitesse d'élongation de l'ARN pol II autorise son inclusion lors de l'épissage (**A**). Adaptée d'après Le Hir et al., 2016

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

vitesse d'élongation de l'ARN pol II et sa capacité à marquer des temps de pause régule les évènements d'AS. Ainsi, si l'ARN pol II est peu processive ou si elle effectue une pause durant l'élongation, cela favorise l'inclusion d'exons alternatifs même s'ils présentent des sites d'épissage peu efficaces. A l'inverse, un fort taux d'élongation de l'ARN pol II ou l'absence de pause durant l'élongation se traduit par un phénomène de saut d'exon (**Figure 37**) (pour revues : Nogués et al., 2003; Le Hir et al., 2016). 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'ARN pol II favorise le saut d'exon (Dujardin et al., 2014).

- **L'épissage alternatif et les modifications de la chromatine**

Dans cette partie, nous allons discuter les changements touchant la chromatine, telles que les modifications post-traductionnelles des histones (phosphorylation, acétylation, ou méthylation), qui sont le reflet de l'activité transcriptionnelle et, par conséquent, jouent un rôle décisif dans l'épissage alternatif (pour revue Luco et al., 2011).

Ces marques chromatiniennes permettent de faire la distinction entre les introns, les exons constitutifs ou alternatifs, influençant ainsi le processus d'épissage. Une acétylation de la lysine 9 de l'Histone H3 (H3K9ac) a été observée autour de l'exon 18 du gène murin NCAM (pour « Neural Cell Adhesion Molecule »), et ce profil est corrélé à un saut de cet exon lors de la dépolarisation des cellules neuronales (Schor et al., 2009). De même, Kolasinska-Zwierz et al. ont 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). Cette modification exonique avec H3K36me3 dépend aussi de la transcription et se trouve à des niveaux très bas dans les exons alternatifs (Hon et al., 2009; Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Nahkuri 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 (Andersson et al., 2009; Schwartz et al., 2009; Spies et al., 2009; pour revues : Hnilicová and Staněk, 2011; Brown et al., 2012).

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

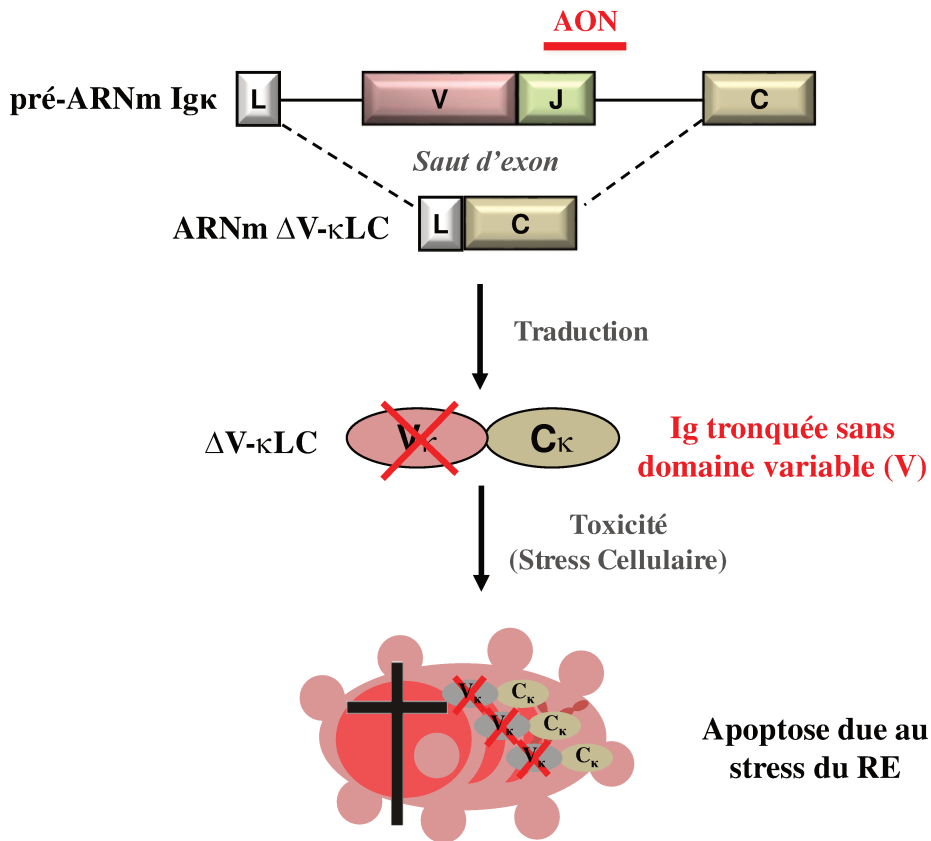


Figure 38 : Approche thérapeutique par saut d'exon dans le traitement du myélome multiple

Représentation schématique de l'administration d'un oligonucléotide anti-sens (AON) ciblant le site donneur d'épissage du segment J κ . Son hybridation au niveau du transcrite primaire entraîne l'élimination de l'exon variable VJ lors de l'épissage. Les transcrits alternatifs courts (ΔV - κ 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.

AON : Antisense OligoNucleotides ; ΔV - κ LC : V domain-less κ Light Chain.

D'après Delpy et al., brevet WO2017/089359

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

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).

3- Modification d'épissage par administration d'oligonucléotides antisens (AON)

Modifier l'épissage présente un intérêt thérapeutique considérable et de nombreuses approches reposent sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens (AON pour « Antisense OligoNucleotides »).

La technique de modification de l'épissage par l'utilisation des AONs est une méthode de thérapie génique permettant de modifier l'expression de certains gènes anormaux responsables de maladies génétiques. De nombreuses tentatives de traitements AON visant à restaurer l'expression d'une dystrophine fonctionnelle ont été à l'étude dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD pour « Duchenne Muscular Dystrophy ») (Wilton et al., 1999; Kole et al., 2012; Falzarano et al., 2015; pour revues : Nakamura and Takeda, 2009; Muntoni and Wood, 2011; Kole and Leppert, 2012; Sardone et al., 2017). La DMD est une maladie génétique causée par des mutations dans le gène de la dystrophine et provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme (Aartsma-Rus et al., 2006). Deux médicaments candidats ont déjà fait l'objet de tests cliniques : (1) le Drisapersen (2'O-methyl-phosphorothiate oligonucléotide : 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, retrouvées chez ~13% des patients atteints de DMD (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; pour revues : Aartsma-Rus and van Ommen, 2009, 2010).

Pour modifier l'épissage, les AONs s'hybrident généralement sur les sites d'épissage, les points de branchement ou les séquences cis-régulatrices d'épissage (ESE...) (pour revue Aartsma-Rus, 2010). 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), et que les stratégies avenir doivent surmonter les problèmes d'absorption tissulaire et de pénétration nucléaire des AONs. De façon intéressante, l'administration systémique d'une

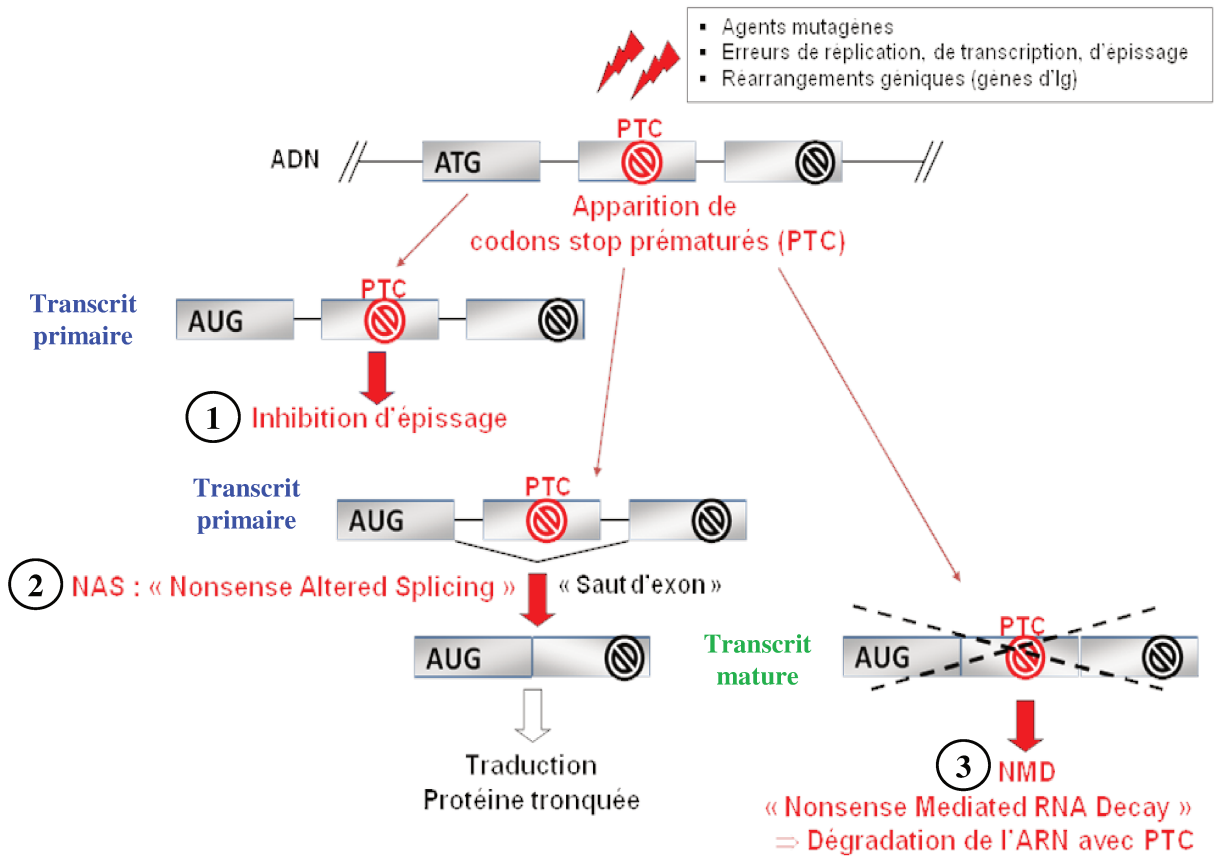


Figure 39 : Les différents mécanismes de surveillance des ARN

La surveillance des transcrits présentant des codons stop prématurés (PTC) peut s'effectuer à différents stades de l'expression génique, y compris avant ou pendant l'épissage. Ainsi, les transcrits primaires présentant des PTCs potentiels peuvent subir un phénomène d'inhibition d'épissage (1). Au cours de l'épissage, le phénomène de NAS permet d'éliminer l'exon contenant un PTC par saut d'exon (2). Enfin, les transcrits matures contenant un PTC sont dégradés par NMD (3). PTC: Premature Termination Codon

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

nouvelle classe d'AON : (les tricyclo-ADN, tc-ADN) permettait de restaurer significativement l'expression de la dystrophine chez des souris reproduisant la DMD. Cette augmentation est retrouvée dans l'ensemble de la musculature squelettique y compris dans le cœur (Goyenville et al., 2015a, 2015b).

Au sein du laboratoire, nous travaillons sur des stratégies AON ciblant l'épissage des Ig. Au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude montrant que la production de chaînes légères d'Ig dépourvues de domaine variable (V), par un phénomène de « saut d'exon », est toxique dans les plasmocytes (Srouf et al., 2016 : cf Annexe 1). Actuellement, nous envisageons de recréer ce saut d'exon par administration d'AON pour forcer la production d'Ig tronquées et induire la mort des plasmocytes tumoraux dans le myélome multiple et d'autres dyscrasies plasmocytaires (**Figure 38**) (Delpy et al, brevet WO2017/089359). Cette stratégie auto-destructrice diffère des approches conventionnelles de saut d'exon thérapeutique visant à restaurer la fonction des protéines.

4- Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

Le processus aléatoire des recombinaisons V(D)J est caractérisé par l'imprécision des jonctions codantes, générant ainsi des décalages du cadre de lecture et l'apparition de PTC dans deux tiers des cas (cf chapitre 1).

De part leur propension à héberger des allèles d'Ig présentant des réarrangements V(D)J non-productifs, les cellules B sont d'excellents modèles pour étudier les mécanismes de surveillance des ARNm. En effet, environ la moitié des cellules B présente des réarrangements bi-alléliques avec un allèle fonctionnel codant et un allèle réarrangé de façon non-fonctionnelle : cellules B dites VDJ^+/VDJ^- (locus des chaînes lourdes) ou VJ^+/VJ^- (loci des chaînes légères) (ten Boekel et al., 1995; Mostoslavsky et al., 2004; Daly et al., 2007).

Bien que la transcription des allèles d'Ig semble principalement bi-allélique, les transcrits matures provenant des allèles non-productifs (VDJ^- ou VJ^-) sont quasi-indétectables dans les cellules B matures (pour revue Li and Wilkinson, 1998; Delpy et al., 2004b; Eberle et al., 2009; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). Cette faible abondance d'ARNm d'Ig porteurs de PTC reflète l'activation des mécanismes de surveillance et permet de limiter la synthèse d'Ig aberrantes, potentiellement néfastes (**Figure 39**).

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

De nombreuses études incluant celles du laboratoire ont montré que cette surveillance drastique résulte d'une coopération entre différents mécanismes (pour revue Li and Wilkinson, 1998; Chemin et al., 2010; Delpy et al., 2004b; Tinguely et al., 2012). Ainsi, des transcrits primaires d'Ig contenant des PTC peuvent subir des modifications d'épissage par un processus d'inhibition d'épissage encore appelé NMUP (pour « Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA »), ou un phénomène d'AS appelé NAS (pour « Nonsense-associated Altered Splicing ») visant à éliminer l'exon contenant un PTC. Les ARNm d'Ig porteurs de PTC sont également activement dégradés par NMD (pour « Nonsense-Mediated mRNA Decay ») (Baumann et al., 1985; Jäck et al., 1989; Lozano et al., 1994; Aoufouchi et al., 1996; pour revue Li and Wilkinson, 1998; Delpy et al., 2004b; pour revue Isken and Maquat, 2007; Eberle et al., 2009; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012).

i. Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA (NMUP)

L'existence d'un processus d'inhibition d'épissage provoqué par la présence de PTC sur l'ARN (ou NMUP) a été révélée par le groupe de Milstein. Les études menées par ces auteurs ont démontré que l'apparition de PTC dans les gènes *Igk* s'accompagne d'une accumulation des pré-ARNm. Leurs données indiquent également que le processus de NMUP n'est pas dépendant de la synthèse protéique et permet de réduire considérablement le taux d'ARNm *Igk* non-sens (Lozano et al., 1994; Aoufouchi et al., 1996). Ensuite, Mühlemann et al. ont révélé que les pré-ARNm d'*Igμ* et du *TCRβ* et contenant des PTC sont également soumis au NMUP. Ces auteurs ont montré que la présence de mutations non-sens, mais pas de mutations faux-sens, entraînent une inhibition de l'épissage des pré-ARNm et que cet effet n'est pas influencé par la localisation du PTC. En effet, la rétention des introns est similaire même si les mutations non-sens sont localisées dans des exons différents. Le NMUP dans ce cas semble indépendant de la position du PTC (Mühlemann et al., 2001). De façon intéressante, et par des expériences de RNA FISH (pour « Fluorescent in situ Hybridization »), ils ont également montré que l'accumulation des transcrits primaires *Igμ* « hors-phase » a lieu au niveau ou à proximité du site de transcription (Mühlemann et al., 2001).

Au sein de notre laboratoire, nous avons également observé une accumulation préférentielle des pré-ARNm *Igk* et *Igμ* 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 manière intéressante, cette accumulation est maximale dans les cellules B au repos présentant une faible activité transcriptionnelle du locus *IgH*. En revanche, cette

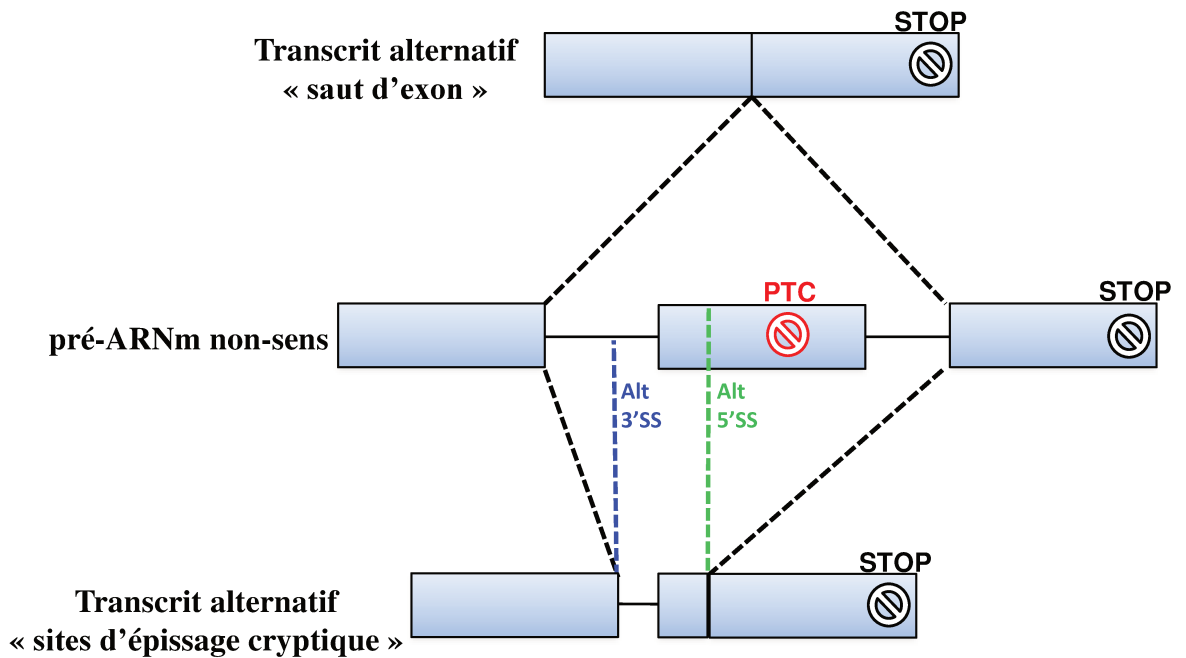


Figure 40 : Elimination d'un exon contenant un PTC par le phénomène de NAS

Représentation schématique illustrant deux exemples d'épissage alternatif suite à l'action du phénomène 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 . Adaptée d'après Maquat, 2002

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

accumulation de transcrits primaires non-sens devient moins marquée dans des cellules B activées qui présentent 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, l'équipe de M. Wilkinson a 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- β (Imam et al., 2010). Dans cette étude, les mutations générées détruisent des ESE. L'épissage est donc altéré indépendamment de la nature de la mutation (non-sens, faux-sens ou silencieuse) (Imam et al., 2010). Ces résultats, en contradiction avec les travaux de l'équipe de Mühlemann, semblent être le reflet de deux mécanismes d'accumulation des transcrits primaires mutés : l'un dépendant et l'autre indépendant du cadre de lecture (Mühlemann et al., 2001; Imam et al., 2010). Le terme de NMUP serait donc plus adapté au phénomène dépendant du cadre de lecture.

5- Nonsense-associated Altered Splicing (NAS)

La fidélité de l'expression génique peut également être contrôlée par AS et la présence d'un PTC sur un pré-ARNm peut induire des modifications du patron d'épissage par le phénomène de NAS (pour « Nonsense-associated Altered Splicing ») (**Figure 40**).

Si le transcrit alternatif ainsi formé conserve la phase ouverte de lecture et si l'exclusion de l'exon muté n'abolit pas la fonction protéique, le NAS peut procurer un avantage sélectif en permettant la synthèse de protéines tronquées qui conservent partiellement ou entièrement leur fonction. A l'inverse, ce processus d'épissage alternatif peut favoriser l'apparition de protéines tronquées potentiellement néfastes pour la cellule (pour revues : Hentze and Kulozik, 1999; Maquat, 2002). Dans ce sens, nous avons observé que l'activation du NAS permettait la synthèse Ig κ sans domaine V particulièrement toxiques dans les plasmocytes (Srouf et al., 2016 : cf Annexe 1). Ainsi, le phénomène de NAS ne semble pas avoir de but précis et la synthèse de protéines tronquées peut exercer des effets bénéfiques ou délétères (pour revue Maquat, 2002).

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

Deux types de NAS ont été décrits : l'un attribué à des mutations touchant des séquences régulatrices de l'épissage (NAS de classe I), l'autre dû à des décalages du cadre de lecture (NAS de classe II). Néanmoins, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont que partiellement élucidés.

i. Le NAS de classe I

Dans le NAS de classe I, le phénomène de l'AS est déclenché par des mutations qui perturbent les séquences régulatrices 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). Le NAS de classe I est donc indépendant de la synthèse protéique comme cela a été décrit pour les transcrits SCN1M1 (pour « Sodium Channel Modifier 1»), CFTR (pour « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator »), fibrilline-1, TCR β et I μ g (Liu et al., 2001; Caputi et al., 2002; Buchner et al., 2003; Pagani et al., 2003; Bühler and Mühlemann, 2005; Mohn et al., 2005; Chang et al., 2007). Outre la destruction de séquences ESE, il peut aussi arriver que des mutations induisent l'apparition de séquences ESS, facilitant d'autant plus les événements de saut d'exon provoquant l'élimination de l'exon muté (Disset et al., 2006).

ii. Le NAS de classe II

Le NAS de classe II se produit en présence de mutations non-sens et se traduit par une modification d'épissage de l'exon porteur d'un PTC, le plus souvent par un événement de saut d'exon. Tout comme le phénomène d'inhibition d'épissage NMUP décrit précédemment (§ 4-i) le NAS de classe II soulève la question très controversée de l'existence d'un « scanning » nucléaire capable de détecter l'interruption d'un cadre de lecture (Wang et al., 2002a). En effet, L. Maquat proposait que la reconnaissance des codons non-sens est peu probable dans le contexte du pré-ARNm car il est difficile d'imaginer comment un exon porteur d'un PTC, qui influence un intron situé en amont, peut être lu quand il résidait en position cis à cet intron ; et que cette reconnaissance se produisait après l'épissage et transmettait ensuite des informations sur l'état de la terminaison à la machinerie d'épissage (Maquat, 2002).

Néanmoins trois points ont permis de mettre en évidence le NAS de classe II : (a) seules les mutations non-sens, et pas les mutations faux-sens à des positions équivalentes, sont capables d'induire un épissage alternatif. C'est le cas de mutations particulières localisées sur les gènes de la fibrilline et les gènes du TCR β (Mendell et al., 2002; Wang et al., 2002b, 2002a)

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

; (b) l'épissage alternatif des exons contenant les PTC est inhibée lorsque le site AUG d'initiation de la traduction ou la séquence consensus de Kozak sont mutés (Wang et al., 2002b, 2002a) ; (c) le phénomène de NAS n'apparaît plus lorsque l'on restaure le cadre de lecture (Wang et al., 2002a).

Contrairement au NAS de classe I, ce type d'épissage alternatif semble dépendant de la traduction protéique et peut être inhibé par suppression des ARNt (Gersappe et al., 1999). En accord avec son lien étroit avec la synthèse protéique, le NAS de classe II fait intervenir la protéine 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 classe 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 processus de NAS (Mendell et al., 2002; Chang et al., 2007). 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 classe II a été également étudié par notre laboratoire, en analysant l'épissage alternatif des transcrits Igk porteurs de mutations non-sens. Les travaux de Chemin et al. ont révélé que l'élimination de l'exon variable contenant le PTC est nettement plus marquée dans les lignées plasmocytaires par rapport aux lignées B (Chemin et al., 2010). De plus, j'ai participé à un travail révélant que seule la présence d'un PTC sur l'exon V activait le NAS (Srouf et al., 2016 : cf Annexe 1). Au cours de ma thèse, j'ai étudié ce processus au niveau moléculaire et montré que l'hypertranscription des gènes d'Ig non-productifs dans les plasmocytes est corrélée à une activation marquée du NAS sur les transcrits IgH (cf Résultats, Article 1). Ainsi, le NAS de classe II serait soumis aux mêmes règles que l'épissage conventionnel, et influencé par la vitesse d'élongation de l'ARN pol II (Das et al., 2006; pour revue Shukla and Oberdoerffer, 2012).

6- Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)

Le NMD est un phénomène ubiquitaire majeur permettant de contrôler la qualité de l'expression génique. Ce mécanisme de surveillance des ARN, découvert il y a plus de 30 ans par Baserga et Benz, est le plus intensément étudié (Baserga and Benz, 1988). Il est impliqué

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

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). Le rôle du NMD apparait même plus général puisque ce système semble capable de cibler également des ARNm sans PTC, participant ainsi largement à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique (Martins et al., 2012; pour revue Ottens and Gehring, 2016).

Des nombreuses études dont celles menées au laboratoire ont montré que les ARNm provenant d'allèles d'Ig réarrangés de manière non-productive sont efficacement dégradés par NMD (pour « Nonsense-Mediated mRNA Decay ») (pour revue Li and Wilkinson, 1998; Delpy et al., 2004b; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012).

i. Les acteurs majeurs du NMD

Les 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. Chez les mammifères, quatre protéines UPF ont été identifiées : UPF1, UPF2, UPF3 (nommée aussi UPF3a) et UPF3X (nommée aussi UPF3b).

UPF1 ou RENT1 (pour « Regulator of Nonsense Transcripts 1 ») est un facteur clé dans le mécanisme de NMD très conservé entre les espèces (Culbertson and Leeds, 2003; Conti and Izaurralde, 2005; pour revue Mühlemann et al., 2008).

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

La protéine **UPF1** humaine est composée de 1118 acides aminés et présente un poids moléculaire d'environ 123 kDa. Elle est principalement présente dans le cytoplasme, et peut également être retrouvée dans le noyau (Mendell et al., 2002). UPF1 contient une phosphoprotéine avec une activité ATPase dépendante de l'ARN et une activité hélicase (Bhattacharya et al., 2000; pour revue Gupta and Li, 2018). En effet, une mutation (R844C) abolissant cette activité hélicase permet d'inhiber l'activité NMD dans les cellules de mammifères (Sun et al., 1998). L'inactivation du gène *upf1* est létale chez la souris ; les embryons meurent entre 3,5 et 5,5 jours révélant ainsi le rôle essentiel de cette protéine dans de nombreuses fonctions biologiques (Medghalchi et al., 2001). Nous noterons son rôle dans le maintien de l'intégrité du génome, la réplication et la protection des séquences télomériques (pour revues : Isken and Maquat, 2008; Gupta and Li, 2018). UPF1 s'associe avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (pour « elongation Release Factor ») ainsi qu'avec UPF2 (pour revue Mühlemann et al., 2008).

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). C'est une protéine de 1272 acides aminés avec un poids moléculaire de 148 kDa (Mendell et al., 2000; Serin et al., 2001). UPF2 possède au moins trois domaines MIF4G (pour « middle of eIF4G-like ») (Mendell et al., 2000) présents dans la région centrale et N-terminale, et un domaine de localisation nucléaire NLS (pour « Nuclear Localization Sequence ») présent uniquement dans la partie N-terminale. Les domaines MIF4G seraient impliqués dans l'interaction d'UPF2 avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4A et eIF3 (pour « elongation Initiation Factor »). La partie C-terminale est impliquée dans l'interaction avec UPF1 (Mendell et al., 2000). Récemment, il a été montré que durant l'apoptose, 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; pour revue Lejeune, 2017).

UPF3 est la dernière des trois protéines UPF. Chez les mammifères il existe deux gènes paralogues *upf3* : *upf3* (nommé aussi *upf3a*) et *upf3X* (nommé aussi *upf3b*). Dans les cellules humaines, la forme UPF3X semble plus impliquée dans le NMD qu'UPF3A. Le gène *upf3* est porté sur le chromosome 13 alors qu'*upf3X* est porté sur le chromosome X (Serin et al., 2001). Ils codent pour des protéines de 52 kDa et 58 kDa, respectivement. UPF3A et UPF3X présentent toutes deux une localisation majoritairement nucléaire mais peuvent faire la navette vers le cytoplasme (Lykke-Andersen et al., 2000; Serin et al., 2001). Ces deux protéines sont

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

caractérisées par la présence d'un domaine conservé RRM (pour « RNA Recognition Motif ») (Lykke-Andersen et al., 2000). Malgré leur similarité, leurs effets sur le NMD semblent être différents. En effet, la fixation artificielle d'UPF3X dans la partie 3'UTR d'un ARNm dépourvu de PTC induit fortement sa dégradation, alors que l'effet d'UPF3 est plus faible (Lykke-Andersen et al., 2000). De même, l'inhibition d'UPF3X par ARNi (pour « ARN interférent ») bloque le processus du NMD mais pas celle d'UPF3 (Kunz et al., 2006).

Récemment, Neu-Yilik et al. ont montré que le facteur UPF3X est caractérisé pour interagir avec la partie N-terminale du facteur de terminaison de la traduction eRF3 (Neu-Yilik et al., 2017). Ainsi, UPF3X s'associe au dimère eRF1/eRF3 pour former un complexe trimérique, qui conduit à la libération du ribosome présent à l'arrêt au niveau du PTC.

• Les protéines SMG

Les protéines SMG (pour « Suppressor of Morphological defects on Genitalia ») assurent le cycle de phosphorylation et déphosphorylation des protéines UPF. La délétion des protéines SMG inhibe le NMD (Cali et al., 1999; Chiu et al., 2003; Unterholzner and Izaurralde, 2004). Il existe six protéines SMG qui jouent un rôle majeur dans le NMD : SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8 et SMG9.

SMG1 est une protéine kinase qui phosphoryle UPF1 sur ses régions N-terminale et C-terminale. Elle appartient à la famille des PIKKs (pour « phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases ») (Denning et al., 2001; Yamashita et al., 2001; Grimson et al., 2004). La phosphorylation d'UPF1 par SMG1 est une étape clé du NMD. En outre, **SMG5**, **SMG6** et **SMG7** sont des protéines non redondantes qui sont impliquées dans la déphosphorylation d'UPF1 puisque leurs absence conduit à une accumulation d'une protéine UPF1 hyperphosphorylée (Anders et al., 2003; Chiu et al., 2003; Ohnishi et al., 2003; Fukuhara et al., 2005; Durand et al., 2016). Ces protéines SMG ne sont pas des phosphatases mais sont capables en recrutant des protéines phosphatases telles que PP2A (pour « Phosphatase Protein 2A ») pour permettre la déphosphorylation d'UPF1 (Chiu et al., 2003; Ohnishi et al., 2003; Conti and Izaurralde, 2005). SMG1 peut s'associer avec deux protéines supplémentaires **SMG8** et **SMG9** et permettre la mise en place du complexe d'induction du NMD nommé « **SURF** » (SMG1, UPF1, et les facteurs eRF2 et eRF3) (Kashima et al., 2006; Yamashita et al., 2009; pour revue Schoenberg and Maquat, 2012). SMG8 régule l'activité kinase de SMG1 sur UPF1 in vivo. SMG9, quant à elle, est requise pour l'interaction entre SMG1 et SMG8 (Yamashita et al., 2009).

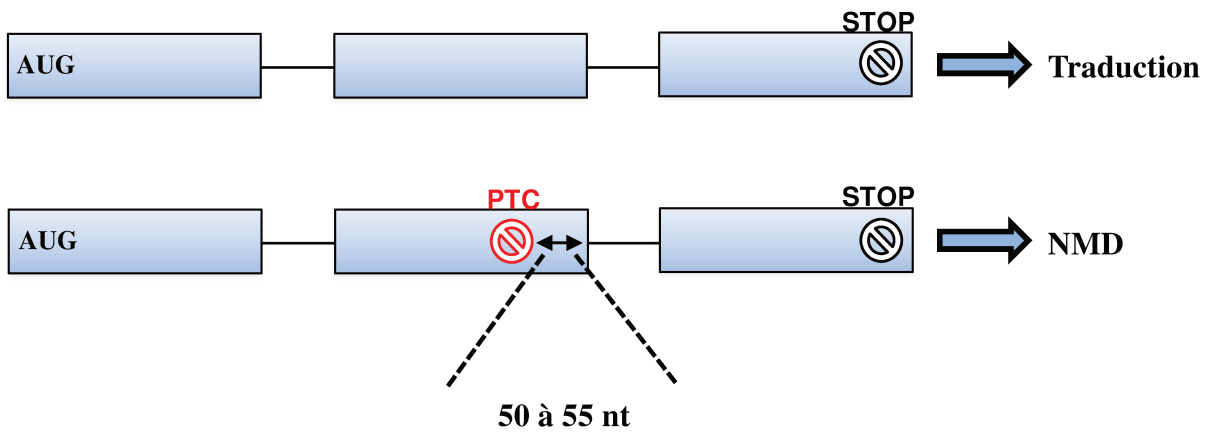


Figure 41 : La dégradation par NMD dépend de la position des PTC

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. Cette règle de position permet de définir si un ARNm contenant des PTC peut être considéré comme un substrat de NMD ou non. Adaptée d'après Kuzmiak et Maquat, 2006

ii. La règle de position du PTC

Dans les cellules de mammifères, le mécanisme du NMD dépend généralement de l'épissage et nécessite que le PTC soit positionné au moins 50 à 55 nucléotides en amont de la dernière jonction entre deux exons (**Figure 41**) (Carter et al., 1996; Zhang and Maquat, 1996; Li and Wilkinson, 1998; Nagy and Maquat, 1998; Thermann et al., 1998; Zhang et al., 1998). Ceci explique le fait que les codons stop physiologiques situés dans le dernier exon sont peu sensibles au processus du NMD (Maquat and Li, 2001). Cette règle de position des PTC repose sur la fixation d'un complexe appelé EJC (pour « Exon Junction Complex ») à 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon (Le Hir et al., 2000b, 2000a, 2001). Ce complexe protéique d'environ 350 kDa est fixé à l'ARNm dans le noyau et reste associé dans le cytoplasme jusqu'à ce que l'ARNm soit traduit (pour revue Le Hir and Séraphin, 2008). Le complexe d'EJC représente un « *nœud* » de régulations post-transcriptionnelles (pour revue Le Hir et al., 2016), fournissant un lien direct entre l'épissage, la traduction et le NMD, et intervenant également lors du transport de l'ARNm (Tange et al., 2004; Nott et al., 2004)

Le « cœur » de l'EJC est un hétérotétramère constitué au moins de quatre protéines essentielles conservées et associées de façon stable : MAGOH, Y14, MLN51 et eIF4AIII (Ballut et al., 2005; Tange et al., 2005; Andersen et al., 2006). La protéine eIF4AIII (pour « eukaryotic translation Initiation Factor 4AIII ») se lie directement à l'ARNm et sert d'ancre pour la fixation d'autres composants de l'EJC (Shibuya et al., 2004; Chan et al., 2004) et un hétérodimère Y14 : MAGOH, qui lui est assemblé avant la ligature de l'exon et sert de plateforme pour la fixation des facteurs périphériques de l'EJC (Gehring et al., 2009). De nombreuses études ont montré que la délétion de MLN51, MAGOH 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).

Le « cœur » de l'EJC sert de plateforme d'ancrage à d'autres facteurs, notamment UPF2 et UPF3a/b, qui interagissent de façon transitoire avec l'ARNm (pour revue Le Hir and Andersen, 2008). La protéine UPF2 s'associerait à UPF3a/b à l'intérieur et/ou à la périphérie du noyau (Lejeune et al., 2002). Les protéines UPF3a/b, quant à elles, sont recrutées sur l'EJC via Y14 au sein du noyau (Gehring et al., 2003). Les protéines UPF2 et UPF3 vont former un pont moléculaire entre l'EJC et le complexe de terminaison de la traduction via la protéine UPF1 (Gehring et al., 2003; Singh et al., 2007). Cette interaction moléculaire est essentielle pour l'activité hélicase d'UPF1 et induit la formation du complexe « SURF » (Kashima et al.,

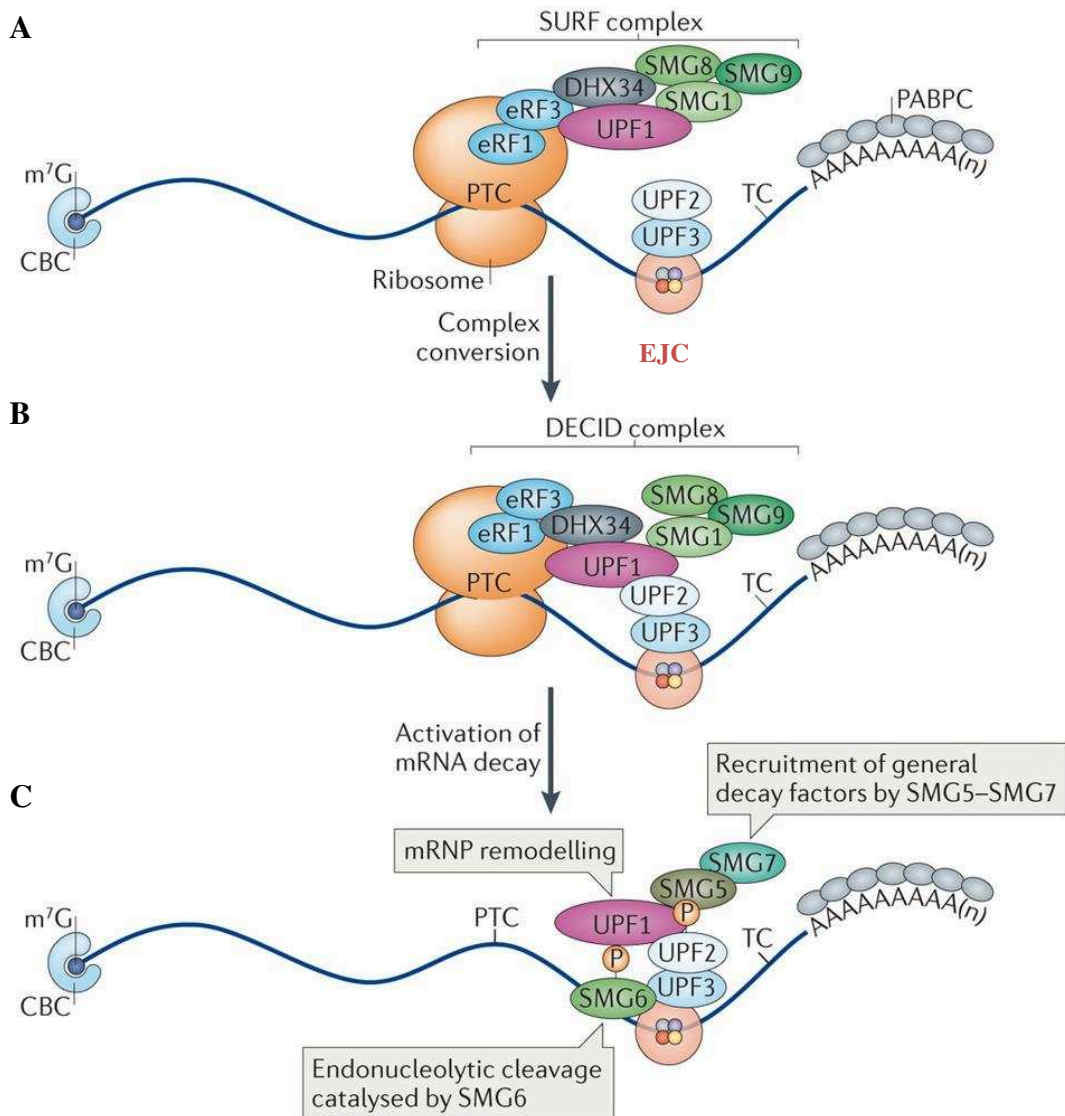


Figure 42 : Mise en place du complexe de surveillance

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 par le ribosome. Dans ce cas, le ribosome reste bloqué sur le PTC et provoque la formation du complexe SURF (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3) avec SMG8-SMG9. La présence d'un EJC (complexe déposé 20-24 nt en amont de chaque jonction exon-exon) en aval du PTC va servir de déclencheur du processus de NMD.

B. L'interaction entre les complexes SURF et EJC, par l'intermédiaire des protéines UPFs (UPF1 avec UPF2-UPF3), va former le complexe DECID et déclencher la phosphorylation d'UPF1 par la protéine kinase SMG1.

C. Un remodelage des particules ribonucléoprotéiques (mRNP) et le recrutement de protéines SMG (SMG6 et complexe SMG5-SMG7) permet ensuite de déclencher les étapes de dégradation endonucléolytique et exonucléolytique des transcrits contenant des PTC.

CBC: Cap-Binding Complex; EJC: Exon Junction Complex; eRF: eukaryotic Release Factor; m^7G : 7-methylGuanosine; PABPC: cytoplasmic poly(A)-binding protein. Adaptée d'après Le Hir et al., 2016

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

2006; Chamieh et al., 2008). L'interaction entre les membres des complexes EJC et SURF crée un nouveau complexe appelé « **DECID** » (pour « Decay Inducing complex ») (**Figure 42**) et conduit à la phosphorylation d'UPF1 et le déclenchement du NMD (pour revue Maquat, 2004; Kashima 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-binding Protein with Ser-rich domain 1 »), SRM 160, PININ et UAP56, également connu sous le nom de DDX39B, les facteurs de localisation de l'ARNm, et les protéines liées à l'export de l'ARNm ALY/REF et TAP (Tange et al., 2004; pour revue Le Hir et al., 2016).

Enfin, il est important de noter que dans un ARNm normal, tous les complexes EJC fixés vont être éliminés lors du premier tour de traduction (Lejeune et al., 2002; Dostie and Dreyfuss, 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 (pour revue Nicholson and Mühlemann, 2010).

iii. Premier tour de traduction : détection des PTC et déclenchement du NMD

La reconnaissance d'un PTC sur un ARNm et l'activation du mécanisme de NMD nécessitent une étape de traduction. En effet, il a été montré que le blocage de la traduction à l'aide de drogues comme la puromycine ou le cycloheximide (CHX) inhibe la dégradation des ARNm porteurs des PTC par NMD (Belgrader et al., 1993; Carter et al., 1995). La première étape de lecture par le ribosome permet de déplacer tous les complexes EJC présents sur le transcrite pour permettre une traduction active des ARNm (pour revue Singh and Lykke-Andersen, 2003). A l'inverse, la rencontre d'un PTC lors de cette primo-lecture ne permet pas d'éliminer les complexes EJC situés en aval sur l'ARNm. Le recrutement du complexe de terminaison de la traduction (eRF1, eRF3) au niveau du PTC et la présence d'EJC en aval permettent donc d'identifier spécifiquement les ARNm porteurs de PTC.

En absence de PTC, l'hétérodimère CBP20/CBP80 (CBP pour « Cap-Binding Protein ») fixé sur la coiffe 5' de l'ARN néosynthétisé est remplacé par eIF4E qui permet une synthèse protéique intense (Ishigaki et al., 2001; pour revue 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 est alors remplacée par PABPC1

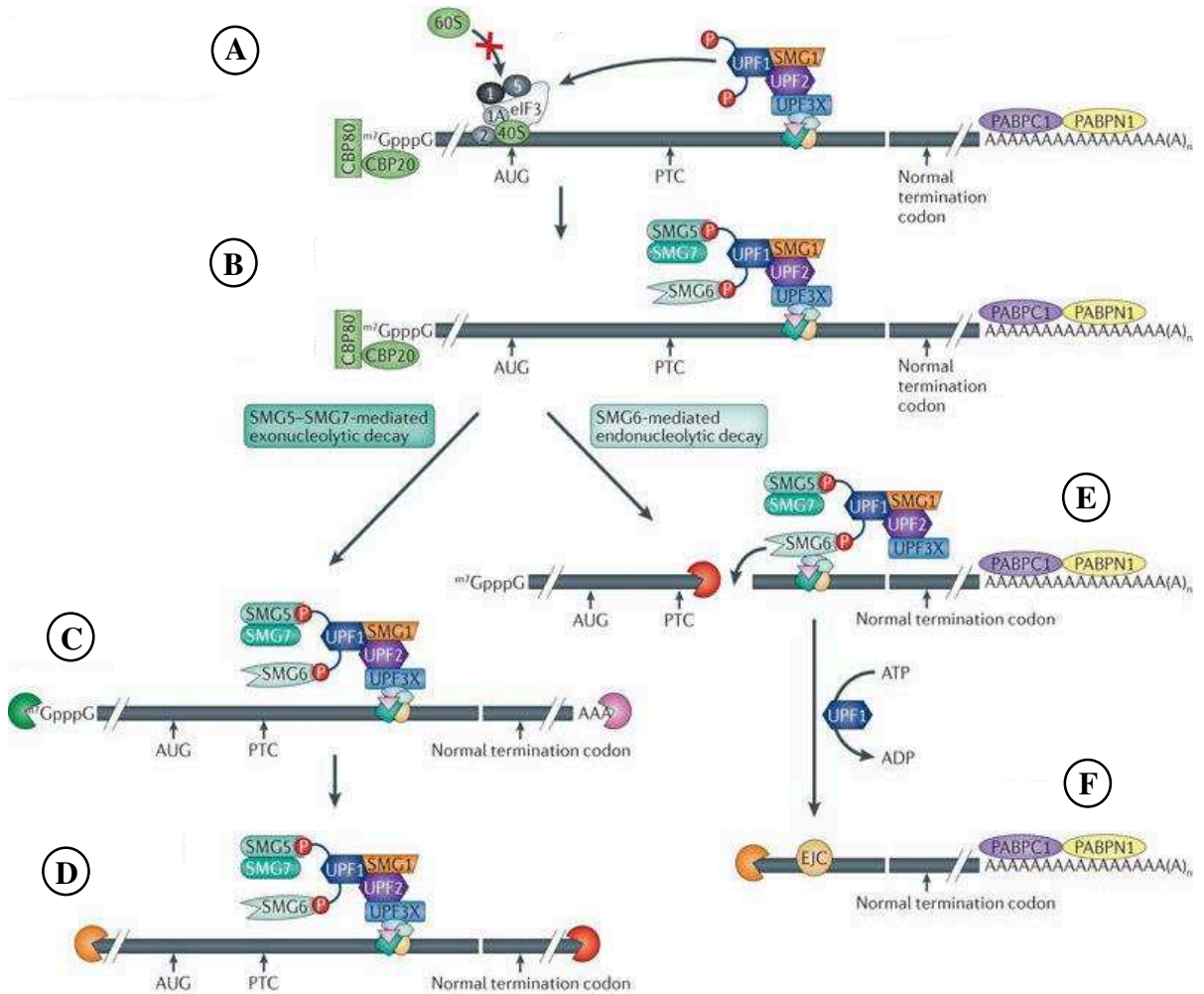


Figure 43 : Dégradation des transcrits porteurs de PTC

A. La protéine UPF1 phosphorylée inhibe la formation des ribosomes en se fixant sur eIF3

B. La phosphorylation d'UPF1 par la kinase SMG1 permet le recrutement de SMG6 et du complexe SMG5-SMG7

C et D. Le complexe SMG5-SMG7 induit la dégradation exonucléolytique de l'ARNm aberrant, où UPF1 phosphorylée serait fixée par SMG5-SMG7 ce qui conduirait au recrutement des enzymes de déadénylation et de « decapping » (ou élimination de la coiffe), telle que DCP2 (pour « Decapping mRNA 2 »), et enfin à la dégradation de l'ARNm non-sens par les exonucléases 3'-5' (RNA exosome) et 5'-3' (par exemple XRN1). La queue poly (A) est éliminée par des enzymes de déadénylation.

E et F. La protéine SMG6 entraîne un clivage endonucléolytique à proximité du PTC. L'ARNm aberrant est ensuite dégradé par des exonucléases. Adaptée d'après Schoenberg et Maquat, 2012

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

(pour « Poly (A)-Binding Protein Cytoplasmic 1 ») qui a la capacité de se fixer à la fois sur les transcrits liés à eIF4E et à CBP80 (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 plusieurs étapes de traduction (Sato and Maquat, 2009). En revanche, la présence de PTC empêche ces modifications de l'ARNm. De nombreuses études ont montré que le 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 lors du NMD et CBP80 peut interagir directement avec UPF1 et favoriser également l'interaction entre UPF1 et UPF2 (Hosoda et al., 2005). Dans ce sens, les travaux de Hwang et al. ont montré que la protéine de la coiffe CBP80 facilite la mise en place du complexe « DECID » en deux étapes séquentielles : tout d'abord, CBP80 stimule l'association de SMG1-UPF1 avec eRF1-eRF3 pour former le complexe « SURF » au niveau du PTC, et dans un deuxième temps CBP80 stimule l'interaction de SMG1-UPF1 dans « SURF » avec UPF2 dans l'EJC pour induire la phosphorylation d'UPF1 (Hwang et al., 2010; pour revue Schoenberg and Maquat, 2012). Cette phosphorylation d'UPF1 inhibe la traduction des ARNm non-sens et favorise la dégradation rapide des transcrits porteurs des PTC par NMD (pour revue Behm-Ansmant and Izaurralde, 2006; Kashima et al., 2006; Isken et al., 2008). En effet, UPF1 phosphorylée se fixe au facteur d'initiation de la traduction eIF3 et empêche ainsi la formation du ribosome, ce qui bloque les futurs cycles de traduction (Isken et al., 2008).

