



HAL
open science

Analyse exploratoire des thérapies antisens innovantes dans le traitement des syndromes lymphoprolifératifs et autres maladies impliquant la lignée lymphoïde B

Anne Marchalot

► To cite this version:

Anne Marchalot. Analyse exploratoire des thérapies antisens innovantes dans le traitement des syndromes lymphoprolifératifs et autres maladies impliquant la lignée lymphoïde B. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2020. Français. NNT : 2020LIMO0030 . tel-03429598

HAL Id: tel-03429598

<https://theses.hal.science/tel-03429598>

Submitted on 15 Nov 2021

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

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

Laboratoire UMR CNRS 7276 INSERM 1262 – CRIBL « Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations »

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

Présentée et soutenue par
Anne Marchalot

Le 6 octobre 2020

Analyse exploratoire de thérapies antisens innovantes dans le traitement des syndromes lymphoprolifératifs et autres maladies impliquant la lignée lymphoïde B

Thèse dirigée par Laurent DELPY

JURY :

Président du jury

M. Christophe Sirac, Professeur des Universités – Université de Limoges

Rapporteurs

M. Ahmed Amine Khamlichi, Directeur de Recherche CNRS – Université Toulouse III

M. Stéphane Mancini, Chargé de Recherche INSERM – Université d'Aix-Marseille

Examineurs

Mme. Marion Espéli, Chargé de Recherche INSERM – Université Paris-Diderot



Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Laurent Delpy qui m'a offert l'opportunité de faire ma thèse dans son équipe au sein de l'unité CRIBL. Il aura fallu un an de plus mais l'attente en valait la chandelle et mon année supplémentaire ne m'aura au final que mieux préparée pour les années de thèse. J'ai pu développer mon autonomie grâce à la confiance que tu m'as accordé et je t'en remercie vraiment, je crois que je ne pourrais pas être mieux préparée pour le post-doctorat !

Je remercie aussi Christophe Sirac, Ahmed Amine Khamlichi, Stéphane Mancini et Marion Espéli d'avoir accepté de faire parti de mon jury.

Merci également à nos collaborateurs de Bordeaux : Philippe Barthélémy et Sébastien Benizri ; de Montpellier : Jérôme Moreaux et Coraline Thibaut ; de Rennes : Thierry Fest, Gersende Lacombe, Marion Haas et Kathleen Santamaria et de Paris : Aurélie Goyenvallée, pour m'avoir permis de développer des projets en dehors de l'unité et pour nos échanges.

La thèse n'aurait pas été la même sans tous les conseils et le soutien que j'ai pu recevoir des membres du CRIBL :

Merci à Claire, Christelle, Sandrine, Marie, Zeliha, Tiffany, Cathy et Mylène qui ont su répondre avec patience à toutes mes questions et m'expliquer sagement la cytométrie et le western Blot (entre autre). Grâce à vous ce sont des techniques un peu moins mystérieuses pour moi et merci pour votre bonne humeur ☺

Merci à mes collègues doctorants et de bureau Jean-Marie et Omar qui m'ont presque tout appris lors de mon arrivée au laboratoire et aussi aidé lors de ma thèse. Mention spéciale pour toi Jean-Marie, ta gentillesse est légendaire, ne change surtout pas ;) Les épreuves difficiles on en aura connu tous les deux et on a réussi à se soutenir même si c'était chacun à notre manière... Je pense qu'on sort tous les deux grandi de ces expériences ☺ Au final on finira notre thèse en même temps, je te souhaite plein de réussite pour la suite !

Merci à tous les chercheurs avec qui j'ai adoré discuter que ce soit de sciences ou autre et de m'avoir apporté leur soutien : Eric, Christophe, Sophie, Sandrine, Christelle, Yves, Jean-Claude, Jean, Nathalie, David, Ahmad, Chantal, Faraj et Jérôme. Merci aussi à Michel Cogné de m'avoir accepté dans son laboratoire

Merci à Stéphanie, et aussi les membres de l'INSERM Transfert Lara Mounné et Matthieu Collin qui m'ont permis de faire naître des nouveaux projets et au final un brevet avec une rapidité imbattable ! J'ai vraiment apprécié votre enthousiasme et nos échanges.

Merci à tous les doctorants et post-doctorant du CRIBL : Racha, Ophélie, Emilie, Batoul, Iman, Zeinab, Nour, Hussein, Sébastien, Alexis, Robin, François, Lina, Léa, Stecy, et j'en oublie sans doute plein... Partager avec vous que ce soit pour les manip ou en dehors était toujours un plaisir. Mention spéciale à Lillian évidemment, mon seul collègue de la promo 2017 ! Je pense qu'on s'est soutenu mutuellement et il le fallait ;) Courage c'est bientôt la fin pour toi aussi ☺ Merci également aux doctorants et post-doctorants des autres unités : Federica, Hichem, Marine, Florent, Alexis, Axel, Eric, Azra, Camille... pour nos partages ☺

Merci à toute l'équipe d'enseignement Immuno/Parasito/Bactério : Jenny, Bertrand, Roselyne, Aurélien, Julien, Clothilde, ... Travailler avec vous était vraiment une bouffée d'air dans mon quotidien au labo. Jamais je n'aurai pensé apprécier autant l'enseignement ☺ Merci tout particulièrement à Jenny qui m'a soutenu et accompagné dans cette aventure, merci pour tes

précieux conseils ! Et merci à Roselyne pour nos petites discussions, les petites anecdotes et toute ton aide dans la réalisation des TP ☺

Merci à toute l'asso ADPLim : Lilian, Céline, Clément, Clotilde, Andréa, Cédric, Elodie, Lucie, Tarek et Sylvain. C'était vraiment sympa d'organiser et de faire les soirées avec vous. Je resterais déçue éternellement d'avoir loupé le premier gala de l'asso :(Je compte sur vous pour bien faire fonctionner le trafic de Vouvray et de Chinon quand je serai partie et surtout je veux des photos du prochain gala ! ☺

Enfin, je me dois évidemment de finir avec ceux qui m'ont apporté leur soutien indéfectible tout au long de la thèse : ma grand-mère, mes parents, ma sœur, Alex ♥ (eh oui tu voulais ton cœur tu l'as ☺), mes beaux-parents Brigitte et Philippe et mes meilleures amies Mathilde et Camille, vous connaissez toute l'histoire... ;)

Merci à Val, Marine, Quentin, Eva et Jan pour nos parties de Molky légendaires à Limoges, indispensable pour souffler ☺ Et merci à mes copains de pharma et de M2 : Bruno, Thibaut, Paul et Justine qui m'ont conseillé lors des petits (ou des épineux !) soucis durant la thèse ! ☺

Et pour finir, merci à tous ceux que j'ai oublié... ☺

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	1
Droits d'auteurs	3
Table des matières	4
Table des illustrations	6
Abbréviations	8
Partie I. Introduction	15
I.1. De l'ADN à la protéine.....	16
I.1.1. La transcription.....	16
I.1.2. L'épissage	20
I.1.3. Polyadénylation	24
I.1.4. Transport du noyau vers le cytoplasme et traduction	27
I.1.5. Régulation des transcrits anormaux	30
I.2. La cellule B et le plasmocyte.....	33
I.2.1. Les immunoglobulines.....	33
I.2.1.1. Les gènes d'Ig et leurs régions régulatrices	34
I.2.1.2. Le réarrangement V(D)J.....	36
I.2.1.3. Régulation des réarrangements V(D)J et exclusion allélique.....	38
I.2.1.4. L'hypermutation somatique	40
I.2.1.5. La commutation de classe.....	42
I.2.2. Ontogenèse B	46
I.3. Les maladies liées à la cellule B et les syndromes lymphoprolifératifs	52
I.3.1. Les allergies IgE-dépendantes	52
I.3.2. Les maladies auto-immunes.....	55
I.3.3. Les syndromes lymphoprolifératifs B	56
I.3.4. Les atteintes rénales due aux gammopathies monoclonales (MGRS)	59
I.4. Les oligonucléotides antisens	59
I.4.1. Principe et structures chimiques	59
I.4.2. Mécanismes	62
I.4.2.1. Généralités	62
I.4.2.2. La modulation de l'épissage.....	64
I.4.2.3. L'inhibition de la polyadénylation.....	66
I.4.3. Méthodes d'administration tissulaire et cellulaire	67
Partie II. Résultats & Discussion.....	71
II.1. Modulation des immunoglobulines sécrétées et membranaires par ASO	71
II.1.1. Résultats	72
II.1.1.1. Modulation de l'IgE-sécrétée par ASO	72
II.1.1.2. Modulation de l'IgA-membranaire par ASO	102
II.1.2. Discussion	105
II.2. Modulation de la commutation de classe des immunoglobulines par ASO	107
II.2.1. Résultats	108
II.2.2. Discussion	128
II.3. Inhibition de l'expression génique par saut d'exon	130
II.3.1. Résultats	132
II.3.2. Discussion.....	167

Conclusion et perspectives.....	169
Références bibliographiques	172
Annexes	191
Annexe 1. Brevet « Methods for modulating immunoglobulin expression ».....	192
Annexe 2. Article : Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells	232
Annexe 3. Brevet « Use of splice switching oligonucleotides for exon skipping-mediated knockdown of NF- κ B components in B cells ».....	243

Table des illustrations

Figure 1 Illustration de la structure d'un nucléosome et de ces mécanismes de régulation. .	16
Figure 2. Mécanisme d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II.	17
Figure 3. Mécanisme de la pause de la Pol II et sa libération durant la transcription	18
Figure 4. Activation de la transcription de la Pol II par une région enhancer via Mediator.....	19
Figure 5. Séquences consensus du 5'SS, BPS et 3'SS qui permettent la définition d'un intron	20
Figure 6. Le mécanisme d'épissage du pré-ARNm en ARNm mature par le spliceosome. ...	21
Figure 7. Mécanisme de l'épissage non canonique : le back-splicing.	22
Figure 8. Les épissages alternatifs de base et complexes.....	23
Figure 9. Régulation de l'épissage par les éléments régulateurs en « cis » et en « trans ». .	24
Figure 10. Les acteurs du clivage et de la polyadénylation de l'ARNm.	25
Figure 11. Les différents types de polyadénylation alternative (APA).	26
Figure 12. Transport de l'ARNm à travers le complexe de pore nucléaire (NPC).....	28
Figure 13. Mécanisme d'élongation de la traduction.	29
Figure 14. Mécanisme du « Nonsense-Mediated mRNA Decay ».	31
Figure 15. Illustration des mécanismes de Non-stop Decay (NSD) et No-Go decay (NGD)..	32
Figure 16. Structure d'une immunoglobuline.	33
Figure 17. Les gènes d'immunoglobulines <i>IGH</i> , <i>IGK</i> et <i>IGL</i> chez l'homme et la souris et leur régions régulatrices.	35
Figure 18. Les réarrangements des régions variables des gènes d'immunoglobulines <i>IGH</i> , <i>IGK</i> et <i>IGL</i> chez l'homme.	36
Figure 19. Les régions FR et CDR et la structure tridimensionnelle du domaine variable.	37
Figure 20. Mécanisme de recombinaison V(D)J par le complexe RAG.....	38
Figure 21. Remaniement chromatinien durant les réarrangements V(D)J.....	39
Figure 22. Exemple d'édition du BCR avec le gène <i>IGK</i> et sa régulation par « feedback ». .	40
Figure 23. Les différentes résolutions possibles d'un mésappariement G:U produit par AID.	41
Figure 24. Le recrutement d'AID au niveau de la région switch.	43
Figure 25. Les 3 étapes de la commutation de classe (CSR) vers IgA.	44
Figure 26. La résolution des DSB dans le CSR par le C-NHEJ et l'A-EJ.	45
Figure 27. Illustration du développement B et leurs marqueurs cellulaires et transcriptionnels.	47
Figure 28. Mécanismes de sélection des cellules pré-B et B durant les stades précoces du développement.....	48

Figure 29. Différentiation tardive des cellules B en cellules B mémoires et plasmocytes et leurs marqueurs transcriptionnels.....	49
Figure 30. Illustration d'un centre germinatif.....	50
Figure 31. Déroulement de la CSR puis de la SHM lors de la formation du GC selon Roco et al.....	51
Figure 32. Mécanisme général d'une allergie IgE-dépendante.....	53
Figure 33. Mécanisme d'une allergie alimentaire dépendante de l'IgE.....	54
Figure 34. Exemple de processus de tumorigénèse dans le lymphome folliculaire (FL).....	58
Figure 35. Les différentes structures chimiques des ASO.....	60
Figure 36. Les différents modes d'action des ASO en comparaison avec d'autres technologies de modulation de l'expression génique.....	63
Figure 37. Exemple de modulation de l'épissage par un SSO ciblant des séquences cis-régulatrices.....	64
Figure 38. Modulation du mRNA decay par un ASO.....	66
Figure 39. Modulation de la polyadénylation du gène <i>VEGFR2</i> par un ASO.....	67
Figure 40. Technologies d'administration des ASO.....	68
Figure 41. Illustration de la polyadénylation alternative des transcrits d'Ig.....	71
Figure 42. Modulation de la polyadénylation de l'ARNm codant pour l'IgE avec un ASO ciblant le PAS.....	72
Figure 43. Modulation de la polyadénylation de l'ARNm codant pour l'IgA avec un ASO ciblant le PAM.....	102
Figure 44. Le traitement ASO ciblant l'IgA-PAM diminue la production de l'IgA membranaire et sécrétée des lignées cellulaires AMO-1 et IgA#6.....	103
Figure 45. Inhibition de l'épissage des exons I à l'aide d'un ASO.....	107
Figure 46. Principe d'une inhibition de l'expression génique à l'aide d'un SSO.....	130

Abbréviations

AAV : « Adeno-Associated Virus » ou Virus Adéno-Associé

ABC : « Activated B Cell » ou Cellule B Activée

ABCE1 : « ATP-Binding Cassette sub-family E Member 1 » ou Membre 1 de la sous-famille E de la Cassette de Liaison à l'ATP

Ac : Anticorps

ACPA : « Anti-Citrullinated Proteins Antibodies » ou Anticorps Anti-Protéines Citrullinées

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

A-EJ : « Alternative End Joining » ou Jonction d'Extrémités Alternative

Ag : Antigène

AGM : Aorte-Gonades-Mésonéphros

AID : « Activation-Induced Deaminase » ou Désaminase Induite par l'Activation

AL : « Amyloid Light-chain » ou Chaîne légère Amyloïde

ALL : « Acute Lymphoblastic Leukaemia » ou Leucémie Lymphoblastique Aiguë

APA : « Alternative PolyAdenylation » ou PolyAdénylation Alternative

APC : « Antigen-Presenting Cell » ou Cellule Présentatrice d'Antigène

ARN(m) : Acide RiboNucléique (messenger)

ASO : « AntiSense Oligonucleotide » ou Oligonucléotide AntiSens

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

« **Back-Splicing** » : Retour d'épissage

BCR : « B-Cell Receptor » ou Récepteur de la Cellule B

BER : « Base Excision Repair » ou Réparation de Base Excisée

Bmem : Cellule B mémoire

BPS : « Branch Point Séquence » ou Séquence d'Attachement

BTK : « Bruton Tyrosine Kinase » ou Tyrosine Kinase de Bruton

CBC : « Cap-Binding Complex » ou Complexe relié à la Cap

CDR : « Complementarity Determining Region » ou Région Déterminant la Complémentarité

cEt-BNA : « Constrained Ethyl-Bloqued Nucleic Acid » ou Acide Nucléique Bloqué contraint par l'Ethyle

c-FMS : aussi connu sous le nom de CSF1R pour « Colony Stimulating Factor 1 Receptor » ou Récepteur du Facteur 1 Stimulant les Colonies

circRNA : « circular Ribonucleic Acid » ou Acide RiboNucléique circulaire

CLL : « Chronic Lymphocytic Leukaemia » ou Leucémie Lymphoïde Chronique

CLP : « Common Lymphoid Progenitor » ou Progéniteur Lymphoïde Commun

C-NHEJ : « Canonical Non Homologous End Joining » ou Jonction d'Extrémités Non Homologues Canonique

CPA : « Cleavage and PolyAdenylation complex » ou complexe de Clivage et de Poly-Adénylation

CPP : « Cell-Penetrating Peptide » ou Peptide de Pénétration Cellulaire

CPSF : « Cleavage and Polyadénylation specificity factor » ou Facteur de spécificité de Clivage et de Polyadénylation

CSTF : « Cleavage STimulation Factor » ou Facteur de Stimulation de Clivage

CSR : « Class-Switch Recombinaison » ou Commutation de Classe par Recombinaison

CTD : « C-Terminal Domain » ou Domaine C-Terminal

DC : « Dendritic Cell » ou Cellule Dendritique

DLBCL : « Diffuse Large B Cell Lymphoma » ou Lymphome Diffus à Grande Cellule B

DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne

DNA-PKcs : « DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit » ou sous-unité catalytique de Protéine Kinase dépendante de l'ADN

DSB : « Double Strand Break » ou Cassure Double Brin

DSE : « Downstream Sequence Element » ou Élément de Séquence en Aval

Eif1 : « E74-like factor 1 » ou Facteur 1 ressemblant à E74

EBV : « Epstein-Barr Virus » ou Virus d'Epstein-Barr

EC : « Elongation Complex » ou Complexe d'Elongation

EDC : « Exon Definition Complex » ou Complexe d'Exon Définition

EJC : « Exon Junction Complex » ou Complexe de Jonction d'Exon

ER : « Endoplasmic Reticulum » ou Reticulum Endoplasmique

ESE : « Exonic Splicing Enhancer » ou Activateur Exonique d'Epissage

ESS : « Exonic Splicing Silencer » ou Inhibiteur Exonique d'Epissage

FACT : « Facilitates Chromatin Transcription » ou Facilite la Transcription de la Chromatine

FDC : « Follicular Dendritic Cell » ou Cellule Dendritique Folliculaire

« **Feedback** » : Retour d'information

FL : « Follicular Lymphoma » ou Lymphome Folliculaire

FR : « Framework Region » ou Région Charnière

FSD-NMD : « Forced Splicing-Dependant Nonsense-Mediated mRNA decay » ou Dégradation d'ARNm Médié par le Nonsens Forcée par Epissage

GC : « Germinal Center » ou Centre Germinatif

GCB : « Germinal Center B cell » ou cellule B du Centre Germinatif

GLT : « GermLine Transcript » ou Transcrit Germinal

GTP : Guanidine Tri-Phosphate

HCDD : « Heavy Chain Deposition Disease » ou Maladie de Dépôt des Chaines Lourdes

hMT : « human MetalloThionein » ou MétalloThionéine humaine

hnRNP : « heterogenous nuclear RiboNucleoProtein » ou RiboNucléoProtéique nucléaire hétérogène

Ig : Immunoglobuline

IgG4-RD : « IgG4-Related Disease » ou Maladie Liée à l'IgG4

IL : InterLeukine

ISE : « Intronic Splicing Enhancer » ou Activateur Intronique d'Epissage

ISS : « Intronic Splicing Silencer » ou Inhibiteur Intronique d'Epissage

ITIM : « Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif » ou Immunorécepteur à Motif Inhibiteur à base de Tyrosine.

LCDD : « Light Chain Deposition Disease » ou Maladie de Dépôt des Chaines Légères

LDL : « Low Density Protein » ou Protéine de Faible Densité

LHCDD : « Light and Heavy Chain Deposition Disease » ou Maladie de Dépôt des Chaines Légères et Lourdes

LLPC : « Long-Lived Plasma Cell » ou Plasmocyte à Longue Durée de vie

LNA : « Locked Nucleic Acid » ou Acide Nucléique Verrouillé

lncRNA : « long non coding Ribonucleic Acid » ou long Acide RiboNucléique non codant

LNP : « Lipid NanoParticle » ou NanoParticule Lipide

LT : LeucoTriènes

MALT : « Mucosa-Associated Lymphoid Tissue » ou Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses

M-CSF : « Macrophage Colony-Stimulating Factor » ou Facteur Macrophagique de Stimulation des colonies

MCT1 : « MonoCarboxylate Transporter 1 » ou Transporteur MonoCarboxylate 1

Met-tRNA_i : « Methionyl-tRNA initiator » ou initiateur méthionyl-tRNA

MGRS : « Monoclonal Gammopathy of Renal Significance » ou Atteinte Rénale due à la Gammopathie Monoclonale

MIDD : « Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease » ou Maladie de Dépôt des Ig Monoclonales

miRNA : « micro Ribonucleic Acid » ou micro Acide RiboNucléique

MM : « Multiple Myeloma » ou Myélome Multiple

MMP : « Multipotent Myeloid Progenitor » ou Progéniteur Myéloïde Multipotent

MMR : « MisMatch Repair » ou Réparation de Mésappariement

MZB : « Marginal Zone B cell » ou cellule B de la Zone Marginale

m⁷G : 7-méthylguanosine

ncRNA : « non coding Ribonucleic Acid » ou Acide RiboNucléique non codant

NELF : « Negative ELongation Factor » ou Facteur Négatif de l'Elongation

NEXT : « Nuclear EXosome Targeting » ou Ciblage de l'EXosome nucléaire

NGD : « No-Go mRNA Decay » ou Dégradation d'ARNm Sans Démarrage

NHEJ : « Non Homologous End Joining » ou Jonction d'Extrémités Non Homologues

NHL : « Non-Hodgkin Lymphoma » ou Lymphome Non Hodgkinien

NMD : « Nonsense-Mediated mRNA decay » ou Dégradation d'ARNm Médié par le Nonsense

NPC : « Nuclear Pore Complex » ou Complexe de Pore Nucléaire

NSD : « Non-Stop mRNA Decay » ou Dégradation d'ARNm Sans Arrêt

NTC : « NineTeen Complex » ou Complexe Dix-Neuf

NTP : Nucléoside Tri-Phosphate

ODN : OligoDeoxyNucleotide

ORF : « Open Reading Frame » ou Cadre de Lecture Ouvert

PAB : « Poly-A Binding protein » ou protéine associée à la Poly-A

PAF : « Platelets Activating Factor » ou Facteur d'Activation des Plaquettes

PAF1 : « Polymerase Associated Factor 1 » ou Facteur 1 Associé à la Polymérase

PAP : Poly-A Polymérase

PAS : « PolyAdenylation Signal » ou Signal de PolyAdénylation

PAXT : « Poly-A tail eXosome Targeting » ou Ciblage de la queue Poly-A par l'eXosome

PEG : PolyEthylène Glycol

PG : ProstaGlandine

pHSC : « pluripotent Hematopoeitic Stem Cell » ou Cellule Souche Hématopoïétique Pluripotente

PIC : « Pre-Initiation Complex » ou Complexe de Pré-Initiation

PMBL : « Primary Mediastinal B-cell Lymphoma » ou Lymphome B primitif du médiastin

PMO : « Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer » ou Oligomère Morpholino Phosphorodiamidate

PN : Phosphorodiamidate

PO : Phosphodiester

PoI II : Polymérase II

PPMO : « Peptide Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer » ou Oligomère Morpholino Phosphorodiamidate Peptide

PROMPT : « PROMoter uPstream Transcript » ou transcrit à promoteur en amont

PS : Phosphorothioate

PST : « Post-Switch Transcript » ou Transcrit Post Switch

PTC : « Premature Termination Codon » ou Codon Stop Prématuré

P-TEFb : « Positive Transcription Elongation Factor b » ou Facteur d'Elongation de la Transcription Positif b

PYT : « Poly-Pyrimidine Tract » ou Région Riche en Pyrimidine

RA : « Rheumatoid Arthritis » ou polyarthrite Rhumatoïde

RE : Reticulum Endoplasmique

RNA : « RiboNucleic Acid » ou Acide RiboNucléique

RNAi : « RiboNucleic Acid interference » ou interférence à l'Acide RiboNucléique

RNP : RiboNucléoProtéine

rRNA : « ribosomal RiboNucleic Acid » ou Acide RiboNucléique ribosomal

RSS : « Recombinaison Signal Sequence » ou Séquence Signal de Recombinaison

SEC : « Super Elongation Complex » ou Complexe de Super Elongation

SEP : Sclérose en plaques

SHM : « Somatic HyperMutation » ou HyperMutation Somatique

shRNA : « small hairpin RiboNucleic Acid » ou petit Acide RiboNucléique en épingle

SLC : « Surrogate Light Chain » ou Substitut de Chaîne Légère

SLE : « Systemic Lupus Erythematosus » ou Lupus Erythémateux Systémique

SLPC : « Short-Lived Plasma Cell » ou Plasmocyte à Courte Durée de vie

SMA : « Spinal Muscular Atrophy » ou Amyotrophie Spinale

SNA : « Spherical nucleic acid » ou Acide Nucléique Sphérique

snRNA : « small nuclear RiboNucleic Acid » ou petit Acide RiboNucléique nucléaire

snRNP : « small nuclear RiboNucleoProtein » ou petite RiboNucléoProtéine nucléaire

snoRNA : « small nucleolar RiboNucleic Acid » ou petit Acide RiboNucléique nucléolaire

SRP : « Signal Recognition Protein » ou Particule Signal de Reconnaissance

SSO : « Splice-Switching Oligonucleotide » ou Oligonucléotide Modulant l'Épissage

TAF : « TATA-box Associated Factor » ou Facteur Associé à la TATA-box

TBP : « TATA-box Binding Protein » ou Protéine de Liaison à la TATA-box

Tfh : Lymphocyte T folliculaire « helper »

TNF : « Tumor Necrosis Factor » ou Facteur de Nécrose Tumorale

Treg : Lymphocyte T régulateur

tRNA : « transfert RiboNucleic Acid » ou Acide RiboNucléique de transfert

TSLP : « Thymic Stromal LymphoPoietin » ou LymphoPoïétine Stromale Thymique

TSS : « Transcription Start Site » ou Site de Départ de la Transcription

TTG : « Tissue TransGlutaminase » ou TransGlutaminase Tissulaire

UNG : « Uracile-DNA glycosylase » ou Glycosylase d'Uracile-ADN

USE : « Upstream Sequence Element » ou Élément de Séquence en Amont

UTR : « Untranslated Region » ou Région non Traduite

WM : « Waldenström Macroglobulinemia » ou Macroglobulinémie de Waldenström

3'SS : « 3' Splice Site » ou Site d'Epissage en 3' ou Site Accepteur d'Epissage

5'SS : « 5' Splice Site » ou Site d'Epissage en 5' ou Site Donneur d'Epissage

Partie I. Introduction

Le matériel génétique contenu dans les cellules, l'acide désoxyribonucléique (ADN) et son messenger, l'acide ribonucléique (ARNm) dirige le devenir même de nos cellules et le développement de notre corps. La régulation de leur expression détermine ainsi la fonction de chaque type cellulaire au plus tôt de notre existence puis au cours de la vie fournit l'adaptation cellulaire nécessaire à tout organisme vivant. Les cellules de notre système immunitaire n'échappent pas à cette règle et sont constamment en évolution pour s'adapter aux agressions extérieures (virus, bactéries, champignons, corps étranger) comme intérieures (cancers). Ainsi, le fonctionnement des lymphocytes B et des plasmocytes, clés de notre système immunitaire adaptatif, est finement régulé et en perpétuelle transformation afin de produire des anticorps efficaces et sûrs pour protéger l'organisme.

Toutefois, la régulation de ce matériel génétique n'est pas sans failles et des mutations peuvent survenir lors d'erreurs de réplication pendant la division cellulaire, plus ou moins fréquemment sous l'influence de facteurs environnementaux (radiations, substances cancérigènes, ...). Ces mutations surviennent en permanence et sont la plupart du temps contenues grâce à des systèmes d'autorégulation cellulaire tels que l'apoptose programmée. Certaines cellules peuvent pourtant échapper à ces systèmes en accumulant les mutations et deviennent des cellules cancéreuses capables de se diviser à l'infini et perdant peu à peu leurs spécificités tissulaires. Les cellules de la lignée des lymphocytes B peuvent ainsi donner naissance à de nombreux syndromes lymphoprolifératifs tels que le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL).

D'autres fois, c'est une mauvaise interprétation du système immunitaire vis-à-vis d'une substance sans danger pour l'organisme ou interne à l'organisme qui va provoquer une réaction immunitaire disproportionnée. C'est le cas des allergies et aussi de certaines maladies auto-immunes comme le lupus. La cause de ces différentes réactions en chaîne est pour l'heure mal connue mais la plupart ont pour résultat la production excessive d'anticorps contre ces substances par les plasmocytes et les lymphocytes B.

Dans cette thèse, nous allons explorer un mécanisme fondamental à l'origine de la production d'anticorps, la commutation de classe, ainsi que différentes pistes de traitements pour les syndromes lymphoprolifératifs et maladies liées à la cellule B. Toutes ces explorations sont réalisées à l'aide d'une technologie de régulation des ARNm : les oligonucléotides antisens, dont nous utilisons plusieurs modes d'action que nous détaillerons plus loin.

I.1. De l'ADN à la protéine

I.1.1. La transcription

La transcription permet de transformer les informations contenues dans l'ADN, situé dans le noyau, en ARNm. Cette transcription est réalisée par une enzyme : l'ARN polymérase II (Pol II), mais il existe également d'autres transcriptions réalisées par d'autres ARN polymérases : l'ARN polymérase I qui synthétise les ARN ribosomiaux (rRNA) et l'ARN polymérase III qui synthétise les ARN de transfert (tRNA) et les petits ARN nucléolaires (snoRNA) (1). La première étape de la transcription est la reconnaissance et l'attachement de l'ARN polymérase II (Pol II) à la région promotrice d'un gène sur l'ADN. Selon le type cellulaire et le gène en question, cette région n'est pas forcément disponible si l'ADN est condensé via les nucléosomes sous forme de chromatine dense ou hétérochromatine. Les nucléosomes sont donc des éléments essentiels de régulation de la transcription en contrôlant l'accès des promoteurs à la Pol II. Les nucléosomes sont formés via un complexe de protéines, les histones, autour duquel l'ADN s'entoure, acquérant ainsi sa forme condensée. Il existe 4 types d'histones formant le nucléosome : l'histone H2a, H2b, H3 et H4 qui s'assemblent en un complexe octamérique $(H3-H4)_2(H2A-H2B)_2$ et une histone de liaison H1 qui se lie à l'ADN en dehors des nucléosomes et stabilise les structures chromatiniennes complexes (2,3). Chaque histone possède plusieurs variants, partageant une homologie de séquence avec leur histone canonique, par exemple H2a.Z (4). Ces histones peuvent également subir des modifications post-traductionnelles comme des méthylations ou acétylation, faisant ainsi varier finement l'accessibilité de la chromatine (2) (Figure 1). Les marques chromatiniennes entourant la région promotrice, comme la triméthylation de H3K4 ($H3K4me3$) sont des marqueurs de promoteurs actifs tandis que d'autres marques comme $H3K27me3$ sont des marqueurs de répression d'expression génique (5).

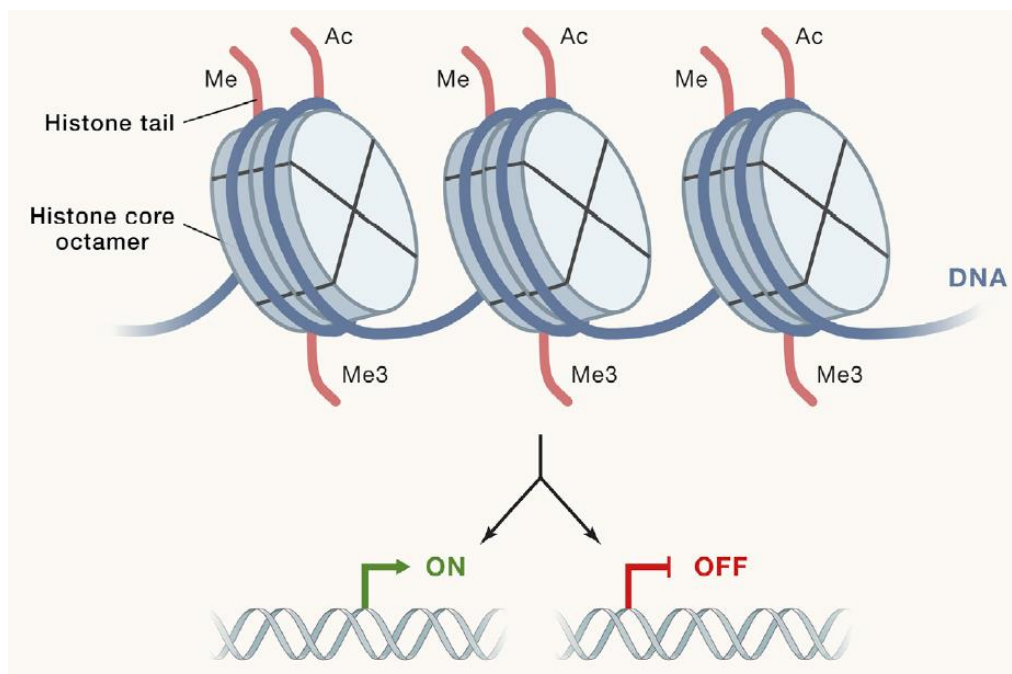
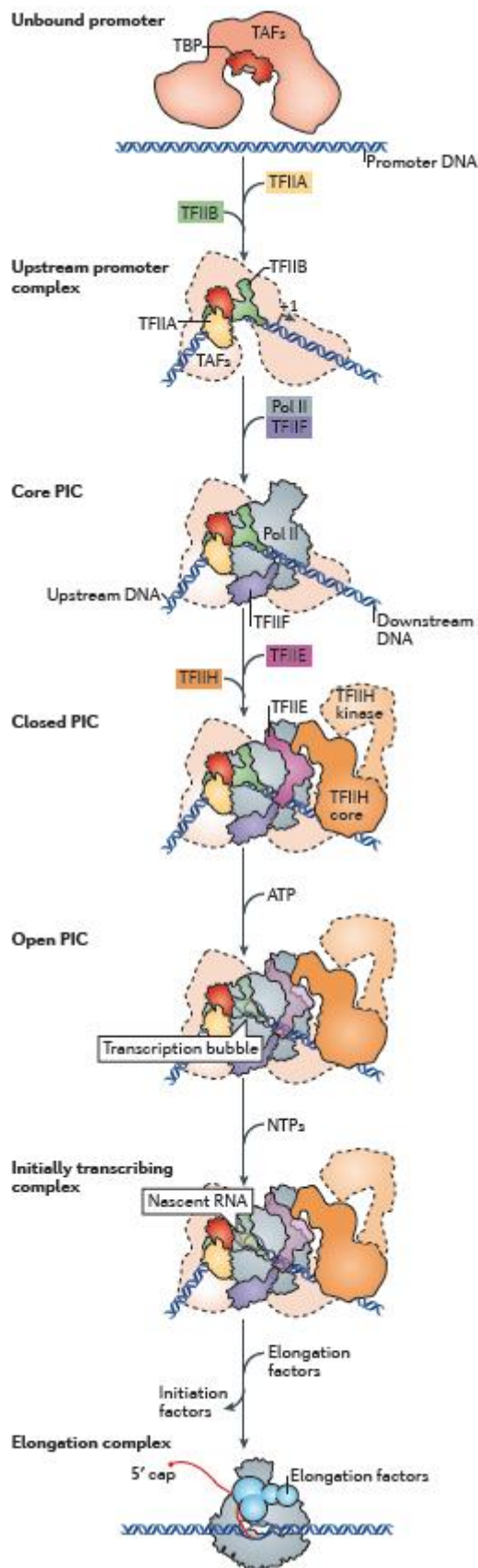


Figure 1 Illustration de la structure d'un nucléosome et de ces mécanismes de régulation.

Le nucléosome est constitué d'un octamère d'histones $(H3-H4)_2(H2A-H2B)_2$ entouré d'ADN et peut être régulé via l'acétylation (Ac), la méthylation (Me), la diméthylation (Me2) et la triméthylation (Me3) des histones dictant l'activation ou la répression de l'expression d'un gène. Adapté de Stillman et al Cell 2018 (2).



Il existe deux types de promoteurs chez l'homme. Le premier type de promoteur possède une séquence appelée « TATA box » riche en thymine et adénosine de consensus TATAWAWR (avec W=A ou T et R=A ou G). La Pol II reconnaît ce motif et initie la transcription. Ce type de promoteur est souvent retrouvé pour les gènes spécifiquement régulés au cours de la différenciation cellulaire (6). Le deuxième type de promoteur concerne surtout les gènes dit « de ménage » constitutivement actifs où les régions promotrices contiennent des îlots CpG qui empêchent la fixation des nucléosomes et permettent l'initiation de la transcription. Ces régions promotrices peuvent toutefois être régulées via la méthylation des cytosines de l'ADN. Ainsi, si l'ADN est suffisamment méthylé l'expression du gène sera réduite car la Pol II reconnaîtra moins facilement la séquence promotrice (7).

La première étape de la transcription consiste en la fixation de différents facteurs de transcription TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH et de la Pol II au niveau du promoteur pour former le complexe de pré-initiation ou PIC. Le TFIID possède notamment des protéines de liaison à la TATA box (ou TATA-like) les TBP ainsi que des facteurs associés à ces protéines appelés TAF qui sont dépendants de chaque promoteur. Le TFIID va être le premier à se fixer sur le promoteur, suivi par les autres facteurs et la Pol II. Le promoteur étant situé environ 30pb en amont du site de départ de la transcription ou TSS, le PIC va ouvrir l'ADN à ce niveau pour commencer la transcription grâce à l'hélicase TFIIH en utilisant de l'adénosine triphosphate (ATP). La boucle de transcription étant formée, la Pol II peut ainsi accéder au brin non codant de l'ADN et commencer la polymérisation de l'ARN pré-messager en présence de nucléosides triphosphates (NTP). (Figure 2) (8)

Figure 2. Mécanisme d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II.

La Pol II vient fixer le promoteur du gène avec les facteurs de transcription pour former le PIC. Ce PIC provoque l'ouverture de la boucle de transcription grâce à l'hélicase TFIIH et initie la transcription. Adapté de Sainsbury et al, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2015 (7).

Le début de la phase d'élongation est initié par la phosphorylation de Ser5 et Ser7 au niveau du domaine C-terminal (CTD) de la Pol II par la kinase Cdk7 du TFIIH ce qui provoque la propulsion de la Pol II hors du promoteur (9). Une fois la Pol II propulsée en direction 3' du gène, les facteurs du PIC vont se dissocier et être rapidement remplacés par des facteurs d'élongation de la transcription : Spt4/Spt5, Elf1 (« E74-like factor 1 ») et TFIIIS, formant le complexe d'élongation (EC). L'EC va ainsi former un tunnel autour de l'ADN constitué de Elf1 à l'entrée et de Spt4/Spt5 pour la sortie, encadrant la Pol II (10).

Au bout d'une trentaine de nucléotides transcrits la Pol II va s'arrêter, c'est l'étape de pause de la Pol II qui permet le remplacement des facteurs d'initiation de la transcription par les facteurs d'élongation de la transcription. Cette pause est initiée par DSIF (domaine de Spt5) et surtout le facteur d'élongation négatif (NELF) qui va bloquer le site catalytique de la Pol II ainsi qu'empêcher la fixation de TFIIIS. La Pol II est ensuite libérée par l'action de la kinase Cdk9 du facteur d'élongation positif de la transcription b (P-TEFb). P-TEFb est recruté par les facteurs de transcriptions généraux, les co-activateurs et Mediator, dont le rôle est expliqué ci-dessous, et va phosphoryler de nombreux éléments dont NELF, DSIF et le CTD de la Pol II au niveau de Ser2. C'est la phosphorylation de DSIF qui a le rôle le plus important dans la libération de la Pol II via la dissociation de NELF du site catalytique de cette dernière. Par la suite, afin de faciliter l'élongation, de nombreux facteurs d'élongation sont recrutés afin de surmonter les obstacles que sont les nucléosomes et d'éviter de nouvelles pauses de la Pol II : le facteur 1 associé à la polymérase (PAF1), le complexe facilitant la transcription de la chromatine (FACT) et Spt6. Ce mécanisme de pause de la Pol II fait partie des mécanismes de régulation de l'expression génique durant la transcription. (Figure 3) (11,12)

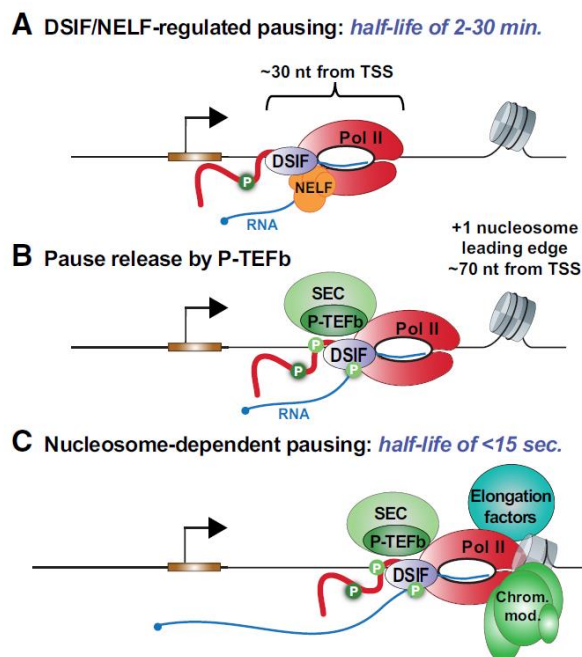


Figure 3. Mécanisme de la pause de la Pol II et sa libération durant la transcription

A. La pause de la Pol II est initiée par DSIF (un domaine de Spt4/Spt5) et par NELF qui vient bloquer le site catalytique de la Pol II après incorporation d'environ 30nt durant la phase précoce d'élongation. **B.** L'élongation va reprendre grâce à l'intervention de P-TEFb (qui fait partie du complexe de super-élongation ou SEC) qui libère NELF de la Pol II. **C.** Des facteurs d'élongation supplémentaires sont alors recrutés afin de faciliter la modulation de la chromatine durant l'élongation. Adapté de Core et Adelman Genes & Development 2019 (11).

Il existe également d'autres éléments éloignés du gène lui-même qui influent sur la transcription, ce sont les régions dites activatrices ou « enhancers ». Ces régions sont capables de se fixer à des facteurs de transcription en même temps que le promoteur et participer à la régulation de la transcription. Les « enhancers » sont situés parfois très loin du gène ciblé sur le génome de 1 000kb ou plus mais vont spatialement se rapprocher au niveau chromatinien. Par exemple, le super-enhancer 3'RR (région régulatrice en 3') du locus *IGH* est séparé de 200kb du gène constant IgM (13). En effet, les activateurs de la transcription liés aux « enhancers » vont activer indirectement le PIC lié au promoteur d'un gène grâce au médiateur de la transcription de la Pol II ou « Mediator ». Le Mediator est un complexe multiprotéique constitué de 30 sous-unités chez l'homme qui va être recruté par les activateurs de la transcription liés aux régions « enhancers » et va créer un pont entre ces activateurs et la PIC afin d'initier la transcription. Le Mediator a ainsi plusieurs rôles durant la transcription puisqu'il aide à l'assemblage du PIC mais aussi promeut la phase d'élongation en facilitant la phosphorylation de la CTD de la Pol II (Figure 4) (12,14).

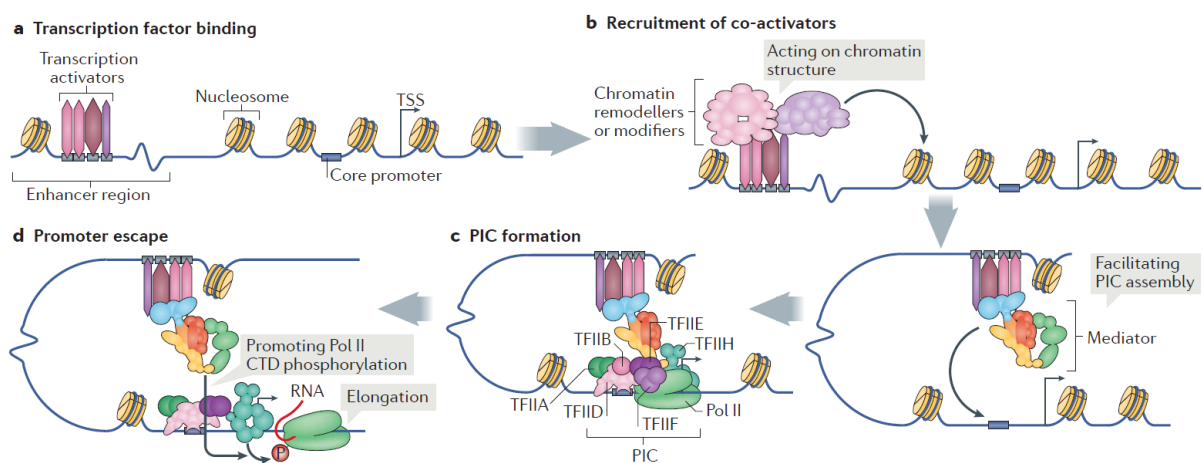


Figure 4. Activation de la transcription de la Pol II par une région enhancer via Mediator.

Les facteurs activateurs de la transcription se lient sur la région enhancer et suite à un remaniement chromatinien, vont recruter le complexe Mediator. Mediator va ainsi pouvoir faciliter l'assemblage du PIC au niveau du promoteur et puis aider à la phosphorylation du CTD de la Pol II afin d'aider à l'initiation de la transcription. Adapté de Soutourina et al Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 (14).

La transcription s'achève lorsque la Pol II atteint la fin du gène marqué par le site de clivage et polyadénylation ou PAS, c'est l'étape de terminaison. En effet, le complexe de clivage et de polyadénylation (CPA) va se former rapidement sous l'influence de la perte d'activité de CDK9 au niveau du PAS et la Pol II va se mettre en pause. Cette pause est provoquée par un changement de conformation ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la Ser2 sur son CTD. Ces changements vont permettre le clivage du transcrit puis la terminaison par les exoribonucléases Xrn2/Rat1 « torpedo » de 5' vers 3' recrutées par le CPA. Lorsque les exoribonucléases atteignent la Pol II, elles provoquent son détachement de l'ADN. (15,16)

En supplément de l'ARNm codant, la transcription permet également la synthèse d'ARN non codants ou ncRNA qui représentent environ 60% des ARNs transcrits chez l'homme. Parmi ces ncRNA, on retrouve les tRNA et les rRNA qui ont un rôle dans la traduction, les snRNA impliqués dans l'épissage et les snoRNA qui aident à la modification des rRNA dont le rôle est connu depuis longtemps. Cependant, le rôle d'autres ncRNA n'a été découvert que récemment dont les ARN introniques, les longs ARN non codants (lncRNA), les micro-ARN (miRNA), les

ARN circulaire (circRNA) ou encore les ARN extracellulaires qui peuvent être transcrits à l'envers de 3' vers 5' ou au sein même des introns d'un gène codant. Ces ncRNA ont un rôle important dans la régulation de l'expression des ARN codants en remodelant la chromatine, agissant sur la transcription ou les modifications post-transcriptionnelles d'un ARNm ou en étant acteur de la transduction d'un signal. Les miRNA sont des ncRNA très conservés dans l'évolution et peuvent se lier à plusieurs ARNm dont la fonction est associée, permettant ainsi la formation d'un réseau de régulation. Les miRNA ont aussi une fonction régulatrice des lncRNA et des circRNA en influençant leur stabilité et, en retour, ces derniers ont un rôle dans la régulation des miRNA en les rendant plus ou moins disponible selon leur degré de séquestration. Au vu de leur impact sur l'expression génique, la dérégulation de certains ncRNA est retrouvée dans de nombreux cancers. (17)

I.1.2. L'épissage

Au cours de la transcription, la Pol II génère un ARN pré-messager, copie conforme de l'ADN contenant des exons et des introns. Afin de former un ARNm mature, les introns de la séquence du pré-messager ont besoin d'être supprimés durant l'étape d'épissage. L'épissage se déroule pendant la transcription, dit co-transcriptionnel (18). Les introns devant être distingués des exons avant cette étape, il existe un marquage contenu dans le génome qui permet de les distinguer. Ainsi, un intron est précédé d'un site donneur d'épissage en 5' ou 5'SS, puis on trouve en son sein une séquence d'attachement ou BPS suivie d'une région riche en pyrimidines ou PYT et enfin l'intron est terminé par un site accepteur d'épissage en 3' ou 3'SS. Ces séquences possèdent des nucléotides consensus, notamment GT pour le 5'SS, A pour le BPS et AG pour le 3'SS (Figure 5). (19)

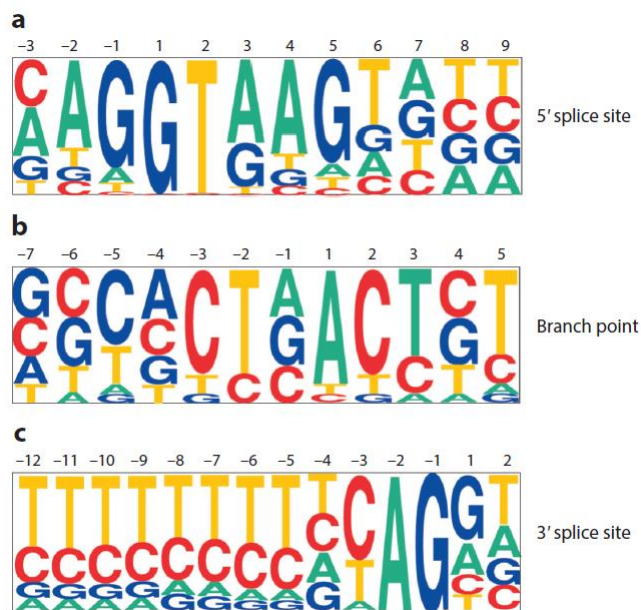


Figure 5. Séquences consensus du 5'SS, BPS et 3'SS qui permettent la définition d'un intron

Les séquences consensus sont illustrées avec des nucléotides plus ou moins grands selon leur pourcentage de répartition et selon leur position. **a.** Séquence consensus du 5'SS **b.** Séquence consensus du BPS **c.** Séquence consensus du 3'SS. Adapté de Lee et Rio Annu Rev Biochem. 2015 (19)

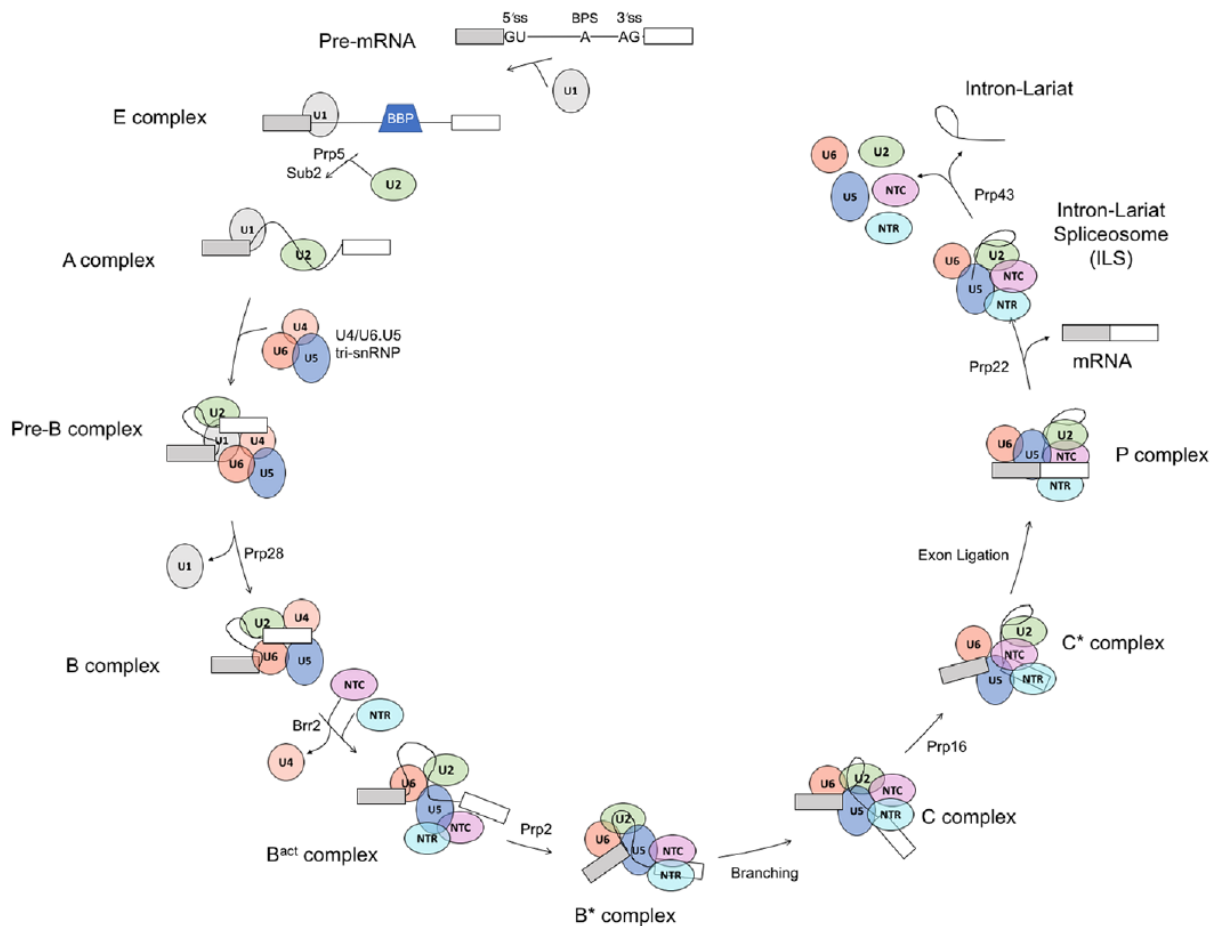


Figure 6. Le mécanisme d'épissage du pré-ARNm en ARNm mature par le spliceosome.

Les snRNPs U1, U2, U4, U5 et U6 vont successivement s'accrocher sur le pré-ARNm nouvellement synthétisé afin de former un complexe dynamique appelé spliceosome. A l'aide de nombreuses hélicases et deux réactions successives de transestérification, les deux exons vont être reliés et séparés de leur intron qui prendra alors une forme de lasso (ou lariat). Adapté de Zhang et al WIRE RNAs 2019 (20).

L'épissage est réalisé à l'aide d'un complexe ARN-protéique dynamique appelé spliceosome, formé de 5 sous unités de petits ARN nucléaires (snRNA) : U1, U2, U4, U5 et U6. Chacun de ces snRNAs forment un complexe avec leur protéine associée ou snRNPs (20). La première étape de ce long mécanisme est la formation du complexe d'exon définition (EDC ou complexe E), où U1 et SF1 viennent se fixer respectivement sur le 5'SS et le BPS puis des protéines SR viennent former un réseau entre les deux snRNPs (21). Suivant l'exon définition, U2 va venir remplacer SF1 guidé par les hélicases Prp5 et Sub1, formant le complexe A. Le spliceosome va alors évoluer avec l'apport de la tri-snRNP U4/U6.U5 pour former le complexe pré-B, qui va rapidement évoluer en Complexe B avec le détachement de U1 par l'hélicase Prp28. Une autre hélicase, Brr2 vient décomplexer la snRNP U4 de U6.U5, ce qui va provoquer l'action du « NineTeen Complex » ou NTC et son complexe associé le NTR pour stabiliser le spliceosome, au stade B activé. Mais c'est l'hélicase Prp2 qui va rendre le site catalytique du spliceosome véritablement actif, on dit alors le complexe B*. La première réaction catalytique de transestérification du spliceosome a alors lieu permettant de libérer le 5'SS et de former un lasso avec l'intron dont l'extrémité vient alors se brancher sur le BPS, formant le complexe C. Sous l'action de l'hélicase Prp16, le spliceosome va de nouveau se réarranger pour former le

complexe C*, provoquant une deuxième réaction de transestérification qui va relier les deux exons. Le nouveau complexe P, contenant le lasso d'intron, va ensuite être séparé des exons sous l'action de l'hélicase Prp2, achevant l'épissage. Les snRNPs liées au lasso d'intron seront décomplexées par l'hélicase Prp43 afin de pouvoir former un nouveau spliceosome. (Figure 6) (20)

La réaction d'épissage par le spliceosome passe par une première étape de définition des éléments clés de l'épissage (3'SS, 5'SS et BPS) en formant un réseau de protéines entre ces derniers. Chez les vertébrés la majorité des gènes sont constitués de petits exons et de grands introns donc l'exon-définition est plus fréquente au contraire des autres organismes qui utilisent plutôt l'intron-définition car leurs introns sont plus petits que les exons. Lors d'une exon définition, un passage vers l'intron-définition lors de la phase du complexe pré-B par basculement de la tri-snRNP est nécessaire pour effectuer un épissage canonique mais dans certains cas ce passage peut être déficient donnant naissance à un épissage non canonique. En effet, il existe un deuxième mécanisme d'épissage non canonique appelé retour d'épissage ou « back-splicing » qui génère des ARN circulaires (circRNA). Son mécanisme reste identique à l'épissage canonique puisqu'il passe par les deux réactions de transestérifications qui vont successivement brancher l'intron puis lier les 2 exons. La différence réside ici dans l'utilisation du BPS sur l'intron en amont du 5'SS et non en aval qui a lieu lors du non basculement de la tri-snRNP durant l'épissage, ce qui empêche le passage d'une exon définition à une intron définition et change de ce fait le 5'SS utilisé. Dans le cas d'un back-splicing on va donc obtenir d'un côté un ARN en « T » en formé des 2 introns entourant l'exon et de l'autre un circRNA formé de l'exon (Figure 7). Ce mécanisme semble survenir plus fréquemment lorsque l'exon est grand et que la distance entre le BPS et le 5'SS lors de l'exon-définition permet à la tri-snRNP de former un complexe pré-B stable, ce qui n'est pas le cas lors de l'épissage canonique où ce complexe pré-B est instable provoquant la bascule de la tri-snRNP et le passage à l'intron-définition. Dans ce contexte, le spliceosome entame sa réaction sans jamais passer par une intron définition et réalise un back-splicing. (22)

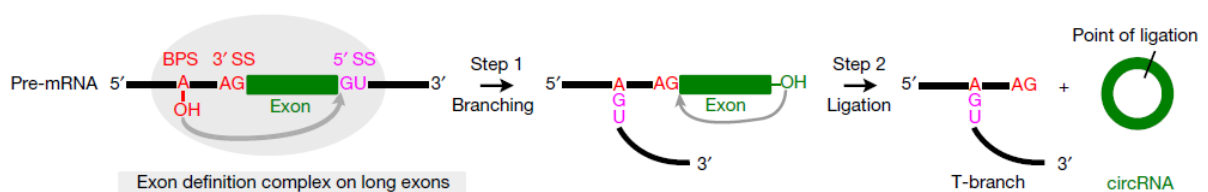


Figure 7. Mécanisme de l'épissage non canonique : le back-splicing.

Le mécanisme du back-splicing est en tout point identique à celui de l'épissage canonique cependant il va utiliser, dans le cas des longs exons, le BPS en amont du 5'SS et non en aval. Les deux produits résultants des deux réactions de transestérification seront un ARN en T formé des deux introns qui encadreraient l'exon et un circRNA formé de l'exon épissé. Adapté de Li et al Nature 2019 (22).

La longueur moyenne d'un exon pouvant former un circRNA via le back-splicing a été calculée de 620pb contre 120pb en moyenne dans les cellules humaines, ce qui explique la faible production des circRNA (23,24). De même, certains motifs sur le pré-ARNm comme des séquences introniques complémentaires ou des protéines liées à l'ARN pourraient influencer la production de circRNA déjà caractérisés contenant plusieurs exons via le mécanisme de back-splicing. Le rôle de ces circRNA est encore mal connu mais des études ont montré qu'ils pourraient jouer un rôle dans la séquestration de miRNAs ou de protéines, dans la régulation de l'épissage ou encore dans la production de peptide par leur traduction (25,26).

L'épissage est une étape très importante pour la cellule car elle permet de produire bien plus d'ARN codants que ne le permet le génome grâce à un mécanisme d'épissage alternatif. Ainsi à partir d'un même ARN pré-messager, plusieurs ARNm matures peuvent être générés selon la lecture qu'en fera le spliceosome (27). L'épissage alternatif permet au génome humain qui ne possède qu'environ 20 000 gènes de produire jusqu'à dix fois ce nombre en protéines différentes (28,29) et concerne 95% des gènes humains possédant plus d'un exon (30).

L'épissage alternatif a lieu lorsque le spliceosome utilise un 5'SS ou 3'SS non canonique appelés sites cryptiques d'épissage à la place des sites d'épissage canoniques, générant un transcrit d'ARNm alternatif. Il existe différents types d'épissages alternatifs de base : le saut d'exon, le 5'SS et le 3'SS alternatif, les exons mutuellement exclusifs, l'intron rétention et l'utilisation alternative du premier ou dernier exon. Mais certains épissages alternatifs sont plus complexes et font intervenir plusieurs mécanismes en même temps dont quelques exemples sont illustrés ci-dessous. (Figure 8) (31)

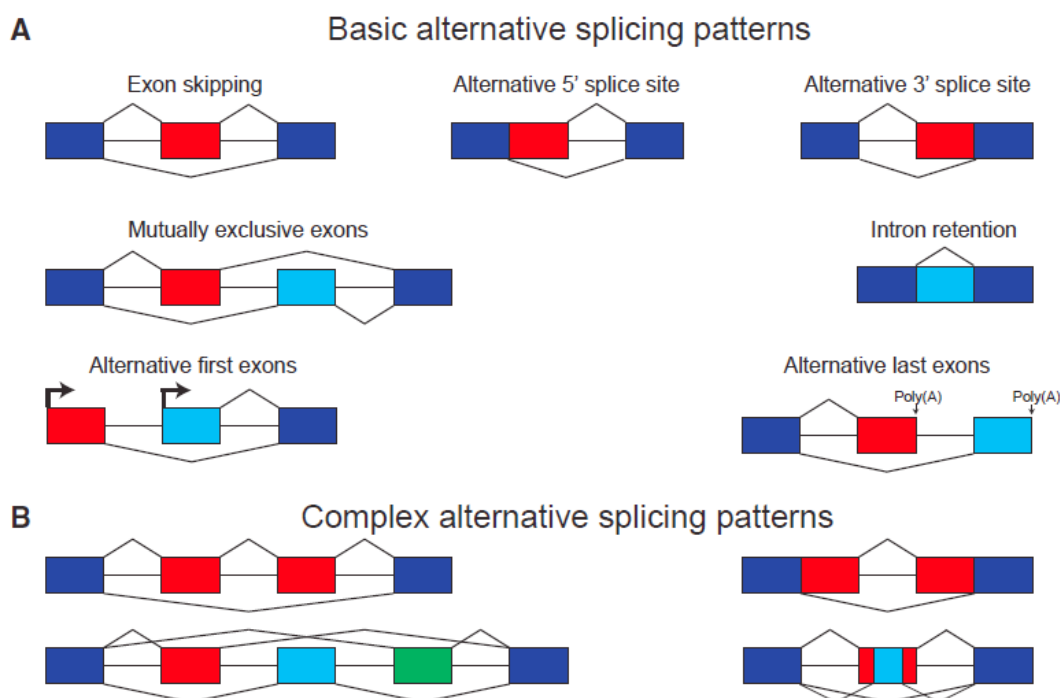


Figure 8. Les épissages alternatifs de base et complexes.

A. Illustration des épissages alternatifs de base : le saut d'exon, le 5'SS et le 3'SS alternatif, les exons mutuellement exclusifs et le dernier (ou premier) exon alternatif. **B.** Illustration d'exemples d'épissages alternatifs complexes, dont un double saut d'exon, un double 5'SS et 3'SS alternatif, 3 exons mutuellement exclusifs et l'utilisation d'un pseudo-exon dans un intron. Le mécanisme d'épissage canonique est illustré au-dessus du gène tandis que le mécanisme alternatif est en dessous. Les parties en rouge, bleu clair et vert sont différenciellement épissées. Adapté de Park et al Am J Hum Genet. 2018 (31).

L'épissage alternatif est régulé de manière différente selon le type cellulaire et son stade de développement par des séquences intrinsèques à l'ARN appelés les régulateurs « cis » et des protéines venant se fixer à ces éléments appelés régulateurs « trans » (27). Parmi ces régulateurs « cis » on retrouve les séquences 3'SS, 5'SS et le BPS sur lesquelles viennent se fixer les différents acteurs du spliceosome mais on trouve également d'autres types de

régulateurs, les séquences activatrices et inhibitrices d'épissage dans les exons : ESE et ESS et dans les introns : ISE et ISS. Ces derniers types de régulateurs en « cis » agissent en recrutant des facteurs régulateurs « trans » telles que les protéines de liaison à l'ARN, les RBP. Par exemple, les RBP se liant aux ESE sont principalement des protéines SR et celles se liant aux ESS sont principalement des protéines hnRNPs qui vont agir respectivement en activant et en inhibant l'épissage le plus souvent. (Figure 9) (31)

Au vu de l'extrême diversité du transcriptome et ses nombreux éléments régulateurs, il est aisé d'imaginer qu'une simple mutation puisse avoir de grands retentissements sur le fonctionnement de l'épissage et puisse causer à terme des maladies. Ainsi une perturbation de l'épissage est fréquemment retrouvée dans de nombreux cancers, certaines maladies neurodégénératives et des maladies génétiques comme les dystrophies musculaires (32,33). Ces anomalies de l'épissage sont, dans le cas du cancer, une aubaine pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques car elles peuvent être à l'origine de protéines inédites pouvant être reconnues par le système immunitaire : les néoantigènes (34), et offrent aussi l'opportunité de corriger les anomalies d'épissages à l'origine de transcrits oncogéniques en développant de nouveaux traitements (35).

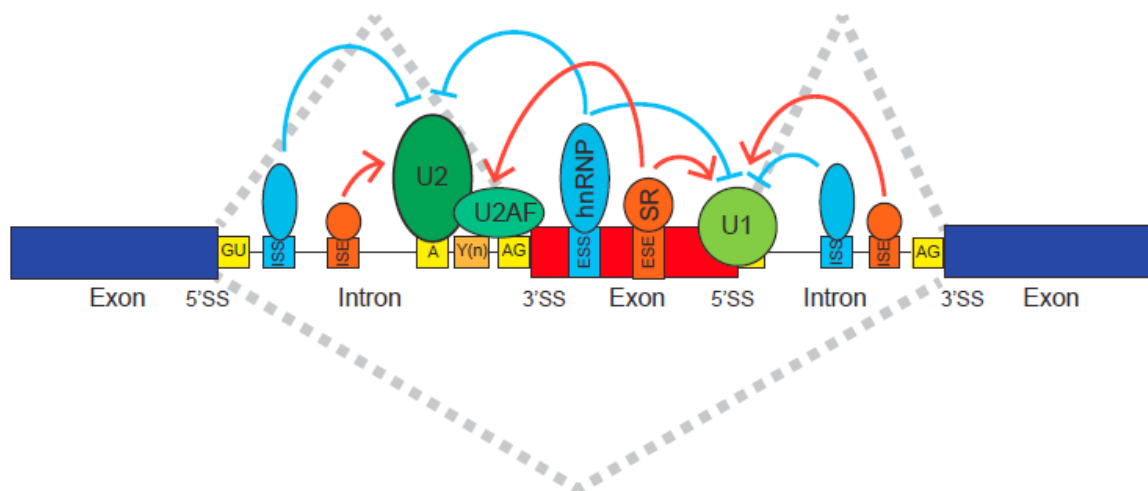


Figure 9. Régulation de l'épissage par les éléments régulateurs en « cis » et en « trans ».

Les séquences régulatrices en « cis » que sont le 5'SS et le BPS recrutent les sous-unités U1 et U2 du spliceosome. Cependant la fixation de ses éléments est aussi régulée par des protéines régulatrices en « trans » comme les RBPs qui sont recrutées par d'autres séquences régulatrices en « cis », les ESE et ESS dans l'exon et les ISE et ISS dans l'intron. Les séquences ESE et ISE sont dites activatrices d'épissage (en orange) et les ESS et ISS sont dites inhibitrices d'épissage (en bleu clair). Adapté de Park et al Am J Hum Genet. 2018 (31)

I.1.3. Polyadénylation

A la fin de la transcription, l'ARNm est clivé en 3' et une série d'adénosines sont ajoutées à la fin du transcrit formant la queue poly(A) afin de stabiliser le transcrit et d'empêcher sa dégradation. Ce mécanisme appelé polyadénylation est effectué grâce à des éléments en cis, le PAS (Signal de clivage et polyadénylation) de séquence consensus AAUAAA ou des variants proches comme AAGAAA ou AUUAAA, et des régions l'entourant comme une région riche en U (UGUA) en amont ou USE et une région riche en U puis en GU en aval ou DSE qui aident à la reconnaissance du PAS. Le clivage et la polyadénylation est réalisé par le CPA, lui-même composé de 4 complexes protéiques : le facteur de spécificité de clivage et

polyadénylation (CPSF), le facteur de stimulation du clivage (CSTF), le facteur de clivage I (CFI) et II (CFII) mais également de protéines comme la Pol II, la poly(A) Polymérase (PAP), le Simplekin et la protéine RBBP6. Le complexe de clivage et de polyadénylation (CPA) va s'associer aux éléments cis via le facteur de spécificité de clivage et polyadénylation (CPSF) qui reconnaît le signal de polyadénylation (PAS), le facteur de clivage I (CFI) qui reconnaît la région USE et le facteur de stimulation du clivage (CSTF) qui reconnaît la région DSE. Le clivage de l'ARNm est réalisé pendant la transcription environ 20 nucléotides en aval du PAS puis la Poly(A) Polymérase synthétise la queue poly(A), rapidement complexée avec les protéines liées à la poly(A) (PAB). (Figure 10) (36,37)

L'expression de l'IgE membranaire par les cellules, très peu fréquente in vivo, est entravée par un signal PAS non canonique de séquence AGUAAA. Cette régulation naturelle a sans doute pour rôle de limiter la production de B mémoire IgE afin d'empêcher la production d'IgE pathologiques sur le long terme (38). Une étude de Laffleur et collègues a en effet montré que l'expression de l'IgE membranaire chez la cellule B provoquait soit son apoptose soit sa différenciation en plasmocyte de courte durée de vie (39).

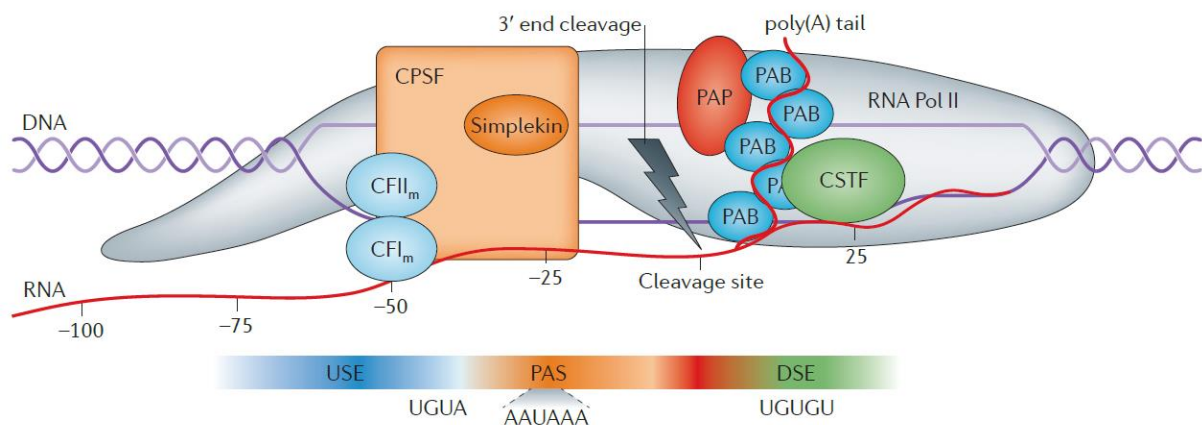


Figure 10. Les acteurs du clivage et de la polyadénylation de l'ARNm.

Pendant la transcription, des éléments régulatoires en cis comme le PAS, DSE et USE sont reconnus respectivement par les facteurs régulateurs en trans : le facteur de spécificité de clivage et polyadénylation (CPSF), le facteur de clivage I (CFI) et le facteur de stimulation du clivage (CSTF). Ensemble, ils aident à définir le site de clivage de l'ARNm, généralement de 10 à 30 nucléotides en aval du PAS. Dès que l'ARNm est clivé, la PAP synthétise la queue poly(A) qui va rapidement se complexer avec les protéines liées à la poly(A) (PAB) pour stabiliser le transcrit et le protéger de la dégradation. D'après Elkon et al Nat Rev Genet. 2013 (37).

Les queues poly(A) ont une taille variable d'en moyenne de 50 à 100 nucléotides et sont étroitement régulées, notamment par les PAB. Ainsi, les queues poly(A) courtes sont souvent rattachées à des gènes fortement exprimés et traduits, et les queues poly(A) longues à des gènes faiblement transcrits et traduits. Cette observation contrintuitive s'explique par le fait qu'une queue poly(A) courte sera mieux stabilisée par les PAB dans le cytoplasme, les protégeant de la dégradation. Ces dernières ont également un rôle dans la traduction puisqu'elles favorisent une traduction rapide. (40)

La polyadénylation n'a pas forcément lieu en un endroit unique sur un gène. En effet, de nombreux gènes possèdent plusieurs sites de polyadénylation et peuvent générer des transcrits différents, c'est ce qu'on appelle la polyadénylation alternative ou APA. Il existe plusieurs types d'APA, comprenant des APAs faisant apparaître un ou plusieurs exons dans le transcrite (dernier exon alternatif) ou au contraire en raccourcissant la séquence codante (APA interne à un exon), en ajoutant une partie de séquence codante (APA intronique) ou en faisant varier uniquement la longueur de la séquence 3'-UTR (APA en tandem de la 3'UTR). (Figure 11) (37)

L'APA a un rôle important dans la spécificité tissulaire, la différenciation et la prolifération cellulaire tout comme l'épissage alternatif. Les PAS alternatifs sont le plus souvent trouvés en 3' d'un PAS canonique AAUAAA et ont une séquence PAS variante, moins efficace pour diriger le CPA. En règle générale, ce sont les cellules en prolifération qui utilisent les PAS proximaux tandis qu'une cellule qui ne prolifère pas va privilégier les PAS distaux. L'APA est régulée par divers éléments en cis dont la séquence du PAS et la définition de ses régions associées USE et DSE, mais aussi en trans via les RBPs ou les miRNAs et les lncRNAs qui peuvent venir masquer les séquences cis nécessaires à la reconnaissance par le CPA ou au contraire aider à son recrutement. Les réactions de clivage et de polyadénylation étant parfois en compétition avec les réactions d'épissage, ces dernières peuvent aussi indirectement contrôler l'APA. Le promoteur du gène ou encore la densité des nucléosomes autour des PAS pourraient eux aussi jouer un rôle. Ainsi, des mutations sur ces éléments peuvent conduire à de nombreuses maladies comme le cancer et certaines maladies hématologiques, immunologiques et neurologiques (41,42).

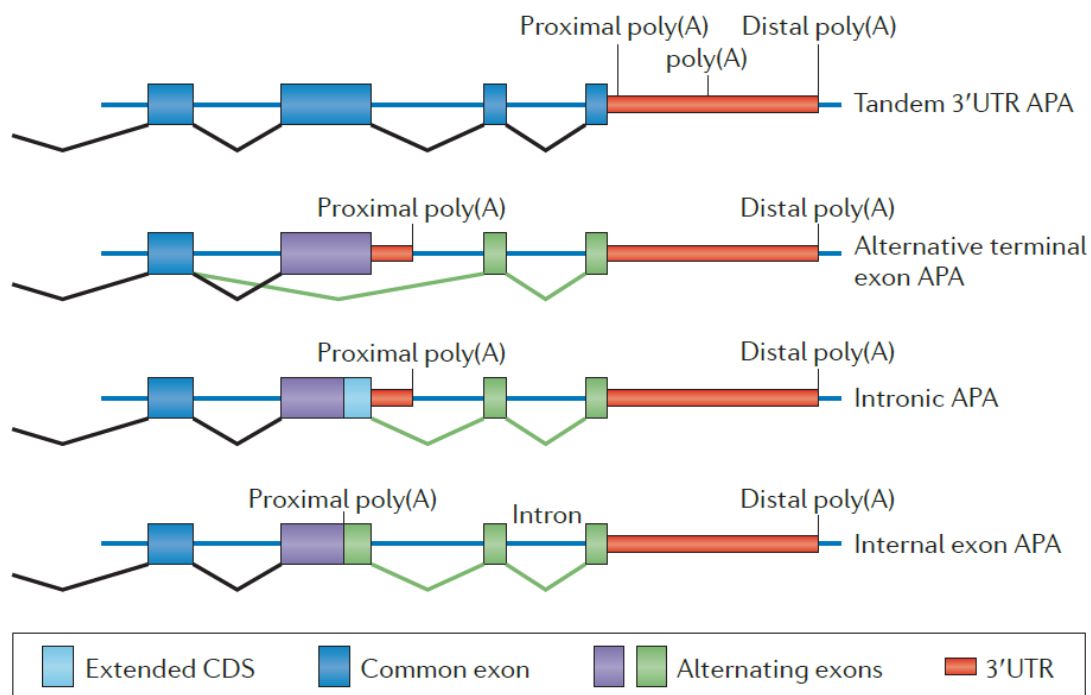


Figure 11. Les différents types de polyadénylation alternative (APA).

Selon la composition du gène et la position des PAS il peut exister divers types d'APA dont l'APA 3'-UTR en tandem qui permet de générer des transcrits avec des longueurs de 3'-UTR variables, l'exon terminal alternatif qui génère deux transcrits possédant des exons terminaux différents, l'APA intronique qui génère un transcrite plus courts ajoutant une séquence intronique dans la partie codante, et l'APA interne à l'exon qui raccourcit la séquence codante d'un transcrite. D'après Elkon et al Nat Rev Genet. 2013 (37).

A noter que dans le cas du gène d'immunoglobuline *IGH*, la cellule B utilise le PAS distal lors de l'activation B où la prolifération cellulaire est intense pour produire un anticorps membranaire puis utilise un PAS intronique pour la production d'anticorps sécrétés chez le plasmocyte où la prolifération est faible au contraire de la majorité des gènes. Une étude de Takagaki et collègues a montré que la surexpression de la sous-unité CstF-64 permettait un changement d'expression de l'immunoglobuline M (IgM) passant de sa forme membranaire à sa forme sécrétée tandis que l'expression de CstF-64 est constitutivement réprimée chez la cellule B primaire où l'expression d'IgM membranaire est prépondérante. Ces résultats montrent le rôle clé de CstF-64 dans la régulation du clivage et de la polyadénylation des transcrits d'immunoglobulines (43). De plus, une autre étude plus récente a révélé que l'usage des PAS intronique est un mécanisme répandu au sein des cellules immunitaires et participe à la diversification de leur transcriptome (44).

I.1.4. Transport du noyau vers le cytoplasme et traduction

L'ARNm doit être protégé de toute dégradation dans le noyau avant d'être clivé. Parmi ces mécanismes de protection, on retrouve le blocage côté 5' par un complexe de protéines chaperonnes ou CBC au niveau du premier nucléotide 7-méthylguanosine (m^7G) mais aussi la queue poly(A) et ses PAB coté 3' ou encore le long du transcrits, la complexation avec des protéines de l'épissage : les protéines SR et le complexe de jonction des exons (EJC). Un autre complexe important pour le signal d'export du mRNA vers le cytoplasme va venir se fixer également sur le transcrit : le complexe TREX et/ou TREX2. L'ARNm et toutes ses protéines associées vont ainsi former un complexe riboprotéique messenger ou mRNP. TREX va permettre à la mRNP de s'accrocher au complexe de pore nucléaire (NPC) le plus proche en la transférant à la protéine NFX1-p15 puis elle va transiter à travers le NPC grâce à la protéine DBP5 et ses protéines associées GLE1 et InsP₆. Pendant son transit, la mRNP va être détachée de toutes ses protéines associées par l'activité hélicase de DBP5. Une fois dans le cytoplasme, l'ARNm dépourvu de marque aux extrémités est alors protégé en 5' par la protéine eIF4E, qui est le facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes 4E et en 3' par les PAB cytoplasmiques qui se fixent sur la queue poly(A) (Figure 12). (45)

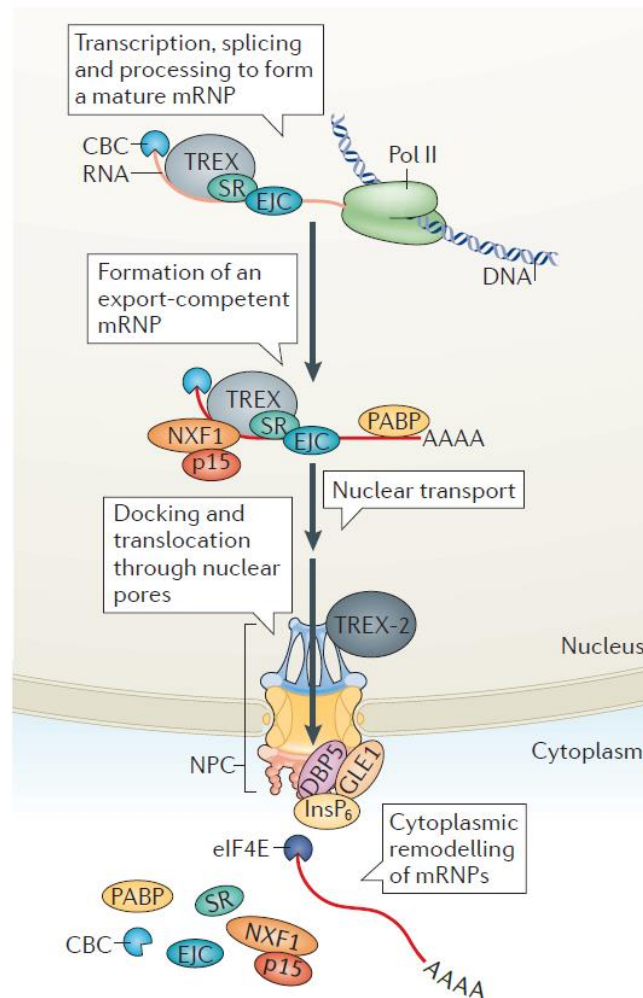


Figure 12. Transport de l'ARNm à travers le complexe de pore nucléaire (NPC).

L'ARNm mature forme un complexe stable avec ses protéines associées, les SR, EJC, PAB et le complexe CBC et forme alors une mRNP. C'est le complexe TREX qui permet le transfert de la mRNP au NPC via son échange avec la protéine NXF1-p15. L'hélicase DBP5 et ses protéines associées, GLE1 et InsP₆ vont ensuite se charger du transit de la mRNP à travers le NPC puis du décrochage de ses protéines associées. L'ARNm, une fois dans le cytoplasme est alors pris en charge en 5' par le facteur eIF4E qui permettra l'initiation de la traduction. D'après Wickramasinghe et Laskey Nat Rev Mol Cell Biol. 2015 (45).

La traduction est réalisée par un complexe ribonucléoprotéique dynamique : le ribosome, qui permet la traduction de la séquence codante de l'ARNm en une chaîne d'acides aminés. Chaque séquence de 3 nucléotides, appelée codon, est ainsi traduite en un acide aminé. Dans la phase de pré-initiation de la traduction, le ribosome est constitué de l'ARNm auquel vient se fixer le complexe 40S et l'ARN de transfert initiateur méthionyl ou Met-tRNA_i guidés par les facteurs d'initiation de la traduction eIFs. Le Met-tRNA_i est un ARN complémentaire au codon d'initiation AUG (ou un variant proche) au début du cadre de lecture ouvert ou ORF et va donc déterminer la reconnaissance au codon d'initiation. Le ribosome ainsi formé va scanner l'ARNm du côté 5' vers 3' jusqu'à trouver le codon d'initiation. Une autre sous-unité ribosomale 60S vient alors se joindre au ribosome pour former l'unité 80S, qui est alors complexée au codon-anticodon au niveau de son site P et la phase d'élongation de la traduction peut commencer. (46)

Durant la phase d'élongation, le site A vacant recrute un aminoacyl-tRNA élongateur complémentaire au prochain codon de l'ARNm complexé au facteur d'élongation EF1A puis transloque vers le prochain codon à l'aide du facteur EF2 et ainsi de suite grâce à des réactions GTP-dépendantes. A chaque déplacement, l'acide aminé correspondant est ajouté à la chaîne d'acide aminé via une liaison peptidique catalysée par le peptidyl-tRNA du site P puis le tRNA déacétylé est éjecté du complexe (Figure 13). La traduction s'achève lorsqu'un codon stop, UAA, UAG ou UGA, atteint le site A du ribosome. Les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 ou eRF3 vont alors catalyser la libération de la chaîne peptidique du peptidyl-tRNA au niveau du site P du ribosome. Le complexe restant est recyclé par le membre 1 de la sous-famille E de la cassette de liaison à l'ATP (ABCE1) qui sépare les deux sous-unités du ribosome puis par les facteurs eIFs, la ligatine (ou eIF2D) et le transporteur monocarboxylate 1 (MCT1) qui séparent l'ARNm du tRNA déacétylé et de la sous-unité 40S. Ainsi, un ARNm peut être traduit plusieurs fois. (47,48)

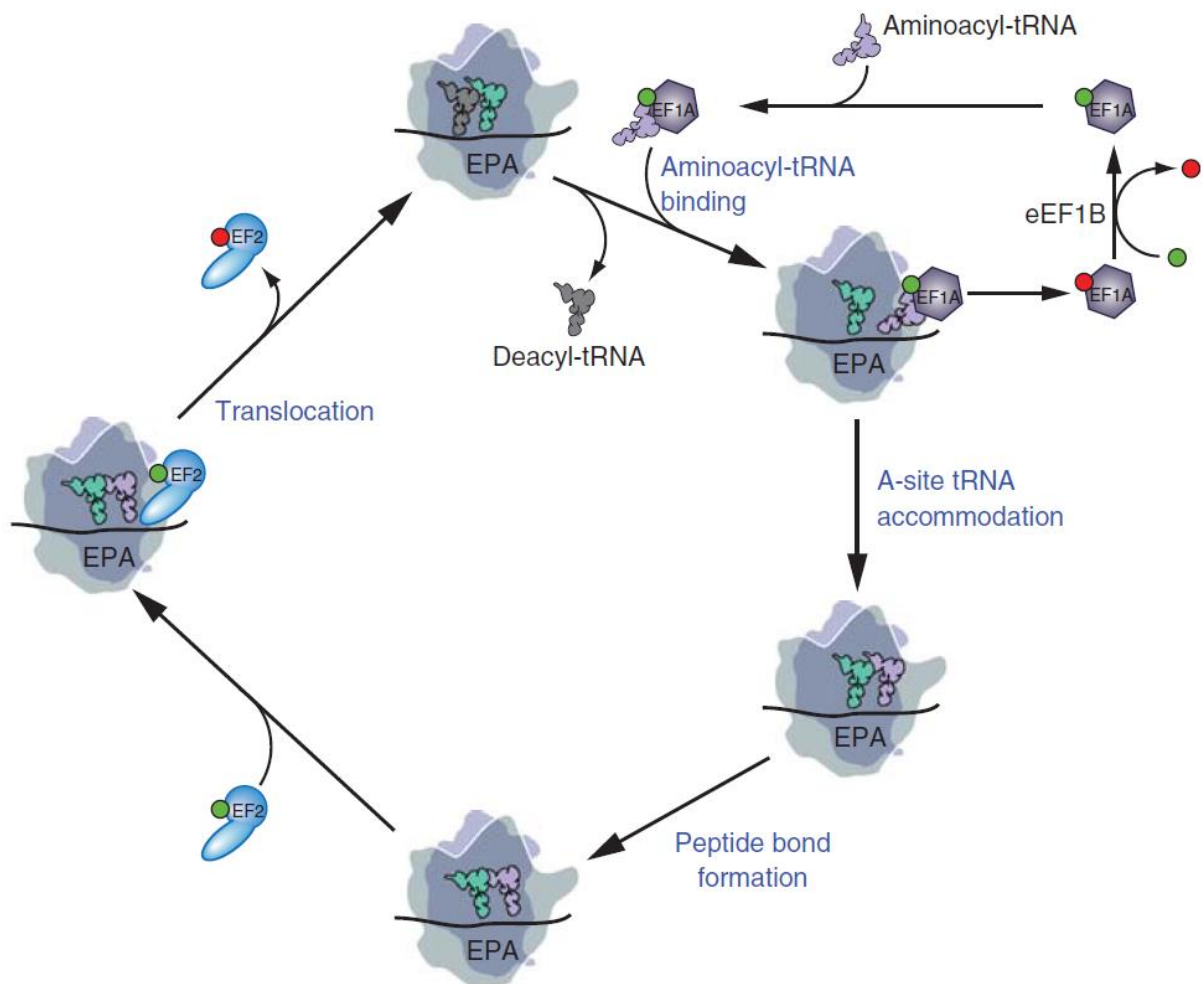


Figure 13. Mécanisme d'élongation de la traduction.

Le ribosome 80S (en gris) réalise l'élongation de la traduction à l'aide d'aminoacyl-tRNAs (en violet) et de facteurs d'élongations EF1 et EF2. Pour se faire, le ribosome possède un site A dans lequel l'interaction ARNm-aminoacyl-tRNA est réalisée et un site P dans lequel le peptidyl-tRNA (en turquoise) vient se loger afin de synthétiser la liaison peptidique entre les différents acides aminés (et un site E qui est un site transitoire). D'après Dever et Green Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 (48).

La traduction des protéines est réalisée principalement à la surface du réticulum endoplasmique (RE) notamment pour les protéines sécrétées et membranaires via la fixation de la particule signal de reconnaissance (SRP) dès l'initiation de la traduction qui permet l'adressage du ribosome vers le RE. Cependant, les protéines cytoplasmiques traduites par des ARNm dépourvus de SRP peuvent aussi être synthétisées par des ribosomes libres dans le cytoplasme. (49)

I.1.5. Régulation des transcrits anormaux

Lors de la transcription, des erreurs peuvent survenir soit lors de la transcription via des erreurs de la Pol II soit lors d'un épissage non conventionnel soit lors d'une maturation incorrecte donnant naissance à un transcrit non traduisible en la protéine complète. Ces transcrits peuvent en effet être dépourvus de codon stop ou au contraire posséder un codon stop prématuré (PTC) suite à une mutation ou un décalage du cadre de lecture. Ces erreurs fréquentes sont corrigées par divers mécanismes au niveau du noyau comme du cytoplasme afin d'éviter la traduction de transcrits non productifs qui produirait des protéines tronquées ou des peptides toxiques pour la cellule. Ainsi, la plupart des transcrits anormaux ne sont pas bien pris en charge par les protéines de 5'-cap ni polyadénylés et/ou sont dégradés. (50)

Parmi les mécanismes de dégradation, on trouve le RNA exosome qui permet la dégradation des transcrits anormaux dans le noyau comme dans le cytoplasme. Le RNA exosome est composé de plusieurs sous-unités protéiques dont les exonucléases de 3' vers 5' EXOSC10/RRP6 et DIS3 (pour le noyau) ou DIS3L (pour le cytoplasme), formant un tube par lequel l'ARN va passer pour être dégradé. Dans le noyau, le RNA exosome va d'abord reconnaître les transcrits qui ont été incorrectement formés grâce à sa coopération avec deux complexes co-facteurs, tous deux constitués de l'hélicase MTR4 : le complexe de ciblage de l'exosome nucléaire (NEXT) et le complexe de ciblage de la queue poly(A) (PAXT) via leur interaction avec le CBC. Le complexe NEXT reconnaît les transcrits introniques comme les lncRNA, snoRNA, les transcrits à promoteur en amont (PROMPTs) qui sont des ARN transcrits de 3' vers 5' à partir d'un promoteur en amont du transcrit canonique ou encore les erreurs d'épissage menant à l'intron rétention. Le complexe PAXT quant à lui reconnaît les transcrits à queue poly(A) longue comme certains ncRNA. Dans le cytoplasme, le RNA exosome dégrade les ARNs anormaux seulement dans un second temps, une fois recruté par une des voies de surveillance des ARNs anormaux par les ribosomes regroupées sous le nom de « mRNA decay ». (50,51)

Parmi les mécanismes de mRNA decay, on trouve le « Nonsense-Mediated mRNA decay » ou NMD qui est provoqué lorsque les ARNm présentent un codon stop prématuré (PTC) sur leur séquence et est également actif sur les ARN normaux dans une moindre mesure. En effet, dans le cas des transcrits normaux, les PAB cytoplasmiques inhibent le NMD lorsqu'elles sont suffisamment proches du codon stop, mais cette inhibition est moins efficace lorsque la 3'UTR est longue. Les transcrits à 3'UTR longues peuvent également subir un épissage dans la 3'UTR ce qui donne naissance à un EJC en aval du codon stop, stimulant le NMD et favorisant leur dégradation. Un PTC est distingué d'un codon stop naturel par la présence d'un EJC 50 à 55 nucléotides après le codon stop qui recrute de façon active le NMD. Le NMD est formé d'un complexe dynamique de plusieurs protéines, dont l'acteur principal est l'hélicase UPF1 qui subit des étapes de phosphorylation/ déphosphorylation par la protéine kinase SMG1 et la phosphatase PP2A pour permettre le déroulement du NMD. UPF1 est recrutée par le ribosome lors de la terminaison de la traduction à l'aide du facteur eRF1/3, alors appelé complexe de surveillance ou complexe SURF. Ensuite, le complexe SURF va interagir successivement

avec les protéines UPF2 et UPF3b et les protéines du complexe EJC pour former le complexe d'induction du mRNA decay ou DECID. La formation de ce complexe provoque la phosphorylation de UPF1 et la libération des facteurs eRF1/3 et du ribosome. UPF1 une fois phosphorylé change de conformation ce qui active sa fonction hélicase et permet son interaction avec UPF2 qui bloque son domaine inhibiteur. L'activité hélicase de UPF1 va le propulser tout au long de la mRNP et déloge toutes les protéines associées à l'ARNm. Ensuite, les protéines SMG5, SMG6 et SMG7 viennent s'associer à UPF1 phosphorylée, clivant l'ARNm juste avant le PTC et initiant le décaping en 5' et la déadénylation en 3'. L'ARNm formé est alors dégradé en 3' par les exonucléases « torpedo » XRN1 et en 5' par le RNA exosome. (Figure 14) (52,53)

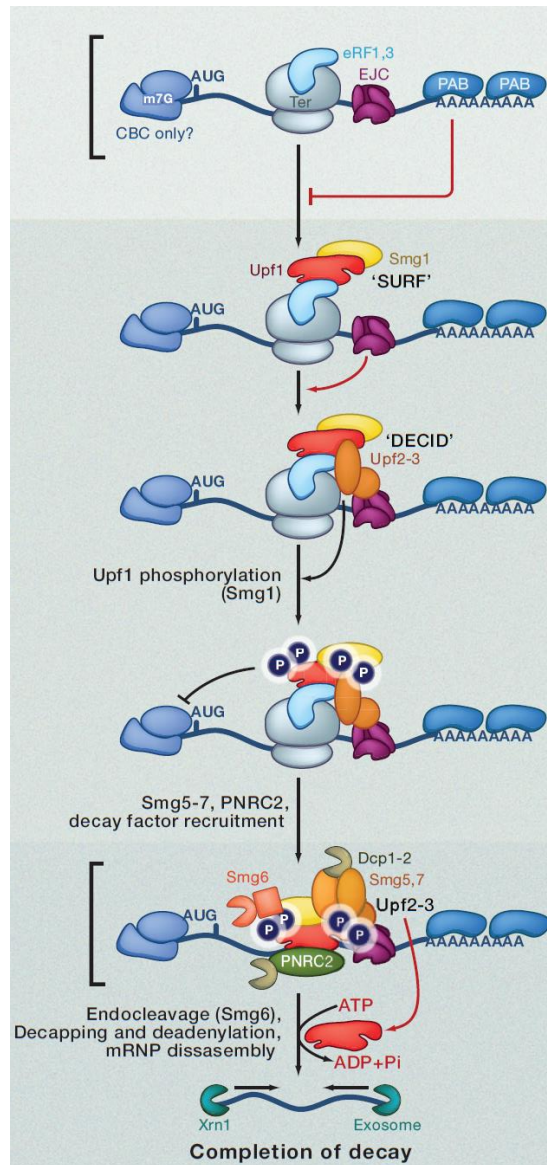


Figure 14. Mécanisme du « Nonsense-Mediated mRNA Decay ».

Le complexe du NMD SURF se forme lors de la terminaison de la traduction par le ribosome. Lorsqu'un EJC est détecté 50 à 55nt en aval du PTC, cela permet la transformation du complexe SURF en complexe DECID, qui va initier le mRNA decay. UPF1 est phosphorylée et va promouvoir, avec l'aide d'autres acteurs, le clivage, le décaping en 5' et la déadénylation en 3' du transcrit, ce qui va permettre sa dégradation par les exonucléases « torpedo » XRN1 en 5' et par l'exosome en 3'. Adapté de Durand et Lykke-Andersen Cell 2011 (52).

D'autres mécanismes de surveillance de l'ARNm par le ribosome existent, parmi eux le No-Go mRNA Decay (NGD) et le Non-Stop mRNA Decay (NSD). Le NGD est réalisé lors d'une pause de la traduction par le ribosome, ce qui arrive quand l'ARNm possède une structure secondaire qui gêne la progression du ribosome ou que certains nucléotides sont dégradés. Deux facteurs entrent alors en jeu : Dom34 et Hbs1, qui sont des homologues des facteurs eRF1 et eRF3 respectivement. A la différence que Dom34 et Hbs1 sont incapables de reconnaître le codon stop et d'initier la terminaison de la traduction mais vont provoquer la séparation des sous-unité 40S et 50S du ribosome, le décrochant de l'ARNm. L'action de Dom34 et Hbs1 provoque également, par un mécanisme non élucidé, le clivage de l'ARNm par une activité endonucléase, ce qui rend le transcrit dégradable par les exonucléases « torpedo » XRN1 et l'exosome. (Figure 15) (54,55)

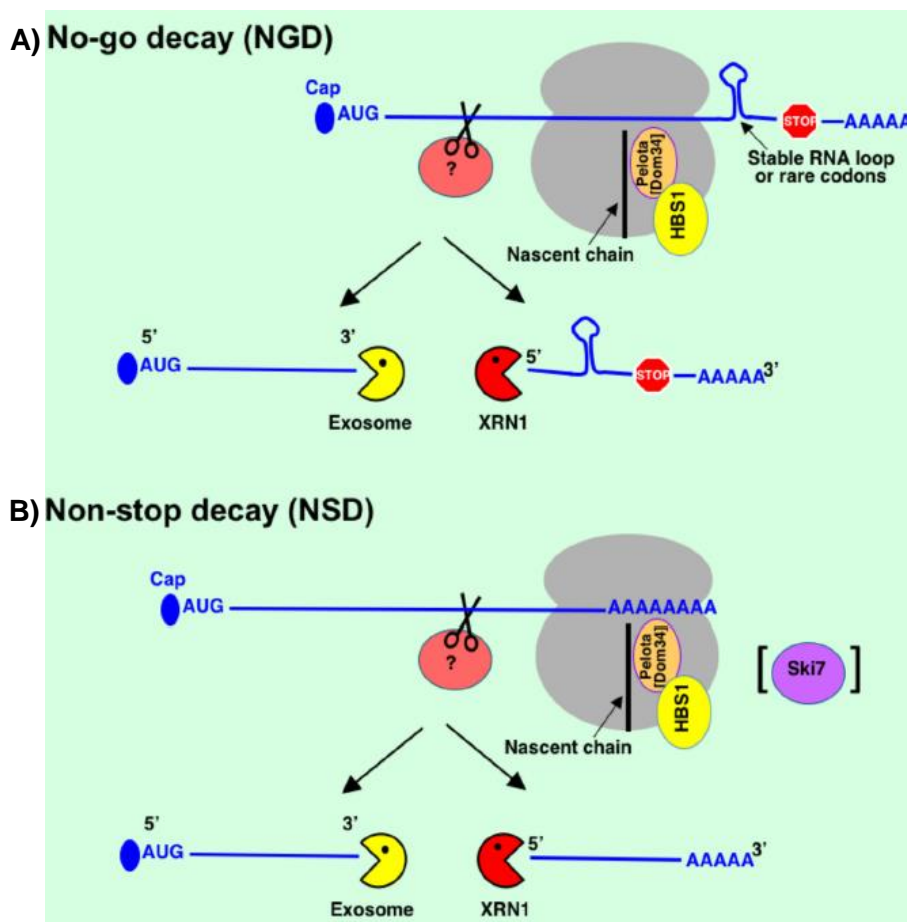


Figure 15. Illustration des mécanismes de Non-stop Decay (NSD) et No-Go decay (NGD).

(A) Le NGD est permis par l'association des protéines Dom34 et Hbs1 qui prennent la place respectivement des facteurs eRF1 et eRF3 lorsque le ribosome est bloqué pendant la traduction, par exemple lorsqu'il rencontre une structure secondaire de l'ARNm comme la structure en épingle ou un nucléotide dégradé (étoile). **(B)** Le NSD est initié par les protéines Dom34 et Hbs1 (ou Ski7 chez la levure) lorsque le ribosome arrive à la fin du transcrit ou au niveau de la queue poly(A) sans avoir rencontré de codon stop. Adapté de Karamyshev et Karamisheva Front Genet. 2018 (56).

Le NSD est provoqué lorsque l'ARNm est mûré de façon incorrecte en étant le plus souvent clivé et polyadénylé avant la fin de la transcription de la séquence codante par des endonucléases qui ont ôté la partie possédant le codon stop ou encore ne possédant pas de queue poly(A). Ce transcrit n'ayant pas de codon stop, le ribosome va arriver au niveau de la

queue poly(A) ou à la fin du transcrit sans avoir rencontré de codon stop pour initier la terminaison de la traduction. Ces deux mécanismes provoquent une pause du ribosome et Dom34 et Hbs1 vont être recrutées pour dissocier le ribosome et cliver le transcrit, initiant la dégradation de l'ARNm de la même façon que pour le NGD. La protéine Ski7, qui est connue pour recruter l'exosome dans le NSD, est associée au ribosome chez la levure mais ne semble pas présente chez les eucaryotes supérieurs comme l'homme. (Figure 15) (54)

I.2. La cellule B et le plasmocyte

I.2.1. Les immunoglobulines

Durant le développement B, la cellule produit des immunoglobulines (Ig) capables de se lier à un antigène. Cette Ig est soit exprimée sous forme membranaire, on parle alors récepteur de la cellule B ou BCR, soit excrétée par le plasmocyte, on parle alors d'anticorps (Ac) ou d'Ig sécrétée.

Les Ig sont des protéines constituées de quatre sous-unités : deux chaînes lourdes ou IgH (« Heavy ») et deux chaînes légères ou IgL (« Light »), ces dernières étant de type lambda (Igλ) ou kappa (Igκ). Deux chaînes lourdes identiques s'assemblent entre elles par plusieurs ponts dissulfures, tandis que deux chaînes légères, elles aussi identiques, vont s'assembler sur chacune des chaînes lourdes via un seul pont dissulfure, formant une structure en « Y ». La chaîne IgH est constituée de plusieurs domaines : 3 à 4 domaines constants C_H et un domaine variable V_L qui porte le site de reconnaissance à l'antigène, différent selon chaque anticorps. La chaîne IgL est constituée d'un seul domaine constant C_L et d'un domaine variable V_L . Chaque domaine d'Ig possède une taille équivalente, d'environ 110 acides aminés (Figure 16).