La phosphorylation d'UPF1 par la kinase SMG1 favorise également le remodelage du complexe de surveillance, essentiel pour rendre accessible les ARNm non-sens à la machinerie de dégradation par NMD (**Figure 43**) (Ohnishi et al., 2003; Kashima et al., 2006; pour revues : Behm-Ansmant and Izaurralde, 2006; Schoenberg and Maquat, 2012). Ainsi, deux voies sont possibles pour la dégradation des ARNm après la phosphorylation d'UPF1 : **(1)** La voie de dégradation exonucléolytique médiée par SMG5-SMG7 où UPF1 phosphorylée serait fixée par SMG5-SMG7 ce qui conduirait au recrutement des enzymes de déadénylation et de « decapping » (ou élimination de la coiffe), telle que DCP2 (pour « Decapping mRNA 2 »), et enfin à la dégradation de l'ARNm non-sens par les exonucléases 3'-5' (RNA exosome) et 5'-3' (par exemple XRN1) (**Figure 43C et D**) ; **(2)** La voie de dégradation endonucléolytique médiée par SMG6 où UPF1 phosphorylée serait fixée par la protéine SMG6 ce qui induirait un clivage endonucléolytique à proximité du PTC et la dégradation des deux fragments par des

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

exonucléases (**Figure 43E et F**) (Muhlrad and Parker, 1994; pour revue Lejeune et al., 2003; Huntzinger et al., 2008; Eberle et al., 2009b).

iv. Dégradation par NMD des transcrits d'Ig non-productifs

Le NMD joue un rôle crucial dans le maintien d'un répertoire d'Ig fonctionnel, via la dégradation des transcrits non-productifs (pour revue Li and Wilkinson, 1998).

- **Dégradation par NMD des ARNm IgH porteurs de PTCs**

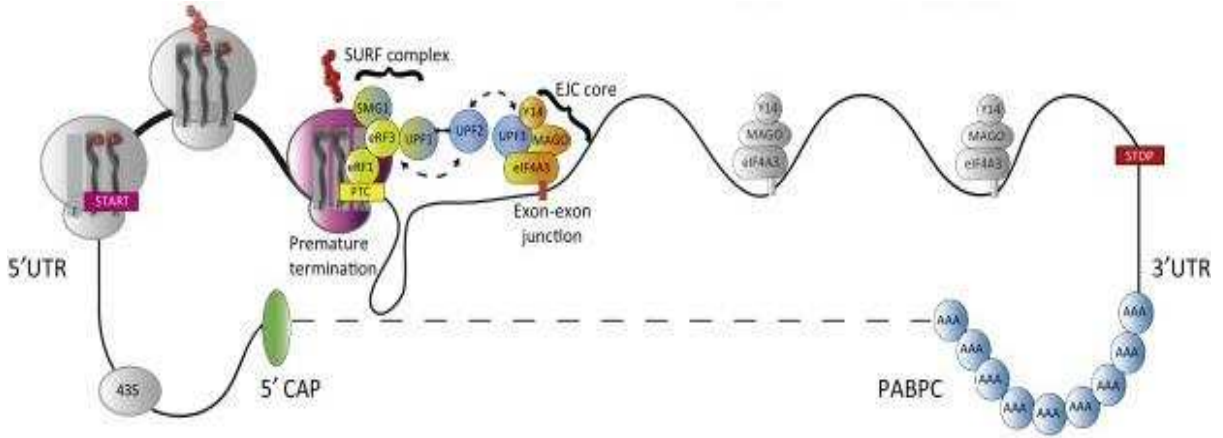
Plusieurs études réalisées dans des lignées cellulaires ont révélé la dégradation des transcrits IgH non-productifs par NMD (Baumann et al., 1985; Jäck et al., 1989; Connor et al., 1994; Bühler et al., 2004). Dans ce sens, certaines études montrent une diminution d'un facteur 100 des transcrits IgH contenant des PTC (pour revue Li and Wilkinson, 1998), suggérant une NMD très efficace pour les transcrits d'Ig.

Pour les chaînes lourdes IgH, les décalages du cadre de lecture lors des jonctions entre les segments V, D et J entraînent l'apparition de PTC soit au niveau de l'exon variable VDJ, soit dans le premier exon codant le domaine constant (C_{H1}). Dans ces deux cas, les transcrits non-sens respectent la règle de position du PTC à plus de 50-55 nucléotides 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 contenant de PTC (Bühler et al., 2004; Tinguely et al., 2012). Cette dégradation très efficace des transcrits IgH non-sens peut également être favorisée par la présence de séquences particulières au sein de l'exon VDJ, capables de renforcer l'activité du NMD (Bühler et al., 2004).

- **Dégradation par NMD indépendante de l'EJC : cas des ARNm Ig κ non-productifs**

La jonction entre les segments V et J des chaînes légères peut induire des décalages du cadre de lecture et l'apparition de PTC soit dans le dernier exon codant le domaine constant (C_{κ}), soit trois nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon. Dans ces deux 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 nucléotides). Ainsi, la dégradation des transcrits Ig κ non-productifs par NMD est nettement moins efficace que celle des transcrits IgH non-sens.

A. Modèle « EJC-dépendant »



B. Modèle « EJC-Indépendant »

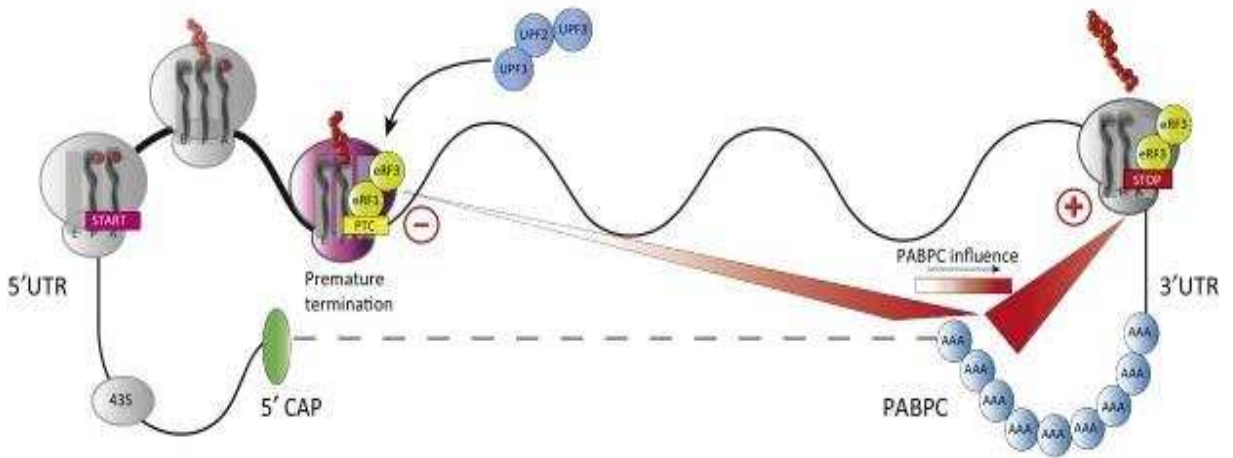


Figure 44 : Dégradation par NMD dépendante ou indépendante de l'EJC

La ligne noire indiquent le sens du déplacement du ribosome lors de la traduction.

La ligne pointillée représente une interaction putative entre la coiffe 5' et les protéines PABPC pour maintenir l'ARNm dans une conformation en boucle fermée.

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 processus de NMD « EJC-dépendant », la présence d'un PTC exige le dépôt du complexe EJC 20 à 24 nucléotides 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 (petites flèches en pointillé) induit la phosphorylation d'UPF1 par la kinase SMG1, ce qui initie la dégradation des transcrits non-sens.

B. Lors du processus de 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). 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 mis en place, UPF1 est phosphorylée et la dégradation de l'ARNm peut s'initier.

Adaptée d'après Brogna et al., 2016

Chapitre 2. Epissage alternatif et surveillance des transcrits d'Ig non-productifs

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 (Delpy et al., 2004b; Chemin et al., 2010). 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). 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 protéines associées à la queue poly (A) et les facteurs de terminaison de la traduction (Amrani et al., 2004, 2006). Le déclenchement du NMD « EJC-indépendant » dépend aussi de la distance physique entre un PTC et la queue poly (A). Dans ce sens, Bühler et al. 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 non-sens peut être inhibée en ramenant la queue poly (A) au voisinage du PTC (Bühler et al., 2006; Eberle et al., 2008).

Dans le cadre du modèle de NMD « EJC-indépendant », il existe une compétition cinétique entre les protéines eRF3, PABPC1 et UPF1 le facteur clé du NMD (**Figure 44**) (Ivanov et al., 2008; Singh et al., 2008; pour revue Brogna et al., 2016). En effet, l'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 ces interactions (**Figure 44**). Dans ce cas, le ribosome reste bloqué au niveau du PTC et favorise les interactions entre eRF3 et UPF1 et la mise en place du complexe « SURF ». Ensuite, UPF1 va recruter d'autres acteurs du NMD comme UPF2 et UPF3 et permettre la dégradation de l'ARNm non-sens (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).

Problématiques

Mes travaux de thèse ont d'abord permis d'étudier l'épissage alternatif par « saut d'exon » des transcrits d'Ig non-productifs, dans des cellules B primaires et des plasmocytes. Ces travaux ont révélé la toxicité des chaînes d'Ig dépourvues de domaine variable dans les plasmocytes, et mis en évidence l'existence d'un nouveau point de contrôle au cours de la différenciation plasmocytaire (Srouf et al., 2016 : cf Annexe 1). Ce phénomène nommé TIE-checkpoint (Truncated-Ig Exclusion) conduit à l'élimination des plasmocytes exprimant des Ig tronquées, après un saut d'exon lors de l'épissage des transcrits Igκ non-productifs. Cependant, l'existence du TIE-checkpoint limite considérablement l'analyse du mécanisme de NAS (pour « Nonsense-associated Altered Splicing ») des transcrits d'Ig in vivo. A l'aide d'un modèle murin disponible au laboratoire et présentant un exon non-sens additionnel au locus IgH (Delpy et al., 2003; Tinguely et al., 2012), j'ai pu réaliser une analyse moléculaire du saut d'exon et montré le lien entre la transcription des allèles d'Ig non-productifs et l'efficacité de cet épissage alternatif (Ashi et al., soumis : Article 1).

Ensuite, j'ai réalisé une étude montrant une boucle de régulation positive entre deux mécanismes de surveillance, agissant au niveau des ARNm (NMD) et au niveau protéique (réponse UPR, autophagie, activation du protéasome). La mise en évidence de cette coopération dans les plasmocytes aurait pour effet de limiter l'expression d'Ig tronquées tout en autorisant la synthèse massive d'Ig (Ashi et al., Manuscrit en préparation : Article 2).

Enfin, je me suis intéressé au rôle de l'épissage des transcrits d'Ig non-codants (appelés transcrits I « germinaux ») au cours du processus de CSR (pour « Class Switch Recombination »). Cette étude a apporté des précisions sur le rôle des sites donneurs d'épissage des exons I en montrant que leur délétion diminue la transcription et l'accessibilité des régions Switch (S) à l'enzyme AID (Ashi et al., Manuscrit en préparation : Article 3).

Résultats

Résultats

- ❖ **Article 1. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells**

Mohamad Omar Ashi^{*a}, Nivine Srour^{*a}, Jean-Marie Lambert^a, Anne Marchalot^a, Ophélie Martin^a, Sandrine Le Noir^a, Eric Pinaud^a, Maria Victoria Ayala^a, Christophe Sirac^a, Jérôme Saulière^a, Michel Cogné^{2,a} and Laurent Delpy^{1,a}

Soumis dans *Journal of Experimental Medicine*

- ❖ **Article 2. Evidence for a positive regulatory loop between unfolded protein response and nonsense-mediated mRNA decay in plasma cells**

Or

Crosstalk between unfolded protein response and non-sense mediated mRNA decay in plasma cells

Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srour¹, Estelle Troadec¹, Jean-Marie Lambert¹, XXX, Christophe Sirac¹, Michel Cogné^{1,2}, Faraj Terro¹ and Laurent Delpy¹

En préparation

- ❖ **Article 3. A role for donor splice site of germline I exons in antibody class switching**

Mohamad Omar Ashi^a, Jean Marie Lambert^a, Anne Marchalot^a, Soazig Le Pennec^a, Nivine Srour^a, Aurélien Tinguely^a, Michel Cogné^{2,a} and Laurent Delpy¹

En préparation

Article 1

Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells

Mohamad Omar Ashi^{*a}, Nivine Srour^{*a}, Jean-Marie Lambert^a, Anne Marchalot^a, Ophélie Martin^a, Sandrine Le Noir^a, Eric Pinaud^a, Maria Victoria Ayala^a, Christophe Sirac^a, Jérôme Saulière^a, Michel Cogné^{2,a} and Laurent Delpy^{1,a}

Soumis dans Journal of Experimental Medicine

Ces résultats ont fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées.

- ✓ Poster : Journée Institut GEIST, Limoges, 2017, Décembre 20.
- ✓ Communication orale : Workshop Onco-Immunology Cancéropôle GSO, Toulouse, 2017, Juin 12.
- ✓ Poster : 12^{èmes} Journées Cancéropôle GSO, Montpellier, 2016, Novembre 23-25.

Objectifs :

Ce travail est en lien avec notre précédente étude (cf Annexe 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 »), à la production de chaînes d'Ig dépourvues de domaine variable (V) et, à la disparition des plasmocytes par activation du Truncated Ig Exclusion (TIE-) checkpoint. En éliminant les plasmocytes exprimant des allèles Igk réarrangés de façon non-productive, ce nouveau point de contrôle tardif façonne le repertoire des Ig, indépendamment de toute spécificité antigénique (Srour et al., 2016).

L'apoptose des plasmocytes consécutive à l'activation du TIE-checkpoint rend difficile l'analyse moléculaire du NAS des 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 murin Knock-in (IgH^{frVk}) présente un exon « frameshift » additionnel au locus IgH (Tinguely et al., 2012) et permet d'étudier le NAS des transcrits IgH non-sens sans activer le TIE-checkpoint. En effet,

l'élimination de cet exon non-sens additionnel par épissage alternatif génère des transcrits IgH productifs, codant des chaînes d'Ig fonctionnelles. Cette étude originale a permis d'analyser la régulation du NAS des transcrits d'IgH non-sens au cours de la différenciation plasmocytaire. Nous avons pu mettre en évidence que l'hypertranscription des allèles IgH non-productifs dans les plasmocytes est corrélée à un fort taux de saut d'exon. Ainsi, l'activation du TIE-checkpoint, provoquant la disparition des plasmocytes hébergeant des réarrangements V(D)J non-productifs, est la conséquence **i)** d'une amplification du NAS des Ig (Ashi et al., Article 1) et, **ii)** d'une grande sensibilité des plasmocytes au stress engendré par les Ig tronquées (Srou et al., 2016).

Notre étude a également permis de montrer que l'administration passive d'oligonucléotides antisens (AON) amplifie considérablement l'élimination des exons V par saut d'exon (Ashi et al., Article 1), ouvrant de nouvelles voies pour promouvoir le TIE-checkpoint à des fins thérapeutiques dans les dyscrasies plasmocytaires (Delpy et al, brevet WO2017/089359).



Laurent Delpy, PhD, Research Director at CNRS
CNRS UMR 7276 – INSERM 1262 / Control of B-cell Immune Response of Lymphoproliferations (CRIBL)
CBRS (Biology and Health Research Center) - Faculty of Medicine
2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France
Tel: +33 519 564 214 / Fax : +33 555 435 897 / mail: laurent.delpy@unilim.fr

Limoges, March 07th, 2018

Editorial board of the Journal of Experimental Medicine

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled "Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells" by Ashi et al which we would like to submit for publication in The Journal of Experimental Medicine.

This manuscript provides evidence that strong biallelic transcription of VDJ-rearranged immunoglobulin (Ig) genes during plasma cell (PC) differentiation favors skipping of variable (V) exons following either physiological nonsense-associated altered splicing (NAS), or passive administration of splice-switching antisense oligonucleotides (ASOs).

We recently demonstrated that NAS of Ig κ pre-mRNAs impacts PC survival by activating the Truncated Immunoglobulin Exclusion (TIE-) checkpoint (Srouf et al., 2016; highlighted by Dempsey, 2016). However, this NASTy (Maquat, 2002) effect blunting the differentiation of PC-expressing nonproductively rearranged Ig alleles precludes the analysis of V exon skipping *in vivo*. Using a dedicated mouse model harboring a supplemental frameshift-inducing V exon at the IgH locus, we showed a drastic increase in NAS of IgH pre-mRNAs in PCs, compared to B cells. Simultaneously, we observed an up-regulation of numerous RNA splicing genes in differentiating PCs and NAS-induced changes of chromatin marks in the skipped V exon (turned into a pseudo-intron). In addition, we showed that modifying Ig RNA splicing was achievable with ASOs hybridizing to the V exon donor splice site. As a new strategy for specifically affecting the fate of PCs transcribing a given rearranged J segment, the proof of concept for ASO-mediated V exon skipping should thus open new avenues for therapeutic strategies of "inducible-TIE" in PC dyscrasias. Finally, this study shows that in PCs, TIE-induced apoptosis results from the combined effects of increased NAS of Ig pre-mRNAs and intrinsic sensitivity towards exacerbated endoplasmic reticulum stress.

The length of abstract, introduction, results, discussion and figure legends sections conforms to editorial style limitations. All authors concur with the submission of this article and have no conflict of interest.

We hope that the quality of this manuscript will be judged suitable for external review.



With best regards,
Laurent Delpy, PhD (corresponding authors)

References:

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. doi:10.1101/gad.1014502.

Srouf, N., G. Chemin, A. Tinguely, M.O. Ashi, Z. Oruc, S. Péron, C. Sirac, M. Cogné, and L. Delpy. 2016. A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.* 213:109–122. doi:10.1084/jem.20131511.

Research highlights: Dempsey, L.A. 2016. Plasma cell checkpoint. Nat. Immunol. 17:229–229. doi:10.1038/ni.3401.

Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells

Mohamad Omar Ashi*¹, Nivine Srour*², Jean-Marie Lambert¹, Anne Marchalot¹, Ophélie Martin¹, Sandrine Le Noir¹, Eric Pinaud¹, Maria Victoria Ayala¹, Christophe Sirac¹, Jérôme Saulière¹, Michel Cogné^{1,3} and Laurent Delpy^{1,a}

¹ Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7276, INSERM U1262- Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations, Université de Limoges, Limoges, France.

² Present address: Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, 3755 Cote Ste-Catherine Road, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1E2.

³Institut Universitaire de France, Université de Limoges, Limoges, France.

^a 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

*contributed equally

Running title: **Skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells**

Abbreviations: ASO: antisense oligonucleotide, NAS: nonsense-associated altered splicing,

NMD: nonsense-mediated mRNA decay, PC: plasma cell, PTC: premature termination codon.

Abstract

The error-prone nature of V(D)J recombination generates considerable amounts of nonproductive immunoglobulin (Ig) pre-mRNAs and aberrant Ig chains lacking variable (V) domains can be produced after nonsense-associated altered splicing (NAS) events. Remarkably, the expression of truncated Ig polypeptides heightens endoplasmic reticulum stress and shortens the lifespan of plasma cells (PC), precluding the molecular analysis of NAS of Ig pre-mRNAs. Using a mouse model harboring an additional frameshift-inducing V exon ("frV κ ") on the nonproductive Ig heavy chain (IgH) allele and hence, allowing V exon skipping without production of aberrant Ig chains, we found that the biallelic boost of IgH transcription accompanying PC differentiation supports huge NAS activation. Chromatin analysis further revealed that the skipped V exon turned into a pseudo-intron. Finally, we provide evidence that passive administration of splice-switching antisense oligonucleotides (ASOs) strongly enhanced V exon skipping, opening new avenues for targeting Ig RNA splicing in PC disorders.

Introduction

During the V(D)J recombination process, the combinatorial and junctional diversity ensures that the immunoglobulin (Ig) primary repertoire is adapted to the vast heterogeneity of antigens. However, random nucleotide additions or deletions generate numerous out-of-frame V(D)J junctions that lead to the appearance of premature termination codons (PTCs) in Ig mRNAs (Li and Wilkinson, 1998). The nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway is activated during the pioneer round of translation and ensures rapid degradation of PTC-containing mRNAs (Maquat, 2004). Several reports including ours documented strong degradation of nonproductively rearranged Ig mRNAs, limiting the synthesis of truncated Ig polypeptides (Baumann et al., 1985; Jäck et al., 1989; Chemin et al., 2010; Tinguely et al., 2012). Activation of another RNA surveillance pathway referred as nonsense-associated altered splicing (NAS) can also prevent the maturation of full length PTC-containing mRNAs (Valentine, 1998; Maquat, 2002; Chang et al., 2007). Whereas NMD basically protects cells from truncated protein synthesis, NAS can exert opposite effects and yield internally deleted mRNAs and proteins. Activation of the NAS pathway remains poorly characterized and knockdowns of several key NMD factors as UPF1 (up-frameshift protein 1), UPF2, UPF3a, UPF3b and SMG1 showed that NAS and NMD might be mechanistically different sharing only the key NMD factor UPF1 (Bühler and Mühlemann, 2005; Chang et al., 2007; Hwang and Kim, 2013; Maquat, 2004; Mendell et al., 2002; Wang et al., 2002b; a). Two classes of NAS have been characterized: class-I NAS depends on the disruption of *cis*-splicing elements like exonic splicing enhancers (ESE) by all the types of mutations, nonsense, silent or missense (Maquat, 2002; Valentine, 1998) and, class-II NAS is caused by disruption of the reading frame (Chang et al., 2007; Wang et al., 2002b; a). It remains elusive whether a nuclear-scanning system or a cyto-nuclear feedback regulation is involved in the class-II NAS (Wang et al., 2002a).

Until recently, the consequences of NAS of Ig pre-mRNAs with regard to the production of shortened Ig chains have been overlooked. Our findings revealed that the presence of nonsense codons within the variable (V) exon enhanced exon skipping and the production of V-domain less Ig κ light chains (Δ V- κ LCs) (Chemin et al., 2010; Srour et al., 2016). Remarkably, these truncated Ig chains exhibited toxic effects and induced endoplasmic reticulum (ER) stress-associated apoptosis in antibody-secreting cells (Srour et al., 2016). Hence, the production of Δ V- κ LCs blunts plasma cell (PC) differentiation through activation of an antigen-independent process that we called Truncated Ig Exclusion (TIE-) checkpoint. This novel PC checkpoint modifies the Ig repertoire by eliminating terminally differentiated cells harboring biallelic Ig κ rearrangements with a PTC-containing V exon (V^{PTC}) on the nonproductive allele. Thus, aberrantly rearranged Ig alleles are frequent but not innocuous and their translation into truncated Ig chains is often possible after skipping of V^{PTC} exons.

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 the TIE-checkpoint provokes PC death as a consequence of a deregulated proteostasis, its activation *per se* precludes the analysis of V exon skipping. Accordingly, alternatively spliced mRNAs (alt-mRNAs) encoding structurally abnormal Ig chains are hardly detectable in PCs (Srour et al., 2016). To overcome this issue and decipher how exon skipping events are regulated during PC differentiation, we exploited a mouse model harboring an additional frameshift-inducing V exon (frV κ) at the Ig heavy (IgH) chain locus (Delpy et al., 2003; Reynaud et al., 2005). Using this dedicated model, skipping of the supplemental frV κ exon does not encode truncated Ig chains provided in-frame VDJ junctions. Therefore, by uncoupling Ig exon skipping to the activation of the TIE-checkpoint, we could depict the regulation of NAS of IgH

pre-mRNAs *in vivo*. As a new strategy for specifically affecting the fate of PCs transcribing a given V exon, we also assessed whether V exon skipping was achievable with splice-switching antisense oligonucleotides (ASOs). The proof of concept for ASO-mediated V exon skipping should thus open new avenues for “inducible-TIE” therapeutic approaches in PC dyscrasias (patent WO2017089359A1).

RESULTS

Determining exon skipping of IgH transcripts *in vivo*

To evaluate the extent of nonsense-associated Ig exon skipping during PC differentiation, experiments were performed using heterozygous IgH^{wt/frVκ} knock-in mice (Delpy et al., 2003; Reynaud et al., 2005). In this model, the expression of VDJ-rearranged IgH^{wt} alleles drives B cell development whereas the supplemental frVκ exon leads to the appearance of PTCs that trigger NMD degradation of full-length IgH^{frVκ} mRNAs (Tinguely et al., 2012). By contrast, activation of the NAS pathway can yield functional IgH chains by eliminating the frVκ exon from transcripts with in-frame VDJ junctions (Fig. 1 A).

In IgH^{wt/frVκ} mice with a mixed B6/129 background, allotypic differences allow to distinguish between IgM^b expression from the IgH^{wt} allele and IgM^a produced upon exon skipping of VDJ-rearranged IgH^{frVκ} pre-mRNAs. The secretion of total IgM, IgM^a and IgM^b was assessed in sera of B6, F1 (B6/129) and IgH^{wt/frVκ} mice, using standard or allotype-specific ELISA assays. Sera from B6 mice served as negative controls for anti-IgM^a assays. As expected, similar serum concentrations of total IgM and IgM^b were found in B6 and IgH^{wt/frVκ} mice (Fig. 1, B and D). Interestingly, we found significant amounts of IgM^a in sera from IgH^{wt/frVκ} mice, albeit diminished compared to F1 (B6/129) mice in which ~50% of the B-lineage cells express a functional IgH^a allotype (Fig. 1 C). Thus, NAS is involved in the processing of nonproductive IgH pre-mRNAs, eliciting active translation of alternatively spliced (alt-) mRNAs in PCs harboring biallelically VDJ-rearranged IgH alleles.

High rate of NAS of IgH pre-mRNAs in PCs

To assess the regulation of NAS of IgH pre-mRNAs at the molecular level, alt-mRNA amounts were quantified in B and PCs. For that, IgH^{frVκ} knock-in mice were crossed with DH-LMP2A mice

harboring a replacement of JH segments by the Epstein-Barr virus LMP2A gene under the control of a DH promoter (Casola et al., 2004). The expression of LMP2A drives B cell development and PC differentiation (Casola et al., 2004; Lechouane et al., 2013). In heterozygous $IgH^{DH-LMP2A/frV\kappa}$ mice, VDJ-rearranged IgH transcripts arise solely from the nonproductive $IgH^{frV\kappa}$ allele, facilitating the analysis of NAS of $IgH^{frV\kappa}$ pre-mRNAs. B cells ($B220^+/CD138^-$) and PCs ($B220^-/CD138^+$) were isolated from spleens of $IgH^{DH-LMP2A/frV\kappa}$ mice (Fig. 2 A), and RT-PCR analysis revealed high alt-mRNA amounts in PCs whereas a faint band was detected in B cells (Fig. 2 B). Next, the rate of NAS of $IgH^{frV\kappa}$ transcripts was determined by qPCR and corresponded to alt-mRNA/pre-mRNA ratios. Likewise, this NAS rate was strongly increased in PCs compared to B cells (Fig. 2 C). Then, we analyzed the VDJ repertoire of alt-mRNAs, as described (Wesemann et al., 2013). Highly diverse productive CDR3 junctions were obtained among the 11506 clonotypes identified using IMGT/HighV-QUEST (Aouinti et al., 2016) (Fig. 2 D). In addition, VDJ junctions involved numerous VH and DH families and all the JH segments (Fig. S1). The nearly absence (0.35%) of nonproductive CDR3 junctions reflected the strong degradation of PTC-containing $Ig\mu$ mRNAs (Tinguely et al., 2012) and the coupling of NMD and NAS pathways (Pan et al., 2006). This repertoire analysis revealed that alt-mRNAs arose from polyclonal PCs rather than rare clones selected after splice site mutations. Hence, a marked upregulation of NAS of IgH pre-mRNAs occurs during PC differentiation.

Elevated expression of VDJ-rearranged IgH alleles and RNA splicing genes during PC differentiation

Many evidences have reported that the rate of transcription by RNA Polymerase II (RNAPII) can regulate alternative splicing (de la Mata et al., 2011; Schor et al., 2009). To address this question, the transcription of nonproductive $IgH^{frV\kappa}$ alleles was evaluated by quantifying pre-

mRNA levels in B cells (B220⁺/GL7⁻/FAS⁻/CD138⁻), germinal center (GC-) B cells (B220⁺/GL7⁺/FAS⁺/CD138⁻) and PCs (B220⁻/CD138⁺) isolated from spleens of SRBC-immunized IgH^{wt/frVκ} mice (Fig. 3 A). Consistent with the increase of Ig gene transcription during PC differentiation (Park et al., 2014b), we found about 3-fold more IgH^{frVκ} pre-mRNA levels in PCs compared to B cells (Fig. 3 B). Next, we performed a comparative analysis of RNAPII binding on productive and nonproductive IgH alleles, in LPS-stimulated B cells isolated from IgH^{wt/frVκ} mice. Supporting a biallelic IgH transcription pattern, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments revealed similar phosphorylated serine 2 (Ser2P) and 5 (Ser5P) RNAPII levels on both IgH alleles (Fig. 3, C and D). The nuclear location of IgH alleles was further analyzed in B cells, LPS-stimulated B cells, GC-B cells and PCs, by DNA-FISH using IgH specific probes (Fig. 3 E). We observed that asymmetric heterochromatin recruitment of one IgH allele was extremely rare (<20%), in the vast majority of B-lineage cells including terminally differentiated PCs.

Next, the expression of genes involved in RNA splicing (Gene ontology ID GO:0008380, n=360) was assessed in purified follicular (FO-) B cells, GC-B cells, plasmablasts (PBs) and PCs, using available microarray dataset GSE26408 and GenomicScape platform (www.genomicscape.com) (Kassambara et al., 2015). Multiclass analysis revealed that the expression profile of RNA splicing regulators is highly modified during PC differentiation, with 249 (~70%) genes differentially expressed and among them 106 (>40%) were significantly overexpressed in PCs (Fold change > 1.5 and p < 0.05) (Fig. 4 and Table S1). These data underline specific gene expression patterns related to RNA splicing at the different stages of B cell maturation with a significant enrichment of genes related to the spliceosomal complex in PCs, identified with gene set expression analysis (GSEA).

Thus, biallelic hypertranscription of IgH alleles together with huge modifications of the RNA splicing environment are triggered during PC differentiation, and this was correlated with the reinforcement of NAS of IgH pre-mRNAs.

Delineating the chromatin profile of the alternative frV κ exon

To evaluate the interplay between NAS and chromatin structure, a comparative analysis of specific histone H3 marks was done in alternative frV κ exon, constitutive CH1 μ exon and intronic "JH-E μ " sequence (Fig. 5 A). CHIP experiments were performed using anti-H3K4me3, H3K9me3, H3K9ac and H3K36me3 antibodies, in LPS-stimulated B cells isolated from IgH^{wt/frV κ} mice. Remarkably, the alternative frV κ exon and the "JH-E μ " intron exhibited highly similar chromatin profiles, for all the tested epigenetic marks (Fig. 5, B-E). By contrast, alternative frV κ and constitutive CH1 μ exons displayed striking differences. H3K4me3 and H3K9ac levels were increased (Fig. 5, B and C), whereas H3K9me3 and to lower extent H3K36me3 were decreased in the alternative frV κ exon, compared to the constitutive CH1 μ exon (Fig. 5, D and E). Supporting the idea that epigenetic histone marks can influence the pattern of alternative splicing by favoring exclusion or inclusion of alternative exons (Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Luco et al., 2010; Saint-André et al., 2011; Zhou et al., 2014), skipped frV κ exons exhibited an "intron-like" chromatin signature.

ASO-mediated exon skipping of Ig transcripts

In recent years, the considerable improvement in terms of stability and cellular penetration of ASOs pushed the development of these molecules for medical purposes in various genetic diseases, and in particular for the treatment of neuromuscular disorders (Benchaouir et al., 2015; Groen et al., 2018; Stein and Castanotto, 2017). By simply monitoring the production of

IgM^a following exon skipping events, the IgH^{wt/frVκ} mouse model represents a unique tool facilitating the analysis of ASO-mediated Ig exon skipping approaches in primary B and PCs. To address this issue, LPS-stimulated B cells were treated with a specific “vivo-morpholino” ASO targeting the frVκ exon donor splice site (ASO-frVκ_{dss}) (Fig. 6 A), or with an irrelevant ASO as control (ASO-ctrl). Remarkably, the passive administration of ASO-frVκ_{dss} strongly improved the secretion of IgM^a in culture supernatants (Fig. 6 B). We also observed that both the frequency of IgM^a positive cells (Fig. 6, C and D) and the mean fluorescence intensity (MFI) of IgM^a (Fig. 6 E) were increased after ASO-frVκ_{dss} treatment, compared to ASO-ctrl. Based on previous observations showing that biallelic VDJ-rearrangements are retrieved in ~40% of B-lineage cells (Mostoslavsky et al., 2004), and that ~22 % of VDJ-rearranged IgH^{frVκ} transcripts exhibited in-frame CDR3 junctions (Tinguely et al., 2012), we estimated a theoretical maximum of IgM^a-expressing cells of ~8.8 %. Interestingly, the frequency of plasmablasts (PB)-expressing IgM^a reached ~7.5% after ASO-frVκ_{dss} treatment, indicating that passive administration of ASOs was highly efficient (~85% of the theoretical maximum) targeting nearly all antibody-secreting cells (Fig. 6 D). Likewise, we found that ASO-frVκ_{dss} treatment drastically increased the rate of frVκ exon skipping, by monitoring alt-mRNA/pre-mRNA ratios (Fig. 6 F). Of note, we observed similar proliferative responses (Fig. S2 A) and Igκ light chain production (Fig. S2 B) in LPS-stimulated B cells treated or not with ASOs, indicating that ASO treatment did not induced adverse toxic effects. Hence, passive administration of ASO targeting V exon donor splice sites strongly induces exon skipping in PCs.

DISCUSSION

Alternative splicing regulates gene expression and affects more than 90% of multiexonic pre-mRNAs in humans (Blencowe, 2006; Johnson et al., 2003; Wang et al., 2008). Likewise, ASO-mediated splicing modulation can be exploited for numerous therapeutic purposes (Aartsma-Rus and van Ommen, 2010). In this study, we provide evidence that the boost of Ig gene transcription accompanying PC differentiation promotes NAS of VDJ-rearranged IgH pre-mRNAs and facilitates ASO-mediated skipping of V exons.

Several studies including ours have shown that the pattern of IgH gene transcription is mostly biallelic in B cells and PCs, and that RNA surveillance pathways like NMD ensure the monoallelic expression of productively recombined Ig genes (Daly et al., 2007; Delpy et al., 2004a; Holwerda et al., 2013; Park et al., 2014b; Tinguely et al., 2012). Accordingly, we found that ~80% of mature B cells and PCs exhibited no IgH allele in heterochromatin. This frequency is consistent with previous 3D RNA FISH data showing that >80% of IgH and Ig κ genes are biallelically transcribed in PCs (Park et al., 2014b). ChIP experiments further revealed similar Ser2P and Ser5P RNAPII binding on both IgH alleles in LPS-stimulated B cells. In agreement with a drastic increase of Ig gene transcription during PC differentiation, we found that the amount of nonproductive IgH pre-mRNAs was ~3-fold higher in PCs, compared to B cells. Altogether, biallelic hypertranscription of Ig genes generates high levels of nonproductively V(D)J-rearranged Ig pre-mRNAs in antibody-secreting cells.

We previously observed that the NAS pathway was involved during splicing of nonproductive Ig κ pre-mRNAs and encoded shortened κ polypeptides (Chemin et al., 2010; Srour et al., 2016). Because the production of Δ V- κ LCs is toxic in PCs and triggers their elimination *via* the TIE-checkpoint (Srour et al., 2016), it remains very challenging to examine the regulation of NAS of Ig pre-mRNAs *in vivo*. Using our dedicated IgH^{fr κ} model allowing skipping of V exon

without production of truncated Ig chain, we found that the magnitude of NAS of IgH pre-mRNAs is greatly enhanced in PCs, compared to B cells. Therefore, increasing Ig gene expression in PCs with biallelic V(D)J-rearrangements favors antibody production, but detrimentally induces activation of the TIE-checkpoint after nonsense-associated exon skipping events. These data strongly suggest that NAS and conventional alternative splicing are governed by similar rules and controlled by the transcription elongation rate (Nogués et al., 2003; Pandit et al., 2008; Shukla and Oberdoerffer, 2012; Zhou et al., 2014; Schor et al., 2009). The transcriptomic analysis in Fig. 4 also indicates that PC differentiation entails major changes with regard to the expression of genes involved in RNA splicing. Although the precise role of differentially expressed genes deserves further investigation, these data are consistent with previous findings showing that the elevated expression of the transcription elongation factor ELL2 (eleven nineteen lysine-rich leukemia gene) favors the recruitment of proteins involved in splicing of Ig pre-mRNAs (Martincic et al., 2009; Park et al., 2014a). Thus, we propose that rapid RNAPII elongation rates together with massive changes in the expression of RNA splicing regulators should support elevated NAS of Ig pre-mRNAs during PC differentiation.

Several studies have identified a specific histone mark signature around alternative exons (Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Luco et al., 2010; Saint-André et al., 2011; Zhou et al., 2014). Interestingly, trimethylation and acetylation of H3K9 have been associated to inclusion or exclusion of alternative exons, respectively (Saint-André et al., 2011; Schor et al., 2009). High levels of H3K9me3 promotes heterochromatin protein 1 γ (HP1 γ) recruitment and provokes a local slowdown of RNAPII, supporting the inclusion of CD44 variant exons (Saint-André et al., 2011). By contrast, a local increase in H3K9ac is associated with exclusion of NCAM (neural cell adhesion molecule) exon 18 during the depolarization of human neuronal cells (Schor et

al., 2009). Remarkably, we observed a massive enrichment in H3K9ac, and an opposite decrease in H3K9me3, at the skipped frV κ exon, compared to the constitutive CH1 μ exon. Altogether, this chromatin profile revealed that the alternative frV κ exon is turned into a pseudo-intron.

The technology of "gene surgery" based on the use of short ASOs to modify the splicing pattern of a gene was developed for over twenty five years (Dominski and Kole, 1993). Novel chemistries, such as tricyclo-DNA or PPMO (peptide conjugated-phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides), continue to expand the possibilities of applications (Goyenvalle et al., 2015; Betts et al., 2012). B-PMO (B peptide-conjugated PMO) have been used to correct splicing of BTK (Bruton's tyrosine kinase) and restore its function in an animal model of XLA (X-linked agammaglobulinemia) (Bestas et al., 2014). Likewise, ASO-mediated skipping of exon 6 of MDM4 (mouse double minute 4) reduces tumor growth in patient-derived xenograft (PDX) models of melanoma and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) (Dewaele et al., 2016). In this study, we validated that ASO-mediated Ig exon skipping can be easily achieved by targeting the donor splice site of V exons, opening new avenues for therapeutic activation of the TIE-checkpoint in PC dyscrasias (patent WO2017089359A1).

Although nonproductively V(D)J-recombined alleles are usually considered as passengers rather than drivers, NAS of Ig pre-mRNAs can activate a TIE-checkpoint and eliminate PC with biallelic Ig gene rearrangements. Thus, TIE-induced apoptosis results from the combined effects of increased NAS of Ig pre-mRNAs and intrinsic sensitivity of antibody-secreting cells towards prolonged ER stress (Srouf et al., 2016). Finally, the use of ASOs to induce massive production of detrimental truncated Ig chains represents a pioneer therapeutic approach that should be of great interest in patients with monoclonal gammopathies.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Assessment of exon skipping of nonproductive VDJ-recombined IgH transcripts *in vivo*.

(A) Map of wild-type (*b* allotype) and targeted (*a* allotype) IgH loci. IgH^{wt/frVκ} knock-in mice were created by insertion of an additional frameshift-inducing Vκ exon (frVκ) between J_{H4} and Eμ. Skipping of frVκ exon occurs after NAS of nonproductive IgH^{frVκ} pre-mRNAs, allowing the expression of complete IgH^a chains upon in-frame VDJ rearrangement. Primers and probes used to detect specifically IgH^{wt} (*b*) and IgH^{frVκ} (*a*) alleles by qPCR are represented (black arrows and short rectangles). **(B-D)** To determine the amounts of total IgM **(B)**, IgM^a **(C)** and IgM^b **(D)** allotypes, ELISA assays were performed in sera from 6 to 8-wk-old IgH^{wt/frVκ} (wt^b/frVκ^a), B6/129 F1 (wt^a/wt^b) and B6 (wt^b/wt^b) mice (n=3-8/group). **(C)** The negative threshold of IgM^a expression was obtained using sera from B6 mice (dotted line). Bars represent mean expression ±SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. (ns : not significant; *, P<0.05; ***, P < 0.001).

Figure 2: Comparative analysis of NAS of IgH pre-mRNAs in B cells and PCs.

(A) B cells and PCs were isolated from spleen of IgH^{DH-LMP2A/frVκ} mice after staining with anti-B220 and anti-CD138 mAbs. Representative dot plot and gates used for cell sorting are depicted. The purity of sorted populations was always above 90%. **(B)** To identify alternatively spliced mRNAs (alt-mRNAs), RT-PCR were performed using VH₇₁₈₃F/CμR primers. One representative experiment out of 3 performed is shown. **(C)** Alt-mRNA and IgH^{frVκ} pre-mRNA levels were assessed by qPCR using VH₇₁₈₃F/CμR primers and the probe *a* respectively, as described in Fig. 1 A. NAS rates corresponding to the relative alt-mRNA/pre-mRNA ratios were determined in sorted B cells (empty bar) and PCs (grey bar) (n=5). **(D)** VDJ repertoire analysis

of alt-mRNAs showing polyclonal CDR3 junctions. RACE-PCR, high throughput sequencing and CDR3 length analysis were performed as described in methods and in Fig. S1. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. (*, $P < 0.05$).

Figure 3: Biallelic transcription of IgH alleles during PC differentiation

(A) B cells, germinal center (GC-) B cells and PCs were isolated from spleens of SRBC-immunized IgH^{wt/frVκ} mice after staining with anti-B220, anti-GL7, anti-FAS and anti-CD138 mAbs. Representative dot plots and gates used for cell sorting are depicted. The purity of each sorted population was always above 90%. **(B)** Relative IgH^{frVκ} pre-mRNA levels were determined by qPCR as described in Fig. 1 A (probe *a*), after normalization to *Gapdh* mRNA expression. The value obtained for B-cells served as a reference and was set to 1 in each FACS sorting experiment (n=3). **(C and D)** Resting B cells were isolated from spleens of IgH^{wt/frVκ} mice and stimulated with LPS (1μg/ml) for 3 days. ChIP experiments were performed using phospho-specific antibodies against phosphorylated Ser2 (Ser2P) and Ser5 (Ser5P) RNAPII (n=4). Relative RNAPII enrichments (percent input) were analyzed on productive and nonproductive IgH alleles by qPCR, as described in Fig.1A (probes *b* and *a* to detect IgH^{wt} and IgH^{frVκ} alleles, respectively). Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. **(E)** Map of the IgH locus detailing genomic regions covered by BAC used as FISH probes. Representative 3D-FISH images of B cell nuclei from B6 mice, reporting no allele, 1 or 2 alleles within heterochromatin (scale bars: 5μm). IgH alleles are indicated by white arrows. Bars represent the percentage of IgH alleles within the heterochromatin, determined in resting B cells (n=137), LPS-stimulated B cells (n=97), GC-B cells (n=52) and PC (n=53) nuclei. For each cell type, data were obtained from 3 individual mice. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. (ns: not significant; *, $P < 0.05$).

Figure 4: Analysis of RNA splicing gene expression profiles during PC differentiation.

Clustergram of GO RNA splicing gene list significantly differentially expressed between follicular B cells (FO B cells, n=3), germinal center B cells (GC B cells, n=5), plasmablasts (PBs, n=4) and plasma cells (PCs, n=3) (Fold change > 1.5 and FDR < 0.05).

Figure 5: Analysis of the alternative frV κ exon chromatin profile

(A) Chromatin marks were analyzed comparatively at the JH4-E μ intron, the alternative frV κ exon and the constitutive CH1 μ exon. Primers and probes used in qPCR are depicted. **(B-E)** ChIP assays were performed in splenic B cells isolated from IgH^{wt/frV κ} mice, 3 days after stimulation with LPS (1 μ g/ml). Immunoprecipitations were done by using anti-H3K4me3 **(B)**, H3K9ac **(C)**, H3K36me3 **(D)** and H3K9me3 **(E)** mAbs. Background signals from mock IP using irrelevant antibodies were subtracted and relative enrichments were expressed after normalization to total input DNA (percent of input). Data are the mean \pm SEM (n=5) and unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance (ns: not significant; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

Figure 6: Significant IgM^a production upon passive administration of ASOs.

(A) An ASO sequence targeting the donor splice site of the frV κ exon (AON-frV κ _{dss}) was designed and synthesized as "vivo-morpholino ASO" (Gene Tools, LLC). **(B)** Splenic B cells isolated from IgH^{wt/frV κ} mice were stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 4 days and treated with ASO-frV κ _{dss} or irrelevant ASO (ASO-Ctrl) during the last 2 days, as described in methods. At day 4, supernatants were harvested and IgM^a levels were determined. **(C)** Cells were labelled with anti-B220, anti-CD138, anti-IgM^b and anti-IgM^a mAbs. Representative dot plots and gates

used for FACS analysis are depicted. **(D)** Left Y-axis represents the percentage of IgM^a-expressing cells in IgM^b-positive B cells and plasmablasts, treated with ASO-frVκ_{dss} (grey bars) or ASO-Ctrl (empty bars). Right Y-axis shows ASOs' efficiency as percentage of theoretical maximum of IgM^a positive cells. **(E)** The mean fluorescence intensity (MFI) of IgM^a was determined on IgM^b positive B cells and PBs. **(F)** Alt-mRNA/pre-mRNA ratios were determined in IgH^{DHLMP2A/frVκ} LPS-stimulated B cells, as described in Fig 2 C. Passive ASO administration was performed as described in panel B. Data are representative of 5 independent experiments. Bars represent mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance (*, P<0.05; **, P<0.01 ****, P<0.0001).

MATERIALS AND METHODS

Mice

IgH^{frVκ} mice harboring an extra frameshift-inducing Vκ exon between J_H4 and Eμ have been described elsewhere previously (Tinguely et al., 2012). Heterozygous IgH^{wt/frVκ} mice were backcrossed to C57BL/6 (B6) background to distinguish between IgH^{wt} (*b* allotype) and IgH^{frVκ} (*α* allotype) alleles. F1 (B6^b/129^a) mice have been used as control. IgH^{DH-LMP2A} mice harbor a replacement of JH segments by the Epstein-Barr virus LMP2A gene under the control of a DH promoter (Casola et al., 2004). The expression of LPM2A mimics the BCR tonic signal, allowing B cell development and PC differentiation (Casola et al., 2004; Lechouane et al., 2013). 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).

ASO treatments

Vivo-morpholino ASOs (ASO-frVκ_{dss}: 5'-ATGCTCGAGACTTACCCGTTTGATT-3') and irrelevant ASO-Ctrl: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') were designed and purchased at Gene Tools, LLC. Splenic B cells isolated from IgH^{wt/frVκ} mice were purified by negative selection using anti-CD43 magnetic beads (Miltenyi Biotec) and stimulated (0.8 x 10⁶ cells/ml) with 1 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) (LPS-EB Ultrapure; InvivoGen), in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum. At day 2, cells were harvested and incubated with 10μM AON (4h in PBS). After that, LPS-stimulation was pursued for 2 days in the presence of AON (1μM) in culture media.

Flow cytometry and cell sorting

Erythrocyte-depleted spleen cells were labelled with anti-mouse CD138 (281-2; BD Pharmingen), B220 (RA3-6B2; BioLegend), anti-mouse T and B cells Activating Ag (GL7; BD Pharmingen) and anti-mouse CD95 (Jo2) mAbs (BD Pharmingen). Intracellular staining was performed using anti-mouse IgM^a (DS-1; BD Pharmingen) and IgM^b (AF6-78; BD Pharmingen) mAbs, according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed on a LSR II Fortessa apparatus using FACS-Diva software (BD Pharmingen). B cells, GC-B cells and PCs were sorted from spleens of B6 or IgH^{wt/frVκ} mice, 7 days after intraperitoneal (i.p.) injection of sheep red blood cells (SRBCs, BioMérieux®SA-France). Cell sorting was performed using a FACS-Aria III (BD Biosciences) and gates used are depicted in dot plots (purity was above 90%).

ELISA assays

Sera from IgH^{wt/frVκ} (wt^b/frVκ^a), B6 (wt^b/wt^b) and B6/129 F1 (wt^b/wt^a) mice were collected and analyzed using total IgM or allotype-specific IgM^a and IgM^b ELISA assays. Ig titers were determined in polycarbonate 96 multiwell plates (Maxisorp, Nunc) using unlabeled IgM (Southern Biotech), IgM^a (DS-1; BD Pharmingen) and IgM^b (AF6-78; BioLegend) Abs and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgM Abs (Southern Biotech), as described (Pinaud et al., 2001; Sirac et al., 2006). 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.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Experiments

ChIP experiments were performed using anti-H3K4me3 (Millipore, 07-473), anti-H3K9ac (Millipore, 06-942), anti-H3K9me3 (Millipore, 05-1242), anti-H3K36me3 (Abcam, ab9050), anti-RNA Pol II P-ser2 (Abcam, ab5095) and anti-RNA Pol II P-ser5 (Abcam, ab5131), as

previously described (Rouaud et al., 2013). In brief, 1×10^7 LPS-stimulated B cells from IgH^{wt/frV κ} mice were harvested at day 3, washed twice in PBS and cross-linked at 37 °C for 15 min in 15 ml PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 0.125 M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2 h at 4 °C with 100 μ l of 50% protein A/G slurry (0.2 mg/ml sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg/ml BSA, and 50% protein A/G; Sigma). $0.3 - 0.5 \times 10^6$ cell equivalents were saved as input, and $3 - 5 \times 10^6$ cell equivalents were incubated overnight with specific or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS and genomic DNA was obtained after phenol/chloroform extraction.

PCR and RT-PCR

Total RNA were prepared using Tri-reagent (Invitrogen) procedures. RT-PCR was carried out on 1 to 3 μ g of DNase I (Invitrogen) -treated RNA, using Superscript III (Invitrogen). Priming for reverse transcription was done with random hexamers. Quantitative PCR were performed on cDNA samples equivalent to 10ng RNA per reaction, using TaqMan or SYBR-Green 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). Primers and probes used for Q-PCR are listed in Table S2.

3D-DNA FISH experiments

DNA probe specific to the IgH locus was prepared with the RP23-109B20 BAC construct (Life Technologies) labelled by random priming with digoxigenin-11-dUTP (Roche). DNA probe specific to heterochromatin compartment was prepared with the p γ Sat plasmid (kindly provided by Dr. Nial Dillon) containing multiple copies of the 234 bp major satellite (γ -satellite) repeat labelled by random priming with Alexa Fluor 488-dUTP (Life Technologies). Before hybridization, probes were denatured in 2X SSC/50% formamide/10% Dextran Sulfate hybridization buffer at 95°C for 5 min. Resting B cells, LPS-stimulated B cells, GC-B cells and PCs were dropped onto poly-L-lysine slides and fixed with PBS/4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature (RT). After washing steps with PBS, cells were permeabilized using pepsine 0.02%/HCl 10mM for 15 minutes at RT. Cells were washed with PBS, post-fixed with PBS/1% paraformaldehyde for 5 min at RT, washed with PBS/0,2M MgCl₂, dehydrated by successive incubations in ethanol solutions (70%, 90%, 100%, 2 min each), denatured for 5 min in 2X SSC/70% formamide at 72°C, dehydrated by successive incubations in cold ethanol solutions (70%, 90%, 100%, 2 min each) and hybridized overnight at 37°C using 200 ng of each labelled probe in hybridization buffer, in a dark humid chamber under coverslips. The day after, slides were washed 3 times with 1X SSC, a blocking step was performed by incubating slides in 4X SSC/3% BSA for 30 min followed by incubation with rhodamine-conjugated anti-digoxigenin secondary antibody (Roche) diluted 1/200 in 4X SSC/3% BSA for 60 min. Slides were washed 4 times in 2X SSC and mounted under coverslips using ProLong Gold antifade reagent containing DAPI (Life Technologies). Images were acquired along the Z-axis with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse Ni-E) with X100 oil objective. 51 optical sections separated by 0.2 μ m were collected, stacked images were deconvoluted using Huygens software (SVI) and analyzed using Volocity 3D Image Analysis software (PerkinElmer).

Separation of alleles was measured in 3D from the center of mass of each signal. Volumetric pixel size was 0.064 μ m in xy and 0.2 μ m in z-direction.

Bioinformatic analysis

Gene expression profiles of purified mouse follicular (FO-) B cells, GC-B cells, plasmablasts (PBs) and PCs were obtained from publicly available dataset GSE 26408 (Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26408>) (Green et al., 2011). Affymetrix Mouse Genome 430A 2.0 Array gene expression data were analyzed with the GenomicScape bioinformatics platform (www.genomicscape.com) (Kassambara et al., 2015). Clustering was performed and visualized with Cluster and TreeView (Eisen et al., 1998). Differentially expressed genes between cell populations were identified with the significance analysis of microarray (SAM) statistical method (fold change ≥ 1.5 , false discovery rate ≤ 0.05) (Tusher et al., 2001).

High throughput sequencing of IgH repertoire

Repertoire sequencing was performed as previously described (Li et al., 2013). In brief, RNA (500 ng) was extracted from sorted PCs of IgH^{DH-LMP2A/frV κ} mice and RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction) was performed using a CH1 μ reverse primer (Boice et al., 2016). Sequencing adapter sequences were added by primer extension and amplicons were sequenced on a MiSeq sequencing apparatus (Illumina). Repertoire was analyzed using IMGT/High-V-Quest (Alamyar et al., 2012) and the bcRep R package (Bischof and Ibrahim, 2016) available on the IMGT Web site (<https://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).

Supplemental material

Fig. S1 shows VDJ repertoire analysis of IgH^{frV_k} alt-mRNAs. Fig. S2 shows absence of adverse toxic effect following ASO treatment. Table S1, a sparse excel file, shows SAM Multiclass analysis of genes related to RNA splicing during plasma cell differentiation. Table S2 contains list of primers and probes used in ChIP, standard and real time PCR assays.

Author contributions

MOA and NS designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. JML and AM contributed data in Fig. 6. OM, SLN and EP contributed 3D FISH data in Fig. 3. MVA, JS, CS and MC helped with the experiments and interpretation of the data. LD conceived the project, designed experiments, analyzed data and wrote the paper.

Acknowledgments

We thank the staff of our animal facility as well as C. Carrion 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. We are grateful to N. Dillan (MRC Clinical Sciences Centre, London, UK) for providing the γ Sat plasmid and M. Alizadeh (UMR S 917, Rennes, France) for repertoire sequencing. This work was supported by grants from Fondation ARC (PJA 20161204724), INCa (PLBIO15-256), ANR (2017-CE15-0024-01), Ligue Contre le Cancer (comités Corrèze, Haute-Vienne), Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales (FFRMG) and Comité d'Organisation de la Recherche sur le Cancer du Limousin (CORC). MOA and NS were funded by Société Française d'Hématologie (SFH) and Région Limousin, respectively.

The authors declare no competing financial interests.

Ashi et al.

Supplemental material

Fig. S1 shows VDJ repertoire analysis of IgH^{frVκ} alt-mRNAs. Fig. S2 shows absence of adverse toxic effect following ASO treatment. Table S1, a sparse excel file, shows SAM Multiclass analysis of genes related to RNA splicing during plasma cell differentiation. Table S2 contains list of primers and probes used in ChIP, standard and real time PCR assays.

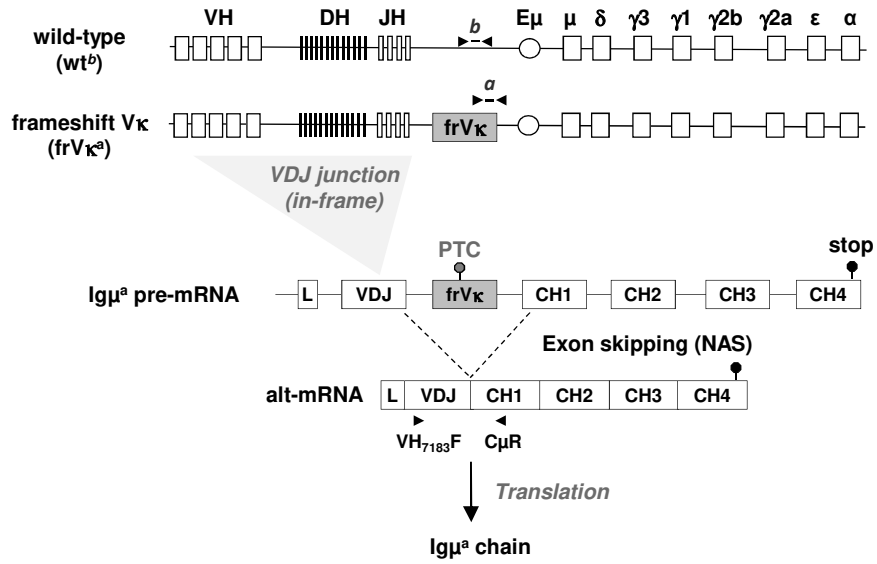
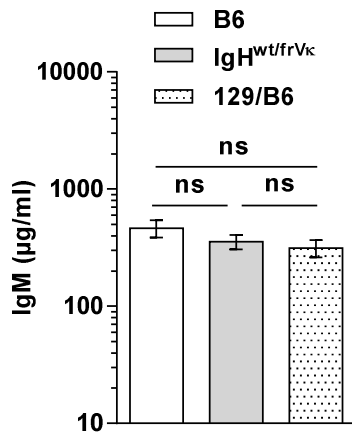
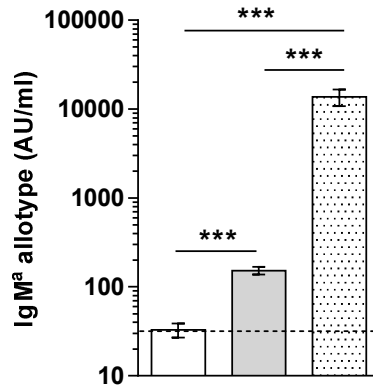
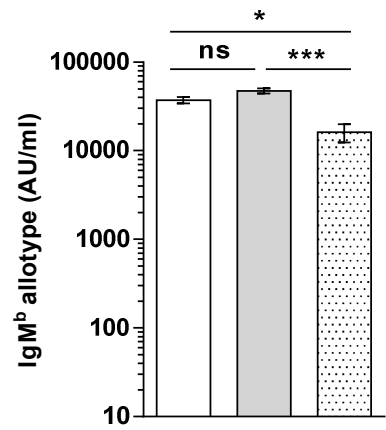
LEGENDS OF SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1: VDJ repertoire analysis of IgH^{frVκ} alt-mRNAs

PCs (B220⁻/CD138⁺) were sorted from spleens of IgH^{DH-LMP2A/frVκ} mice and RACE-PCR was performed using a CH1μ reverse primer as described in methods. The VDJ repertoire of IgH^{frVκ} alt-mRNAs was analyzed using IMGT/High-V-Quest (Alamyar et al., 2012). **(A and C)** Pie charts represent VH and JH₁₋₄ family usage, respectively. The total number of clonotypes identified **(A)** and the frequency of JH usage **(C)** are indicated. **(B)** Histograms of DH family usage in IgH^{DH-LMP2A/frVκ} mice.

Figure S2: Absence of adverse toxic effect following ASO treatment

Splenic B cells (n=5) isolated from IgH^{wt/frVκ} mice were stimulated with LPS (1μg/ml) for 4 days and treated or not with AON (1μM) during the last 2 days, as described in methods. **(A)** The proliferative index was determined by counting viable cells after Trypan blue exclusion. **(B)** The production of Igκ was analyzed in 96h supernatants to evaluate off-target effects of ASO treatments in antibody secreting cells. Bar graphs are expressed as mean ± SEM (ns: not significant).

A**Mouse IgH locus****B****C****D**Figure 1 (Ashi *et al.*)

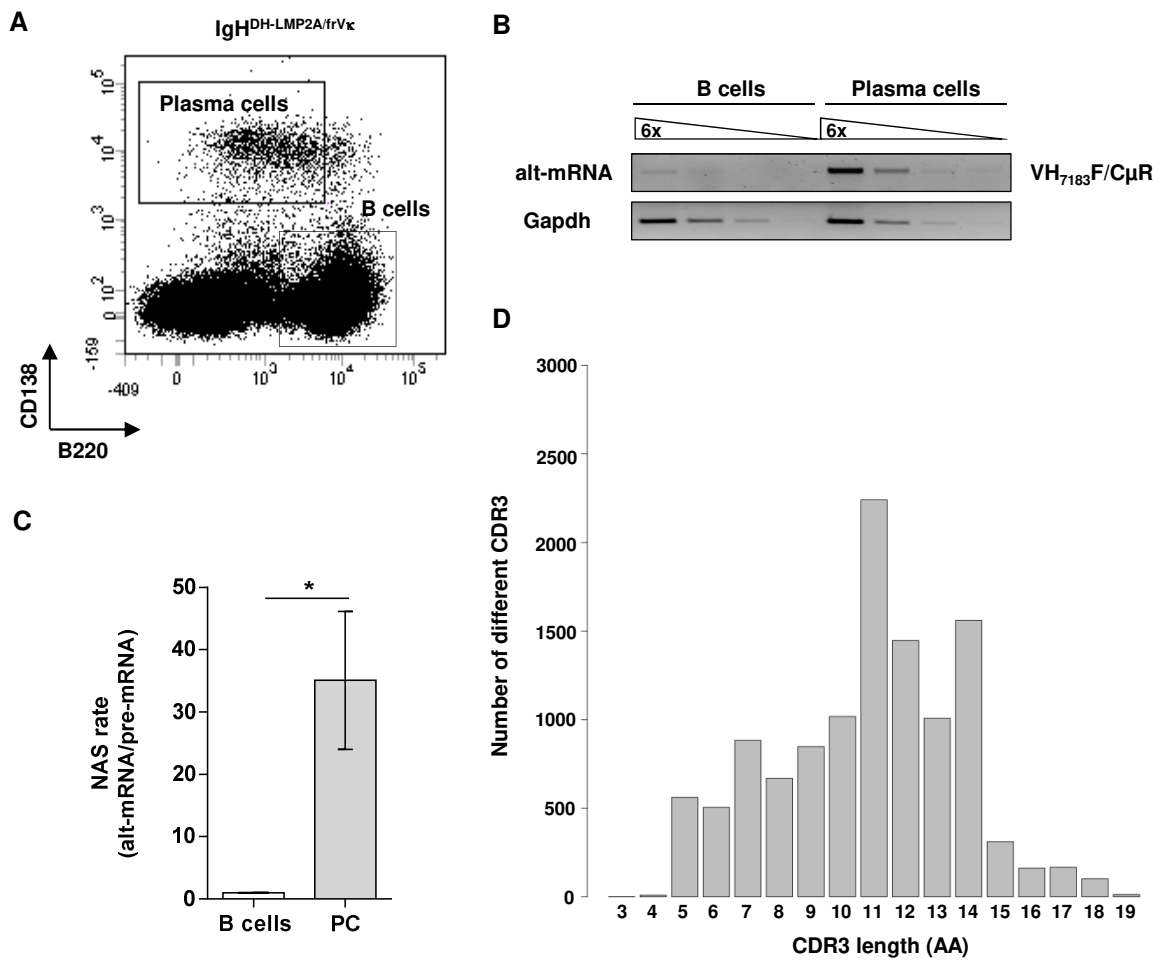


Figure 2 (Ashi *et al.*)

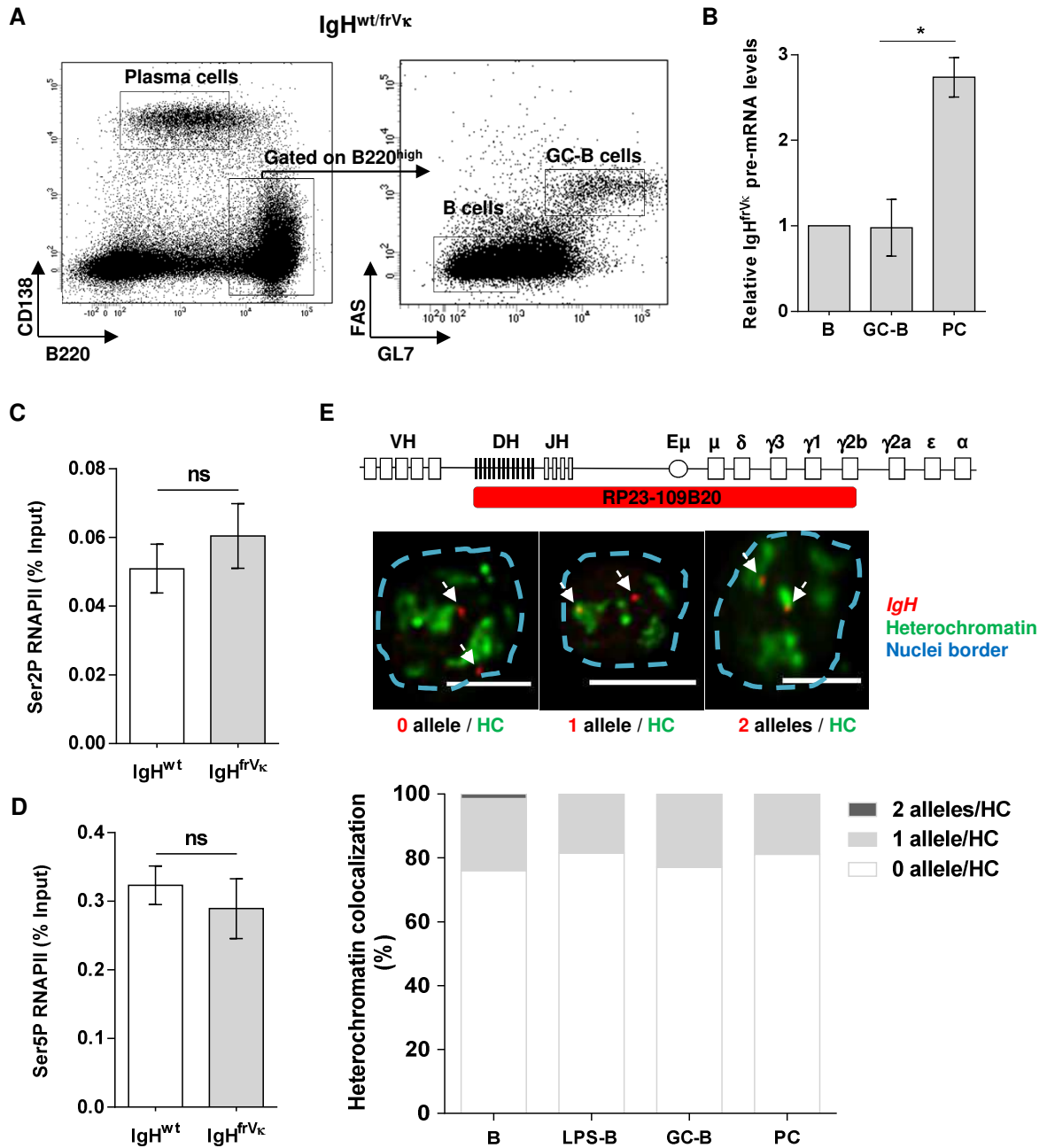


Figure 3 (Ashi *et al.*)

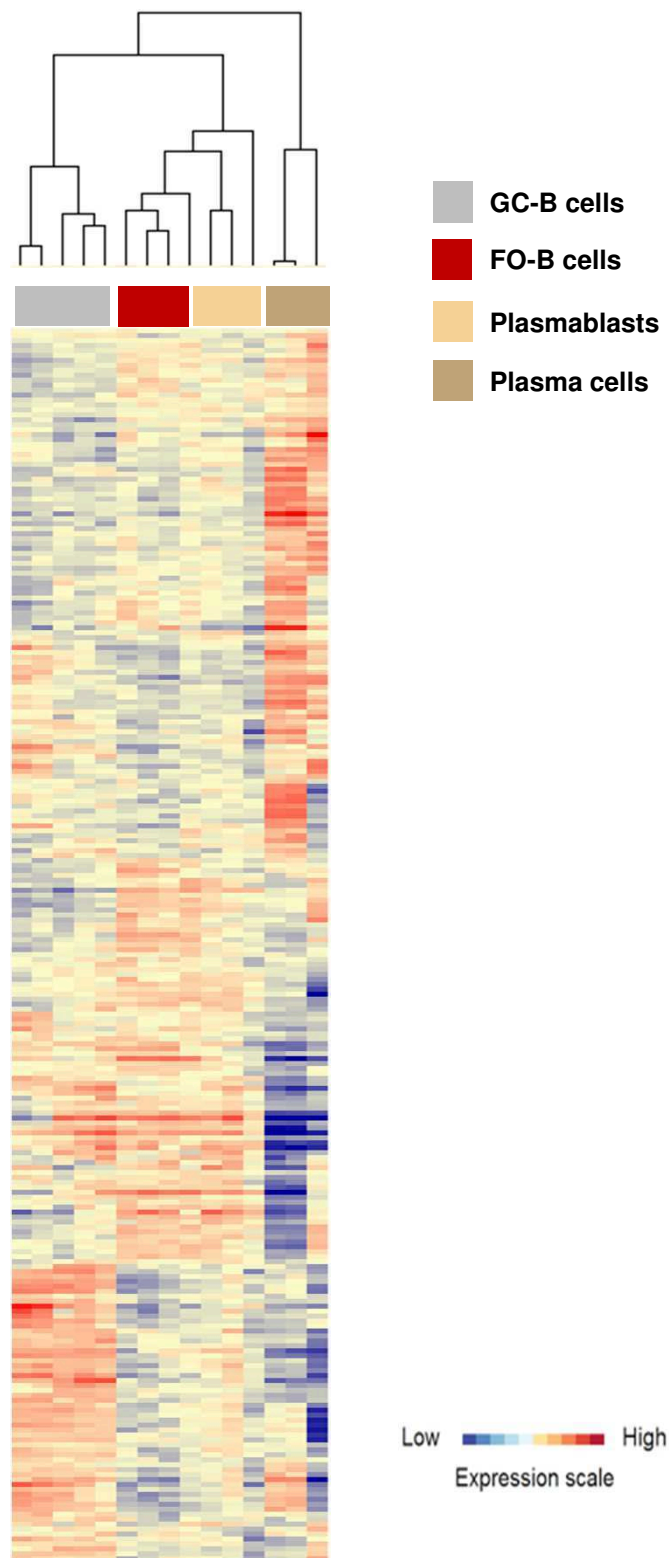
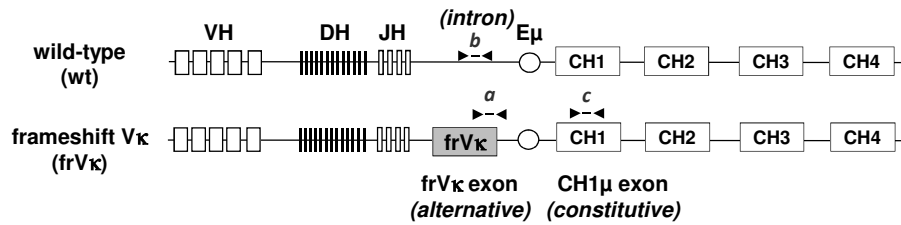
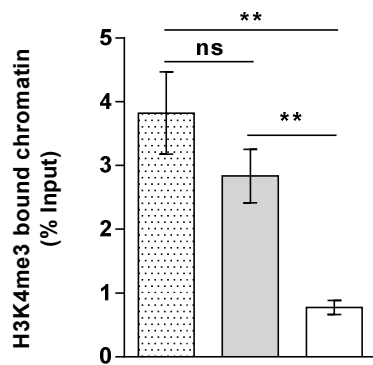


Figure 4 (Ashi *et al.*)

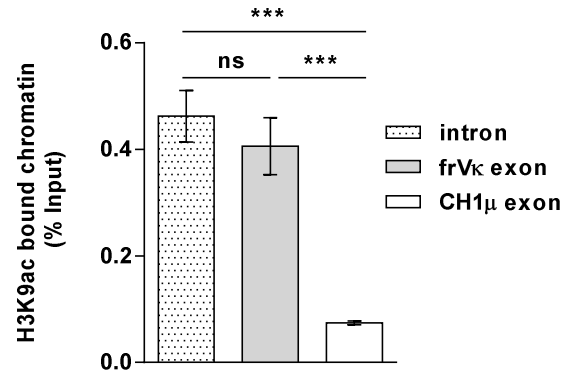
A IgH^{wt/frVκ}



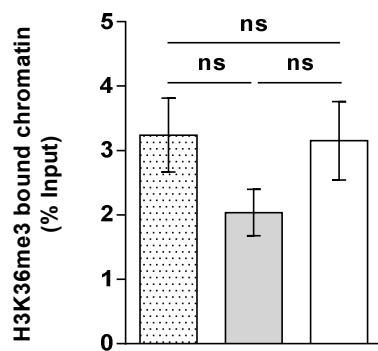
B



C



D



E

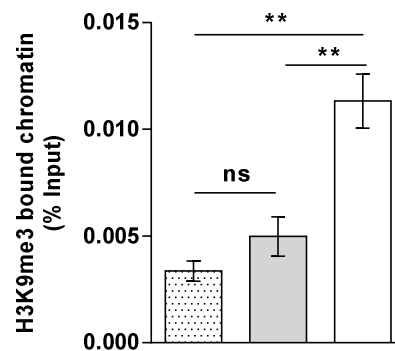


Figure 5 (Ashi *et al.*)

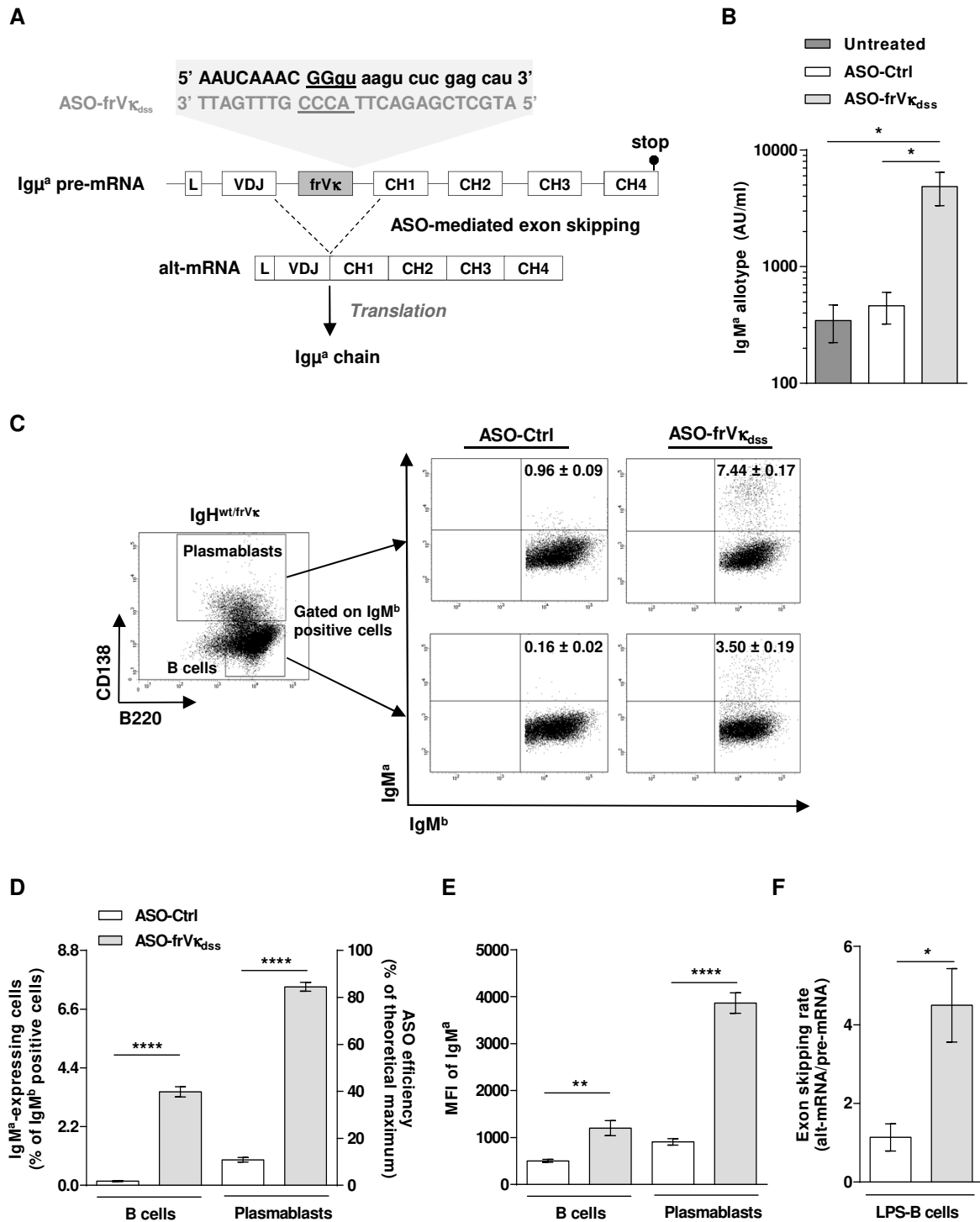
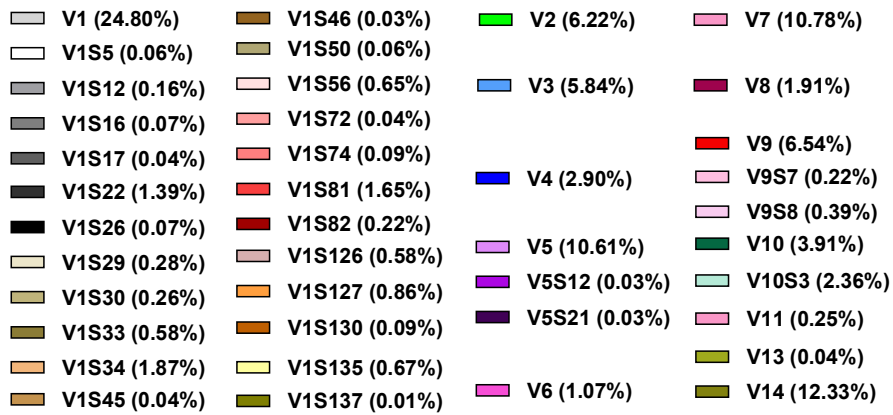
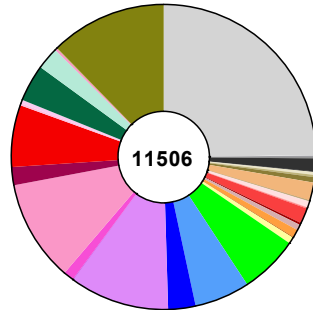


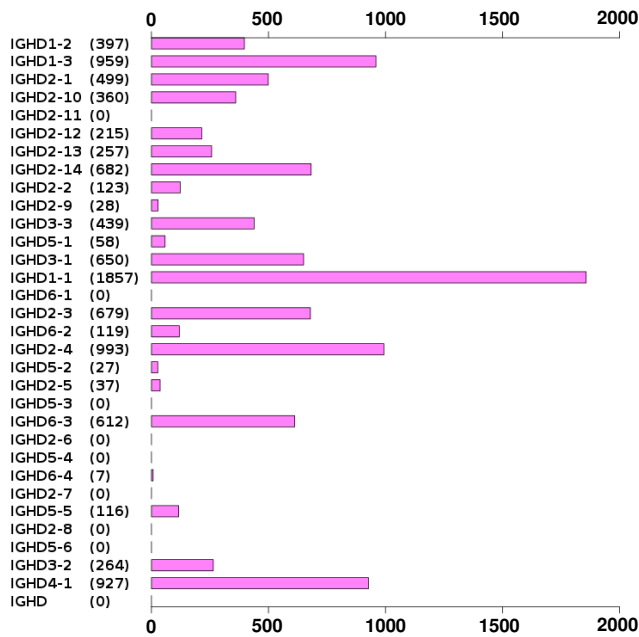
Figure 6 (Ashi *et al.*)

Supplemental material

A



B



C

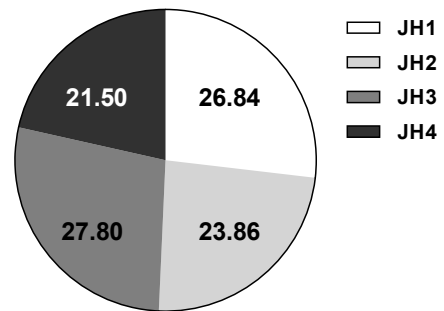
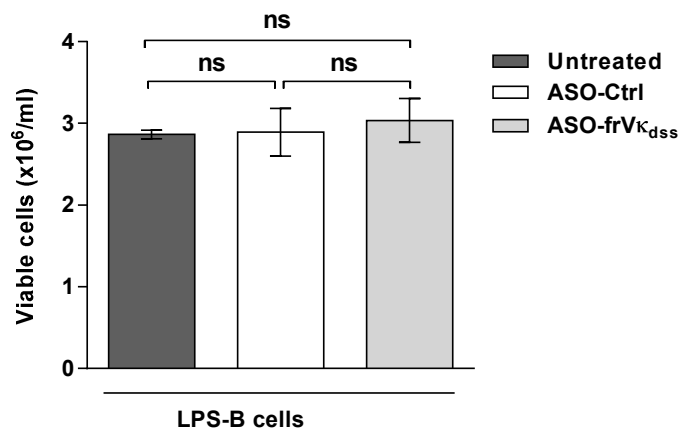


Figure S1 (Ashi et al.)

Supplemental material

A



B

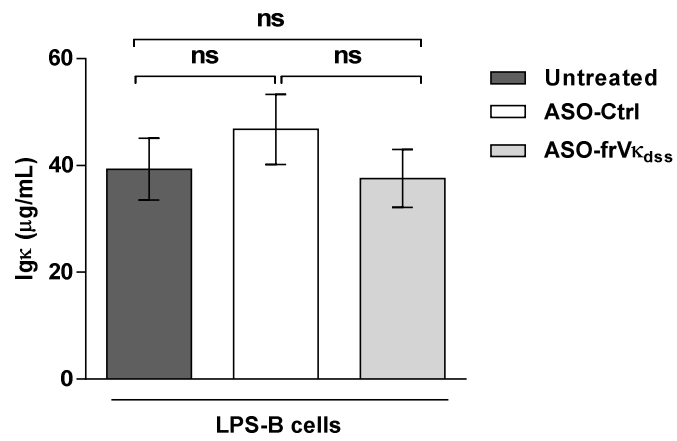


Figure S2 (Ashi *et al.*)

Table S1. SAM Multiclass analysis of genes related to RNA splicing during plasma cell differentiation

Genes related to RNA splicing (GO ID GO:0008380) differentially expressed between murine follicular B cells, germinal center B cells, plasmablasts and plasma cells using SAM Multiclass analysis (fold change ≥ 1.5 and false discovery rate ≤ 0.05)

| Gene ID | Gene Name | Score(d) | Numerator(r) | Denominator(+s0) | Contrast Follicular B cells | Contrast Germinal center B cells | Contrast Plasmablasts | Contrast Plasma cells | q-value, FDR(%) |
|--------------|----------------|-------------|--------------|------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| 1437835_a_at | Aar2 | 1.886097223 | 17.68722017 | 9.377682106 | 0.000961397 | -1.915781501 | 0.070749884 | 3.097674593 | 0 |
| 1416568_a_at | Acin1 | 3.022421456 | 84.47568086 | 27.94966952 | 2.978186671 | -3.388619509 | 2.611488678 | -0.812472393 | 0 |
| 1452217_at | Ahnak | 2.290295552 | 1037.923743 | 453.1833206 | 3.054772362 | 0.874064218 | -1.195194549 | -2.917953327 | 0 |
| 1457265_at | Akap17b | 1.627810193 | 32.71891392 | 20.0999564 | -0.852199034 | -0.929469563 | -0.411720291 | 2.950275359 | 0 |
| 1433497_at | Aqr | 1.466635529 | 33.89716623 | 23.11219493 | 2.306361539 | -1.459429876 | 0.211822698 | -0.156408676 | 0 |
| 1437262_x_at | Bcas2 | 1.744786128 | 107.5455052 | 61.63821657 | -1.271402439 | 2.196590668 | -0.738513329 | -1.404897567 | 0 |
| 1417223_at | Cd2bp2 | 1.463819536 | 69.53699657 | 47.50380417 | 0.918034409 | 0.388702956 | 0.784582973 | -2.611983298 | 0 |
| 1426407_at | Cellf1 | 2.136890238 | 366.8657554 | 171.6820775 | -1.828528552 | 2.393498927 | 0.130148028 | -2.334167031 | 0 |
| 1423895_a_at | Cellf2 | 2.375650703 | 1064.613933 | 448.1357176 | 1.048023295 | 1.533876598 | 0.421884103 | -4.16699643 | 0 |
| 1422886_a_at | Clk4 | 1.528172184 | 187.823089 | 122.9070199 | 0.936551016 | 0.07746335 | 1.150312413 | -2.599878124 | 0 |
| 1438278_a_at | Cwc22 | 1.447089055 | 98.1224446 | 67.80677685 | -0.518336439 | -0.736881889 | -0.64128975 | 2.60152592 | 0 |
| 1451641_at | Dbr1 | 1.697491156 | 48.17317764 | 28.37904485 | -1.593990433 | 0.063066806 | -1.00580931 | 2.82995817 | 0 |
| 1415915_at | Ddx1 | 2.051479611 | 461.2994656 | 224.861833 | -0.938170086 | -1.117541254 | -0.643720041 | 3.65903223 | 0 |
| 1417927_at | Ddx19a | 1.985645283 | 48.18039366 | 24.26435078 | -1.815078383 | 0.388102097 | -1.483627244 | 3.146411213 | 0 |
| 1416751_a_at | Ddx20 | 3.164003961 | 132.6556709 | 41.92651859 | -1.901694908 | -1.297515933 | -1.227315459 | 5.700642075 | 0 |
| 1423814_at | Ddx41 | 1.975744006 | 65.6044968 | 33.20493418 | -0.225841749 | -1.286114897 | -0.850992285 | 3.504022957 | 0 |
| 1424569_at | Ddx46 | 1.576288069 | 120.9809247 | 76.75051726 | 1.71227616 | -1.90948744 | 0.828602627 | 0.365399404 | 0 |
| 1423752_at | Ddx47 | 1.433652317 | 59.29394486 | 41.35864627 | 1.090045268 | -1.508422211 | -0.296138401 | 1.818842451 | 0 |
| 1438371_x_at | Ddx5 | 2.445383729 | 1066.911601 | 436.2961888 | -1.565179986 | 3.096021097 | -1.497336051 | -1.598407108 | 0 |
| 1451770_s_at | Dhx9 | 3.096759675 | 553.4351399 | 178.7142684 | -2.702893671 | 3.882685951 | -1.502550046 | -1.764849519 | 0 |
| 1428299_at | Dyrk1a | 2.268272565 | 269.3104441 | 118.7293133 | -0.796487076 | 2.782624036 | -1.115571362 | -2.353791168 | 0 |
| 1451402_at | Ecd | 1.996435106 | 318.5714084 | 159.5701295 | -1.212616758 | -0.640639877 | -0.957929295 | 3.557588946 | 0 |
| 1451044_at | Gemin2 | 2.407491304 | 54.86418517 | 22.78894428 | -2.333933182 | 0.247420232 | -1.514573554 | 3.940997534 | 0 |
| 1430019_a_at | Gm10052 /// G | 2.639317667 | 815.3990704 | 308.9431335 | -1.317471064 | 2.763763685 | 0.276589505 | -3.65758775 | 0 |
| 1417274_at | Gm21559 /// G | 1.412302204 | 122.9476048 | 87.05474256 | -0.774526265 | -0.943536186 | -0.072490604 | 2.443740714 | 0 |
| 1451184_at | Gm6793 /// Hn | 2.723043477 | 1611.583047 | 591.831552 | -1.937483001 | 3.441428197 | -1.725798224 | -1.497166363 | 0 |
| 1430020_x_at | Hnrnpa1 | 2.210333868 | 1123.685755 | 508.378291 | -0.701339333 | 2.37578717 | -0.112528252 | -3.108268281 | 0 |
| 1434047_x_at | Hnrnpa2b1 /// | 2.248862305 | 486.8140614 | 216.4712621 | -2.554956196 | 2.670881449 | -0.474372841 | -1.264015765 | 0 |
| 1418693_at | Hnrnpk | 3.476848417 | 181.4986551 | 52.20206155 | -3.649464305 | 4.281398861 | -1.288931455 | -1.767625189 | 0 |
| 1448176_a_at | Hnrnpk | 2.605724922 | 936.1459197 | 359.2650598 | -0.805963003 | 2.899215791 | -0.378739588 | -3.517443898 | 0 |
| 1426698_a_at | Hnrnpm | 2.222010082 | 303.9689643 | 136.7990932 | 2.529308071 | -0.590756882 | 1.292079726 | -3.267486236 | 0 |
| 1423050_s_at | Hnrnpu | 1.945872968 | 1480.188974 | 760.6811947 | -1.802153172 | 2.113986182 | 0.276270909 | -2.089518345 | 0 |
| 1434541_x_at | Khdrbs1 | 1.443073977 | 293.447057 | 203.3485889 | -1.622661025 | 1.544781765 | -1.071247823 | 0.476355181 | 0 |
| 1426808_at | Lgals3 | 1.93790822 | 145.5436367 | 75.10347249 | 3.041364515 | -0.497142895 | 0.104033977 | -2.351504992 | 0 |
| 1448500_a_at | Lime1 /// Zgpa | 3.114607714 | 130.7291763 | 41.97291866 | 5.294487736 | -2.089448687 | -1.74937029 | 0.520420463 | 0 |
| 1415876_a_at | LOC100046297 | 2.624216308 | 1066.627115 | 406.4554859 | -0.435406047 | -2.280697388 | -0.069524503 | 4.329267698 | 0 |
| 1432416_a_at | LOC100046628 | 1.527359036 | 862.9286203 | 564.9808472 | -1.413556421 | -0.237344684 | -0.596111711 | 2.60394651 | 0 |
| 1436766_a_at | LOC100861853 | 1.418433347 | 166.696955 | 117.521881 | -0.845056846 | 1.756449001 | -0.535577044 | -1.368255435 | 0 |
| 1424849_at | LOC100862584 | 1.436689015 | 17.86246751 | 12.43307864 | -1.056135652 | -0.30522688 | -0.78321177 | 2.609129478 | 0 |
| 1423223_a_at | LOC677654 /// | 1.851730684 | 176.0640783 | 95.08082343 | 0.499992187 | -1.777175212 | -0.302750379 | 2.865633672 | 0 |
| 1452708_a_at | Luc7l | 1.936686617 | 182.9462268 | 94.46351578 | 1.98910843 | -1.323488626 | 1.721570836 | -2.078721835 | 0 |
| 1436767_at | Luc7l2 | 1.411384451 | 209.0667242 | 148.1288278 | -0.555709209 | 1.248239779 | 0.496681991 | -2.186933079 | 0 |
| 1418189_s_at | Malat1 | 1.623108865 | 1594.754744 | 982.5309797 | 1.228519677 | -0.012934219 | 1.127251223 | -2.709964276 | 0 |
| 1416904_at | Mbnl1 | 1.615477341 | 580.6045957 | 359.4012623 | 1.319101575 | 0.932885565 | -0.135933449 | -2.692666251 | 0 |
| 1423099_a_at | Mettl3 | 2.058523706 | 334.6285468 | 162.5575386 | -0.432427367 | -1.164072234 | -0.962447559 | 3.655811169 | 0 |
| 1423046_s_at | Ncbp2 | 2.27824925 | 166.747879 | 73.19201769 | -1.143291801 | -1.189486783 | -0.717821092 | 4.082864562 | 0 |
| 1433658_x_at | Pcbp4 | 2.13732085 | 26.33233203 | 12.32025226 | -0.629533453 | -1.688309182 | -0.269308383 | 3.802459934 | 0 |
| 1425515_at | Pik3r1 | 1.506151368 | 72.84724919 | 48.36648609 | 0.742390981 | 0.762760866 | 0.524426148 | -2.712893955 | 0 |
| 1423324_at | Pnn | 2.385340457 | 440.5219517 | 184.6788851 | -0.753882571 | -1.43183957 | -0.824948362 | 4.240213004 | 0 |
| 1433850_at | Ppp4r2 | 1.891930042 | 621.5758404 | 328.5406048 | -1.563599417 | 2.378943376 | -1.082883029 | -0.95746217 | 0 |
| 1451248_at | Prmt7 | 1.653691029 | 127.105945 | 76.86196678 | -0.892594645 | -0.868473358 | -0.461226337 | 2.955018691 | 0 |
| 1424314_at | Prpf3 | 2.619070532 | 153.7153036 | 58.6907843 | -0.042775355 | -2.098945322 | -0.689203533 | 4.459955602 | 0 |
| 1448633_at | Prpf31 | 2.387543032 | 61.89022619 | 25.92214061 | -2.096795795 | -0.499177176 | -0.950550735 | 4.196158735 | 0 |
| 1419512_at | Prpf40b | 1.490544355 | 28.6053012 | 19.19117744 | -0.511154861 | -0.62783556 | -0.871223617 | 2.719178951 | 0 |
| 1423292_a_at | Prx | 2.894045441 | 13.64267495 | 4.714050012 | -1.586566232 | -1.432704999 | -1.315022166 | 5.727770785 | 0 |
| 1423470_at | Ptbp2 | 1.593858126 | 111.5676816 | 69.99850222 | -0.676279593 | 1.994912558 | -0.882497525 | -1.471911302 | 0 |
| 1455819_at | Ptbp3 | 3.553083809 | 1129.124127 | 317.7871439 | -1.56553004 | 4.20734067 | -0.948507131 | -4.182028236 | 0 |
| 1416438_at | Puf60 | 1.618756155 | 209.068626 | 129.1538725 | 1.338992351 | -1.52507375 | -0.65567752 | 2.076887568 | 0 |
| 1421265_a_at | Rbm38 | 2.692733252 | 83.47626955 | 31.00057144 | 4.480352492 | -1.574383118 | 0.36533727 | -2.343496989 | 0 |
| 1452186_at | Rbm5 | 2.246401787 | 188.6707284 | 83.98797112 | 2.120312636 | 0.397629993 | 0.797843033 | -3.846820001 | 0 |
| 1416177_at | Rbmx1 | 1.831507384 | 291.517979 | 159.168334 | -1.006180289 | -0.866458308 | -0.618098613 | 3.274408953 | 0 |
| 1455936_a_at | Rbpms | 1.467735825 | 76.76841929 | 52.30397594 | -0.081357159 | -0.78056414 | -0.899860359 | 2.582111204 | 0 |
| 1424837_at | Rnf113a1 | 1.582495597 | 12.63420486 | 7.983721969 | -0.766637558 | -0.799882006 | -0.67557954 | 3.000546954 | 0 |
| 1437027_x_at | Rnps1 | 1.733508308 | 130.7961826 | 75.45171951 | -1.847160848 | 0.743948262 | -1.310324322 | 2.354346174 | 0 |
| 1452119_at | Rrp1b | 2.45676579 | 165.8355735 | 67.50158042 | -1.173707773 | -1.147268202 | -1.002653109 | 4.422692255 | 0 |
| 1448584_at | Rsrc1 | 3.35378162 | 59.42883515 | 17.81758538 | -1.97233189 | -0.464339181 | -2.380952165 | 5.920833411 | 0 |
| 1417547_at | Sart3 | 2.023144695 | 64.36395324 | 31.81381608 | 0.664043195 | -1.80700073 | -0.65711426 | 3.223777035 | 0 |
| 1423750_a_at | Sf1 | 1.517884779 | 304.3600379 | 200.5159034 | -0.317047908 | 1.509899981 | 0.084861476 | -2.312600696 | 0 |
| 1423811_at | Sf3a3 | 2.526494744 | 135.6446033 | 53.68885239 | -0.944941885 | -1.57553543 | -0.700037572 | 4.504217699 | 0 |
| 1418562_at | Sf3b1 | 1.401644983 | 223.4040196 | 159.3870219 | 0.943841548 | -0.044821275 | 1.093440132 | -2.327059599 | 0 |
| 1436898_at | Sfpq | 1.465780371 | 500.8363819 | 341.6858295 | 0.427293589 | 0.968383281 | 0.403724709 | -2.579565336 | 0 |
| 1438674_a_at | Sfswap | 1.667883387 | 371.7922108 | 222.9125931 | 1.971731179 | -0.820557224 | 1.130580337 | -2.111576256 | 0 |