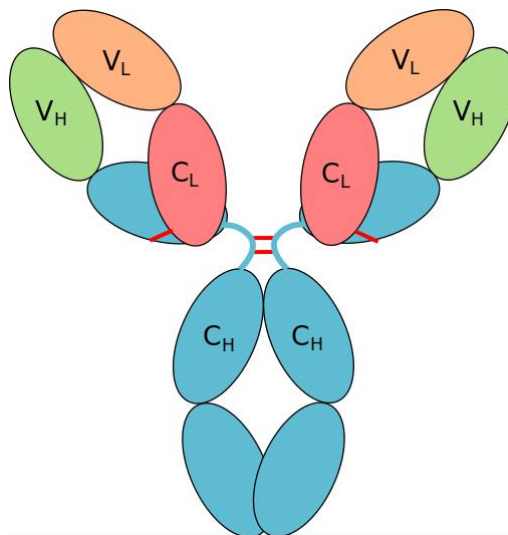


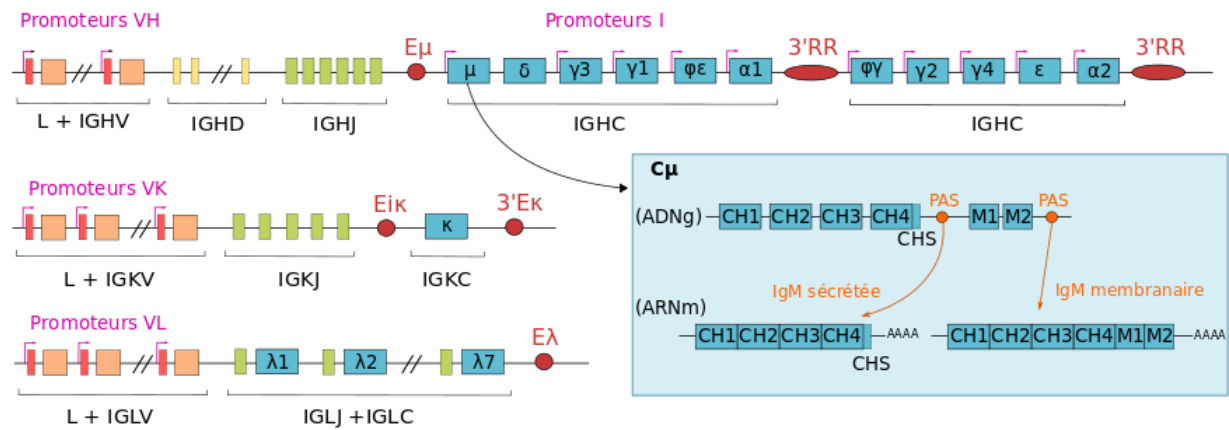
Figure 16. Structure d'une immunoglobuline.

Une immunoglobuline est constituée de deux chaînes lourdes avec une partie constante C_H (bleu) et une partie variable V_H (vert) ; et deux de chaînes légères avec une partie constante C_L (rose) et une partie variable V_L (orange). Toutes ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts dissulfures en rouge. Chaque domaine d'Ig est représenté par un ovale.

I.2.1.1. Les gènes d'Ig et leurs régions régulatrices

Les immunoglobulines sont codées à partir de 3 loci distincts : le locus *IGH* pour la chaîne lourde et les loci *IGL* et *IGK* pour les chaînes légères. Les loci *IGH*, *IGL* et *IGK* sont présents respectivement sur le chromosome 14, 22 et 2 chez l'homme et le chromosome 12, 16 et 6 chez la souris et sont organisés de manière équivalente entre les deux espèces. A noter que chez la souris, la chaîne $Ig\lambda$ n'est présente que sur 5% des Ig (57). La partie constante des chaînes légères est codée par un seul exon : $C\kappa$ au locus *IGK* et $C\lambda$ ($C\lambda 1$ à $C\lambda 7$ chez l'homme) au locus *IGL*. Le locus *IGH* possède plusieurs régions constantes $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma$, $C\alpha$ et $C\epsilon$ qui déterminent l'isotype de l'Ig et permettent d'exprimer respectivement des IgM, IgD, IgG, IgA et IgE dont les fonctions diffèrent. Chaque région CH code pour plusieurs domaines constants, un seul pour *IGL* et *IGK* et 3 à 4 pour *IGH* de CH1 à CH4. Les régions $C\gamma$, $C\delta$ et $C\alpha$ possèdent également un domaine charnière « H » (pour « Hinge ») entre le CH1 et le CH2. Dans le locus *IGH*, les régions C possèdent aussi un ou deux domaines différentiellement épissés et polyadénylés appelés régions membrane ou « M » qui ne sont exprimés que sur les Ig membranaires et donnent naissance aux domaines transmembranaires et cytoplasmiques des chaînes lourdes d'Ig. Au contraire, ces domaines M sont absents sur les Ig sécrétées qui elles possèdent une petite extension du dernier domaine CH3 ou CH4 appelé CHS (S pour sécrété). La région variable quant à elle est organisée en de nombreux segments de type V, (D) et J (pour « variable », « diversity » et « joining ») qui devront être réarrangés durant le développement B. Chaque segment V est précédée d'un segment L (pour « Leader ») qui est séparé en deux parties par un intron et dont la partie 2 est directement devant le segment V. Ce segment L, une fois épissé, code le peptide signal indispensable pour l'adressage de l'Ig au réticulum endoplasmique (ER) où les chaînes lourdes et légères seront assemblées. (Figure 17) (58–63)

Homo sapiens



Mus musculus

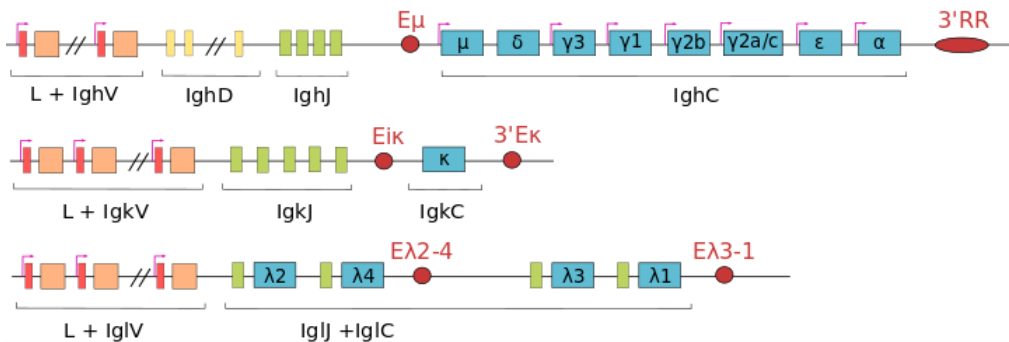


Figure 17. Les gènes d'immunoglobulines *IGH*, *IGK* et *IGL* chez l'homme et la souris et leur régions régulatrices.

Dans l'ordre, les 3 locus *IGH*, *IGK* et *IGL* de l'homme (*Homo sapiens*) puis de la souris (*Mus musculus*) sont représentés avec les segments L (rouge pale), V (orange), D (Jaune), J (Vert) et C (Bleu). Les promoteurs sont indiqués sous forme de flèche coudée en rose et les « enhancer » en cercles et ellipses rouge foncé. D'après les représentations des locus *IGH*, *IGK* et *IGL* murins et humains sur le site IMGT (58–63).

Chaque gène possède des régions promotrices, ainsi on retrouve un promoteur en 5' de chaque segment V, en amont de l'exon leader. Dans le locus *IGH*, on retrouve également d'autres régions promotrices appelées promoteur I, en 5' de chaque région constante excepté C δ , et qui permettent la transcription de ncRNA contenant un exon I et la région constante C. Des régions « enhancer » sont également retrouvées dans le grand intron qui sépare le dernier segment J des régions constantes C μ et C κ , appelés $E\mu$ et Eik , et en 3' des régions C κ et C λ , appelé $3'Ek$ et $E\lambda$ (chez la souris $E\lambda 2-4$ et $E\lambda 3-1$). Des régions constituées de plusieurs « enhancer » HS3a, HS1,2, HS3b et HS4 sont également retrouvées en 3' des régions C du locus *IGH*, ce sont des « super-enhancer » appelées régions régulatrices en 3' ou $3'RR$. Il existe deux $3'RR$ chez l'homme dont une est retrouvée entre les régions C mais une seule chez la souris. (Figure 17) (64–67)

I.2.1.2. Le réarrangement V(D)J

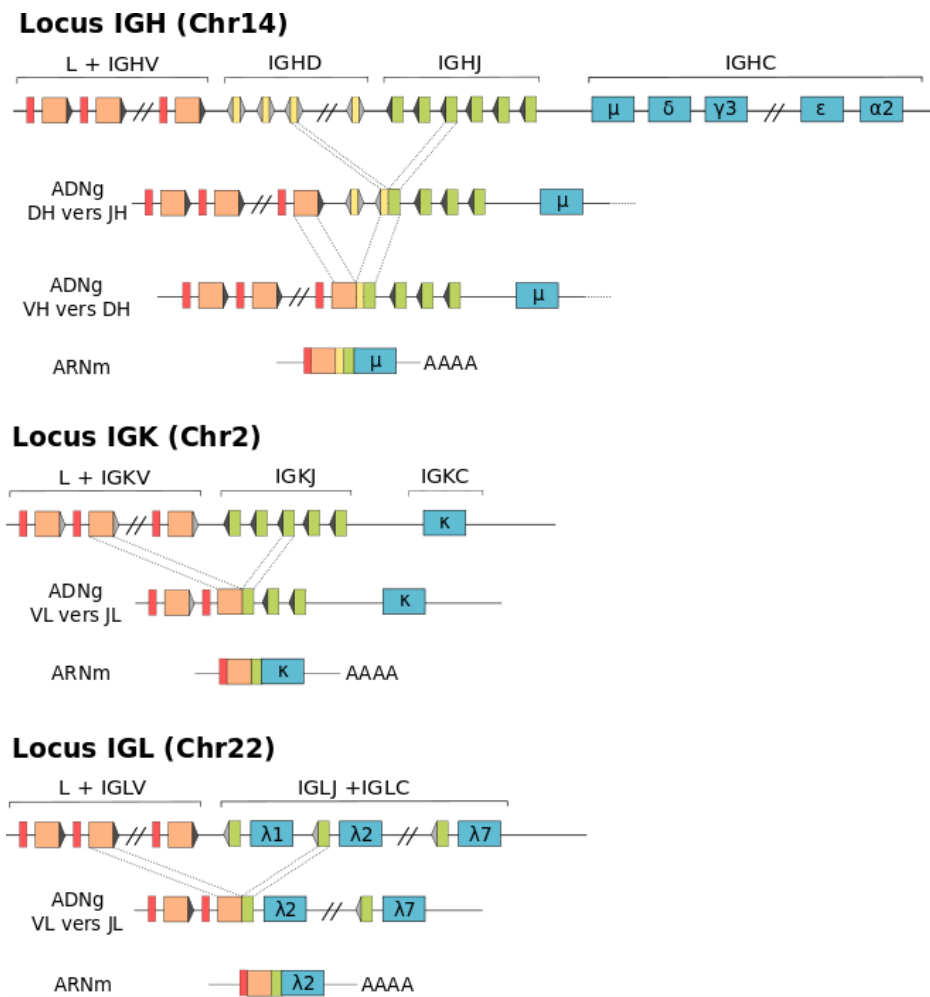


Figure 18. Les réarrangements des régions variables des gènes d'immunoglobulines IGH, IGK et IGL chez l'homme.

Les gènes de chaînes lourdes (*IGH*) et légères (*IGK* et *IGL*) d'Ig subissent des réarrangements au niveau de leur parties variables V (D) J durant le développement B. Ainsi, le gène *IGH* subit deux réarrangements successifs de DH vers JH puis de VH vers le segment réarrangé DJH tandis que les gènes *IGK* et *IGL*, dépourvus de segments D, ne vont subir qu'une seule étape de réarrangement de VL vers JL. Ces réarrangements sont guidés par les séquences signal de recombinaison 12RSS (triangle gris) et 23RSS (triangle noir).

Pendant le développement B (détaillé dans la partie I.2.2), la cellule B va réaliser plusieurs réarrangements successifs des régions V, (D) et J sur le gène *IGH* puis sur un des deux gènes *IGL* ou *IGK*. En effet, la cellule pro-B réalise d'abord un réarrangement de DH vers JH puis de VH vers DJH au stade pré-B précoce afin de produire une région VDJ codant pour le domaine variable de la chaîne IgH ; et pour finir, un dernier réarrangement de VL vers JL dans la petite cellule pré-B permet la formation du domaine variable d'IgL kappa ou lambda (Figure 18) (68). Grâce à ce mécanisme, les Ig peuvent posséder une grande diversité de régions variables. A titre d'exemple, il existe chez l'homme un grand nombre de segments fonctionnels différents : 54 segments VH (regroupés dans 6 sous-groupes de IGHV1 à V6), 23 segments DH (regroupés dans 7 sous-groupes IGHD1 à D7) et 6 segments JH (IGHJ1 à J7) (61).

Au sein de la région variable recombinée on distingue plusieurs régions dont quatre régions charnières peu variables FR1, FR2, FR3 et FR4 (pour « Framework Region ») intercalées par trois régions déterminant la complémentarité à l'antigène hautement variables CDR1, CDR2 et CDR3. CDR3 est la plus variable des CDR car elle est encodée par la région où on retrouve la jonction des différents segments V(D)J au sein desquels des additions de nucléotides sont fréquemment retrouvées dues au mécanisme de recombinaison. Les variations des autres CDR1 et CDR2 sont surtout dictées par le type de segment V utilisé. Toutes les régions CDR sont également ciblées préférentiellement par le phénomène d'hypermutation somatique (SHM), augmentant encore leur variabilité (détaillé dans la partie I.2.1.4). Une fois traduites en protéines, les régions CDR de la chaîne lourde et de la chaîne légère seront positionnées en surface de l'immunoglobuline sous forme de boucle, toutes rapprochées les unes des autres afin de constituer le site de reconnaissance à l'antigène. (Figure 19) (68)

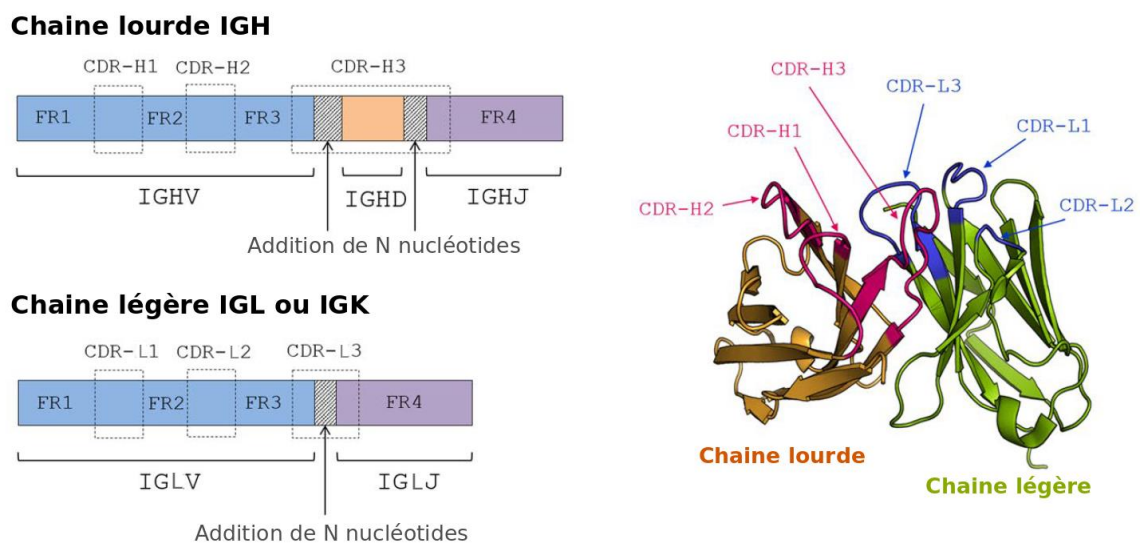


Figure 19. Les régions FR et CDR et la structure tridimensionnelle du domaine variable.

Le réarrangement V(D)J donne naissance à quatre régions charnières FR1 à FR4 et trois régions déterminant la complémentarité à l'antigène CDR1 à CDR3. Une fois la chaîne lourde et légère assemblées, les CDR forment des boucles rapprochées en surface de l'Ig constituant le site de reconnaissance de l'antigène. Adapté de Dunn-Walters et al Immunol Rev. 2018 (68).

Les réarrangements V(D)J sont réalisés à l'aide des endonucléases RAG1 et RAG2 qui s'assemblent deux à deux pour former un tétramère RAG. Le complexe RAG aidé par la protéine HMGB1 se lie aux séquences RSS positionnées en bordure des segments V(D)J, composées d'un heptamère de séquence CACAGTG et d'un nonamère de séquence consensus ACAAAAACC séparés par 12 (12RSS) ou par 23 (23RSS) nucléotides. Les séquences 12RSS et 23RSS vont être rapprochées par le complexe RAG qui initiera le clivage de l'ADN pour permettre de générer des cassures doubles brins (ou DSB). Le complexe RAG va uniquement relier un 12RSS avec un 23RSS, on parle de la règle du 12/23, ce qui empêche les recombinaisons illégitimes entre des segments de même type et assure une jonction séquentielle des segments D vers J puis V vers DJ au locus *IGH* et V vers J aux loci *IGK* et *IGL*. Cette réaction forme également un ADN circulaire avec la partie excisée appelé joint signal (SJ) qui sera dégradé. Le mécanisme de réparation de l'ADN de type jonction d'extrémités non homologues ou NHEJ impliqué dans la jonction des DSB générés provoque

l'ajout de quelques nucléotides au niveau de chaque jonction (Figure 20) (69–71). De plus, la forte expression de la terminal deoxynucleotidyl transferase (ou TdT) durant les recombinaisons au locus *IGH* permet d'accentuer la diversification des jonctions D vers J et V vers DJ.

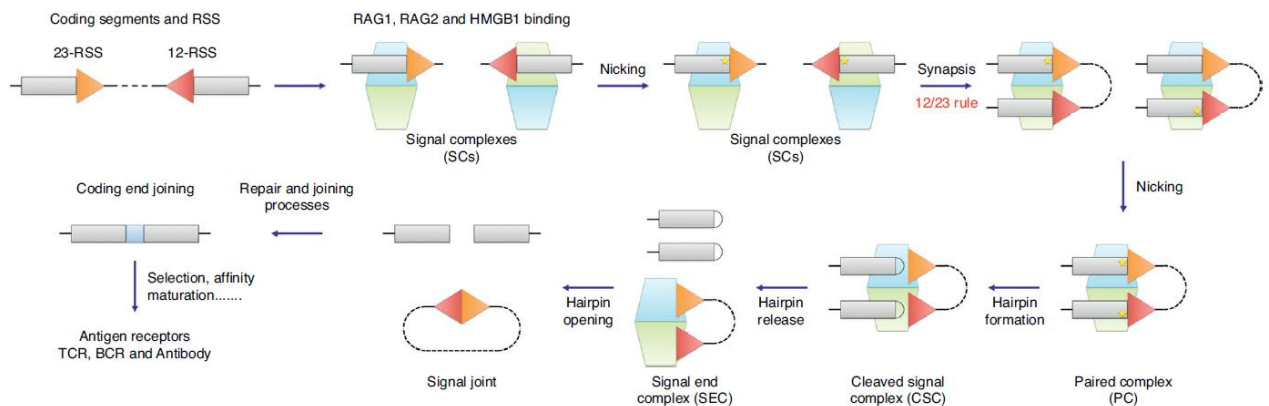


Figure 20. Mécanisme de recombinaison V(D)J par le complexe RAG.

Le complexe RAG1/2 (bleu et vert) se lie à un 12RSS (rouge) et à un 23RSS (orange) et rapproche les deux séquences par formation d'une synapse, tout en introduisant une cassure simple brin de l'ADN qui aboutira ensuite à une cassure double brin au niveau des séquences RSS. Les segments V(D)J impliqués dans le processus de recombinaisons sont ensuite reliés entre eux par NHEJ et l'ADN excisé forme un ADN circulaire appelé joint signal. Adapté de Ru et al Curr Opin Struct Biol 2018 (70).

I.2.1.3. Régulation des réarrangements V(D)J et exclusion allélique

Durant la recombinaison V(D)J, seul un allèle de chaque gène *IGH*, *IGK* et *IGL* s'exprime afin de garantir la production d'une Ig unique par cellule. Ce phénomène est appelé exclusion allélique. Ainsi, pour un gène, une cellule B peut posséder un allèle correctement réarrangé d'un côté et un allèle soit non réarrangé, incorrectement réarrangé ou réarrangé mais non fonctionnel de l'autre. On note alors respectivement les allèles V(D)J+ et V(D)J-. L'exclusion allélique n'a lieu qu'à partir du stade pré-B précoce donc le gène *IGH* possède deux allèles réarrangés de DH vers JH mais seulement un de VH vers DHJH. C'est uniquement si le réarrangement du premier allèle donne naissance à un VDJ- que le deuxième allèle est réarrangé. Pour les gènes de chaînes légères *IGL* et *IGK*, seul un allèle des deux gènes va être réarrangé sauf si le premier réarrangement donne naissance à un VJ-. A cause de la nature aléatoire des réarrangements V(D)J, seule une petite partie des réarrangements donnera naissance à des régions V(D)J fonctionnelles. En effet, la plupart des réarrangements induisent des décalages de cadre de lecture provoquant l'apparition de codons stop prématurés (PTC). D'autres réarrangements peuvent également coder des chaînes d'Ig incapables de s'assembler avec leur homologue, ne permettant donc pas l'expression du BCR ou du pré-BCR. (72,73)

L'exclusion allélique est médiée par la répression épigénétique via un remaniement chromatinien, la modification des histones, la méthylation de l'ADN ou encore par la réplication, rendant une partie du gène ou l'allèle entier indisponible pour le réarrangement V(D)J. La répression chromatinienne de l'expression des gènes *IGH*, *IGK* et *IGL* prédomine dans la plupart des cellules et un changement de l'accessibilité de la chromatine permet les réarrangements successifs V(D)J au sein de la lignée lymphoïde B. Ainsi les gènes passent de la région non accessible de la chromatine, condensée en périphérie du noyau ou hétérochromatine à la région accessible décondensée ou euchromatine. Les histones sont

également modifiées, étant plutôt méthylées et hypo-acétylées sur les gènes réprimés tandis qu'elles sont acétylées sur les gènes d'Ig exprimés. De même durant la réplication asynchrone des gènes d'Ig au stade embryonnaire, il est admis que c'est toujours l'allèle répliqué en premier qui va être réarrangé, l'autre étant réprimé (74). Cependant, un récent article de Alves-Pereira et collègues montre que les deux allèles agiraient plutôt indépendamment l'un de l'autre jusqu'à ce qu'un des allèles soit correctement réarrangé et inhibe le réarrangement de l'autre allèle par « feedback » (75). La méthylation de l'ADN joue également un rôle dans l'accessibilité des régions RSS, ce qui permet de réguler directement les réarrangements V(D)J en rendant ces régions indisponibles (méthylées) à disponibles (déméthylées) uniquement sur un allèle à la fois (Figure 21). De nombreuses études montrent que ces mécanismes pourraient être dirigés par l'action d'éléments en « cis » des gènes comme les promoteurs V_H et les enhancers E_{μ} , $E_{i\kappa}$ et E_{λ} médiées par des éléments en « trans » comme la cohésine. (76,77)

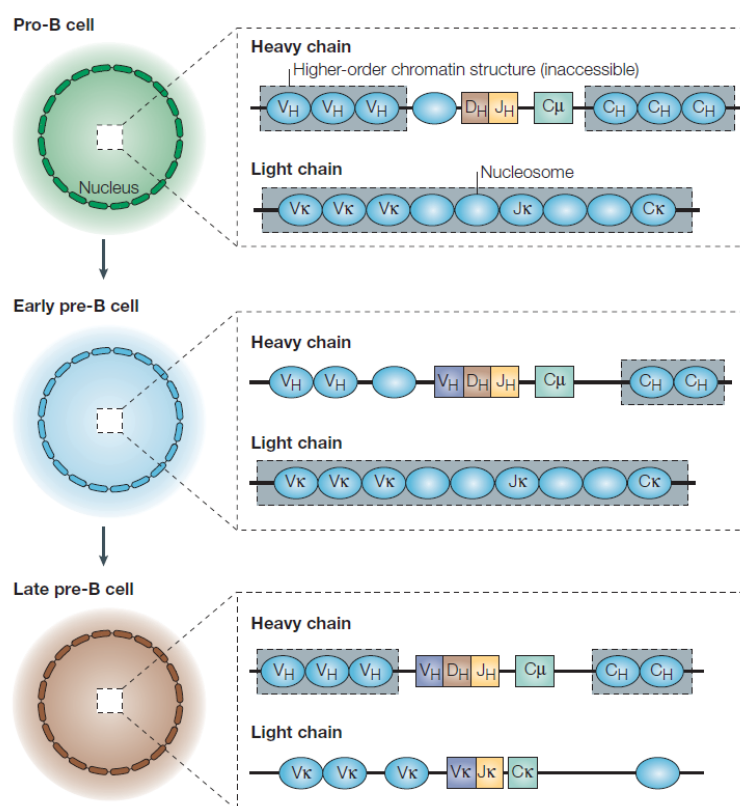


Figure 21. Remaniement chromatinien durant les réarrangements V(D)J.

Durant le développement B, la chromatine doit être successivement réarrangée et rendue accessible pour permettre le réarrangement V_H vers D_HJ_H menant au stade pré-B précoce (Bleu clair) puis le réarrangement de V_L vers J_L au stade pré-B tardif (Marron). La chromatine non accessible par est représentée par un rectangle gris. D'après Bergman et Cedar Nat Rev Immunol 2004 (76).

Une fois les réarrangements V(D)J réalisés, la cellule peut parcourir différents chemins avant d'exprimer un BCR fonctionnel et non autoréactif à sa surface. Ainsi l'exclusion allélique est parfois levée de manière séquentielle sur les gènes *IGK* et *IGL* pour permettre plusieurs réarrangements VJ successifs, c'est ce qu'on appelle l'édition du BCR. En effet, tant que l'expression de RAG n'est pas inhibée par un signal BCR tonique, les réarrangements VJ peuvent avoir lieu, c'est ce qu'on appelle le « feedback ». Par exemple dans le cas d'IgK, si le premier réarrangement donne naissance à un BCR autoréactif, il peut être réarrangé une

seconde fois car RAG continuera d'être exprimé sans un signal BCR nécessaire pour l'inhiber. Ce deuxième réarrangement est possible car les segments JK en amont sont préférentiellement réarrangés en premier, laissant la possibilité d'utiliser les JK en aval lors de l'édition du BCR. Si ce deuxième réarrangement est non fonctionnel et que l'allèle ne peut plus être de nouveau réarrangé, un troisième réarrangement pourra avoir lieu sur le deuxième allèle IGK après remaniement chromatinien. Le deuxième allèle pourra alors lui aussi subir plusieurs réarrangements jusqu'à donner naissance à un BCR fonctionnel et non autoréactif (Figure 22). (76)

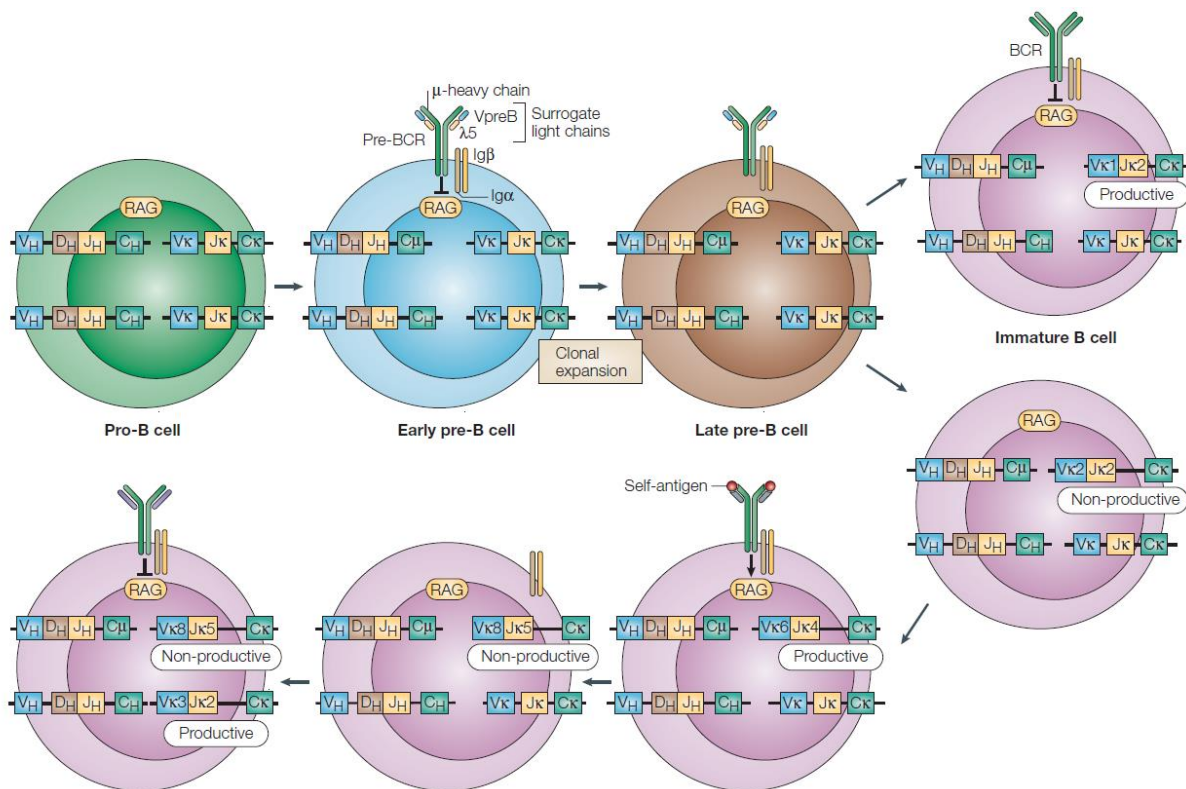


Figure 22. Exemple d'édition du BCR avec le gène IGK et sa régulation par « feedback ».

Durant le développement B, la cellule Pro-B (vert) subit un premier réarrangement de DH vers JH puis la pré-B précoce (bleu) un réarrangement de VH vers DHJH formant le pré-BCR. C'est uniquement au stade de pré-B tardif (marron) que la cellule réarrange sa chaîne légère de VL vers JL. La cellule B immature (violet) peut alors subir plusieurs réarrangements VJ, c'est l'édition du BCR, jusqu'à obtenir un BCR fonctionnel et non autoréactif. Ce mécanisme est contrôlé par un « feedback » d'inhibition de RAG lorsqu'un BCR fonctionnel et non autoréactif est exprimé à la surface cellulaire. D'après Bergman et Cedar Nat Rev Immunol 2004 (76).

I.2.1.4. L'hypermutation somatique

Lors de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative suite au contact avec un antigène, la cellule B va interagir étroitement avec une cellule T ce qui va stimuler l'expression d'une enzyme capable de désaminer les cytosines ou AID (pour « Activated-Induced cytidine Deaminase »). Grâce à cette enzyme, de nombreuses mutations ponctuelles ciblant les 4 bases sont réalisées sur les CDR du domaine V d'IGH. Les CDR constituant le site de reconnaissance à l'antigène, cela permet de générer des anticorps plus affins et d'enrichir le répertoire d'anticorps. Ce phénomène est appelé hypermutation somatique.

L'hypermutation somatique se déroule en deux étapes. Premièrement, l'enzyme AID va cibler les branches simple brin de l'ADN se formant au niveau de la boucle de transcription des régions V. En effet, AID est recrutée directement au niveau de la machinerie transcriptionnelle de la Pol II via sa phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) et sa liaison avec la protéine de réplication A (RPA). Elle va agir particulièrement sur les 3 CDR du locus *IGH* où elle produit des mésappariements de bases en transformant les cytosines en uracile. AID cible préférentiellement certains motifs appelés « hotspot » de séquence consensus WRCY. Durant la deuxième étape, les mésappariements G:U formés sont pris en charge par différentes voies de réparation mutagènes de l'ADN qui dicteront le type de mutation. Ainsi, la réplication du mésappariement G:U donne naissance à une transition en appariement A:T. La reconnaissance de G:U par le complexe MSH2/MSH6 (MutS α) provoque le recrutement de l'exonucléase Exo1 qui va dégrader le brin d'ADN puis la polymérase eta (Pol η) va réparer l'ADN de manière imprécise, donnant lieu à des mutations sur les paires A:T entourant le mésappariement G:U. Enfin, l'uracile du mésappariement peut également être excisé par l'enzyme UNG, générant un site abasique qui bloque la réplication par les polymérase ADN conventionnelles. Seules certaines polymérase dites « permissives » comme Rev1 sont capables de synthétiser l'ADN en traversant de telles lésions. La polymérase Rev1 va ainsi pouvoir synthétiser un nouveau brin d'ADN en remplaçant la lésion abasique par une déoxycytidine, donnant alors une mutation de type transversion G:C ou C:G. D'autres polymérase permissives comme la Pol θ pourraient donner lieu à des transitions et des transversions de type T:A et A:T. (Figure 23) (78,79)

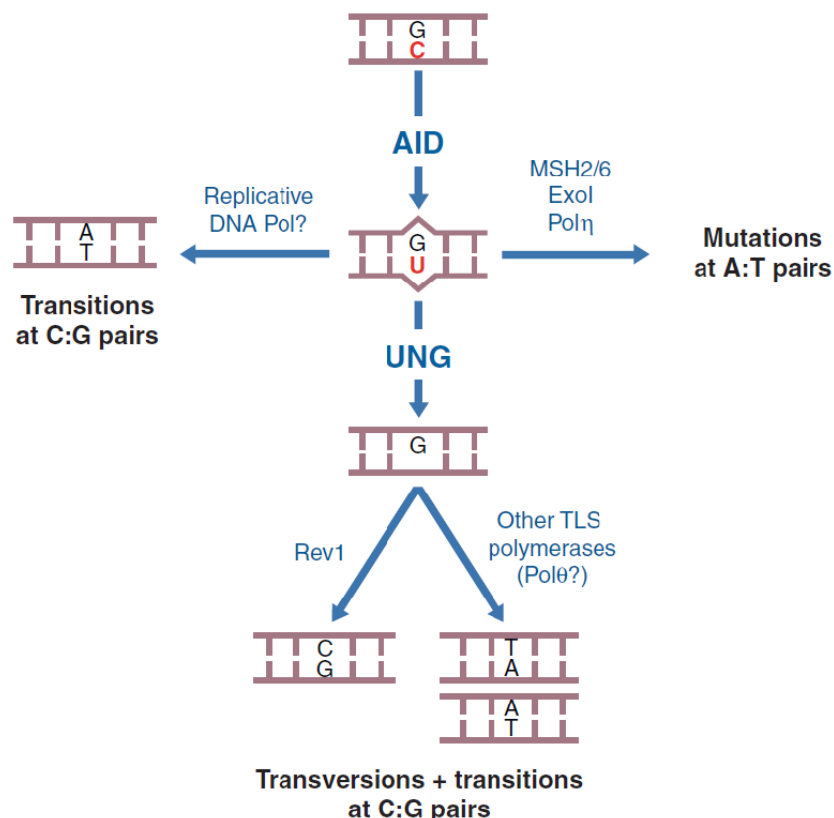


Figure 23. Les différentes résolutions possibles d'un mésappariement G:U produit par AID.

L'enzyme AID produit des mésappariement G:U au niveau des paires G:C de l'ADN. Ce mésappariement peut être pris en charge par plusieurs mécanismes ou enzymes donnant lieu à des mutations ponctuelles : des transitions et/ou des transversions. TLS = Trans-lésion (permissives). Adapté de Di Noia et Neuberger Annu Rev Biochem. 2007 (78).

En temps normal, la cellule va réparer correctement les mésappariements G:U par la voie de réparation des mésappariement de l'ADN ou MMR et les bases excisées par la voie de réparation des bases excisées ou BER mais d'une manière inexplicée, ce sont les voies de réparations mutagènes décrites précédemment, elles-mêmes dérivées du MMR et du BER, qui sont préférentiellement utilisées lors de la SHM chez la cellule B. En effet les voies de réparation du MMR et du BER recrutent respectivement les Pol β et Pol δ afin de réparer l'ADN de manière fidèle dans d'autres contextes. (78,79)

I.2.1.5. La commutation de classe

Lors de la réponse immune humorale, le changement de l'isotype d'Ig est primordial car certaines Ig sont plus à même de répondre à certains types d'antigènes. Ainsi, l'IgM/IgD va être transformée ou « switchée » en IgA, IgE ou IgG durant le mécanisme de commutation de classe par recombinaison ou CSR. Ce mécanisme permet la délétion d'une partie des régions C du locus *IGH* et est, tout comme l'hypermutation somatique, assisté par l'enzyme AID. (80)

La CSR est un mécanisme dépendant de la transcription qui repose sur l'induction de cassures double brin (DSB) au niveau d'une région S (switch) donneuse (S_{μ} le plus souvent) et d'une région acceptrice en 3' (S_{γ} , S_{α} ou S_{ϵ}). Les régions S sont situées en amont de chaque gène constant, elles présentent des tailles variables (~1 à 10 Kb chez la souris) mais contiennent toutes de nombreuses répétitions de motifs riches en G ou GC leur permettant d'être ciblées efficacement par AID (81). La CSR se déroule en 3 étapes (Figure 25) :

En premier, une transcription germinale se produit au niveau des régions S donneuse et acceptrice impliquées dans la CSR. Ces transcrits germinaux (GLT) non codants sont initiés à partir des promoteurs I situés en amont des régions S de chaque gène constant (excepté C δ). La transcription des GLT au niveau de la région S_{μ} donneuse est constitutive dans les lymphocytes B activés, alors qu'au niveau des régions acceptrices, elle est coordonnée étroitement par certains stimuli comme l'interleukine 4 (IL-4) pour $\gamma 1$ par exemple (82). Cette activité transcriptionnelle des régions S permet le recrutement d'AID au niveau de la boucle de transcription, ce qui lui permet d'agir sur les deux brins de l'ADN en particulier lors de la pause de la Pol II (79). En plus de ce mécanisme, les transcrits GLT formés d'un premier exon appelé exon I, de la région S et des exons C correspondants, vont s'hybrider à un des brins de l'ADN au niveau des motifs riches en GC de ces régions répétitives. Cette structure ADN:ARN appelée « R-loop » est favorisée par les clusters de G et permettrait de maintenir l'ADN sous sa conformation ouverte. La formation de structure G-quadruplexes (G4) constitue également un site de haute affinité pour la fixation d'AID au sein des R-loop. Ainsi, bien que ces mécanismes impliquant des R-loop et des structures G4 ne soient pas totalement élucidés, ils semblent faciliter l'action d'AID dans la CSR (80). Une autre étude de Zheng et collègues semble également aller dans ce sens en démontrant que le lasso généré lors de l'épissage des transcrits GLT est débranché par l'enzyme DBR1 puis sert de guide pour AID vers les régions S en formant des structures G4 (83). Plus récemment, il a été montré que ces G4 pourraient être convertis en R-loop via l'action de l'hélicase DDX1 (84). La résolution des R-loop est également importante pour la CSR et le RNA exosome tout comme la ribonucléase H (RNase H) semblent être des acteurs essentiels dans la dégradation des transcrits GLT (80), le RNA exosome pouvant même recruter directement AID (85). Par un mécanisme encore méconnu, l'épissage des transcrits GLT semble également avoir un rôle dans la CSR puisqu'une altération du 5'SS des exons I l'abroge (86) et des facteurs d'épissage favorisent le recrutement d'AID comme PTBP2 (87) ou CTNNB1 (88). Une fois au cœur des régions S hautement répétées, AID est particulièrement guidée vers les motifs AGCT présents en grande

quantité et sur lesquels sont fixés les adaptateurs 14-3-3 capables de recruter AID via sa partie C-terminale. Les adaptateurs 14-3-3 recrutent également d'autres co-facteurs indispensables à son activité désaminase comme la PKA et la RPA (82). (Figure 24)

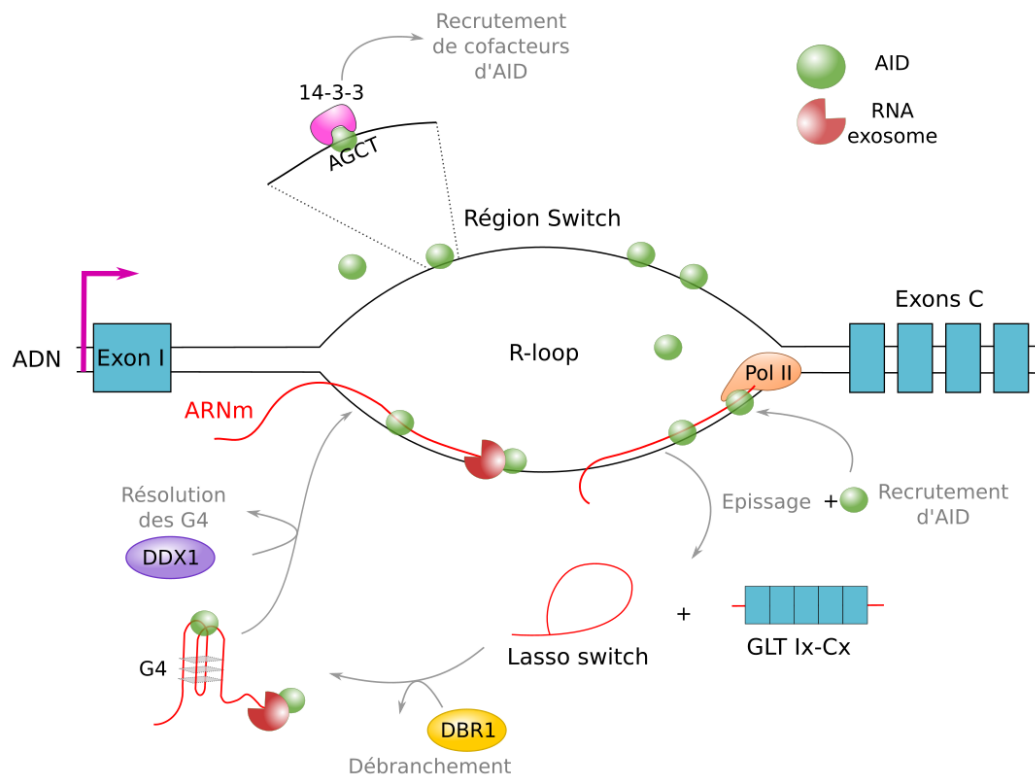


Figure 24. Le recrutement d'AID au niveau de la région switch.

AID est guidée au sein de la région switch (S) par divers mécanismes dont la formation de R-loop au niveau de la région S et son recrutement par la Pol II lors de la transcription. L'épissage de l'ARNm du GLT fait intervenir des facteurs d'épissages qui semblent aider également au recrutement d'AID. La réaction d'épissage génère également un lasso qui une fois débranché par DBR1, se lie directement à AID via ses structures en G4. Les ncRNA générés et liés à AID sont ensuite pris en charge par DDX1 qui linéarise le transcrit, leur permettant de s'hybrider à l'ADN. L'exosome qui dégrade activement les transcrits GLT, permet également le recrutement de AID. Pour finir, AID est également attirée vers un de ses hotspots AGCT sur lesquels sont fixés les adaptateurs 14-3-3, indispensables aux recrutements des cofacteurs nécessaires pour son activité désaminase. (79,80,82–88)

Durant la deuxième étape, AID provoque des mutations de C vers U sur les deux brins d'ADN au niveau des régions S impliquées dans la CSR. La plus grande partie de ces mutations sont prises en charge par l'enzyme UNG, créant des sites abasiques, eux-mêmes pris en charge par la protéine APE1 qui crée des cassures simple brin (SSB). Dans le cas où les SSB sont suffisamment proches, elles peuvent être converties en cassures double brin (DSB) franches. Au contraire si les SSB sont éloignées elles sont prises en charge par MutS α qui mène, en coopération avec Exo1, à la dégradation d'une partie de l'ADN créant des DSB décalées. A ce moment, les deux régions switch donneuse et acceptrice sont rapprochées spatialement entre elles et avec la région 3'RR par la protéine 53BP1, la cohésine et le complexe Mediator. La 3'RR est en effet essentielle pour effectuer une CSR efficace en favorisant la transcription des GLT. (79)

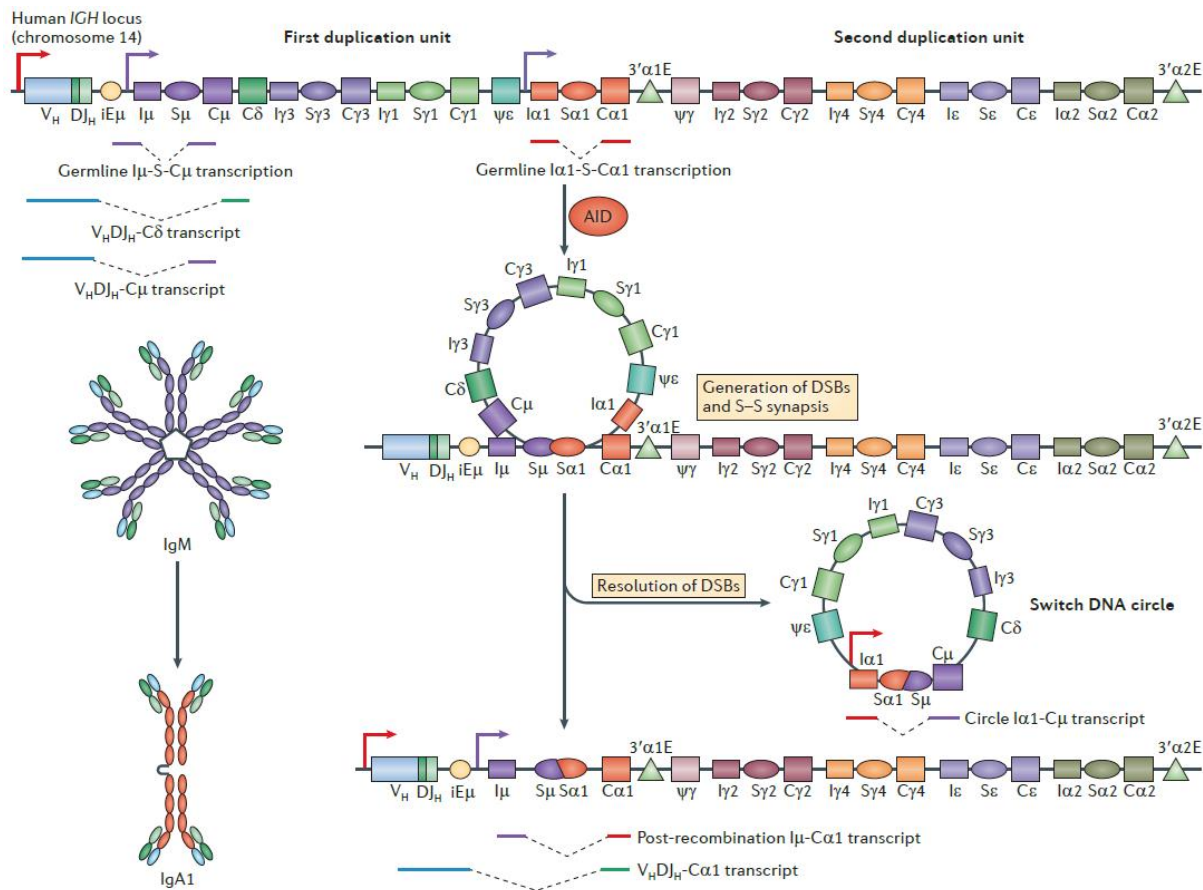


Figure 25. Les 3 étapes de la commutation de classe (CSR) vers IgA.

La CSR se déroule en 3 étapes. Tout d'abord, les GLT sont transcrits au niveau de la région donneuse C μ puis sous l'influence de stimuli au niveau de la région acceptrice, ici C α 1. Cette transcription provoque le recrutement d'AID, ce qui a pour conséquence de générer des DSB et permet également la création d'une synapse qui rapproche entre elles les deux régions switch. Pour finir, les DSB sont réparées, laissant d'un côté une liaison entre les deux régions switch sur l'ADN et de l'autre formant un cercle avec l'ADN excisé. D'après Xu et al Nat. Rev. Immunol 2012 (82).

Enfin, la troisième étape consiste à la résolution des DSB, reliant les régions S donneuse et acceptrice entre elles d'un côté et excisant un cercle d'ADN de l'autre. Les extrémités des régions S sont ainsi rapprochées entre elles par différents complexes dont 53BP1.

Les DSB sont réparées par des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN ou DDR soit par la jonction d'extrémités non homologues conventionnelle (C-NHEJ) soit moins fréquemment par la jonction d'extrémités alternative (A-EJ), dont nous ne détaillerons pas le mécanisme ici. En effet, suite à la génération de DSB, le complexe Ku70/Ku86 se lie rapidement aux extrémités de l'ADN, suivi du recrutement des sous-unités de protéine kinase dépendante de l'ADN ou DNA-PKcs et de ATM. Les DNA-PKcs vont permettre le rapprochement des deux DSB et le recrutement des facteurs de résolution comme Artemis ou des ADN polymérases qui vont préparer les extrémités et ainsi favoriser leur ligation par le complexe XRCC4-XRF-LIG4. Le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 ou MRN est également rapidement recruté sur les extrémités de l'ADN dans les régions S et semble être important pour la CSR mais bien qu'il pourrait interagir avec Ku70/Ku86, son mécanisme n'est pas encore élucidé. ATM provoque également des modifications chromatiniennes en phosphorylant l'histone H2AX qui va ensuite activer les protéines MBC1 et 53BP1. La protéine

53BP1 permet le recrutement de nombreux éléments de la DDR et participe à la formation de la synapse entre les deux régions S, ce faisant elle est acteur clé dans la résolution des DSB durant la CSR. Pour finir, la transcription à partir du promoteur I μ sur l'ADN recombiné donne naissance à des transcrits post-switch dits PST qui permettront d'effectuer des étapes séquentielles de CSR, impliquant des régions constantes en 3'. La transcription de l'ADN recombiné au niveau des promoteurs VH assure quant à elle l'expression du nouvel isotype de chaîne lourde par la cellule B. (Figure 26) (82,89–91)

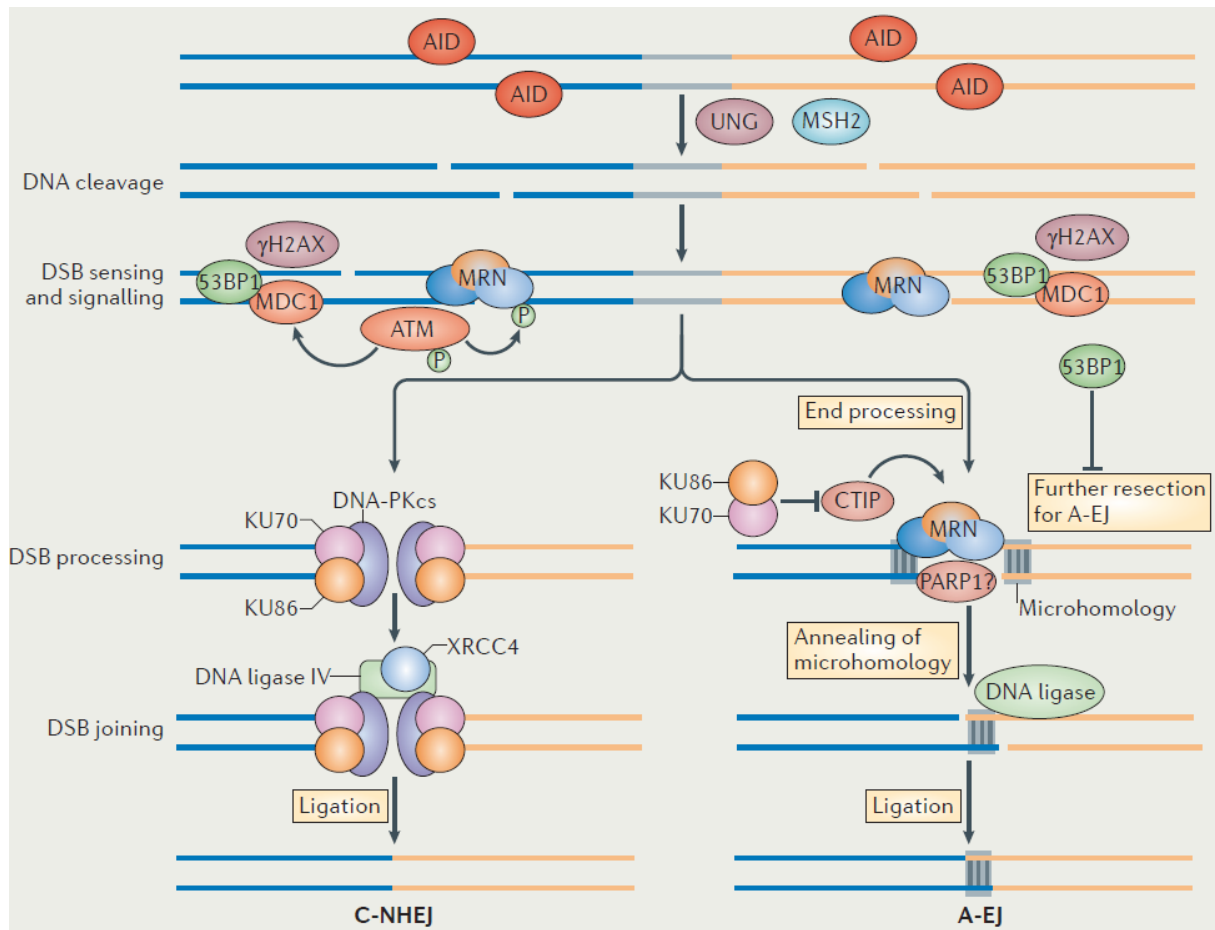


Figure 26. La résolution des DSB dans le CSR par le C-NHEJ et l'A-EJ.

Les DSB sont détectés par acteurs dont la protéine ATM qui phosphoryle à le complexe MRN et active la voie H2AX/MDC1/53BP1, ce qui permet un remaniement chromatinien et le recrutement des acteurs des voies DDR. Les DSB sont ensuite réparées grâce aux mécanismes de C-NHEJ ou de A-EJ. Le C-NHEJ fait intervenir Ku70/Ku86 et les DNA-PKcs pour rapprocher les deux extrémités puis l'ADN est lié par le complexe XRC4-XRF-LIG4. D'après Xu et al Nat Rev Immunol 2012 (82).

I.2.2. Ontogenèse B

Au cours de la vie, des acteurs essentiels à l'immunité adaptative : les cellules B, vont suivre une évolution dans le but de produire un anticorps dirigé contre un antigène présent sur un élément dangereux pour l'organisme (tel qu'une bactérie ou un virus par exemple).

Ce long processus démarre avant même la naissance au niveau du foie fœtal puis tout au long de la vie au niveau de la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes ou pHSC. Lors du développement fœtal, les pHSC originaires du sac vitellin puis de l'aorte-gonades-mésonephros (AGM) vont trouver une niche au niveau du foie fœtal, qui leur procurera les cytokines, chimiokines et les contacts cellulaires nécessaires pour leur évolution jusqu'au stade B1, c'est l'hématopoïèse primaire et secondaire. Après la naissance cependant, les pHSC s'installent définitivement dans la moelle osseuse où elles trouveront une niche stable, démarrant la troisième vague continue d'hématopoïèse. Durant leur développement, ces cellules vont évoluer et passer successivement 5 points de contrôle afin d'éviter la différenciation en cellules B non productrices d'anticorps ou produisant des anticorps autoréactifs reconnaissant des antigènes du soi, ou des anticorps non fonctionnels. (Figure 27) (92)

La première phase du développement B, permet à la pHSC d'évoluer en progéniteur lymphoïde/myéloïde multipotent (MMP) puis en progéniteur lymphoïde commun (CLP) qui expriment respectivement des récepteurs de cytokines : le récepteur du facteur macrophagique de stimulation des colonies (M-CSF), le récepteur du facteur 1 stimulant les colonies (c-FMS) pour le développement myéloïde et le récepteur à l'IL7, IL7R α pour le développement lymphoïde (à noter que l'IL7 a ce rôle chez la souris mais n'est pas essentielle chez l'homme). Ces progéniteurs établissent un contact étroit avec les cellules de leur niche constituée de cellules épithéliales et stromales mésenchymateuses qui vont produire entre autres les chimiokines CXCL10 et CXCL12 pour les attirer à elles, notamment grâce à l'interaction CXCR4/CXCL12. Les cellules de la niche vont également produire des cytokines nécessaires à la différenciation et la prolifération : l'IL7, le M-CSF et le ligand FLT3 (FLT3-L). A ce stade, l'engagement dans l'ontogenèse B commence avec l'expression du facteur de transcription E2A et des acteurs du réarrangement V(D)J des chaînes d'immunoglobulines : les protéines RAG1 et RAG2. Suite à ces événements, le réarrangement DH vers JH commence dans la cellule pro-pré-B et est achevé dans la cellule pro-B sur les deux allèles DH-JH/DH-JH. Il s'en suit l'expression des gènes codant pour le facteur de transcription EBF ainsi que les composants du substitut de la chaîne légère ou SLC, VpreB et λ 5. Les cellules pro-pré-B et pro-B expriment le facteur de transcription PAX5, marqueur de l'engagement dans la lignée B et prolifèrent activement. (Figure 27) (92)

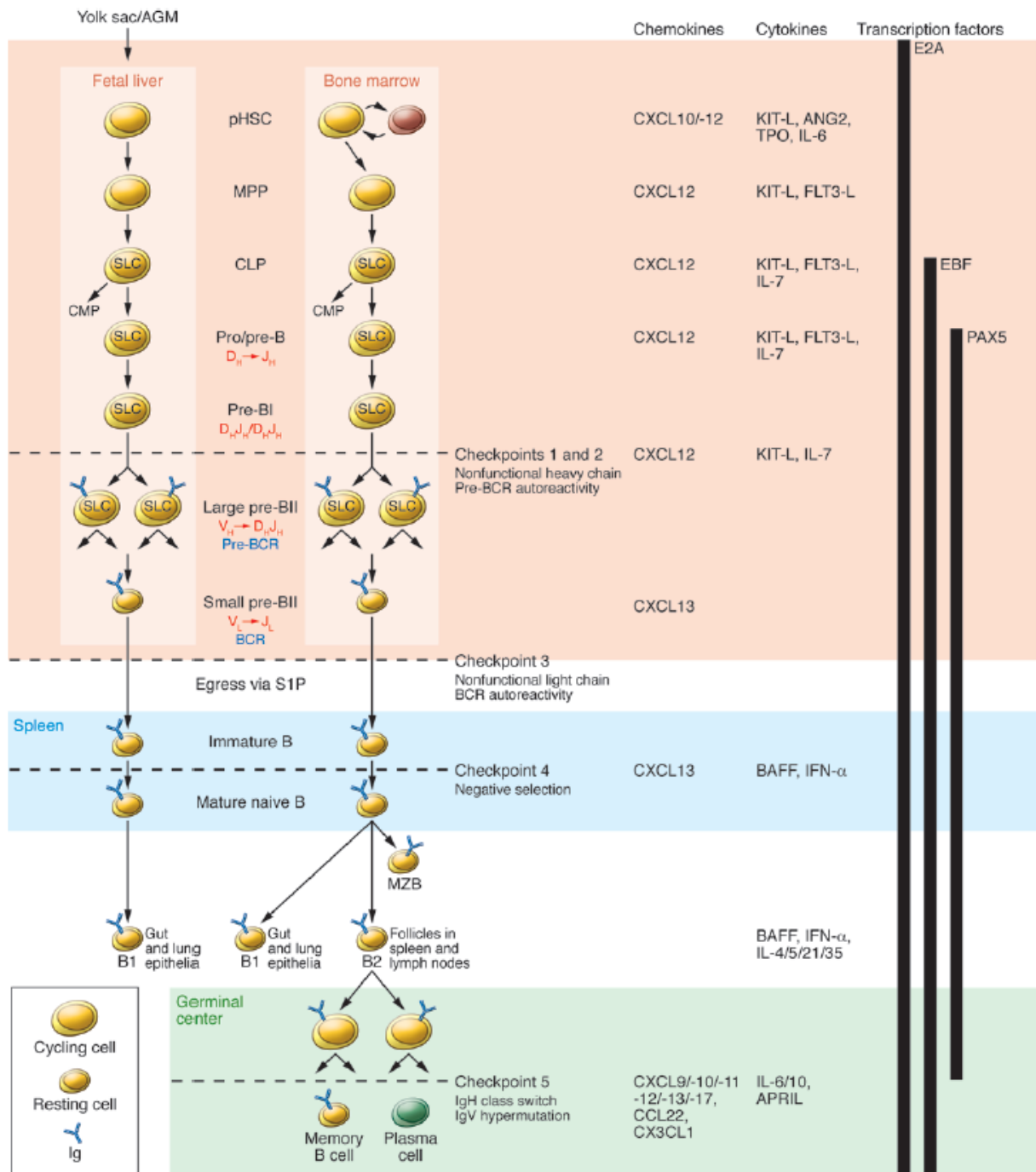


Figure 27. Illustration du développement B et leurs marqueurs cellulaires et transcriptionnels.

La cellule B se différencie à partir d'une cellule pHSC dans la moelle osseuse (ou dans le sac vitellin puis l'AGM chez l'embryon) où elle réarrange ses gènes d'immunoglobulines. La cellule B immature ainsi formée migre ensuite vers la rate où elle devient principalement une cellule B2. Après activation par l'antigène et prolifération intense au sein de structures appelées centres germinatifs, la cellule B2 peut se différencier en cellule B mémoire ou en plasmocyte sécrétant activement des immunoglobulines. Pré-BI = Pro-B et Pré-BII = Pré-B. D'après Melchers J Clin Invest. 2015 (92).

A ce moment, la cellule réarrange les segments de son locus *IGH* de VH vers DHJH devenant une cellule pré-B précoce sur laquelle le récepteur pré-B va se former uniquement si la chaîne lourde IgH réarrangée peut s'assembler avec le substitut de chaîne légère SLC, c'est le premier point de contrôle. Seules 30 à 50% des chaînes IgH nouvellement formées pourront effectivement s'assembler avec le SLC pour former le pré-BCR. Ce récepteur va ensuite être exprimé sur la surface de la cellule pré-B précoce et un deuxième point de contrôle a alors lieu, permettant de vérifier si ce pré-BCR possède une chaîne lourde IgH non-autoréactive lorsqu'il est exprimé à la surface cellulaire. Afin d'éviter qu'une cellule ne produise plusieurs pré-BCR, la cellule va inactiver l'expression de RAG1/2 permettant ainsi le maintien d'une expression monoallélique en évitant les réarrangements sur son second allèle. Au-delà de son rôle clé dans le phénomène d'exclusion allélique, le signal pré-BCR permet une prolifération transitoire dont ne pourront pas bénéficier les cellules qui n'ont pas passé les deux premiers points de contrôles, ce qui les mène automatiquement vers l'apoptose. Au contraire, si la cellule a passé ces deux points de contrôle elle quitte son contact avec sa niche dans la moelle osseuse et ce faisant va perdre sa capacité proliférative, devenant une petite cellule pré-B qui n'exprime plus l'IL7R. (Figure 28) (92,93)

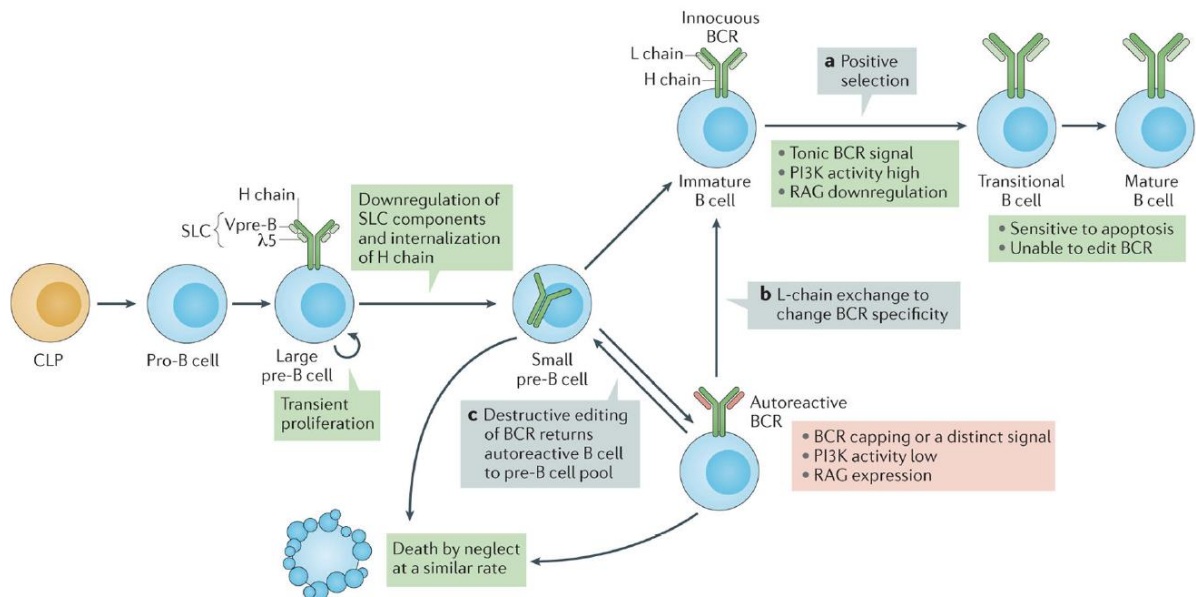


Figure 28. Mécanismes de sélection des cellules pré-B et B durant les stades précoces du développement.

L'expression du pré-BCR sur la grande pré-B permet une prolifération transitoire et la sélection d'un pré-BCR fonctionnel et non autoréactif. La cellule passe alors au stade de petite pré-B et subit une sélection négative qui élimine le BCR autoréactif. Chez la cellule B immature résultante, une deuxième sélection, positive cette fois a lieu qui permet de choisir définitivement le BCR avant son évolution en cellule B transitionnelle puis mature. D'après Nemazee Nat Rev Immunol. 2017 (94).

La cellule pré-B tardive internalise alors son pré-BCR et réalise le réarrangement de la chaîne légère VL vers JL grâce à la réexpression de RAG1/2 afin de pouvoir produire un BCR productif qu'elle exprime ensuite à sa surface. A ce stade un nouveau point de contrôle de l'autoréactivité du BCR a lieu, on l'appelle aussi sélection négative car toutes les cellules qui auront un BCR autoréactif vont finir par mourir par apoptose puisqu'elles ne prolifèrent plus. Lors de cette étape, les chaînes légères peuvent être échangées jusqu'à trouver un BCR fonctionnel et non autoréactif donnant naissance à la cellule B immature. Si le BCR est

fonctionnel, il va envoyer un signal tonique à la cellule qui passera le quatrième point de contrôle, c'est la sélection positive. La cellule B immature quitte alors la moelle osseuse via la circulation sanguine vers la région folliculaire de la rate, attirée par la chimiokine S1P et évolue en cellule B transitionnelle puis mature, au sein desquelles l'expression de RAG1/2 est de nouveau inactivée, rendant impossible la modification du BCR. (Figure 28) (92,93)

La cellule B mature résultante est dite naïve car elle n'a pas rencontré son antigène, exprimant principalement un BCR de type IgM et IgD. Une partie des cellules B matures formées dans le foie fœtal vont migrer vers les cavités pleurales et intestinales formant les cellules B1. Ces cellules B1 formées en grande partie lors de l'embryogenèse, se renouvellent constamment et peuvent évoluer en plasmablastes puis en plasmocytes à courte durée de vie (SLPC) de manière T-indépendante. Ainsi, les cellules B1 assurent la production des anticorps dit « naturels », principalement des IgM (Figure 29). (92,94–96)

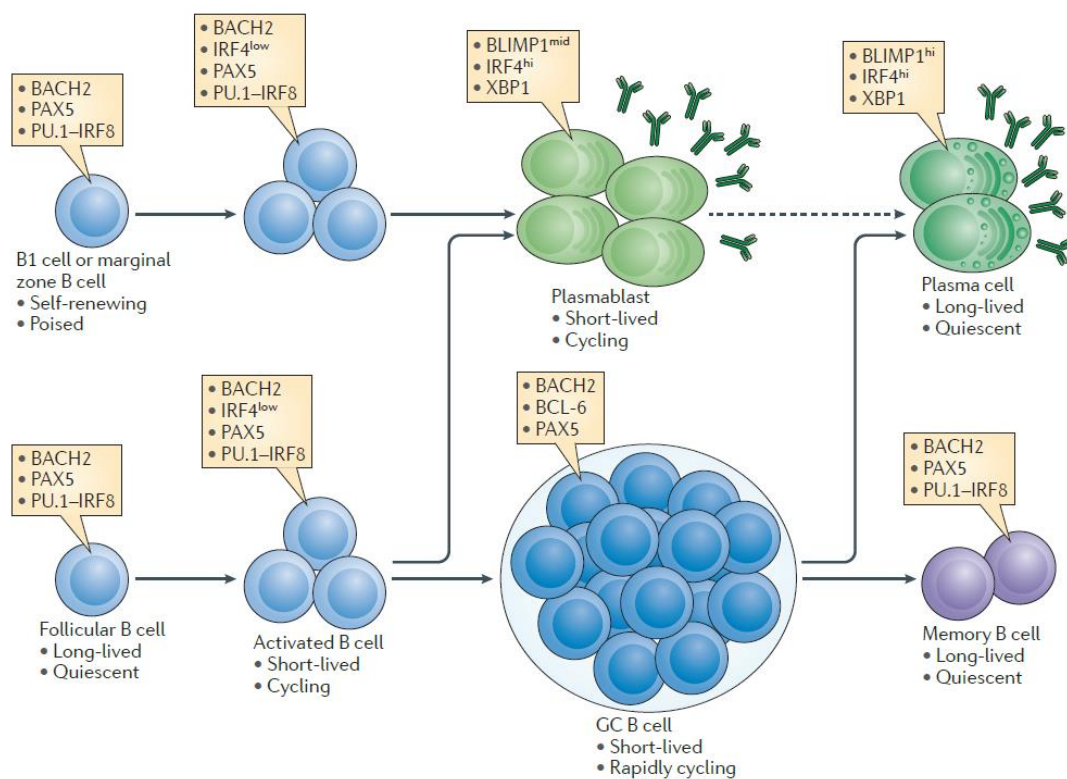


Figure 29. Différenciation tardive des cellules B en cellules B mémoires et plasmocytes et leurs marqueurs transcriptionnels.

Les cellules B1 et les cellules B2 de la zone marginale MZB donnent naissance directement à des plasmocytes à courte durée de vie (vert clair) suite à la reconnaissance de l'antigène par le BCR. Les autres cellules B2 ou cellules folliculaires quant à elles vont migrer vers le centre germinatif et devenir des cellules GC B (bleu foncé) où elles subissent la commutation de classe et l'hypermutation somatique. Les cellules GC B sont ensuite sélectionnées selon l'affinité de leur BCR envers l'antigène puis se différencient soit en cellules B mémoire (violet) soit en plasmocytes à longue durée de vie (vert foncé). Les marqueurs transcriptionnels de chaque type de cellule sont indiqués dans les cadres en jaune. D'après Nutt et al Nat Rev Immunol. 2015 (95).

L'autre partie des cellules B matures va quant à elle rester dans la rate ou migrer vers d'autres organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques ou les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), formant les cellules B2. Puis, elles vont se localiser soit dans la région marginale formant les cellules B de la zone marginale (MZB) ; soit au sein des

follicules B afin de former les cellules B2 ou cellules B folliculaires. Ces cellules B2 sont activées via la présentation de leur antigène par les FDC et vont migrer vers la zone T du follicule où elles interagissent avec les lymphocytes T folliculaires « helper » (Tfh). Cette interaction va provoquer la prolifération des cellules B2 pour former un centre germinatif qui deviennent alors des cellules GC B. A ce moment, les cellules GC B expriment AID qui va permettre l'hypermutation somatique (SHM) des parties variables des Ig dans la zone sombre (DZ) du GC puis la commutation de classe dans la zone claire (LZ) du GC. Les cellules GC B de la LZ vont alors être sélectionnées selon leur affinité avec l'antigène et leur capacité à proliférer durant un cinquième et dernier point de contrôle. Les cellules B sélectionnées prolifèrent activement et génèrent ensuite soit un plasmocyte à longue durée de vie (LLPC) si l'affinité BCR-antigène est forte ; soit des cellules B mémoires (Bmem) si leur BCR a une affinité un peu plus faible avec l'antigène. (Figure 30) (92,95,97)

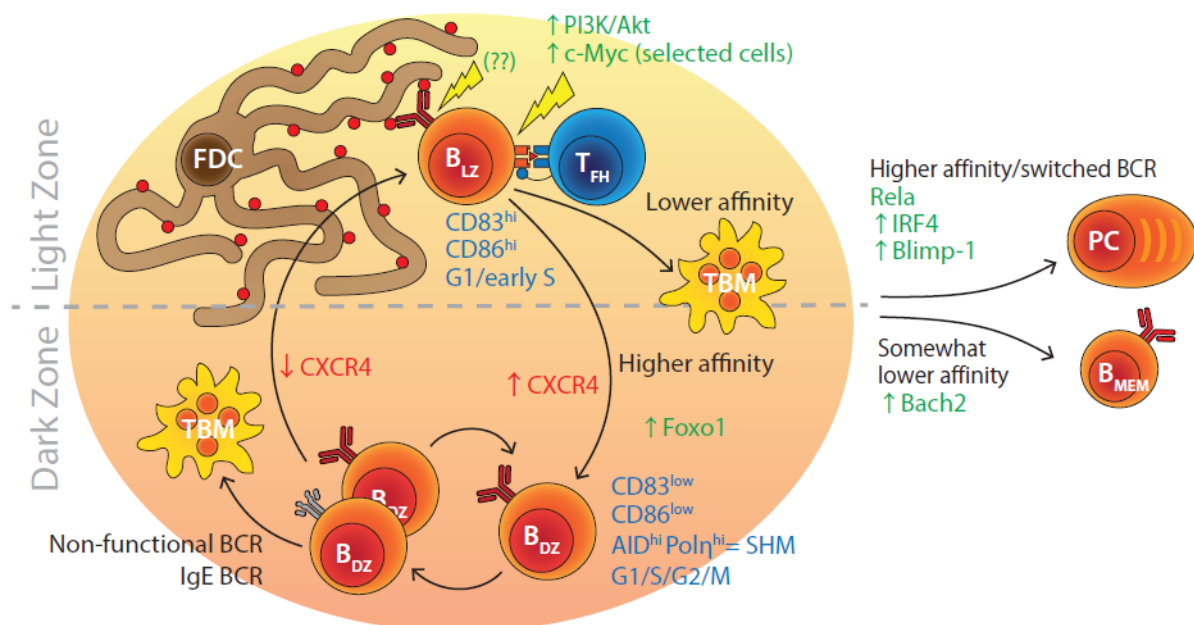


Figure 30. Illustration d'un centre germinatif.

Suite au contact avec l'antigène et son interaction avec la cellule T « helper » (Tfh), la cellule B2 va proliférer pour former un centre germinatif et devenir une cellule B du GC. Le centre germinatif possède deux zones : claire (LZ) et sombre (DZ). La cellule subit plusieurs sélections suivant la CSR dans la LZ (Bien que de récents articles suggèrerait qu'elle se déroulerait plutôt avant la formation du GC (98,99)) puis la SHM dans la DZ afin de sélectionner les cellules exprimant un BCR fonctionnel et afin pour l'antigène. Les cellules ayant un BCR de haute affinité se différencieront plutôt en plasmocyte (PC) alors que les BCR de plus faible affinité se différencieront plutôt en Bmem. L'expression génique est indiquée en vert, l'expression des marqueurs cellulaires en bleu et la modulation de l'expression de CXCR4 en rouge. D'après Mesin et al Immunity 2016 (97).

Le consensus scientifique établissait jusqu'à maintenant que la CSR avait lieu après la SHM au sein du GC cependant une récente étude de Roco et al a montré que la CSR aurait plutôt lieu dès son contact avec le Tfh juste avant la formation du GC et donc avant la SHM. En effet les GLT ainsi que APE1, l'enzyme nécessaire pour la CSR, sont exprimés un jour avant puis décroissent drastiquement suivant la formation du GC. Les auteurs suggèrent que ce mécanisme pourrait être régulé par BCL6 qui est capable de se fixer spécifiquement aux promoteurs des GLT et de APE1 pour bloquer leur expression et qui est surexprimé dans le GC. Leur analyse phylogénétique des cellules au sein de plusieurs GC ainsi que leur comparaison à des modèles in silico a également montré qu'il est plus favorable pour la cellule de réaliser la CSR avant la SHM afin de conserver une quantité suffisante de Bmem IgM. (Figure 31) (91,92)

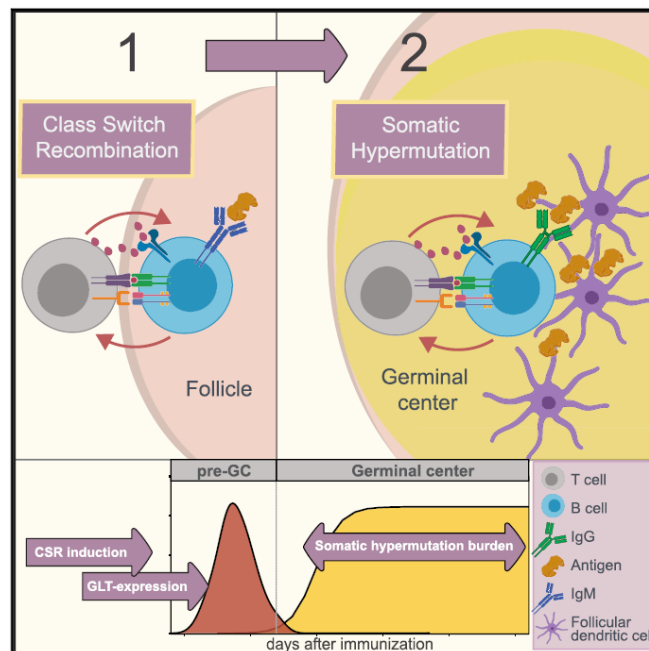


Figure 31. Déroulement de la CSR puis de la SHM lors de la formation du GC selon Roco et al.

Le récent article de Roco et al (98) remet en question le dogme selon lequel la CSR se produirait la LZ du GC et propose plutôt un déroulement successif où la CSR aurait lieu juste avant la formation du GC, avant la SHM. D'après Roco et al, Immunity 2019 (98).

De manière intéressante, on peut noter que les cellules GC B qui possèdent BCR IgE sont dirigées vers l'apoptose de la même manière que les celles qui ont un BCR non fonctionnel lors de leur passage dans la LZ et de celles qui expriment un BCR de faible affinité durant la sélection dans la LZ. Les cellules Bmem ont la capacité de se différencier en plasmocyte dès leur réexposition à l'antigène ce qui permet une réponse immunitaire rapide tandis que les LLPC assureront la sécrétion d'anticorps spécifiques de l'antigène durant une longue durée. Certaines cellules B activées directement par leur antigène ne rentrent toutefois pas dans le centre germinatif et donnent naissance directement à des SLPC tout comme les cellules MZB. Ce sont des réponses immunes dites extrafolliculaires qui sont plus rapides mais moins efficaces contre l'antigène (Figure 29). (92,95,97)

I.3. Les maladies liées à la cellule B et les syndromes lymphoprolifératifs

I.3.1. Les allergies IgE-dépendantes

Les allergies sont des maladies déclenchées lorsque le système immunitaire réagit de manière excessive contre un antigène appelé allergène, présent dans l'air, un aliment, un médicament ou un matériau. Ainsi les allergies sont également appelées syndromes d'hypersensibilité, séparées communément en 4 types selon les acteurs dirigeant la réaction : le type I dit immédiat pour l'IgE ; les types II et III dits semi-retardés pour l'IgM/IgG responsables respectivement des cytopénies médicamenteuses et des vascularites ; et le type IV dit retardé pour les hypersensibilités cellulaires comme la dermatite de contact. A noter qu'à ce jour ces 4 types d'hypersensibilités décrits en 1968 par Gell et Coombs ne regroupent pas tous les types d'allergies connus (100,101). On peut également distinguer les allergies de type atopique qui présentent un caractère héréditaire des allergies non atopiques. Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux allergies IgE-dépendantes qui représentent la majorité des allergies regroupant notamment la dermatite atopique, l'asthme allergique, les rhinites et les conjonctivites allergiques ou encore certaines allergies alimentaires.

La réponse immunitaire allergique peut être séparée en deux phases : la sensibilisation et la phase de déclenchement.

La phase de sensibilisation consiste au premier contact de l'allergène avec le système immunitaire. Les cellules épithéliales en contact direct avec l'allergène sont les premières à répondre soit de par une prédisposition génétique, soit de par la présence de substance adjuvantes ou de lésions. En effet les prédispositions génétiques telles que les mutations sur des gènes importants pour la barrière épithéliale (par exemple la filaggrine, SPINK5 ou la cornéodesmosine), les substances adjuvantes et les lésions favorisent l'inflammation nécessaire à la réaction d'hypersensibilité. En conséquence, les cellules épithéliales vont produire de l'IL-33, de l'IL-25 et de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) (102) qui vont stimuler les cellules lymphoïdes innées de type 2 ou ILC2 (103) et les cellules dendritiques (DC). Ces dernières vont alors exprimer le ligand OX40L, tout en présentant l'allergène capté aux lymphocytes T CD4+ dans les organes lymphoïdes secondaires. Le lymphocyte T se différencie alors en lymphocyte T helper de type 2 (Th2) sous l'influence de la liaison de son récepteur OX40 avec son ligand (104). Le lymphocyte Th2 va produire ses cytokines effectrices IL-5, IL-4 et IL-13 ainsi que de l'IL-3 et son récepteur l'IL-3R, ce qui aura pour effet de renforcer sa sécrétion de cytokines (105). Localement, de nombreuses cellules de l'immunité innée dont les mastocytes et les basophiles produisent également de l'IL-4, ce qui favorise la différenciation en Th2 et dirige la CSR des cellules B vers IgE (106,107). Les ILC2 une fois stimulées par les cytokines des cellules épithéliales produisent également de l'IL-5 qui permet le recrutement des éosinophiles, ainsi que de l'IL-13 (108). Après leur interaction avec les Th2, les cellules B activées prolifèrent puis se différencient en cellules B mémoire exprimant des IgG1 ou en plasmocytes produisant des IgE ou IgG1, sous l'influence de l'IL-4 et de l'IL-13 (109). Les IgE circulantes produites par les plasmocytes vont ensuite venir se fixer à leurs récepteurs de haute affinité FcεRI présents sur les mastocytes et les basophiles (110) et sur leur récepteur de faible affinité FcεRII/CD23 présents sur les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles, les DC et les cellules B (111). A noter que durant ce mécanisme, les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont inhibés par la production massive d'IL4. Le rôle des Treg étant d'inhiber la réponse Th2 via la production d'IL-10 et de TGF-β, cela aggrave la réponse allergique (112). Récemment, un autre type de lymphocyte T helper Th9 dérivés des Th2 a montré avoir un rôle important dans l'allergie en produisant de l'IL-3 et de l'IL-9. Ces

cytokines permettent notamment l'activation des mastocytes ainsi que l'augmentation de la production d'IgE par les cellules B (113). (Figure 32)

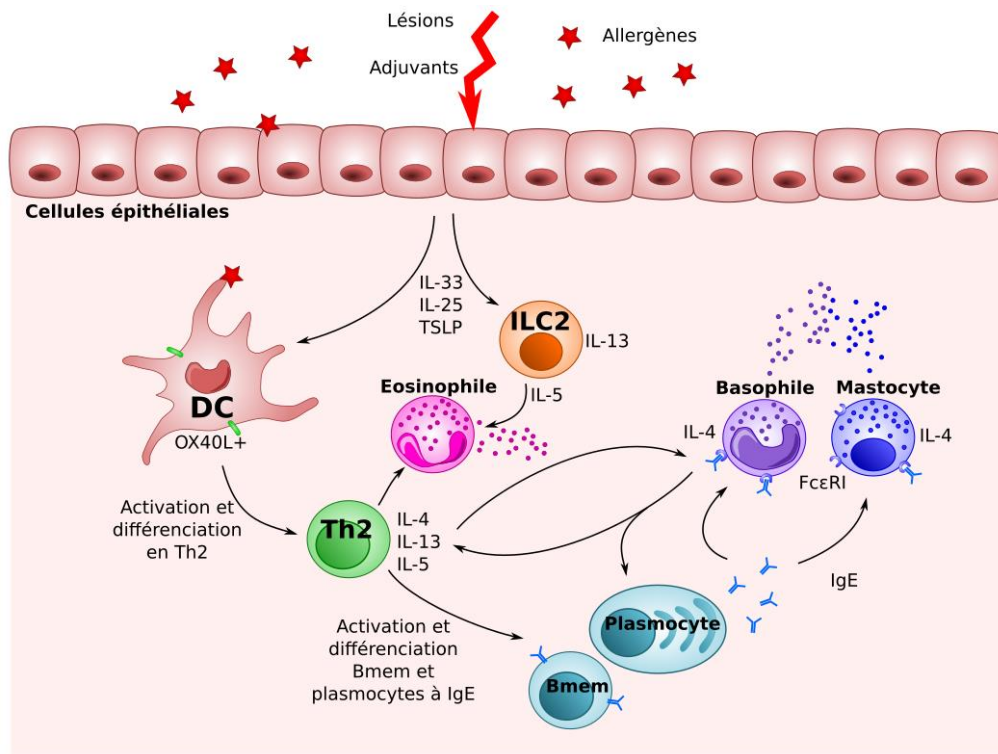


Figure 32. Mécanisme général d'une allergie IgE-dépendante

Une réponse allergique commence avec la captation de l'allergène (étoile rouge) par la cellule dendritique qui va diriger la différenciation des cellules T en Th2 sous l'influence des cytokines sécrétées par les cellules épithéliales. Les Th2 jouent un rôle central en stimulant la différenciation des plasmocytes producteurs d'IgE et le recrutement des éosinophiles avec les ILC2. La fixation d'IgE sur son récepteur FcεRI provoque la dégranulation des basophiles et des mastocytes. Les effecteurs produits par les basophiles, mastocytes et éosinophiles (points violets, bleus et roses) sont responsables des symptômes de l'allergie.

La seconde phase se déclenche lors d'un deuxième contact avec l'allergène où celui-ci se fixe à l'IgE ancrées sur les cellules et provoque l'activation d'un signal d'inflammation. La fixation de l'allergène va notamment provoquer la dégranulation des mastocytes et des basophiles, libérant des histamines et de nombreuses enzymes protéolytiques ainsi que la production de facteurs d'inflammation comme les prostaglandines (PG) ou les leucotriènes (LT). Tous ces acteurs vont installer une inflammation cellulaire localisée dans le tissu, provoquant des dysfonctionnements et/ou des lésions qui seront responsables des symptômes de l'allergie. Dans certains cas, la réaction allergique peut même devenir généralisée, on parle alors de réaction anaphylactique. Certains médiateurs comme le facteur d'activation des plaquettes (PAF) produit par les basophiles et les mastocytes mais aussi par les neutrophiles et les macrophages, sont associés à la réaction anaphylactique chez l'homme. (114) (Figure 33)

I.3.2. Les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes peuvent être regroupées dans les syndromes d'hypersensibilité non allergiques où la réponse immunitaire sera cette fois dirigée contre un antigène du soi. Ainsi une partie des patients atteints d'allergies comme la dermatite atopique, la rhinite allergique ou l'urticaire chronique possèdent des IgE dirigés contre le soi et ont en conséquence des allergies spontanées (122). Cette réponse immunitaire inadaptée peut être provoquée par des mutations sur des gènes importants dans la sélection ou la survie des cellules immunitaires et/ou par la présence d'un déclencheur dans l'environnement comme une infection par exemple. C'est la nature de l'auto-antigène qui déterminera la spécificité tissulaire et donc la nature de la maladie auto-immune, affectant les intestins pour la maladie cœliaque, le cerveau et la moelle épinière pour la sclérose en plaque (SEP) ou encore la thyroïde pour la thyroïdite auto-immune par exemple. Certaines maladies auto-immunes touchent même plusieurs organes comme dans la polyarthrite rhumatoïde (RA) ou le lupus érythémateux systémique (SLE). Nous ne nous intéresserons ici qu'à quelques exemples de maladies auto-immunes dont le mécanisme est connu et fait intervenir l'immunité humorale. (123)

Au sein des maladies auto-immunes tissu-spécifiques, on retrouve la maladie cœliaque qui se caractérise par des symptômes digestifs notamment lors de l'ingestion de gluten. Dans l'intestin, le gluten est digéré de manière incomplète, fractionné en petits peptides qui sont absorbés et entrent dans la lamina propria. Ces peptides sont pris en charge par l'enzyme transglutaminase (TTG) qui, chez les individus prédisposés possédant des HLA-DQ2 et HLA-DQ8, provoque une réaction immunitaire adaptative avec notamment la production d'IgA anti-TTG et une réaction immunitaire innée par un procédé qui est encore inconnu à ce jour (124). De la même manière, il y a présence de cellules T autoréactives et d'autoanticorps dirigés contre le récepteur des thyroïdostimulines qui provoquent une hyperthyroïdie dans la maladie de Graves (125). Des autoanticorps sont aussi dirigés contre les mélanocytes dans le vitiligo (126) ou contre les desmoglénines dans le pemphigus (127). L'origine de la production des auto-anticorps pourrait s'expliquer par des variants génétiques mais également par une cross-réactivité avec le soi de certains anticorps dirigés contre des pathogènes (123,128).

Dans le SLE, on retrouve des Ig dirigées contre les phospholipides et contre des antigènes nucléaires comme l'ADN ou les histones. Ces anticorps pouvant être d'isotype IgE forment également des complexes immuns se déposant dans de nombreux organes, causant une inflammation locale médiée par les cellules T qui explique le caractère généralisé de la maladie (122,129,130). Dans la RA au contraire c'est un dysfonctionnement durant le développement B, notamment un défaut de SHM, qui pourrait être à l'origine de la plupart des symptômes. Certaines cellules B produisent en effet des IgG/A/M autoréactives et hypo-glycosylées dirigées contre les protéines citrullinées (ACPA). Les ACPA forment des complexes immuns avec leur antigène sur lesquels se lient les facteurs rhumatoïdes menant à l'activation du complément et peuvent activer directement les macrophages et les ostéoclastes au niveau des articulations (131,132). Une autre maladie liée à l'IgG4 ou IgG4-RD qui est probablement une maladie auto-immune est provoquée par l'infiltration de plasmocytes à IgG4 au sein des organes ce qui crée des fibroses et de l'inflammation. La présence d'autoanticorps dirigés contre les glandes exocrines a été montrée mais l'implication directe des IgG4 dans la pathologie reste encore à prouver (133).

Pour certaines maladies non auto-immunes on trouve également des réactions inflammatoires associées à la production d'Ig. Dans le cas de la maladie de Crohn, qui est une maladie

inflammatoire non auto-immune, ce ne sont pas des autoanticorps qui sont produits mais des anticorps dirigés contre la levure du microbiote *Saccharomyces cerevisiae*. Il est aussi observé une infiltration de plasmocytes dans la lamina propria et une dérégulation de la production d'Ig passant d'une production d'IgA dimérique à des IgG et des IgA monomériques (134). Dans la maladie de Berger ou néphropathie à IgA, il est admis que c'est une production anormale d'IgA1 hypoglycosylées qui va causer la pathologie. Cette IgA1 hypoglycosylée peut être reconnue par des anticorps IgA ou IgG avec lesquels elle forme des complexes immuns qui vont se déposer au niveau des glomérules rénaux, causant une néphropathie (135). Cependant le caractère auto-immun de cette maladie est discuté, en effet certains patients atteints de la maladie de Berger ne présentent pas d'IgA1 hypoglycosylée ce qui implique l'existence d'un autre mécanisme menant à la pathologie. De récentes publications suggèrent notamment qu'un défaut de maturation des IgA produites dans les muqueuses pourrait participer à la mise en place de la néphropathie (136,137).

A l'heure actuelle, les maladies auto-immunes sont traitées par des traitements symptomatiques visant à diminuer l'inflammation comme les corticoïdes ou des traitements immunomodulateurs comme l'hydroxychloroquine, le méthotrexate ou le mycophénolate mofétil. D'une manière intéressante, le traitement par immunothérapie anti-CD20 (rituximab) qui induit une déplétion des cellules B a montré des résultats intéressants dans la SLE, la RA ou encore le pemphigus mais présente également de lourds effets secondaires (126,127,129,138). Les inhibiteurs du TNF α sont également utilisés dans le traitement de la RA et la maladie de Crohn (134,138). Des thérapies ciblées plus efficaces et mieux tolérées sont donc fortement attendues dans le traitement des maladies auto-immunes.

I.3.3. Les syndromes lymphoprolifératifs B

Les syndromes lymphoprolifératifs sont des maladies associées à la prolifération maligne ou non d'un lymphocyte B, T ou NK ou d'un plasmocyte. Ces maladies regroupent tous les stades cellulaires du développement B, menant à des caractéristiques différentes selon le type cellulaire touché et leur localisation. Ainsi, la prolifération maligne de cellules B dans la moelle osseuse et le sang donne lieu à des leucémies, celles de cellules B dans les organes lymphoïdes donne lieu à des lymphomes tandis que la prolifération des plasmocytes dans la moelle osseuse est à l'origine du myélome multiple ou d'autres gammopathies monoclonales bénignes. (139)

Les leucémies lymphoïdes les plus fréquentes sont la leucémie lymphoblastique aiguë (ALL) qui est le cancer le plus courant chez l'enfant (140) et la leucémie lymphoïde chronique (CLL) qui touche surtout les personnes âgées. La CLL a une origine incertaine, probablement une cellule B aillant rencontré son antigène indépendamment du GC, pré ou post-GC car elle exprime le marqueur CD5 mais assez peu son BCR. Ces cellules expriment AID et sont donc susceptibles aux mutations et aux délétions chromosomiques. Dans la CLL, on retrouve en effet de nombreuses délétions chromosomiques touchant les miRNAs suppresseurs de tumeurs miR-16-1 et miR-15a (Del[13q]) et les gènes *ATM* (Del[11q]) et *TP53* (Del[17p]) impliqués respectivement dans la réparation de l'ADN et dans l'apoptose. De plus les gènes *TP53*, *SF3B1* ou *MYD88* sont fréquemment mutés, ce qui favorise la survie de la cellule cancéreuse. (141,142)

Il existe deux types de lymphomes, dits Hodgkiniens lorsque les cellules cancéreuses présentent une forme caractéristique de Reed-Sternberg, très grandes et atypiques, tous les autres étant dits non Hodgkiniens (NHL) dont le lymphome folliculaire (FL) et le lymphome

diffus à grandes cellules B (DLBCL) sont les plus fréquents. Le lymphome hodgkinien représente 15 à 25% de tous les lymphomes et est le plus fréquent chez l'enfant et le jeune adulte. Il a pour origine une cellule B mature post-GC qui a cependant perdu certaines caractéristiques B comme l'expression des marqueurs CD20 ou CD79a. Dans le lymphome Hodgkinien, on observe une activation constitutive des voies NF- κ B et des kinases JAK-STAT normalement activées respectivement par un signal BCR tonique lors de la reconnaissance de l'antigène et par la fixation des IL comme l'IL-2 et l'IL-6 sur leurs récepteurs. Ces deux voies deviennent actives lorsque des mutations et/ou amplification des gènes clés tels que *REL* et *NFKB1* pour la voie NF- κ B ou *JAK2* et *STAT6* pour la voie JAK/STAT. Ces deux voies étant anti-apoptotiques, l'accumulation de mutations permet la transformation en cellules cancéreuses (143).

Parmi les NHL, le DLBCL est le plus commun et représente environ 35% des NHL. La plupart du temps, le DLBCL survient lors de la transformation d'une cellule B mature activée, on parle alors du type ABC, d'une cellule B du GC de type GCB ou encore d'une cellule B post-thymique du médiastin de type PMBL. Chaque sous-type de DLBCL possède des caractéristiques propres à l'origine de la transformation cancéreuse. Ainsi, des translocations de *BCL2* t(14;18) menant à l'activation de BCL6, le régulateur principal de la prolifération cellulaire des GCB, sont retrouvées dans 34% des GCB-DLBCL tandis que c'est plutôt une activation constitutive de la voie NF- κ B par des mutations et des mutations du gène *MYD88* qui sont retrouvés dans 37% des cas d'ABC-DLBCL (144). Le FL est également un NHL fréquent impliquant des cellules B du GC ayant effectué la CSR et la SHM. Plusieurs phénomènes sont à l'origine de la transformation cancéreuse des cellules du FL dont, en premier, une translocation du chr.14 vers le chr.18 (t[14;18]) dans 85% des cas, puis l'accumulation de mutations ponctuelles inactivant notamment le gène suppresseur de tumeur *MLL2* dans plus de 80% des cas. La t(14;18) survient lors d'une recombinaison VDJ anormale durant le développement précoce B et mène au placement du gène *BCL2* sous l'influence des régulateurs transcriptionnels de *IGH* mais n'est pas suffisante en elle-même pour induire une transformation cancéreuse. La cellule B devient donc mature et migre vers les GC où elle peut accumuler des mutations ponctuelles lors de la SHM tout en étant moins sensible à l'apoptose grâce à la surexpression de BCL2, ce qui mène à sa transformation cancéreuse. La plupart des mutations retrouvées dans le FL inactivent des gènes importants dans le remaniement chromatinien, comme les gènes *MLL2* et *EZH2* (27%) qui sont respectivement responsables de la méthylation de H3K4 et H3K27, ou *CREBBP* (33%) ou encore des gènes suppresseurs de tumeurs comme *TNFAIP3* (Figure 34) (145). L'inhibition du signal BCR dans le traitement du DLBCL et des FL avec l'ibrutinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton (BTK), se révèle efficace en particulier sur les tumeurs dépourvues de mutations de la voie NF- κ B (146,147). Cela ouvre la voie au développement d'autres traitements ciblant le signal BCR qui pourraient venir compléter l'arsenal thérapeutique.

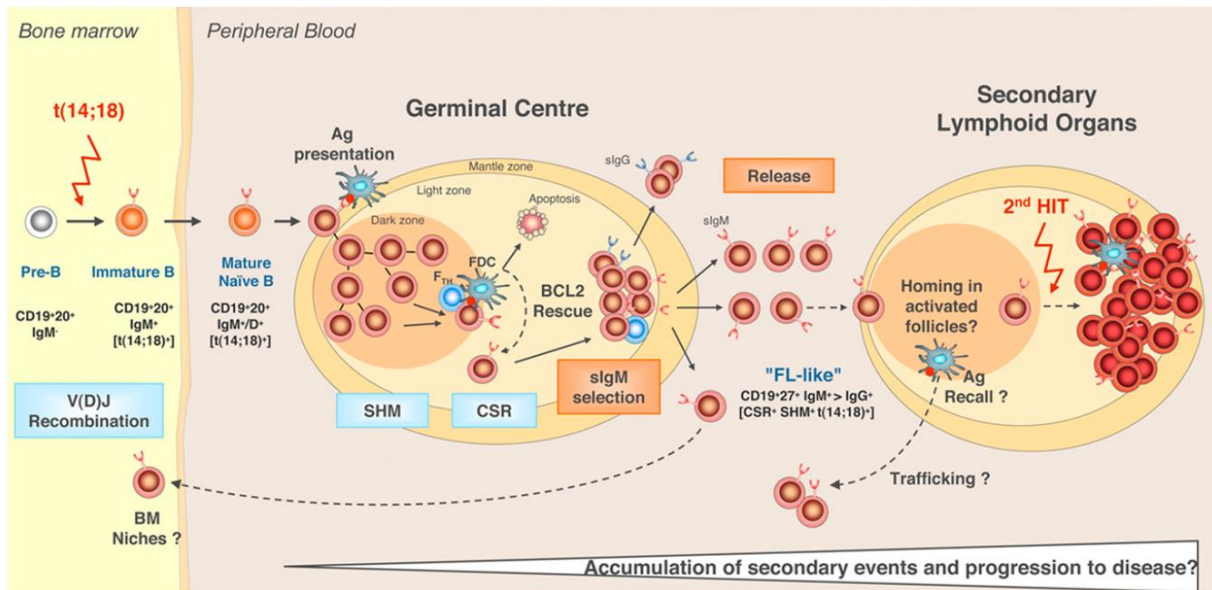


Figure 34. Exemple de processus de tumorigénèse dans le lymphome folliculaire (FL).

Le lymphome folliculaire résulte d'un développement B anormal durant lequel une translocation t(14 ;18) survient lors du réarrangement VDJ puis l'accumulation de mutations durant la SHM et le CSR dans le GC. D'après Kahl et Yang Blood 2016 (145).

Pour finir, les plasmocytes correspondant au stade ultime du développement B peuvent également être à l'origine de pathologies cancéreuses comme la macroglobulinémie de Waldenström (WM) et le myélome multiple (MM), et de gammathies monoclonales bénignes. La WM est une maladie rare qui se caractérise par la prolifération dans la moelle osseuse de cellules lymphoplasmocytaires pas totalement différenciées en plasmocytes et produisant des IgM monoclonales. La mutation génétique L265P de *MYD88* et d'autres mutations de *MYD88* sont retrouvées dans 80 à 95% des cas de WM ainsi que des mutations activatrices du gène *CXCR4* chez 20 à 40% des patients qui sont probablement à l'origine de la pathologie (148). Le MM au contraire résulte d'une prolifération dans la moelle osseuse d'un clone plasmocytaire totalement différencié menant à diverses cytopénies et touchant principalement les personnes âgées. Des translocations sur le chr.14 dans le gène *IGH*, plaçant des oncogènes sous l'influence des enhanceurs du locus mais également des hyperdiploïdies sont fréquemment retrouvées dans 50% des tumeurs de myélome. Les translocations t(4;14) (10 à 15%), t(6;14), t(11;14), t(14;16) et t(14;20) (2 à 4%) augmentent fortement la transcription des oncogènes *MMSET/FGFR3*, *CCND1*, *CCND3*, *MAF* et *MAFB* respectivement. L'expression de ces oncogènes a pour effet d'augmenter la quantité de cycline D, soit directement via les gènes *CCND1* et *CCND3* soit indirectement par les facteurs de transcription *MAF* et *MAFB* qui ciblent *CCND2* ou encore *MMSET/FGFR3* qui augmentent également l'expression de *CCND2* par un mécanisme inconnu (149,150). L'augmentation de la quantité de cycline D mène à une dérégulation du point de contrôle des phases G1/S du cycle cellulaire et à la prolifération des plasmocytes. D'autres altérations chromosomiques telles que la del(17p) porteur de *TP53* (8 à 10%), le gain(1q) (30 à 35%), la translocation ou l'augmentation du nombre de copies du gène *MYC* (15 à 20%) et des mutations ciblant les gènes *TP53* ou *ATM* semblent également participer à la transformation cancéreuse (151).