| | | | | | | | | | |
|--------------|------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 1426718_at | Skiv2l2 | 2.52173038 | 362.3108039 | 143.6754725 | -1.396420344 | -0.816627268 | -1.307530934 | 4.50084037 | 0 |
| 1429043_at | Smdnc1 | 1.795462192 | 192.9842951 | 107.4844661 | -1.148874907 | 2.23630974 | -0.70383011 | -1.639867847 | 0 |
| 1422442_at | Smu1 | 1.941084324 | 226.152754 | 116.508464 | -0.869184749 | -0.462639435 | -1.335247706 | 3.420580748 | 0 |
| 1417352_s_at | Snrpa1 | 1.1798957655 | 206.2090064 | 114.62969373 | -0.871070246 | -1.154026263 | -0.272445794 | 3.157708411 | 0 |
| 1429003_at | Snw1 | 1.580946282 | 64.45977673 | 40.77290764 | 2.146232409 | -1.044030989 | 0.921030219 | -1.634221053 | 0 |
| 1420952_at | Son | 2.069820619 | 376.3610649 | 181.8326967 | 1.466419697 | -1.05598646 | 2.183832488 | -2.618218915 | 0 |
| 1420507_a_at | Srek1l1p1 | 1.953085287 | 18.13764975 | 9.286665499 | -1.571863749 | -0.683706011 | -0.672656727 | 3.608249404 | 0 |
| 1454689_at | Srrm1 | 1.46729337 | 497.8917909 | 339.3266821 | -0.758525704 | 1.769539837 | -0.436872752 | -1.608210355 | 0 |
| 1453722_s_at | Srsf1 | 2.539730571 | 1228.667991 | 483.7788722 | -1.668255772 | 2.885834032 | -0.084082429 | -3.029357709 | 0 |
| 1416150_a_at | Srsf5 | 1.670989196 | 1028.253832 | 615.3563612 | -1.601521303 | 2.045358534 | -0.492273743 | -1.151044596 | 0 |
| 1423130_a_at | Srsf5 | 1.967822138 | 674.0583526 | 342.5402834 | 1.622646825 | 1.158438532 | -0.223887677 | -3.254868009 | 0 |
| 1424104_at | Syf2 | 2.24926335 | 103.9964298 | 46.23577305 | 2.990755688 | 0.619320412 | -0.573145611 | -3.258762226 | 0 |
| 1426402_at | Syncr1p | 2.140603621 | 386.0641903 | 180.3529558 | -1.579373123 | 2.663155836 | -0.785148145 | -1.812355743 | 0 |
| 1448976_at | Tf1p11 | 1.755208289 | 53.61273178 | 30.54493996 | -0.688389751 | -1.021402014 | -0.582647314 | 3.167589526 | 0 |
| 1424641_a_at | Thoc1 | 1.561304003 | 253.104924 | 162.1112375 | -0.845485642 | -0.396597396 | -0.943442106 | 2.76440411 | 0 |
| 1423971_at | Thoc3 | 1.709578309 | 74.13070113 | 43.36198041 | -1.197817445 | 2.07318681 | -1.577526006 | -0.154125896 | 0 |
| 1460545_at | Thrap3 | 3.05218543 | 234.7733753 | 76.9197615 | -1.463214559 | 3.746294314 | -1.173874312 | -3.215443547 | 0 |
| 1451586_at | Tmbim6 | 1.791065136 | 1052.299024 | 587.5269428 | 2.135282958 | 0.277742861 | 0.188058842 | -2.848932848 | 0 |
| 1419374_at | Wbp4 | 3.858002825 | 93.64759513 | 24.27359424 | 0.097698414 | -2.71900487 | -1.733428878 | 6.745214884 | 0 |
| 1452401_at | Wtap | 1.58565846 | 494.7188953 | 311.9958729 | -0.129400633 | 1.871655966 | -0.922914538 | -1.75947326 | 0 |
| 1418624_at | Ybx1 | 1.795086149 | 545.6663332 | 303.9777971 | -1.261006146 | -1.150535902 | 0.119902899 | 3.018695451 | 0 |
| 1419181_at | Zfp326 | 2.178868254 | 25.61416565 | 11.75572025 | -1.920608533 | 2.679627652 | -0.265687953 | -2.191186949 | 0 |
| 1417536_at | Zmat2 | 2.152547055 | 155.0925505 | 72.05071321 | -1.454091221 | 2.657456177 | -0.682342399 | -2.065212551 | 0 |
| 1423612_at | C1p1 | 1.347861886 | 14.87998147 | 11.03969304 | -1.258279598 | 1.530386033 | 0.186047124 | -1.540426621 | 0.094103959 |
| 1418263_at | Ddx25 | 1.365299296 | 17.36677669 | 12.72012425 | -0.365522097 | 1.162569779 | 0.538876379 | -2.290596041 | 0.094103959 |
| 1426786_s_at | Dhx38 | 1.256669136 | 42.25692962 | 33.62613786 | 0.352219286 | -1.422040134 | 0.230387691 | 1.710664017 | 0.094103959 |
| 1456664_x_at | Gm11793 /// H | 1.393211297 | 475.8612415 | 545.4027276 | -1.141845073 | 1.73780015 | -0.554856245 | -1.014682433 | 0.094103959 |
| 1415872_at | Hnrnp1 | 1.326387571 | 671.6635896 | 506.3856177 | -0.201948309 | 1.459251719 | -0.302288526 | -1.827086522 | 0.094103959 |
| 1424101_at | Hnrnp1 | 1.273730618 | 263.6646836 | 207.00192 | 1.503667458 | -1.006868883 | 0.980904901 | -1.133425855 | 0.094103959 |
| 1454760_at | Htatsf1 | 1.27947053 | 84.27491916 | 65.86702639 | -0.999599455 | 1.407474146 | -1.285549377 | 0.367875048 | 0.094103959 |
| 1426938_at | Nova1 | 1.263809058 | 2.403802936 | 1.902030153 | -0.410521976 | -1.262648172 | -0.252864283 | 2.852087974 | 0.094103959 |
| 1448282_at | Plrg1 | 1.35092467 | 170.4866609 | 126.199976 | -0.696799795 | -0.440116156 | -0.73674269 | 2.412650308 | 0.094103959 |
| 1424874_a_at | Ptbp1 | 1.261348529 | 74.05889661 | 58.71406268 | 1.034465755 | -0.169198461 | 0.958286449 | -2.030183585 | 0.094103959 |
| 1418573_a_at | Raly | 1.383191308 | 347.4005949 | 251.1587463 | 2.114594555 | -0.60060272 | 0.339725839 | -1.566557807 | 0.094103959 |
| 1415739_at | Rbm42 | 1.258809311 | 154.6924068 | 122.8878794 | 0.117887016 | -1.076760807 | -0.301049325 | 2.078113428 | 0.094103959 |
| 1416720_at | Srsf6 | 1.322816791 | 121.6354314 | 91.95183505 | 1.77128794 | 0.54302202 | -0.801863711 | -1.607173024 | 0.094103959 |
| 1423723_s_at | Tardbp | 1.266650954 | 313.391114 | 247.4171066 | -1.060953848 | 1.589258847 | -0.589733092 | -0.801500107 | 0.094103959 |
| 1448461_a_at | Thoc7 | 1.336200969 | 211.6273381 | 158.3798718 | -1.5641488 | 1.424707268 | -0.934301007 | 0.435371363 | 0.094103959 |
| 1416812_at | Tia1 | 1.384292864 | 43.21413309 | 31.21747877 | -0.457714627 | 1.160179949 | -1.233513751 | -2.042007213 | 0.094103959 |
| 1452615_s_at | Trpt1 | 1.388628838 | 18.40073113 | 13.25100749 | -0.415878969 | -0.684111898 | -0.754031607 | 2.561440943 | 0.094103959 |
| 1433698_a_at | Txn14a | 1.308565347 | 107.7447392 | 82.33806542 | 1.502013831 | -1.572487854 | 0.417141971 | 0.562609964 | 0.094103959 |
| 1417260_at | U2af2 | 1.264697837 | 48.49861821 | 38.34798857 | -0.255061782 | 1.495600442 | -0.514843641 | -1.551147434 | 0.094103959 |
| 1460429_at | Cdc5l | 1.229729803 | 97.38441878 | 79.19172047 | -1.359077778 | 1.408495593 | -0.004335541 | -0.982636822 | 0.156294402 |
| 1423849_a_at | Clk3 | 1.222334615 | 107.8480461 | 88.23119685 | 1.903139329 | -1.199368175 | 0.111059255 | -0.052271377 | 0.156294402 |
| 1423925_at | Dhx16 | 1.141571646 | 60.09450095 | 52.64190046 | -0.500128785 | 0.150136495 | 1.373521387 | -1.581460555 | 0.156294402 |
| 1428267_at | Dhx40 | 1.162105433 | 120.7217716 | 103.8819441 | -0.83900457 | 0.121551265 | -0.936255451 | 1.88475973 | 0.156294402 |
| 1419977_s_at | Esrp2 | 1.203906033 | 250.6908565 | 208.2312487 | -0.554982467 | 1.388711314 | -0.194571655 | -1.500107517 | 0.156294402 |
| 1423369_at | Fmr1 | 1.146630565 | 279.8692762 | 244.0797279 | -0.157928785 | 1.374182753 | -0.688686503 | -1.214127133 | 0.156294402 |
| 1417253_at | Frg1 | 1.254914889 | 258.4393815 | 205.9417604 | 1.749151639 | -0.034937155 | 0.085131141 | -1.804431236 | 0.156294402 |
| 1438794_x_at | Gm15483 /// R | 1.13595032 | 253.8005386 | 223.4257379 | 1.260406553 | -0.508706665 | -1.17337597 | 1.151939181 | 0.156294402 |
| 1428262_s_at | Hnrnpa3 | 1.241355274 | 958.4710758 | 772.11665 | -1.121488494 | 1.465165871 | -0.131062643 | -1.145704433 | 0.156294402 |
| 1433663_s_at | Ncbp1 | 1.4228843085 | 56.35101555 | 45.88069597 | -1.425455019 | 0.858969571 | -0.974528572 | 1.244810264 | 0.156294402 |
| 1427439_s_at | Prmt5 | 1.151054555 | 64.65127734 | 56.16699663 | -0.519127841 | -0.660663922 | -0.329998957 | 2.060232987 | 0.156294402 |
| 1422453_at | Prpf8 | 1.253526827 | 274.3313829 | 218.8476362 | -0.323513673 | -0.798476386 | -0.42084448 | 2.215433623 | 0.156294402 |
| 1423193_at | Pspc1 | 1.159990188 | 3.586112578 | 3.09150251 | 1.292532295 | -1.297116641 | -0.542343579 | 1.592453545 | 0.156294402 |
| 1427110_at | Raver1 | 1.250258488 | 198.4017487 | 158.6885836 | -0.803239515 | 1.558872475 | -1.030654462 | -0.420675327 | 0.156294402 |
| 1427286_at | Rbfox3 | 1.236538801 | 1.945333977 | 1.573209005 | -1.546517086 | 0.251013234 | -1.224302392 | 2.760564885 | 0.156294402 |
| 1431624_a_at | Rnf219 | 1.219893376 | 5.729994149 | 4.697127029 | -1.131707102 | 1.317022268 | -1.377465398 | 0.773290519 | 0.156294402 |
| 1428364_at | Scnm1 | 1.177311423 | 28.03099012 | 23.80932486 | -1.54109352 | 1.373945658 | -0.339895189 | -0.295622325 | 0.156294402 |
| 1452422_a_at | Snrpb2 | 1.176029248 | 395.199281 | 336.0454527 | -1.01228402 | 1.473974113 | -0.570108909 | -0.68419429 | 0.156294402 |
| 1448358_s_at | Snrpg | 1.224072805 | 653.7480907 | 534.0761498 | -1.260735847 | 1.333288906 | 0.170377327 | -1.188582098 | 0.156294402 |
| 1452439_s_at | Srsf2 | 1.179443042 | 467.2636657 | 396.1731502 | 1.512724862 | -0.50090918 | 0.636522594 | -1.526573021 | 0.156294402 |
| 1431593_a_at | Tsen34 | 1.186794535 | 6.119628368 | 5.156434569 | -0.917263181 | 1.591441065 | -0.373725277 | -1.236838225 | 0.156294402 |
| 1450892_a_at | Usp4 | 1.147382566 | 270.0808488 | 235.3886636 | 1.84763002 | -0.598272832 | 0.192745757 | -1.107502976 | 0.156294402 |
| 1449354_at | Zrsr1 | 1.176332425 | 50.35369597 | 42.80566862 | 0.378834407 | 0.52288606 | 0.651435593 | -2.118891965 | 0.156294402 |
| 1426124_a_at | Clk1 | 1.12727891 | 316.7795444 | 281.0125708 | 1.256865189 | 0.501183256 | -0.269082052 | -1.733394546 | 0.246699987 |
| 1454681_at | Esrp1 | 1.111505476 | 2.82280107 | 2.53961958 | -0.344071481 | -1.177006069 | 0.068413897 | 2.214529733 | 0.246699987 |
| 1425804_at | Hmx2 | 1.116385038 | 1.5356134 | 1.375523093 | -0.32488752 | -0.907248824 | -0.83810138 | 2.954437401 | 0.246699987 |
| 1426126_a_at | Igflr1 /// U2af1 | 1.109404789 | 9.211299269 | 8.302920054 | 2.073186975 | -0.701805413 | -0.503850574 | -0.231710523 | 0.246699987 |
| 1428172_at | Prpf39 | 1.116361014 | 126.7702611 | 113.5566895 | -0.30926282 | -0.16940081 | -0.979722032 | 1.897893546 | 0.246699987 |
| 1417628_at | Supt6 | 1.084329945 | 217.5710196 | 200.6501993 | 1.597071819 | -0.618659925 | 0.427946945 | -1.136567871 | 0.246699987 |
| 1456699_s_at | Vthdc1 | 1.091250173 | 535.186076 | 490.4338982 | -1.118348878 | 0.756120637 | -0.308292655 | -1.612688635 | 0.246699987 |
| 1417743_at | Clk2 | 1.055513861 | 42.72484177 | 40.47776477 | 0.87241328 | -0.497286746 | 1.024305601 | -1.409342837 | 0.381071156 |
| 1424080_at | Dcps | 1.00656527 | 40.89252322 | 40.62580384 | 0.517745718 | 0.273795631 | 0.61952325 | -1.80010277 | 0.381071156 |
| 1416144_a_at | Dhx15 | 1.011709844 | 360.0744355 | 355.9068211 | -1.069384506 | 0.728471386 | -0.877272873 | 1.024962695 | 0.381071156 |
| 1416336_s_at | Gm14277 /// S | 1.039420866 | 402.1485881 | 386.8967819 | -1.277645423 | 1.136490654 | -0.615459231 | 0.20410664 | 0.381071156 |
| 1418420_at | Myod1 | 1.031326614 | 6.05890748 | 5.874867763 | 1.323936041 | -1.17602014 | -0.22438166 | 0.935273071 | 0.381071156 |

| | | | | | | | | | |
|--------------|----------------|--------------|-------------|-------------|--------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| 1460633_at | Prpf19 | 1.038728748 | 54.2064343 | 52.1853606 | -0.751646001 | -0.181921077 | -0.577076462 | 1.824283078 | 0.381071156 |
| 1417166_at | Psp1 | 1.04627845 | 624.5742246 | 596.9483788 | -1.027534992 | 1.272400188 | -0.664227612 | -0.207495172 | 0.381071156 |
| 1426826_at | Scaf8 | 1.046917536 | 37.72775258 | 36.03698599 | -1.24397048 | 1.055610958 | 0.339973436 | -0.968679031 | 0.381071156 |
| 1456040_at | Sf3b2 | 1.009263539 | 67.92055947 | 67.29714969 | 1.033137219 | -0.862110674 | 0.92392388 | -0.828184602 | 0.381071156 |
| 1422884_at | Snrpd3 | 1.031583498 | 298.8562453 | 289.7063067 | 0.095701115 | 0.833293319 | 0.196845815 | -1.7469844 | 0.381071156 |
| 1451294_s_at | Snrpe | 1.059741674 | 523.2211571 | 493.7251878 | -1.388232754 | 1.156512149 | -0.496728286 | 0.123016887 | 0.381071156 |
| 1448583_at | Usb1 | 1.000389629 | 38.67997057 | 38.66490559 | 1.694483028 | -0.765946529 | 0.058211164 | -0.495520364 | 0.381071156 |
| 1416736_at | Casc3 | 0.936222177 | 82.41777031 | 88.03227734 | 0.388250188 | 0.527993859 | 0.304601682 | -1.674375527 | 0.52864283 |
| 1423133_at | Cwc15 | 0.94147386 | 82.12519572 | 87.23045774 | 0.31460747 | -0.250420341 | 1.085554782 | -1.34464661 | 0.52864283 |
| 1439037_at | Ddx17 | 0.985523166 | 54.30865024 | 55.1064167 | 0.672107459 | 0.282521334 | 0.459751724 | -1.755978647 | 0.52864283 |
| 1448221_at | Ddx39b | 0.981446243 | 353.0527182 | 359.7270055 | 0.782113649 | -1.150014127 | 0.087318414 | 1.01815201 | 0.52864283 |
| 1416821_at | Dgcr14 | 0.940445047 | 30.54904381 | 32.48360326 | -0.561394527 | -0.500210817 | -0.218353366 | 1.686217044 | 0.52864283 |
| 1423403_at | Mapkbp1 | 0.941731335 | 16.00461242 | 16.99488148 | 0.245475325 | -0.452130954 | -0.80179671 | 1.577138545 | 0.52864283 |
| 1422836_at | Mbnl3 | 0.997507627 | 31.35551934 | 31.43386427 | -0.713728117 | 1.272057261 | -0.483762254 | -0.76135098 | 0.52864283 |
| 1455696_a_at | Prpf4b | 0.97422341 | 324.3050852 | 332.8861098 | -1.442681486 | 0.931760726 | -0.436664056 | 0.347956584 | 0.52864283 |
| 1452091_a_at | Rbm28 | 0.958884573 | 51.21893827 | 53.41512388 | -0.448624532 | -0.440680083 | -0.410042984 | 1.729815316 | 0.52864283 |
| 1418119_at | Rbm8a | 0.994859785 | 275.4637113 | 276.8869698 | 0.710919812 | -1.249091426 | 0.727334776 | 0.401119529 | 0.52864283 |
| 1424883_s_at | Srsf7 | 0.965666354 | 401.1098571 | 415.3710591 | -1.059208894 | 1.11176551 | -0.036829663 | -0.744627406 | 0.52864283 |
| 1427432_a_at | Tra2b | 0.968739168 | 266.9248105 | 275.5383692 | -1.207388663 | 1.023453548 | -0.596545584 | 0.297026861 | 0.52864283 |
| 1437281_x_at | Xab2 | 0.988674598 | 105.657688 | 106.8680111 | 0.64754155 | -0.89840888 | -0.410962505 | 1.39775659 | 0.52864283 |
| 1454652_at | Zranb2 | 0.99689394 | 342.2104517 | 343.2766898 | -1.138175879 | 1.015977292 | -0.756873096 | 0.454044521 | 0.52864283 |
| 1423375_at | Cir1 | 0.879150234 | 36.37150843 | 41.37120943 | 1.411035044 | -0.752250189 | -0.330947863 | 0.283979089 | 0.788327027 |
| 1424300_at | Gemin6 /// Gm | 0.905535254 | 72.42987487 | 79.98570411 | 0.266636055 | -0.003807773 | -0.574123461 | 1.324192297 | 0.788327027 |
| 1451400_at | Gemin8 | 0.927960303 | 55.74815096 | 60.07600842 | -0.202317336 | -0.474529366 | -0.498705611 | 1.658140429 | 0.788327027 |
| 1422311_a_at | Polr2a | 0.914131797 | 25.35970719 | 27.74184999 | -0.52951374 | 1.160197496 | -0.433325396 | -0.822943925 | 0.788327027 |
| 1454789_x_at | Prpf6 | 0.899189459 | 215.4697299 | 239.6266192 | 0.412593174 | -0.741355394 | -0.422567171 | 1.386422043 | 0.788327027 |
| 1446147_at | Rbm39 | 0.894142158 | 751.6597537 | 840.6490479 | 0.699525862 | 0.170500859 | 0.428635229 | -1.555207599 | 0.788327027 |
| 1451237_s_at | Rbm7 | 0.884751282 | 106.1954937 | 120.0286407 | -1.094907336 | 1.004345111 | -0.453624462 | 0.025831433 | 0.788327027 |
| 1415913_at | Rps13 | 0.927750945 | 23.42469891 | 25.24890871 | 0.836769279 | 0.691905503 | -0.505476058 | -1.315977041 | 0.788327027 |
| 1452884_at | Scaf11 | 0.928079942 | 136.3459296 | 146.9118374 | -0.590088452 | -0.13039947 | -0.604481981 | 1.613396876 | 0.788327027 |
| 1449933_a_at | Tsen15 | 0.925510199 | 74.97720096 | 81.0117501 | -0.536101364 | -0.41018989 | -0.329495701 | 1.659078783 | 0.788327027 |
| 1416848_at | Ubl5 | 0.919390208 | 121.4120394 | 132.0571378 | 1.214623369 | -0.57215364 | 0.547944518 | -0.991626659 | 0.788327027 |
| 1417085_at | Akr1c6 | 0.85929974 | 1.7262007 | 2.00884583 | 1.247292203 | -1.269635646 | 0.025759088 | 0.834421756 | 1.178613522 |
| 1428961_a_at | Clasrp | 0.822076974 | 66.3324468 | 80.6888514 | 0.459494471 | -0.872452881 | -0.090355584 | 1.115067777 | 1.178613522 |
| 1456107_x_at | Eftud2 | 0.859202299 | 153.6029089 | 183.0627814 | -1.186038761 | 0.642971465 | -0.435002621 | 0.694423148 | 1.178613522 |
| 1435764_a_at | Gemin7 | 0.816808614 | 54.81747508 | 67.11177397 | 0.134630886 | -0.840319146 | 1.05701334 | -0.143450095 | 1.178613522 |
| 1426266_s_at | Gm8539 /// Zb | 0.8339746 | 110.0359732 | 131.9416361 | -0.57830358 | -0.042056539 | -0.57889053 | 1.420267018 | 1.178613522 |
| 1418656_at | LOC100044729 | 0.84828545 | 123.626374 | 145.736761 | -0.792865308 | 1.052491162 | -0.321387601 | -0.532769828 | 1.178613522 |
| 1439154_at | Nup98 | 0.858089623 | 15.88907282 | 18.15679871 | -0.688511696 | -0.253864637 | -0.322291207 | 1.541341034 | 1.178613522 |
| 1435821_s_at | Ppp1r8 | 0.846468869 | 108.5627425 | 128.2536741 | -0.60940507 | -0.115154186 | -0.500892058 | 1.469184791 | 1.178613522 |
| 1452869_at | Prpf38b | 0.8433636 | 160.8444866 | 190.717843 | 0.445782859 | 0.289977852 | 0.433107166 | -1.506555501 | 1.178613522 |
| 1437461_s_at | Rnpc3 | 0.829898369 | 179.9240441 | 216.8025036 | -0.666870961 | -0.173181382 | -0.367969254 | 1.44613227 | 1.178613522 |
| 1451104_a_at | Snrnp70 | 0.849658469 | 151.7168062 | 178.5621067 | 1.305121227 | -0.606837359 | 0.293963313 | -0.685676714 | 1.178613522 |
| 1417136_s_at | Srpk2 | 0.852334061 | 51.0332868 | 59.87474765 | -0.311857085 | 0.352597144 | 0.798350902 | -1.340272691 | 1.178613522 |
| 1417727_at | Srsf9 | 0.833518259 | 104.0782059 | 124.866138 | 0.558581874 | -0.508470999 | 0.929726562 | -0.950765626 | 1.178613522 |
| 1422116_at | Aff2 | 0.787977951 | 1.259328872 | 1.598177805 | 0.177885242 | -0.563918535 | -0.814049677 | 1.847378553 | 1.642281278 |
| 1426629_at | Dhx8 | 0.82951182 | 29.65687848 | 37.8783239 | -0.293547278 | -0.711320233 | 0.178545815 | 1.241019913 | 1.642281278 |
| 1420622_a_at | Hspa8 | 0.771858468 | 657.1175899 | 851.3446669 | -0.98744576 | 0.215637647 | -0.342512481 | 1.084732989 | 1.642281278 |
| 1417515_at | Lsm10 | 0.803236271 | 36.00346068 | 44.8230016 | -0.053617214 | -0.632709288 | -0.20487086 | 1.38129384 | 1.642281278 |
| 1418247_s_at | Rbfox2 | 0.801781962 | 1.491867364 | 1.860689607 | 0.576399145 | -0.1019192135 | -0.301579445 | 1.524360339 | 1.642281278 |
| 1416354_at | Rbmx | 0.7856999322 | 108.9998645 | 143.9893819 | 0.076232107 | 0.281682959 | -1.043849844 | 0.846096086 | 1.642281278 |
| 1455546_s_at | Sf3a2 | 0.763636345 | 74.14884276 | 97.09967737 | -0.157046622 | -0.398457099 | -0.403706921 | 1.359417681 | 1.642281278 |
| 1427134_at | Srek1 | 0.768002564 | 42.92207709 | 55.88793464 | -0.680628263 | -0.277283294 | -0.143389084 | 1.333952532 | 1.642281278 |
| 1427902_at | Srrm2 | 0.809542973 | 312.4174427 | 385.9182933 | -0.01111303 | 0.46442711 | 0.478526524 | -1.400967519 | 1.642281278 |
| 1433611_s_at | Bud31 /// LOC1 | 0.78566371 | 253.9183309 | 335.5761977 | 0.003815548 | 0.690825006 | 0.051386236 | -1.22370554 | 2.368319877 |
| 1448274_at | C1qbp | 0.707698654 | 166.9814934 | 235.9499944 | -0.754897668 | -0.436748675 | 0.39428429 | 0.957099739 | 2.368319877 |
| 1436935_x_at | Clns1a | 0.701716393 | 324.4748956 | 462.4017609 | -0.381946387 | -0.338991009 | -0.22849683 | 1.251593842 | 2.368319877 |
| 1451065_a_at | Ddx39 | 0.742220216 | 219.7484207 | 296.0690316 | -0.901760897 | 0.796790502 | -0.472422891 | 0.203673914 | 2.368319877 |
| 1418927_a_at | Habp4 | 0.73803886 | 9.885744484 | 13.39461242 | 0.674839588 | 0.324586883 | 0.065491098 | -1.30313919 | 2.368319877 |
| 1450943_at | Magohb | 0.740647244 | 62.13736631 | 83.89603396 | -0.887169131 | 0.325713769 | -0.474417059 | 0.976868929 | 2.368319877 |
| 1417731_at | Pqbp1 | 0.701488021 | 98.23512317 | 140.0382047 | 0.841495118 | -0.536350462 | 0.527164993 | -0.650464338 | 2.368319877 |
| 1454798_at | Rbm15b | 0.738861691 | 12.1113787 | 16.39194296 | 0.289817386 | 0.536288242 | 0.099797685 | -1.316685703 | 2.368319877 |
| 1452675_at | Rbm22 | 0.75254572 | 53.90559722 | 71.63099307 | 0.687715589 | 0.451037377 | -0.179813559 | -1.199693139 | 2.368319877 |
| 1448658_at | Sart1 | 0.753754973 | 77.53444193 | 102.8642527 | 0.20272394 | -0.618868556 | -0.295978524 | 1.223361687 | 2.368319877 |
| 1428264_at | Snrnp40 | 0.699730084 | 58.69513135 | 83.88253225 | -0.093611363 | -0.602289053 | -0.052506741 | 1.167435439 | 2.368319877 |
| 1419260_a_at | Snrpb | 0.738840184 | 57.53647729 | 77.87404981 | 0.096317684 | -0.576806386 | 1.023289074 | -0.499359139 | 2.368319877 |
| 1416566_at | Strap | 0.728506526 | 121.8692754 | 167.2864568 | -0.622957342 | -0.17619518 | -0.262123478 | 1.266121177 | 2.368319877 |
| 1453037_at | Usp49 | 0.735188957 | 16.67561883 | 22.68208557 | -0.9950277 | 0.498126613 | -0.447819293 | 0.761909068 | 2.368319877 |
| 1423755_at | Zcchc8 | 0.743387003 | 42.97016301 | 57.80322068 | 0.405466697 | 0.092248542 | 0.548604499 | -1.290686932 | 2.368319877 |
| 1450178_at | Brdt | 0.672566174 | 4.654753237 | 6.920885134 | 0.421120299 | -0.678424418 | -0.237630086 | 1.026427181 | 3.253545716 |
| 1426929_at | Celf4 | 0.678382044 | 2.852955195 | 4.205528756 | 1.260056637 | 0.016130244 | -0.625738438 | -0.45262246 | 3.253545716 |
| 1419275_at | Dazap1 | 0.696967727 | 30.39763349 | 43.61411918 | 0.98972868 | -0.259652286 | 0.255354972 | -0.897448165 | 3.253545716 |
| 1452680_at | Gm5848 /// Sn | 0.680621084 | 309.6480942 | 454.9493124 | 0.452244092 | -0.592395838 | 0.780332982 | -0.505361672 | 3.253545716 |
| 1450963_at | Hnrnpf | 0.674609846 | 218.1164203 | 323.3223196 | 0.950985676 | -0.271186629 | 0.257718879 | -0.842633133 | 3.253545716 |
| 1451884_a_at | Lsm2 | 0.684291791 | 22.12275973 | 32.32942441 | -0.993627538 | 0.374290136 | 0.614710334 | -0.449803134 | 3.253545716 |
| 1416212_at | Magoh | 0.657088279 | 142.1635143 | 216.3537517 | -0.313762445 | 0.748872636 | -0.076202421 | -0.832755387 | 3.253545716 |
| 1415820_x_at | Nono | 0.652819749 | 252.682371 | 387.0630006 | -0.387848961 | 0.570170099 | -0.77315609 | 0.46844025 | 3.253545716 |

| | | | | | | | | | |
|--------------|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 1453840_at | Pabpc1 | 0.684726464 | 24.14342172 | 35.25995119 | 0.928279456 | -0.30246596 | 0.335819887 | -0.871929373 | 3.253545716 |
| 1451185_at | Sf3b5 | 0.654776348 | 99.55537481 | 152.0448548 | 0.719559908 | -0.396521647 | 0.525677958 | -0.759594441 | 3.253545716 |
| 1448778_at | Srsf4 | 0.677624132 | 38.5567074 | 56.89984396 | -0.115661946 | -0.772928935 | 0.537709973 | 0.686930206 | 3.253545716 |
| 1422509_at | U2af1 | 0.642347824 | 100.6201713 | 156.6443718 | -0.492606367 | 0.788404991 | -0.179792154 | -0.581679079 | 3.253545716 |
| 1460209_at | Usp39 | 0.681542372 | 31.2461889 | 45.84628952 | -0.24235315 | -0.696772864 | 0.358890261 | 0.925120909 | 3.253545716 |
| 1421324_a_at | Akt2 | 0.62696919 | 12.75514772 | 20.344138 | -0.042028836 | -0.505691046 | -0.153129564 | 1.089019997 | 4.399458528 |
| 1422993_s_at | Alyref /// Alyre | 0.62282482 | 99.41221013 | 159.6150424 | 0.454052934 | -0.236399459 | 0.61057929 | -0.874159556 | 4.399458528 |
| 1423740_a_at | Gm15455 /// R | 0.619076273 | 199.2533581 | 321.8559113 | -0.497595693 | -0.228487179 | -0.152981562 | 1.082383075 | 4.399458528 |
| 1451503_at | Nol3 | 0.633578556 | 1.978384808 | 3.122556452 | -0.643264215 | 0.261680195 | -0.640503692 | 1.061135479 | 4.399458528 |
| 1425523_at | Rbm25 | 0.603778953 | 97.55527141 | 161.5744818 | 0.17766503 | -0.021126928 | 0.615837811 | -0.963570565 | 4.399458528 |
| 1424705_at | Rbmx2 | 0.617618728 | 16.3791944 | 26.51991213 | -0.959136452 | 0.146791 | -0.054579962 | 0.787258068 | 4.399458528 |
| 1420397_a_at | Spen | 0.633748705 | 16.10742387 | 25.41610539 | 0.941719325 | -0.676584574 | 0.0607052 | 0.104981364 | 4.399458528 |
| 1454042_a_at | Srp1 | 0.595553224 | 90.95957705 | 152.7312309 | 0.643535657 | 0.284822509 | -0.147701515 | -0.921304486 | 4.399458528 |
| 1425774_at | Srrm4 | 0.588489337 | 1.046434302 | 1.778170369 | 0.644345776 | -0.970840193 | 0.228312067 | 0.669305122 | 4.399458528 |
| 1418527_a_at | Srsf10 | 0.618727149 | 74.67742064 | 120.6952383 | -0.658730071 | 0.637741931 | -0.513915253 | 0.28104719 | 4.399458528 |
| 1418732_s_at | Wdr83 | 0.601021132 | 11.02306073 | 18.34055434 | -0.630255308 | -0.40334491 | 0.757852786 | 0.292026444 | 4.399458528 |
| 1419366_at | Zmat5 | 0.630238417 | 29.51586673 | 46.83285869 | 0.572863674 | -0.670282275 | -0.132512501 | 0.720956785 | 4.399458528 |
| 1424285_s_at | Arl6ip4 | 0.566029109 | 44.77488386 | 79.1035004 | -0.145525193 | -0.225974495 | -0.36358269 | 1.006926272 | 5 |
| 1420056_s_at | Jmjd6 | 0.565542053 | 34.24811102 | 60.55802722 | 0.136748533 | -0.323808539 | -0.404315149 | 0.942019231 | 5 |
| 1449333_at | Sf3a1 | 0.567743107 | 25.55651125 | 45.01421666 | -0.868136855 | -0.119855886 | 0.331566376 | 0.625808163 | 5 |
| 1415714_a_at | Snrnp27 | 0.566862875 | 117.2074787 | 206.7651346 | -0.465418522 | 0.297760939 | -0.558853807 | 0.714288698 | 5 |
| 1423633_at | Snrnp48 | 0.58532057 | 56.00612046 | 95.68452457 | -0.07868368 | 0.445849069 | -0.809547667 | 0.414998789 | 5 |
| 1435798_a_at | Sugp2 | 0.584901324 | 75.96655741 | 129.8792708 | -0.379652874 | 0.214371341 | -0.600282175 | 0.822743539 | 5 |

Supplemental material

Table S2. Primers and probes used in ChIP, standard and real time PCR assays

| Primers and probes | | Standard | Real time | ChIP | Letter code ^a |
|---------------------------------|---|----------|-----------|------|--------------------------|
| VH₇₁₈₃-for | 5' CGG TAC CAA GAA SAM CCT GTW CCT GCA AAT GAS C 3' | x | x | | |
| Cμ-rev | 5' AGA CGA GGG GGA AGA CAT TT 3' | x | x | x | |
| IgH^{frVk}-for | 5' GGG CAC CAA GCT GGA AAT C 3' | | x | x | a |
| IgH^{frVk}-rev | 5' CGC CCC CAC TAG ATG CAT 3' | | x | x | a |
| IgH^{frVk}-probe | 5' AAC GGG TAA GTC TCG 3' | | x | x | a |
| IgH^{wt}-for | 5' TTC TGA GCA TTG CAG ACT AAT CTT G 3' | | x | x | b |
| IgH^{wt}-rev | 5' CCT AGA CAG TTT ATT TCC CAA CTT CTC 3' | | x | x | b |
| IgH^{wt}-probe | 5' CCC TGA GGG AGC CG 3' | | x | x | b |
| CH1μ-for | 5' CTT CCC AAA TGT CTT CCC CC 3' | | | x | c |
| CH1μ-rev | 5' TGC GAG GTG GCT AGG TAC TTG 3' | | | x | c |
| Gapdh Ex5-for | 5' TGT TCC TAC CCC CAA TGT GT 3' | x | | | |
| Gapdh Ex6-rev | 5' GGT CCT CAG TGT AGC CCA AG 3' | x | | | |
| Gapdh-probe | Mm99999915_g1, Applied Biosystem | | x | | |

^a Letter code used in Fig. 1 A and Fig. 5 A. Degenerate nucleotide positions are coded as follows: M=A or C, S=C or G, Y=C, W=A or T.

REFERENCES

- Aartsma-Rus, A., and G.-J.B. van Ommen. 2010. Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 18:146–153. doi:10.1038/ejhg.2009.160.
- Alamyar, E., P. Duroux, M.-P. Lefranc, and V. Giudicelli. 2012. IMGT(®) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 882:569–604. doi:10.1007/978-1-61779-842-9_32.
- Aouinti, S., V. Giudicelli, P. Duroux, D. Malouche, S. Kossida, and M.-P. Lefranc. 2016. IMGT/StatClonotype for Pairwise Evaluation and Visualization of NGS IG and TR IMGT Clonotype (AA) Diversity or Expression from IMGT/HighV-QUEST. *Front. Immunol.* 7:339. doi:10.3389/fimmu.2016.00339.
- Baumann, B., M.J. Potash, and G. Köhler. 1985. Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J.* 4:351–359.
- Benchaouir, R., V. Robin, and A. Goyenvalle. 2015. Gene and splicing therapies for neuromuscular diseases. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 20:1190–1233.
- Bestas, B., P.M.D. Moreno, K.E.M. Blomberg, D.K. Mohammad, A.F. Saleh, T. Sutlu, J.Z. Nordin, P. Guterstam, M.O. Gustafsson, S. Kharazi, B. Piątosza, T.C. Roberts, M.A. Behlke, M.J.A. Wood, M.J. Gait, K.E. Lundin, S. El Andaloussi, R. Månsson, A. Berglöf, J. Wengel, and C.I.E. Smith. 2014. Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J. Clin. Invest.* 124:4067–4081. doi:10.1172/JCI76175.

- Betts, C., A.F. Saleh, A.A. Arzumanov, S.M. Hammond, C. Godfrey, T. Coursindel, M.J. Gait, and M.J. Wood. 2012. Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 1:e38. doi:10.1038/mtna.2012.30.
- Bischof, J., and S.M. Ibrahim. 2016. bcRep: R Package for Comprehensive Analysis of B Cell Receptor Repertoire Data. *PloS One*. 11:e0161569. doi:10.1371/journal.pone.0161569.
- Blencowe, B.J. 2006. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell*. 126:37–47. doi:10.1016/j.cell.2006.06.023.
- Boice, M., D. Salloum, F. Mourcin, V. Sanghvi, R. Amin, E. Oricchio, M. Jiang, A. Mottok, N. Denis-Lagache, G. Ciriello, W. Tam, J. Teruya-Feldstein, E. de Stanchina, W.C. Chan, S.N. Malek, D. Ennishi, R.J. Brentjens, R.D. Gascoyne, M. Cogné, K. Tarte, and H.-G. Wendel. 2016. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell*. 167:405–418.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.08.032.
- Bühler, M., and O. Mühlemann. 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. doi:10.1261/rna.7183805.
- 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. doi:10.1038/ni1036.

- Cenci, S., A. Mezghrani, P. Cascio, G. Bianchi, F. Cerruti, A. Fra, H. Lelouard, S. Masciarelli, L. Mattioli, L. Oliva, A. Orsi, E. Pasqualetto, P. Pierre, E. Ruffato, L. Tagliavacca, and R. Sitia. 2006. Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *EMBO J.* 25:1104–1113. doi:10.1038/sj.emboj.7601009.
- Cenci, S., and R. Sitia. 2007. Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett.* 581:3652–3657. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.031.
- 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. doi: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 kappa transcripts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 184:5009–5017. doi:10.4049/jimmunol.0902949.
- 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. doi:10.1038/sj.emboj.7601846.
- Delpy, L., M. Le Bert, M. Cogné, and A.A. Khamlichi. 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. doi:10.1002/eji.200323969.

- Delpy, L., C. Sirac, C. Le Morvan, and M. Cogné. 2004a. Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol.* 173:1842–1848.
- Delpy, L., C. Sirac, E. Magnoux, S. Duchez, and M. Cogné. 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. doi:10.1073/pnas.0305586101.
- Dewaele, M., T. Tabaglio, K. Willekens, M. Bezzi, S.X. Teo, D.H.P. Low, C.M. Koh, F. Rambow, M. Fiers, A. Rogiers, E. Radaelli, M. Al-Haddawi, S.Y. Tan, E. Hermans, F. Amant, H. Yan, M. Lakshmanan, R.C. Koumar, S.T. Lim, F.A. Derheimer, R.M. Campbell, Z. Bonday, V. Tergaonkar, M. Shackleton, C. Blattner, J.-C. Marine, and E. Guccione. 2016. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J. Clin. Invest.* 126:68–84. doi:10.1172/JCI82534.
- Dominski, Z., and R. Kole. 1993. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:8673–8677.
- Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown, and D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:14863–14868.
- Goyenvalle, A., G. Griffith, A. Babbs, S. El Andaloussi, K. Ezzat, A. Avril, B. Dugovic, R. Chaussonot, A. Ferry, T. Voit, H. Amthor, C. Bühr, S. Schürch, M.J.A. Wood, K.E. Davies, C. Vaillend, C. Leumann, and L. Garcia. 2015. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 21:270–275. doi:10.1038/nm.3765.

- Green, M.R., S. Monti, R. Dalla-Favera, L. Pasqualucci, N.C. Walsh, M. Schmidt-Supprian, J.L. Kutok, S.J. Rodig, D.S. Neuberg, K. Rajewsky, T.R. Golub, F.W. Alt, M.A. Shipp, and J.P. Manis. 2011. Signatures of murine B-cell development implicate Yy1 as a regulator of the germinal center-specific program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:2873–2878. doi:10.1073/pnas.1019537108.
- Groen, E.J.N., K. Talbot, and T.H. Gillingwater. 2018. Advances in therapy for spinal muscular atrophy: promises and challenges. *Nat. Rev. Neurol.* doi:10.1038/nrneurol.2018.4.
- 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. doi:10.1093/nar/gkt491.
- Hwang, J., and Y.K. Kim. 2013. When a ribosome encounters a premature termination codon. *BMB Rep.* 46:9–16.
- Jäck, H.M., J. Berg, and M. Wabl. 1989. Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* 19:843–847. doi:10.1002/eji.1830190510.
- Johnson, K., C. Angelin-Duclos, S. Park, and K.L. Calame. 2003. Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V(H) gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol. Cell. Biol.* 23:2438–2450.

- Kassambara, A., T. Rème, M. Jourdan, T. Fest, D. Hose, K. Tarte, and B. Klein. 2015. GenomicScape: an easy-to-use web tool for gene expression data analysis. Application to investigate the molecular events in the differentiation of B cells into plasma cells. *PLoS Comput. Biol.* 11:e1004077. doi:10.1371/journal.pcbi.1004077.
- Kolasinska-Zwierz, P., T. Down, I. Latorre, T. Liu, X.S. Liu, and J. Ahringer. 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat. Genet.* 41:376–381. doi:10.1038/ng.322.
- 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. doi:10.1002/eji.201242912.
- Li, S., M.-P. Lefranc, J.J. Miles, E. Alamyar, V. Giudicelli, P. Duroux, J.D. Freeman, V.D.A. Corbin, J.-P. Scheerlinck, M.A. Frohman, P.U. Cameron, M. Plebanski, B. Loveland, S.R. Burrows, A.T. Papenfuss, and E.J. Gowans. 2013. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat. Commun.* 4:2333. doi:10.1038/ncomms3333.
- Li, S., and M.F. Wilkinson. 1998. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity.* 8:135–141.
- Lozano, F., B. Maertzdorf, R. Pannell, and C. Milstein. 1994. Low cytoplasmic mRNA levels of immunoglobulin kappa light chain genes containing nonsense codons correlate with inefficient splicing. *EMBO J.* 13:4617–4622.

- Luco, R.F., Q. Pan, K. Tominaga, B.J. Blencowe, O.M. Pereira-Smith, and T. Misteli. 2010. Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. *Science*. 327:996–1000. doi:10.1126/science.1184208.
- 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. doi:10.1101/gad.1014502.
- Maquat, L.E. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 5:89–99. doi:10.1038/nrm1310.
- Martincic, K., S.A. Alkan, A. Cheadle, L. Borghesi, and C. Milcarek. 2009. Transcription elongation factor ELL2 directs immunoglobulin secretion in plasma cells by stimulating altered RNA processing. *Nat. Immunol*. 10:1102–1109. doi:10.1038/ni.1786.
- de la Mata, M., M.J. Muñoz, M. Alló, J.P. Fededa, I.E. Schor, and A.R. Kornblihtt. 2011. RNA Polymerase II Elongation at the Crossroads of Transcription and Alternative Splicing. *Genet. Res. Int*. 2011:309865. doi:10.4061/2011/309865.
- Mendell, J.T., C.M.J. ap Rhys, and H.C. Dietz. 2002. Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science*. 298:419–422. doi:10.1126/science.1074428.
- Mostoslavsky, R., F.W. Alt, and K. Rajewsky. 2004. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell*. 118:539–544. doi:10.1016/j.cell.2004.08.023.
- 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.
doi:10.1080/1521654031000119830.

Pan, Q., A.L. Saltzman, Y.K. Kim, C. Misquitta, O. Shai, L.E. Maquat, B.J. Frey, and B.J. Blencowe. 2006. Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev*. 20:153–158. doi:10.1101/gad.1382806.

Pandit, S., D. Wang, and X.-D. Fu. 2008. Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries. *Curr. Opin. Cell Biol*. 20:260–265.
doi:10.1016/j.ceb.2008.03.001.

Park, K.S., I. Bayles, A. Szlachta-McGinn, J. Paul, J. Boiko, P. Santos, J. Liu, Z. Wang, L. Borghesi, and C. Milcarek. 2014a. Transcription elongation factor ELL2 drives Ig secretory-specific mRNA production and the unfolded protein response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 193:4663–4674. doi:10.4049/jimmunol.1401608.

Park, S.-K., Y. Xiang, X. Feng, and W.T. Garrard. 2014b. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev*. 28:1159–1164.
doi:10.1101/gad.237479.114.

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.

- Reynaud, S., L. Delpy, L. Fleury, H.-L. Dougier, C. Sirac, and M. Cogné. 2005. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 174:6176–6183.
- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210:1501–1507. doi:10.1084/jem.20130072.
- Saint-André, V., E. Batsché, C. Rachez, and C. Muchardt. 2011. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 γ favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:337–344. doi:10.1038/nsmb.1995.
- Schor, I.E., N. Rascovan, F. Pelisch, M. Alló, and A.R. Kornblihtt. 2009. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:4325–4330.
- Shukla, S., and S. Oberdoerffer. 2012. Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1819:673–683. doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.014.
- 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. doi:10.1182/blood-2005-11-4419.
- Srour, N., G. Chemin, A. Tinguely, M.O. Ashi, Z. Oruc, S. Péron, C. Sirac, M. Cogné, and L. Delpy. 2016. A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig

- rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.* 213:109–122. doi:10.1084/jem.20131511.
- Stein, C.A., and D. Castanotto. 2017. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 25:1069–1075. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.023.
- 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. doi:10.1128/MCB.06138-11.
- Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:5116–5121. doi:10.1073/pnas.091062498.
- Valentine, C.R. 1998. The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* 411:87–117.
- Wang, E.T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtkova, L. Zhang, C. Mayr, S.F. Kingsmore, G.P. Schroth, and C.B. Burge. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature.* 456:470–476. doi:10.1038/nature07509.
- Wang, J., Y.F. Chang, J.I. Hamilton, and M.F. Wilkinson. 2002a. Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol. Cell.* 10:951–957.
- Wang, J., J.I. Hamilton, M.S. Carter, S. Li, and M.F. Wilkinson. 2002b. Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. *Science.* 297:108–110. doi:10.1126/science.1069757.