La MW et le MM sont très souvent précédés par une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) qui se caractérise par l'apparition d'un pic d'Ig monoclonale

sérique, le plus fréquemment de type IgG (70%), sans infiltration de la moelle osseuse. Ce phénomène ne provoque presque pas de symptômes et n'est donc pas traité mais peut évoluer à terme vers un lymphome, une MW ou un MM et/ou peut provoquer des atteintes rénales due à la gammopathie monoclonale (MGRS) comme la maladie de dépôt d'Ig ou une amylose de chaîne d'Ig détaillées dans la partie suivante. (152)

I.3.4. Les atteintes rénales due aux gammopathies monoclonales (MGRS)

Au cours d'un syndrome lymphoprolifératif comme le MM, la WM ou le MGUS, les Ig monoclonales produites en excès peuvent en elles-mêmes causer des maladies d'atteintes rénales ou MGRS telles que les maladies de dépôts d'immunoglobulines (MIDD), des amyloses de chaînes d'Ig, des glomérulonéphrites prolifératives avec dépôt d'Ig monoclonale ou encore des tubulopathies comme le syndrome de Fanconi. Les Ig monoclonales complexées, entières ou simple chaîne peuvent en effet se déposer dans les organes causant des lésions et des dysfonctionnements tissulaires. L'organe le plus touché est le rein puisque sa fonction est d'éliminer les Ig, ce qui mène à des néphropathies diverses voire à l'insuffisance rénale. (153)

Les MIDD sont séparées en trois catégories selon le type de dépôt : la LCDD pour les chaînes légères (la plus fréquente), la HCDD pour les chaînes lourdes et la LHCDD pour les deux types de chaînes en même temps. Lors d'une MIDD, une chaîne d'Ig mal repliée est produite ce qui la rend capable de se lier aux protéines de la matrice extracellulaire créant des dépôts, en particulier au niveau des glomérules rénaux (153). Parmi les amyloses liées aux Ig on retrouve l'amylose des chaînes légères amyloïdes ou amylose AL et plus rarement l'amylose des chaînes lourdes amyloïdes. Dans l'amylose AL, les chaînes légères libres κ ou λ mal repliées s'agrègent de manière anormale et forment des fibrilles amyloïdes au niveau des tissus cardiaques et rénaux notamment. A noter que l'amylose AL n'est pas forcément secondaire à un syndrome lymphoprolifératif mais y est fréquemment associée (154).

I.4. Les oligonucléotides antisens

I.4.1. Principe et structures chimiques

Les ASO sont un des premiers outils de modulation de l'expression génique utilisés dans l'histoire. Leur principe a été décrit par les auteurs Zamecnik et Stephenson en 1978 (155) et a précédé la découverte d'autres technologies de modulation de l'expression génique telles que l'interférence à l'ARN (RNAi) en 1999 à l'aide de siRNA ou de shRNA (156) ou encore plus récemment en 2012 de la technologie CRISPR-Cas9 (157). Les oligonucléotides antisens (ASO) sont de courtes séquences simple chaîne d'ADN modifié d'environ 20 nucléotides et complémentaire à un ARN cible. Un ASO permet, selon sa structure chimique, soit de moduler la maturation de l'ARN lors de l'épissage, la polyadénylation ou la traduction soit de provoquer la dégradation de l'ARN via le recrutement de la RNase H. Ces mécanismes seront détaillés dans la prochaine partie.

Tous les ASO sont constitués d'ADN modifié chimiquement au niveau du squelette phosphodiester, du ribose et/ou des bases. En effet, bien qu'une chaîne d'ADN non modifiée puisse agir comme un ASO, elle est trop rapidement dégradée par les nucléases pour être efficace et des modifications chimiques sont donc indispensables pour augmenter la résistance à cette dégradation (158). Il existe plusieurs modifications chimiques pouvant être associées au sein d'un même ASO : les modifications du squelette phosphodiester, du ribose ou encore des bases les plus utilisées sont illustrées Figure 35 (pour revue (159)).

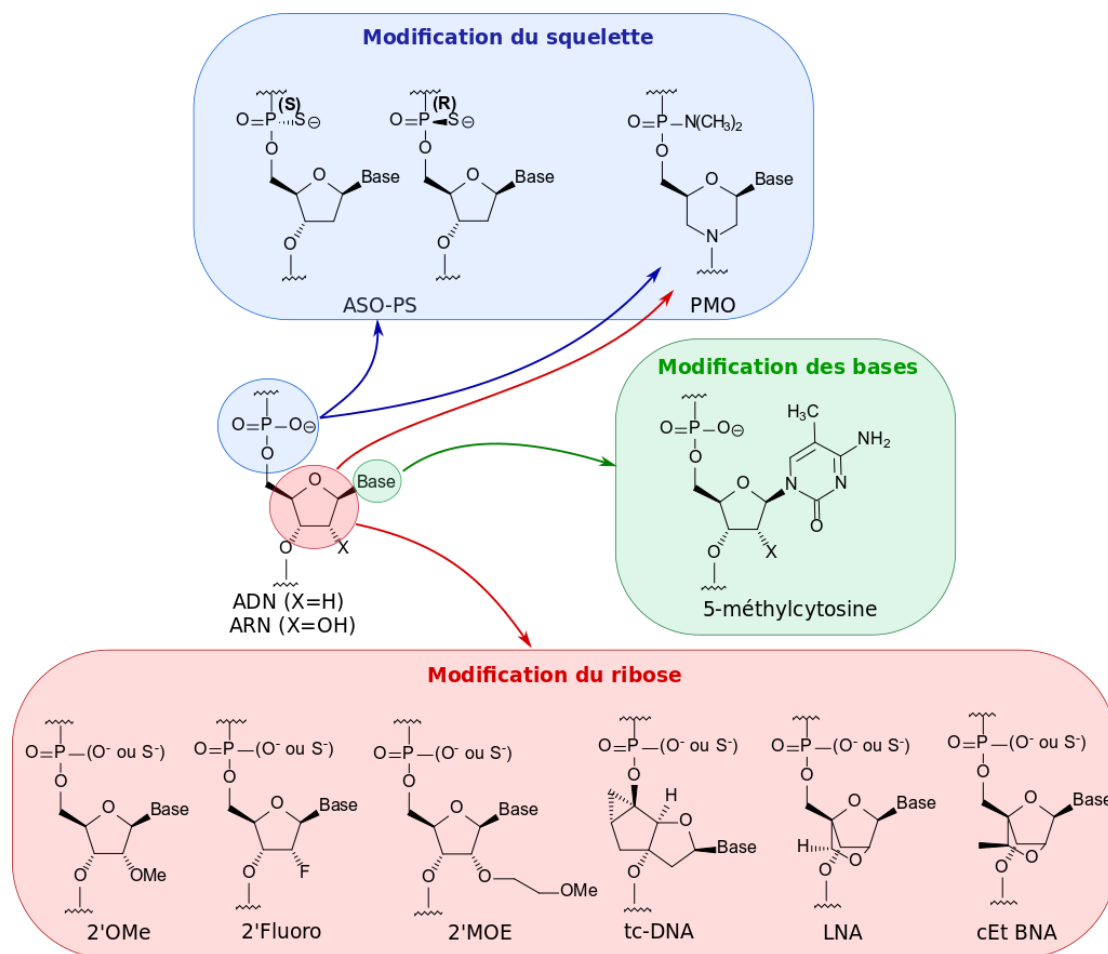


Figure 35. Les différentes structures chimiques des ASO.

Les modifications du squelette telles que l'ASO-PS (phosphorothioate), permet une augmentation de la résistance aux nucléases et surtout une augmentation de la distribution in vivo mais diminue également l'affinité à l'ARN, ce qui nécessite l'ajout d'autres modifications. Les modifications en 2' du ribose comme les 2'-O-Methyl (2'OMe), 2'-O-méthoxy-éthyl (2'MOE) ou 2'-Fluoro (2'Fluoro) permettent une augmentation de l'affinité à l'ARN et cette affinité est d'autant plus importante dans les modifications de contrainte du ribose comme les ASO verrouillés (LNA) ou les ASO contraints par un groupement éthyle (cEt BNA). Le ribose peut être également modifié pour former un tri-cycle (tc-DNA) ce qui favorise la biodistribution de l'ASO (160). Une autre modification chimique, l'oligomère morpholino phosphorodiamidate (PMO) combine une modification du squelette en phosphorodiamidate et une modification du ribose en morpholino, ce qui le rend idéal pour les mécanismes de blocage stériques mais le rend aussi incapable de recruter la RNase H. Pour finir certaines bases comme la cytosine peuvent également être modifiées par l'ajout d'un groupement méthyle en 5' afin de diminuer l'effet pro-inflammatoire de certains ASO (161).

La modification la plus commune est le squelette phosphorothioate ou PS-ASO qui permet une augmentation de la résistance aux nucléases tout en gardant la capacité de recruter la RNase H pour promouvoir la dégradation de l'ARN cible (162). Le squelette phosphorothioate favorise les liaisons non spécifiques aux protéines, ce qui augmente la distribution tissulaire de ce type d'ASO via la fixation aux protéines plasmatiques comme l'albumine (163) mais également leur distribution cellulaire via la fixation aux protéines de la surface cellulaire et du trafic intracellulaire (164,165). Cependant, cette fixation est à double tranchant puisqu'elle

participe à la toxicité de l'ASO, pro-inflammatoire par l'activation du complément et thrombotique par l'activation plaquettaire nécessitant une limitation des doses (166). Cette modification a aussi pour effet adverse de baisser l'affinité de liaison à l'ARN et elle est donc fréquemment utilisée en associations avec d'autres modifications augmentant l'affinité à l'ARN telles que les modifications du ribose (159). Récemment, une étude a montré que le contrôle de la stéréochimie des liaisons PS permettait d'augmenter l'efficacité de clivage de la RNase H par l'insertion de liaisons $S_pS_pR_p$ ainsi que la stabilité par l'enrichissement en liaisons S_p . R_p et S_p étant respectivement les stéréoisomères R (pour Rectus) et S (pour Sinister) de la liaison P-S (167).

Une partie des modifications du ribose consistent en l'ajout d'une fonction en 2' du ribose : O-méthyl (2'OMe), O-méthoxy-éthyl (2'MOE) ou Fluoro (2'Fluoro), ce qui accroît respectivement de manière croissante l'affinité à l'ARN ainsi que la résistance aux nucléases (168). Les modifications 2'Fluoro sont cependant peu utilisées dans les thérapies à base d'ASO car elles provoquent une toxicité hépatique (169,170) mais elles sont toujours utilisées dans les technologies RNAi où cette toxicité semble moins présente de par leur nature double brin (171). D'autres modifications du ribose par formation d'un cycle supplémentaire furanose reliant les carbones 2' et 4' du ribose permettent une résistance totale à la dégradation par les nucléases ainsi qu'une augmentation significative de l'affinité pour l'ARN (172). La formation de ce cycle furanose va en effet bloquer le ribose en conformation de type A plus proche de l'ARN que de l'ADN (type B) dans les ASO verrouillés ou LNA et leurs analogues avec groupement éthyle ou cEt-BNA (173). Une autre modification du ribose constituée d'un triple cycle ou tc-DNA permet une augmentation de l'affinité à l'ARN, quoique moindre que les LNA. Les tc-DNA ont l'avantage de favoriser la distribution dans des organes difficilement atteignables comme le cerveau ou le cœur par la formation spontanée de nanoparticules de 40 à 100nm qui imitent la structure des agents de transfection (160,174). Toutes ces modifications du ribose abrogent le recrutement de la RNase H et par conséquent la possibilité de dégradation de l'ARN mais peuvent être utilisées pour des mécanismes de blocage stérique ou de manière partielle sur un ASO comme stabilisateur (159).

Afin de garder la possibilité de recruter la RNase H, certains oligonucléotides associent en effet plusieurs modifications chimiques pour former ce qu'on appelle des gapmers. Un gapmer est formé d'environ 6 à 10 bases centrales (le « gap ») avec un squelette phosphodiester ou phosphorothioate pour permettre un clivage avec la RNase H et d'extrémités 3' et 5' avec des modifications en 2' du ribose, incapables de recruter la RNase H mais qui permettent d'augmenter l'affinité de l'ASO pour son ARN (175,176). Cette association de modifications chimiques permet la formation d'un ASO capable de dégrader un ARN avec une meilleure efficacité et une meilleure précision (177).

Certains ASO combinent deux types de modifications comme les oligomères morpholino phosphorodiamidates ou PMO qui sont constitués d'un squelette phosphorodiamidate (PN) et d'un morpholino à la place du ribose. Le squelette phosphorodiamidate est neutralement chargé contrairement au squelette PS et phosphodiester (PO) de l'ADN ce qui rend l'ASO plus hydrophile. Cette hydrophilie évite les liaisons non spécifiques aux protéines mais diminue également sa biodistribution car son excrétion est plus rapide (178). Les PMO ont l'avantage d'être totalement résistants aux nucléases et d'avoir une affinité importante pour l'ARN mais ne peuvent pas recruter la RNase H, ce qui en fait des ASO très utilisés dans les mécanismes de blocage stérique (179,180). C'est ce type d'ASO que j'ai majoritairement utilisé au cours de ma thèse.

Pour finir, les bases nucléiques A, U, T, G et C peuvent également être modifiées notamment en position 5' pour les pyrimidines. La modification la plus fréquente étant la 5-méthylcytosine qui fournit une diminution des effets pro-inflammatoires dus à l'activation des cellules B (161), ainsi qu'une légère augmentation de l'affinité pour l'ARN d'un ASO (181). En effet, un ASO à cytosines non méthylées ou CpG ODN est capable de se lier au TLR9 de la même manière qu'un ADN bactérien et est même actuellement utilisé en tant qu'adjuvant dans certains vaccins (182,183).

I.4.2. Mécanismes

I.4.2.1. Généralités

Les oligonucléotides permettent de réguler l'ARN de deux manières soit en provoquant sa dégradation par la RNase H soit en perturbant une étape de sa maturation comme l'épissage, la polyadénylation ou la traduction par blocage stérique, pour revue (184). (Figure 36)

Le mécanisme de dégradation des ARN par ASO repose sur la reconnaissance du duplexe ARN/ADN par la ribonucléase H1 ou RNase H1 (185). Cette nucléase ubiquitaire est retrouvée chez tous les êtres vivants où elle a notamment pour rôle de résoudre les structures en R-loop ainsi que de maintenir la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial (186,187). Ce mécanisme se distingue d'autres technologies comme les RNAi qui utilisent une autre voie de dégradation des ARN à l'aide du complexe RISC/Ago2 (188) ou encore les DNase et les ribozymes qui ont une activité catalytique spécifique pour dégrader un ARN (189,190).

L'autre mécanisme fait intervenir un blocage stérique consécutif à l'hybridation d'un ASO arborant des modifications chimiques incapables d'être reconnues par la RNase H1. Ce blocage stérique empêche la fixation de protéines ou la reconnaissance de séquences importantes dans la maturation de l'ARN. Un ASO peut en effet cibler des sites d'initiation de la traduction, ce qui empêche le ribosome de se fixer et donc de traduire l'ARN en protéine (191). Ce mécanisme restait relativement peu utilisé mais semble regagner de l'intérêt en virologie (192). Un autre mécanisme découvert récemment permet à l'inverse l'augmentation de la traduction par l'hybridation d'un ASO sur des éléments inhibiteurs de la traduction dans la 5'UTR comme les ORF en amont (uORF) (193). Les ASO peuvent également être utilisés en antagonistes de certains miRNA naturels dans le but d'empêcher la dégradation de leurs ARNs cibles, on les appelle alors anti-miR ou antagomiR (194). Ce dernier mécanisme semble très prometteur pour le développement de nouvelles thérapies notamment dans le cancer et pourrait aussi être utilisé dans la régulation d'autres ncRNA comme les lncRNA.

Des ASO permettant un blocage stérique ont été utilisés durant ma thèse afin de moduler l'épissage et la polyadénylation des ARN cibles (détaillés dans les parties I.4.2.2 et I.4.2.3).

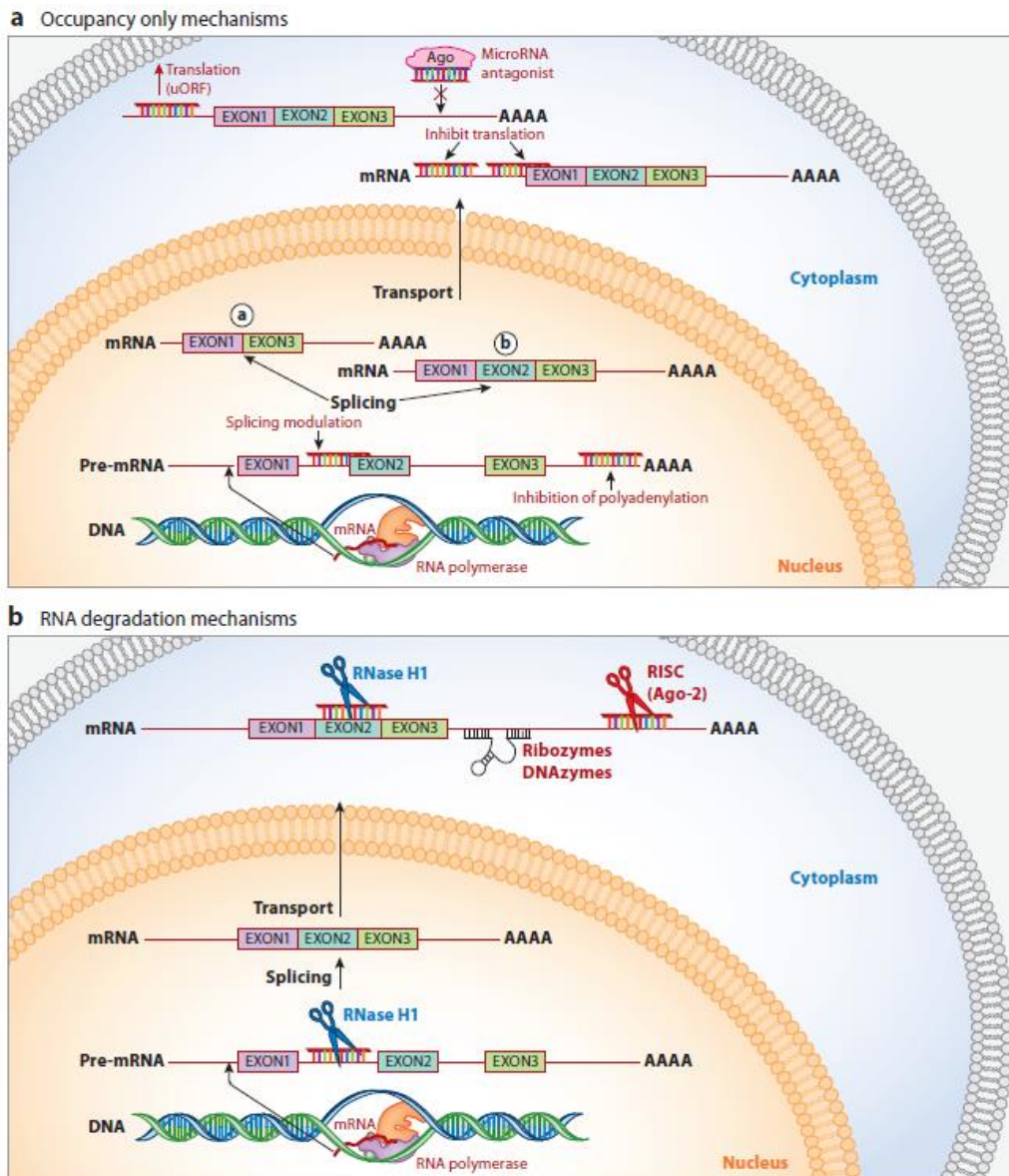


Figure 36. Les différents modes d'action des ASO en comparaison avec d'autres technologies de modulation de l'expression génique.

Selon sa structure chimique, un ASO peut modifier l'expression génique par deux modes d'action distincts. **(a)** Le mécanisme de blocage stérique par ASO permet de moduler l'épissage, d'inhiber la polyadénylation, d'inhiber ou augmenter la transcription d'un ARNm ou encore de bloquer des miRNA **(b)** Le mécanisme de dégradation de l'ARN par la RNase H1 (en bleu) est différent des mécanismes de dégradation induits par les technologies RNAi ou par les ribozymes/DNAzyme (en rouge). D'après Bennet Annu Rev Med. 2019 (184).

I.4.2.2. La modulation de l'épissage

Les ASO peuvent moduler l'épissage en empêchant la fixation soit d'un élément du spliceosome comme U1 et U2 en se fixant sur les 5'SS ou 3'SS, soit des facteurs d'épissage en se fixant sur les séquences cis-régulatrices ESE, ESS, ISE ou ISS. L'hybridation d'un ASO sur ces éléments provoque un épissage alternatif tel que le saut d'exon ou l'intron rétention, il est alors appelé oligonucléotide de modulation de l'épissage ou SSO (195) (Figure 37).

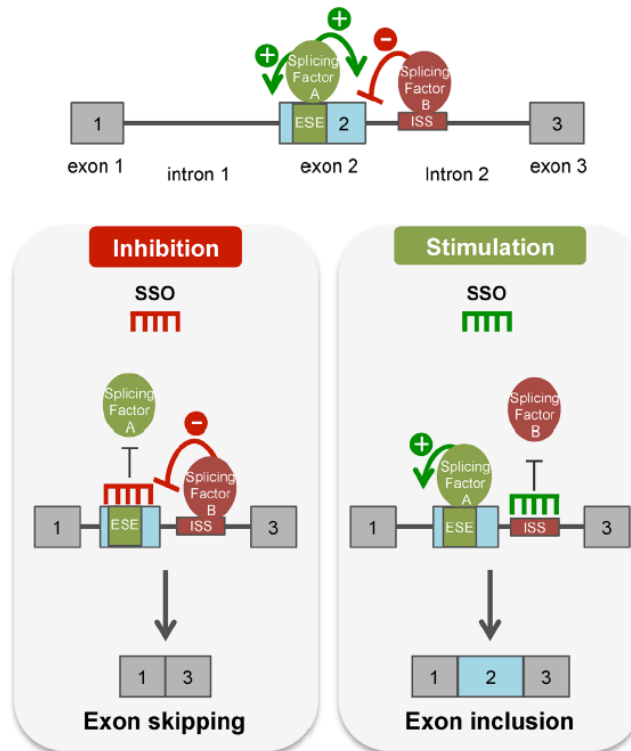


Figure 37. Exemple de modulation de l'épissage par un SSO ciblant des séquences cis-régulatrices.

L'épissage peut être modulé par un SSO ciblant des séquences cis-régulatrices en déséquilibrant la régulation par les facteurs d'épissage. Par exemple, lorsque qu'un SSO cible des séquences activatrices (ESE ou ISE en vert), cela provoque une inhibition de l'épissage et un saut d'exon alors que si ces séquences sont inhibitrices (ESS ou ISS en rouge), cela provoque une inclusion d'exon. D'après Havens et Hastings *Nucleic Acids Res* 2016 (195).

Récemment des thérapies à base de SSO ont été autorisées par la Food & Drug Administration (FDA) américaine en 2016 : l'eteplirsén dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et le nusinersén dans le traitement de l'amyotrophie spinale (SMA) (196). L'eteplirsén est un SSO de chimie PMO qui induit un saut de l'exon 51 du gène de la dystrophine *DMD*. En effet, environ 13% des patients atteints de DMD arborent un décalage du cadre de lecture dû à une délétion d'un ou plusieurs exons de 47 à 63 qui rend la dystrophine non fonctionnelle car son transcrite est dégradé par NMD (197). Le nusinersén est un SSO de chimie PS-2'MOE qui induit l'inclusion de l'exon 7 du gène *SMN2*, rétablissant la survie des motoneurones des patients atteints de SMA. En effet, dans la SMA des mutations dans le gène *SMN1* causent la dégradation de son transcrite par NMD ou rendent la protéine inactive alors que le gène *SMN2*, une duplication du gène *SMN1*, est constitutivement inactif chez l'homme à cause d'un saut de l'exon 7 (198). Des SSO pourraient traiter d'autres

maladies génétiques qui causent des anomalies de l'épissage comme la dysautonomie familiale, la dystrophie myotonique ou l'hypercholestérolémie familiale par exemple (199).

On retrouve aussi des anomalies de l'épissage dans de nombreux cancers où des variants d'épissage favorisant la cancérogénèse ou la maintenance du cancer sont produits. Cette production anormale est promue soit par la surexpression ou sous expression de facteurs d'épissage soit par des mutations directes dans les séquences cis-régulatrices de gènes oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs qui induisent un changement d'épissage (200). Ainsi par exemple, le facteur d'épissage SF3B1 est muté dans la CLL ce qui favorise un épissage alternatif en 3'SS de nombreux gènes dont *DVL2* qui dérégule la voie Notch et favorise ainsi la maintenance de la CLL (201). SF3B1 est également muté dans 28% et 19% des cas de syndrome myélodysplasique et de néoplasme myélodysplasique/myéloprolifératif respectivement (202). On retrouve aussi des mutations dans les éléments cis-régulateurs de gènes suppresseurs de tumeur qui induisent le plus souvent une intron rétention avec l'apparition de PTC (203). C'est le cas notamment du gène *TP53* dont les fréquentes mutations au niveau de ses 5'SS produisent des variants d'épissage dégradés par NMD ou la traduction de protéines TP53 tronquées, conduisant à son inactivation (203). L'épissage alternatif dans le cancer peut également cibler des oncogènes dans lesquels on retrouve le plus souvent des sauts d'exon comme le saut de l'exon 14 du gène *MET* dans le cancer du poumon (204) ou encore le saut de l'exon 9 de *REL* dans le DLBCL (205). Tous ces variants d'épissage pourraient ainsi être ciblés par des SSO dans le but de rétablir un épissage conventionnel et réduire la survie des cellules cancéreuses (200). Les ASO peuvent également être utilisés en tant que leurre afin de bloquer spécifiquement un facteur d'épissage en étant composés d'une répétition de leurs séquences cis comme cela a été montré avec les facteurs SRSF1, RBFOX1/2 et PTBP1 (206).

La modulation de l'épissage n'a pas forcément vocation à réparer une expression génique défectueuse et à l'inverse peut aussi être utilisée pour produire un ARN dégradé par NMD par un mécanisme alors appelé NMD forcé par épissage ou FSD-NMD. Le FSD-NMD consiste à forcer un épissage qui induit un décalage du cadre de lecture et fait apparaître un PTC dans le transcrit, par exemple avec un saut d'exon (207). Ce mécanisme a été montré pour la première fois en 2011 avec l'inhibition de l'expression de STAT3 dans le traitement du cancer (208). Le FSD-NMD constitue une alternative intéressante au mécanisme dépendant de la RNase H pour dégrader un ARNm cible et inhiber l'expression d'un gène à l'aide d'ASO. De la même manière, des ASO peuvent induire la dégradation d'un transcrit par NGD lorsqu'ils sont hybridés en 3' de la région codante ce qui gêne probablement la progression du ribosome lors de la traduction (209). A l'inverse, ils peuvent aussi être utilisés pour éviter la dégradation d'un transcrit par NMD en s'hybridant aux jonctions exon-exon en aval d'un PTC ce qui empêche la formation de l'EJC (210). (Figure 38)

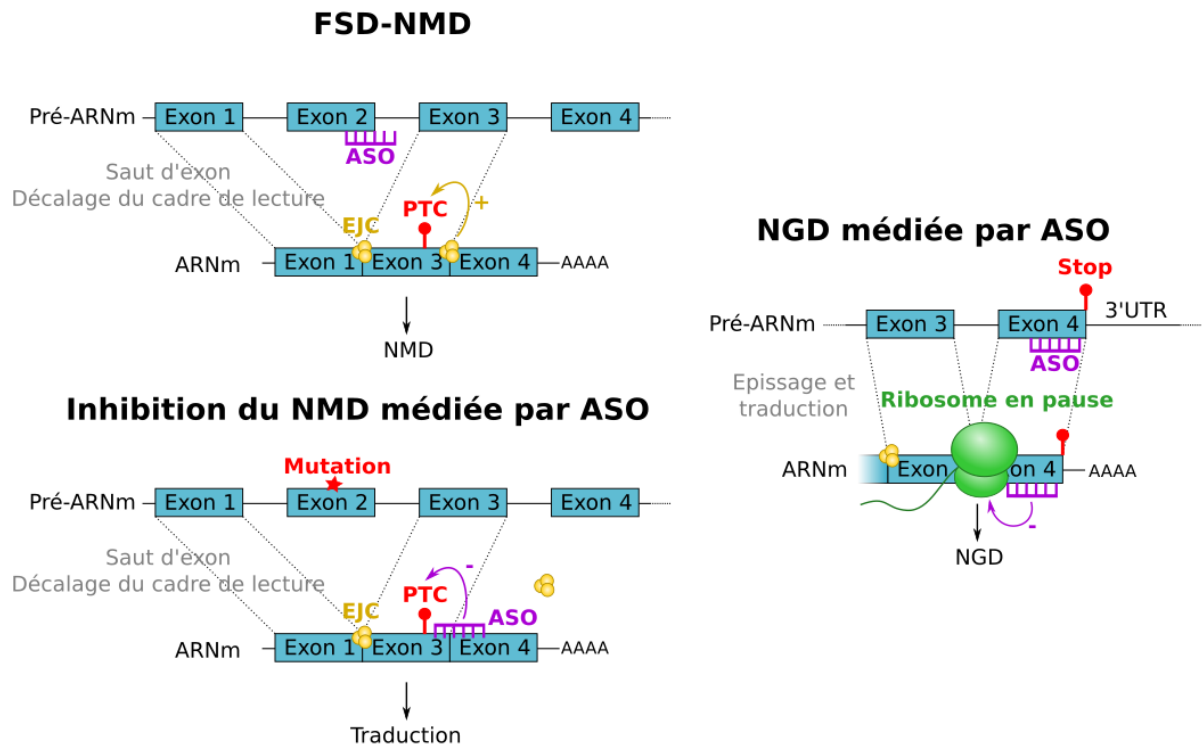


Figure 38. Modulation du mRNA decay par un ASO.

Un ASO peut moduler le mRNA decay de trois façons. Il peut provoquer un saut d'exon qui induit un décalage de lecture, fait apparaître un PTC et active la dégradation du transcrite par NMD : c'est le mécanisme de FSD-NMD. Un ASO hybridé au niveau de la séquence codante juste avant le codon stop va ralentir la progression du ribosome lors de la traduction et provoquer la dégradation du transcrite par NGD. Un ASO hybridé au niveau de la jonction d'exon empêche la fixation de l'EJC et inhibe le NMD lorsqu'un PTC est présent en amont.

I.4.2.3. L'inhibition de la polyadénylation

La polyadénylation (polyA) peut être modulée par un ASO ciblant les séquences cis-régulatrices dont le PAS ou en ciblant le 5'SS précédant un PAS dans le cas d'un gène présentant des sites polyA alternatifs. Le blocage d'un PAS par un ASO permet en effet d'inhiber sélectivement le transcrite correspondant d'un gène tout en redirigeant la polyadénylation vers les PAS distaux (211).

Ce mécanisme peut aussi être utilisé pour favoriser l'utilisation d'un PAS proximal en ciblant le 5'SS en amont. Par exemple, pour le gène *VEGFR2* le ciblage du 5'SS de l'exon en amont du PAS proximal permet l'utilisation de ce dernier lors de la polyadénylation favorisant la production d'une protéine soluble plutôt que membranaire (212) (Figure 39). En effet il a été montré que la fixation de U1 sur le 5'SS inhibe l'utilisation du PAS intronique proximal (213).

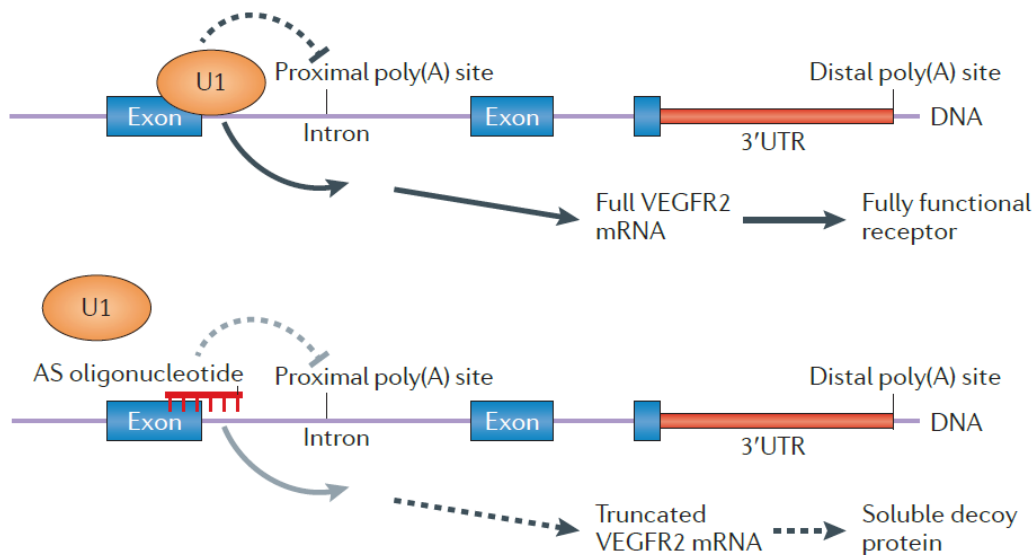


Figure 39. Modulation de la polyadénylation du gène *VEGFR2* par un ASO.

Afin de favoriser l'utilisation du PAS proximal du gène *VEGFR2*, un ASO peut être hybridé sur le 5'SS en amont afin d'inhiber la fixation de U1 et donc l'épissage sur les exons suivants. Ce traitement permet d'augmenter la production de VEGFR2 soluble et de réduire la quantité de VEGFR2 membranaire. D'après Elkon et al Nat Rev Genet. 2013 (37).

Les transcrits de chaînes lourdes d'Ig étant générés par APA, le PAS proximal encodant la forme sécrétée et les PAS distaux la forme membranaire (214), une modulation de la polyadénylation par ASO pourrait rediriger efficacement la production vers de l'une ou l'autre forme d'Ig. De plus, une récente étude de Peng et collègues a montré le rôle de la hnRNPLL dans la redirection de la polyadénylation vers le PAS proximal dans les plasmocytes (215). Le ciblage de la séquence cis-régulatrice de la hnRNPLL par un ASO pourrait constituer une piste supplémentaire dans le cadre d'un traitement pour réduire la quantité d'Ig sécrétée. Réduire la quantité d'Ig sécrétée pourrait en effet avoir un intérêt dans le traitement de l'allergie (IgE), de maladies autoimmunes (IgA, IgG) ou encore dans les maladies liées aux gammopathies monoclonales (IgG, IgM) dans lesquelles une production délétère ou excessive de certaines Ig est observée. De même, réduire la quantité d'Ig membranaire pourrait avoir un intérêt dans le traitement de certains cancers lymphocytaires où une activation constitutive du BCR est observée. Une modulation de l'APA vers les PAS proximaux pourrait aussi être efficace sur certains gènes dérégulés dans le myélome multiple (MM) où il a été montré une baisse de l'utilisation des PAS introniques (44).

I.4.3. Méthodes d'administration tissulaire et cellulaire

Les ASO peuvent être internalisés naturellement par une cellule mais ne se distribuent pas de la même manière dans tous les organes suite à une administration systémique. En effet, en fonction des modifications chimiques d'un ASO, celui-ci va arborer une demi-vie plus ou moins grande selon sa stabilité face aux nucléases ainsi qu'une clairance rénale plus ou moins rapide selon sa proportion en liaisons PS, PO ou PN. Effectivement, la liaison PS est celle qui diminue le plus la clairance grâce à sa charge négative au contraire de la liaison PN qui n'est pas chargée. En conséquence, la biodistribution des oligonucléotides se concentre surtout dans les organes d'élimination que sont le foie et le rein, suivi par les adipocytes, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques (216). Malgré une biodistribution améliorée grâce aux progrès

réalisés sur les modifications chimiques, les ASO restent relativement peu absorbés par les cellules ciblées ce qui limite leur efficacité et potentialise leur toxicité. C'est pourquoi de nombreuses stratégies de ciblage cellulaire sont actuellement à l'étude dans l'espoir d'augmenter l'efficacité des ASO tout en réduisant leur toxicité (217,218). Ces stratégies de ciblages incluent la conjugaison d'ASO avec des peptides, lipides ou ligands et la vectorisation à l'aide de nanoparticules ou de vecteurs viraux, pour revue (217,218). (Figure 40)

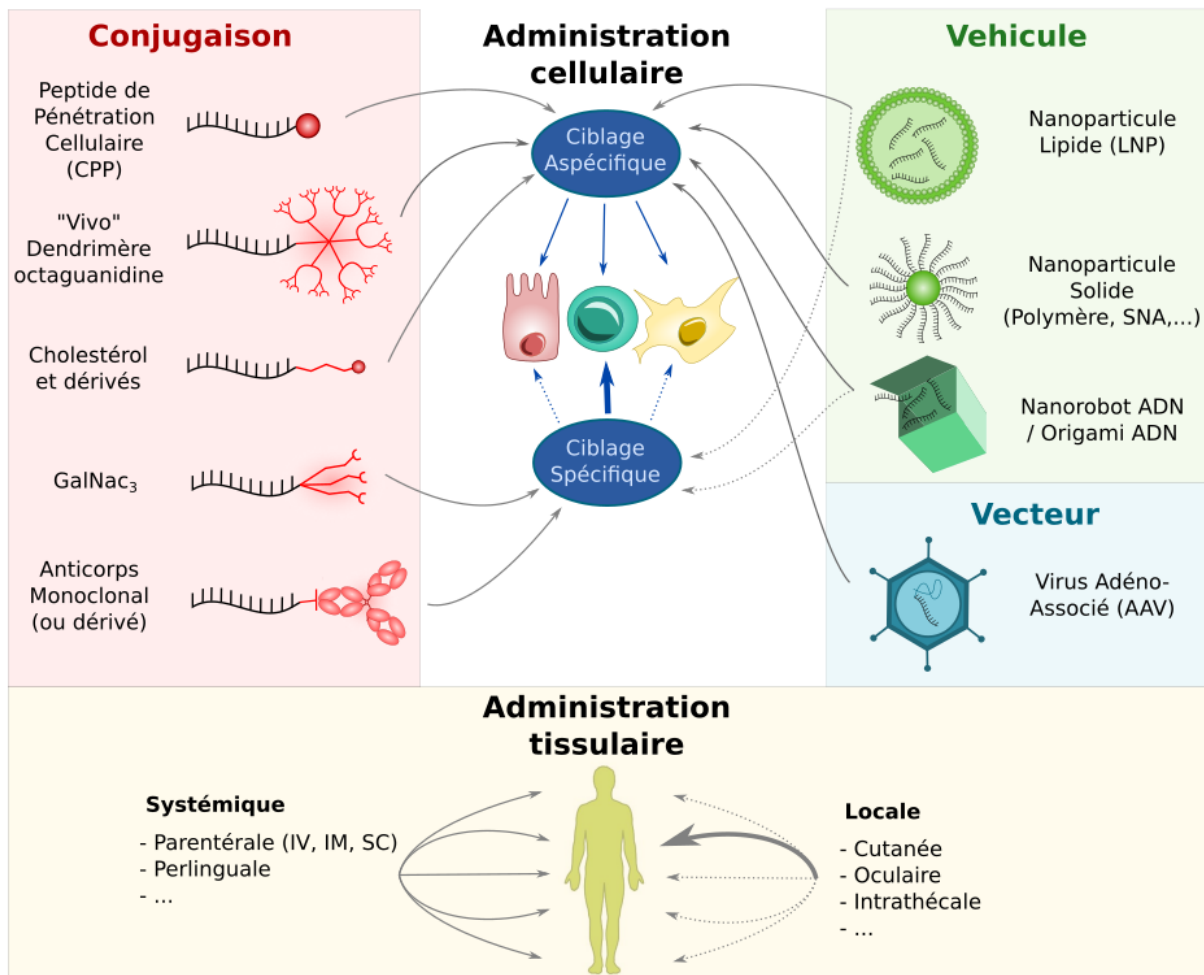


Figure 40. Technologies d'administration des ASO

Un ASO peut être conjugué à divers ligands, peptides ou molécules, être transporté à l'aide de nanoparticules ou d'origami ADN ainsi qu'être vectorisé dans des AAV afin d'augmenter sa distribution cellulaire, spécifique d'un type cellulaire ou non. De même l'administration locale ou systémique permet de moduler la concentration d'ASO disponible dans un organe donné.

La conjugaison de peptides favorisant la pénétration cellulaire ou CPP est une des solutions pour augmenter l'assimilation des ASO par les cellules de manière non spécifique. Parmi ces CPP, on trouve de nombreux peptides dérivés de protéines qui promeuvent l'internalisation lors de la liaison à leurs récepteurs comme le HIV-tat, la penetratin-1, le transportan ou encore Arg8. Ces CPP de 10 à 16 résidus sont cationiques donc exclusivement conjugués à des ASO neutralement chargé comme les PMO afin d'éviter des interactions électrostatiques (219), formant ce qu'on appelle un PPMO. Les conjugués CPP les plus utilisés sont le peptide B (220) et le peptide Pip6 (221) qui ont le point commun d'être riches en arginine. On trouve aussi parmi les conjugués de pénétration cellulaire, le conjugué « vivo » qui est un dendrimère

d'octaguanidine positivement chargé principalement utilisé avec les PMO appelé vivo-morpholino. Les vivo-morpholinos permettent une meilleure biodistribution mais provoquent aussi une toxicité due à une augmentation de la coagulation qui doit être monitorée rendant problématique le transfert de cette technologie en clinique (222). Des CPP amphiphiles peuvent également être utilisés pour produire des nanoparticules avec des ASO négativement chargés comme les ASO PS grâce à des interactions hydrophobes et/ou électrostatiques parmi lesquels sont les peptides MPG-8 et CADY (219).

Des conjugués spécifiques comme des ligands de récepteurs cellulaires peuvent également augmenter l'absorption des ASO au sein de la cellule. Le plus connu des conjugués ligands est le GalNac₃ qui cible le récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR) présent en grande quantité sur les hépatocytes (223). Parmi ces conjugués spécifiques, on retrouve aussi les anticorps monoclonaux ou leurs dérivés (scFV, (Fab)₂,...) pour qui peuvent cibler des récepteurs spécifiques promouvant leur internalisation mais cette technologie nécessite encore des améliorations afin d'améliorer l'efficacité des oligonucléotides délivrés (224). Cette technologie a l'avantage de réunir l'activité de d'un anticorps monoclonal et d'un ASO permettant ainsi une synergie de différents modes d'action comme l'on montré Satake et collègues avec un anticorps monoclonal anti-CD22 couplé à un ASO dirigé contre le gène *MXD3* dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (ALL) (225).

Les ASO peuvent également être conjugués avec des lipides tels que le cholestérol, l'octadecyl-amine ou le squalène qui sont particulièrement absorbés par les cellules du foie et sont capables de s'associer aux LDL dans le sang (226). Les lipides cationiques peuvent également servir de transporteur pour des oligonucléotides anioniques comme les ASO PS en formant ce qu'on appelle des nanoparticules lipides ou LNP qui vont s'accumuler préférentiellement au niveau du foie et des tumeurs. Ces LNP sont composées de lipides cationiques comme le DLin-MC3-DMA et sont stabilisés par d'autres éléments comme le polyéthylène glycol (PEG) qui ralentit leur clairance rénale. Des ligands peuvent également être incorporés à la surface des LNP afin de cibler un récepteur cellulaire spécifique (227). Moins utilisés que les LNP, les nanoparticules solides telles que les nanoparticules d'or (formant des acides nucléiques sphériques ou SNA) (228) ou les nanoparticules polymériques (229) peuvent elles aussi délivrer des ASO hybridés à leur surface.

Pour finir, l'administration des ASO peut aussi être faite via leur vectorisation au sein de virus adéno-associés (AAV) dans la séquence des U1 ou U7 snRNA. En effet, la séquence des U1 et U7 snRNA qui ont pour rôle la régulation des extrémités 3' des ARNm d'histones et la définition des 5'SS respectivement, peut être modifiée afin de contenir une séquence antisens (230,231). Un autre type de vecteur comprend les structures ADN jouant le rôle de transporteur dont les origami ADN ou nanorobots ADN qui ont l'avantage d'être adaptables à façon et capturés passivement par les cellules. Ces origami ADN peuvent prendre des formes et structures variées mais aussi posséder des sites de liaisons spécifiques qui vont déclencher un changement structurel et la libération de leur cargo (232,233). Dans la nature, du matériel génétique comme les miRNA sont échangés entre les cellules par des exosomes et l'utilisation de cette technologie pourrait aussi être envisageable pour le transfert d'oligonucléotides synthétiques (234,235).

Une voie d'administration locale quand son utilisation est possible augmente également l'efficacité des ASO et peut être potentialisée par des formulations spécifiques : par voie orale pour les maladies digestives (236) ou par voie transdermique pour les maladies de la peau (237) par exemple. Actuellement, l'administration intrathécale du nusinersen est utilisée avec succès pour augmenter l'efficacité du traitement dans le cerveau (198).

Partie II. Résultats & Discussion

II.1. Modulation des immunoglobulines sécrétées et membranaires par ASO

Les gènes d'Ig peuvent donner naissance à deux ARNm alternativement polyadénylés : l'un utilisant un site de polyadénylation (PAS) situé entre le dernier exon constant CH et le ou les exons de membrane M et l'autre utilisant un PAS situé après le ou les exons de membrane M. L'ARNm issu de l'utilisation du premier PAS codera pour les Ig sécrétées tandis que celui issu de l'utilisation du dernier PAS codera pour les Ig membranaires. Par soucis de simplification ici, nous appelleront ces sites de polyadénylation PAS pour Poly(A) Sécrété et PAM pour Poly(A) Membranaire (Figure 41). Il peut y avoir plusieurs sites PAS et PAM pour un même mais un seul site polyA est majoritairement utilisé pour la polyadénylation. Il peut aussi y avoir coexistence de transcrits utilisant les sites PAS et PAM dans une même cellule mais un seul est majoritairement utilisé dans un type cellulaire donné, avec une polyadénylation au site PAM dans les cellules B et au site PAS dans les plasmocytes.

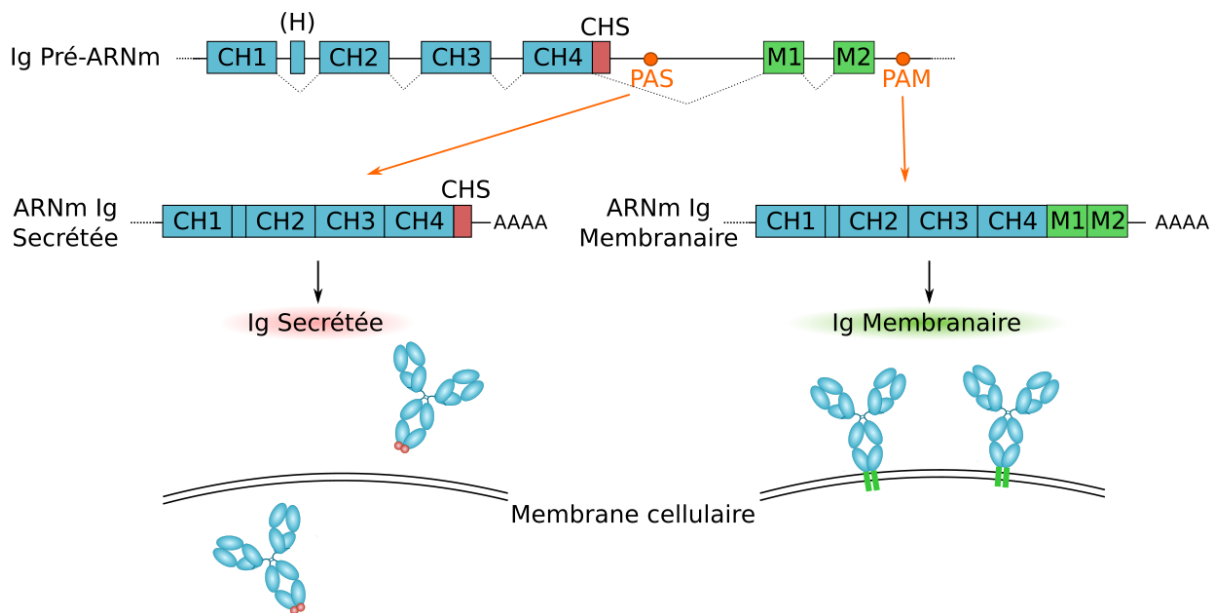


Figure 41. Illustration de la polyadénylation alternative des transcrits d'Ig.

Un gène IGH générique possède deux sites de polyadénylation sécrété (PAS) et membranaire (PAM) en orange qui peuvent être utilisés de façon alternative lors de la transcription. Dans les plasmocytes, l'utilisation préférentielle du PAS donne naissance à un ARNm d'Ig sécrétée possédant la séquence CHS (rouge) caractéristique des Ig solubles. En revanche, l'utilisation du PAM donne naissance à un ARNm d'Ig membranaire possédant un ou plusieurs exons membranaires M (vert) qui codent pour le domaine transmembranaire de l'Ig, permettant l'expression du BCR à la surface des cellules B.

L'objectif de ces travaux est d'évaluer une stratégie de modulation de la polyadénylation à l'aide d'oligonucléotides antisens (ASO), en ciblant les séquences PAS ou PAM sur les transcrits d'Ig. Cette approche, selon l'isotype d'Ig visé, pourrait procurer de nouvelles pistes thérapeutiques dans l'allergie (IgE, IgA), les maladies auto-immunes (IgG, IgA), ou encore le cancer et les maladies de dépôt d'Ig (IgG, IgM, IgA). En effet, favoriser la synthèse d'Ig membranaires par rapport aux Ig sécrétées permettrait de réduire le taux sérique d'Ig qui est souvent associé directement ou indirectement à la symptomatologie de ces maladies (maladies auto-immunes, allergie, maladies de dépôt d'Ig). A l'inverse, réduire la synthèse d'Ig membranaire pourrait diminuer le signal BCR qui contribue à la survie de nombreux cancers

comme les lymphomes B, et joue aussi un rôle essentiel lors de la sélection positive des lymphocytes B et en particulier des cellules Bmem. La modulation de la polyadénylation par ASO a le potentiel d'être spécifique à un seul type d'Ig ce qui permettrait de traiter une maladie liée aux Ig tout en conservant un potentiel immunitaire chez le patient.

Ces travaux ont fait l'objet d'un brevet déposé le 4 juin 2019 n°EP19305716.3 avec une extension internationale déposée le 3 juin 2020 n°PCT/EP2020/065327 (Annexe 1).

II.1.1. Résultats

II.1.1.1. Modulation de l'IgE-sécrétée par ASO

Lors de mes travaux, j'ai d'abord étudié la stratégie de modulation de la polyadénylation des Ig en ciblant l'IgE humaine à l'aide d'un ASO complémentaire au PAS afin de réduire la synthèse d'IgE sécrétée et de favoriser la synthèse d'IgE membranaire. En effet, l'IgE est un acteur bien décrit dans la physiopathologie des allergies IgE-dépendantes et diminuer le taux d'IgE circulantes réduit le nombre de manifestations chez les patients allergiques comme cela a déjà été observé avec l'Omalizumab, un anticorps monoclonal anti-IgE (121). De plus, de précédents travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que la production d'IgE membranaire par les cellules B provoque soit son apoptose soit sa différenciation en plasmocyte à courte durée de vie, ce qui explique la rareté des Bmem IgE chez l'homme (38,39). Cibler le PAS sur le pré-ARNm codant pour l'IgE aurait donc le potentiel de diminuer la sécrétion d'IgE tout en provoquant l'apoptose des cellules productrices d'IgE via la réexpression d'IgE membranaire (Figure 42).