Wesemann, D.R., A.J. Portuguese, R.M. Meyers, M.P. Gallagher, K. Cluff-Jones, J.M. Magee, R.A. Panchakshari, S.J. Rodig, T.B. Kepler, and F.W. Alt. 2013. Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. *Nature*. 501:112–115. doi:10.1038/nature12496.

Zhou, H.-L., G. Luo, J.A. Wise, and H. Lou. 2014. Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 42:701–713. doi:10.1093/nar/gkt875.

Article 2

Evidence for a positive regulatory loop between unfolded protein response and nonsense-mediated mRNA decay in plasma cells

Or

Crosstalk between unfolded protein response and non-sense mediated mRNA decay in plasma cells

Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srour¹, Estelle Troadec¹, Jean-Marie Lambert¹, XXX, Christophe Sirac¹, Michel Cogné^{1,2}, Faraj Terro¹ and Laurent Delpy¹

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 l'efficacité de dégradation des ARNm d'Ig non-sens par NMD. Pour aborder cette question, nous avons analysé la coopération éventuelle entre ces mécanismes de surveillance, agissant sur les ARNm (NMD) et sur les protéines (UPR, activation du protéasome, autophagie).

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 l'UPR. Dans un premier temps, 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^{wl/frVκ} (**Figure 1A**), permettant de quantifier l'efficacité du NMD des ARNm IgH non-sens dans 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) ou l'Emétine (Em), des inhibiteurs de traduction utilisés classiquement pour inhiber le NMD, et la wortmannin (Wort), capable d'inhiber la phosphorylation d'UPF1

via la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-related kinase SMG1. L'efficacité de dégradation par NMD des ARNm IgH^{frVκ} a été analysée par q-PCR après 2 ou 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). Cette efficacité correspond aux taux d'ARNm IgH^{frVκ} obtenus sur des cellules B traitées ou non pendant 4h avec le CHX ou la Wort. En parallèle, 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.

Pour créer une situation de stress protéique et évaluer simultanément l'efficacité de dégradation par NMD des ARNm d'Ig porteurs de PTCs, nous avons ensuite croisé le modèle iTIE (Annexe 1 : Figure 4A), dans lequel les plasmocytes présentent un stress exacerbé du RE, avec le modèle IgH^{wt/frVκ} facilitant l'analyse du NMD des ARNm IgH non-sens. Les cellules B isolées de rate de souris iTIE::IgH^{wt/frVκ} ont été stimulées et traitées comme précédemment.

Pour étendre l'analyse du stress protéique dans le modèle iTIE, nous avons étudié le processus d'autophagie, par traitement des cellules à la Chloroquine (CQ : 30μM) un inhibiteur du flux autophagique. Nous avons également évalué la dégradation des chaînes d'Ig tronquées par le protéasome, par traitement au bortézomib (Bz : 5nM).

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^{wt/frVκ}, stimulées 3 jours avec différents stimuli. Nos résultats montrent que la dégradation efficace des ARNm non-sens IgH^{frVκ} dans les cellules B activées (**Figure 1B**), est corrélée à une augmentation de l'expression des facteurs impliqués dans la réponse UPR (**Figure 1C**).

Dans un second temps, nous avons étudié ces mêmes paramètres à l'aide du modèle iTIE::IgH^{wt/frVκ}. Au préalable, nous avons complété l'analyse du stress protéique dans le modèle iTIE en analysant l'UPR (**Figure 2A**), l'activation du protéasome (**Figure 2B**) et de l'autophagie (**Figure 2C-D**). Bien que l'expression des Ig tronquées provoque un fort déficit en plasmocytes à longue durée de vie in vivo, ces Ig aberrantes n'ont que peu d'impact sur la survie des cellules B et des plasmablastes générées in vitro, après stimulation au LPS (3 jours). En effet, nous avons observé un pourcentage identique de plasmablastes après stimulation de

cellules B issues de souris *iTIE/iTIE Cre^{pos}* et *Cre^{neg}* (**Figure S1A-B**). De même, le marquage de viabilité cellulaire 7AAD (pour « 7-Aminoactinomycin D ») montre un pourcentage de cellules vivantes identiques dans ces deux modèles (**Figure S1C**). Ces conditions de stimulation *in vitro* facilitent donc l'analyse du stress protéique dans ce modèle. Après 3 jours de stimulation avec du LPS, nous avons confirmé les données obtenues précédemment (Annexe 1) et montré une forte expression des acteurs de l'UPR dans ces cellules (**Figure 2A**). Ensuite, nous avons évalué la dégradation des Ig tronquées par le protéasome dans les cellules B spléniques de souris *iTIE/iTIE Cre^{pos}*, stimulées 2 jours avec du LPS et traitées ou non au Bz. Nos résultats montrent une augmentation de la quantité d'Ig tronquées (facteur 2) après traitement Bz, soulignant leur prise en charge efficace par le protéasome (**Figure 2B**). L'autophagie a ensuite été étudiée dans ces cellules B stimulées au LPS (2 ou 3 jours) et traitées ou non avec CQ, pour bloquer le flux autophagique. De manière intéressante, nos résultats montrent que l'expression des Ig tronquées dans le modèle *iTIE*, active le flux autophagique avec une augmentation drastique de LC3 (facteur clé impliqué dans l'étude du flux autophagique) (**Figure 2C**). Ces résultats ont été confirmés par une analyse Western Blot du système de conjugaison ATG5/ATG12 (complexe protéique de conjugaison lors de la formation des autophagosomes) et révèle une augmentation drastique (facteur 5) de ce complexe dans les souris *iTIE/iTIE Cre^{pos}*, comparativement aux souris contrôles (*iTIE/iTIE Cre^{neg}*) (**Figure 2D**).

Après avoir contrôlé les taux de pré-ARNm $IgH^{frV\kappa}$, pour vérifier que la transcription de cet allèle non-productif est similaire dans les modèles $IgH^{wt/frV\kappa}$ et *iTIE::IgH^{wt/frV κ}* et que le traitement avec la Wort n'a pas d'impact sur cette transcription (**Figure 3A**), nous avons ensuite analysé la dégradation par NMD des ARNm $IgH^{frV\kappa}$ (**Figure 3B**). De façon intéressante, cette dégradation des transcrits IgH non-sens est plus marquée dans les cellules B issues du modèle *iTIE::IgH^{wt/frV κ}* , comparativement aux cellules $IgH^{wt/frV\kappa}$ présentant un stress protéique très faible (**Figure 3C-D**). Ces résultats mettent donc en évidence une augmentation de la dégradation des transcrits IgH non-sens par NMD en réponse à un stress protéique exacerbé (UPR, protéasome et autophagie).

Nos observations peuvent sembler en contradiction avec plusieurs études montrant une corrélation inverse entre la réponse UPR et l'activité du NMD dans des cellules non lymphoïdes (Gardner, 2008; Oren et al., 2014; Karam et al., 2015; pour revue Goetz and Wilkinson, 2017). Dans ces cellules, l'inhibition du NMD est la conséquence d'une activation

de la voie PERK et de la phosphorylation d'eIF2 α 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 α conduit à une inhibition de ce mécanisme de surveillance des ARNm (pour revue Goetz and Wilkinson, 2017). Pour apporter un éclairage sur ces disparités, nous avons étudié la voie PERK de l'UPR en analysant le taux de phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (p-eIF2 α) dans les cellules B spléniques de souris iTIE/iTIE Cre^{pos}, stimulées 3 jours avec du LPS par Western Blot (**Figure 4A**). Nos résultats montrent que le taux d'eIF2 α phosphorylée est équivalent dans les souris iTIE/iTIE Cre^{pos} comparativement aux souris iTIE/iTIE Cre^{neg} (**Figure 4B**). Ces résultats mettent donc en évidence que le stress protéique n'active pas la voie PERK de l'UPR dans les cellules sécrétrices d'anticorps, permettant ainsi de maintenir une production massive d'Ig. En accord avec cette dernière hypothèse, des taux d'Ig identiques sont retrouvés dans les surnageants de culture (**Figure 4C**) et les cellules B stimulées des souris iTIE/iTIE Cre^{pos} et Cre^{neg} (**Figure 4D**). Enfin, nous avons observé que l'inhibition de la traduction protéique, par traitement des cellules B stimulées à l'Em (6 dernières heures), abolit la boucle de régulation UPR-NMD et révèle une efficacité du NMD identique dans les modèles iTIE::IgH^{wt/frV κ} et IgH^{wt/frV κ} (**Figure 4E**). Ainsi, cette boucle de régulation positive, entre les mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie protéique et la surveillance des ARNm, serait restreinte aux cellules sécrétrices d'anticorps et dûe à leur activité de synthèse protéique considérable (**Figure 4F**).

Conclusion :

En conclusion, ces données montrent pour la première fois une forte coopération entre les mécanismes de NMD et de surveillance protéique (réponse UPR, autophagie, activation du protéasome) dans les cellules plasmocytaires. Nous proposons que la synthèse massive des Ig nécessite un renforcement global des mécanismes de surveillance, pour limiter l'apparition excessive d'Ig mal repliées ou tronquées et l'élimination des cellules sécrétrices d'anticorps par activation du « TIE-checkpoint ».

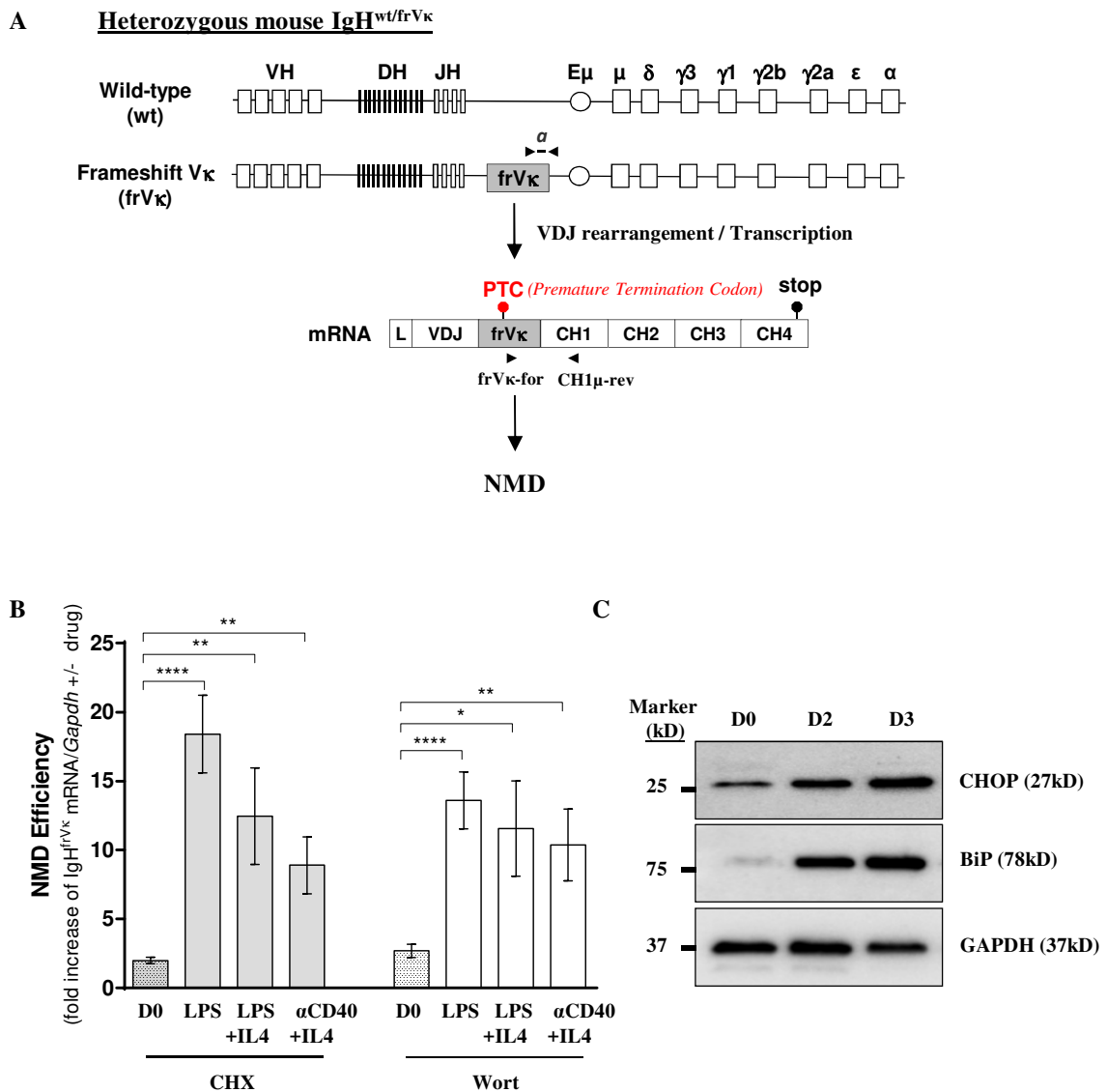


Figure 1. Increase of both NMD and UPR following B cell stimulation.

(A) Schematic representation of wild-type and targeted $IgH^{wt/frV\kappa}$ knock-in mice. In this model, B cells develop normally through the expression of the wild-type allele. After VDJ recombination, premature termination codons (PTC) appear on $IgH^{frV\kappa}$ mRNAs and these nonsense transcripts can be degraded by NMD. (B) The degradation of nonproductive $IgH^{frV\kappa}$ mRNAs (referred as NMD efficiency) was assessed by RT-qPCR using primers frV κ -for and CH1 μ -rev represented by black arrows in resting (D0, dotted bars) and stimulated B-cells (empty bars) (D3; LPS, LPS+IL-4 and α CD40+IL-4) after treatment with Cycloheximide (CHX 100 μ g/ml, grey bars) or Wortmannin (Wort 20 μ g/ml, white bars) during the last 4 hours (n=14-18). (C) Western blots of CHOP and BiP were performed in LPS-stimulated B cells (D2 and D3) compared to resting B-cells (D0) in $IgH^{wt/frV\kappa}$ mice. A representative experiment (out of 3 performed) is shown. Bars represent mean expression \pm SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$.

Figure 1 (Ashi et al.)

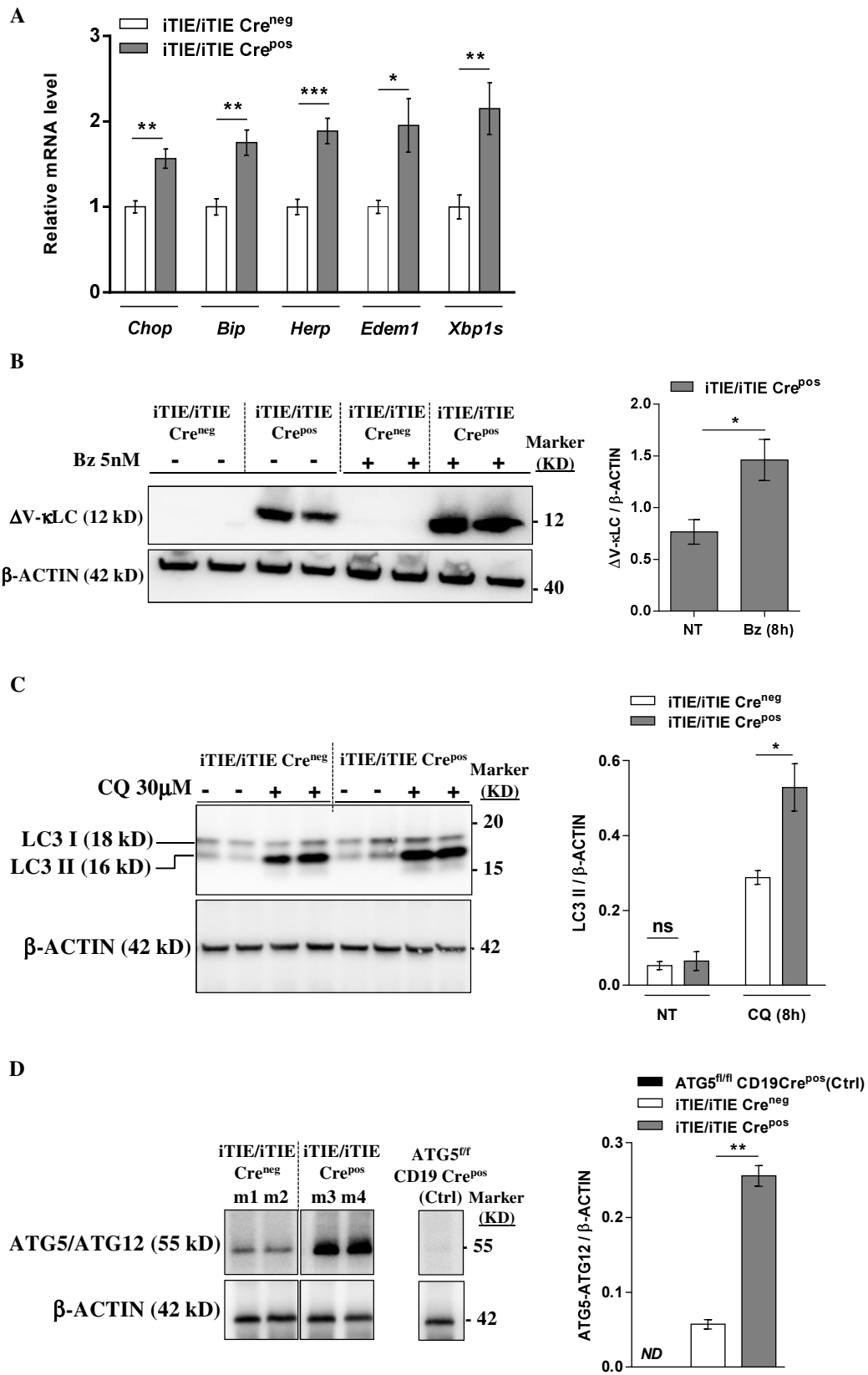


Figure 2 (Ashi *et al.*)

Figure 2. Exacerbated ER stress upon expression of truncated Ig

(A) Relative mRNA levels of ER stress markers were assessed on purified splenic B cells from *iTIE/iTIE Cre^{pos}* and *iTIE/iTIE Cre^{neg}* (n=5), 3 days after LPS stimulation (1 μ g/ml). qPCR were normalized to *Gapdh* expression and values obtained for *iTIE/iTIE Cre^{neg}* were set to 1. (B) The quantification of truncated ΔV - κ LCs was performed by Western Blot (WB), in LPS-stimulated B cells (day 2) isolated from spleens *Cre^{neg}* and *Cre^{pos}* *iTIE/iTIE* mice (n=5). Cells were treated or not with Bortezomib (Bz 5nM) during the last 8 hours. A representative experiment using two pools of 2 mice per genotype is shown. (C) The quantification of LC3 protein levels was performed in LPS-stimulated B cells (day 2) from *Cre^{neg}* (empty bars; n= 3) and *Cre^{pos}* (gray bars; n=3) *iTIE/iTIE* mice, after treatment with Chloroquine (CQ 30 μ M) during the last 8 hours. A representative experiment is shown. (D) The quantification of ATG5/ATG12 protein levels was performed in LPS-stimulated (day 3) B cells from *Cre^{neg}* (empty bars; n= 4) and *Cre^{pos}* (gray bars; n=4) *iTIE/iTIE* mice. ATG5^{fl/fl} CD19^{Cre^{pos}} served as a negative control (ND: not detected). A representative experiment using two mice per genotype is shown. Data are representative of at least three independent experiments (n=3–5). Bars represent mean expression \pm SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. ns : not significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

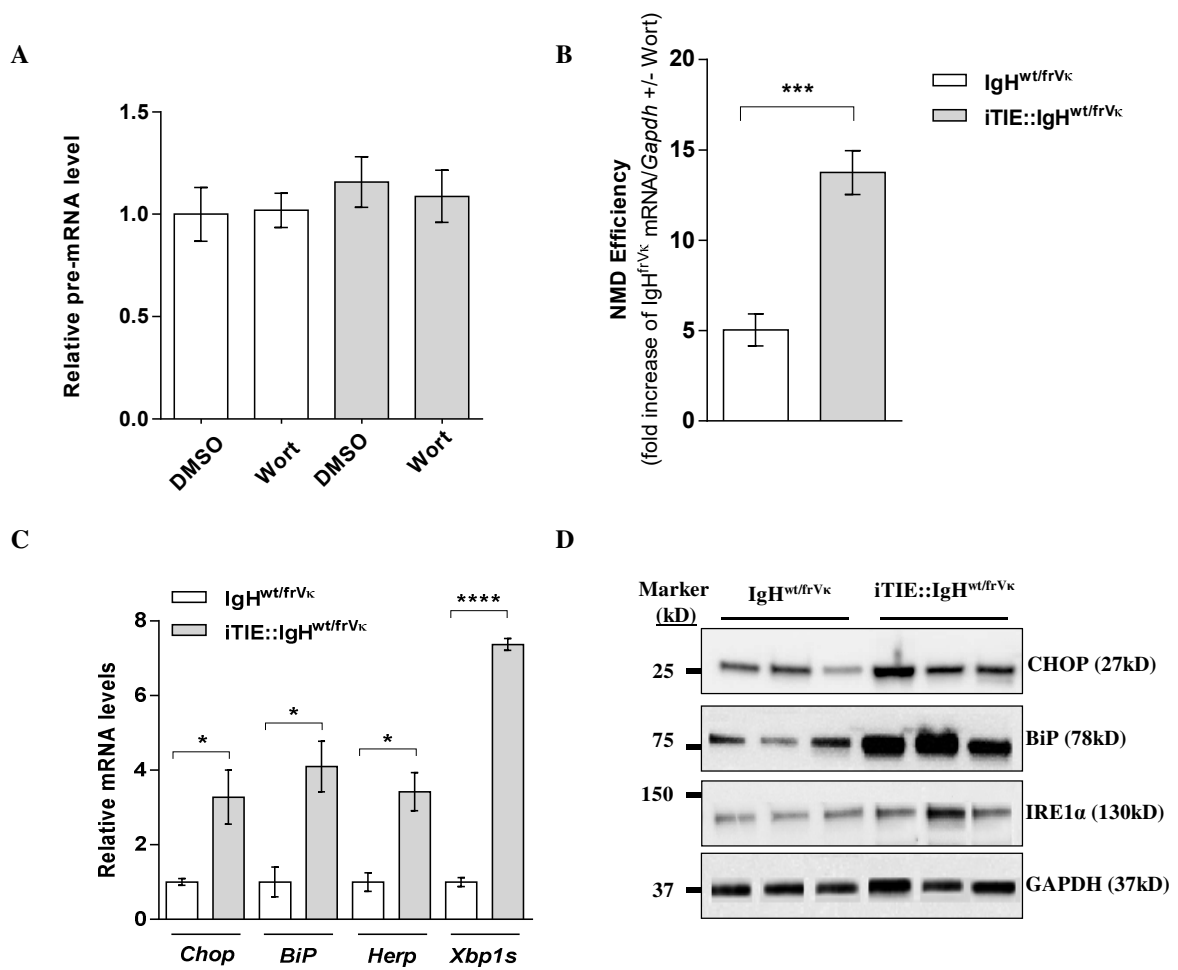


Figure 3. Prolonged ER stress enhances the degradation by NMD in stimulated B cells.

(A) Quantification of IgH^{frVκ} pre-mRNA levels was performed 3 days after LPS stimulation of splenic B cells isolated from IgH^{wt/frVκ} (empty bars) and iTIE:: IgH^{wt/frVκ} mice (gray bars), treated with Wortmannin (Wort 20μg/ml for 4h) or DMSO as control. (B) The degradation of nonproductive IgH^{frVκ} mRNAs was assessed in those stimulated B cells, by RT-qPCR. The NMD efficiency represents the fold increase of IgH^{frVκ} mRNA levels after drug treatment, after normalization 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^{wt/frVκ} mice 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 three independent experiments (n=6/group). Bars represent mean expression ±SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. *, P<0.05; ***, P<0.001; ****, P<0.0001.

Figure 3 (Ashi et al.)

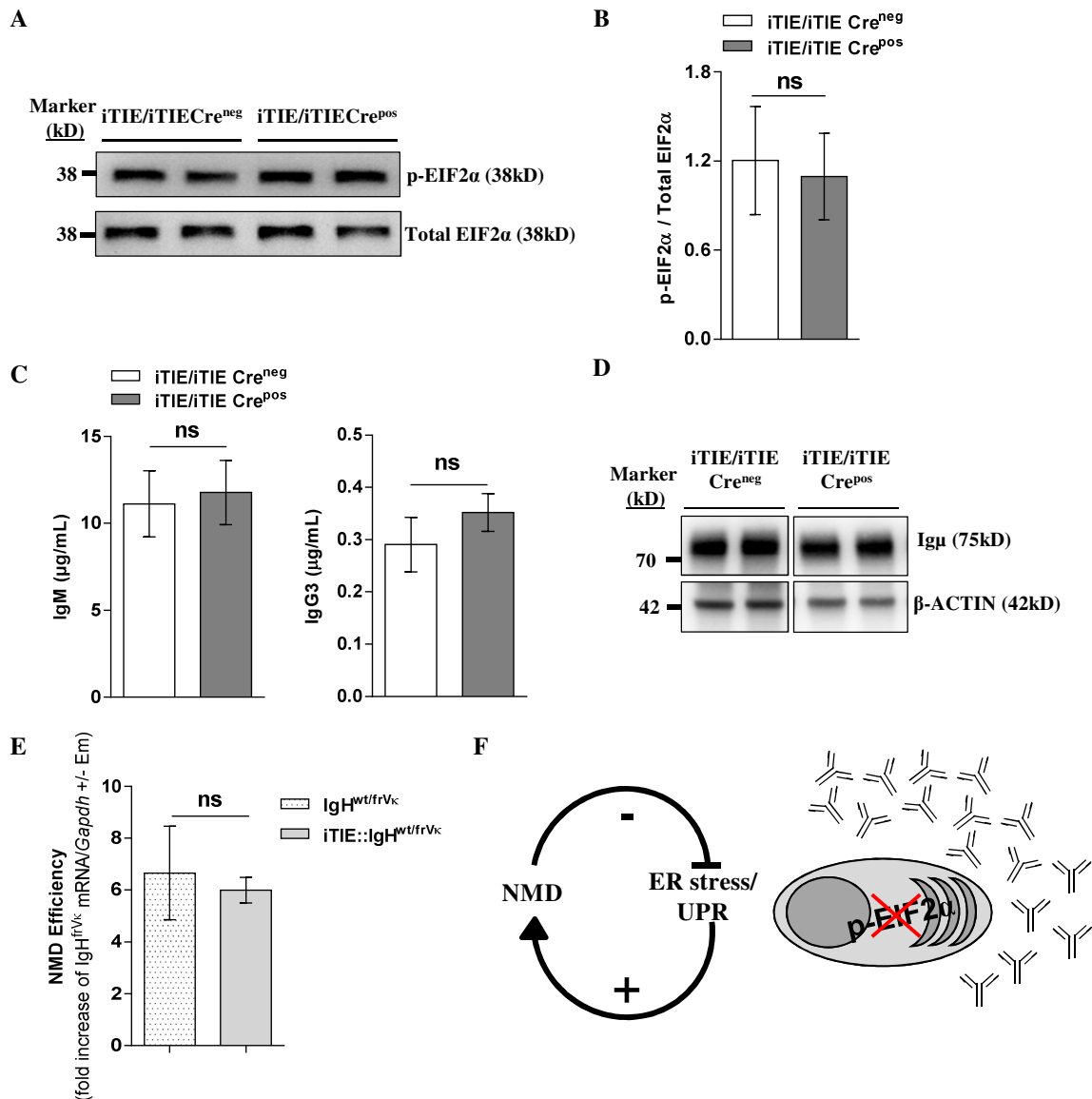


Figure 4. Poor activation of the PERK pathway and significant Ig production in stimulated B cell-expressing ΔV - κ LCs.

(A) p-EIF2 α and total EIF2 α protein levels were analyzed by Western blot after LPS stimulation (day 3) of B cells isolated from spleens of iTIE/iTIE mice. A representative experiment using two pools of 2 mice per genotype is shown. (B) Quantifications of p-EIF2 α protein levels in Cre^{neg} (empty bars; n=4) and Cre^{pos} (gray bars; n=4) iTIE/iTIE mice after normalization to total EIF2 α amounts. (C) ELISA analysis of IgM and IgG3 secretion in 72h supernatants from Cre^{neg} (n = 8) and Cre^{pos} (n = 8) iTIE/iTIE LPS-stimulated B cells. (D) Igu protein levels were analyzed by Western blot after LPS stimulation (day 3). A representative experiment is shown. (E) The degradation of nonproductive IgH^{frV κ} mRNAs was assessed in stimulated B cells (day 3) of IgH^{wt/frV κ} (dotted bars) and iTIE::IgH^{wt/frV κ} mice (light gray bars). RT-qPCRs were performed on stimulated splenic B cells treated or not with Em (100 μ g/ml for 6h). The NMD efficiency represents the fold increase of IgH^{frV κ} mRNA levels after drug treatment. Relative mRNA levels were normalized to *Gapdh* transcripts. (F) Model showing a positive regulatory feedback-loop between NMD and UPR in antibody-secreting cells. Data are representative of at least three independent experiments (n= 3-8/group). Bars represent mean expression \pm SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. ns : not significant

Figure 4 (Ashi et al.)

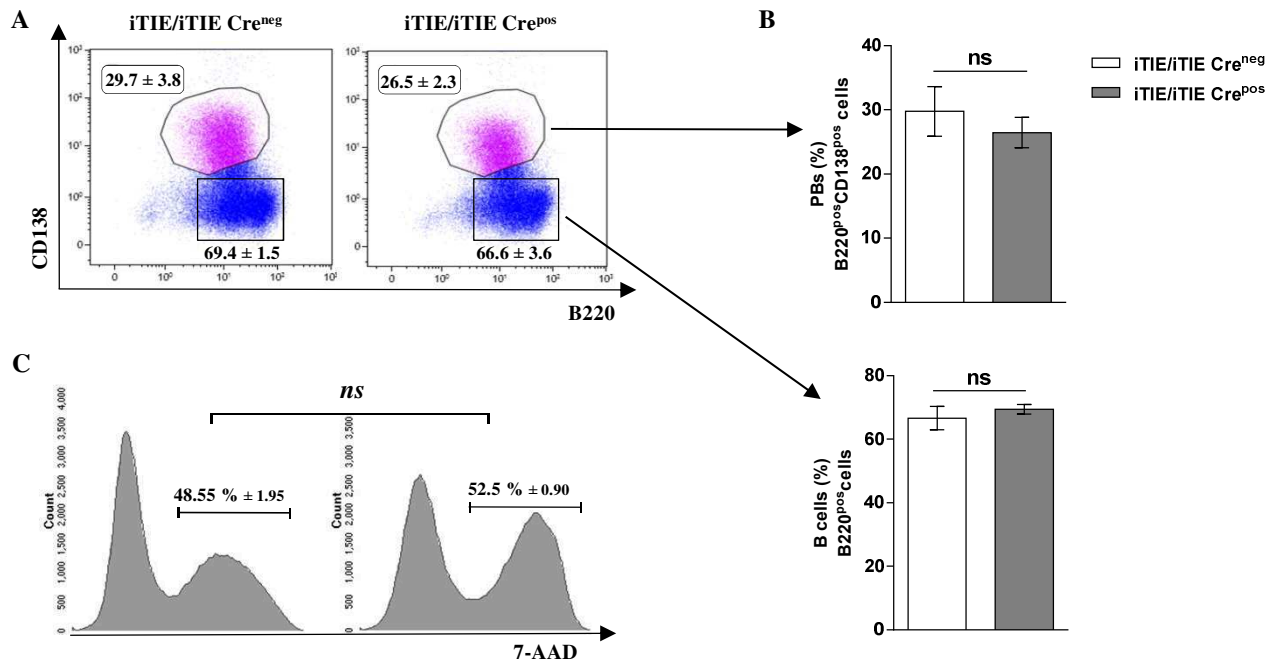


Figure S1. ΔV - κ LC expression did not affect B cell proliferative response and plasmablast differentiation *in vitro*.

FACS analysis was performed 3 days after LPS stimulation (1 μ g/ml) of resting B cells isolated from spleens Cre^{neg} and Cre^{pos} iTIE/iTIE mice. (A) Cells were labelled using anti-B220 and anti-CD138 mAbs. (B) The percentage of (B220^{pos}/CD138^{pos}) plasmablasts (PBs) and (B220^{pos}/CD138^{neg}) activated B cells was determined 3 days after LPS stimulation of B cells from iTIE/iTIE Cre^{pos} (gray bars; n = 6) and iTIE/iTIE Cre^{neg} (empty bars; n = 6) mice. The gates used are depicted in dot plots. (C) The percentage of dead cells was determined after incorporation of 7AAD. Data are representative of at least four independent experiments. Bars represent mean expression \pm SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. ns : not significant

Figure S1 (Ashi *et al.*)

Article 3

A role for donor splice site of germline I exons in antibody class switching

Mohamad Omar Ashi^a, Jean Marie Lambert^a, Anne Marchalot^a, Soazig Le Pennec^a, Nivine Srour^a, Aurélien Tinguely^a, Michel Cogné^{2,a} and Laurent Delpy¹

En préparation

Ces résultats ont fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées.

- ✓ Poster : Annual Meeting of the French Society for Immunology SFI, Paris, 2016, Novembre 28-30.
- ✓ Communication orale : Séminaire scientifique de l'école doctorale biosanté ED 524, Pouligny Notre Dame, 2016, Mars 7-9.
- ✓ Poster : 2^{ème} Journée Recherche Tours-Poitiers-Limoges, Limoges, 2016, Janvier 15.

Objectifs :

Cette étude s'intéresse au mécanisme de Class Switch Recombination (CSR) et, en particulier, au rôle de l'épissage des transcrits germinaux $I_{(x)}$, initiés à partir des promoteurs I situés en amont de chaque région $S_{(x)}$ (Switch). La transcription germinale des régions S est un préalable nécessaire à la CSR (Dunnick et al., 2011). Pour autant, cette transcription n'est pas à elle seule suffisante pour que la CSR soit optimale (Bottaro et al., 1994). En effet, les travaux du groupe de Radbruch sont venus étayer ces observations et ont démontré que l'épissage des transcrits pré-switch (I_x - C_x) joue un rôle crucial dans le processus de CSR. Par recombinaison homologue, ces auteurs ont créé deux modèles murins dans lesquels l'ensemble promoteur $I\gamma 1$ /exon $I\gamma 1$ a été remplacé par le promoteur de la méthallothionéine II humaine (hMT pour « human Methallothionein ») avec ou sans conservation du site donneur d'épissage de l'exon $I\gamma 1$ (modèles murins s-hMT et hMT respectivement) (**Figure S1**). Ils ont ainsi pu montrer qu'une stimulation des cellules B induit la CSR à IgG1 uniquement lorsque le site donneur d'épissage est présent (s-hMT) et ce malgré la transcription de la région $S\gamma 1$ dans le modèle dépourvu de site d'épissage (hMT) (Lorenz et al., 1995; Hein et

al., 1998). Par des approches indirectes, d'autres études ont confirmé le rôle clé de l'épissage des transcrits pré-switch dans la CSR (Qiu et al., 1999; Kuzin et al., 2000; Samara et al., 2006). Bien que des travaux récents tendent vers une implication de la machinerie d'épissage dans le recrutement d'AID au niveau des régions S, le rôle de cette maturation des ARN dans la CSR reste encore méconnu (Conticello et al., 2008; Nowak et al., 2011). Par ailleurs, il a été démontré que la présence d'un site donneur d'épissage à proximité d'un promoteur facilite le recrutement du complexe d'initiation de la transcription et ainsi augmente le taux de transcription (Furger et al., 2002; Damgaard et al., 2008). Sachant que les exons I sont de courts exons contenant des PTC dans les 3 cadres de lecture et que leur site donneur d'épissage est positionné à proximité du promoteur I, nous avons étudié la dégradation par NMD des ARNm Ix-Cx et le rôle potentiel des sites donneurs d'épissage des exons I sur la transcription des régions S et leur accessibilité à AID.

Nos données indiquent une absence de dégradation par NMD des ARNm non-codants Ix-Cx et soulignent l'importance de la reconnaissance des sites donneurs d'épissage pour moduler l'intensité de la transcription de la région S, et par conséquent, son accessibilité à AID (Ashi et al., Article 3 en préparation)

Laurent Delpy, PhD, Research Director at CNRS
CNRS UMR 7276 – INSERM 1262 / Control of B-cell Immune Response of Lymphoproliferations (CRIBL)
CBRS (Biology and Health Research Center) - Faculty of Medicine
2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France
Tel: +33 519 564 214 / Fax : +33 555 435 897 / mail: laurent.delpy@unilim.fr

Limoges, March 2018

Editorial board of xxx

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled " A role for donor splice site of germline I exons in antibody class switching " by Ashi et al that we would like to submit for publication in xxx.

This manuscript identifies new roles for noncoding I exons during antibody class switching. Indeed, we observed that the presence of strong donor splice sites enhances germline transcription of the switch (S) regions and facilitate RNA polymerase II pausing during class switch recombination (CSR).

Class switch recombination (CSR) at the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus is preceded by germline transcription initiated from I promoters few kilobases upstream of the targeted switch (S) regions. Germline transcripts (GLTs) are composed by a noncoding I exon that can be spliced to the first exon of the corresponding constant gene. Although it is well documented that the processing of GLTs is necessary for CSR and that debranched lariat-introns can participate as RNA guides for activation-induced cytidine deaminase (AID), the post-transcriptional control of noncoding GLT mRNAs has never been investigated. We observed that GLT mRNAs are poor nonsense-mediated decay (NMD) substrates, excluding either a feedback regulatory role of GLT mRNA degradation products in the stabilization of S regions, or the involvement of exon-junction complex-dependent NMD pathway during CSR. In addition, many questions remain to decipher the precise function of I exon donor splice sites (dss) during CSR. Interestingly, the predicted strength of noncoding I exon dss is high, and similar to the one of actively spliced adjacent CH1 exons. In addition, we found that the presence of Iy1-dss enhances the chromatin accessibility of the entire Sy1 region and RNAPII pausing upstream, eventually allowing its targeting by AID. Altogether, the recognition of potent I exons dss is involved in the enhancement of germline transcription of S regions, as an additional example of transcriptional regulation by a splicing-competent intron, and also favors the slowdown of RNAPII processivity,

likely facilitating R-loop formation and AID recruitment during antibody class switching.

The length of abstract, introduction, results, discussion and figure legends sections conforms to editorial style limitations. All authors concur with the submission of this article and have no conflict of interest.

We hope that the quality of this manuscript will be judged suitable for external review.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Delpy', with a horizontal line underneath.

With best regards,
Laurent Delpy, PhD (corresponding author)

A role for donor splice sites of germline I exons in antibody class switching

Mohamad Omar Ashi^a, Jean-Marie Lambert^a, Anne Marchalot^a, Soazig Le Pennec^a, Nivine Srour^a, Aurélien Tinguely^a, Michel Cogné^{2,a} and Laurent Delpy^{1,a}

^a Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7276, INSERM U1262- Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations, Université de Limoges, Limoges, France.

¹Corresponding author: Laurent Delpy, Université de Limoges - CNRS UMR 7276 & INSERM U 1262, 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

²Institut Universitaire de France, Université de Limoges, 87000 Limoges, France

Short title: I exon donor splice sites enhance transcription of switch regions

Abbreviations: dss, donor splice sites; CSR, Class Switch Recombination; RNA Pol II, RNA polymerase II; hMT, human methallothionein II_A; NMD, nonsense-mediated mRNA decay.

ABSTRACT

Class switch recombination (CSR) is a transcription-dependent process modifying immunoglobulin (Ig) effector functions. A noncoding germline transcription encompassing switch (S) regions is necessary for CSR. This transcription *per se* is not sufficient and the processing of germline transcripts (GLTs) is also required to target activation-induced cytidine deaminase (AID) on S regions. GLTs are composed by a noncoding I exon that can be spliced to the corresponding constant CH1 exon. Many questions remain regarding the splicing and the post-transcriptional regulation of noncoding GLTs. Arguing against the involvement of the splicing-dependent nonsense-mediated decay (NMD) pathway during CSR, we observed that noncoding GLT mRNAs are poor NMD substrates. Next, we investigated the role of I exon donor splice sites (dss) during CSR. Most of I exon dss displays high predicted splice strengths. Interestingly, the deletion of I γ 1-dss diminishes chromatin accessibility and RNA polymerase II (RNA Pol II) pausing upstream of the S γ 1 region, abolishing its targeting by AID. As an additional example of transcriptional regulation by a splicing-competent intron, the recognition of I exon dss enhances GL transcription of S regions and favors the slowdown of RNA Pol II, thus participating in R-loop formation and AID recruitment during antibody class switching.

INTRODUCTION

During immune responses, B cells can diversify the immunoglobulin (Ig) repertoire through transcription-dependent somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) processes. SHM introduces mutations in the variable (V) regions of Ig genes modifying antibody affinity for a cognate antigen (Ag). CSR involves long range interactions and replaces C μ exons with a downstream constant gene (Manis et al., 2002; Pinaud et al., 2001). CSR allows expression of antibodies with different isotypes (from IgM to IgG, IgA or IgE) and effector functions. Both CSR and SHM events require transcription of the target region and enzymatic activity of the activation-induced deaminase AID (Chaudhuri and Alt, 2004; Pavri and Nussenzweig, 2011; Honjo et al., 2005).

Germline (GL) transcription is a required for CSR and initiated from I promoters a few kilobases upstream of both the donor and the acceptor switch (S) regions (Chaudhuri and Alt, 2004; Manis et al., 2002). GL transcripts (GLTs) exhibit a conserved structure composed by noncoding I exons that are spliced to the first exon (CH1) of the adjacent constant gene. Because multiple stop codons are retrieved in the three reading frames of I exons, these GLTs do not encode peptide of significant length. The 3' regulatory region (3'RR) acts as a distal enhancer of the IgH locus and is involved in long range interactions and transcriptional activation of different I promoters, and hence drives the accessibility to AID of specific S regions (Pinaud et al., 2011).

During CSR, AID initiates double-strand DNA breaks (DSBs) by deaminating cytidines inside the transcribed S regions that exhibit repetitive GC-rich sequences (Chaudhuri and Alt, 2004; Pavri and Nussenzweig, 2011). Deletion and/or replacement of I promoters clearly demonstrated that GL transcription is necessary for efficient CSR (Harriman et al., 1996; Qiu et al., 1999; Kuzin et al., 2000; Samara et al., 2006). GLTs are likely involved in the formation of RNA-DNA

hybrids (R-loops) within S regions (Daniels and Lieber, 1995; Huertas and Aguilera, 2003; Reaban and Griffin, 1990; Tian and Alt, 2000; Yu et al., 2003). The impairment of transcription elongation upon R-loop formation (Huertas and Aguilera, 2003) may favor RNA polymerase II (RNA Pol II) pausing and the subsequent recruitment of AID to S regions *via* the transcription elongation factor *spt5* and the RNA exosome complex, a RNA-processing/degradation complex (Pavri et al., 2010; Basu et al., 2011).

Although GL transcription is necessary for CSR, it is not *per se* sufficient (Bottaro et al., 1994) and the processing of GLTs is also required for antibody class-switching (Hein et al., 1998; Lorenz et al., 1995; Li et al., 1994). Supporting a role for splicing of GLTs, it has been recently reported that lariat introns containing S regions are debranched by DBR1 and serves as RNA guides to target AID to S region DNA. AID binds directly to switch RNA through G-quadruplexes formed in the RNA molecules (Zheng et al., 2015). Other factors involved in the processing of pre-mRNAs including CTNNB1 (Catenin β -like 1), PTPB2 (Polypyrimidine Tract Binding Protein 2), the RNA exosome complex and several splicing factors have been shown to interact with AID (Conticello et al., 2008; Nowak et al., 2011; Basu et al., 2011; Jeevan-Raj et al., 2011). Although these data indicate that the processing of GLTs by the splicing machinery favors AID recruitment during CSR, many questions remains regarding the impact of I exon donor splice sites (dss) recognition on transcription of S regions. In addition, the cellular fate of noncoding GLT mRNAs has never been investigated.

To address these questions and clarify the role of GLTs during CSR, we investigated whether the nonsense-mediated decay (NMD) pathway, as a splicing-dependent RNA surveillance process (Lejeune and Maquat, 2005; Huang and Wilkinson, 2012), could be involved in the degradation of noncoding GLT mRNAs. Then, we analyzed whether the presence of I exon dss could influence chromatin accessibility and transcription of S regions, as early events

preceding CSR. For that, we scrutinized histone modifications, RNA Pol II binding and AID targeting of S regions, using dedicated mouse models previously created in Radbruch's lab, harboring or lacking I γ 1 exon dss (Hein et al., 1998; Lorenz et al., 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

Conserved strength of I exon donor splice sites

Features of noncoding I exons lying upstream of repetitive S regions are highly similar among all Ig isotypes. To further characterize the evolutionary conserved structure of GLTs, we performed *in silico* analysis to predict the strength of I exon dss. For that goal, I exon dss were determined by sequencing splice junctions on GLT mRNAs, upon appropriate stimulation of B cells isolated from spleens of C57BL/6 (B6) mice (Fig. 1). Computational analysis shows high splice site scores for I exon dss with predicted efficiency > 95%, similar to the one observed for potent dss located in the CH1 exons (Table 1). Thus, for all Ig isotypes, the pressure for efficient CSR likely promoted the selection of highly efficient dss upstream of S regions. In agreement with an important role for I exon dss in Ig class switching, CSR to IgG1 is abrogated in B cells isolated from mice harboring replacement of I γ 1 exon by heterologous human methallothionein II_A (hMT) construct lacking I γ 1 dss upstream of S γ 1 (Hein et al., 1998) (Fig. S 1). In addition, the use of cryptic dss upstream of S regions recreates I exon dss and supports CSR in several models harboring deletion of I μ dss (Kuzin et al., 2000) or targeted replacements of I exons by a neomycin resistance (neo^R) cassette or an hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) minigene in sense orientation (Qiu et al., 1999).

Spliced GLTs are poor NMD substrates

Among the multiple RNA surveillance pathways, the nuclear RNA exosome participates actively in CSR by promoting AID recruitment on both DNA strands (Basu et al., 2011). NMD is a cytoplasmic translation-dependent RNA surveillance pathway that degrades mRNAs containing premature termination codons (PTCs). This mechanism is supported by exon-

junction complex (EJC) deposits during splicing (Lejeune and Maquat, 2005; Gudikote et al., 2005). We have previously shown that the rate of RNA splicing influence the NMD degradation of nonproductive Ig μ mRNAs (Tinguely et al., 2012). To examine whether noncoding GLT mRNAs are degraded by NMD, we analyzed the amount of GLT mRNAs in stimulated B cells treated or not with cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor classically used to inhibit NMD (Carter et al., 1995). For all isotypes, semi-quantitative PCR assays revealed that CHX treatment did not increase the amount of spliced GLTs, compared to untreated B cells (Fig. 1). The simultaneous analysis of nonproductive IgH^{frV κ} mRNAs served as a positive control for NMD degradation, as described (Tinguely et al., 2012). The presence of short open reading frames (ORFs) with the appearance of stop codons close to the AUG represents a common feature of GLT mRNAs. Indeed, regardless of the reading frame, these ORFs encode small peptides (< 35 amino acids). Several evidences suggest the vicinity of AUG initiation codon and the cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABC1) precludes NMD degradation of mRNAs harboring AUG-proximal nonsense codons (Peixeiro et al., 2012; Pereira et al., 2015). Thus, the presence of short ORFs may be responsible for the NMD resistance of noncoding GLTs mRNAs, arguing against the involvement of the splicing-dependent NMD pathway during CSR. A putative siRNA-based transcriptional silencing role of NMD degradation intermediates has been observed on nonsense-codon containing Ig μ minigenes (Bühler et al., 2005). The absence of NMD of GLT mRNAs also excluded such a feedback regulatory role of GLT mRNA degradation products during CSR. This contrast with the RNA guide functions of debranched lariat introns supporting AID binding to S regions (Zheng et al., 2015).

The presence of I γ 1 dss promotes accessibility of S γ 1 region

Beyond their role in splicing of GLTs, we investigated whether the recognition of I exon dss regulate the accessibility of S regions during CSR. For that goal, we performed comparative CHIP experiments after stimulation of splenic B cells isolated from s-hMT (splice-hMT) and hMT mice (Hein et al., 1998; Lorenz et al., 1995), harboring or lacking I γ 1 dss respectively (Fig. S 1). As previously described by Lorenz et al, IgG1 class switching is greatly induced upon LPS-stimulation of s-hMT B cells, irrespective of the presence of IL-4. By contrast, stimulated B cells from hMT mice exhibited extremely low IgG1 class switching, whereas CSR to other Ig isotypes remained unaffected (Hein et al., 1998; Lorenz et al., 1995). Here, we confirmed these findings upon stimulation of B cells from s-hMT and hMT mice and assessment of post-switch I μ -Cx mRNAs (Fig. 2 A). In addition, hMT mice exhibited very low serum IgG1 levels, compared to s-hMT mice (Fig. 2 B). Similar results were obtained in culture supernatants with undetectable IgG1 levels after LPS-stimulation of B cells from hMT mice (Fig. 2 C).

Next, we analyzed comparatively the accessibility of S γ 1 region 48h after LPS-stimulation of s-hMT and hMT B cells. Before this, we determined the transcription start site (TSS) of heterologous hMT promoter by 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) and performed several qPCRs from the TSS to the end of the γ 1 locus, as depicted (Fig. 3). First, we assessed the global histone H3 acetylation (H3Ac) profile in S γ 1 region. We observed a strong reduction of H3Ac marks in stimulated B cells from hMT mice, compared to s-hMT (Fig. 3 A). Interestingly, by comparing the amounts of H3Ac throughout S γ 1 region in s-hMT stimulated B cells, we found a strong enrichment of these active chromatin marks immediately upstream S γ 1. However, this specific increase was no longer observed in hMT B cells. We also evaluated specific histone H3 modifications involved in AID recruitment to S regions during CSR (Stanlie et al., 2010; Jeevan-Raj et al., 2011; Daniel and Nussenzweig, 2012). As shown in Fig. 3 B and

C, levels of acetylated lysine 9 in histone H3 (H3K9ac) and trimethylated lysine 4 in histone H3 (H3K4me3) were strongly affected by the deletion of $I\gamma 1$ dss. Again, we observed a specific accumulation of these two active chromatin marks upstream the $S\gamma 1$ region in s-hMT stimulated B cells, compared to hMT B cells (Fig. 3 B and C). These data strongly suggest that the presence of $I\gamma 1$ -dss favors the accumulation of active chromatin marks upstream of $S\gamma 1$ region.

The recognition of $I\gamma 1$ donor splice site promotes RNA Pol II pausing upstream $S\gamma 1$ region

RNA Pol II loading throughout the $\gamma 1$ locus was very weak in the absence of $I\gamma 1$ dss (Fig. 4). Interestingly, the binding of RNA Pol II was strongly diminished before the deletion of $I\gamma 1$ dss, suggesting that the presence of strong I exon dss served as enhancer of germline transcription. Supporting this idea, it has been demonstrated that the presence of a dss facilitates the recruitment of the transcription initiation complex and stimulates the transcription even in the absence of splicing (Furger et al., 2002; Damgaard et al., 2008). In addition, Moabbi et al have shown that the promoter region interacted with dss in yeast cells, suggesting a role for gene looping in the intron-mediated activation of gene transcription (Moabbi et al., 2012). Next, we examined the impact of $I\gamma 1$ dss deletion with regard to the binding of elongation (Ser2P) and paused (Ser5P) RNA Pol II. The binding of Ser2P-RNA Pol II was very weak upstream of $S\gamma 1$ (Fig. 4 B). Interestingly, we found that the recognition of $I\gamma 1$ dss played a major in transcriptional pausing from the TSS to upstream $S\gamma 1$ region (Fig. 4 C). As control, we observed similar RNA Pol II binding in $S\mu$ and $S\gamma 2b$ regions in B cells of hMT and s-hMT mice (Fig. 5). Taken together, we propose that the presence of $I\gamma 1$ exon dss enhances transcription initiation and RNA Pol II pausing upstream of the $S\gamma 1$ region. Since the strength of I exon dss is highly

conserved among all Ig isotypes (Table 1), we speculate that this transcriptional regulatory effect can be generalized to all I exon dss.

Low GLT pre-mRNA levels and lack of AID-mediated mutations in the absence of I γ 1 exon dss

To confirm the impact of I exon dss on transcription of S γ 1 region, we analyzed GLT pre-mRNA levels using primers located upstream of S γ 1 (S γ 1-U). We found ~8-fold lower levels of unspliced GLTs in stimulated hMT B cells, compared to s-hMT (Fig. 6 A). Regardless of the presence of IL4, pre-mRNA levels observed in stimulated hMT B cells were similar to the background level found for unspliced I γ 1 GLTs, in LPS-stimulated B cells from B6 mice. Since, germline transcription and chromatin changes controls the accessibility of S regions to AID, we also performed a comparative analysis of SHM in upstream of S γ 1 region. As shown in Fig. 6 B, SHM were found in ~11% (7 out of 63) of sequences from s-hMT B cells whereas these mutations were almost absent in hMT B cells, with only 1 mutated sequence out of 61 analyzed (~1.6%). Thus, the recruitment of AID to S γ 1 was strongly decreased in the absence of I γ 1-dss (Fig. 6 B), and this was not due to a decrease of AID expression (Fig. 6 C). These data indicate that the presence of I γ 1 exon dss enhances germline transcription and the targeting of AID to S γ 1 region.

Finally, we identified new roles for noncoding I exons during antibody class switching. We propose that the recognition of strong I exon dss enhances germline transcription and RNA polymerase II pausing upstream of S regions, facilitating R-loop formation and AID recruitment during CSR.

MATERIALS AND METHODS

Mice.

Two- to six-month-old *Wt*, *hMT* and *s-hMT* 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. *hMT* and *s-hMT* mice were kindly obtained from Dr. A. Radbruch (Leibniz Institute, Berlin, Germany).

Spleen cell cultures for CSR

Single-cell suspensions of CD43⁻ spleen cells were cultured 2 days at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) (InvivoGen) with or without addition of cytokines : 20 ng/ml IL4, 2 ng/ml TGFβ or 2ng/ml INFγ (PeproTech, Rocky Hill, NJ).

ELISA assays

Blood samples were recovered from 12 weeks-old *hMT* and *s-hMT* mice. Serum samples were recovered by centrifugation and stored at - 20 °C until used. B splenocytes were cultured for 2 days with LPS. At day 3, culture supernatants were recovered and stored at - 20 °C until used. Culture supernatants and sera were analyzed for the presence of IgM, IgG_{2b} and IgG₁ by ELISA. ELISA assays were performed in polycarbonate 96 multiwell plates, coated overnight at 4 °C (100 µl per well) with 2 µg/ml IgM or IgG_{2b} or IgG₁ (Southern Biotechnologies) in 0.1M NaHCO₃ buffer. After three successive washing steps in phosphate-buffered saline (PBS) buffer, a blocking step was performed (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) for 30 min at 37 °C. After three washing steps, 50 µl of sera (first diluted to 1:100), or standards IgM, IgG_{2b} and

IgG₁ (Southern Biotechnologies, 400 ng/ml,) were diluted into successive wells in 1% BSA/PBS buffer and incubated for 2 h at 37 °C. After three washing steps, 100 µl per well of 1 µg/ml AP-conjugated goat anti-mouse Abs (IgM, IgG_{2b}, and IgG₁) (Southern Biotechnologies) were incubated for 2 h at 37 °C. After washing, AP activity was assayed on p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) substrate, and blocked with addition of 3M NaOH. Optic density was then measured at 405 nm.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Experiments

Splenic B cells were purified by CD43 magnetic cell sorting from nonimmunized mice and cultured *in vitro* with 1 µg/ml LPS for 2 days. ChIP experiments were done essentially as previously described (Rouaud et al., 2013). In brief, 1×10^7 stimulated B cells were cross-linked at 37 °C for 15 min in 15 ml PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 0.125 M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2 h at 4 °C with 100 µl of 50% protein A/G slurry (0.2 mg/ml sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg/ml BSA, and 50% protein A/G; Sigma). $0.3 - 0.5 \times 10^6$ cell equivalents were saved as input, and $3 - 5 \times 10^6$ cell equivalents were incubated overnight with specific or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. PCR primers used for Q-PCR are detailed in Table S1. The following antibodies were used: anti-H3K4me3 (Millipore, 07-473), anti-H3K9ac (Millipore, 06-942), anti-H3ac (Millipore, 06-599), anti-RNA Pol II (CTD4H8; Santa Cruz), anti-RNA Pol II P-ser2 (Abcam, ab5095) and anti-RNA Pol II P-ser5 (Abcam, ab5131).

Cloning and Sequencing

PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning vector system (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (PerkinElmer).

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. Real-time PCR were performed on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Transcripts were quantified according to the standard $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method after normalization to *Gapdh*. Primers and probes are listed in Table S2.

Statistical analysis

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

| Ig isotype | I -exon | | CH1-exon | |
|----------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|
| | Donor site | Donor site score | Donor site | Donor Site score |
| IgM | ATGGTAAGC | 1,00 | CAGGTAAGA | 1,00 |
| IgG3 | AAGGTGAGT | 0,99 | TCGGTGAGA | 0,91 |
| IgG1 | GCGGTAAGT | 1,00 | TTGGTGAGA | 0,88 |
| IgG2b | AGAGTAAGC | 0,97 | TTGGTGAGA | 0,93 |
| IgG2a | AGAGTAAGC | 0,97 | TTGGTGAGG | 0,95 |
| | AGGGTAAGG | 1,00 | | |
| | CAGGTATGG | 0,93 | | |
| IgE | CAGGTATTA | 0,85 | TAGGTAAGT | 1,00 |
| IgA | CAGGTGGGT | 0,88 | CTGGTAAAG | 0,59 |
| | GAGGCAAGG | unidentified | | |
| | AAGGTAGGC | 0,97 | | |
| Average ± SEM | | 0,96 ± 0,02 | | 0,89 ± 0,05 |

Table 1. Comparative analysis of I and CH1 exon donor splice sites

Computational analysis was performed using splice site database software (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) to calculate donor site score.

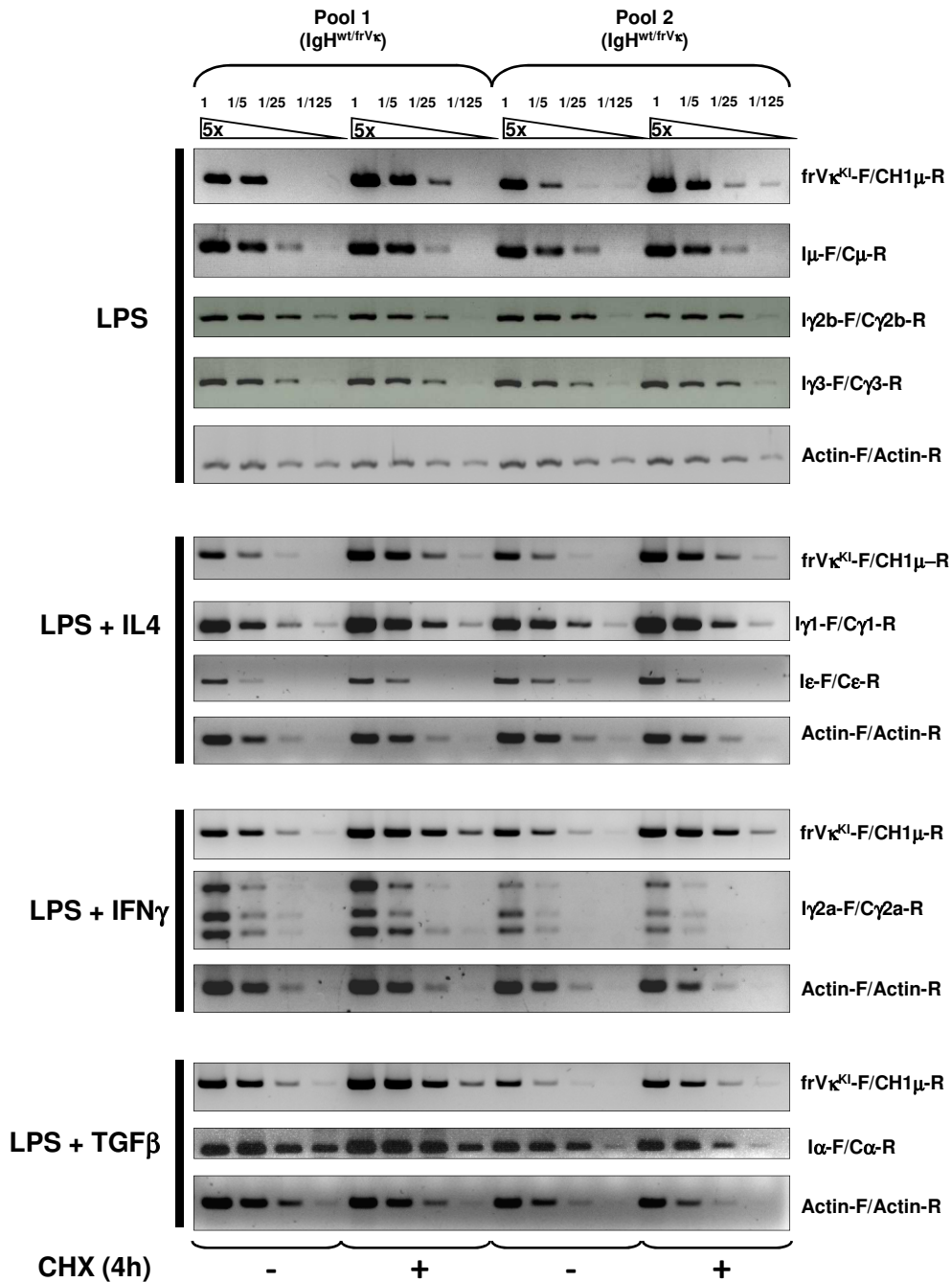


Figure 1. Spliced GLTs are resistant to NMD degradation

RT-PCR were performed on total RNA extracts isolated from splenic B cells isolated from $IgH^{wt/frV\kappa}$ mice (2 pools of 2 mice). B cells were stimulated *in vitro* with LPS, LPS+IL4, LPS+IFN γ and LPS+TGF β for 4 days. Stimulated B cells were treated or not with cycloheximide (CHX) for 4 hours. PCRs were performed in semi-quantitative conditions from five fold serial dilutions of cDNAs. $frV\kappa^{KL}$ -F/CH1 μ -R, $I\mu$ -F/C μ -R, $I\gamma 2b$ -F/C $\gamma 2b$ -R, $I\gamma 1$ -F/C $\gamma 1$ -R, $I\epsilon$ -F/C ϵ -R, $I\gamma 2a$ -F/C $\gamma 2a$ -R, and $I\alpha$ -F/C α -R oligonucleotides amplify spliced GLTs. The amplification of *Actin* transcripts was used for normalization.

Figure 1 (Ashi *et al.*)

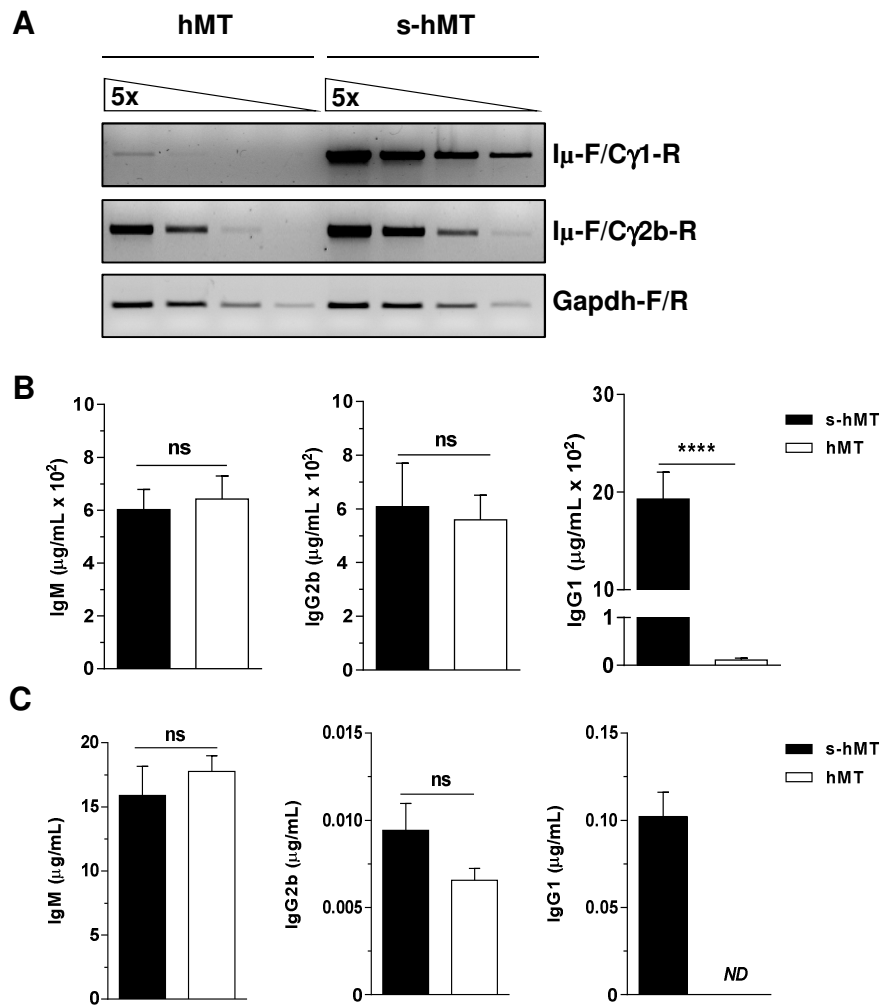


Figure 2. Defect of IgG1 class switching in *hMT* mice lacking *I γ 1* dss.

(A) RT-PCR were performed on total RNA extracts isolated 4 days after LPS stimulation of splenic B cells isolated from *hMT* and *s-hMT* mice. Semi-quantitative PCRs were performed on serial five fold dilutions of cDNAs. I μ -F/C γ 1-R and I μ -F/C γ 2b-R primers amplify post-switch I μ -C γ 1 and I μ -C γ 2b mRNAs, respectively. The amplification of *Gapdh* transcripts was used for normalization. (B and C) ELISA assays were performed in sera and culture supernatants from 8-wk-old *s-hMT* and *hMT* mice to determine the amounts of Ig isotypes (IgM, IgG2b, and IgG1). Serum n=5 (B) Supernatant n=4 (C). Data are representative of at least two independent experiments. Bars represent mean expression \pm SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. ns : not significant, ****, $P < 0.0001$, ND : not detected

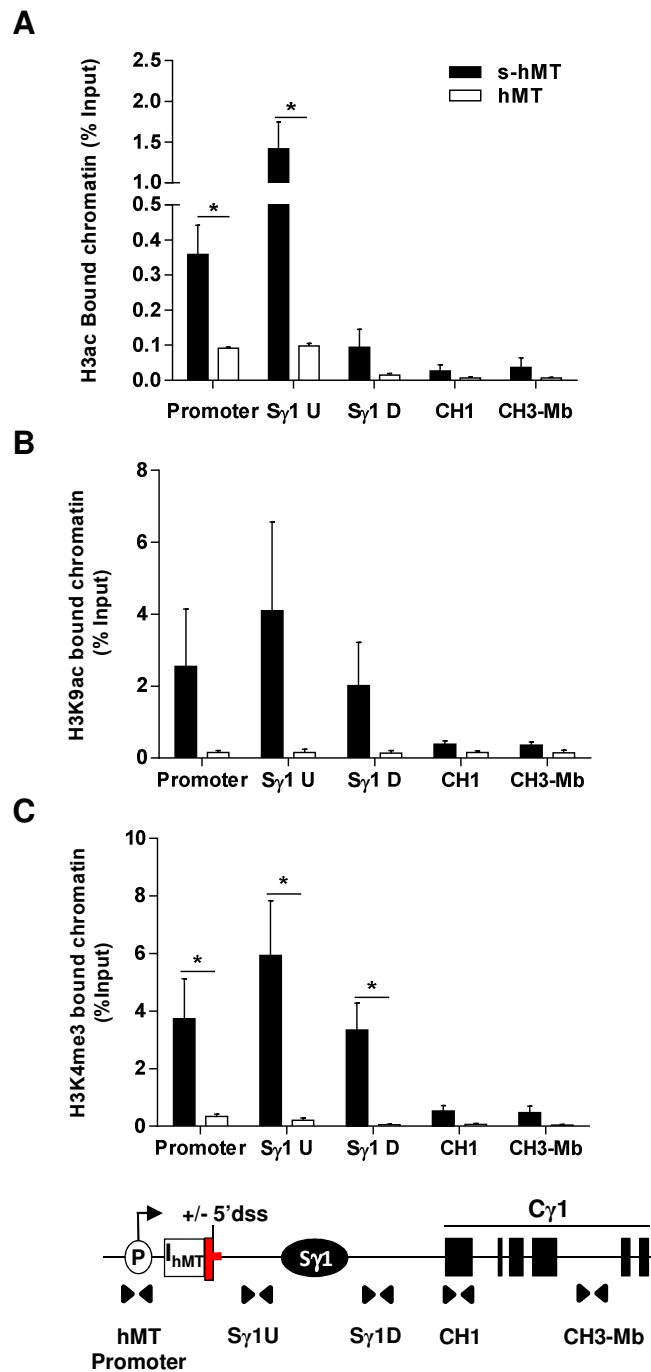


Figure 3. γ 1 dss is required for the establishment of chromatin accessibility.

ChIP assays were performed with splenic B cells from *s-hMT* and *hMT* mice. Cells were stimulated with LPS for 2 days. H3ac (A), H3K9ac (B), H3K4me3 (C). Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to total input DNA. The position of the pairs of oligonucleotides (triangles) used for qPCR is described on the illustrative diagram of γ 1 locus (bottom). Data are the mean \pm SEM of at least two independent experiments $n=3$ for each genotype. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. *, $P < 0.05$.

Figure 3 (Ashi *et al.*)

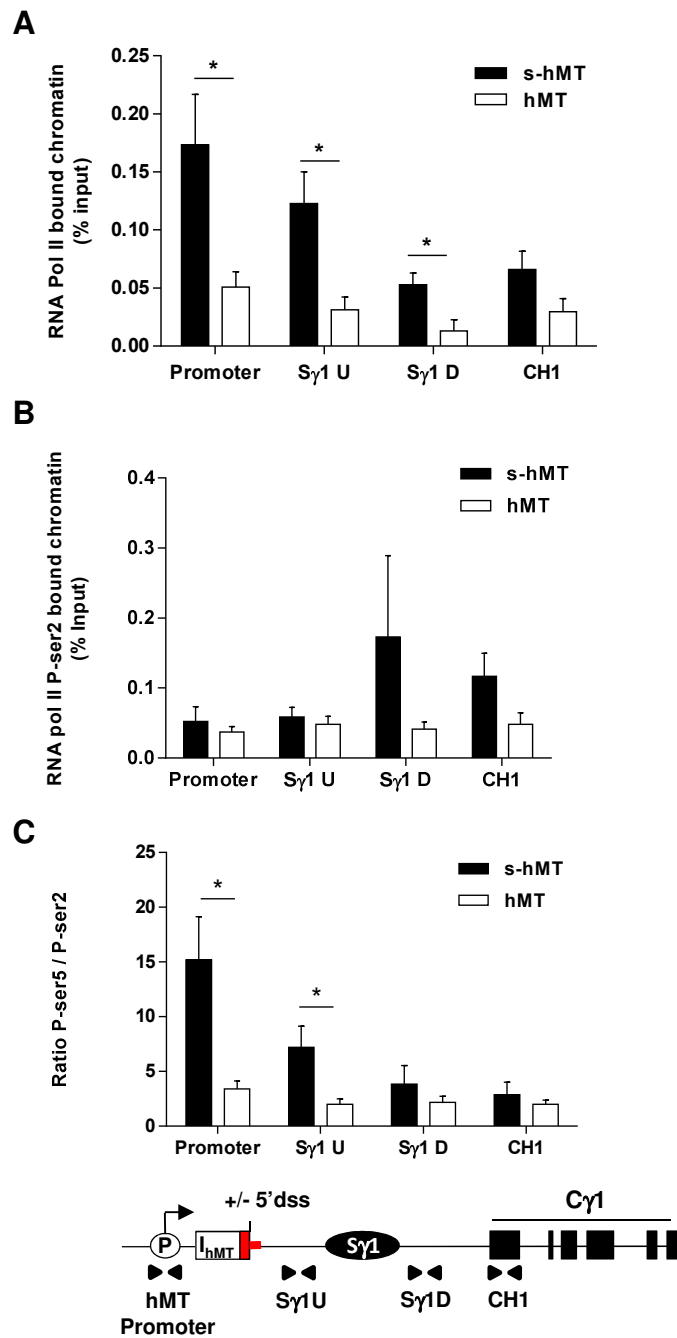


Figure 4. *Iy1* dss recognition induces RNA pausing upstream of the *Sy1* region

ChIP assays were performed with splenic B cells from *s-hMT* and *hMT* mice. Cells were stimulated with LPS for 2 days. RNA Pol II (A) RNA Pol II P-ser2 (B) Ratio P-ser5/P-ser2 (C). Backgrounds signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to total input DNA. Data are the mean \pm SEM of at least two independent experiments $n=5$ for each genotype. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. *, $P < 0.05$.

Figure 4 (Ashi *et al.*)

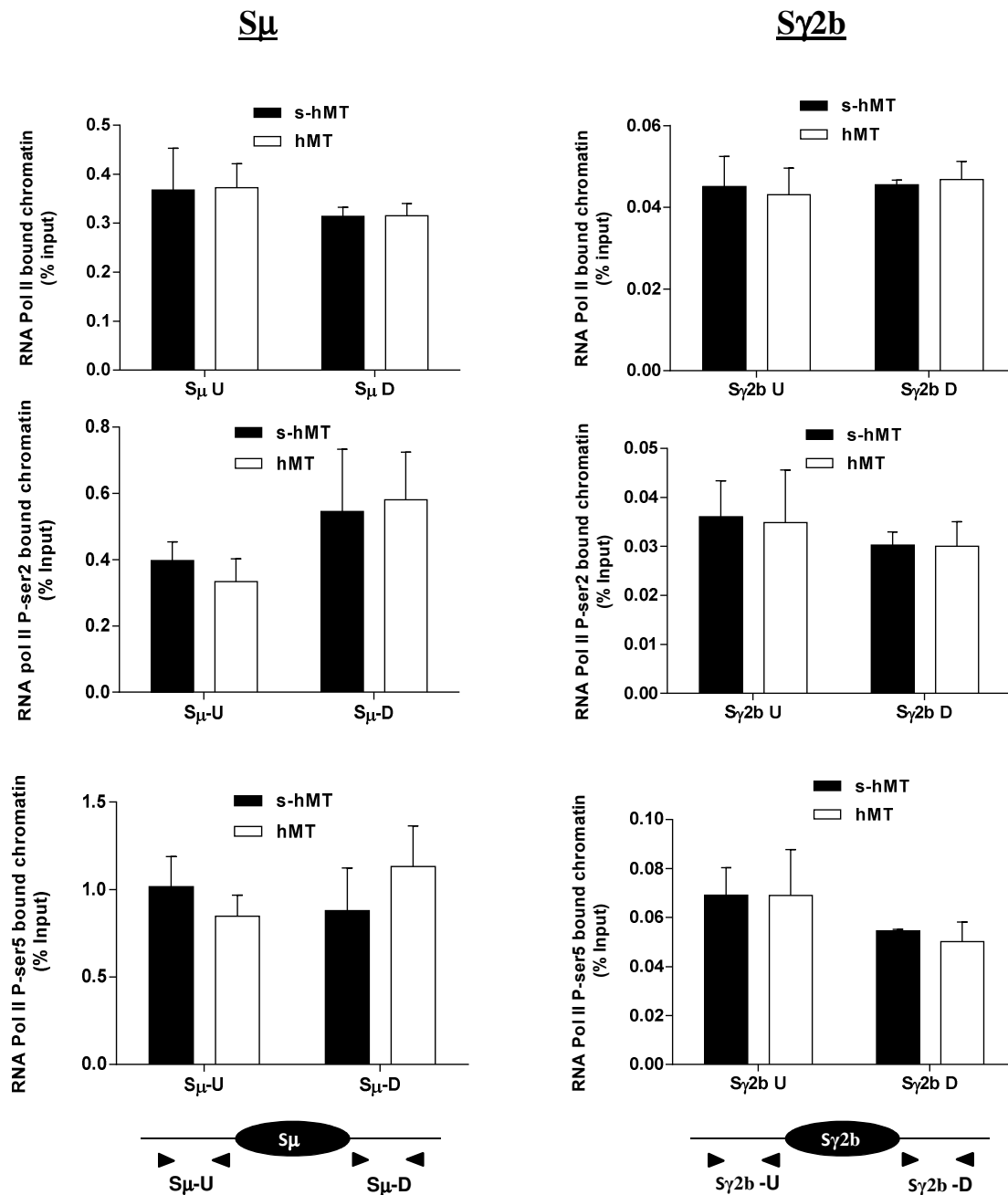


Figure 5. Similar RNA pol II binding in S μ and S γ 2b regions.

ChIP assays were performed with splenic B cells from *s-hMT* and *hMT* mice. Cells were stimulated with LPS for 2 days. Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to total input DNA. Data are the mean \pm SEM of at least two independent experiments $n=4$ for each genotype. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance.

Figure 5 (Ashi *et al.*)

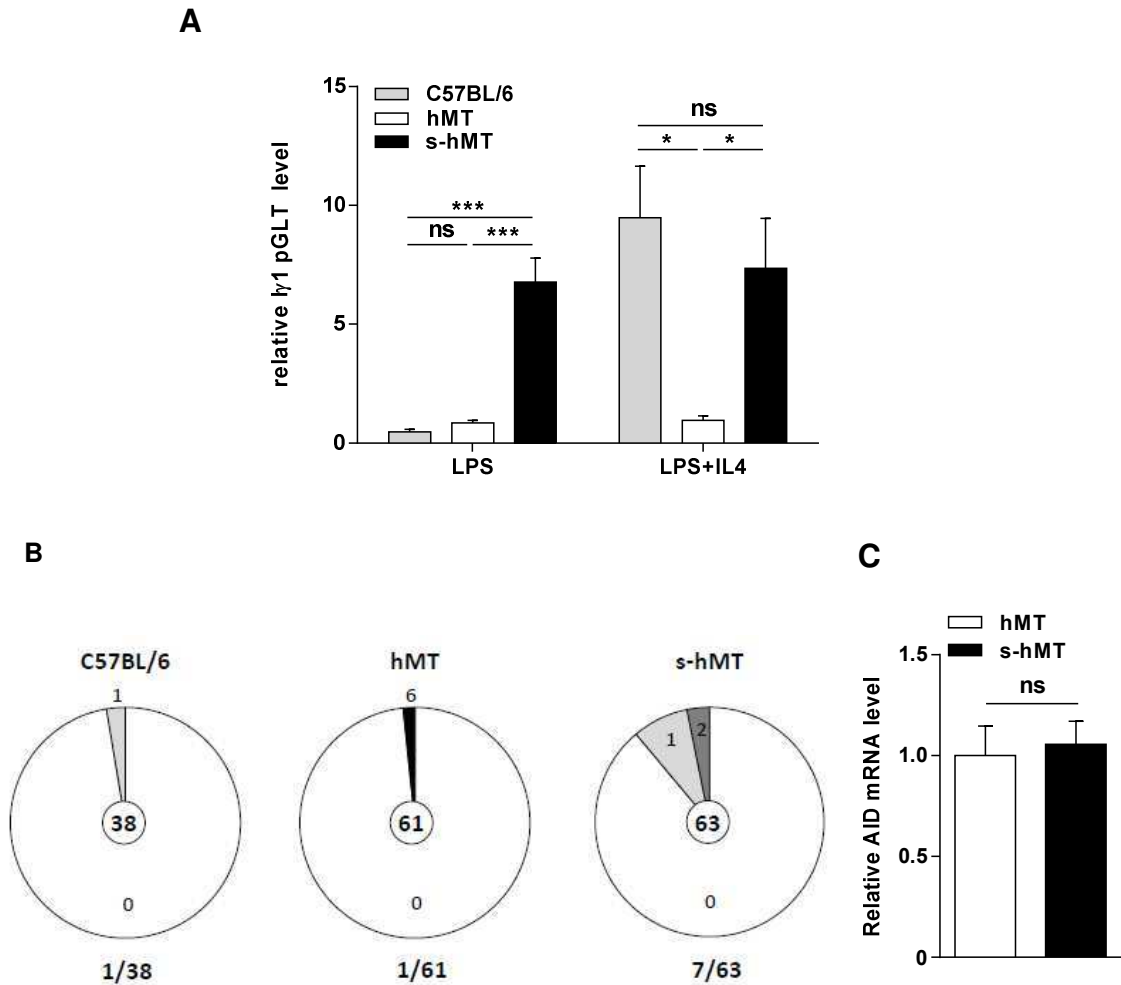


Figure 6. Low levels of unspliced GLTs and absence of AID-mediated mutations upon deletion of Iγ1 exon dss

(A) GLT pre-mRNAs levels were analyzed by RT-qPCR after *in vitro* stimulation of B cells with LPS or LPS + IL-4 for 48 h. Splenic B cells were isolated from lymphocytes from *hMT*, *s-hMT* and *C57BL/6* mice. Sγ1U primers were used as described in Fig. 3 and values were normalized to the expression of *Gapdh*. Graphs show results obtained from 4 independent experiments. (B) The frequency of AID-mediated mutations was evaluated within the Sγ1 region. The total number of sequences is shown in the center of the pie. The number of mutations per analyzed sequences is indicated in each portion. LPS stimulation without IL4 of B6 B cells serve as a negative control for background mutations in untranscribed Sγ1 regions. (C) RT-qPCR analysis of the expression of AID in B cells after normalization to the expression of *Gapdh*. The expression of AID in B cells from *hMT* mice was normalized to 1. The results represent 4 independent experiments. Bars represent mean expression \pm SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. (ns: not significant; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

Figure 6 (Ashi et al.)

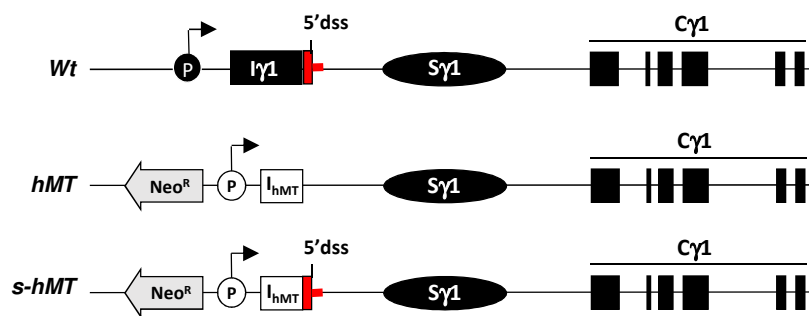


Figure S1. Schematic representation of *Iγ1* locus in *hMT* and *s-hMT* murine models.

The white elements are the gene segments specific to *hMT* and *s-hMT* models, and are not found in *Wt* animals. Black elements represent gene segments of $\gamma 1$ *Wt* locus. The red fragment corresponds to the sequence of *Iγ1* exon containing the donor splice site (5'dss for 5'donor splice site) retained in the *s-hMT* model and absent in the *hMT* model.

Figure S1 (Ashi *et al.*)

Table S1. Sequences of primers used for ChIP experiments.

| Name | Sequences 5'→3' | Assay |
|--------------------------------------|----------------------------------|--------------|
| hMT promoter-for | CCCGGTCTCTCGAGCTATAAAC | Taqman |
| hMT promoter-rev | GGTTCGCTGGGACTTGGGA | Taqman |
| hMT promoter-probe | CTGCTTGCATGTGGAATTGTGAGCG | Taqman |
| S_γ1-U-for | AGGACACAAGACCTGCAAAGAG | Taqman |
| S_γ1-U-rev | CCCAGGAGCTGCTGAACCT | Taqman |
| S_γ1-U-probe | TGAGGCTGGTAAGAGTAACAAGGTAACCTGGG | Taqman |
| S_γ1-D-for | CAGGCAAATAAACCAGTGGG | SYBR Green |
| S_γ1-D-rev | AGGATGTCCACCCTCACCCAGGC | SYBR Green |
| C_γ1-U-(CH1)-for | GCCCAAATAACTCCATGGTG | SYBR Green |
| C_γ1-U-(CH1)-rev | CAACGTTGCAGGTGACGGT | SYBR Green |
| C_γ1-D-(CH3-Mb)-for | CAACACCCTGCCAATAAGGC | SYBR Green |
| C_γ1-D-(CH3-Mb)-rev | CCCCTTGTAATGCCGAGG | SYBR Green |
| S_μ-U-for | TCTAAAATGCGCTAAACTGAGG | SYBR Green |
| S_μ-U-rev | AGCGTAGCATAGCTGAGCTC | SYBR Green |
| S_μ-D-for | CTGAATGAGTTTCACCAGGCC | SYBR Green |
| S_μ-D-rev | GGCCTGTCCTGCTTGGCTTC | SYBR Green |
| S_γ2b-U-for | AGCTCCAAAAGCTCAGCAGAC | SYBR Green |
| S_γ2b-U-rev | AGCCCCAGCTTACAAAGAGCT | SYBR Green |
| S_γ2b-D-for | GGTGGGAATATGAGGGAGAAGTCCTAG | SYBR Green |
| S_γ2b-D-rev | TTCCACCTGCCTCAGCTCTCCACAGC | SYBR Green |

Table S1 (Ashi *et al.*)

Table S2. Sequences of primers used for RT-qPCR experiments.

| Name | Sequences | Assay |
|--|---------------------------------------|--------------|
| lμ-for | 5' CTT CCC TCT GAT TAT TGG TCT CCA 3' | SYBR Green |
| HMT-for | 5' AGG CAT TTC AGT CAG TTG CTC 3' | SYBR Green |
| Sg1-RT-AS-for | 5' TCA AGA GCT CAG GAC ACA AGA C 3' | SYBR Green |
| Sg1-FOR-S-for | 5' TGC AAG CTG CTC TGA GGG 3' | SYBR Green |
| Sg1-RT-S-rev | 5' ATT GGG GAG CTA GGA CAG GT 3' | SYBR Green |
| frVκ^{KI}-for | 5' AGG AAG TGG ATC TGG GAC AG 3' | SYBR Green |
| CH1μ-rev | 5' AGA CGA GGG GGA AGA CAT TT 3' | SYBR Green |
| lγ2b-for | 5' CCA ACC AGG AAG AGT CCA GAG 3' | SYBR Green |
| Cγ2b-rev | 5' CGG AGG AAC CAG TTG TAT C 3' | SYBR Green |
| lγ3-for | 5' AAC TAC TGC TAC CAC CAC CAC CAG 3' | SYBR Green |
| Cγ3-rev | 5' ACC AAG GGA TAG ACA GAT GGG G 3' | SYBR Green |
| lγ1-for | 5' GGC CCT TCC AGA TCT TTG AG 3' | SYBR Green |
| Cγ1-rev | 5' GGA TCC AGA GTT CCA GGT GAC T 3' | SYBR Green |
| lϵ-for | 5' ACT AGA GAT TCA CAA CG 3' | SYBR Green |
| Cϵ-rev | 5' AGC GAT GAA TGG AGT AGC 3' | SYBR Green |
| lα-for | 5' CTA CCA TAG GGA AGA TAG CCT 3' | SYBR Green |
| Cα-rev | 5' TAA TCG TGA ATC AGG CAG 3' | SYBR Green |
| lγ2a-for | 5' GCT GAT GTA CCT ACC GAG AGA 3' | SYBR Green |
| Cγ2a-rev | 5' GCT GGG CCA GGT GCT CGA GGT T 3' | SYBR Green |
| Actin-for | 5' CGA TGC CCT GAG GCT CTT 3' | SYBR Green |
| Actin-rev | 5' TGG ATG CCA CAG GAT TCC A 3' | SYBR Green |
| Gapdh-for | 5' TGT TCC TAC CCC CAA TGT GT 3' | SYBR Green |
| Gapdh-rev | 5' GGT CCT CAG TGT AGC CCA AG 3' | SYBR Green |
| Gapdh-probe | Mm99999915_g1 (Life technologies) | Taqman |

Table S2 (Ashi *et al.*)

References

- Basu, U., F.-L. Meng, C. Keim, V. Grinstein, E. Pefanis, J. Eccleston, T. Zhang, D. Myers, C.R. Wasserman, D.R. Wesemann, K. Januszyk, R.I. Gregory, H. Deng, C.D. Lima, and F.W. Alt. 2011. The RNA Exosome Targets the AID Cytidine Deaminase to Both Strands of Transcribed Duplex DNA Substrates. *Cell*. 144:353–363. doi:10.1016/j.cell.2011.01.001.
- Bottaro, A., R. Lansford, L. Xu, J. Zhang, P. Rothman, and F.W. Alt. 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.
- Bühler, M., F. Mohn, L. Stalder, and O. Mühlemann. 2005. Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol. Cell*. 18:307–317. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.030.
- Carter, M.S., J. Doskow, P. Morris, S. Li, R.P. Nhim, S. Sandstedt, and M.F. Wilkinson. 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.
- Chaudhuri, J., and F.W. Alt. 2004. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol*. 4:541–552. doi:10.1038/nri1395.
- Conticello, S.G., K. Ganesh, K. Xue, M. Lu, C. Rada, and M.S. Neuberger. 2008. Interaction between antibody-diversification enzyme AID and spliceosome-associated factor CTNNB1. *Mol. Cell*. 31:474–484. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.009.
- Damgaard, C.K., S. Kahns, S. Lykke-Andersen, A.L. Nielsen, T.H. Jensen, and J. Kjems. 2008. A 5' splice site enhances the recruitment of basal transcription initiation factors in vivo. *Mol. Cell*. 29:271–278. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.035.
- Daniel, J.A., and A. Nussenzweig. 2012. Roles for histone H3K4 methyltransferase activities during immunoglobulin class-switch recombination. *Biochim. Biophys. Acta*. 1819:733–738. doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.019.
- Daniels, G.A., and M.R. Lieber. 1995. RNA:DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic Acids Res*. 23:5006–5011.
- Furger, A., J.M. O'Sullivan, A. Binnie, B.A. Lee, and N.J. Proudfoot. 2002. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev*. 16:2792–2799. doi:10.1101/gad.983602.
- Gudikote, J.P., J.S. Imam, R.F. Garcia, and M.F. Wilkinson. 2005. RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 12:801–809. doi:10.1038/nsmb980.

- Harriman, G.R., A. Bradley, S. Das, P. Rogers-Fani, and A.C. Davis. 1996. IgA class switch in I alpha exon-deficient mice. Role of germline transcription in class switch recombination. *J. Clin. Invest.* 97:477–485. doi:10.1172/JCI118438.
- Hein, K., M.G. Lorenz, G. Siebenkotten, K. Petry, R. Christine, and A. Radbruch. 1998. Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 188:2369–2374.
- Honjo, T., H. Nagaoka, R. Shinkura, and M. Muramatsu. 2005. AID to overcome the limitations of genomic information. *Nat. Immunol.* 6:655–661. doi:10.1038/ni1218.
- Huang, L., and M.F. Wilkinson. 2012. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 3:807–828. doi:10.1002/wrna.1137.
- Huertas, P., and A. Aguilera. 2003. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell.* 12:711–721.
- Jeevan-Raj, B.P., I. Robert, V. Heyer, A. Page, J.H. Wang, F. Cammas, F.W. Alt, R. Losson, and B. Reina-San-Martin. 2011. Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 208:1649–1660. doi:10.1084/jem.20110118.
- Kuzin, I.I., G.D. Ugine, D. Wu, F. Young, J. Chen, and A. Bottaro. 2000. Normal isotype switching in B cells lacking the I mu exon splice donor site: evidence for multiple I mu-like germline transcripts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 164:1451–1457.
- 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. doi:10.1016/j.ceb.2005.03.002.
- Li, S.C., P.B. Rothman, J. Zhang, C. Chan, D. Hirsh, and F.W. Alt. 1994. Expression of I mu-C gamma hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int. Immunol.* 6:491–497.
- Lorenz, M., S. Jung, and A. Radbruch. 1995. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science.* 267:1825.
- Manis, J.P., M. Tian, and F.W. Alt. 2002. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 23:31–39.
- Moabbi, A.M., N. Agarwal, B. El Kaderi, and A. Ansari. 2012. Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:8505–8510. doi:10.1073/pnas.1112400109.
- Nowak, U., A.J. Matthews, S. Zheng, and J. Chaudhuri. 2011. The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* 12:160–166. doi:10.1038/ni.1977.

- Pavri, R., A. Gazumyan, M. Jankovic, M. Di Virgilio, I. Klein, C. Ansarah-Sobrinho, W. Resch, A. Yamane, B. Reina San-Martin, V. Barreto, T.J. Nieland, D.E. Root, R. Casellas, and M.C. Nussenzweig. 2010. Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell*. 143:122–133. doi:10.1016/j.cell.2010.09.017.
- Pavri, R., and M.C. Nussenzweig. 2011. AID targeting in antibody diversity. *Adv. Immunol.* 110:1–26. doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00005-3.
- Peixeiro, I., Â. Inácio, C. Barbosa, A.L. Silva, S.A. Liebhaber, and L. Romão. 2012. Interaction of PABPC1 with the translation initiation complex is critical to the NMD resistance of AUG-proximal nonsense mutations. *Nucleic Acids Res.* 40:1160–1173. doi:10.1093/nar/gkr820.
- Pereira, F.J.C., A. Teixeira, J. Kong, C. Barbosa, A.L. Silva, A. Marques-Ramos, S.A. Liebhaber, and L. Romão. 2015. Resistance of mRNAs with AUG-proximal nonsense mutations to nonsense-mediated decay reflects variables of mRNA structure and translational activity. *Nucleic Acids Res.* 43:6528–6544. doi:10.1093/nar/gkv588.
- 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.
- Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110:27–70. doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8.
- Qiu, G., G.R. Harriman, and J. Stavnezer. 1999. Ialpha exon-replacement mice synthesize a spliced HPRT-C(alpha) transcript which may explain their ability to switch to IgA. Inhibition of switching to IgG in these mice. *Int. Immunol.* 11:37–46.
- Reaban, M.E., and J.A. Griffin. 1990. Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature*. 348:342–344. doi:10.1038/348342a0.
- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210:1501–1507. doi:10.1084/jem.20130072.
- Samara, M., Z. Oruc, H.-L. Dougier, T. Essawi, M. Cogné, and A.A. Khamlichi. 2006. Germ line transcription in mice bearing neor gene downstream of Igamma3 exon in the Ig heavy chain locus. *Int. Immunol.* 18:581–589. doi:10.1093/intimm/dxh400.
- Stanlie, A., M. Aida, M. Muramatsu, T. Honjo, and N.A. Begum. 2010. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:22190–22195. doi:10.1073/pnas.1016923108.

- Tian, M., and F.W. Alt. 2000. Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases in vitro. *J. Biol. Chem.* 275:24163–24172. doi:10.1074/jbc.M003343200.
- Tinguely, A., G. Chemin, S. Peron, C. Sirac, S. Reynaud, M. Cogne, and L. Delpy. 2012. Cross Talk between Immunoglobulin Heavy-Chain Transcription and RNA Surveillance during B Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* 32:107–117. doi:10.1128/MCB.06138-11.
- Yu, K., F. Chedin, C.-L. Hsieh, T.E. Wilson, and M.R. Lieber. 2003. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* 4:442–451. doi:10.1038/ni919.
- Zheng, S., B.Q. Vuong, B. Vaidyanathan, J.-Y. Lin, F.-T. Huang, and J. Chaudhuri. 2015. Non-coding RNA Generated following Lariat Debranching Mediates Targeting of AID to DNA. *Cell.* 161:762–773. doi:10.1016/j.cell.2015.03.020.