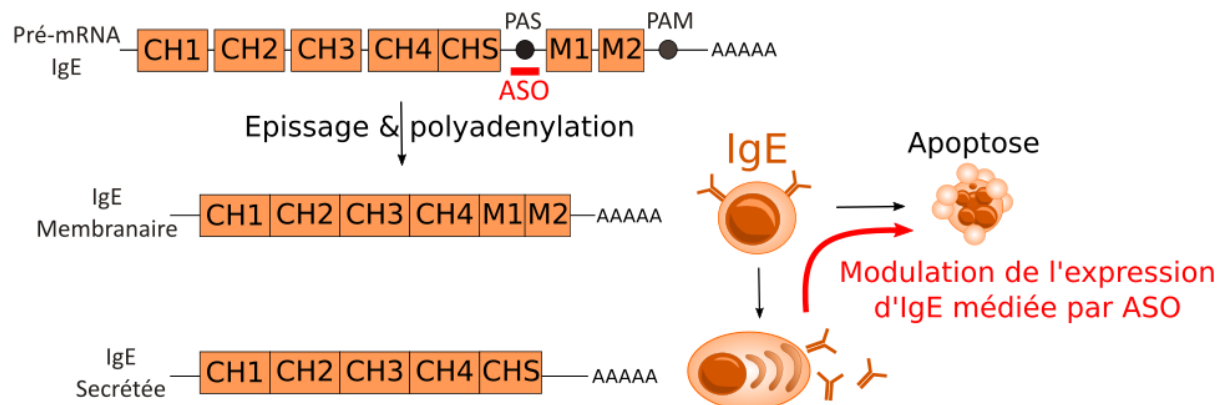


Figure 42. Modulation de la polyadénylation de l'ARNm codant pour l'IgE avec un ASO ciblant le PAS.

Un ASO hybridé au PAS du pré-ARNm codant pour IgE va diminuer la production d'ARNm codant pour l'IgE sécrétée tout en favorisant la production d'ARNm codant pour l'IgE membranaire via l'utilisation alternative du PAM. La production d'IgE membranaire provoque l'apoptose chez la cellule B comme montré par Laffleur et collègues (39).

Ces travaux, illustrés dans le brief report rédigé ci-dessous qui a été soumis au « Journal of Allergy and Clinical Immunology », ont permis de valider cette stratégie en utilisant plusieurs modèles : un modèle de souris transgénique inducible appelé InEps™, où les parties constantes du gène de l'IgE humaine ont été intégrées au locus Igh murin, des hybridomes obtenus à partir de cellules B InEps™, une lignée cellulaire de myélome sécrétant de l'IgE (U266) et enfin des cellules B humaines stimulées in vitro pour réaliser une CSR vers IgE. Dans tous ces modèles, la réduction d'IgE sécrétée et l'augmentation d'IgE membranaire a pu

être démontrée. En accord avec la réexpression d'IgE membranaire, une augmentation de la mortalité par apoptose a pu également être mise en évidence dans les cellules U266 traitées par ASO. De plus, les analyses réalisées après séquençage d'ARN à haut débit (RNAseq) ont révélé un changement de l'expression génique, montrant un profil plutôt B mémoire que plasmocytaire dans les cellules traitées par ASO. La spécificité de l'ASO pour IgE a également été vérifiée après stimulation de B humains, en montrant que l'ASO n'a pas d'impact sur la transcription des autres isotypes d'Ig et qu'il ne provoque pas non plus de modulation de leur polyadénylation.

The Journal of Allergy and Clinical Immunology
Targeting IgE polyadenylation signal with antisense oligonucleotides decreases IgE secretion and plasma cell viability
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JACI-D-20-01852
Article Type:	Brief Report
Section/Category:	Brief Reports
Keywords:	Immunoglobulin E; Antisense Oligonucleotide; Polyadenylation; Allergy; B Cells; Plasma Cells; Gene Therapy; Cell Viability
Corresponding Author:	Laurent Delpy, Ph.D CNRS UMR7276 INSERM U1262 Limoges, 87025 FRANCE
First Author:	Anne Marchalot, MSc, Pharm.D
Order of Authors:	Anne Marchalot, MSc, Pharm.D Jean-Marie Lambert, MSc Claire Carrion, MSc Christelle Oblet, MSc Justine Pollet, MSc Michel Cogné, MD, Ph.D Jeanne Moreau, Ph.D Brice Laffleur, Ph.D Laurent Delpy, Ph.D
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	<p>Background : Allergy regroups numerous complex and various diseases. Among them, atopic dermatitis or allergic asthma are known as immunoglobulin E (IgE)-dependent allergies and still lack long lasting and effective medications. IgE are expressed as membrane and secreted forms by B cells and plasma cells, respectively. IgE secretion is responsible for the onset of allergic symptoms but in contrast, surface IgE expression as a B-cell receptor (BCR) is barely detectable and has been demonstrated to induce apoptosis in B cells.</p> <p>Methods : We designed an antisense oligonucleotide (ASO) targeting the polyadenylation signal (PAS) of human secreted IgE in order to redirect IgE transcript polyadenylation from the secreted form to the membrane form and eventually induce apoptosis. ASO treatments were performed in B cells from transgenic mice expressing humanized IgE, as well as human primary B cells and myeloma cells.</p> <p>Results/Discussion : We demonstrated that treatment with ASO targeting the secreted IgE PAS drastically decreased IgE secretion and inversely increased membrane-IgE expression. In addition, ASO treatment induced apoptosis of IgE-expressing U266 myeloma cells, and accordingly RNA-seq revealed a switch from a plasma cell profile towards a B-cell like profile, with hallmarks of apoptotic pathway activation most likely associated with surface IgE expression. Altogether, this ASO strategy could be an efficient way to decrease IgE secretion and allergic symptoms in patients suffering from IgE-dependent allergic diseases, and could also promote allergen tolerance through apoptosis induced by enforced IgE BCR expression.</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation



Université
de Limoges



Laurent Delpy, PhD, Research Director at CNRS

UMR CNRS 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

Limoges, September 22th, 2020

To the Editor of **the Journal of Allergy and Clinical Immunology**

Dear editor,

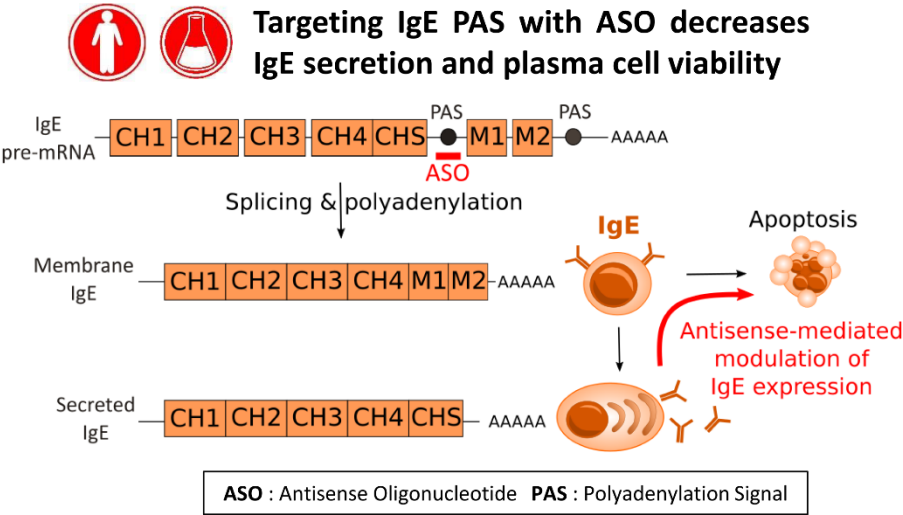
Please find enclosed our manuscript entitled “Targeting IgE polyadenylation signal with antisense oligonucleotides decreases IgE secretion and plasma cell viability” by Marchalot *et al.*, in which we describe a new antisense oligonucleotide (ASO) based strategy to diminish immunoglobulin E (IgE) secretion and to induce apoptosis of IgE-expressing plasma cells.

Allergy regroups numerous complex and variable diseases. Among them, atopic dermatitis or allergic asthma are known to be IgE-dependent allergies and long lasting effective treatment is still lacking. IgE are expressed as membrane and secreted forms by B cells and plasma cells, respectively. IgE secretion is responsible for the onset of allergic symptoms but in contrast, surface IgE expression as B-cell receptors (BCR) is barely detectable and has been demonstrated to induce apoptosis in B cells as previously shown by our lab (Laffleur *et al*, Cell Reports 2015). In the present work, we introduce a new ASO based strategy targeting the polyadenylation signal encoding the human secreted IgE that efficiently diminishes IgE secretion while increasing surface IgE expression in antibody-secreting cells from transgenic mice expressing humanized IgE (InEps®), *ex vivo* stimulated human B cells and IgE-expressing U266 myeloma cells. Furthermore, our ASO treatment induces a switch from secreted to membrane polyadenylation site usage and was able to drive a B-cell like transcriptomic profile and IgE-BCR associated apoptosis in U266 cells. Altogether, this ASO strategy could be an effective strategy to decrease IgE secretion and allergic symptoms in patients suffering from IgE-dependent allergic diseases, and could also promote allergen tolerance through apoptosis induced by enforced IgE BCR expression.

We hope that this study will be considered as providing important new insights about novel IgE-dependent allergy therapy, and thus worthy of publication in the Journal of Allergy and Clinical Immunology.

With best regards,

Laurent Delpy, PhD (Corresponding author)



1 **Targeting IgE polyadenylation signal with antisense oligonucleotides decreases IgE**
2 **secretion and plasma cell viability**

3 Anne Marchalot, MSc, PharmD^a, Jean-Marie Lambert, MSc^a, Claire Carrion, MSc^a, Christelle Oblét,
4 MSc^a, Justine Pollet, MSc^b, Michel Cogné, MD, PhD^a, Jeanne Moreau, PhD^a, Brice Laffleur, PhD^c and
5 Laurent Delpy, PhD^{a*}.

6 ^aUMR CNRS 7276 - INSERM 1262 - Limoges University, Control of the B cell Response &
7 Lymphoproliferations, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France.

8 ^bBISCEm US 42 INSERM / UMS 2015 CNRS - Limoges University, Limoges, France

9 ^cColumbia University, New York City, United States

10 *Corresponding Author: Laurent Delpy

11 Mail: laurent.delpy@unilim.fr

12 Phone: +33 519 564 214

13 Address : UMR CNRS 7276 - INSERM 1262, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France.

14 **FUNDING**

15 This work was supported by grants from Fondation ARC (PJA 20161204724), ANR (2017-CE15-0024-
16 01), Ligue Contre le Cancer (CD87, CD19, CD23) and Fondation Française pour la Recherche contre le
17 Myélome et les Gammopathies monoclonales (FFRMG).

18 **AUTHORS CONTRIBUTION**

19 Anne Marchalot designed and performed experiments, analysed data and wrote the manuscript. Jean-
20 Marie Lambert, Claire Carrion and Christelle Oblét performed experiments and analysed data. Justine
21 Pollet analysed bioinformatics data. Michel Cogné contributed to the initial conception of the project.
22 Jeanne Moreau and Brice Laffleur reviewed the manuscript. Laurent Delpy conceived the project,
23 designed experiments and wrote the manuscript.

24 **CONFLICT OF INTEREST**

25 The authors declare no conflict of interest.

26 **ABSTRACT**

27 **Background:** Allergy regroups numerous complex and various diseases. Among them, atopic dermatitis
28 or allergic asthma are known as immunoglobulin E (IgE)-dependent allergies and still lack long lasting
29 and effective medications. IgE are expressed as membrane and secreted forms by B cells and plasma
30 cells, respectively. IgE secretion is responsible for the onset of allergic symptoms but in contrast,
31 surface IgE expression as a B-cell receptor (BCR) is barely detectable and has been demonstrated to
32 induce apoptosis in B cells.

33 **Methods:** We designed an antisense oligonucleotide (ASO) targeting the polyadenylation signal (PAS)
34 of human secreted IgE in order to redirect IgE transcript polyadenylation from the secreted form to
35 the membrane form and eventually induce apoptosis. ASO treatments were performed in B cells from
36 transgenic mice expressing humanized IgE, as well as human primary B cells and myeloma cells.

37 **Results/Discussion:** We demonstrated that treatment with ASO targeting the secreted IgE PAS
38 drastically decreased IgE secretion and inversely increased membrane-IgE expression. In addition, ASO
39 treatment induced apoptosis of IgE-expressing U266 myeloma cells, and accordingly RNA-seq revealed
40 a switch from a plasma cell profile towards a B-cell like profile, with hallmarks of apoptotic pathway
41 activation most likely associated with surface IgE expression. Altogether, this ASO strategy could be an
42 efficient way to decrease IgE secretion and allergic symptoms in patients suffering from IgE-dependent
43 allergic diseases, and could also promote allergen tolerance through apoptosis induced by enforced
44 IgE BCR expression.

45

46 **KEY MESSAGES**

- 47 • Targeting the secreted IgE polyadenylation signal (PAS) with an antisense oligonucleotide
48 (ASO) results in a switch from expression of secreted IgE mRNA form to the membrane-
49 associated form
- 50 • ASO targeting secreted IgE PAS are good strategies to decrease the secretion of allergen-
51 specific IgE
- 52 • Treatment with ASO targeting secreted IgE PAS provokes apoptosis of IgE-expressing plasma
53 cells, through IgE B cell receptor re-expression

54 **CAPSULE SUMMARY**

55 This study identifies that targeting secreted IgE polyadenylation signal using antisense oligonucleotides
56 strongly reduces IgE secretion and provokes apoptosis of IgE-expressing plasma cells, opening new
57 therapeutic perspectives in patients suffering from IgE-dependent allergic diseases.

58 **KEYWORDS**

59 Immunoglobulin E, Antisense Oligonucleotide, Polyadenylation, Allergy, B Cells, Plasma Cells, Gene
60 Therapy, Cell Viability

61 **ABBREVIATIONS**

62 **Ig** = Immunoglobulin

63 **BCR** = B cell receptor

64 **ASO** = Antisense Oligonucleotide

65 **PAS** = Polyadenylation Signal

66 **CTRL** = Control

67

68 **TEXT**

69 **INTRODUCTION**

70 Immunoglobulin E (IgE) is a well-characterized actor in allergies such as asthma and atopic dermatitis.
71 Upon immunization with an allergen, B cells and plasma cells secrete specific IgE, which binds the
72 surface of tissue mast cells and basophils through the FcεRI receptor. A second encounter with the
73 allergen triggers a pro-inflammatory response when recognized by FcεRI-bound IgE, producing allergic
74 symptoms (1). Furthermore, some allergic patients maintain increased serum IgE levels compared to
75 healthy individuals even without allergic manifestations and Omalizumab, an anti-IgE monoclonal
76 antibody, can be used in case of severe asthma to prevent allergic manifestations (2). IgE is first
77 produced as a membrane-associated form in B lymphocytes, but those cells expressing surface IgE are
78 extremely rare in humans (3). Consistent with the scarcity of IgE+ memory B cells, previous studies
79 have shown that IgE B cell receptor (BCR) expression leads to cell apoptosis or rapid differentiation
80 into short lived plasma cells, preventing IgE memory B cell formation (4–6).

81 Antisense oligonucleotides (ASO) are short single strands of modified DNA, which can be used to
82 modify RNA maturation processes such as splicing or polyadenylation (for review see (7,8)). Recently,
83 two splice-switching oligonucleotides obtained marketing authorization : eteplirsen and nusinersen,
84 for the treatment of Duchenne’s muscular dystrophy and spinal muscular atrophy respectively,
85 invigorating hope for the avenue of new ASO therapeutic strategies in many diseases (12). ASO can
86 also modulate polyadenylation through targeting polyadenylation signals (PAS) or a donor splice site
87 either to reduce gene expression or to direct alternative polyadenylation and preferably generate one
88 transcript over the other (9–11). Thereby, ASO remain a relatable solution for RNA polyadenylation
89 modulation avoiding DNA modifications that can trigger off-target effects (13,14).

90 Here we address a new therapeutic antisense strategy targeting PAS sequences for secreted IgE to
91 decrease IgE secretion while inducing the production of membrane-associated IgE and apoptosis of
92 IgE-secreting plasma cells.

93 **METHODS**

94 **ASO design**

95 Ig polyadenylation signal sequences (PAS) were collected from NCBI, GRCh38.p12 assembly, 20 base
96 pairs upstream to 20 base pairs downstream from secreted Ig PAS on IGH locus. Multiple sequence
97 alignments were made using MView bioinformatics software. Vivo-morpholino IgE-PAS ASO (5'-
98 GCTCTGAGCAGGCACAGTTTATTG- 3') and irrelevant VivoStandard Control ASO (5'-
99 CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') were designed and purchased from Gene Tools, LLC. ASO stock
100 was diluted to 0.5mM with sterile nuclease-free water.

101 **Mice**

102 The InEps mouse model, harboring an insertion of a floxed human C μ gene followed by a human C ϵ
103 gene at the IgH locus, has been previously described (Laffleur et al, Cell Reports 2015). These mice
104 were crossed with CreERT2 mice in order to induce Tamoxifen dependent expression of human IgE.
105 Nine- to ten-month-old mice were used in all experiments and maintained in our animal facility, at 21–
106 23 °C with a 12-h light/dark cycle. Experiments were performed according to the guidelines of our
107 institutional review board for animal experimentation (No. CREEAL 6-07-2012).

108 **Cell culture and ASO treatments**

109 The U266 cell line was cultured in RPMI1640 with Ultraglutamine (Lonza) and 20% Fetal Bovine Serum
110 (FBS) (Dominique Dutscher) at 37°C with 5% CO₂ and treated for 48 hours with 6 μ M ASO. Allergen-
111 specific InEps hybridoma cell lines (anti-Penicillin, anti-Wasp Venom and anti-Ovalbumin) were kindly
112 provided by Dr A. Cuvillier (B-Cell Design, Limoges, France) and cultured for 48 hours in DMEM
113 Glutamax, high glucose medium 10% FBS at 37°C with 5% CO₂ with 3 μ M ASO. Splenic B cells isolated
114 from InEps/CreERT2+ mice were stimulated (1 \times 10⁶ cells/ml) with 1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS)
115 (LPS-EB Ultrapure; InvivoGen) in RPMI 1640 medium with Ultraglutamine and 10% FBS. At day 1, cells
116 were treated for 48 hours with 1 μ M Hydroxy-tamoxifen (Sigma H7904) and 2 μ M ASO. Human

117 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained by ficoll (Lympholyte-H Celardane) of
118 cytopheresis rings of healthy donors (EFS Bordeaux) and B cells were sorted with the B cell isolation kit
119 II (Miltenyi Biotec). Sorted B cells were cultured for 4 days in RPMI 1640 with UltraGlutamine (Lonza)
120 containing 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate (Eurobio), 1% AANE (Eurobio) and 50 U/ml penicillin/ 50
121 µg/ml streptomycin (Gibco) with 50ng/mL human IL-4 (Peprotech) and 100ng/mL Mega-CD40 ligand
122 (Enzo Life Sciences). Human B cells were treated with 2µM ASO for 72 hours at day 1 following
123 stimulation.

124 **Flow Cytometry**

125 InEps spleen cells were briefly washed with 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco) to remove passively bound IgE
126 before staining. Intracellular IgE staining was performed on B-cells with IntraPrep Permeabilization
127 Reagent (Beckman Coulter), using FITC anti-human IgE (A80-108F Bethyl Laboratories) and additional
128 surface BV421 anti-mouse B220 (RA3-6B2 BioLegend) staining. Apoptosis was evaluated in U266 cells
129 with AnnexinV (BioLegend) and 7-AAD (BD Pharmingen) staining. Data were acquired on a Beckton
130 Dickinson LSRII Fortessa cytometer and analyzed with FlowLogic software.

131 **Immuno-Assays**

132 IgE concentrations were determined in culture supernatants by Total IgE ImmunoCap (ThermoFisher
133 Diagnostic) using a Phadia250.

134 **Western Blot**

135 Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Thermo Scientific) supplemented
136 with protease and phosphatase inhibitor cocktail. Lysates were sonicated and protein quantified with
137 Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Proteins were denatured at 95°C 5 minutes before
138 separation on 12% SDS-PAGE TGX Stain-Free FastCast Acrylamide (Bio-Rad Laboratories). Proteins
139 were then electro-transferred onto Trans Blot Turbo polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad
140 Laboratories). Western blots were probed with rabbit anti-human PARP antibody (Cell Signaling ref

141 9542). Detection was performed using an HRP-linked goat anti-rabbit secondary antibody (Southern
142 Biotech ref 4050-05) and chemiluminescence detection kit (ECL Plus™, GE Healthcare) using
143 ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories).

144 **RT-qPCR**

145 Total RNA was prepared using Tri-reagent (Invitrogen) procedures. RT-PCR was carried out on 1µg
146 DNase I (Invitrogen)-treated RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied
147 Biosystems). Priming for reverse transcription was done with Oligo(dT)₂₀ (Invitrogen). Quantitative
148 PCRs were performed on cDNA samples equivalent to 5-10 ng RNA per reaction, using SYBR® Premix
149 Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), ROX plus kit or Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), ROX plus kit (Takara) on a
150 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Transcripts were quantified according to the
151 standard 2^{-ΔΔCt} method after normalization to GAPDH (Hs02758991_g1 ThermoFisher Scientific Probe)
152 or Gapdh (Mm99999915_g1 ThermoFisher Scientific Probe). SYBR quantitative PCR was performed for
153 the quantification of secreted-IgE with forward 5'- CGAGCGGTGTCTGTAAATCC and reverse 5'-
154 CACTGCACAGCTGGATGG primers, for total IgG1 with forward 5'-TGCAAGGTCTCCAACAAAGC and
155 reverse 5'-GTGGTCTTGTAGTTGTTCTC, for total IgM with forward 5'-CAGAATGCGTCTCCATGTG and
156 reverse 5'-GGTGGACTTGGTGAGGAAGA, for secreted IgG1 5'-AAGCTCACCGTGGACAAGAG and reverse
157 5'-CGGCCGTGGCACTCATTTA, for membrane IgG1 with forward 5'-AAGCTCACCGTGGACAAGAG and
158 reverse 5'-AGCACACGCTTAACAGGAAGA, for secreted IgM with forward 5'-
159 AAGAGGAATGGAACACGGGG and reverse 5'-ACATGACCAGGGACAGTTG and for membrane IgM with
160 forward 5'-AAGAGGAATGGAACACGGGG and reverse 5'-ACAAGGTGACGGTGGTACTG primers.
161 Membrane-IgE transcript mRNAs were quantified using Taqman quantitative PCR with an M1-M2 exon
162 spanning probe designed and purchased at ThermoFisher Scientific.

163 **RNA sequencing analysis**

164 Poly-adenylated mRNA-sequencing was performed on the Illumina NextSeq500 and analyzed with
165 DESeq2 by the Nice-Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform. Differentially expressed genes

166 were sorted when the adjusted p value was > 0.05 and the fold change was < 1.5 or > 1.5 . Reads were
167 aligned with STAR on the hg38 genome during the primary analysis. IGHE read visualization was
168 performed on IGV software and total read counts of CH4, CHS and M2 regions were extracted with
169 Samtools. Heatmap was obtained with R studio software using ggplot. Pathway enrichments were
170 analyzed on statistical differentially expressed genes with Gene Ontology, KEGG and Reactome tools
171 on R studio software.

172 **Statistical analysis**

173 The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM), and overall differences
174 between variables were evaluated by Student t test using Prism GraphPad software (San Diego, CA).

175 **RESULTS AND DISCUSSION**

176 To evaluate this strategy, we used a Cre tamoxifen-inducible transgenic mouse model called InEps™
177 where human IgM and IgE constant genes have been inserted between E μ and mouse IgM constant
178 genes. This model produces human IgE upon *in vitro* hydroxytamoxifen treatment of isolated spleen
179 cells (Fig E1, A). We found that IgE targeting ASO treated spleen cells were less likely to secrete IgE and
180 less IgE was found in supernatants compared to irrelevant control ASO (CTRL) (Fig E1, A,C). In addition,
181 secreted IgE mRNA significantly decreased when membrane IgE mRNA increased with ASO treatment
182 (Fig E1, B). We next verified this effect on InEps™ mouse hybridoma cells secreting allergen-specific
183 human IgE and found less IgE in supernatants, decreased secreted IgE mRNA, and increased membrane
184 IgE mRNA in ASO treated cells compared to controls (Fig E1, D,E).

185 To characterize the effect of IgE polyadenylation switching following ASO treatment on a complete
186 human background, human IgE-secreting myeloma U266 cells were also treated *in vitro*. Similarly to
187 InEps transgenic mouse spleen cells, U266 myeloma cells secreted less IgE in supernatants in the
188 presence of IgE ASO compared to cells cultured with control ASO (Fig E2, A). Similarly, secreted IgE
189 mRNA was strongly reduced whereas the expression of the membrane IgE mRNA isoform was
190 increased (Fig E2, B). These results were confirmed by exon coverage analysis of mRNA sequencing
191 reads from which we observed a decrease in CHS reads and an increase in M1 and M2 reads in ASO
192 treated cells compared to control treated cells (Fig E2, C). CHS and M1-M2 exons are only found in
193 secreted IgE mRNA and membrane IgE mRNA respectively. Further analysis of total read counts
194 confirmed the significant modulation of CHS/CH4 and M2/CH4 ratios in ASO conditions compared to
195 controls (Fig E2, D). Consistent with Laffleur et al (4), more than twice the number of ASO treated
196 myeloma cells underwent late apoptosis compared to control treated cells (Fig E2, E). Cleaved PARP
197 protein, a marker of apoptosis, was also increased in those cells (Fig E2, F).

198 RNA sequencing of ASO compared to CTRL treated U266 cells revealed 202 differentially expressed
199 genes (Fig E3, A and Table E1) among which *IGHE* expression was significantly decreased by 1.7 fold.

200 Pathway analysis performed on this list revealed eight significant pathways related to lymphocyte
201 proliferation and activation along with regulation of immunoglobulin production and interleukin 4 and
202 13 signalling (Fig E3, B). *CD80* and *PD-L2* expression, markers of a subtype of memory B cells (15), were
203 increased by almost 2 fold while *MZB1*, an essential gene for plasma cell differentiation (16), was
204 diminished by 2 fold. Interestingly, the suppressive allergen immune response interleukin IL-10 (17)
205 was also increased by 2 fold upon ASO treatment. These results suggest IgE ASO treatment could
206 induce a switch from a plasma cell profile towards a more B-cell like profile and promote allergen
207 tolerance.

208 To address whether IgE ASO treatment displayed a selective effect on IgE secretion, normal human
209 sorted B cells were cultivated and stimulated for IgG1 and IgE class switching *in vitro*. Comparable to
210 other models, secreted IgE mRNA was decreased and membrane IgE mRNA was increased but none of
211 total unswitched IgM or switched IgG1 mRNA were affected by ASO treatment (Fig E4, A). IgM and
212 IgG1 membrane and secreted mRNA were also checked to verify that no polyadenylation switching
213 effect occurred on those Ig isotypes, regardless of total mRNA amounts (Fig E4, B). Our IgE-targeting
214 ASO is therefore specific for the IgE isotype and will not affect synthesis or polyadenylation of other Ig
215 subclasses, maintaining a responsive immune system against pathogens.

216 Allergic IgE immune responses are closely related to residual circulating serum IgE secreted by plasma
217 cells which are generated either by direct class switching from IgM+ B cells or sequential class switching
218 from IgG1+ B cells in germinal centers (3,18). Furthermore, reducing circulating IgE and the number of
219 IgE secreting cells would likely favour an IgG4 allergen blocking effect by balancing the IgG4/IgE ratio
220 and in this way promote a tolerant immune response for the next allergen encounter. Like IgE, IgG4 is
221 produced by the Th2 response but the presence of IL-10 drives switching to IgG4 rather than IgE (19).
222 IgG4 can directly compete with IgE due to its allergen-binding specificity and additionally inhibit mast
223 cell and basophil degranulation by cross-linking FcεRI with its inhibitory FcγIIb receptor (20). Thus, an

224 ASO treatment could be beneficial in two ways: directly by reducing IgE secretion in tissues and blood
225 and indirectly by promoting tolerance through an increase in the IgG4/IgE ratio.

226 Local delivery of ASO could be advantageous in asthma or atopic dermatitis patients as most of the IgE
227 class-switching in those allergic diseases seems to occur in the mucosa (21). Indeed, intradermal
228 injections of a splice-switching oligonucleotide targeting FcRI β already demonstrated positive results
229 in a mouse model of allergic dermatitis (22). In addition, previous studies have shown that transdermal
230 delivery of ASO is possible (23) and respirable ASO for aerosol delivery has already been developed
231 (24). However, systemic ASO delivery could also be interesting as ASO can exert long lasting effects
232 resulting in a reduced number of injections (25). Nonetheless, the impact of IgE ASO need to be
233 confirmed *in vivo* with some formulation adjustments to effectively target a broad range of IgE-
234 dependent allergies.

235 We show here that targeting the secreted IgE PAS with an ASO is an effective method to reduce IgE
236 secretion which has already proven to be beneficial for IgE-dependent allergic patients (2) while
237 enhancing membrane IgE expression to promote apoptosis of IgE-expressing plasma cells. This latter
238 effect could be even more favourable for allergic patient prognosis as it could reduce the IgE plasma
239 cell compartment (4) and, in this manner, decrease IgE production to promote allergen tolerance as
240 other types of Ig are not affected.

241 **ACKNOWLEDGMENTS**

242 We thank ArkAb (a division of B Cell Design) for kindly providing InEps mice and IgE-specific hybridoma
243 cells. We thank also the staff of our animal facility (University of Limoges, France).

244 **REFERENCES**

- 245 1. MacGlashan DW. IgE-dependent signaling as a therapeutic target for allergies. *Trends Pharmacol*
246 *Sci.* 2012 Sep 1;33(9):502–9.
- 247 2. Kawakami T, Blank U. From IgE to Omalizumab. *J Immunol.* 2016 Dec 1;197(11):4187–92.
- 248 3. Wu LC, Zarrin AA. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol.*
249 2014 Apr;14(4):247–59.
- 250 4. Laffleur B, Duchez S, Tarte K, Denis-Lagache N, Péron S, Carrion C, et al. Self-Restrained B Cells
251 Arise following Membrane IgE Expression. *Cell Rep.* 2015 Feb 17;10(6):900–9.
- 252 5. Haniuda K, Fukao S, Kodama T, Hasegawa H, Kitamura D. Autonomous membrane IgE signaling
253 prevents IgE-memory formation. *Nat Immunol.* 2016 Sep;17(9):1109.
- 254 6. Yang Z, Sullivan BM, Allen CDC. Fluorescent In Vivo Detection Reveals that IgE+ B Cells Are
255 Restrained by an Intrinsic Cell Fate Predisposition. *Immunity.* 2012 May 25;36(5):857–72.
- 256 7. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu Rev Med.*
257 2019;70(1):307–21.
- 258 8. Smith CIE, Zain R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*
259 2019;59(1):605–30.
- 260 9. Vickers TA, Wyatt JR, Burckin T, Bennett CF, Freier SM. Fully modified 2' MOE oligonucleotides
261 redirect polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* 2001 Mar 15;29(6):1293–9.
- 262 10. Vorlová S, Rocco G, LeFave CV, Jodelka FM, Hess K, Hastings ML, et al. Induction of Antagonistic
263 Soluble Decoy Receptor Tyrosine Kinases by Intronic PolyA Activation. *Mol Cell.* 2011 Sep
264 16;43(6):927–39.

- 265 11. Elkon R, Ugalde AP, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and
266 function. *Nat Rev Genet.* 2013 Jul;14(7):496–506.
- 267 12. Levin AA. Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *N Engl J Med.* 2019 Jan
268 3;380(1):57–70.
- 269 13. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target
270 mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013
271 Sep;31(9):822–6.
- 272 14. Grünwald J, Zhou R, Garcia SP, Iyer S, Lareau CA, Aryee MJ, et al. Transcriptome-wide off-target
273 RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature.* 2019 May;569(7756):433–7.
- 274 15. Zuccarino-Catania GV, Sadanand S, Weisel FJ, Tomayko MM, Meng H, Kleinstei SH, et al. CD80
275 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody
276 isotype. *Nat Immunol.* 2014 Jul;15(7):631–7.
- 277 16. Andreani V, Ramamoorthy S, Pandey A, Lupar E, Nutt SL, Lämmermann T, et al. Cochaperone Mzb1
278 is a key effector of Blimp1 in plasma cell differentiation and β 1-integrin function. *Proc Natl Acad*
279 *Sci.* 2018 Oct 9;115(41):E9630–9.
- 280 17. Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, Akdis M, Akdis CA. IL-10 producing T and B cells in allergy. *Semin*
281 *Immunol.* 2019 Aug 1;44:101326.
- 282 18. He J-S, Subramaniam S, Narang V, Srinivasan K, Saunders SP, Carbajo D, et al. IgG1 memory B cells
283 keep the memory of IgE responses. *Nat Commun.* 2017 Sep 21;8(1):641.
- 284 19. Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T Regulatory-1 Cells Induce IgG4 Production by B Cells:
285 Role of IL-10. *J Immunol.* 2005 Apr 15;174(8):4718–26.

- 286 20. Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo
287 through both antigen interception and FcγRIIb cross-linking. *J Clin Invest*. 2006 Mar 1;116(3):833–
288 41.
- 289 21. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, et al. The Biology of IgE and the
290 Basis of Allergic Disease. *Annu Rev Immunol*. 2003 Apr 1;21(1):579–628.
- 291 22. Cruse G, Yin Y, Fukuyama T, Desai A, Arthur GK, Bäumer W, et al. Exon skipping of FcεRIβ eliminates
292 expression of the high-affinity IgE receptor in mast cells with therapeutic potential for allergy. *Proc*
293 *Natl Acad Sci*. 2016 Dec 6;113(49):14115–20.
- 294 23. Brand RM, Iversen PL. Transdermal delivery of antisense compounds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000
295 Oct 31;44(1):51–7.
- 296 24. Tang L, Sandrasagra A, Teng K, Nyce JW, Li Y, Mannion JC, et al. RASONS: a novel antisense
297 oligonucleotide therapeutic approach for asthma. *Expert Opin Biol Ther*. 2001 Nov 1;1(6):979–83.
- 298 25. Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of
299 antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Jun 29;87:46–51.

300 **FIGURE LEGENDS**

301 **FIG E1. IgE targeting ASO decreased secreted IgE and increased membrane IgE in a human IgE**
302 **transgenic mouse model. A.** IGH locus in InEps™ mouse model. **B,C,D.** Isolated spleen cells treated 48
303 hours with 1μM hydroxytamoxifen and 2μM IgE targeting ASO (ASO) or irrelevant control ASO (CTRL)
304 (n=5). **B.** Total IgE in supernatants measured by ImmunoCap assays. **C.** Secreted and membrane IgE
305 mRNA quantified by qRT-PCR. **D.** Intracellular IgE bearing B cells were analysed by flow cytometry. **E,F.**
306 InEps™ hybridoma cells secreting allergen specific IgE to : penicillin, ovalbumin and wasp venom were
307 treated 48 hours with 3μM ASO or CTRL (n=4). **E.** Total IgE in supernatants measured as in B. **F.** Secreted
308 and membrane IgE mRNA quantified as in C.

309 **FIG E2. IgE targeting ASO decreased secreted IgE and promoted apoptosis through membrane IgE**
310 **expression in a human plasma cell line.** IgE secreting U266 human myeloma cells were treated 48
311 hours with 6μM ASO or CTRL (n=11). **A.** Total IgE measured by ImmunoCap assays. **B.** Secreted and
312 membrane IgE mRNA quantified by qRT-PCR. **C.** Exon coverage of RNA sequencing reads on IGHE gene.
313 **D.** Apoptosis flow cytometry with annexin V and 7-AAD labelling. **E,** PARP Western Blot analysis on
314 total extracted protein.

315 **FIG E3. IgE targeting ASO treatment induces a shifted profile in a human plasma cell line.** IgE secreting
316 U266 human myeloma cells were treated 48 hours with 6μM ASO or CTRL and polyadenylated RNA
317 was sequenced (n=4). **F.** Heatmap of 202 differentially expressed genes by DEseq2 analysis of RNA
318 sequencing results. **G.** Significant Gene Ontology and Reactome pathways performed on differentially
319 expressed genes.

320 **FIG E4. IgE targeting ASO decreased secreted IgE and promoted apoptosis through membrane IgE**
321 **expression in human cells but did not affect other Ig isotypes.** Sorted human B cells stimulated with
322 CD40 ligand and IL-4 and treated 72 hours with 2μM ASO or CTRL (n=5). **A.** Secreted and membrane
323 IgE, total IgG1 and total IgM mRNA and **B.** secreted and membrane IgG1 and IgM mRNA quantified by
324 qRT-PCR.

325 **TABLE E1. Differentially expressed genes analysed by DESeq2 after RNA sequencing.** Differentially
326 expressed gene with a fold change $< \text{ or } > 1.5$ and an adjusted p value < 0.05 were selected from DESeq2
327 analysis gene list.

Figure E1

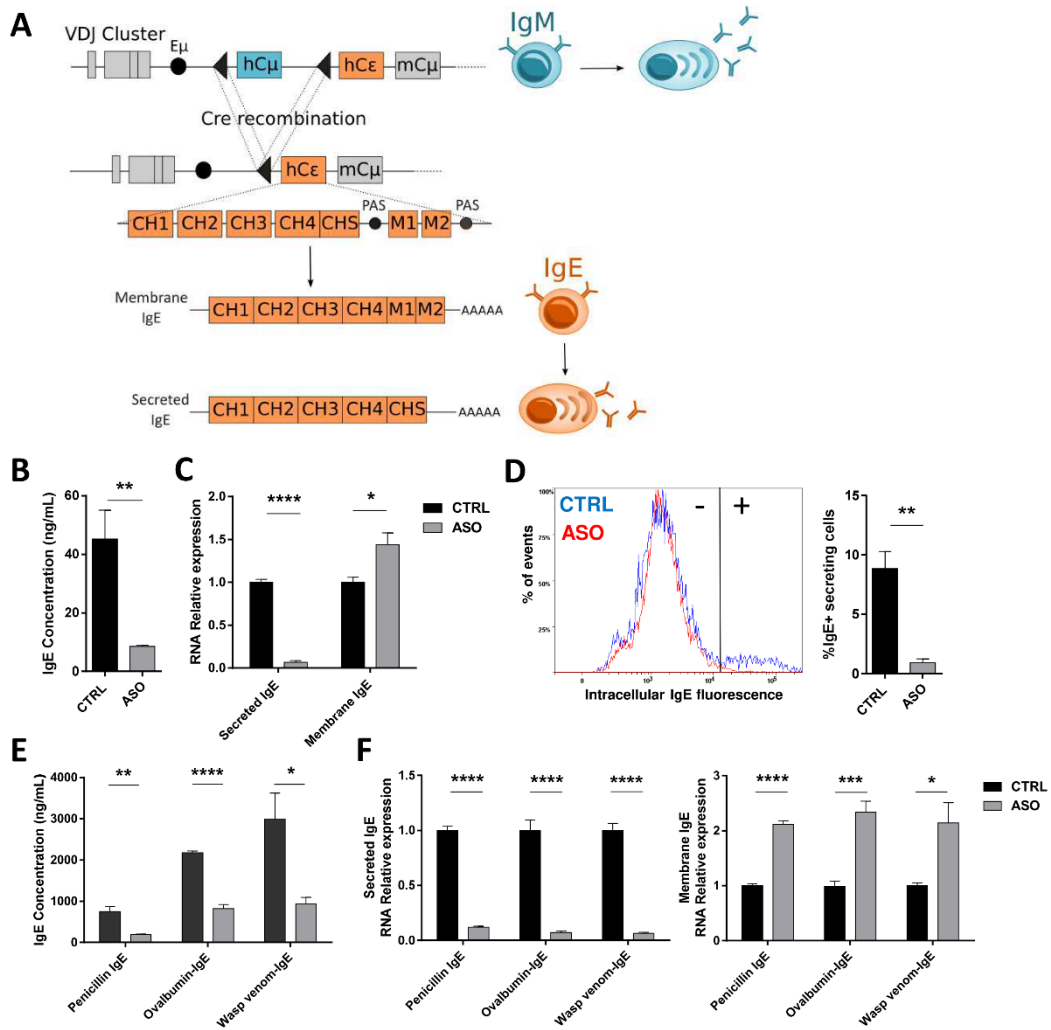


Figure E2

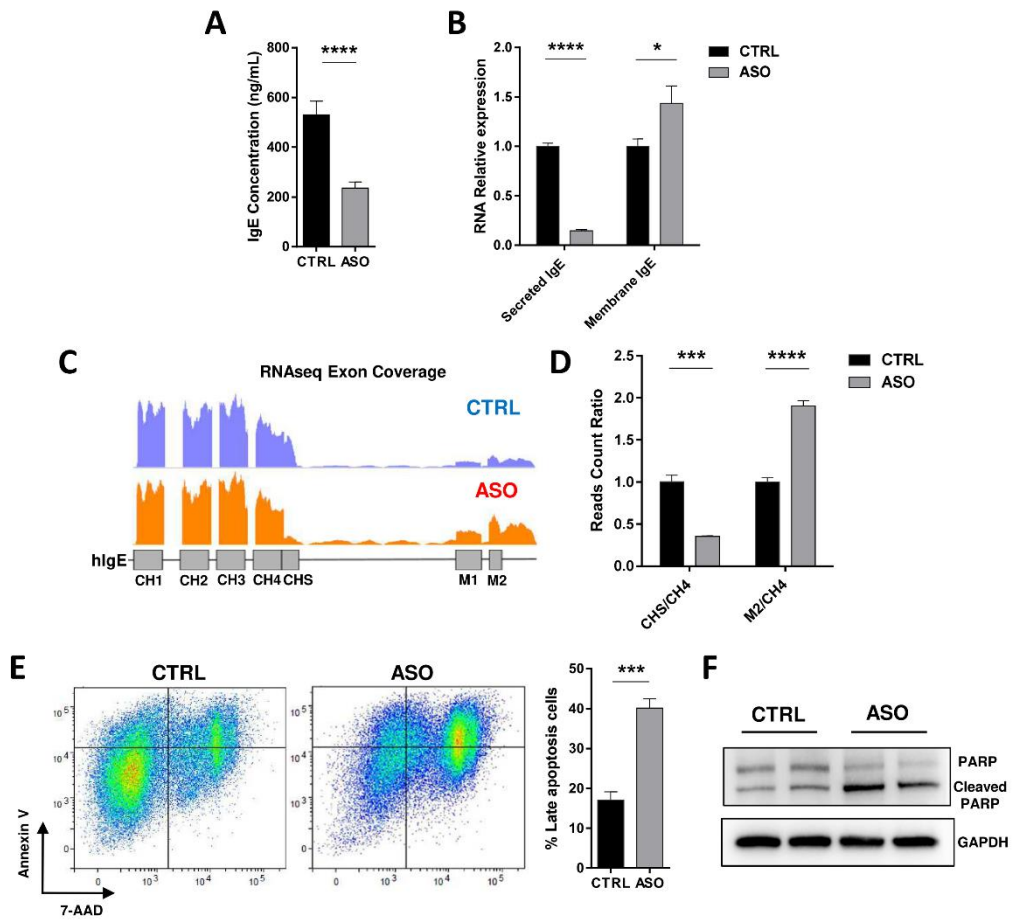


Figure E3

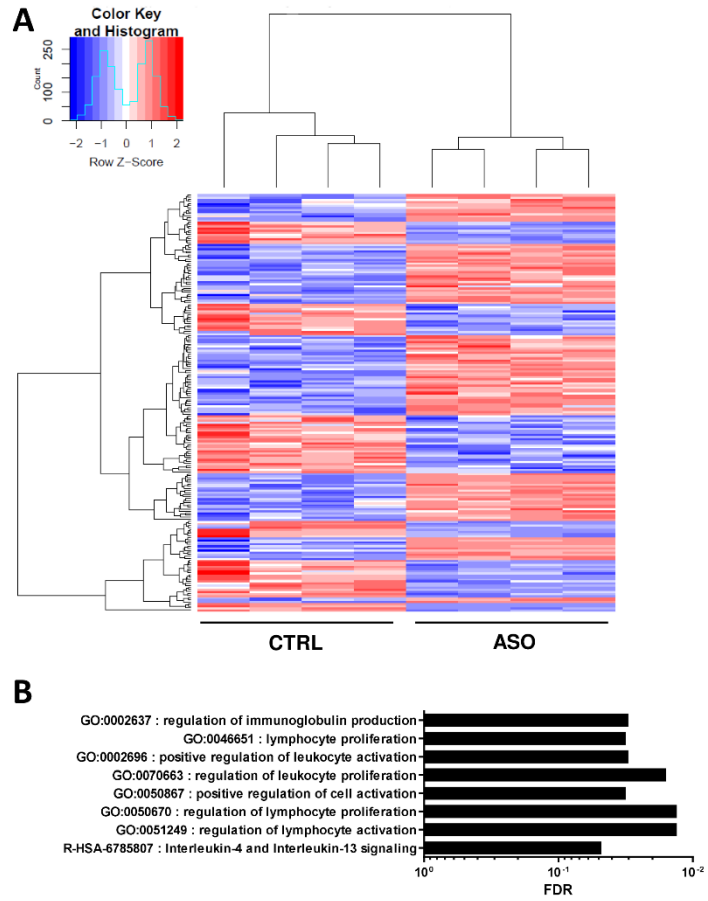
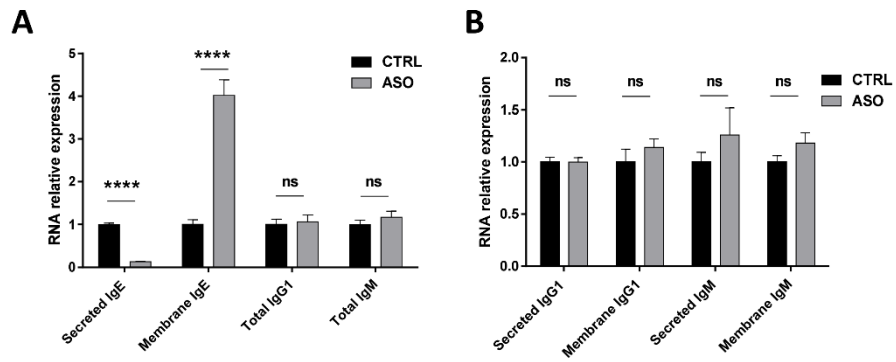


Figure E4



Tables

Geneid	log2 Fold Change	Adjusted p-value
C1orf167	-1,74	4,84E-02
RNU1-1	1,95	5,84E-06
U1	1,08	4,15E-06
RNU1-3	1,32	4,97E-03
ALDH4A1	-1,00	2,27E-08
MRT04	1,07	3,60E-19
HSPG2	-0,83	1,03E-09
Metazoa_SRP	0,69	1,21E-03
SEPN1	0,84	1,08E-02
FGR	-0,83	1,51E-02
MATN1	0,65	2,05E-02
S1PR1	-0,70	1,27E-06
VANGL1	0,65	1,18E-26
RP11-27K13.3	0,99	5,48E-04
RNVU1-18	0,95	3,45E-03
C1orf56	-0,71	2,39E-02
LINGO4	1,03	3,39E-09
AL450992.2	0,62	4,45E-06
S100A10	-1,04	8,87E-03
C1orf189	1,82	5,48E-04
LENEP	5,58	7,07E-08
TRIM46	-0,66	8,44E-03
RP4-612B18.3	2,23	2,88E-04
PAPPA2	0,82	2,70E-02
CACNA1E	0,77	2,14E-03
CHI3L1	0,66	2,81E-06
LINC01136	-0,84	1,18E-02
ZBED6	-1,23	1,20E-05
IL10	1,03	7,26E-06
AC010729.1	0,67	5,15E-03
MFS2B	1,61	7,26E-06
ADD2	-0,66	5,06E-03
RN7SKP203	1,66	1,23E-10
COL3A1	1,14	1,54E-07
CHPF	-0,60	3,70E-02
ARL4C	-0,68	2,25E-03
CPNE9	2,79	1,26E-11
IL17RE	1,56	1,98E-08
CRELD1	-0,63	3,74E-02
CCR3	0,98	1,68E-08
CCR1	0,74	7,76E-07
UBA7	1,12	3,04E-03
CD80	0,94	3,17E-04
LINC00886	1,05	1,45E-02
LINC00880	0,59	3,43E-02

NCAPG	-0,63	7,25E-03
RBM47	-0,72	6,54E-28
DCAF4L1	0,69	1,01E-02
LINC01088	0,78	3,69E-02
SH3RF1	-1,01	8,56E-04
NEK1	-0,89	1,50E-07
CENPU	0,67	2,03E-04
CTD-2152M20.2	1,41	3,17E-04
SLC45A2	1,08	5,00E-06
EMB	-0,73	2,40E-03
IPO11	0,77	9,94E-06
IL13	1,20	3,03E-04
KDM3B	1,07	2,60E-59
SLC23A1	1,07	1,85E-06
MZB1	-1,06	1,21E-10
ECI2	1,77	6,92E-78
C6orf52	1,17	4,23E-06
BAK1	-0,66	9,97E-06
MAPK13	-0,59	4,02E-02
CPNE5	-0,73	3,01E-08
GSTA9P	-1,16	4,55E-02
RN7SK	1,47	3,49E-09
RP11-301G19.1	0,61	6,51E-05
RP11-462G2.1	1,23	9,51E-24
RP11-477D19.2	0,59	3,09E-04
ZNF815P	-0,79	1,03E-02
AC005083.1	0,76	2,01E-03
CHN2	0,59	8,91E-13
AC007551.3	0,95	3,46E-02
AC005537.2	0,78	2,40E-03
COBL	-0,96	2,85E-02
RNU6-11P	2,58	8,71E-05
PLXNA4	-0,64	9,85E-08
EFNB1	-1,00	4,75E-02
DRP2	1,51	2,28E-02
AFF2	1,14	8,84E-05
PRRG3	1,71	7,42E-04
EMD	-0,81	3,11E-08
ADAMDEC1	0,64	1,39E-06
ARFGEF1	0,64	1,21E-03
RP11-383H13.1	0,74	4,78E-03
RP11-1149M10.2	0,66	1,18E-02
FBXO43	0,67	3,50E-09
GSDMC	0,84	3,17E-02
PDCD1LG2	0,98	4,62E-02
GLDC	-0,61	3,99E-06

RP11-77E14.2	1,41	1,12E-02
AGTPBP1	-0,73	8,76E-05
BAAT	1,28	4,30E-02
ZFP37	0,74	2,77E-03
C5	0,59	2,06E-02
FAM78A	-0,66	3,58E-03
OBP2A	-0,93	2,13E-07
PAEP	-0,78	2,42E-02
TOR4A	1,40	1,50E-07
TMEM9B-AS1	1,01	2,26E-05
ADM	-0,62	1,08E-02
KIAA1549L	0,97	5,44E-04
SLC43A1	0,90	8,50E-03
BEST1	1,14	4,33E-02
P2RY2	-0,98	1,10E-02
RP11-800A3.4	-0,91	4,55E-02
P2RY6	-0,73	3,42E-06
COLCA1	1,05	8,14E-11
BTG4	0,97	6,05E-03
RP5-1031D4.2	0,85	4,01E-04
STAM-AS1	0,76	8,93E-03
RNU6-15P	2,63	1,50E-04
ZNF25	0,59	2,16E-02
TMEM72-AS1	0,89	2,40E-02
TMEM72	0,65	1,13E-04
KIAA1279	0,76	3,12E-02
C10orf54	-1,11	8,66E-09
ANAPC16	0,65	4,37E-17
TTC18	0,86	9,20E-04
SEC31B	0,65	3,36E-03
WDR96	1,37	8,93E-04
ADAM12	0,68	7,80E-03
CLEC1B	0,67	3,72E-04
CPNE8	0,61	7,93E-04
SARNP	-1,14	2,10E-02
IGF1	-0,97	2,45E-03
TMEM119	-0,59	1,51E-02
RP11-689B22.2	1,50	9,29E-39
MAPKAPK5-AS1	-0,59	7,04E-05
RN7SKP71	1,68	1,49E-06
RP1-71H24.6	1,72	4,62E-07
OAS2	-0,59	2,96E-08
LINC00173	-0,82	3,00E-02
RNU4-2	1,60	1,61E-02
TM9SF2	-0,72	1,01E-06
RP11-12G12.7	-0,62	3,22E-03

MYO16	0,72	9,47E-03
NDRG2	-1,22	2,48E-04
MIS18BP1	0,66	3,60E-02
IGHE	-0,79	1,54E-14
IGHG1	-0,83	2,34E-02
IGHV1-2	-0,75	1,26E-11
GOLGA6L2	-0,86	1,47E-13
SPTBN5	-0,77	2,22E-06
USP8	-0,87	5,52E-08
ALDH1A2	1,04	3,34E-05
KIAA1024	0,67	2,04E-03
ISG20	-0,61	4,02E-05
CTD-2313J17.6	1,60	1,25E-04
MPG	-1,14	9,19E-09
CLUAP1	-0,72	4,90E-06
TVP23A	1,28	2,50E-02
RP11-264B17.3	0,79	3,77E-02
MT2A	2,56	1,26E-11
RP11-252A24.2	0,88	1,10E-09
KIAA0513	-0,72	1,63E-11
FAM92B	-3,50	3,22E-11
SNAI3	-0,77	2,44E-02
GALNS	-0,72	4,28E-03
P2RX5-TAX1BP3	1,03	5,35E-03
P2RX5	-0,70	3,16E-05
KCNAB3	0,90	2,37E-05
SNORD3D	1,61	6,42E-04
SUPT6H	-0,62	5,71E-20
CCL4L1	-0,92	1,25E-04
AC091132.1	-0,73	2,07E-02
RPS26P8	-0,75	4,08E-02
AC003665.1	0,62	4,28E-02
ITGA3	-0,62	2,32E-06
UTP18	-0,91	6,46E-54
BZRAP1	0,92	1,00E-12
CTD-2319I12.4	-0,63	2,80E-02
GH1	2,76	5,88E-14
SCN4A	1,10	1,21E-15
LLGL2	-0,68	3,76E-06
GALK1	-0,76	1,16E-03
TMC6	-0,61	2,99E-03
MYADML2	-0,60	1,18E-02
MYLK2	2,29	8,55E-36
SRC	-1,20	4,30E-02
RP4-564F22.5	1,68	9,75E-49
RP4-564F22.7	1,92	1,18E-10

BCAS4	-0,66	9,61E-03
STX16-NPEPL1	1,12	1,36E-05
ABCA7	-0,63	7,44E-05
CIRBP	-0,69	2,71E-13
NFIX	-0,59	3,24E-04
IL27RA	-0,66	2,39E-04
AC079466.1	0,99	6,15E-03
GYS1	-0,65	1,61E-06
NAPSA	-0,84	2,45E-02
NLRP4	0,85	2,22E-02
AC007228.11	0,84	1,74E-02
CRYBB1	0,73	3,53E-02
CSF2RB	-1,20	6,99E-10
H1FO	-0,78	2,26E-05
MLC1	-0,76	4,36E-06
CHODL	0,84	2,55E-04
NCAM2	0,94	1,54E-03
MT-TV	2,24	4,39E-29
MT-TL1	0,63	1,15E-06

II.1.1.2. Modulation de l'IgA-membranaire par ASO

En parallèle de mes travaux sur IgE, j'ai également évalué une autre stratégie avec un ASO ciblant le PAM de l'IgA humaine, la séquence ciblée étant identique chez l'IgA1 et l'IgA2. Cet ASO permettrait de réduire les transcrits codant pour l'IgA membranaire, diminuant de ce fait le signal de survie et de prolifération induit par un cross-linking du BCR sans affecter les transcrits d'IgA secrétées. Diminuer le signal BCR IgA pourrait en effet être intéressant dans le cadre de maladies auto-immunes liées à l'IgA comme la maladie de Crohn ou la maladie de Berger (134,135) en diminuant la viabilité des cellules B et plasmocytaires productrices d'IgA pathogènes (Figure 43).