Discussion & Perspectives

1- Étude in vivo du NAS et le « TIE Checkpoint »

Le processus aléatoire de recombinaisons V(D)J est essentiel à la diversification du répertoire des Ig. Néanmoins, ce mécanisme est source d'erreurs et provoque des décalages du cadre de lecture dans environ 2/3 des cas. Ainsi, la plupart des cellules B hébergent des allèles d'Ig avec des réarrangements V(D)J non-productifs, donnant naissance à des transcrits contenant des codons stop prématurés (PTC pour « Premature Termination Codon »). Notre laboratoire possède une bonne expertise dans l'étude des mécanismes de surveillance des ARNm et 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 des transcrits d'Ig non-productifs. Ce phénomène appelé NAS (pour « Nonsense associated Altered Splicing ») peut conduire à une production d'Ig tronquées présentant des délétions du domaine variable (V).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude qui montre qu'un phénomène de saut d'exon (« exon-skipping ») se produit au cours de l'épissage des transcrits d'Igk non-sens (Srouf et al., 2016 : cf Annexe 1). Ce type de NAS engendre ainsi la production de chaînes légères d'Ig dépourvues de domaine V. Cette étude a également révélé la toxicité de ces Ig aberrantes et l'existence d'un point de contrôle nommé TIE-checkpoint (pour « Truncated Immunoglobulin Exclusion checkpoint ») lors de la différenciation terminale des cellules B en plasmocytes. Nous avons également 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 classe II).

Bien que le TIE-checkpoint permette d'éliminer les PC exprimant des Ig tronquées, sa survenue tardive pourrait être considérée comme une faiblesse du système immunitaire. En effet, les cellules B hébergeant des allèles Igk non-productifs de type V^{PTC} peuvent répondre aux stimulations antigéniques, voire même effectuer les processus de maturation d'affinité (SHM) ou de commutation isotypique (CSR) dans les GC, alors qu'elles seront incapables de se différencier en plasmocytes à longue durée de vie.

L'apoptose prématurée des plasmocytes exprimant des Ig tronquées révèle la grande sensibilité des cellules sécrétrices d'anticorps à des dérégulations de l'homéostasie protéique. A l'aide d'un modèle murin knock-in permettant d'exprimer de manière inductible des transcrits alternatifs dépourvus d'exon variable ($\Delta V\text{-}\kappa$ Light Chains), nous avons analysé les fondements du TIE-checkpoint. Cette lignée iTIE (inductible) présente un déficit en plasmocytes à longue durée de vie et une diminution des réponses anticorps. La production d'Ig tronquées conduit à un raccourcissement de la durée de vie des plasmocytes et augmente l'expression des acteurs majeurs de l'UPR : CHOP, BiP, HERP, XBP1s et IRE1 α . En accord avec cette perturbation de la protéostasie cellulaire, les plasmocytes exprimant des chaînes d'Ig anormales sont très sensibles aux traitements par des inhibiteurs du protéasome PI (pour « Proteasome Inhibitor ») (Bonaud et al., 2015; Srour et al., 2016).

Nos travaux présentés dans l'Annexe 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^{wt/frV κ} (Tinguely et al., 2012) qui permet d'analyser le devenir des transcrits IgH contenant des PTC (Ashi et al., soumis : Article 1). L'allèle IgH^{frV κ} contient un exon « frameshift » additionnel (frV κ). L'activation du saut d'exon lors de l'épissage des transcrits IgH^{frV κ} non-sens 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^a 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, et l'analyse des jonctions CDR3 hypervariables a révélé que ces transcrits alternatifs provenaient des PC oligoclonaux plutôt que de clones rares sélectionnés après des mutations du site d'épissage (Ashi et al., soumis : Article 1). Ces données sont en accord avec des résultats antérieurs dans des lignées cellulaires exprimant des transcrits Ig κ non-sens, montrant que les transcrits alternatifs sont deux fois plus abondants dans les cellules plasmocytaires (S194) que dans les cellules B matures (A20) (Chemin et al., 2010; Srour et al., 2016). Par conséquent, une augmentation drastique du NAS des transcrits d'Ig non-sens se produit lors de la différenciation plasmocytaire. De façon intéressante, nous avons observé une corrélation entre l'épissage par saut d'exon et le taux de transcription des allèles IgH non-sens. Ces résultats

sont en accord avec les données de la littérature montrant que l'épissage et la transcription peuvent être concomitants et influencés par la vitesse d'élongation de l'ARN pol II (Nogués et al., 2003; Shukla and Oberdoerffer, 2012; Le Hir et al., 2016).

Les modifications épigénétiques des histones apparaissent également comme des régulateurs potentiels de l'épissage alternatif (pour revue Luco et al., 2011). Différentes expériences ont permis d'associer des événements d'épissage alternatifs à une signature chromatinienne particulière. Des expériences réalisées dans l'équipe de Misteli, sur deux isoformes mutuellement exclusifs du récepteur humain FGFR2 (pour « Fibroblast Growth Factor Receptor 2 ») (FGFR2-IIIb et IIIc), illustrent l'influence de la structure chromatinienne sur l'épissage alternatif. Dans ce modèle, les exons IIIb et IIIc sont exclus respectivement dans les cellules mésenchymateuses et épithéliales. L'utilisation différentielle de ces deux exons se caractérise 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 des marques H3K36me3 et H3K4me1 (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 γ , 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 influencer leur épissage ou leur élimination.

Dans ce sens, et pour évaluer l'interaction entre la structure chromatinienne et la régulation du NAS des pré-ARNm IgH, nous avons effectué une analyse comparative des marques spécifiques de l'histone H3 au niveau de l'exon alternatif « frV κ », de l'exon constitutif « CH1 μ » et de la séquence intronique « J_H-E μ ». De façon intéressante, ces expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont révélé que l'exon alternatif « frV κ » présente des marques caractéristiques des introns et très différentes d'un exon constitutif (Ashi et al., soumis : Article 1).

L'ensemble de ces données suggèrent fortement que les mécanismes de NAS et d'épissage alternatifs conventionnels (indépendant des PTC) sont régis par des règles similaires et contrôlés par le taux d'élongation de la transcription (Nogués et al., 2003; Das et al., 2006; Pandit et al., 2008; Shukla and Oberdoerffer, 2012).

Nous proposons ainsi que les changements de processivité de l'ARN pol II au cours de la différenciation plasmocytaire faciliteraient la transcription massive des Ig mais également le NAS des transcrits d'Ig non-productifs, conduisant à la synthèse d'Ig tronquées et à l'activation du « TIE-checkpoint ».

La technique de modification de l'épissage par utilisation d'oligonucléotides anti-sens ou « AON » (pour « Antisense OligoNucleotides ») est une méthode de thérapie génique permettant de modifier l'expression de certains gènes anormaux responsables de maladies génétiques. En effet, cette chirurgie de l'ARN fait l'objet de nombreuses études depuis plus de 20 ans. Ces dernières années, l'amélioration considérable en termes de stabilité et de pénétration cellulaire des oligonucléotides a poussé le développement de ces molécules à des fins médicales, et en particulier pour le traitement de maladies neuromusculaires (pour revues : Aartsma-Rus and van Ommen, 2010; Arechavala-Gomez et al., 2012). Nous avons récemment validé une nouvelle approche thérapeutique consistant à forcer le saut d'exon et la production d'Ig tronquées en utilisant des AONs capables de provoquer l'élimination de l'exon variable lors de l'épissage (Delpy et al, brevet WO2017/089359). Cette approche pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques pertinentes dans le traitement du Myélome Multiple et d'autres pathologies touchant les plasmocytes. Ainsi, l'utilisation des AONs pour produire massivement des Ig tronquées délétères est une approche pionnière et mérite une étude plus approfondie.

Notre modèle murin $IgH^{wt/frV\kappa}$ représente un outil de choix pour évaluer l'efficacité des approches de saut d'exon des transcrits d'Ig non-sens dans les cellules B primaires et les PC. Nos résultats ont révélé que le traitement des cellules B stimulées (LPS) avec un AON "Vivo-Morpholino" (GeneTools, LLC) ciblant le site donneur d'épissage de l'exon alternatif « frV κ » : AON-frV κ_{dss} , améliore fortement la sécrétion d'IgM^a dans les surnageants de culture. Nous avons également observé que la fréquence des cellules IgM^a et l'intensité moyenne de fluorescence MFI (pour « Mean Fluorescence Intensity ») d'IgM^a cellulaire étaient augmentées après le traitement avec l'AON-frV κ_{dss} comparé à l'AON-contrôle (AON-Ctrl). Il est important à noter qu'aucun effet toxique indésirable a été observé après traitement d'AON et que les cellules B stimulées avec du LPS, traitées ou non avec les AONs présentaient des réponses similaires de prolifération et une production identique de chaîne légère Ig κ . De façon intéressante, l'administration passive d'AON permet de restaurer la production d'IgM avec une efficacité >75%, ciblant ainsi la quasi-totalité des cellules plasmablastiques.

Notre étude sur cellules primaires constitue une avancée importante pour tester l'efficacité des approches de saut d'exon thérapeutique, ciblant les transcrits d'Ig, sur des cellules isolées de patients atteints de myélome et d'autres gammopathies monoclonales. 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), et que les stratégies avenir doivent surmonter les problèmes d'absorption tissulaire et de pénétration nucléaire des AONs. De façon intéressante, l'administration systémique d'une nouvelle classe d'AON : (les tricyclo-ADN, tc-ADN) permet de restaurer significativement l'expression de la dystrophine chez des souris reproduisant la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Cette augmentation est retrouvée dans l'ensemble de la musculature squelettique y compris dans le cœur (Goyenvalle et al., 2015a, 2015b). A l'aide de notre modèle murin, nous envisageons de tester différentes formulations chimiques et/ou couplage des AONs pour permettre le ciblage des plasmocytes *in vivo*.

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

Notre modèle murin knock-in : iTIE détaillé dans l'Annexe 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 protéasome (PI) des PC produisant des Ig tronquées sans domaine variable (Article 2 et Annexe 1 : Srour et al., 2016). Ces observations nous ont poussé à explorer la voie UPR, qui engage à la fois des facteurs pro-apoptotiques et des facteurs de survie.

i. Les Ig mal-repliées, le NMD et la réponse UPR

Plusieurs études réalisées sur des modèles murins ou des cellules tumorales ont analysé la relation entre le stress du RE et le mécanisme du NMD (Belgrader et al., 1993; Harding et al., 2003; Gardner, 2008; Oren et al., 2014; pour revue Goetz and Wilkinson, 2017). L'objectif de cette étude est d'analyser le dialogue entre les mécanismes de surveillance agissant au niveau des ARNm et au niveau protéique dans les plasmocytes. Afin de répondre à cette question, nous avons croisé notre modèle murin iTIE, caractérisé par une production forcée des Ig tronquées accompagnée par un stress exacerbé du RE, avec des animaux $IgH^{wt/frV\kappa}$, précédemment décrits comme un modèle d'étude de dégradation par NMD des transcrits IgH non-sens (Tinguely et al., 2012).

Nos résultats ont mis en évidence une dégradation très efficace des transcrits IgH non-productifs dans des cellules B activées. Ces données sont en accord avec les travaux de Weischenfeldt et al, montrant 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).

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; Benhamron et al., 2015; pour revue Lam and Bhattacharya, 2018). L'expression accrue des protéines chaperonnes BiP (appelée aussi GRP78, pour « Glucose-Regulated protein-78kDa ») 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 événements majeurs vont avoir lieu : (i) un clivage de la protéine ATF6 α 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 α , n'est pas induite dans les plasmocytes (Gass et al., 2008). En plus, plusieurs études in vitro ont montré que l'activation de la voie PERK est très limitée dans les plasmocytes (Ma et al., 2010; Goldfinger et al., 2011). L'activation sélective des voies IRE1 α 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 positive 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, les études précédentes avaient plutôt observé 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; pour revue Goetz and Wilkinson, 2017). Dans ces cellules, l'inhibition du NMD est la conséquence d'une activation de la voie PERK et de la phosphorylation d'eIF2 α 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 α conduit à une inhibition de ce mécanisme de surveillance des ARNm (pour revue Goetz and Wilkinson, 2017).

Comme énoncé ci-dessus, la voie PERK est réprimée dans les plasmocytes pour permettre une synthèse massive d'Ig (Gass et al., 2008; Ma et al., 2010; Goldfinger et al., 2011). L'ensemble de ces données suggère donc que selon la voie activée lors de la réponse UPR, la dégradation par NMD peut être soit activée (voies IRE1 α 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 forte entre le mécanisme du NMD et la réponse UPR empêche donc une activation généralisée du TIE-checkpoint qui conduirait à l'élimination massive des plasmocytes (Ashi et al., Manuscrit en préparation : Article 2).

ii. Les Ig mal-repliées et l'autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation par lequel une cellule est capable de recycler son matériel cytoplasmique. Cette voie alternative à celle du protéasome conduit à la dégradation des organites et macromolécules cellulaires, par l'intermédiaire du lysosome. Afin de rétablir l'homéostasie cellulaire, diverses conditions de stress du RE activent des voies de signalisation menant à l'activation de l'autophagie (pour revue Sano and Reed, 2013). Dans ce sens, il a été démontré que la voie IRE1 α est nécessaire à l'activation de l'autophagie (Ogata et al., 2006) et que les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en IRE1 α présentent une absence d'accumulation de LC3 (facteur clé de l'autophagie), suite au traitement avec la thapsigargine pour induire un stress du RE. D'autres études ont montré que les facteurs de transcription activés par l'UPR régulent positivement l'autophagie au niveau transcriptionnel : XBP1, ATF4 et CHOP promeuvent l'expression de Beclin-1, Atg12 et Atg5 respectivement (Kouroku et al., 2007; Margariti et al., 2013). En outre, la combinaison d'inhibiteurs du protéasome avec du flux autophagique induit un stress massif du RE via l'activation de CHOP dans des cellules de MM (Moriya et al., 2013, 2015). Cependant, une inhibition du flux autophagique suite à un stress prolongé du RE a également été observée (Lee et al., 2012), soulignant ainsi la complexité du rôle de l'autophagie dans la survie ou la mort cellulaire (pour revues : Kroemer and Levine, 2008; Shen and Codogno, 2011).

En s'appuyant sur ces données, et pour évaluer l'effet des Ig tronquées sur l'activation de l'autophagie, nous avons réalisé des expériences sur des cellules B de souris iTIE (stimulées avec du LPS) avec ou sans traitement avec la Chloroquine (CQ), un inhibiteur du flux autophagique. Nos résultats montrent que les cellules plasmablastiques produisant des Ig

aberrantes activent le flux autophagique et présentent une accumulation protéique de LC3 et du complexe de conjugaison ATG5/ATG12.

Récemment, l'équipe de Cenci, a étudié le rôle de l'autophagie au cours de la différenciation plasmocytaire (Pengo et al., 2013). En effet, les souris *Atg5^{ff} 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).

En accord avec ces données, notre étude suggère que les PC exprimant des Ig tronquées pourraient activer l'autophagie comme un moyen de survie permettant de limiter le stress du RE. Par conséquent, l'inhibition de cette voie protectrice pourrait aggraver le déficit en PC des animaux iTIE voire affecter d'autres compartiments B. Des expériences sont en cours pour évaluer l'effet des Ig tronquées dans le modèle *Atg5^{ff} CD19-Cre*.

3- Étude du rôle des sites donneurs d'épissage des exons I lors de la CSR

Cette partie de ma thèse a été consacrée à l'étude du processus de « Class Switch Recombination » (CSR). Au cours de la CSR, la transcription germinale des régions S est initiée à partir des promoteurs I « germinaux ». Chaque promoteur est suivi par un exon $I_{(x)}$ non-codant et plusieurs études ont souligné la relation entre l'épissage de ces transcrits germinaux et la CSR (Lorenz et al., 1995; Hein et al., 1998; Qiu et al., 1999; Kuzin et al., 2000; Samara et al., 2006; Conticello et al., 2008; Pavri et al., 2010; Xu et al., 2010; Nowak et al., 2011). Néanmoins, les mécanismes sous-jacents et le rôle exact de l'épissage des exons $I_{(x)}$ restent peu étudiés.

Dans le but d'apporter des précisions, nous avons analysé l'accessibilité transcriptionnelle et la structure chromatinienne de la région *Sy1* dans les modèles murins hMT et s-hMT. Ces modèles ont été élaborés il y a près de trente ans par l'équipe de Radbruch et le premier présente une délétion du site donneur d'épissage de l'exon *Iy1* qui abolit la CSR vers IgG1 (Lorenz et al., 1995; Hein et al., 1998). De façon originale, notre étude a mis en évidence un rôle encore inexploré des sites donneurs d'épissage (dss : pour « donor

splice site ») des exons I dans le processus de CSR. En effet, nous avons montré que l'absence du site donneur d'épissage de $I\gamma 1$ diminue considérablement la transcription germinale de la région $S\gamma 1$ et son accessibilité à AID. Ainsi, la reconnaissance du site donneur d'épissage des exons I permettrait une transcription germinale optimale, et favoriserait ainsi les cassures de l'ADN au niveau des régions S lors du processus de CSR. Dans ce sens, la reconnaissance d'un site donneur d'épissage à proximité du site d'initiation de la transcription semble capable de stimuler la transcription même en l'absence de l'épissage, en facilitant le recrutement du complexe d'initiation de la transcription (Furger et al., 2002; Damgaard et al., 2008).

De nombreuses études ont observé que la transcription germinale lors de la CSR s'accompagne de modifications chromatinienne au niveau des régions S. Dans ce sens, la déficience pour le facteur PTIP (pour « PAX Interaction with Ttranscription-activation domain Protein »), qui a un rôle crucial dans l'initiation de la transcription germinale, est associée à une réduction drastique des marques activatrices H3K4me3 et H3Ac au niveau des régions S (Daniel et al., 2010; Schwab et al., 2011; Starnes et al., 2016). Le groupe de Kenter a également démontré une présence accrue des marques H3Ac, H4Ac, et H3K4me3 au niveau des régions S, uniquement lorsqu'elles sont transcrites (Wang et al., 2006, 2009). En accord avec ces observations, nos travaux montrent que le profil d'acétylation de l'histone H3 au niveau de la région $S\gamma 1$ est corrélé à l'intensité de la transcription germinale. En effet, la présence de cette marque est nettement plus marquée dans le modèle s-hMT que dans le modèle hMT dont la transcription germinale est beaucoup plus faible. A l'aide de ces deux modèles, nous prévoyons également de quantifier par ChIP le recrutement de facteurs d'initiation de la transcription (TFIIH, TFIIB, TBP) au niveau du promoteur hMT. Ces expériences permettraient de confirmer la relation entre la reconnaissance du site donneur d'épissage des exons I et l'intensité de la transcription germinale.

Ainsi, notre étude contribue à mieux définir le rôle de l'épissage des transcrits germinaux au cours de la CSR. Dans un premier temps, la reconnaissance des sites donneurs d'épissage au niveau des exons I augmente la transcription germinale et l'accessibilité des régions S à AID (Ashi et al., Manuscrit en préparation : Article 3), puis l'épissage de ces exons permet de former un « lasso » qui, après linéarisation par DBR1 (pour « debranching RNA lariats 1 »), pourra générer un ARN pour guider AID sur la région S ciblée (Zheng et al., 2015).

En parallèle, nous avons réalisé des tests sur des animaux C57BL/6, utilisant des AONs spécifiques des exons I afin de modifier le mécanisme de CSR des Ig. Nos résultats préliminaires ont révélé que le traitement des cellules B stimulées (LPS) avec des AONs “Vivo-Morpholino” (GeneTools, LLC) ciblant le site donneur d’épissage des exons $I\gamma 1$ (AON- $I\gamma 1_{\text{dss}}$) et $I\gamma 3$ (AON- $I\gamma 3_{\text{dss}}$) diminuent fortement le processus de CSR vers IgG1 et IgG3 respectivement. Nous avons également observé une diminution du taux de sécrétion d’IgG1 et d’IgG3 dans les surnageants de culture suite aux traitements d’AON spécifique à chaque isotype. De façon intéressante, ces résultats révèlent que des traitements AONs peuvent impacter le mécanisme de CSR et diminuer considérablement l’expression d’IgG. Des études additionnelles sont en cours visant à identifier des traitements AONs capables de diminuer la production d’Ig « post-switch ». Ces approches pourraient s’adresser à différentes situations pathologiques : IgE dans l’allergie, IgG dans des maladies auto-immunes comme le lupus, ou IgA dans la maladie de Berger (néphropathie à dépôts d’IgA).

Conclusion Générale

Pour conclure, ces travaux de thèse m'ont permis d'appréhender des aspects moléculaires originaux au cours développement lymphocytaire B tardif. Dans un premier temps, j'ai pu participer à une étude révélant la toxicité des chaînes d'Ig dépourvues de domaine variable produites après épissage alternatif dans les plasmocytes. L'analyse des mécanismes mis en jeu par les lymphocytes B pour se protéger de la synthèse d'Ig tronquées a permis d'identifier un nouveau point de contrôle agissant principalement lors de la différenciation plasmocytaire (TIE-checkpoint). Ensuite, nous avons montré in vivo que l'épissage alternatif par « saut d'exon » des transcrits d'Ig non-productifs, est beaucoup plus marqué dans les plasmocytes que dans cellules B primaires. De plus, nous avons montré qu'une boucle de régulation positive NMD-UPR se produit dans ces cellules sécrétrices d'anticorps. Cette coopération évite la synthèse d'Ig tronquées permettant ainsi une réponse humorale optimale. Enfin, dans une tout autre mesure, ce travail de thèse nous aura permis de mettre en exergue un rôle encore insoupçonné des sites donneur d'épissage des exons I dans le processus de CSR. Au final, nous espérons avoir apporté un peu de lumière sur la régulation de l'expression des Ig au cours du développement lymphocytaire B tardif.

Annexes

Annexe 1

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

Nivine Srour¹, Guillaume Chemin^{1,*}, Aurélien Tinguely^{1,*}, **Mohamad Omar Ashi**¹, Zéliha Oruc¹, Sophie Péron¹, Christophe Sirac¹, Michel Cogné^{1,2,**} and Laurent Delpy^{1,**}

Journal of Experimental Medicine (JEM), 2016

Les résultats de cet article ont fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées.

Un prix a été gagné lors de ces présentations :

- ✓ Prix du meilleur Poster : 1^{ère} Journée Recherche en Cancérologie, Ligue contre le cancer, Limoges, 2017, Novembre 9.

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

Nivine Srour,¹ Guillaume Chemin,^{1*} Aurélien Tinguely,^{1*} Mohamad Omar Ashi,¹ Zéliha Oruc,¹ Sophie Péron,¹ Christophe Sirac,¹ Michel Cogné,^{1,2**} and Laurent Delpy^{1**}

¹Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7276 and ²Institut 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 κ exons promote exon-skipping and synthesis of V domain-less κ light chains (Δ V- κ LCs). Unexpectedly, such Δ V- κ LCs inhibit plasma cell (PC) differentiation. Accordingly, in wild-type mice, rearrangements encoding Δ V- κ LCs are rare in PCs, but frequent in B cells. Likewise, enforcing expression of Δ V- κ LCs impaired PC differentiation and antibody responses without disturbing germinal center reactions. In addition, PCs expressing Δ V- κ LCs synthesize low levels of Ig and are mostly found among short-lived plasmablasts. Δ V- κ LCs have intrinsic toxic effects in PCs unrelated to Ig assembly, but mediated by ER stress-associated apoptosis, making PCs producing Δ V- κ 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 κ alleles. This truncated Ig exclusion (TIE) checkpoint ablates PC clones with Δ V- κ 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 Nussenz-

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; Victora 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 atV(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; Δ V- κ LC, variable domain-less Ig κ light chain; ER, endoplasmic reticulum; GC, germinal center; κ LC, Ig κ 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 μ 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 κ 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 κ transcripts and strongly enhanced exon skipping. Interestingly, the production of V domain-less κ light chains (Δ V- κ 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 κ alleles.

RESULTS

Nonsense codons located within V regions enhance exon skipping of Ig κ transcripts

We previously showed in normal B lineage cells that upon skipping of some noncoding V exons, so called excluded alleles often yield shortened κ mRNAs which would translate into Δ V- κ 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 κ transcripts were translated into Δ V- κ LCs, and addressed whether the latter affects B cell differentiation. Out-of-frame V κ -to-J κ 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 Δ V- κ LC mRNA levels in cell lines transfected with constructs mimicking nonproductive V κ J κ 5 rearrangements from both the V^{PTC} and the C^{PTC} class (Fig. 1, B and C). This revealed high Δ V- κ 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 κ genes (Fig. 1 D). Δ V- κ LC mRNA levels were quantified using capillary electrophoresis after normalization to the amount of productive κ LC mRNAs, as previously described (Chemin et al., 2010). Compared with C^{PTC} -expressing cells, Δ V- κ 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 Δ V- κ LCs

Next, we checked whether Δ V- κ 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 κ LCs (~25 kD) and truncated Δ V- κ LCs (~12 kD) were detected in cells transfected with productive and V^{PTC} constructs, respectively (Fig. 2 A). In contrast, no Δ V- κ 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 Δ V- κ LCs were routed toward proteasomal degradation. In V^{PTC} -expressing cells, treatment with MG132 induced an approximately two- to four-fold increase of Δ V- κ LCs in cell pellets and culture supernatants, respectively (Fig. 2, A and B). In contrast in C^{PTC} -expressing cells, very low amounts of Δ V- κ LCs were found in cell pellets, and only upon treatment with MG132 (Fig. 2 A). For controls, no major changes were observed for complete κ 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

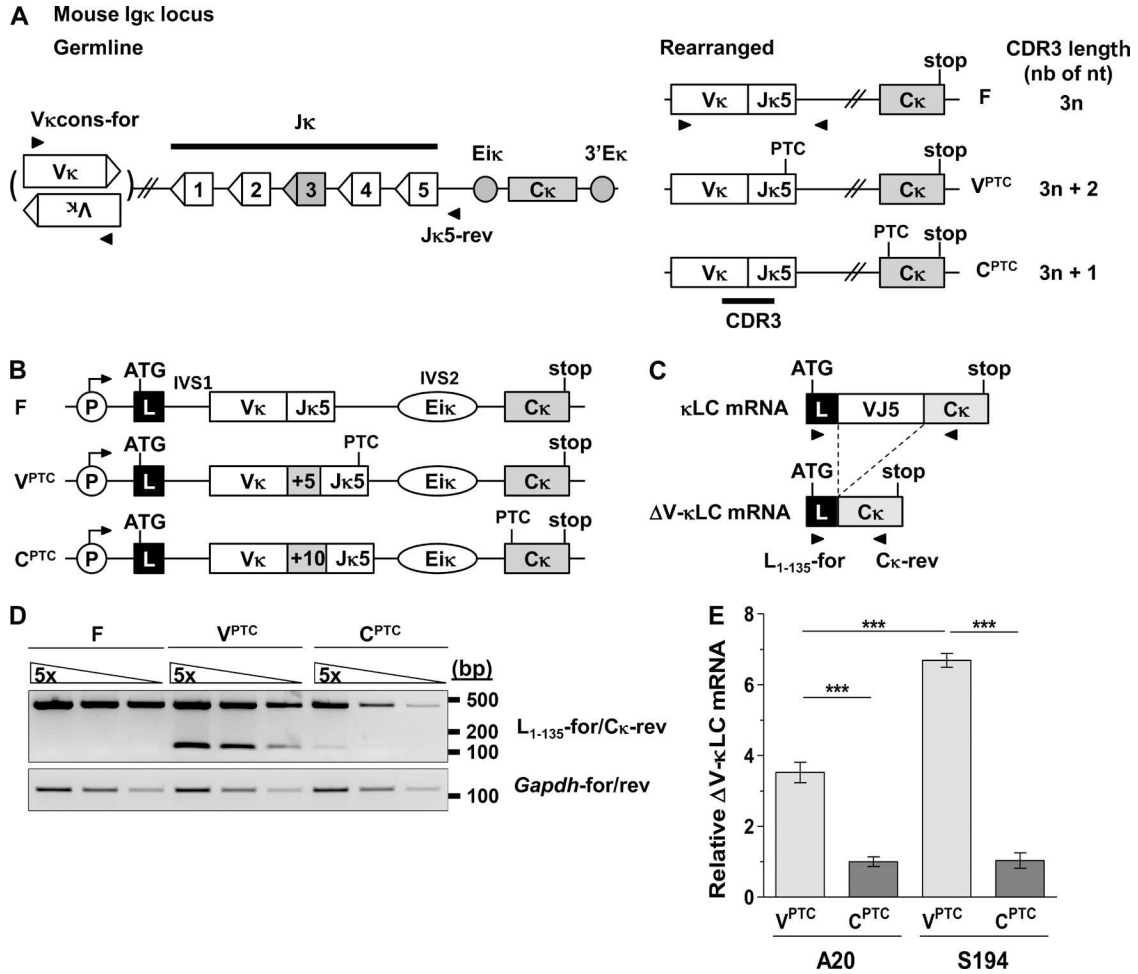


Figure 1. Alternative splicing of nonproductive Igκ transcripts in B cell and plasma cell lines. (A, left) Mouse Igκ locus showing V_κ segments (in normal and inverse orientations), the four functional J_κ segments, the intronic κ enhancer (E_κ), and the constant C_κ exon. (right) In-frame (F) and out-of-frame (V^{PTC} and C^{PTC}) V_κJ_κ5 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^{PTC}, and C^{PTC} mini-gene constructs. Out-of-frame junctions were created by inserting 5 nt (V^{PTC}) or 10 nt (C^{PTC}) at V_κJ_κ5 junctions. (C) RT-PCR was performed using L₁₋₁₃₅-for/C_κ-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^{PTC}, and C^{PTC} constructs. (E) A20 (mature B) and S194 (PC) cell lines were cotransfected with F and either V^{PTC} or C^{PTC} constructs (A20-F+V^{PTC}, n = 9; A20-F+C^{PTC}, n = 5; S194-F+V^{PTC}, n = 6; S194-F+C^{PTC}, 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^{PTC}, n = 4; S194-F+V^{PTC}, 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^{PTC}-expressing cells exhibit higher apoptosis than nontransfected and C^{PTC}-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^{PTC}-expressing cells than in nontransfected cells upon treatment with MG132 (Fig. 2 D).

As expected, *Chop* expression in C^{PTC}-expressing cells was intermediate, in between nontransfected and V^{PTC}-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^{PTC}-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

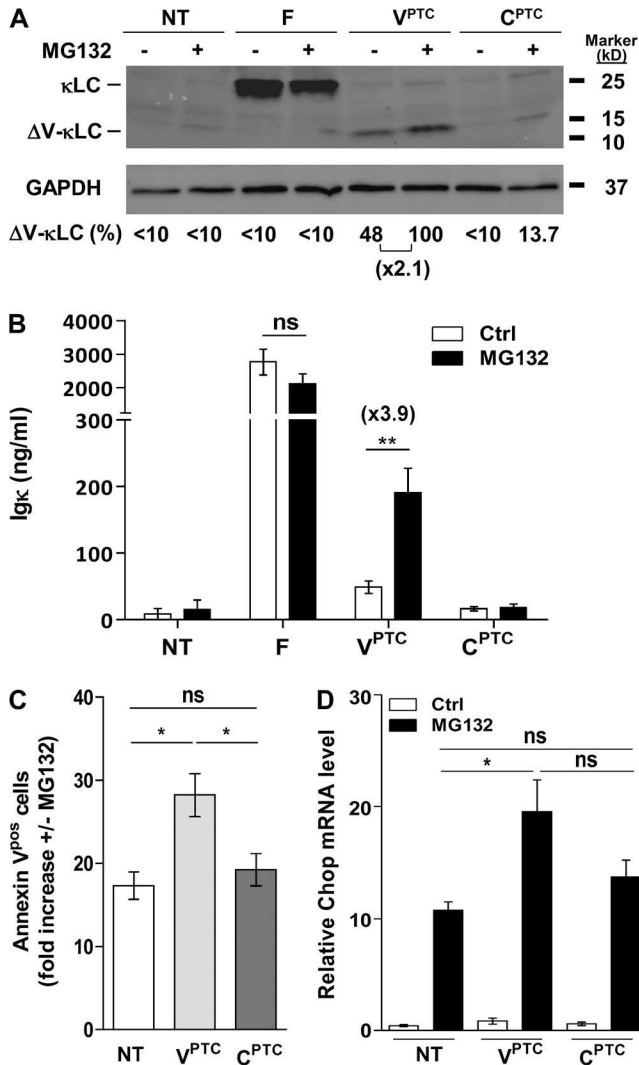


Figure 2. Production of truncated Ig and exacerbated ER stress response in V^{PTC}-expressing cells lines. Sp2/0 (hybridoma) clones isolated after transfection with F ($n = 5$), V^{PTC} ($n = 6$), or C^{PTC} ($n = 5$) constructs were treated or not with MG132 (1 μ M, 8 h). Complete κ LCs (25 kD) and truncated Δ V- κ 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 κ Abs. (C) Annexin V staining was performed in S194 cells either nontransfected (NT) or transfected with V^{PTC} ($n = 9$) and C^{PTC} ($n = 6$) constructs, and treated or not with MG132 (1 μ 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 κ repertoire at the DNA level in B cells and PCs from WT animals. We determined CDR3 lengths and distinguished in-frame (F or VJ⁺) V^{PTC} and C^{PTC} V κ J κ 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 κ J κ 5 junctions were readily detectable in precursor B cells that did not express a BCR (pro-B/pre-B cells: B220^{lo}/IgL^{neg}). As expected, numerous (~66.6%) out-of-frame junctions were retrieved in the absence of BCR-mediated selection, with an equivalent repartition of V^{PTC} and C^{PTC} subclasses (Table 1). In contrast, the percentage of F junctions was much higher in GC B cells (B220^{hi}/PNA^{hi}) having been selected for functional BCR expression, with a reciprocal fall of V^{PTC} and C^{PTC} subclasses (Table 1). Unexpectedly, the frequency of V^{PTC} junctions still more drastically decreased in PCs (B220^{neg}/CD138^{pos}; approximately nine-fold lower than GC B cells; $P < 0.01$), whereas that of C^{PTC} junctions was unchanged (Table 1). Next, we addressed whether the disappearance of PCs harboring V^{PTC}-rearranged Ig κ alleles prone to exon-skipping correlated with a decrease in Δ V- κ LC mRNAs. Δ V- κ LC mRNA levels were analyzed by RT-PCR in sorted B cell populations and PCs (Fig. 3 A). Although, a short band corresponding to Δ V- κ 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 Δ V- κ LC mRNAs in PCs was consistent with the drastic disappearance of V^{PTC} junctions in their repertoire. Altogether, the selective elimination of PCs with biallelic Ig κ rearrangements in VJ⁺/V^{PTC} configuration, likely reflects toxic effects of Δ V- κ 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 Δ V- κ 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^{PTC}-rearranged Ig κ 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^{PTC} 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 Δ V- κ LCs on late B cell development and on humoral responses, we created Ig κ knock-in mice allowing inducible expression of Δ V- κ LCs in B lineage cells (Fig. 4 A). In these mutants, later referred as inducible TIE (iTIE) mice, the replacement of endogenous J κ segments by a leader exon (L₁₋₃₃) under the control of a pV_H promoter led to enforced expression of Δ V- κ LC mRNAs and proteins. Conditional Cre-mediated expression of Δ V- κ LC mRNAs was achieved by inserting a loxP-flanked neomycin-resistance (NeoR) cassette that blocks transcription and splicing of the L₁₋₃₃ exon (Fig. 4 A). In heterozygous (iTIE/+) animals, the WT allele (+) supports normal Ig κ expression during B

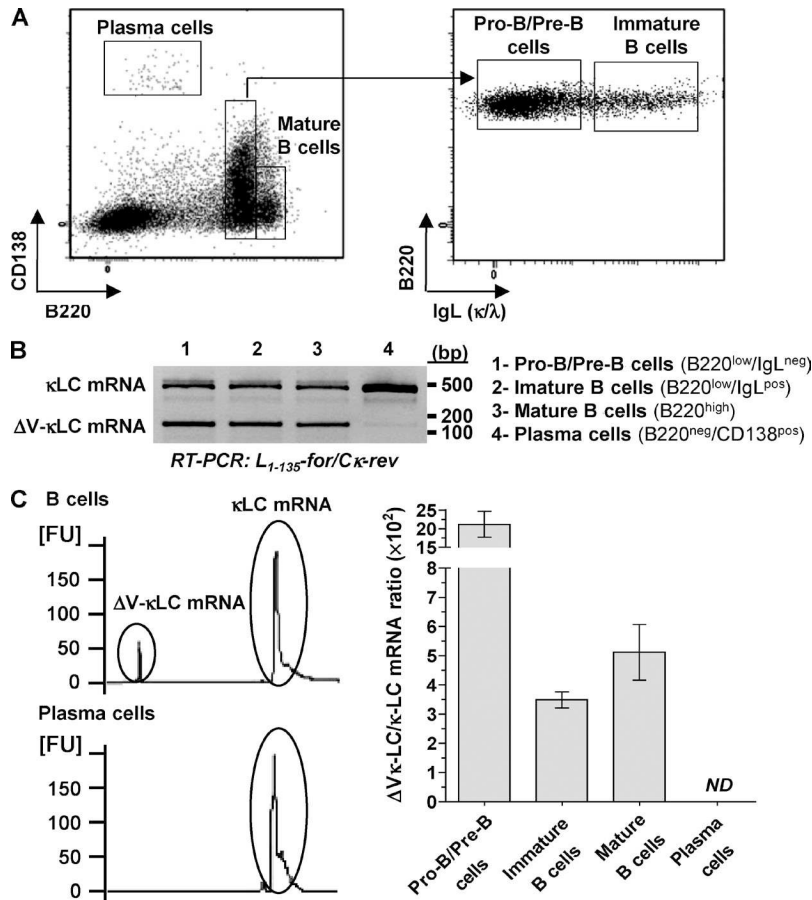


Figure 3. Exon skipping of Ig κ transcripts occurs in normal B cells but not in PCs. (A) Primary B and plasma cells were isolated from bone marrow and sorted after staining with anti-B220, anti-IgL (κ and λ), and anti-CD138 mAbs. Representative dot plots and gates used for cell sorting are depicted. 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 κ LC and ΔV - κ LC mRNA levels in sorted cell populations. One representative experiment is shown. (C) Quantification of amplification products was done using an Agilent Bioanalyzer (left). ΔV - κ LC/ κ 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 ΔV - κ LCs. After mating iTIE/+ mice with a CMV-Cre-expressing strain, high ΔV - κ 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), ΔV - κ 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 ΔV - κ 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 (Dogan et al., 2009). We found significantly lower amounts of

Table 1. Analysis of productive and nonproductive V κ J κ 5 junctions in B and plasma cells from WT mice

| Cell type | Total | In-frame | V ^{PTC} | C ^{PTC} |
|-------------------|----------|----------|------------------|------------------|
| | <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 ($B220^{neg}/IgL^{neg}$) 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 κ cons-for/J κ 5-rev primers (Fig. 1 A). Productive V κ J κ 5 junctions were assigned as in-frame and nonproductive junctions as V^{PTC} and C^{PTC}. Data are from two independent cell sorting experiments. *n* = total number of sequences.

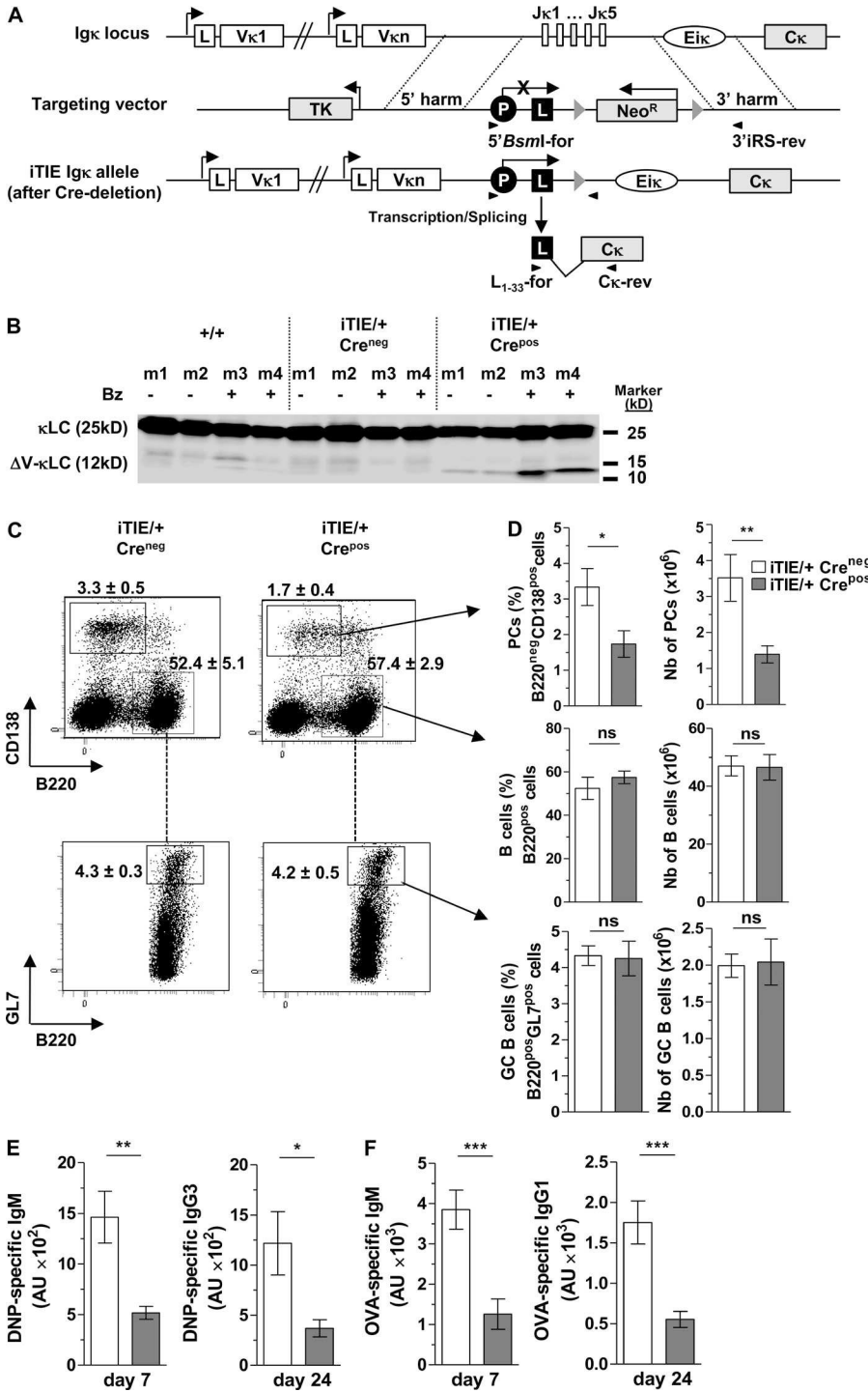


Figure 4. Altered plasma cell differentiation and antibody responses in model mice reproducing the TIE checkpoint. (A) Gene targeting strategy. Map of the Igκ locus in germline configuration (top), after Jκ replacement (middle), and Cre-mediated recombination of the loxP-flanked *hsvTK-Neo^R* cassette (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^{neg}/CD138^{pos}; top), B cells (B220^{pos}; middle), and GC B cells (B220^{pos}/GL7^{pos}; bottom) are shown for Cre^{pos} iTIE/+ (gray bars) and Cre^{neg} iTIE/+ (empty bars; *n* = 16 mice/group). (E and F) Cre^{pos} (gray) and Cre^{neg} (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 December 21, 2015

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^{pos} 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

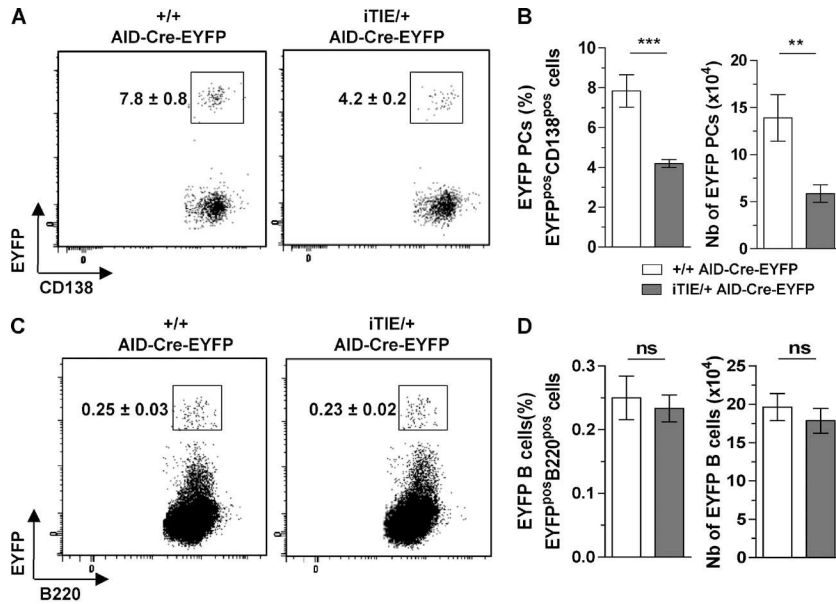


Figure 5. Altered plasma cell differentiation after inducible production of truncated Ig in germinal center B cells. FACS analysis was performed on spleen cells after gating on B220^{neg}/CD138^{pos} PCs (A) or B220^{pos} B cells (C), as depicted in Fig. 4 C. The frequency and absolute numbers of EYFP^{pos} PCs (B) and EYFP^{pos} 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^{pos} iTIE/+), but to a higher extent, homozygous animals (Cre^{pos} iTIE/iTIE) exhibited very low amounts of B220^{neg}CD138^{pos} PCs (Fig. 6 A) together with a strong reduction in serum Ig levels (Fig. 6 B), compared with Cre^{neg} controls. Δ V- κ LC mRNA amounts were determined by qPCR in B cells and PCs isolated from bone marrow of Cre^{pos} iTIE/iTIE mice. We found that the remaining PCs exhibited approximately five-fold higher Δ V- κ LC mRNA levels compared with sorted B cells (Fig. 6 C). To evaluate whether Δ V- κ LC production in PCs affected Ig synthesis, we analyzed the expression of Ig λ in Cre^{pos} and Cre^{neg} iTIE/iTIE B220^{neg}CD138^{pos} PCs. Interestingly, we found an approximately two-fold lower mean fluorescence intensity (MFI) for intracellular Ig λ in Cre^{pos} iTIE/iTIE PCs, compared with Cre^{neg} iTIE/iTIE counterparts (Fig. 6 D). Hence, PCs expressing Δ V- κ LCs synthesized low levels of Ig. Next, we evaluated whether the truncated Ig impaired the renewal or survival of PCs in Cre^{pos} and Cre^{neg} iTIE/iTIE mice injected with BrdU. Similar amounts of BrdU^{neg} and BrdU^{pos} B cells were retrieved for both strains (Fig. 6 E). In contrast, the frequency of BrdU^{pos} (cycling) B220^{neg}CD138^{pos} cells was significantly increased in Cre^{pos} iTIE mice compared with Cre^{neg} controls, indicating higher proportion of recently divided plasmablasts (PBs) upon production of Δ V- κ LCs. Inversely, we found lower amounts of noncycling BrdU^{neg} PCs in Cre^{pos} 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^{neg}CD138^{pos}). In agreement with an exacerbated ER stress response upon production of Δ V- κ 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^{pos} iTIE mice (Fig. 6 F). Thus,

the rise of ER stress as a result of the production of Δ V- κ 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

Δ V- κ 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^{PTC}-rearranged Ig κ alleles also occurred in the absence of IgH chain expression. Ig κ repertoires were thus compared between B cells (B220^{pos}) and PCs (B220^{neg}/CD138^{pos}) isolated from spleens of DH-LMP2A mice (Lehouane 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 κ J κ 5 junctions were out-of-frame in DH-LMP2A B cells, with an equivalent repartition of V^{PTC} and C^{PTC} subclasses (Table 2). Regarding nonproductive junctions, we found again that the V^{PTC} class was drastically decreased in PCs, compared with B cells (Table 2). In addition, we confirmed that the sole presence of Δ V- κ LCs impaired PC differentiation by breeding iTIE mice on a DH-LMP2A background (Fig. 7 A). Thus, the elimination of PCs containing V^{PTC}-rearranged Ig κ 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 α expression were strongly increased upon production of Δ V- κ LCs (Fig. 7).