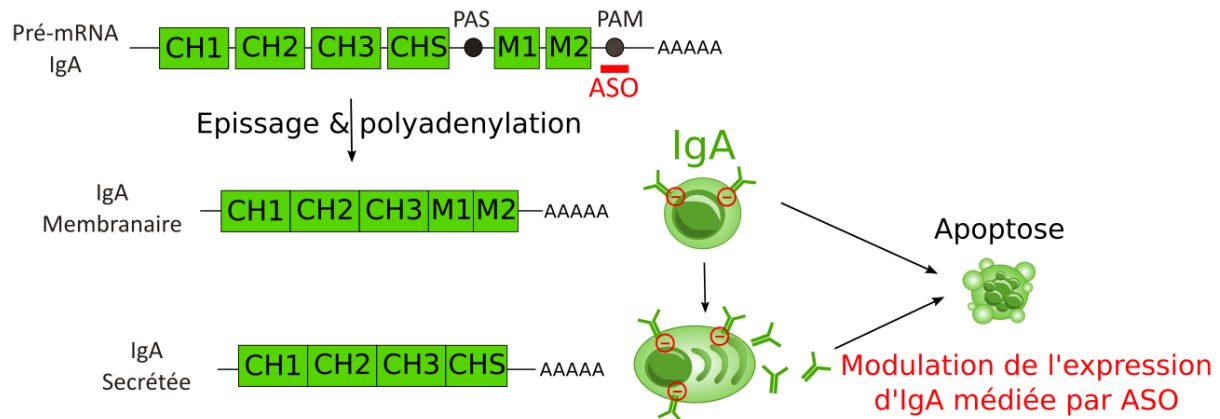


Figure 43. Modulation de la polyadénylation de l'ARNm codant pour l'IgA avec un ASO ciblant le PAM.

Un ASO hybridé au PAM principal du pré-ARNm codant pour l'IgA va diminuer la synthèse d'IgA membranaire sans affecter la synthèse d'IgA sécrétée. Les cellules B de même que les nombreux plasmocytes produisant des IgA membranaires se verront donc privés du signal BCR qui participe à leur prolifération cellulaire et seront plus prompts à l'apoptose.

En effet, l'IgA est une des seules Ig (avec l'IgM) à être retrouvée en abondance sous forme membranaire chez le plasmocyte comme l'a montré l'étude de Pinto et al (238). Les auteurs ont également montré que le cross-linking du BCR avec un anticorps anti-BCR permet d'induire un signal BCR fonctionnel qui favorise la survie des plasmocytes à IgA et suggèrent que cet effet pourrait favoriser la tolérance vis-à-vis du microbiote (238). En effet les IgA jouent un rôle primordial dans la régulation du microbiote intestinal en facilitant l'implantation des bactéries bénéfiques via leur fixation à la paroi bactérienne (239). Dans la maladie de Crohn, ce signal de tolérance est déficient et le système immunitaire peut réagir contre la levure commensale *Saccharomyces cerevisiae*, provoquant une infiltration de plasmocytes à IgA dans la lamina propria de l'intestin (134). Cibler le signal BCR IgA avec un ASO IgA-PAM pourrait dans ce contexte atténuer la réactivité face à *Saccharomyces cerevisiae*, en diminuant la prolifération et la différenciation plasmocytaire des cellules B à IgA ou en agissant directement sur la survie des plasmocytes IgA.

Afin d'évaluer cette stratégie, des cellules productrices d'IgA humaines sont traitées avec un ASO ciblant le PAM principal de l'IgA et comparées à des cellules traitées avec un ASO irrelevant (CTRL). Trois modèles in vitro ont été utilisés : la lignée de myélome humain AMO-1 exprimant une IgA, une lignée d'hybridome de souris IgA#6 obtenue par fusion de cellules SP2/0 avec une cellule B issue du modèle murin HAMIGA™ où les gènes constants humains de l'IgA ont été intégrés au locus *Igh* avant les gènes constants murins, et des cellules B

humaines stimulées. L'expression d'IgA membranaire dans les deux lignées cellulaires a préalablement été vérifiée par cytométrie en flux.

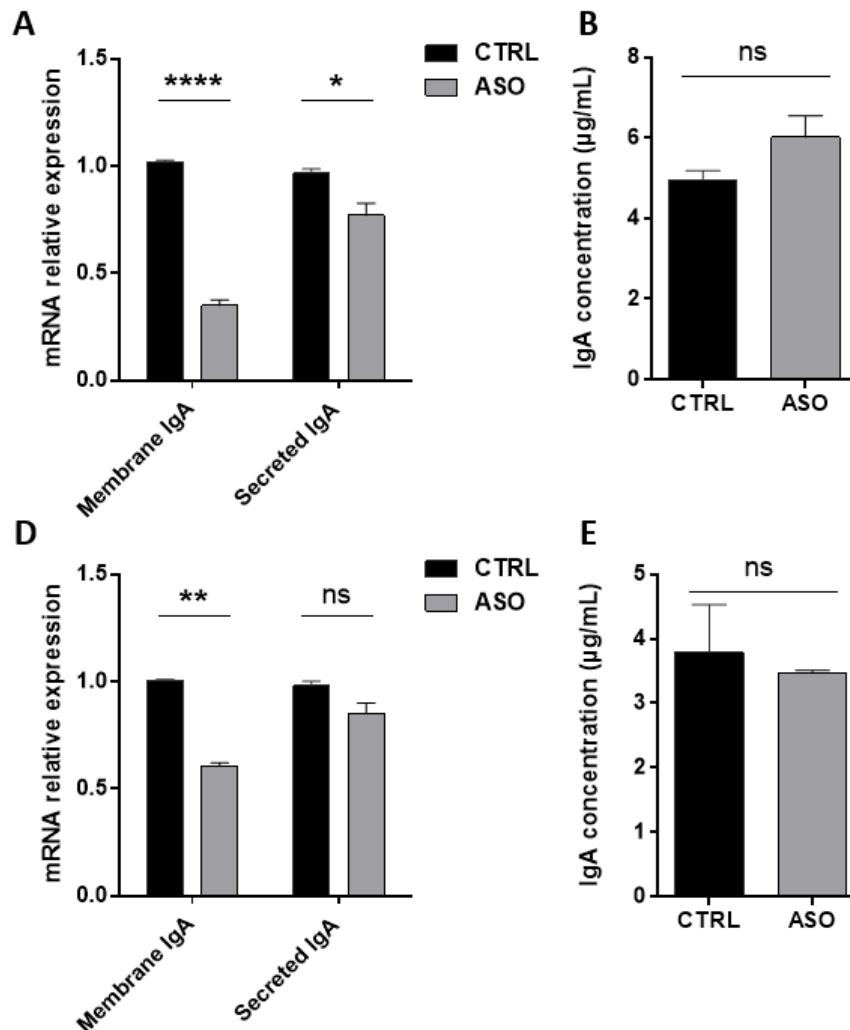


Figure 44. Le traitement ASO ciblant l'IgA-PAM diminue la production de l'IgA membranaire et sécrétée des lignées cellulaires AMO-1 et IgA#6.

A,B Les cellules de myélome AMO-1 ont été traitées 48 heures avec 3µM d'ASO ciblant le PAM d'IgA (ASO) ou d'ASO irrelevant (CTRL) (n=3). **D,E** La lignée d'hybridome IgA#6 est traitée 48 heures avec 6µM d'ASO ciblant le PAM de l'IgA (ASO) ou d'ASO irrelevant (CTRL) (n=2). **A,D** L'expression relative en ARNm IgA membranaire et IgA sécrétée est mesurée par qRT-PCR. **B,E** Le dosage de l'IgA totale dans les surnageants est mesuré par ELISA.

Les résultats préliminaires sur les lignées cellulaires AMO-1 et IgA#6 ont révélé que l'ASO diminue significativement la synthèse d'ARNm pour l'IgA membranaire, comparé aux cellules traitées avec l'ASO contrôle (Figure 44 A,D). En revanche, la synthèse d'ARNm codant pour l'IgA sécrétée n'est que très légèrement (Figure 44A) voire pas (Figure 44D) affectée par ce traitement. De ce fait le dosage d'IgA dans les surnageants de culture ne montre pas d'effet sur la sécrétion d'IgA (Figure 44 B,E). Pour compléter cette preuve de concept d'un ciblage des Ig membranaires par ASO, des expériences similaires seront réalisées prochainement sur des cellules B humaines stimulées.

- **MATERIEL ET METHODES**

DESIGN DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS

Les séquences des sites de polyadénylation encodant les immunoglobulines sécrétées et membranaires ont été recueillies sur le site NCBI, dans le génome GRCh38.p12, 20 paire de base avant et après le PAS des Ig sécrétées et membranaires sur le locus IGH. L'alignement des séquences entre les immunoglobulines a été réalisé par l'outil MView bioinformatics. Les vivo-morpholino IgA-PAM ASO (5'- GGGCCACTTTATTGCACCTGGAAGG- 3') et le irrelevant VivoStandard Control ASO (5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') ont été designés et commandés à Gene Tools, LLC. Les solutions mère d'ASO ont été reconstituées dans de l'eau sterile sans nuclease à la concentration de 0,5mM.

RT-qPCRs

L'ARN total a été préparé à l'aide du protocole Tri-reagent TRIzol (Invitrogen). Les RT-PCR ont été réalisées sur de l'ARN traité avec 1µg de DNase I (Invitrogen) en utilisant le « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystem) et des amorces Oligo(dT)¹²⁻¹⁸ (Invitrogen). Les PCR en temps réel ont été réalisées sur les ADN complémentaires équivalent à 5-10ng d'ARN par réaction en utilisant le SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), ROX plus ou le Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), ROX plus (Takara) sur l'appareil StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Les transcrits ont été quantifiés en utilisant la méthode 2-ΔΔCt après normalisation avec la GAPDH (sonde Taqman Hs02758991_g1 ThermoFisher Scientific). Pour la quantification des transcrits IgA membranaire, une PCR quantitative SYBR a été réalisée avec les amorces forward 5'- CCTTCGCTGTGACCAGCATA et reverse 5'-GTCCAGCACCATAGGGAG. Pour la quantification des transcrits IgA sécrétée, une PCR quantitative SYBR a été réalisée avec les amorces forward 5'- CCTTCGCTGTGACCAGCATA et reverse 5'- CTCCGCCATGACAACAGACA.

ELISA

Les surnageants de culture ont été analysés pour la présence d'IgA humaine par ELISA. Les ELISA ont été réalisés sur des plaques 96 puits et coatées durant la nuit à 4°C avec une solution d'anticorps polyclonal de lapin anti-IgA humaine (Dako) à 660ng/mL dans du PBS. La phase de saturation a été réalisée avec une solution de PBS 3% albumine de sérum bovin (BSA) à 37°C pendant 30 minutes. Puis après lavage, les surnageants purs et le sérum étalon ont été déposés et dilués en série dans du PBS 1% BSA. La révélation a été réalisée avec une solution d'anticorps polyclonal de mouton anti-IgA couplée à l'alcaline phosphatase (AP) (Southern Biotechnologies) à 500ng/mL dans du PBS 0.05% Tween®20 (Sigma Aldrich) pendant 1 heure 30 minutes à 37°C. L'activité AP a été mise en évidence par une incubation avec son substrat (SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate Tablets, Sigma-Aldrich) et la réaction bloquée par une solution de NaOH à 3M (Sigma Aldrich). L'absorbance de chaque puits a ensuite été mesurée à 405nm sur le spectrophotomètre Multiskan FC (Thermo Scientific).

ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Les différences statistiques entre les variables ont été évaluée par test de Student (t test) en utilisant le logiciel Prism GraphPad (San Diego, CA).

II.1.2. Discussion

Nos résultats montrent que cibler les PAS et PAM des Ig est une stratégie envisageable dans le traitement de nombreuses maladies impliquant les Ig comme l'allergie IgE-dépendante, les maladies auto-immunes liées à l'immunité humorale ou encore les cancers de la lignée lymphoïde B.

Nous avons démontré l'efficacité d'un ASO ciblant le PAS de l'IgE pour réduire la sécrétion d'IgE ce qui, en regard de l'efficacité de l'anticorps monoclonal anti-IgE omalizumab (121), est prouvé bénéfique dans le soin des allergies IgE-dépendantes. Cet effet pourrait même être potentialisé car l'ASO provoque également l'apoptose des cellules productrices d'IgE en forçant la réexpression d'IgE membranaire tout en diminuant la sécrétion d'IgE. Cette stratégie a également favorisé la transformation d'une lignée plasmocytaire vers un profil plus ressemblant aux cellules Bmem et a induit de manière surprenante une hausse de l'expression d'IL-10. L'IL-10 est une interleukine connue pour son rôle suppresseur de la réponse allergique car elle promeut la CSR vers IgG4 plutôt que vers IgE lors d'une réponse immunitaire Th2 (240,241). Il est en effet admis que la plupart des cellules productrices d'IgE à courte durée de vie sont générées soit par un CSR direct à partir de cellules B à IgM, soit par un CSR séquentiel à partir de cellules B à IgG1 (242). Les cellules B à IgG4 pourraient elles aussi être générées par un CSR séquentiel, les gènes constants *IGHG4* étant situés après les gènes constants *IGHG1* bien que cela n'ait jamais été montré. L'IgG4 est un acteur de l'inhibition de la réponse allergique car il concurrence l'IgE pour la fixation à l'allergène d'une part et inhibe la dégranulation des effecteurs des mastocytes et des basophiles via le cross-linking du récepteur FcεRI avec son récepteur inhibiteur FcγIIb d'autre part (243). L'ASO pourrait donc promouvoir une tolérance à l'allergène en favorisant la CSR vers IgG4 mais aussi en rééquilibrant le ratio IgE/IgG4 en faveur d'une réponse tolérante par son effet direct sur la diminution d'IgE circulante.

Utiliser une technologie ASO avec une administration locale pourrait être intéressante dans le traitement des allergies IgE-dépendantes. En effet, dans le cas de l'asthme, une administration sous forme d'aérosol pourrait être envisagée, de même que pour une application topique dans la dermatite atopique ou encore par un traitement oral dans le cas des allergies alimentaires par exemple. L'utilisation de voies locales d'administration n'en est qu'à ses balbutiements dans le domaine des oligonucléotides antisens (236,237) mais pourrait constituer une alternative de choix dans le traitement des allergies. Les nombreuses avancées dans les technologies de conjugaison d'ASO et d'administration cellulaires comme le conjugué GalNac3 (223) ou encore les origamis ADN (232) laissent à penser que cette prouesse pourrait être atteignable dans quelques années. Une administration locale permettrait alors d'optimiser l'efficacité des ASO tout en évitant la survenue d'effets secondaires liée à la prise de médicaments par voie générale ce qui est particulièrement attendu dans le traitement des allergies.

Un autre intérêt de la technologie ASO pour le traitement de l'allergie est sa longévité d'action. L'etepirsén, qui est un ASO de type morpholino comme celui que nous avons utilisé pour nos expériences, peut en effet n'être injecté qu'une seule fois toutes les semaines (244). D'autres types d'ASO comme le nusinersén qui est un ASO-PS 2'MOE conserve même son efficacité lorsqu'il est injecté seulement une fois tous les 4 mois (245). Cette particularité est d'un grand intérêt car elle permet de réduire le nombre de prises médicamenteuses favorisant de ce fait l'observance du traitement et améliorant le confort des patients. Un traitement à longue durée d'action serait bénéfique pour la prise en charge de nombreuses allergies qui reposent

actuellement sur la prise fréquente de médicaments comme les bronchodilatateurs inhalés dans l'asthme ou encore les corticoïdes topiques dans les allergies de la peau.

L'ASO ciblant le PAM d'IgA a quant à lui également rempli son rôle en diminuant significativement la production d'IgA membranaire bien que ces données restent encore à vérifier au niveau protéique.

Cibler à façon le site PAM d'un isotype donné présente un intérêt thérapeutique majeur. En effet, dans les cancers comme la CLL, le FL ou encore le DLBCL, diminuer l'expression du BCR permettrait de diminuer la survie et/ou la prolifération de cellules tumorales ou de potentialiser les effets de l'ibrutinib (un inhibiteur de la kinase BTK intervenant en aval du BCR), afin de diminuer la dose utilisée et de réduire les effets secondaires responsables de l'interruption du traitement chez de nombreux patients (146,147,246,247). De même cibler le site PAS d'un isotype d'Ig particulier permettrait de diminuer la sécrétion des Ig auto-réactives dans les maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (SLE), la RA ou encore la maladie coéliqua ou le pemphigus (124,127,129,131) afin d'atténuer les symptômes de ces maladies. Réduire la sécrétion d'Ig pourrait également être efficace pour réduire les effets rénaux observés dans les amyloses de chaînes d'Ig ou les atteintes rénales dues aux gammopathies monoclonales (153,154).

II.2. Modulation de la commutation de classe des immunoglobulines par ASO

La commutation de classe des Ig (CSR) permet à la cellule B de modifier les fonctions effectrices des anticorps qu'elle produit en changeant son IgM pour une IgG, une IgA ou une IgE. Le rôle de la transcription des transcrits germinaux (GLT) dans la commutation de classe d'anticorps pour rendre la région Switch accessible à AID est bien décrit (248) mais celui de l'épissage de ces transcrits reste flou. En effet, de récentes études ont montré que le lasso généré par l'épissage des transcrits GLT, une fois débranché par DBR1 (83), jouerait un rôle dans la CSR en guidant AID vers les régions switch avec l'aide de DDX1 (84) et que des facteurs d'épissage tels que PTBP2 (87) ou CTNNBL1 (88) sont importants pour le recrutement d'AID. Ces données soulignent l'importance de l'épissage des transcrits GLT dans la CSR, cependant le rôle du site donneur d'épissage des exons I dans ce mécanisme n'a pas été décrit.

Dans ce projet, nous avons utilisé des oligonucléotides antisens ciblant le site donneur d'épissage des exons I afin d'étudier le rôle de l'épissage des transcrits GLT dans la CSR. En effet, de précédents travaux réalisés dans notre équipe ont déjà utilisé les ASO vivomorpholino afin de moduler l'épissage des transcrits d'Ig avec succès (249) (Annexe 2). L'utilisation de ces ASO en ciblant le site donneur d'épissage des exons I permettrait d'altérer l'épissage des transcrits GLT sans altérer sa transcription ni modifier la séquence ADN endogène qui code pour ce transcrit (Figure 45).

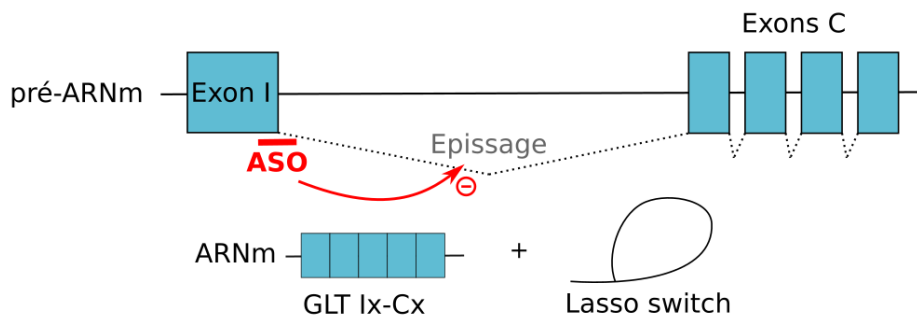


Figure 45. Inhibition de l'épissage des exons I à l'aide d'un ASO.

L'épissage des exons I au sein des transcrits GLT peut être inhibé à l'aide d'un ASO ciblant le site donneur d'épissage d'un exon I. Ce faisant, la génération du transcrit GLT et du lasso résultants de l'épissage est diminuée.

Nos travaux publiés le 8 mai 2020 dans le journal « Frontiers in Immunology », ont montré qu'altérer l'épissage des transcrits GLT à l'aide d'oligonucléotides antisens a permis de découpler le rôle de la transcription et de l'épissage dans la CSR. Nous avons mis en évidence que la reconnaissance du site donneur d'épissage des exons I est essentielle pour réaliser la pause de la Pol II mais aussi pour promouvoir l'ouverture de la chromatine dans les régions Switch grâce à au modèle murin à promoteur métallothionéine II_A humaine (hMT) et son homologue délété du site donneur d'épissage de l'exon I γ 1 (s-hMT) (250). De plus, altérer l'épissage des transcrits GLT donneurs et accepteurs à l'aide d'ASO a diminué significativement la CSR vers IgG1 et IgG3, même en la présence de transcrits GLT alternatifs. La reconnaissance du site donneur d'épissage constitutif de l'exon I semble donc être une étape essentielle pour réaliser la CSR.



Uncoupling Splicing From Transcription Using Antisense Oligonucleotides Reveals a Dual Role for I Exon Donor Splice Sites in Antibody Class Switching

OPEN ACCESS

Edited by:

Deborah K Dunn-Walters,
University of Surrey, United Kingdom

Reviewed by:

David Jonathan Fear,
King's College London,
United Kingdom
Paolo Casali,
University of Texas Health Science
Center San Antonio, United States

***Correspondence:**

Laurent Delpy
laurent.delpy@unilim.fr
Soazig Le Pennec
soazig.le-pennec@unilim.fr

[†] These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

[‡] These authors have contributed
equally to this work and share last
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
B Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 15 January 2020

Accepted: 06 April 2020

Published: 08 May 2020

Citation:

Marchalot A, Ashi MO, Lambert J-M,
Carrion C, Lecardeur S, Srour N,
Delpy L and Le Pennec S (2020)
Uncoupling Splicing From
Transcription Using Antisense
Oligonucleotides Reveals a Dual Role
for I Exon Donor Splice Sites in
Antibody Class Switching.
Front. Immunol. 11:780.
doi: 10.3389/fimmu.2020.00780

Anne Marchalot^{1†}, Mohamad Omar Ashi^{1†}, Jean-Marie Lambert^{1†}, Claire Carrion¹,
Sandrine Lecardeur¹, Nivine Srour^{1,2}, Laurent Delpy^{1*†} and Soazig Le Pennec^{1*†}

¹ Unité Mixte de Recherche CNRS 7276, INSERM 1262, Université de Limoges, Limoges, France, ² Segal Cancer Center, Lady Davis Institute for Medical Research and Departments of Oncology and Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada

Class switch recombination (CSR) changes antibody isotype by replacing C μ constant exons with different constant exons located downstream on the immunoglobulin heavy (*IgH*) locus. During CSR, transcription through specific switch (S) regions and processing of non-coding germline transcripts (GLTs) are essential for the targeting of activation-induced cytosine deaminase (AID). While CSR to IgG1 is abolished in mice lacking an I γ 1 exon donor splice site (dss), many questions remain regarding the importance of I exon dss recognition in CSR. To further clarify the role of I exon dss in CSR, we first evaluated RNA polymerase II (RNA pol II) loading and chromatin accessibility in S regions after activation of mouse B cells lacking I γ 1 dss. We found that deletion of I γ 1 dss markedly reduced RNA pol II pausing and active chromatin marks in the S γ 1 region. We then challenged the post-transcriptional function of I exon dss in CSR by using antisense oligonucleotides (ASOs) masking I exon dss on GLTs. Treatment of stimulated B cells with an ASO targeting I γ 1 dss, in the acceptor S γ 1 region, or I μ dss, in the donor S μ region, did not decrease germline transcription but strongly inhibited constitutive splicing and CSR to IgG1. Supporting a global effect on CSR, we also observed that the targeting of I μ dss reduced CSR to IgG3 and, to a lesser extent, IgG2b isotypes. Altogether, this study reveals that the recognition of I exon dss first supports RNA pol II pausing and the opening of chromatin in targeted S regions and that GLT splicing events using constitutive I exon dss appear mandatory for the later steps of CSR, most likely by guiding AID to S regions.

Keywords: B cells, class switch recombination, splicing, germline transcripts, I exon, antisense oligonucleotides

INTRODUCTION

During immune responses, B cells can diversify the immunoglobulin (Ig) repertoire through class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM). SHM introduces mutations in the variable (V) regions of Ig genes modifying antibody affinity for a cognate antigen. The mouse Ig heavy chain (*IgH*) locus comprises eight constant genes (C μ). CSR involves long-range interactions

at the *IgH* locus and occurs between GC-rich repetitive switch (S) DNA regions preceding each C_H gene due to the enzymatic activity of activation-induced deaminase (AID) (1, 2). Thus, CSR replaces the C_μ exons by a downstream constant gene C_γ , C_ϵ , or C_α allowing expression of antibodies with different isotypes (from IgM to IgG, IgE, or IgA) and effector functions.

Transcription through S regions is required for CSR (3). Germline (GL) transcription is initiated from intervening (I) promoters a few kilobases upstream of both the donor and the acceptor S regions. The μ I promoter drives constitutive transcription through S_μ while γ , ϵ , or α I promoters are inducible. Primary GL transcripts (GLTs) exhibit a conserved structure composed of a non-coding I exon, an intronic S region, and C_H exons (4, 5). In mature GLTs, the I exon is spliced to the first exon (CH1) of the adjacent constant gene. Because multiple stop codons are present in the three reading frames of I exons, these GLTs do not encode peptides of significant lengths.

During CSR, AID initiates double-strand DNA breaks (DSBs) by deaminating cytidines inside the transcribed S regions. GL transcription through S regions of C_H gene favors AID accessibility to S regions (3). GL transcription promotes generation of RNA: DNA hybrid structures (R-loops) (6, 7) revealing single-stranded DNA (ssDNA) that serves as a substrate for AID (8). The impairment of transcription elongation upon R-loop formation (9) may favor RNA polymerase II (RNA pol II) pausing. RNA pol II pausing then promotes AID recruitment to S regions (10, 11). Paused RNA pol II and histone modifications associated with “open” chromatin, such as histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3) and histone H3 lysine 9 acetylation (H3K9ac), are enriched in transcribed I-S regions and have been involved in AID targeting to S regions primed for CSR (12–16). Moreover, the suppressor of Ty 5 homolog (Spt5) transcription elongation factor and the RNA exosome, a cellular RNA-processing degradation complex, associate with AID together with paused RNA pol II in transcribed S regions and are required for CSR (17, 18).

Beyond the prerequisite transcription of S regions, splicing of GLTs has been proposed to be important for the CSR process. Notably, CSR to IgG1 is severely impaired in a mouse model lacking the I γ 1 exon donor splice site (dss) (19, 20). Further supporting a role for splicing of GLTs in CSR, several RNA processing and splicing factors are critical regulators of CSR (21, 22). Interestingly, it has recently been proposed that intronic switch RNAs produced by the splicing of primary GLTs act as guide RNAs and target AID to DNA in a sequence-specific manner (23). After lariat debranching by the RNA debranching enzyme (DBR1), these switch RNAs are folded into G-quadruplexes. G-quadruplexes and AID are targeted to the S region DNA through the post-transcriptional action of the DEAD-box RNA helicase 1 (DDX1) (24).

Even though these data suggest that processing of GLTs by the splicing machinery is necessary for CSR, the precise role of I exon dss recognition in antibody class switching remains largely unknown. To address this issue, we first analyzed whether the presence of I γ 1 exon dss could influence RNA pol II pausing and chromatin accessibility of the S γ 1 region, as early events leading to CSR to IgG1. For that, chromatin immunoprecipitation

(ChIP) experiments were performed in stimulated B cells from the previously described human metallothionein II_A (*hMT*) and *s-hMT* (splice *hMT*) mouse models, lacking or harboring I γ 1 exon dss, respectively (19, 20). We next specifically evaluated the impact of GLT splicing on CSR to IgG1 by using antisense oligonucleotides (ASOs) targeting specific I exon dss on primary GLTs, from both donor and acceptor S regions. Contrary to the models used previously to study the impact of I exons on CSR, treatment of mouse B cells by ASOs masks only a short RNA sequence (23–25 nucleotides) surrounding the I exon dss on primary GLTs. This antisense strategy bypassing the impact of I exon dss recognition on transcription is very useful for studying the involvement of I exon dss recognition in CSR at the post-transcriptional level. Collectively, our data indicate that the recognition of I exon dss exerts both transcriptional and post-transcriptional roles during CSR.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Two- to 8-month-old *C57BL/6*, *s-hMT*, and *hMT* mice were used. *hMT* and *s-hMT* mice were kindly obtained from Dr. A. Radbruch (Leibniz Institute, Berlin, Germany). Mice were housed, and procedures were conducted in agreement with European Directive 2010/63/EU on animals used for scientific purposes applied in France as the “Décret n°2012-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.” Accordingly, the present project APAFIS#15279-2018052915087229 v3 was authorized by the “Ministère de l’Éducation Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.”

Splenic B Cell *in vitro* Stimulation and ASO Treatments

Splenic B cells isolated from *C57BL/6*, *hMT*, and *s-hMT* mice were purified with the EasySep Mouse B Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies). B cells were cultured for 2–4 days in RPMI 1640 with UltraGlutamine (Lonza) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Dominique Dutscher), 1 mM sodium pyruvate (Eurobio), 1% AANE (Eurobio), 50 U/ml penicillin/50 μ g/ml streptomycin (Gibco), and 129 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Splenic B cells were stimulated with either 1 or 5 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) (LPS-EB Ultrapure, InvivoGen), 1 μ g/ml LPS + 20 ng/ml interleukin 4 (IL4) (recombinant murine IL-4, PeproTech), or 5 μ g/ml anti-CD40 [mouse CD40/TNFRSF5 MAb (Clone 1C10), Bio-Techne, USA] + 40 ng/ml IL4. For ASO treatments, *in vivo*-morpholino ASOs (I γ 1 dss ASO: 5’-CCCCTCCCTGGTCACTTACCG-3’; I μ dss ASO: 5’-GGCTGCCTCTGGCTTACCATTTG-3’) and an irrelevant ASO (control: 5’-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3’) were designed and purchased at Gene Tools, LLC (Philomath, USA). Stimulated splenic B cells were cultured in the presence of 2, 3, or 4 μ M ASO, as indicated.

Culture samples were harvested at day 2, 3, or 4 for subsequent flow cytometry analysis, ChIP assays, or RNA/protein extraction, as described below and in the **Supplementary Methods**.

Supernatants of stimulated B cells were collected at day 3 or 4 and stored at -20°C until used for enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs).

Flow Cytometry

Cell suspensions of *in vitro* stimulated splenic B cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS). To reduce Fc receptor-mediated binding by antibodies of interest, B cells were preincubated for 15 min with $0.5\ \mu\text{g/ml}$ anti-mouse CD16/CD32 (Clone 2.4G2, BD Pharmingen, ref 553142) in FACS buffer [PBS supplemented with 2% FCS and $2\ \text{mM}$ (ethylenedinitrilo)tetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich)]. Cells were then labeled with $0.5\ \mu\text{g/ml}$ anti-mouse B220-BV421 (clone RA3-6B2, BioLegend, ref 103240) and $0.5\ \mu\text{g/ml}$ anti-mouse IgG1-FITC (clone A85-1, BD Pharmingen, ref 553443) antibodies or with $0.25\ \mu\text{g/ml}$ anti-mouse B220-APC-Cy7 (clone RA3-6B2, BD Pharmingen, ref 552094) and $0.5\ \mu\text{g/ml}$ anti-mouse IgG1-FITC (clone A85-1, BD Pharmingen, ref 553443) or $0.5\ \mu\text{g/ml}$ anti-mouse IgG3-FITC (clone R40-82, BD Pharmingen, ref 553403) and anti-mouse IgG2a/2b-BV421 (clone R2-40, BD OptiBuild, ref 744292) antibodies.

After 45 min, cells were washed in PBS and suspended in FACS buffer. For nonviable-cell exclusion, 7-AAD (BD Pharmingen, ref 559925) was added on cells 10 min before flow cytometry analysis. Data were acquired on a BD Pharmingen Fortessa LSR2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using FlowlogicTM software (Miltenyi Biotec).

ELISAs

Culture supernatants and sera were analyzed for the presence of IgM, IgG1, or IgG2b by ELISA. Blood samples were collected from 12-week-old *hMT* and *s-hMT* mice. Serum samples were recovered by centrifugation and stored at -20°C until used. ELISAs were performed in polycarbonate 96-multiwell plates, coated overnight at 4°C ($100\ \mu\text{l}$ per well) with $2\ \mu\text{g/ml}$ IgM, IgG1, or IgG2b antibodies (Southern Biotechnologies: goat anti-mouse IgM human ads UNLB, ref 1020-01; goat anti-mouse IgG1 human ads-UNLB, ref 1070-01; and goat anti-mouse IgG2b human ads-UNLB, ref 1090-01) in PBS. After three successive washing steps in PBS with 0.05% Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich), a blocking step with $100\ \mu\text{l}$ of 3% bovine serum albumin (BSA) (Euromedex) in PBS was performed for 30 min at 37°C . After three washing steps, $50\ \mu\text{l}$ of sera/supernatant or standards IgM, IgG1, or IgG2b (Southern Biotechnologies, $400\ \text{ng/ml}$) were diluted into successive wells in 1% BSA/PBS buffer and incubated for 2 h at 37°C . After three washing steps, $100\ \mu\text{l}$ per well of $1\ \mu\text{g/l}$ alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-mouse antibodies (Southern Biotechnologies: goat anti-mouse IgG1 human ads-AP, ref 1070-04 and goat anti-mouse IgM-AP, ref 1021-04; Beckman Coulter: goat anti-mouse IgG2b human ads-AP, ref 1090-04) was incubated in PBS with 0.05% Tween[®] 20 for 2 h at 37°C . After three washing steps, AP activity was assayed: $100\ \mu\text{l}$ of substrate for AP (SIGMAFASTTM *p*-nitrophenyl phosphate tablets, Sigma-Aldrich) was added, and after 15 min, the reaction was blocked with the addition of $50\ \mu\text{l}$ of 3 M NaOH (Sigma-Aldrich). Optic density was then

measured at 405 nm on a Multiskan FC microplate photometer (Thermo Scientific).

RT-PCR and Quantitative RT-PCR

In vitro stimulated splenic B cells were harvested, and RNA was extracted using the TRIzolTM reagent (Invitrogen) procedure. Reverse transcription was carried out on $1\ \mu\text{g}$ of DNase I (Invitrogen)-treated RNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Priming for reverse transcription was done with random hexamers.

To analyze GL transcription, PCRs were performed on cDNA using the Taq Core Kit (MP Biomedicals) and appropriate primer pairs (primer pairs are provided in **Supplementary Table 1**). PCR amplification of the β -actin transcript was used as an internal loading control.

To determine nucleotide sequence of normal and alternative transcripts, PCRs were performed on cDNA using the Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) and appropriate primer pairs. After purification of the RT-PCR products using the NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions, sequencing was performed using the BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on a 3130×1 Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems). Quantification of the purified RT-PCR products was also performed using ImageJ software.

Quantitative PCRs were performed on cDNA using Premix Ex TaqTM (probe qPCR), ROX Plus (Takara), or TB Green Premix Ex TaqTM II (Tli RNase H Plus), ROX Plus (Takara) 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 used for determination of transcripts are listed in **Supplementary Table 1**.

ChIP Assays

ChIP assays were performed using anti-H3ac (Millipore, 06-599), anti-H3K4me3 (Millipore, 07-473), anti-H3K9ac (Millipore, 06-942), anti-RNA pol II (CTD4H8, Santa Cruz Biotechnology, sc-47701), anti-RNA pol II ser2P (Abcam, ab5095), and anti-RNA pol II ser5P (Abcam, ab5131) as previously described (25). In brief, 1×10^7 LPS-stimulated B cells from *hMT* and *s-hMT* mice were harvested at day 2, washed twice in PBS, and cross-linked at 37°C for 15 min in $15\ \text{ml}$ of PBS with 1% formaldehyde (Sigma-Aldrich). The reaction was quenched with $0.125\ \text{M}$ glycine (Sigma-Aldrich). After lysis, chromatin was sonicated to $0.5\text{--}1\ \text{kb}$ using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer [0.01% SDS (Sigma-Aldrich), 1.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), $1.2\ \text{mM}$ EDTA (Eurobio), $16.7\ \text{mM}$ Tris-HCl (Sigma-Aldrich), pH 8.1, and $167\ \text{mM}$ NaCl (Sigma-Aldrich)], chromatin was precleared by rotating for 2 h at 4°C with $100\ \mu\text{l}$ of 50% protein A/G slurry ($0.2\ \text{mg/ml}$ sheared salmon sperm DNA, $0.5\ \text{mg/ml}$ BSA, and 50% protein A/G; Sigma-Aldrich), $0.3\text{--}0.5 \times 10^6$ cell equivalents were saved as input, and $3\text{--}5 \times 10^6$ 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 Tris-EDTA (Sigma-Aldrich)

buffer with 0.02% SDS, and genomic DNA was obtained after phenol/chloroform extraction. Analysis of immunoprecipitated DNA sequences was done by quantitative PCR using the primer pairs described in **Supplementary Table 1**.

Statistical Analysis

Results are expressed as means \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).

RESULTS

RNA pol II Pausing and Histone Modifications Upstream of the Sy1 Region Are Altered in Mice Lacking Iy1 dss

To clarify the role of I exon dss in CSR, we first performed comparative experiments in homozygous *s-hMT* and *hMT* mice (19, 20). In these models, the promoter and Iy1 exon have been replaced by the LPS-inducible *hMT* promoter and an artificial I_{hMT} exon containing (*s-hMT*) or lacking (*hMT*) Iy1 dss (**Figure 1A**). As previously described by Lorenz and collaborators (20), IgG1 class switching was almost abolished in *hMT* mice, whereas CSR to other Ig isotypes remained unaffected (**Supplementary Figures 1A–C**). This was not associated with a difference in AID mRNA expression between splenic B cells isolated from *hMT* and *s-hMT* mice (**Supplementary Figure 1D**). Previous nuclear run-on assays have shown that the transcription rate of the Sy1 region was higher in LPS-stimulated B cells from *s-hMT* mice than that from *hMT* mice (20), suggesting a role for Iy1 exon dss in GL transcription of the Sy1 region. In agreement with these results, we found low levels of unspliced $\gamma 1$ GLTs in LPS-stimulated B cells from *hMT* mice, compared to *s-hMT* (**Figure 1B**).

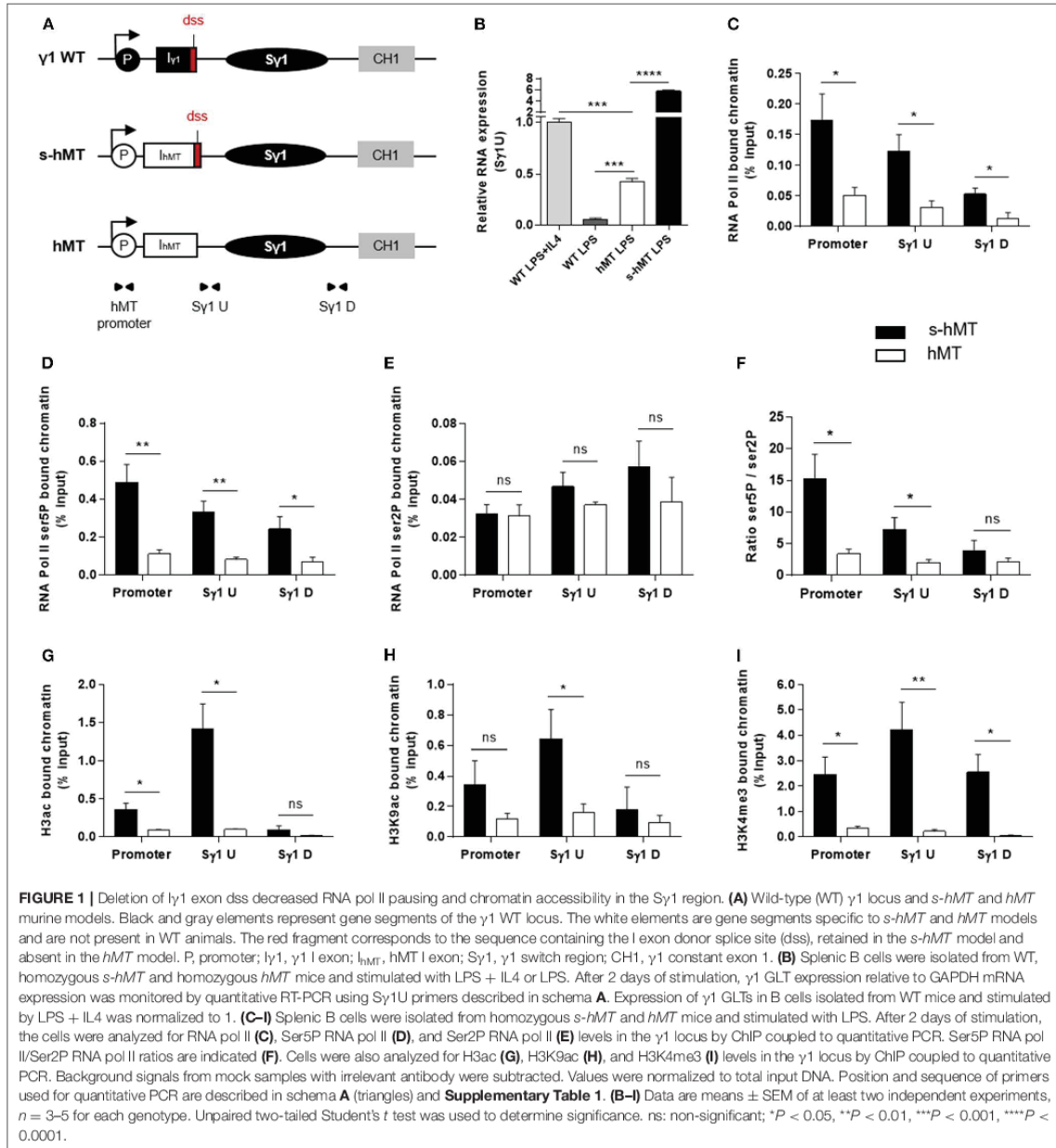
Paused RNA pol II and histone modifications associated with “open” chromatin are involved in AID recruitment to S regions during CSR (10, 12, 13, 15, 16, 18). To study the role of I exon dss in RNA pol II pausing and chromatin remodeling in the Sy1 region, we performed ChIP experiments in splenic B cells isolated from *hMT* and *s-hMT* mice after 2 days of LPS stimulation. First, antibodies directed against total RNA pol II, elongating RNA pol II (Ser2P), or pausing RNA pol II (Ser5P) were used. In agreement with the low level of $\gamma 1$ GLTs described in **Figure 1B**, stimulated B cells from *hMT* mice displayed significantly decreased total RNA pol II loading throughout the Sy1 region, compared to *s-hMT* mice (**Figure 1C**). Interestingly, a significant decrease in Ser5P RNA pol II loading (**Figure 1D**), but not Ser2P RNA pol II loading (**Figure 1E**), was observed in the promoter–Sy1 region in stimulated B cells from *hMT* compared to *s-hMT* mice. Accordingly, stimulated B cells from *s-hMT* mice exhibited significantly higher Ser5P/Ser2P ratios upstream from the Sy1 region than B cells from *hMT* animals (**Figure 1F**), suggesting that the recognition of I exon dss regulated RNA pol II pausing upstream from the Sy1 region. As a control, we found similar Ser5P and Ser2P RNA pol II loading in S μ and S $\gamma 2b$ regions in stimulated B cells from both *hMT* and *s-hMT* mice (**Supplementary Figure 2**).

We next performed similar ChIP experiments using antibodies directed against variants of histone H3. We observed very low levels of acetylated histone H3 (H3ac), a general marker of chromatin accessibility, throughout the whole promoter–Sy1 region in LPS-stimulated B cells from *hMT* compared to *s-hMT* mice (**Figure 1G**). In B cells from *s-hMT* mice, the highest levels of H3ac, H3K9ac, and H3K4me3 histone forms were observed in the region upstream from Sy1 (**Figures 1G–I**). In contrast, this increase was not anymore observed in B cells from *hMT* mice.

Collectively, our data indicate that Iy1 exon dss recognition is of key importance for transcriptional activity of the Sy1 region by supporting RNA pol II pausing and chromatin remodeling, two occurrences required for AID recruitment in S regions and efficient CSR.

ASO Strategy Targeting I Exon dss Allows Uncoupling GL Transcription and Splicing in Wild-Type B Cells

We next wanted to study the function of I exon splicing on CSR. For this purpose, we treated stimulated splenic B cells isolated from wild-type (WT) mice with *vivo*-morpholino ASO targeting the dss sequence of Iy1 exon (Iy1 dss ASO) (**Figure 2A**). Indeed, we previously demonstrated that passive administration of these phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides complexed with an octaguanidine dendrimer could very efficiently modulate the splicing of Ig transcripts (26). First, we wanted to verify that masking the dss sequence of Iy1 exon on GLTs by ASO did not inhibit $\gamma 1$ GL transcription. After 2 days of culture with LPS + IL4 and 2 μ M ASO, expression of unspliced $\gamma 1$ GLTs in activated B cells was significantly increased after treatment with Iy1 dss ASO (**Figure 2B**), compared to cells treated with an irrelevant control ASO. This suggested an accumulation of unspliced $\gamma 1$ GLTs due to Iy1 dss ASO-induced splicing inhibition. In order to study the consequences of Iy1 dss ASO on spliced $\gamma 1$ GLTs, we next performed PCR using the Iy1–C $\gamma 1$ primer pair (Iy1-for and C $\gamma 1$ -rev, described in **Figure 2C** and **Supplementary Table 1**) on cDNA from ASO-treated WT splenic B cells stimulated by LPS + IL4. After 2 days, the $\gamma 1$ GLT profile was strikingly different in control and Iy1 dss ASO conditions (**Figure 2C**, top). A band corresponding to the constitutively spliced $\gamma 1$ GLT (involving the constitutive Iy1 exon dss) was strongly detected in control but slightly detected upon Iy1 dss ASO treatment (**Figure 2C**, top, and **Supplementary Figure 3**). Remarkably, in both control and Iy1 dss ASO conditions, additional bands were also detected that could account for new splicing isoforms. Sanger sequencing indeed revealed alternative transcripts so far not described in the literature (alternative transcripts 1, 2, and 3; **Figure 2C**, middle, and **Supplementary Figure 3**) involving donor and acceptor splice sites internal to the Iy1 exon. The fact that these alternative splice sites were predicted with high consensus value by the HSF 3.1 tool [HSF 3.1, 07/24/2019, <http://www.umd.be/HSF/HSF.shtml>, (27)] (**Figure 2C**, bottom) indicated that the different PCR products were *bona fide* spliced transcripts. As a proof of ASO efficiency, treatment with Iy1 dss ASO almost abolished



the major constitutive GLT and prevented alternative transcript 1 detection (Figure 2C, top). Thus, after treatment with $I\gamma 1$ *dss* ASO, transcript isoforms using the constitutive $I\gamma 1$ *dss* (constitutive transcript and alternative transcript 1) represented only 16% of the detected transcripts (vs. 85% in control). Another consequence of $I\gamma 1$ *dss* ASO treatment is the detection of

alternative transcript 3 and a better detection of alternative transcript 2.

Since our data showed that $I\gamma 1$ *dss* ASO strongly decreased $\gamma 1$ GLT constitutive splicing, the ASO strategy is a good tool to study the function of $I\gamma 1$ exon splicing on CSR.