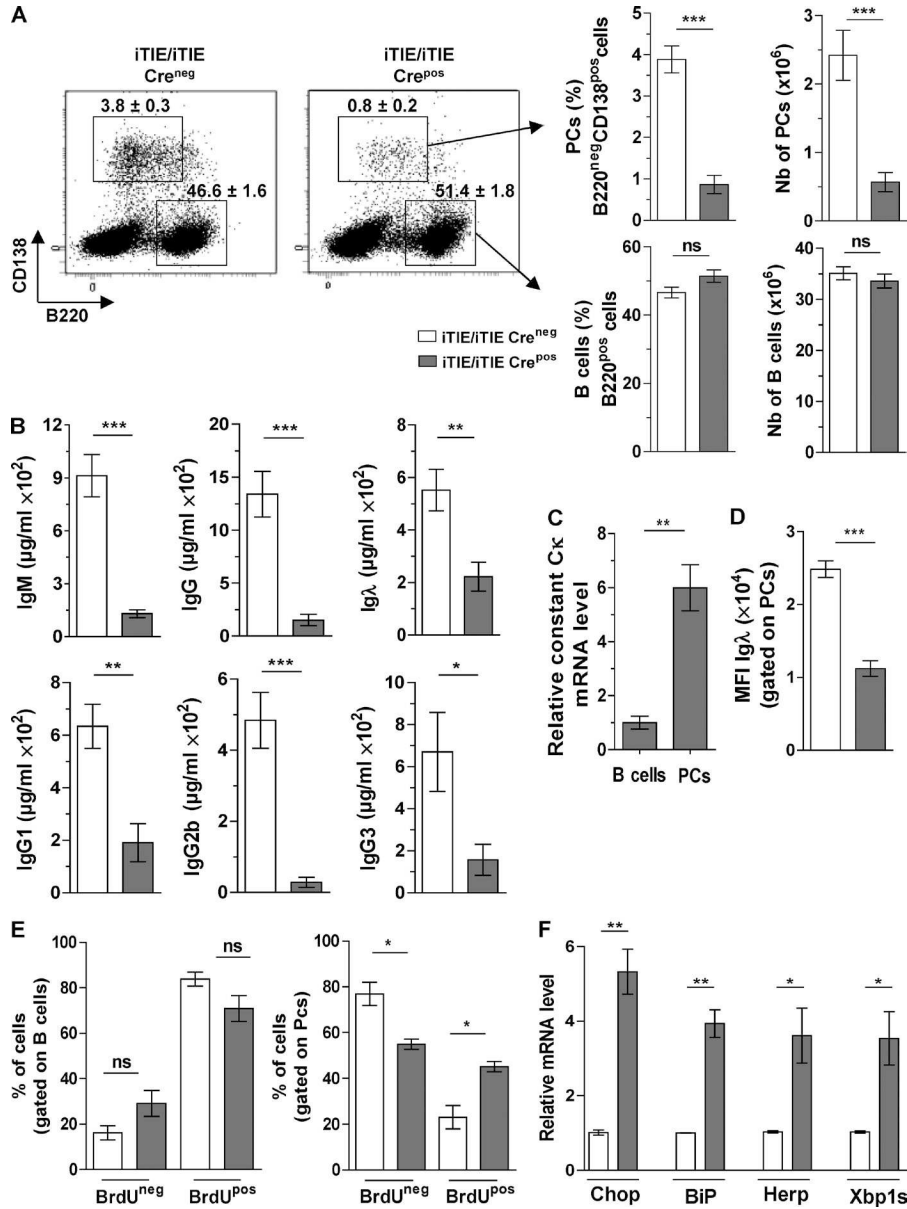


Figure 6. PCs expressing ΔV - κ LCs synthesize low amounts of Ig and preferentially accumulate as short-lived plasmablasts.

(A) Representative FACS analysis of spleen cells isolated from Cre^{pos} and Cre^{neg} homozygous iTIE/iTIE mice after staining with anti-B220 and anti-CD138 mAbs. The percentage and absolute numbers of B cells (B220^{pos}/CD138^{neg}) and PCs (B220^{neg}/CD138^{pos}) 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^{neg} ($n = 9$) and Cre^{pos} ($n = 9$) iTIE/iTIE mice to determine the amounts of Ig isotypes (IgM, IgG, IgG1, IgG2b, IgG3, and total IgG). (C) Relative ΔV - κ LC mRNA levels were determined in purified B cells (B220^{pos}/CD138^{neg}; $n = 3$) and PCs (B220^{neg}/CD138^{pos}; $n = 3$) sorted from spleens of iTIE/iTIE Cre^{pos} mice, 7 d after SRBC injection. RT-qPCR was performed using constant C κ primers, after normalization to *Gapdh* transcripts. (D) Intracellular contents of Ig λ were assessed by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) in splenic Cre^{pos} (gray) and Cre^{neg} (empty) iTIE/iTIE B220^{neg}/CD138^{pos} PCs ($n = 6$ /group), 7 d after SRBC injection. (E) Cre^{pos} and Cre^{neg} iTIE/iTIE mice ($n = 4$ /group) were injected with BrdU as described in experimental procedures. At day 10, the frequency of BrdU^{pos} (cycling) and BrdU^{neg} (noncycling) cells was analyzed in B cells (B220^{pos}/CD138^{neg}; left) and PCs (B220^{neg}/CD138^{pos}; right) isolated from bone marrow. (F) Relative mRNA levels of ER stress markers were assessed in purified PCs (B220^{neg}/CD138^{pos}) sorted from spleens of Cre^{pos} (gray; $n = 3$) and Cre^{neg} (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 κ J κ 5 junctions in B and plasma cells from DH-LMP2A mice

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

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

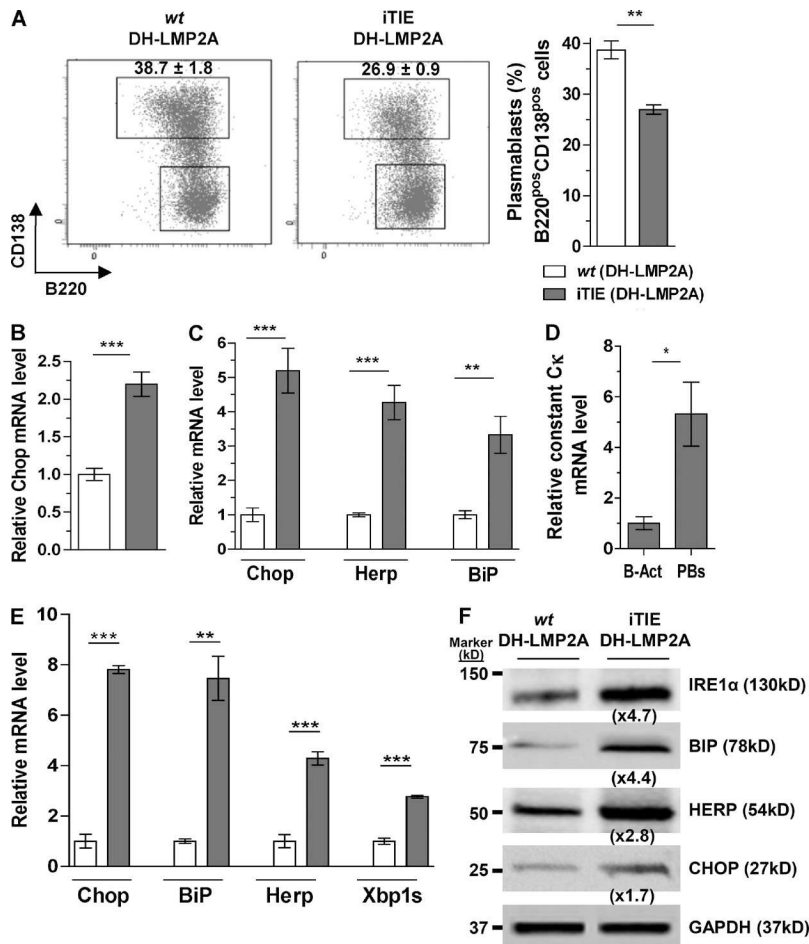


Figure 7. Intrinsic toxicity of truncated Ig encoded by ΔV - κ LC mRNAs. Experiments were performed on the DH-LMP2A background lacking IgH expression to analyze intrinsic effects of ΔV - κ LCs in terminally differentiated B lineage cells. (A) The frequency of (B220^{pos}/CD138^{pos}) plasmablasts (PBs) 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 μ 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 ΔV - κ LCs (D) and ER stress markers (E) was assessed in activated B cells (B-act: B220^{pos}/CD138^{neg}) and PBs (B220^{pos}/CD138^{pos}) sorted 4 d after LPS stimulation of B cells. (D) ΔV - κ LC mRNA levels were assessed in the iTIE/iTIE::DH-LMP2A model by qPCR using C κ 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 α 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 ΔV - κ 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 ΔV - κ 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 κ alleles prone to exon skipping. Consistent

with an Ag-independent checkpoint, ΔV - κ LCs exert intrinsic toxic effects in PCs, likely mediated by ER stress-induced apoptosis. In addition, PCs expressing ΔV - κ 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 κ alleles, V^{PTC} and C^{PTC} 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^{PTC} 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 κ transcripts that

further relies on PTC recognition within the skipped V exon, but not within the downstream C κ exon. We also observed an approximately two-fold increase in Δ V- κ 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 κ premRNAs.

Biallelic Ig κ rearrangements with a VJ⁺/V^{PTC} 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 Δ V- κ LCs. Accordingly, ER stress markers and UPR components such as CHOP, BIP, HERP, and XBP1/IRE1 α are up-regulated upon production of Δ V- κ 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 Δ V- κ 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 α) 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 Δ V- κ LCs.

Interestingly, the late TIE checkpoint stands as a quality control of individual and unassembled Δ V- κ 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^{PTC}-rearranged Ig κ 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 Δ V- κ 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 κ 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 κ C κ 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 κ segments was replaced with a cassette containing a V_H promoter (pV_H), a human leader exon (L₁₋₃₃), 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 L₁₋₃₃ exon (Fig. 4 A). Mouse embryonic stem cells (E14) were transfected with the linearized vector by electroporation and selected using 300 μ g/ml Ganciclovir and 2 μ M ganciclovir.

Mice. 2–3-mo-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, β -mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco). Cells (2×10^6) 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 μ 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 κ (187-1; Beckman Coulter), anti-mouse Ig λ (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 (0.5×10^6 cells/ml) with 1 μ 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 μ 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 λ 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 Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_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 α (Cell Signaling Technology), goat anti-mouse Ig κ (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 κ , Ig λ , 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 μ 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 μ 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 μ 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 χ^2 test was done to analyze the distribution of F_{V^{PTC}}, and C^{PTC}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.ceb.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.V79.2181-2195.1571535>
- 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 α 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 κ 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 κ 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 κ 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>

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., and van Ommen, G.-J.B. (2010). Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 18, 146–153.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Andersen, C.B.F., Ballut, L., Johansen, J.S., Chamieh, H., Nielsen, K.H., Oliveira, C.L.P., Pedersen, J.S., Séraphin, B., Le Hir, H., and Andersen, G.R. (2006). Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* 313, 1968–1972.

Anderson, S.M., Tomayko, M.M., Ahuja, A., Haberman, A.M., and Shlomchik, M.J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J. Exp. Med.* 204, 2103–2114.

Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C., and Komorowski, J. (2009). Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Res.* 19, 1732–1741.

Aoki-Ota, M., Torkamani, A., Ota, T., Schork, N., and Nemazee, D. (2012). Skewed primary Igk 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 α -independent development of antibody-secreting B cells. *Mol. Immunol.* 51, 347–355.

Arechavala-Gomez, V., Anthony, K., Morgan, J., and Muntoni, F. (2012). Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges. *Curr. Gene Ther.* 12, 152–160.

Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.* 279, 55117–55126.

Audzevich, T., Bashford-Rogers, R., Mabbott, N.A., Frampton, D., Freeman, T.C., Potocnik, A., Kellam, P., and Gilroy, D.W. (2017). Pre/pro-B cells generate macrophage populations during homeostasis and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3954–E3963.

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.

B

- Bagga, P.S., Arhin, G.K., and Wilusz, J. (1998). DSEF-1 is a member of the hnRNP H family of RNA-binding proteins and stimulates pre-mRNA cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 26, 5343–5350.
- Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17, 341–352.
- Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., and Le Hir, H. (2005). The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 861–869.
- 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.
- Baserga, S.J., and Benz, E.J. (1988). Nonsense mutations in the human beta-globin gene affect mRNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 2056–2060.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508–511.
- Basu, U., Franklin, A., Schwer, B., Cheng, H.-L., Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2009). Regulation of activation-induced cytidine deaminase DNA deamination activity in B-cells by Ser38 phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 561–568.
- Basu, U., Meng, F.-L., Keim, C., Grinstein, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wasserman, C.R., Wesemann, D.R., et al. (2011). The RNA Exosome Targets the AID Cytidine Deaminase to Both Strands of Transcribed Duplex DNA Substrates. *Cell* 144, 353–363.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 15–27.
- 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.
- Baumgarth, N. (2016). B-1 Cell Heterogeneity and the Regulation of Natural and Antigen-Induced IgM Production. *Front. Immunol.* 7, 324.
- Bébin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogné, N., Lecardeur, S., Cogné, M., and Pinaud, E. (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 3710–3717.

Références Bibliographiques

- Begum, N.A., Stanlie, A., Nakata, M., Akiyama, H., and Honjo, T. (2012). The histone chaperone Spt6 is required for activation-induced cytidine deaminase target determination through H3K4me3 regulation. *J. Biol. Chem.* 287, 32415–32429.
- 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.
- Benhamron, S., Pattanayak, S.P., Berger, M., and Tirosh, B. (2015). mTOR activation promotes plasma cell differentiation and bypasses XBP-1 for immunoglobulin secretion. *Mol. Cell. Biol.* 35, 153–166.
- 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.
- Berget, S.M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.* 270, 2411–2414.
- 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.
- Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5611–5622.
- Bergsma, A.J., van der Wal, E., Broeders, M., van der Ploeg, A.T., and Pim Pijnappel, W.W.M. (2018). Alternative Splicing in Genetic Diseases: Improved Diagnosis and Novel Treatment Options. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 85–141.
- Bernales, S., Papa, F.R., and Walter, P. (2006). Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 487–508.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332.
- Bettigole, S.E., and Glimcher, L.H. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 107–138.
- 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.
- 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.
- ten Boekel, E., Melchers, F., and Rolink, A. (1995). The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int. Immunol.* 7, 1013–1019.
- 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., Srour, 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.
- 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.
- Braun, R.O., Python, S., and Summerfield, A. (2017). Porcine B Cell Subset Responses to Toll-like Receptor Ligands. *Front. Immunol.* 8, 1044.
- 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.
- Brogna, S., McLeod, T., and Petric, M. (2016). The Meaning of NMD: Translate or Perish. *Trends Genet.* 32, 395–407.
- Brown, S.J., Stoilov, P., and Xing, Y. (2012). Chromatin and epigenetic regulation of pre-mRNA processing. *Hum. Mol. Genet.* 21, R90-96.
- 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.
- 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.

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.

Chahwan, R., Edelmann, W., Scharff, M.D., and Roa, S. (2012). AIDing antibody diversity by error-prone mismatch repair. *Semin. Immunol.* 24, 293–300.

- 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.
- Chan, C.C., Dostie, J., Diem, M.D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J., and Dreyfuss, G. (2004). eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA N. Y. N* 10, 200–209.
- 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, E1888-1897.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chowdhury, M., Forouhi, O., Dayal, S., McCloskey, N., Gould, H.J., Felsenfeld, G., and Fear, D.J. (2008). Analysis of intergenic transcription and histone modification across the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15872–15877.
- 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.

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

Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M., and Schwartz, S. (1998). Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 273, 22648–22656.

Collins, A.M., Wang, Y., Roskin, K.M., Marquis, C.P., and Jackson, K.J.L. (2015). The mouse antibody heavy chain repertoire is germline-focused and highly variable between inbred strains. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370, 20140236.

Connor, A., Wiersma, E., and Shulman, M.J. (1994). On the linkage between RNA processing and RNA translatability. *J. Biol. Chem.* 269, 25178–25184.

Conter, L.J., Song, E., Shlomchik, M.J., and Tomayko, M.M. (2014). CD73 expression is dynamically regulated in the germinal center and bone marrow plasma cells are diminished in its absence. *PloS One* 9, e92009.

Conti, E., and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 316–325.

Conticello, S.G. (2008). The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* 9, 229.

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

Conticello, S.G., Langlois, M.-A., Yang, Z., and Neuberger, M.S. (2007). DNA deamination in immunity: AID in the context of its APOBEC relatives. *Adv. Immunol.* 94, 37–73.

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

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, 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

Dallaire, F., Dupuis, S., Fiset, S., and Chabot, B. (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UPI protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J. Biol. Chem.* 275, 14509–14516.

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.

Damgaard, C.K., Kahns, S., Lykke-Andersen, S., Nielsen, A.L., Jensen, T.H., and Kjems, J. (2008). A 5' splice site enhances the recruitment of basal transcription initiation factors in vivo. *Mol. Cell* 29, 271–278.

Daniel, J.A., Santos, M.A., Wang, Z., Zang, C., Schwab, K.R., Jankovic, M., Filsuf, D., Chen, H.-T., Gazumyan, A., Yamane, A., et al. (2010). PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination. *Science* 329, 917–923.

Daniels, G.A., and Lieber, M.R. (1995). Strand specificity in the transcriptional targeting of recombination at immunoglobulin switch sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5625–5629.

Das, R., Dufu, K., Romney, B., Feldt, M., Elenko, M., and Reed, R. (2006). Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly. *Genes Dev.* 20, 1100–1109.

De Silva, N.S., and Klein, U. (2015a). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.

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. (2004). 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.

Dempsey, L.A. (2016). Plasma cell checkpoint. *Nat. Immunol.* 17, 229–229.

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.

- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007a). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22.
- Dice, J.F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295–299.
- Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J.M., and Ferguson, D.O. (2009). Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 808–813.
- Dispenzieri, A., Katzmann, J.A., Kyle, R.A., Larson, D.R., Melton, L.J., Colby, C.L., Therneau, T.M., Clark, R., Kumar, S.K., Bradwell, A., et al. (2010). Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet Lond. Engl.* 375, 1721–1728.
- Disset, A., Bourgeois, C.F., Benmalek, N., Claustres, M., Stevenin, J., and Tuffery-Giraud, S. (2006). An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements. *Hum. Mol. Genet.* 15, 999–1013.
- 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.
- Du, Q., Melnikova, I.N., and Gardner, P.D. (1998). Differential effects of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K on Sp1- and Sp3-mediated transcriptional activation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor promoter. *J. Biol. Chem.* 273, 19877–19883.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86, 43–112.
- 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.
- Dunnick, W.A., Shi, J., Holden, V., Fontaine, C., and Collins, J.T. (2011). The role of germline promoters and I exons in cytokine-induced gene-specific class switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 350–358.
- Durand, S., Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J. (2016). Hyperphosphorylation amplifies UPF1 activity to resolve stalls in nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Commun.* 7, 12434.

DuRose, J.B., Tam, A.B., and Niwa, M. (2006). Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 17, 3095–3107.

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.

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.

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

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.

Falzarano, M.S., Scotton, C., Passarelli, C., and Ferlini, A. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Mol. Basel Switz.* 20, 18168–18184.

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.

Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., et al. (2006). H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol. Cell* 21, 201–214.

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.

Furger, A., O’Sullivan, J.M., Binnie, A., Lee, B.A., and Proudfoot, N.J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* 16, 2792–2799.

Fuxa, M., and Skok, J.A. (2007). Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 129–136.

G

Galej, W.P., Nguyen, T.H.D., Newman, A.J., and Nagai, K. (2014). Structural studies of the spliceosome: zooming into the heart of the machine. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 25, 57–66.

Gallego-Paez, L.M., Bordone, M.C., Leote, A.C., Saraiva-Agostinho, N., Ascensão-Ferreira, M., and Barbosa-Morais, N.L. (2017). Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige : The key role of alternative splicing in human biological systems. *Hum. Genet.* 136, 1015–1042.

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.

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.

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.
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7779–7786.
- 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.
- Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2005). IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* 33, D256–261.
- 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.
- Goetz, A.E., and Wilkinson, M. (2017). Stress and the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 3509–3531.
- Goldfinger, M., Shmuel, M., Benhamron, S., and Tirosh, B. (2011). Protein synthesis in plasma cells is regulated by crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Eur. J. Immunol.* 41, 491–502.
- Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2010). Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3117–3125.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., and Raphael, K. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676–682.
- Gorman, J.R., and Alt, F.W. (1998). Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Adv. Immunol.* 69, 113–181.
- 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.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussonot, 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.

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.

Grigera, F., Wuerffel, R., and Kenter, A.L. (2017). MBD4 Facilitates Immunoglobulin Class Switch Recombination. *Mol. Cell. Biol.* 37.

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.

Gupta, P., and Li, Y.-R. (2018). Upf proteins: highly conserved factors involved in nonsense mRNA mediated decay. *Mol. Biol. Rep.* 45, 39–55.

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.

Haddad, D., Oruc, Z., Puget, N., Laviolette-Malirat, N., Philippe, M., Carrion, C., Le Bert, M., and Khamlichi, A.A. (2011). Sense transcription through the S region is essential for immunoglobulin class switch recombination. *EMBO J.* 30, 1608–1620.

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., Calton, 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., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173, 1213–1225.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26, 703–714.
- 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.
- He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., Chen, H., and Qi, L. (2010). Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr.* 15, 13–25.
- Hein, K., Lorenz, M.G., Siebenkotten, G., Petry, K., Christine, R., and Radbruch, A. (1998). Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 188, 2369–2374.
- Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307–310.
- Hertz, M., and Nemazee, D. (1997). BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity* 6, 429–436.
- 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. *Nucleus* 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.
- Hon, G., Wang, W., and Ren, B. (2009). Discovery and annotation of functional chromatin signatures in the human genome. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000566.
- 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.

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.

Huber, C., Schäble, K.F., Huber, E., Klein, R., Meindl, A., Thiebe, R., Lamm, R., and Zachau, H.G. (1993). The V kappa genes of the L regions and the repertoire of V kappa gene sequences in the human germ line. *Eur. J. Immunol.* 23, 2868–2875.

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.

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., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D., and Maquat, L.E. (2010). UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Mol. Cell* 39, 396–409.

Hwang, J.K., Alt, F.W., and Yeap, L.-S. (2015). Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3-0037-2014.

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.

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., and Maquat, L.E. (2008). The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 699–712.

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.

Jeevan-Raj, B.P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J.H., Cammas, F., Alt, F.W., Losson, R., and Reina-San-Martin, B. (2011). Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 208, 1649–1660.

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.

Johnston, C.M., Wood, A.L., Bolland, D.J., and Corcoran, A.E. (2006). Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4221–4234.

Ju, Z., Volpi, S.A., Hassan, R., Martinez, N., Giannini, S.L., Gold, T., and Birshtein, B.K. (2007). Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J. Biol. Chem.* 282, 35169–35178.

Jung, D., and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116, 299–311.

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.

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. (2004). 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.
- Kato, H., Okazaki, K., and Urano, T. (2013). Spt6: Two fundamentally distinct functions in the regulation of histone modification. *Epigenetics* 8, 1249–1253.
- 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.
- Kenter, A.L. (2012). AID targeting is dependent on RNA polymerase II pausing. *Semin. Immunol.* 24, 281–286.
- Kenter, A.L., Feldman, S., Wuerffel, R., Achour, I., Wang, L., and Kumar, S. (2012). Three-dimensional architecture of the IgH locus facilitates class switch recombination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1267, 86–94.
- 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.
- Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* 103, 3828–3836.
- Khan, F.A., and Ali, S.O. (2017). Physiological Roles of DNA Double-Strand Breaks. *J. Nucleic Acids* 2017, 6439169.
- Kinoshita, K., Tashiro, J., Tomita, S., Lee, C.G., and Honjo, T. (1998). Target specificity of immunoglobulin class switch recombination is not determined by nucleotide sequences of S regions. *Immunity* 9, 849–858.
- Klein, U., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* 188, 1679–1689.

- Klionsky, D.J., and Codogno, P. (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J. Innate Immun.* 5, 427–433.
- 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., Vilardell, J., and Query, C.C. (2006). Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Mol. Cell* 21, 543–553.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14, 230–239.
- 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.
- Krätzler, N.J., Suan, D., Butt, D., Bourne, K., Hermes, J.R., Chan, T.D., Sundling, C., Kaplan, W., Schofield, P., Jackson, J., et al. (2017). Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *J. Exp. Med.* 214, 1259–1267.
- Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 1004–1010.
- Kuang, F.L., Luo, Z., and Scharff, M.D. (2009). H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5288–5293.
- Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2012). Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Invest.* 122, 3456–3463.
- Kumar, S.K., Rajkumar, V., Kyle, R.A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Gay, F., and Anderson, K.C. (2017). Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17046.
- 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.
- Kuzin, I.I., Ugine, G.D., Wu, D., Young, F., Chen, J., and Bottaro, A. (2000). Normal isotype switching in B cells lacking the I mu exon splice donor site: evidence for multiple I mu-like germline transcripts. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 1451–1457.

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

Lähdesmäki, A., Taylor, A.M.R., Chrzanowska, K.H., and Pan-Hammarström, Q. (2004). Delineation of the role of the Mre11 complex in class switch recombination. *J. Biol. Chem.* 279, 16479–16487.

Lam, W.Y., and Bhattacharya, D. (2018). Metabolic Links between Plasma Cell Survival, Secretion, and Stress. *Trends Immunol.* 39, 19–27.

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.

Le Hir, H., and Andersen, G.R. (2008). Structural insights into the exon junction complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 112–119.

Le Hir, H., and Séraphin, B. (2008). EJC's at the heart of translational control. *Cell* 133, 213–216.

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., 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., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M.J. (2001). 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., 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.

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, 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.

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.

- Lejeune, F. (2017). Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep.* 50, 175–185.
- 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, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675–687.
- Lennon, G.G., and Perry, R.P. (1985). C mu-containing transcripts initiate heterogeneously within the IgH enhancer region and contain a novel 5'-nontranslatable exon. *Nature* 318, 475–478.
- Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323–335.
- Li, S., and Wilkinson, M.F. (1998). Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* 8, 135–141.
- Li, G., Zan, H., Xu, Z., and Casali, P. (2013). Epigenetics of the antibody response. *Trends Immunol.* 34, 460–470.
- 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.
- Li, S.C., Rothman, P.B., Zhang, J., Chan, C., Hirsh, D., and Alt, F.W. (1994). Expression of I mu-C gamma hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int. Immunol.* 6, 491–497.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 1125–1136.
- 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, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4771–4780.
- 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.X., Cartegni, L., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2001). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat. Genet.* 27, 55–58.
- 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.
- Long, J.C., and Caceres, J.F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* 417, 15–27.
- Lorenz, M., Jung, S., and Radbruch, A. (1995). Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 267, 1825.
- 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.
- Luby, T.M., Schrader, C.E., Stavnezer, J., and Selsing, E. (2001). The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J Exp Med* 193, 159–168.
- 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.
- Lutzker, S., and Alt, F.W. (1988). Structure and expression of germ line immunoglobulin gamma 2b transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1849–1852.
- 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, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., and Hendershot, L.M. (2002). 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.

Références Bibliographiques

- MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18.
- 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., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A., and Alt, F.W. (1998). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* 188, 1421–1431.
- Manis, J.P., Tian, M., and Alt, F.W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 23, 31–39.
- 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.
- Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., Karamariti, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Zhang, Z., et al. (2013). XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 288, 859–872.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007). 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., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323–335.
- 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.
- Martins, A.S., Alves, I., Helguero, L., Domingues, M.R., and Neves, B.M. (2016). The Unfolded Protein Response in Homeostasis and Modulation of Mammalian Immune Cells. *Int. Rev. Immunol.* 35, 457–476.
- Martins, R., Proença, D., Silva, B., Barbosa, C., Silva, A.L., Faustino, P., and Romão, L. (2012). Alternative polyadenylation and nonsense-mediated decay coordinately regulate the human HFE mRNA levels. *PLoS One* 7, e35461.
- 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.
- Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J., and Chaudhuri, J. (2014). Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* 122, 1–57.
- Mayeda, A., Srean, 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.
- 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.
- 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.
- Medghalchi, S.M., Frischmeyer, P.A., Mendell, J.T., Kelly, A.G., Lawler, A.M., and Dietz, H.C. (2001). Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* 10, 99–105.
- 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.
- Mesin, L., Ersching, J., and Victora, G.D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 45, 471–482.
- 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.
- Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682.
- Mikulasova, A., Wardell, C.P., Murison, A., Boyle, E.M., Jackson, G.H., Smetana, J., Kufova, Z., Pour, L., Sandecka, V., Almasi, M., et al. (2017). The spectrum of somatic mutations in monoclonal gammopathy of undetermined significance indicates a less complex genomic landscape than that in multiple myeloma. *Haematologica* 102, 1617–1625.
- 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.
- Minnich, M., Tagoh, H., Bönelt, P., Axelsson, E., Fischer, M., Cebolla, B., Tarakhovsky, A., Nutt, S.L., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2016). Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* 17, 331–343.
- 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.
- 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., Orlowski, 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.

- 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.
- Moriya, S., Komatsu, S., Yamasaki, K., Kawai, Y., Kokuba, H., Hirota, A., Che, X.-F., Inazu, M., Gotoh, A., Hiramoto, M., et al. (2015). Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress-mediated cell death in multiple myeloma cells. *Int. J. Oncol.* 46, 474–486.
- Morvan, C.L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A., and Cogne, M. (2003). The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102, 1421–1427.
- 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. (2004). The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 118, 539–544.
- 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* 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.
- Mühlemann, O., Eberle, A.B., Stalder, L., and Zamudio Orozco, R. (2008). Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 538–549.
- Muhrad, D., and Parker, R. (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370, 578–581.
- 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

- Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M., and Mori, K. (2004). Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 15, 2537–2548.
- 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.
- Nahkuri, S., Taft, R.J., and Mattick, J.S. (2009). Nucleosomes are preferentially positioned at exons in somatic and sperm cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3420–3424.
- 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.
- Nakamura, A., and Takeda, S. (2009). Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 29, 494–501.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302, 2137–2140.
- 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.
- Neugebauer, K.M. (2002). On the importance of being co-transcriptional. *J. Cell Sci.* 115, 3865–3871.
- Neu-Yilik, G., Raimondeau, E., Eliseev, B., Yeramala, L., Amthor, B., Deniaud, A., Huard, K., Kerschgens, K., Hentze, M.W., Schaffitzel, C., et al. (2017). Dual function of UPF3B in early and late translation termination. *EMBO J.* 36, 2968–2986.
- 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.
- 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. (2007b). 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 1950* 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.

Nowak, U., Matthews, A.J., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* 12, 160–166.

Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715–725.

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

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573–583.

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.

Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., and Iwawaki, T. (2009). Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 2496–2504.

Okada, T., and Cyster, J.G. (2006). B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 278–285.

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

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. (2010). 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.

Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M., and Hentze, M.W. (1997). mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* 89, 597–606.

Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D.H. (2004). Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: the function of hnRNPs K and E1/E2. *Biol. Cell* 96, 407–411.

Ottens, F., and Gehring, N.H. (2016). Physiological and pathophysiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Pflugers Arch.* 468, 1013–1028.

Overdijk, M.B., Verploegen, S., Bögels, M., van Egmond, M., Lammerts van Bueren, J.J., Mutis, T., Groen, R.W.J., Breij, E., Martens, A.C.M., Bleeker, W.K., et al. (2015). Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *MAbs* 7, 311–321.

Overdijk, M.B., Jansen, J.H.M., Nederend, M., Lammerts van Bueren, J.J., Groen, R.W.J., Parren, P.W.H.I., Leusen, J.H.W., and Boross, P. (2016). The Therapeutic CD38 Monoclonal Antibody Daratumumab Induces Programmed Cell Death via Fcγ Receptor-Mediated Cross-Linking. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 197, 807–813.

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.

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.
- Patenaude, A.-M., and Di Noia, J.M. (2010). The mechanisms regulating the subcellular localization of AID. *Nucl. Austin Tex* 1, 325–331.
- Pavri, R. (2017). R Loops in the Regulation of Antibody Gene Diversification. *Genes* 8.
- Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V., et al. (2010). Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 143, 122–133.
- Peled, D., Daube, S.S., and Naaman, R. (2008). Selective enzymatic labeling to detect packing-induced denaturation of double-stranded DNA at interfaces. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 24, 11842–11846.
- 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.
- Perlot, T., Li, G., and Alt, F.W. (2008). Antisense transcripts from immunoglobulin heavy-chain locus V(D)J and switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3843–3848.
- Pettigrew, C.A., and Brown, M.A. (2008). Pre-mRNA splicing aberrations and cancer. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 1090–1105.
- Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* 203, 2419–2424.
- Pike, B.L., Boyd, A.W., and Nossal, G.J. (1982). Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2013–2017.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15, 187–199.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110, 27–70.
- Plaschka, C., Nozawa, K., and Cramer, P. (2016). Mediator architecture and RNA polymerase II interaction. *J. Mol. Biol.*
- Pozzoli, U., and Sironi, M. (2005). Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 1579–1604.

Proudfoot, N.J., Furger, A., and Dye, M.J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501–512.

Puig, O., Gottschalk, A., Fabrizio, P., and Séraphin, B. (1999). Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection. *Genes Dev.* 13, 569–580.

Pulak, R., and Anderson, P. (1993). mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes Dev.* 7, 1885–1897.

Q

Qi, H. (2012). From SAP-less T cells to helpless B cells and back: dynamic T-B cell interactions underlie germinal center development and function. *Immunol. Rev.* 247, 24–35.

Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769.

Qiu, G., Harriman, G.R., and Stavnezer, J. (1999). Ialpha exon-replacement mice synthesize a spliced HPRT-C(alpha) transcript which may explain their ability to switch to IgA. Inhibition of switching to IgG in these mice. *Int. Immunol.* 11, 37–46.

R

Rada, C., and Milstein, C. (2001). The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J.* 20, 4570–4576.

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.

Radcliffe, G., Lin, Y.C., Julius, M., Marcu, K.B., and Stavnezer, J. (1990). Structure of germ line immunoglobulin alpha heavy-chain RNA and its location on polysomes. *Mol. Cell. Biol.* 10, 382–386.

Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751–758.

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.

Reimold, A.M., Ponath, P.D., Li, Y.S., Hardy, R.R., David, C.S., Strominger, J.L., and Glimcher, L.H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J. Exp. Med.* 183, 393–401.

Reina-San-Martin, B., Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R.F., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2003). H2AX is required for recombination between immunoglobulin

switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 197, 1767–1778.

Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J. Exp. Med.* 200, 1103–1110.

Reina-San-Martin, B., Nussenzweig, M.C., Nussenzweig, A., and Difilippantonio, S. (2005). Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1590–1595.

Reth, M., and Nielsen, P. (2014). 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.

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.

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.

Richardson, P.G., Kumar, S., Laubach, J.P., Paba-Prada, C., Gupta, N., Berg, D., van de Velde, H., and Moreau, P. (2017). New developments in the management of relapsed/refractory multiple myeloma - the role of ixazomib. *J. Blood Med.* 8, 107–121.

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.

Robert, I., Dantzer, F., and Reina-San-Martin, B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 206, 1047–1056.

Rogozin, I.B., Iyer, L.M., Liang, L., Glazko, G.V., Liston, V.G., Pavlov, Y.I., Aravind, L., and Pancer, Z. (2007). Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat. Immunol.* 8, 647–656.

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. (2014). Multiple myeloma. *Lancet.*

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.

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.

Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2013). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210, 1501–1507.

Rouschop, K.M.A., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., et al. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.* 120, 127–141.

Rubtsov, A.V., Swanson, C.L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R., and Torres, R.M. (2008). TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 3882–3888.

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.

S

Saintamand, A., Rouaud, P., Saad, F., Rios, G., Cogné, M., and Denizot, Y. (2015). Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* 6, 7084.

Saintamand, A., Vincent-Fabert, C., Garot, A., Rouaud, P., Oruc, Z., Magnone, V., Cogné, M., and Denizot, Y. (2016). Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region. *Nat. Commun.* 7, 10730.

Saint-André, V., Batsché, E., Rachez, C., and Muchardt, C. (2011). Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 γ favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 337–344.

Samara, M., Oruc, Z., Dougier, H.-L., Essawi, T., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2006). Germ line transcription in mice bearing neor gene downstream of Ig γ 3 exon in the Ig heavy chain locus. *Int. Immunol.* 18, 581–589.

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.

Sano, R., and Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3460–3470.

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.

Sardone, V., Zhou, H., Muntoni, F., Ferlini, A., and Falzarano, M.S. (2017). Antisense Oligonucleotide-Based Therapy for Neuromuscular Disease. *Mol. Basel Switz.* 22.

- 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.
- 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 Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263.
- Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 167–202.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035–1048.
- Schoenberg, D.R., and Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 13, 246–259.
- 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.
- Schwab, K.R., Patel, S.R., and Dressler, G.R. (2011). Role of PTIP in Class Switch Recombination and Long-Range Chromatin Interactions at the Immunoglobulin Heavy Chain Locus. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1503–1511.
- Schwartz, S., Meshorer, E., and Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 990–995.
- 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., Giltneane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the

secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93.

Shamu, C.E., and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* 15, 3028–3039.

Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 230–242.

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.

Sharp, P.A. (1985). On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42, 397–400.

Sharp, P.A. (1987). Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235, 766–771.

Shen, H.-M., and Codogno, P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 7, 457–465.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.

Shepard, P.J., and Hertel, K.J. (2009). The SR protein family. *Genome Biol.* 10, 242.

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.

Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* 4, 435–441.

Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* 247, 52–63.

Shore, G.C., Papa, F.R., and Oakes, S.A. (2011). Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 143–149.

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. (2015b). 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., Kleedejn, 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.
- Sitia, R., and Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891–894.
- 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.
- Spies, N., Nielsen, C.B., Padgett, R.A., and Burge, C.B. (2009). Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Mol. Cell* 36, 245–254.
- 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. (2016). A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.* 213, 109–122.
- 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.
- Stanlie, A., Aida, M., Muramatsu, M., Honjo, T., and Begum, N.A. (2010). Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 22190–22195.
- Starnes, L.M., Su, D., Pikkupera, L.M., Weinert, B.T., Santos, M.A., Mund, A., Soria, R., Cho, Y.-W., Pozdnyakova, I., Kubec Højfeldt, M., et al. (2016). A PTIP-PA1 subcomplex promotes transcription for IgH class switching independently from the associated MLL3/MLL4 methyltransferase complex. *Genes Dev.* 30, 149–163.

Stavnezer, J., Radcliffe, G., Lin, Y.C., Nietupski, J., Berggren, L., Sitia, R., and Severinson, E. (1988). Immunoglobulin heavy-chain switching may be directed by prior induction of transcripts from constant-region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7704–7708.

Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 261–292.

Stavnezer-Nordgren, J., and Sirlin, S. (1986). Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO J.* 5, 95–102.

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.

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.

Suñé-Pou, M., Prieto-Sánchez, S., Boyero-Corral, S., Moreno-Castro, C., El Yousfi, Y., Suñé-Negre, J.M., Hernández-Munain, C., and Suñé, C. (2017). Targeting Splicing in the Treatment of Human Disease. *Genes* 8.

T

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.

Tange, T.Ø., Shibuya, T., Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2005). Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA N. Y. N* 11, 1869–1883.

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.

Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., and de Vries, J.E. (1998). Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188, 1691–1703.

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.

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.

Thiebe, R., Schäble, K.F., Bensch, A., Brensing-Küppers, J., Heim, V., Kirschbaum, T., Mitlöhner, H., Ohnrich, M., Pourrajabi, S., Rösenthaler, F., et al. (1999). The variable genes and gene families of the mouse immunoglobulin kappa locus. *Eur. J. Immunol.* 29, 2072–2081.

Thomas-Claudepierre, A.-S., Robert, I., Rocha, P.P., Raviram, R., Schiavo, E., Heyer, V., Bonneau, R., Luo, V.M., Reddy, J.K., Borggreffe, T., et al. (2016). Mediator facilitates transcriptional activation and dynamic long-range contacts at the IgH locus during class switch recombination. *J. Exp. Med.* 213, 303–312.

Tinguely, A., Chemin, G., Peron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogne, 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.

Tomayko, M.M., Steinel, N.C., Anderson, S.M., and Shlomchik, M.J. (2010). Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 7146–7150.

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

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.

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.

Valentine, C.R. (1998). The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* 411, 87–117.

Vertino, P.M., and Wade, P.A. (2012). R Loops: Lassoing DNA Methylation at CpGi. *Mol. Cell* 45, 708–709.

Victoria, G.D., and Mesin, L. (2014). Clonal and cellular dynamics in germinal centers. *Curr. Opin. Immunol.* 28, 90–96.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.

Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605.

Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogne, N., Cogne, M., and Denizot, Y. (2009). Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol* 182, 6926–6932.

Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116, 1895–1898.

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, 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.

Wang, L., Whang, N., Wuerffel, R., and Kenter, A.L. (2006). AID-dependent histone acetylation is detected in immunoglobulin S regions. *J. Exp. Med.* 203, 215–226.

Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A.A., and Kenter, A.L. (2009). S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J. Exp. Med.* 206, 1817–1830.

Wang, Q., Oliveira, T., Jankovic, M., Silva, I.T., Hakim, O., Yao, K., Gazumyan, A., Mayer, C.T., Pavri, R., Casellas, R., et al. (2014). Epigenetic targeting of activation-induced cytidine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 18667–18672.

de Weers, M., Tai, Y.-T., van der Veer, M.S., Bakker, J.M., Vink, T., Jacobs, D.C.H., Oomen, L.A., Peipp, M., Valerius, T., Slootstra, J.W., et al. (2011). Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 1840–1848.

Weichhold, G.M., Klobeck, H.G., Ohnheiser, R., Combriato, G., and Zachau, H.G. (1990). Megabase inversions in the human genome as physiological events. *Nature* 347, 90–92.

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.

Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecueche, D., Gauthier, F., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* 205, 1331–1342.

Werner, M., Thuriaux, P., and Soutourina, J. (2009). Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 740–745.

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.

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.

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.

Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and Kenter, A.L. (2007). S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27, 711–722.

X

Xiao, Y., Hendriks, J., Langerak, P., Jacobs, H., and Borst, J. (2004). CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 172, 7432–7441.

Xu, M.Z., and Stavnezer, J. (1992). Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line gamma 1 RNA: analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* 11, 145–155.

Xu, Z., Fulop, Z., Wu, G., Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., Thomas, L.M., Al-Qahtani, A., White, C.A., Park, S.-R., et al. (2010). 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1124–1135.

Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531.

Y

Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H., Robbiani, D.F., McBride, K., Nussenzweig, M.C., and Casellas, R. (2011). Deep-sequencing identification of the genomic

targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* 12, 62–69.

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.

Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol* 4, 442–451.

Z

Zachau, H.G. (1993). The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene* 135, 167–173.

Zaharieva, E., Chipman, J.K., and Soller, M. (2012). Alternative splicing interference by xenobiotics. *Toxicology* 296, 1–12.

Zahler, A.M., Lane, W.S., Stolk, J.A., and Roth, M.B. (1992). SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* 6, 837–847.

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.

Zan, H., and Casali, P. (2015). Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. *Front. Immunol.* 6.

Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L., and Tian, M. (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 5, 1275–1281.

Zarrin, A.A., Tian, M., Wang, J., Borjeson, T., and Alt, F.W. (2005). Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2466–2470.

Zarrin, A.A., Goff, P.H., Senger, K., and Alt, F.W. (2008). Sgamma3 switch sequences function in place of endogenous Sgamma1 to mediate antibody class switching. *J. Exp. Med.* 205, 1567–1572.

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.
- Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L., and Toellner, K.-M. (2016). Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol. Rev.* 270, 8–19.
- Zhang, Z.Z., Pannunzio, N.R., Hsieh, C.-L., Yu, K., and Lieber, M.R. (2014). The role of G-density in switch region repeats for immunoglobulin class switch recombination. *Nucleic Acids Res.* 42, 13186–13193.
- 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.
- Zheng, S., Vuong, B.Q., Vaidyanathan, B., Lin, J.-Y., Huang, F.-T., and Chaudhuri, J. (2015). Non-coding RNA Generated following Lariat Debranching Mediates Targeting of AID to DNA. *Cell* 161, 762–773.
- Zhou, P., Ma, X., Iyer, L., Chaulagain, C., and Comenzo, R.L. (2014). One siRNA pool targeting the λ constant region stops λ light-chain production and causes terminal endoplasmic reticulum stress. *Blood* 123, 3440–3451.
- 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.
- Zuccarino-Catania, G.V., Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat. Immunol.* 15, 631–637.

Titre : Régulation de l'expression des immunoglobulines au cours du développement lymphocytaire B tardif

Résumé

Le processus aléatoire des recombinaisons V(D)J permet d'obtenir un répertoire d'anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) hautement diversifié. En revanche, le caractère imprécis des jonctions V(D)J conduit à l'apparition de décalages du cadre de lecture dans deux tiers des cas. Ainsi, la plupart des cellules B hébergent des allèles d'Ig avec des réarrangements V(D)J non-productifs au sein de leur génome. Plusieurs études incluant celles menées au laboratoire ont montré que ces allèles non-productifs sont transcrits mais subissent une régulation post-transcriptionnelle impliquant le mécanisme de dégradation des ARNm appelé NMD « Nonsense-Mediated mRNA Decay ». Cette surveillance ARN diminue ainsi le taux d'ARNm codant pour des chaînes d'Ig tronquées. En revanche, l'impact de l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs sur la production d'Ig aberrantes reste jusqu'ici peu exploré. L'étude de ce processus appelé NAS (« Nonsense-associated Altered Splicing »), et en particulier du phénomène de saut d'exon, présente un grand intérêt car cet épissage alternatif peut permettre la synthèse d'Ig tronquées présentant des délétions internes.

Les projets développés lors de cette thèse ont révélé la toxicité des chaînes d'Ig dépourvues de domaine variable (V) dans les plasmocytes, et mis en évidence l'existence d'un nouveau point de contrôle au cours de la différenciation plasmocytaire. Ce phénomène nommé TIE-checkpoint (Truncated-Ig Exclusion) conduisant à l'élimination des plasmocytes exprimant des Ig tronquées, est la conséquence d'un saut d'exon lors de l'épissage des transcrits Ig κ non-productifs. Pour étudier les événements de NAS lors de l'épissage des transcrits d'Ig dans les plasmocytes, il faut par conséquent limiter l'activation du TIE-checkpoint. A l'aide d'un modèle murin présentant un exon non-sens additionnel au locus IgH, nous avons pu analyser *in vivo* l'épissage alternatif par « saut d'exon » des transcrits d'Ig non-productifs. En effet, l'élimination de cet exon additionnel aboutit à la synthèse d'une chaîne d'Ig normale et non à la production de chaînes tronquées. Cette étude a été menée dans des cellules B primaires et des plasmocytes. Les résultats obtenus ont révélé que l'hypertranscription des gènes d'Ig, qui accompagne la différenciation plasmocytaire, favorise l'épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs, par un phénomène de saut d'exon.

Nous avons également étudié les éventuelles connexions entre le mécanisme de NMD, impliqué dans la surveillance des ARNm, et l'UPR (« Unfolded Protein Response ») permettant de réguler l'homéostasie protéique dans les plasmocytes. De façon originale, nous avons identifié une boucle de régulation positive entre les processus de surveillance ARN (NMD) et protéique (UPR, autophagie, protéasome). La mise en évidence de cette coopération dans les plasmocytes constitue un exemple unique au vu de la littérature et, aurait pour effet de limiter la synthèse d'Ig tronquées tout en autorisant la synthèse massive d'Ig.

Enfin, nous avons étudié le rôle de l'épissage des transcrits d'Ig non-codants (appelés transcrits I « germinaux ») au cours du processus de CSR « Class Switch Recombination ». Cette étude a apporté des précisions sur le rôle des sites donneurs d'épissage des exons I et révélé que la reconnaissance de ces sites d'épissage module l'intensité de la transcription de la région « switch » S adjacente, et par conséquent, son accessibilité à AID « Activation-Induced cytidine Deaminase » lors de la CSR.

Mots clefs : Immunoglobulines (Ig), Plasmocytes, NAS (Nonsense-associated Altered Splicing), Épissage alternatif, Saut d'exon, NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response).