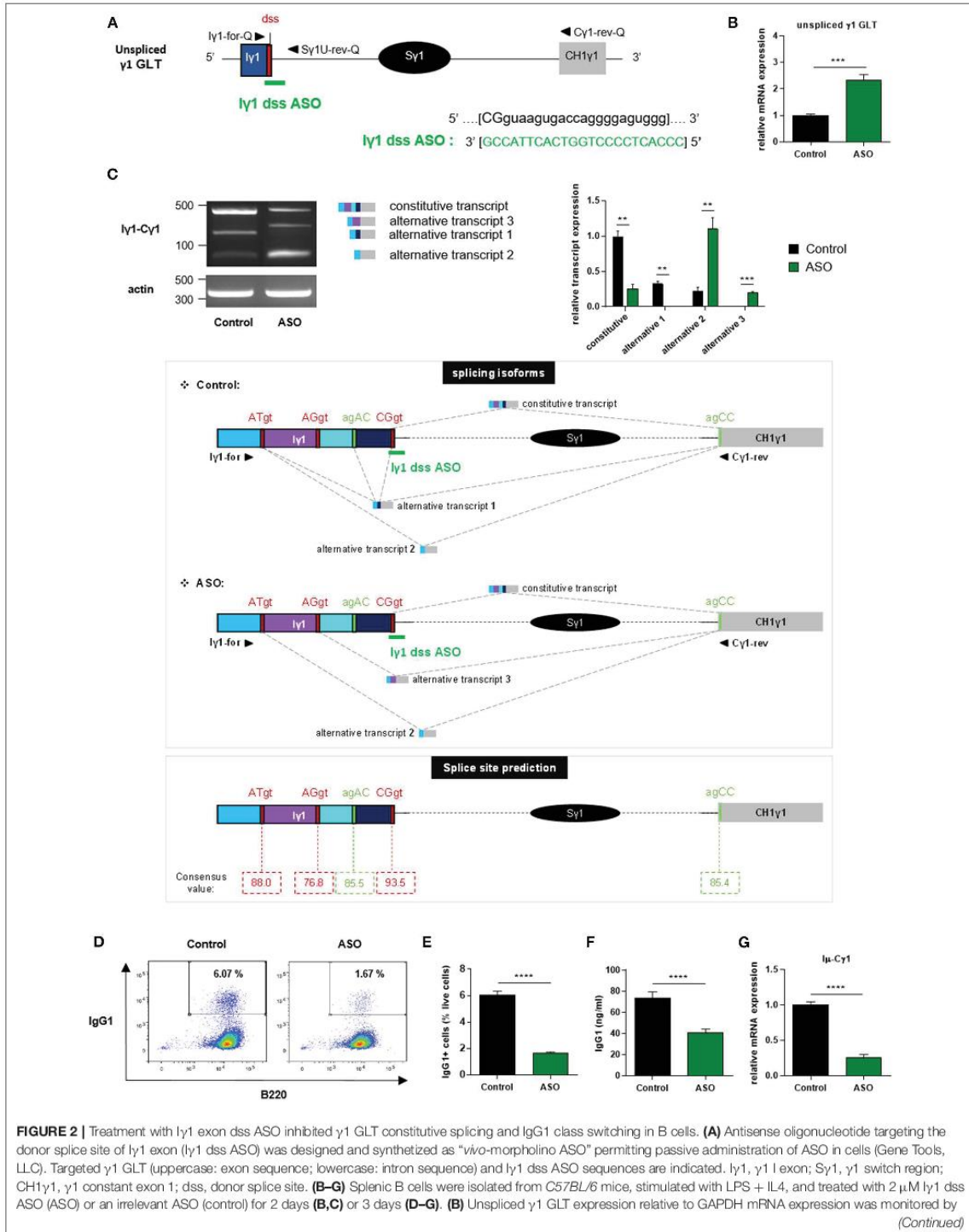


FIGURE 2 | Treatment with Iy1 exon dss ASO inhibited $\gamma 1$ GLT constitutive splicing and IgG1 class switching in B cells. **(A)** Antisense oligonucleotide targeting the donor splice site of Iy1 exon (Iy1 dss ASO) was designed and synthesized as “*vivo*-morpholino ASO” permitting passive administration of ASO in cells (Gene Tools, LLC). Targeted $\gamma 1$ GLT (uppercase: exon sequence; lowercase: intron sequence) and Iy1 dss ASO sequences are indicated. Iy1, $\gamma 1$ I exon; Sy1, $\gamma 1$ switch region; CH1 $\gamma 1$, $\gamma 1$ constant exon 1; dss, donor splice site. **(B–G)** Splenic B cells were isolated from C57BL/6 mice, stimulated with LPS + IL4, and treated with 2 μ M Iy1 dss ASO (ASO) or an irrelevant ASO (control) for 2 days **(B,C)** or 3 days **(D–G)**. **(B)** Unspliced $\gamma 1$ GLT expression relative to GAPDH mRNA expression was monitored by (Continued)

FIGURE 2 | quantitative RT-PCR using I γ 1-for-Q and S γ 1U-rev-Q primers described in schema **A**. Expression of γ 1 GLTs in control B cells was normalized to 1. **(C, top)** RT-PCR was performed using I γ 1-for and C γ 1-rev primers (position described in schema **C**, middle) to identify constitutively and alternatively spliced transcripts. PCR products were analyzed on agarose gels. Expression of actin mRNA is also shown. Molecular markers in base pairs are indicated. Schematic representation of the different γ 1 spliced transcripts is indicated on the right, and transcript sequences are given in **Supplementary Figure 3**. One experiment out of three is shown. Relative quantification of amplification products was done using ImageJ software and expressed after normalization to actin band intensity. **(C, middle)** Schematic representation of γ 1 spliced transcripts detected in B cells from C57BL/6 mice after treatment with an irrelevant ASO (control) or I γ 1 dss ASO (ASO). Gray hatched lines represent splicing events involving constitutive and alternative splice sites. Donor and acceptor splice sites are indicated in red and green, respectively. **(C, bottom)** Consensus value (ranging from 0 to 100) of each predicted splice site determined using the HSF 3.1 tool. **(D)** Flow cytometry analysis of purified B-cell populations using the indicated cell surface markers. Plots are gated on live cells. The percentage of B220⁺IgG1⁺ cells is indicated. One experiment out of five is shown. **(E)** Percentage of IgG1-positive cells determined by flow cytometry. **(F)** Quantification of IgG1 in culture supernatants by ELISA. **(G)** Post-switch I μ -C γ 1 mRNA expression relative to GAPDH expression was monitored by quantitative RT-PCR. Expression of post-switch mRNAs in control B cells was normalized to 1. Sequences of primers used for RT-PCR and quantitative RT-PCR are indicated in **Supplementary Table 1**. **(B, C, E–G)** Data are means \pm SEM of two independent experiments, $n = 3–8$ for each group. Unpaired two-tailed Student's t test was used to determine significance. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Treatment With I γ 1 Exon dss ASO Specifically Inhibits IgG1 Class Switching

We next investigated the effect of ASO-mediated γ 1 GLT splicing inhibition on CSR to IgG1. After 3 days of culture with LPS + IL4 and 2 μ M ASO, CSR to IgG1 was greatly diminished in B cells treated with I γ 1 dss ASO compared to B cells treated with an irrelevant control ASO. The percentage of IgG1-positive B cells determined by flow cytometry was decreased 4-fold in I γ 1 dss ASO-treated B cells (**Figures 2D,E**), and IgG1 levels determined in culture supernatants by ELISA were almost 2-fold lower in I γ 1 dss ASO-treated cells (**Figure 2F**) than in control B cells. In agreement with the CSR defect, I μ -C γ 1 switched transcripts were decreased by 4-fold in I γ 1 dss ASO-treated B cells (**Figure 2G**).

In order to control I γ 1 dss ASO specificity, we realized similar experiments in B cells stimulated by anti-CD40 + IL4. Similar to what was observed in LPS + IL4-stimulated B cells, after 2 days of culture with anti-CD40 + IL4 and 2 μ M ASO, expression of unspliced γ 1 GLTs was significantly increased (**Figure 3B**), and CSR to IgG1 was significantly diminished (**Figures 3C,D**) in B cells treated with I γ 1 dss ASO compared to B cells treated with an irrelevant control ASO. However, expression of unspliced I ϵ GLTs (**Figures 3A,E**) and CSR to IgE (**Figures 3F,G**) were similar in B cells treated with the irrelevant control ASO or I γ 1 dss ASO. This showed that I γ 1 dss ASO specifically decreased CSR to IgG1 by inhibiting splicing precisely on γ 1 GLTs.

Collectively, these data indicate that splicing of γ 1 GLTs is necessary for CSR to IgG1 and strongly suggest that the use of the constitutive I γ 1 exon dss during splicing is required for efficient CSR.

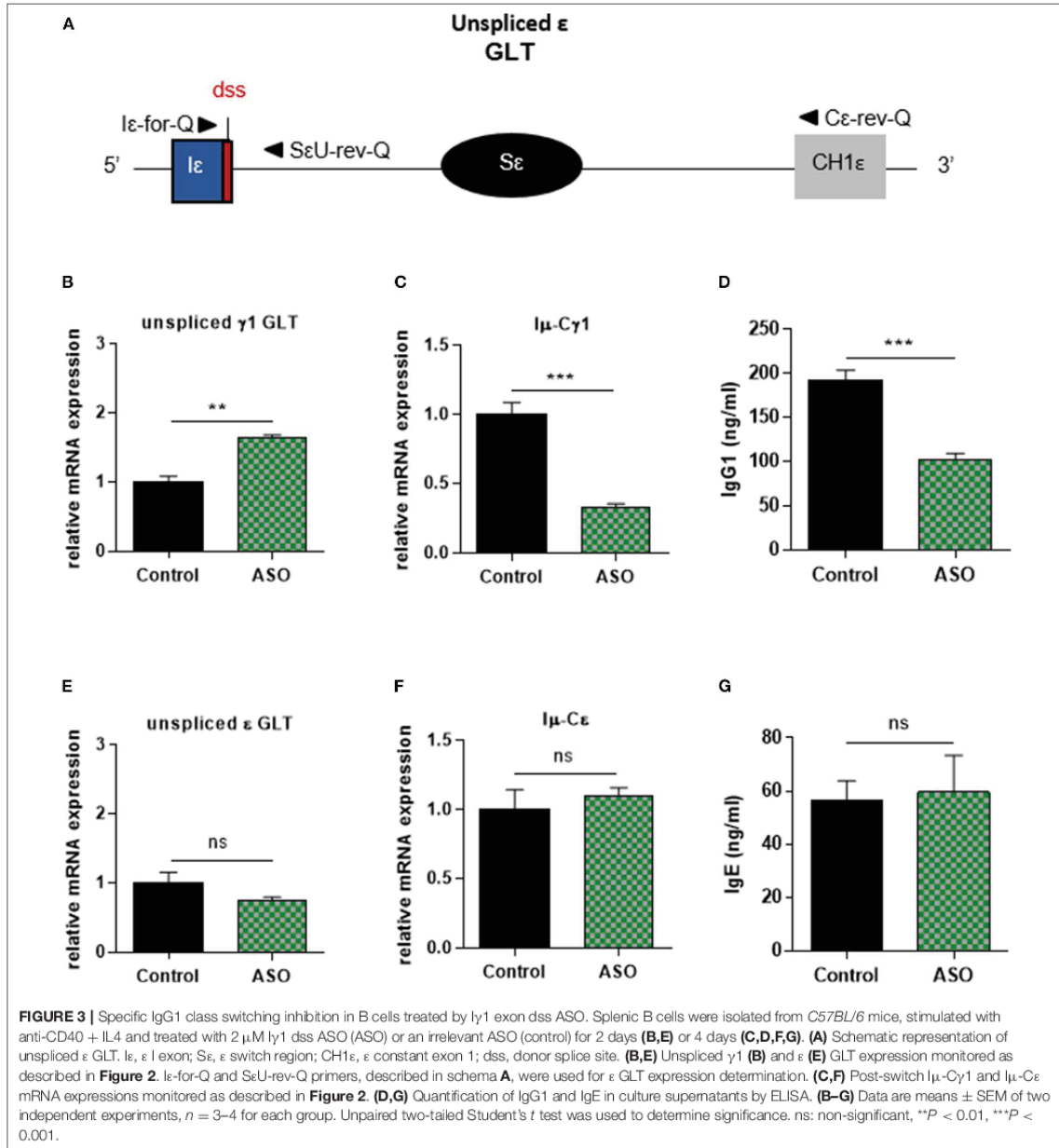
Treatment With an ASO Targeting the Constitutive I exon dss in the Donor S μ Region Inhibits IgG Class Switching

Our results showed that the ASO strategy targeting the constitutive I exon dss from the S γ 1 acceptor region inhibited CSR to IgG1. We next developed a similar approach to determine whether specifically masking the constitutive I exon dss from the donor S μ region could also inhibit CSR to IgG1. Splenic B cells isolated from WT mice were stimulated by LPS + IL4 and

treated with an ASO targeting the constitutive I μ exon dss (I μ dss ASO) (**Figure 4A**). In order to study the consequences of I μ dss ASO on spliced I μ GLTs, we performed PCR using the I μ -C μ primer pair (I μ -for and C μ -rev, described in **Figure 4A** and **Supplementary Table 1**) on cDNA from stimulated splenic B cells treated with 2 μ M ASO for 2 days. A band corresponding to the constitutively spliced I μ transcript (involving the constitutive I μ exon dss) was detected in control but slightly detected after I μ dss ASO treatment (**Figure 4B**). Similar to what was observed in stimulated splenic B cells treated with I γ 1 dss ASO, we detected the presence of alternatively spliced I μ transcripts in cells treated with I μ dss ASO. These alternative transcripts were indicative of the use of alternative I μ dss present in the intronic S region previously described by Kuzin and collaborators (28). In addition, after 3 days of culture with LPS + IL4 and 2 μ M ASO, CSR to IgG1 was significantly diminished in B cells treated with I μ dss ASO compared to B cells treated with an irrelevant control ASO (**Figures 4C,D**). After 2 days of 2 μ M ASO treatment, expression of unspliced γ 1 GLTs was similar in B cells treated with an irrelevant control or I μ dss ASO (**Figure 4E**). This showed that the defect in IgG1 class switching observed after treatment by I μ dss ASO was not due to an inhibition of γ 1 GLT splicing but to the splicing decrease of I μ GLTs. Therefore, correct splicing of GLTs produced in both the donor S μ and the acceptor S γ 1 regions is required for efficient IgG1 class switching.

We next investigated whether masking the constitutive I μ dss could also inhibit class switching to other isotypes than IgG1. Splenic B cells isolated from WT mice were stimulated by LPS and treated with I μ dss ASO. After 3 days of culture with LPS and 3 or 4 μ M ASO, the percentage of IgG3-positive B cells was significantly diminished in B cells treated with I μ dss ASO compared to B cells treated with an irrelevant control ASO (**Figures 4F–H**). Moreover, treatment of B cells with I μ dss ASO strongly decreased the level of γ 3 heavy-chain protein (**Supplementary Figure 4**). After 3 days of culture with LPS, the percentage of IgG2b-positive B cells was significantly diminished only in B cells treated with 4 μ M I μ dss ASO compared to B cells treated with an irrelevant control ASO (**Figures 4I–K**).

These results indicated that treatment with ASO masking the constitutive I μ dss on the donor S μ region globally



reduced CSR, albeit with variable efficiency depending on the switched isotypes.

DISCUSSION

S region transcription *per se* promotes basal CSR, but for optimal efficiency, the process requires the presence of the intact I

region, implicating factors beyond transcription through the S region in the regulation of class switching (29). Transcription and pre-mRNA processing are functionally coupled. In our study, through the experimental uncoupling of splicing from transcription, we identified distinct functions of I exon dss that control antibody class switching at transcriptional and post-transcriptional levels. During transcription, we provide evidence that deletion of the Iy1 exon dss decreased accumulation of

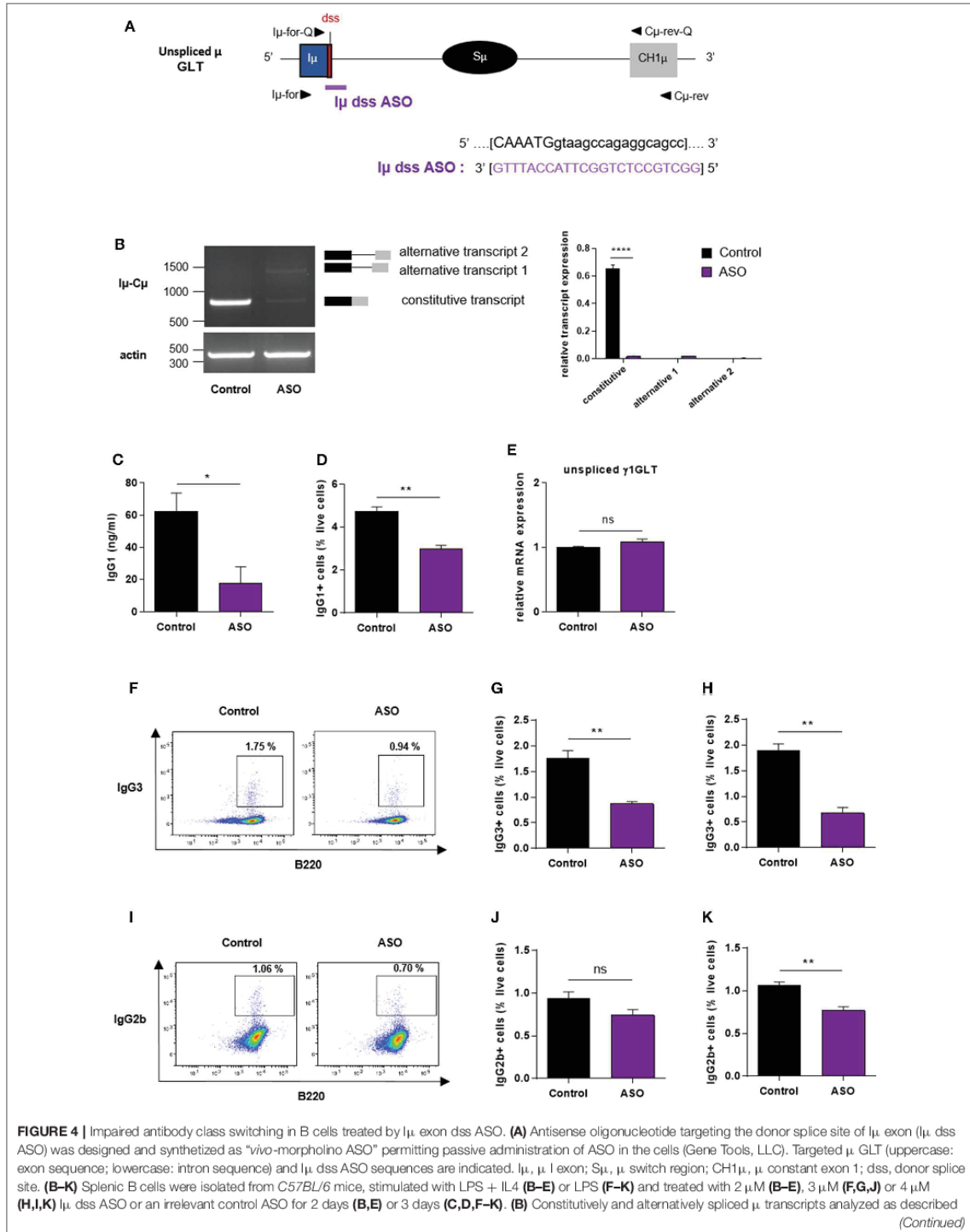


FIGURE 4 | in **Figure 2** using I μ -for and C μ -rev primers, described in schema **A**. One experiment out of three is shown. Relative quantification of amplification products was done using ImageJ software and expressed after normalization to actin band intensity. **(C)** Quantification of IgG1 in culture supernatants by ELISA. **(D)** Percentage of IgG1-positive cells determined by flow cytometry as described in **Figure 2**. **(E)** Unspliced γ 1 GLT expression monitored as described in **Figure 2**. **(F,I)** Flow cytometry analysis of purified B-cell populations using the indicated cell surface markers. Plots are gated on live cells. The percentage of B220⁺IgG3⁺ **(F)** or B220⁺IgG2b⁺ **(I)** cells is indicated. One experiment out of three is shown. **(G,H,J,K)** Percentage of IgG3-positive **(G,H)** or IgG2b-positive **(J,K)** cells determined by flow cytometry. **(B–K)** Data are means \pm SEM, $n = 3$ for each group. Unpaired two-tailed Student's t test was used to determine significance. ns: non-significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

Ser5P RNA pol II and chromatin accessibility in the promoter-Sy1 region. Moreover, our data demonstrated that, in S regions primed for CSR, GLT splicing involving the constitutive I exon dss is an essential step for efficient CSR.

Regarding the impact of I exon dss on transcription, our comparative analysis of *s-hMT* and *hMT* B cells indicated that, in the absence of I γ 1 dss, GL transcription and RNA pol II loading were very weak at the γ 1 locus. Interestingly, RNA pol II binding was strongly diminished at the *hMT* promoter, suggesting that the presence of I γ 1 exon dss enhanced the initiation of GL transcription. These data are consistent with the poor transcription observed upon deletion of a large portion of I γ 2b exon including dss (30). Although the function of I exon dss in transcription regulation has been overlooked, such intron-mediated enhancement of gene expression has long been described in a wide range of organisms, including mammals (31). Indeed, it has been demonstrated that the presence of a dss facilitates the transcription preinitiation complex assembly and stimulates transcription even in the absence of splicing (32, 33). Whether the recognition of I exon dss promotes the formation of pre-initiation complex (32) and involves a gene looping interaction between promoter and dss, as described in yeast cells (34), remains to be investigated. Our ChIP analysis further indicated that, in the absence of I γ 1 exon dss, RNA pol II pausing is markedly decreased in the promoter-Sy1 region, whereas the rate of RNA pol II elongation remains mostly unchanged. It is tempting to speculate that the I exon dss acts as an anchor for the co-transcriptional machinery and is required for appropriate associations of critical factors, like Spt5, with RNA pol II to enable recruitment of AID to S regions. After B cell stimulation, transcribed I-S regions are a focus for increased modified histones, such as H3ac, H3K9ac, or H3K4me3, and chromatin accessibility (13, 16). Reinforcing the idea that GL transcription, RNA pol II pausing, and the establishment of active chromatin marks in S regions are interconnected (10), we found a global reduction of active H3ac marks in the promoter-Sy1 region of stimulated B cells from *hMT* mice, compared to *s-hMT*. The H3K9ac and H3K4me3 enrichment specifically detected upstream the Sy1 region was also lost in *hMT* mice. Interestingly, it has been proposed that H3K4me3 serves as a mark for recruiting the recombinase machinery for CSR independently of its function in transcription (15, 35). These studies have shown that Spt5 and the histone chaperone FACilitates Chromatin Transcription (FACT) are not required for transcription of S regions but regulate H3K4me3 modification and DNA cleavage in CSR (15, 35).

I γ 1 exon dss recognition is necessary for the regulation of GL transcription. Consequently, using classical I exon deletion and/or replacement mouse models neither allow distinguishing the roles of I exon dss in the interconnected processes of transcription and splicing nor permit distinguishing requirements of splicing *per se* from that of stable S GLTs (36). Several studies including ours have shown the efficacy of ASO-mediated approaches to modify RNA splicing in B-lineage cells (26, 37, 38). Here, we used ASOs targeting a short sequence (23–25 nucleotides) spanning the I γ 1 or I μ exon dss on pre-mRNA to analyze the consequences of GLT splicing defect on CSR in splenic B cells from WT mice. We showed that, in addition to its positive effect on transcription, I exon dss recognition is required at the post-transcriptional level for efficient CSR. Indeed, we demonstrated that masking I γ 1 exon dss inhibited CSR to IgG1 and masking I μ exon dss decreased CSR to IgG1, IgG3, and, to a lesser extent, IgG2b isotypes. Further investigations in both mouse and human B cells will be necessary to check whether masking I μ exon dss could decrease CSR to all isotypes. ASOs masking I exon dss in other acceptor S regions than Sy1 could also be used to verify whether the recognition of I exon dss is required for efficient CSR toward each switched Ig isotype.

Our results strongly suggest that splicing of GLTs *per se* is not sufficient to induce CSR. Indeed, we found a marked reduction of CSR to IgG1 upon treatment with ASOs masking constitutive I exon dss on GLTs produced in the donor S μ or the acceptor Sy1 regions, even though alternative splicing events could be readily detected. By contrast, Kuzin and collaborators showed normal surface Ig expression and serum Ig levels in Δ I μ -s^{-/-} mice harboring a deletion of 236 bp spanning the constitutive I μ dss (28). As expected, there were no detectable spliced I μ transcripts in these mice. Nevertheless, alternative “I μ -like” GLTs driven by regulatory elements other than E μ were detected at low levels in B cells from Δ I μ -s^{-/-} mice. The authors suggested that such alternative “I μ -like” GLTs directly contribute to CSR activity (28). However, our results showed that these alternative “I μ -like” GLTs might not be sufficient for efficient CSR activity *in vitro*. Indeed, after treatment of B cells with I μ dss ASO, we detected I μ -C μ alternative transcripts indicative of the use of the same cryptic S μ dss than described by Kuzin and collaborators whereas a drastic inhibition of CSR was observed. The regulation of μ locus is complex, and further investigations are needed to understand the discrepancies concerning the impact of I μ dss absence at the DNA level, in genetically modified mouse model, and at the RNA level, with our ASO strategy, on CSR. Nonetheless, our data are in agreement with a

study of Ruminy and collaborators (39). They detected recurrent acquired mutations at the I μ dss on the functional *IgH* allele of *t*_(14;18) positive lymphomas cases presenting restricted IgM expression and proposed that disruption of I μ constitutive dss, inducing the expression of abnormal GLTs, may be involved in the perturbation of CSR observed in these lymphomas. Moreover, Spt4 depletion by siRNA in the CH12F3-2A B cell line severely impaired CSR to IgA despite a dramatically increased expression of cryptic transcripts initiating from the S μ intronic region (35). As observed in the donor S μ region, masking the constitutive I exon dss on GLTs produced in the acceptor Sy1 region with Iy1 dss ASO strongly inhibited CSR to IgG1 despite Iy1-Cy1 alternative transcripts being detectable. Additional molecular studies will be required to delineate the mechanism involved in the ASO-mediated inhibition of CSR. Several scenarios could explain the inhibition of CSR by I exon dss ASOs. First, RNA-binding proteins have been shown to interact with AID (22, 40–42), and the ASO, attached to the GLTs, could avoid fixation of such proteins necessary for CSR. Second, it has been described that, when the accumulation of intronic switch RNAs was prevented from the onset of CH12F3-2A B cell stimulation, R-loop levels were decreased by half in S regions (24). In our study, after I exon dss ASO treatment, the accumulation of unspliced GLTs indicated a strong splicing inhibition. Thus, even though low levels of constitutive and alternative spliced GLTs are detected after ASO treatment, the lariat abundance may be too weak to induce R-loop formation at S regions and efficient CSR. Third, even if alternatively spliced GLTs were detected after ASO treatments, the sequence of intronic lariat generated after alternative splicing could prevent efficient CSR. For example, alternative lariat sequence could impede the lariat debranching by DBR1 and the subsequent generation of G-quadruplex RNA structures that participate in guiding AID to specific S regions through RNA:DNA base pairing (23). Alternative lariat sequences could also avoid the fixation of DDX1 to G-quadruplex switch RNAs and consequently impair AID binding to S region DNA (24). These explanations are consistent with a model whereby processed S region transcripts serve as a guide for RNAs to target AID, in a sequence-dependent manner, to the S region DNA from which they were transcribed (36).

In summary, our study highlighted a dual role for I exon dss during CSR, at the DNA and RNA levels, and further paves the way for antisense strategies in the modulation of antibody class switching and immune response efficiency.

REFERENCES

1. Arakawa H. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science*. (2002) 295:1301–6. doi: 10.1126/science.1067308
2. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the 'Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'. APAFIS#15279-2018052915087229 v3.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM, MA, and J-ML performed experiments and analyzed data. CC, SL, and NS performed experiments. LD conceived the project, designed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. SL conceived the project, designed experiments, performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from Fondation ARC (PJA 20161204724), INCa (PLBIO15-256), ANR (2017-CE15-0024-01), Ligue Contre le Cancer (CD87, CD19, and CD23) and Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales (FFRMG).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of our animal facility. We also thank J. Cook-Moreau and E. Pinaud (UMR CNRS 7276, INSERM 1262, Limoges, France) for critical reading of the manuscript and A. Radbruch (Leibniz Institute, Berlin, Germany) for providing *hMT* and *s-hMT* mice. This manuscript has been released as a preprint at bioRxiv (43).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00780/full#supplementary-material>

cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. (2000) 102:553–63. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00078-7

3. Matthews AJ, Zheng S, DiMenna LJ, Chaudhuri J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination. In: Alt F, editor. *Advances in Immunology*. (2014) 122:1–57. doi: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00001-8
4. Lennon GG, Perry RP. C mu-containing transcripts initiate heterogeneously within the IgH enhancer region and contain a novel

- 5'-nontranslatable exon. *Nature*. (1985) 318:475–8. doi: 10.1038/318475a0
5. Lutzker S, Alt FW. Structure and expression of germ line immunoglobulin gamma 2b transcripts. *Mol Cell Biol*. (1988) 8:1849–52. doi: 10.1128/MCB.8.4.1849
 6. Tian M, Alt FW. Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases *in vitro*. *J Biol Chem*. (2000) 275:24163–72. doi: 10.1074/jbc.M003343200
 7. Yu K, Chedin F, Hsieh CL, Wilson TE, Lieber MR. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol*. (2003) 4:442–51. doi: 10.1038/ni919
 8. Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, Alt FW. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature*. (2003) 422:726–30. doi: 10.1038/nature01574
 9. Huertas P, Aguilera A. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*. (2003) 12:711–21. doi: 10.1016/j.molcel.2003.08.010
 10. Kenter AL. AID targeting is dependent on RNA polymerase II pausing. *Semin Immunol*. (2012) 24:281–6. doi: 10.1016/j.smim.2012.06.001
 11. Pavri R, Nussenzweig MC. AID targeting in antibody diversity. *Adv Immunol*. (2011) 110:1–26. doi: 10.1016/B978-0-12-387663-8.00005-3
 12. Daniel JA, Nussenzweig A. The AID-induced DNA damage response in chromatin. *Mol Cell*. (2013) 50:309–21. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.017
 13. Jeevan-Raj BP, Robert I, Heyer V, Page A, Wang JH, Cammas F, et al. Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med*. (2011) 208:1649–60. doi: 10.1084/jem.20110118
 14. Kuang FL, Luo Z, Scharff MD. H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2009) 106:5288–93. doi: 10.1073/pnas.0901368106
 15. Stanlie A, Aida M, Muramatsu M, Honjo T, Begum NA. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:22190–5. doi: 10.1073/pnas.1016923108
 16. Wang L, Wuerffel R, Feldman S, Khamlichi AA, Kenter AL. S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J Exp Med*. (2009) 206:1817–30. doi: 10.1084/jem.20081678
 17. Basu U, Meng FL, Keim C, Grinstein V, Pefanis E, Eccleston J, et al. The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. *Cell*. (2011) 144:353–63. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.001
 18. Pavri R, Gazumyan A, Jankovic M, Di Virgilio M, Klein I, Ansarah-Sobrinho C, et al. Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell*. (2010) 143:122–33. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.017
 19. Hein K, Lorenz MGO, Siebenkotten G, Petry K, Christine R, Radbruch A. Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J Exp Med*. (1998) 188:2369–74. doi: 10.1084/jem.188.12.2369
 20. Lorenz M, Jung S, Radbruch A. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science*. (1995) 267:1825–8. doi: 10.1126/science.7892607
 21. Conticello SG, Ganesh K, Xue K, Lu M, Rada C, Neuberger MS. Interaction between antibody-diversification enzyme AID and spliceosome-associated factor CTNNB1. *Mol Cell*. (2008) 31:474–84. doi: 10.1016/j.molcel.2008.07.009
 22. Nowak U, Matthews AJ, Zheng S, Chaudhuri J. The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat Immunol*. (2011) 12:160–6. doi: 10.1038/ni.1977
 23. Zheng S, Vuong BQ, Vaidyanathan B, Lin JY, Huang FT, Chaudhuri J. Non-coding RNA generated following lariat debranching mediates targeting of AID to DNA. *Cell*. (2015) 161:762–73. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.020
 24. Ribeiro de Almeida C, Dhir S, Dhir A, Moghaddam AE, Sattentau Q, Meinhardt A, et al. RNA Helicase DDX1 converts RNA G-Quadruplex structures into R-Loops to promote IgH class switch recombination. *Mol Cell*. (2018) 70:650–62.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.001
 25. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, et al. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med*. (2013) 210:1501–7. doi: 10.1084/jem.20130072
 26. Ashi MO, Srour N, Lambert JM, Marchalot A, Martin O, Le Noir S, et al. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell Mol Immunol*. (2019) 16:810–9. doi: 10.1038/s41423-018-0160-6
 27. Desmet FO, Hamroun D, Lalonde M, Colod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human splicing finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. (2009) 37:e67. doi: 10.1093/nar/gkp215
 28. Kuzin II, Ugine GD, Wu D, Young F, Chen J, Bottaro A. Normal isotype switching in B cells lacking the I μ exon splice donor site: evidence for multiple I μ -like germline transcripts. *J Immunol*. (2000) 164:1451–7. doi: 10.4049/jimmunol.164.3.1451
 29. Bottaro A, Lansford R, Xu L, Zhang J, Rothman P, Alt FW. S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J*. (1994) 13:665–74. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06305.x
 30. Seidl KJ, Bottaro A, Vo A, Zhang J, Davidson L, Alt FW. An expressed neo(r) cassette provides required functions of the Igamma2b exon for class switching. *Int Immunol*. (1998) 10:1683–92. doi: 10.1093/intimm/10.11.1683
 31. Shaul O. How introns enhance gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*. (2017) 91:145–55. doi: 10.1016/j.biocel.2017.06.016
 32. Damgaard CK, Kahns S, Lykke-Andersen S, Nielsen AL, Jensen TH, Kjems J. A 5' splice site enhances the recruitment of basal transcription initiation factors *in vivo*. *Mol Cell*. (2008) 29:271–8. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.035
 33. Furger A. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev*. (2002) 16:2792–9. doi: 10.1101/gad.983602
 34. Moabbi AM, Agarwal N, El Kaderi B, Ansari A. Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:8505–10. doi: 10.1073/pnas.1112400109
 35. Stanlie A, Begum NA, Akiyama H, Honjo T. The DSIF Subunits Spt4 and Spt5 have distinct roles at various phases of immunoglobulin class switch recombination. *PLoS Genet*. (2012) 8:e1002675. doi: 10.1371/journal.pgen.1002675
 36. Yewdell WT, Chaudhuri J. A transcriptional serenAID: the role of noncoding RNAs in class switch recombination. *Int Immunol*. (2017) 29:183–96. doi: 10.1093/intimm/dxx027
 37. Bestas B, Moreno PMD, Blomberg KEM, Mohammad DK, Saleh AF, Sutlu T, et al. Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J Clin Invest*. (2014) 124:4067–81. doi: 10.1172/JCI76175
 38. Dewaele M, Tabaglio T, Willekens K, Bezzi M, Teo SX, Low DHP, et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J Clin Invest*. (2015) 126:68–84. doi: 10.1172/JCI82534
 39. Ruminy P, Jardin F, Penther D, Picquenot JM, Parmentier F, Buchonnet G, et al. Recurrent disruption of the I μ splice donor site in t(14;18) positive lymphomas: a potential molecular basis for aberrant downstream class switch recombination. *Genes Chromosomes Cancer*. (2007) 46:735–44. doi: 10.1002/gcc.20453
 40. Chen J, Cai Z, Bai M, Yu X, Zhang C, Cao C, et al. The RNA-binding protein ROD1/PTBP3 cotranscriptionally defines AID-loading sites to mediate antibody class switch in mammalian genomes. *Cell Res*. (2018) 28:981–95. doi: 10.1038/s41422-018-0076-9

41. Hu W, Begum NA, Mondal S, Stanlie A, Honjo T. Identification of DNA cleavage- and recombination-specific hnRNP cofactors for activation-induced cytidine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2015) 112:5791–6. doi: 10.1073/pnas.1506167112
42. Mondal S, Begum NA, Hu W, Honjo T. Functional requirements of AID's higher order structures and their interaction with RNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2016) 113:E1545–54. doi: 10.1073/pnas.1601678113
43. Marchalot A, Ashi MO, Lambert JM, Srour N, Delpy L, Le Pennec S. Uncoupling splicing from transcription using antisense oligonucleotides reveals a dual role for I exon donor splice sites in antibody class switching. *bioRxiv [Preprint]*. (2019) 850867. doi: 10.1101/850867

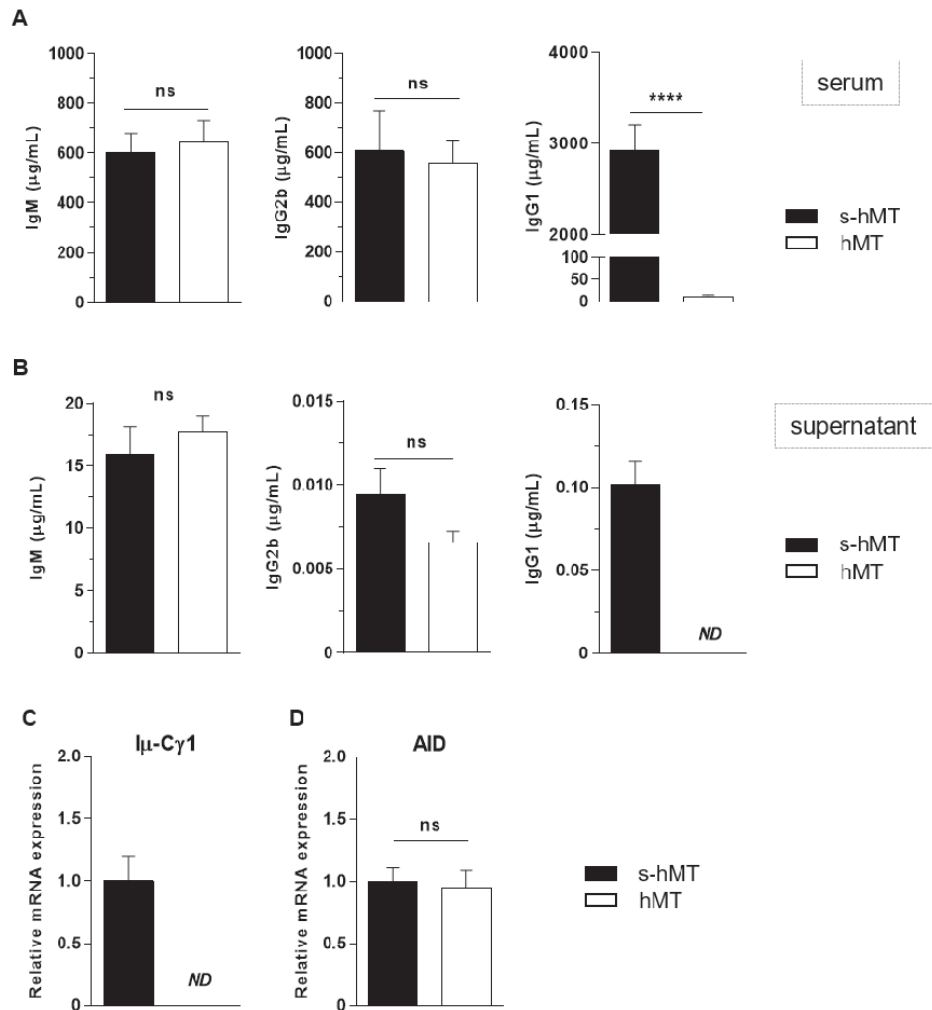
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Marchalot, Ashi, Lambert, Carrion, Lecardeur, Srour, Delpy and Le Pennec. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

SUPPLEMENTARY METHODS

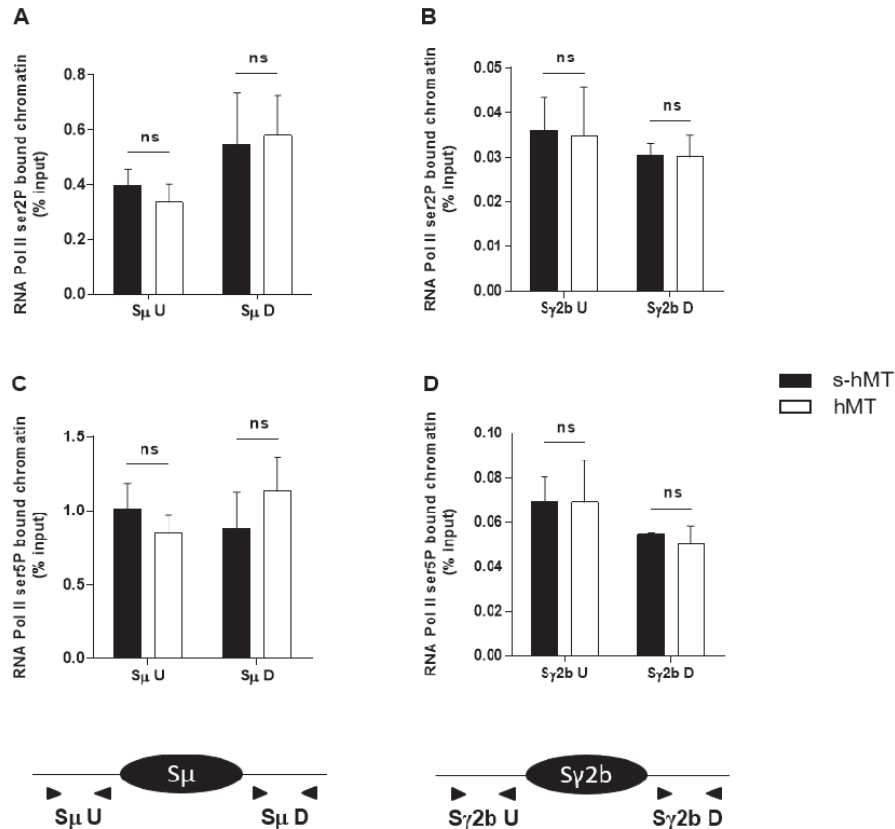
Western blot

Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Lysis and Extraction Buffer (Thermo Scientific) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail. Lysates were sonicated and protein levels were quantified by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Proteins were denatured at 94°C for 5 min before separation on SDS-PAGE (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels were used (Bio-Rad Laboratories)). Proteins were then electro-transferred onto Trans Blot Turbo polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad Laboratories). Western blots were probed with goat anti-mouse IgM Human ads-UNLB (SouthernBiotech, ref 1020-01) or goat anti-mouse IgG3 Human ads-BIOT (SouthernBiotech, ref 1100-08) antibodies. Detection was performed using an HRP-linked rabbit anti-goat secondary antibody or Extravidin-AP (Sigma-Aldrich) and chemiluminescence detection kit (ECL Plus™, GE Healthcare) using ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories). Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories) was used for relative quantification of the bands.



Supplementary figure 1. Defect of IgG1 class switching in mice lacking *Iγ1 dss*

(A) Quantification of Ig isotypes (IgM, IgG2b, and IgG1) in sera of homozygous *s-hMT* and *hMT* mice by ELISA. (B-D) Splenic B cells were isolated from homozygous *s-hMT* and *hMT* mice and stimulated with LPS. After 4 days stimulation, amounts of Ig isotypes (IgM, IgG2b, and IgG1) were determined in culture supernatants by ELISA (B). After 3 days stimulation, post-switch $I\mu$ -C γ 1 (C) and AID (D) mRNA expression relative to GAPDH mRNA expression was monitored by quantitative RT-PCR. Expression of $I\mu$ -C γ 1 or AID in B cells from *s-hMT* mice was normalized to 1. Data are means \pm SEM, $n=3$ to 4 for each genotype. Unpaired two-tailed Student's *t* test was used to determine significance. ND: not detected, ns: non significant, **** $P < 0.0001$.



Supplementary figure 2. Similar RNA pol II binding in S μ and S γ 2b regions of *s-hMT* and *hMT* mice

Splenic B cells were isolated from homozygous *s-hMT* and *hMT* mice and stimulated with LPS. After 2 days, the cells were analyzed for Ser2P RNA pol II (A, B) and Ser5P RNA pol II (C, D) levels in S μ (A, C) and S γ 2b (B, D) regions by ChIP coupled to quantitative PCR. Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to total input DNA. Primers (triangles) used for quantitative PCR are described on the illustrative schema (bottom). Data are means \pm SEM of at least two independent experiments, n=4 for each genotype. Unpaired two tailed Student's t test was used to determine significance. ns: non significant.

Supplementary figure 3: Sequences of $\gamma 1$ constitutive and alternative spliced transcripts

The sequences of I γ 1 exon (bold) and CH1 γ 1 exon are indicated. Donor (red) and acceptor (green) splice sites are also represented.

Constitutive $\gamma 1$ transcript:

**GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATGTTGAGTGGGGTCAGCAGGGAAAGGAGCT
GCAAGAAGAGGCCATACAAACAGCACGCATCTGTGGCCCTTCCAGATCTTTG
AGTCATCCTATCACGGGAGATTGGGAAGGAGTTGACAGACCAGCCCAGGCA
GAGGAAGCCTCTGTGTTAAAGAGTAAAGGTGCTTGCCTACAGCCTGGTGTCA
ACTAGGCAGGCCCTGGGGGGCCGGGAAGGGGCCTCCTAGACAAGCACAGGC
ATGTAGAGCTGCACACCCACAGCAAACCTGAGCCCCGAGGATATCATGG
AATATATCGAGAAGCCTGAGGAATGTGTTTGGCATGGACTACAGGTTGAGAG
AACCAAGGAAGCTGAGCCCTGCGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCAC
TGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGT
CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCC
AGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCA
GCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGT
TGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG**

Alternative $\gamma 1$ transcript 1:

**GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATACAAAACCTGAGCCCCGAGGATATCATGGA
ATATATCGAGAAGCCTGAGGAATGTGTTTGGCATGGACTACAGGTTGAGAGA
ACCAAGGAAGCTGAGCCCTGCGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACT
GGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC
AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCA
GCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG
CTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGTT
GCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG**

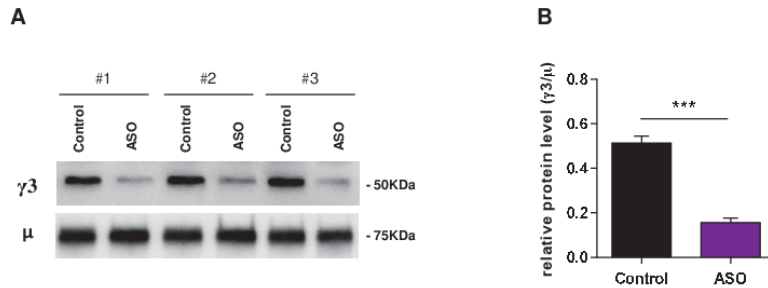
Alternative $\gamma 1$ transcript 2:

**GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACT
GGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC
AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCA
GCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG**

CTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGTT
GCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG

Alternative γ 1 transcript 3:

GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATGTGAGTGGGGTCAGCAGGGAAAGGAGCT
GCAAGAAGAGGCCATACAAACAGCACGCATCTGTGGCCCTTCCAGATCTTTG
AGTCATCCTATCACGGGAGATTGGGAAGGAGTTGACAGACCAGCCCAGGCA
GAGGAAGCCTCTGTGTTAAAGAGTAAAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTA
TCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGC
CTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCC
TGTCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTG
AGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCA
ACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG



Supplementary figure 4. Decreased $\gamma 3$ heavy chain protein levels in B cells treated by I μ exon dss ASO

Splenic B cells were isolated from *C57BL/6* mice, stimulated with 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS and treated with 4 μM I μ dss ASO or an irrelevant control ASO for 4 days. **(A)** $\gamma 3$ and μ heavy chain protein levels were analyzed by Western Blot. **(B)** Quantification of $\gamma 3$ heavy chain protein expression relative to μ heavy chain protein expression. Data are means \pm SEM, $n=3$ for each group. Unpaired two-tailed Student's *t* test was used to determine significance. *** $P < 0.001$.

Supplementary table 1: Primers used for ChIP, RT-PCR and quantitative RT-PCR experiments

Name	Sequence	ChIP	RT-PCR	qRT-PCR
hMT promoter-for	5' CCCGGTCTCTCGAGCTATAAAC 3'	x		
hMT promoter-rev	5' GGTTCGCTGGGACTTGGA 3'	x		
hMT promoter-Probe	5' CTGCTTGCAATGTGGAATTGTGAGCG 3'	x		
S γ 1-U-for	5' AGGACACAAGACCTGCAAAAGAG 3'	x		x
S γ 1-U-rev	5' CCCAGGAGCTGCTGAACCT 3'	x		x
S γ 1-U-Probe	5' TGAGGCTGGTAAGAGTAACAAGGTAACCTGGG 3'	x		x
S γ 1-D-for	5' CAGGCAAACTAAACCAAGTGGG 3'	x		
S γ 1-D-rev	5' AGGATGTCCACCTCACCCAGGC 3'	x		
S μ -U-for	5' TCTAAAATGGCTAAACTGAGG 3'	x		
S μ -U-rev	5' AGCGTAGCATAGCTGAGCTC 3'	x		
S μ -D-for	5' CTGAATGAGTTTACCAGGCC 3'	x		
S μ -D-rev	5' GGCCTGTCTGCTTGGCTTC 3'	x		
S γ 2b-U-for	5' AGCTCCAAAAGCTCAGCAGAC 3'	x		
S γ 2b-U-rev	5' AGCCCCAGCTTACAAAGAGCT 3'	x		
S γ 2b-D-for	5' GGTGGGAATATGAGGGAGAAGTCCTAG 3'	x		
S γ 2b-D-rev	5' TTCCACCTGCCTCAGCTCTCCACAGC 3'	x		
I μ -for	5'-TTGACATTCTGGTCAAAACGGC		x	
C μ -rev	5'-TCTGAACCTTCAAGGATGCTCTTG		x	
I γ 1-for	5'-CCAAAACAGGAACAGAGACGG		x	
C γ 1-rev	5'-TAGACAGATGGGGGTGTCGT		x	
Actin-for	5' CGATGCCCTGAGGCTCTT 3'		x	
Actin-rev	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG		x	
I μ -for-Q	5'-ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT			x
I γ 1-for-Q	5'-GAACCAAGGAAGCTGAGCCC			x
I ϵ -for-Q	5'-AGATTCAACGCCTGGGAG			x
C γ 1-rev-Q	5'-ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA			x
C ϵ -rev-Q	5'-AATACCAGGTCACAGTCACAGG			x
S γ 1U-rev-Q	5'-AATGCTGGGATTGATCCTGGG			x
SeU-rev-Q	5'-GCAAACCCTTTGCTCAGGG			x
Gapdh-probe	Mm99999915_g1 (Life Technologies)			x
AID-probe	Mm01184115_m1 (Life Technologies)			x

II.2.2. Discussion

Nos travaux ont permis de découpler les étapes de transcription et d'épissage des transcrits germinaux (GLT) au cours de la CSR et ont révélé le double rôle joué par le site donneur d'épissage de l'exon I dans ce mécanisme.

Nous avons ainsi montré que la reconnaissance du site donneur de l'exon $I_{\gamma 1}$ permet l'accessibilité de la chromatine ainsi que la pause de la Pol II au niveau du promoteur, ce qui est indispensable pour le ciblage d'AID au niveau de la région switch $\gamma 1$ dans le mécanisme de la CSR. En effet, l'absence du site donneur de l'exon $I_{\gamma 1}$ dans le modèle de souris hMT réduit la transcription des GLT et le chargement de la Pol II au niveau du promoteur, ce qui suggère que la région autour de ce site donneur est indispensable pour l'initiation de la transcription. La reconnaissance du site donneur d'épissage par le spliceosome pourrait donc favoriser la formation d'une boucle avec le promoteur comme cela a été observé chez la levure (251) ou directement promouvoir l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription (252). Cette observation va dans le même sens que les résultats avec un autre modèle où une large région incluant le site donneur d'épissage de l'exon $I_{\gamma 2b}$ est également délétée (253). Ces modèles, s'ils permettent l'analyse de l'effet de la présence des sites donneur d'épissage des exons I sur la transcription, ne permettent cependant pas d'étudier le rôle de l'épissage seul dans la CSR. En effet, la présence de séquences introniques peuvent augmenter la transcriptions de certains gènes (254) et de ce fait, des modèles de délétions génique ne sont pas indiqués pour étudier l'influence de l'épissage dans d'autres mécanismes même autres que la CSR.

Notre technique de blocage du site donneur d'exon I à l'aide d'oligonucléotide nous a permis de nous affranchir de l'impact d'une modification génique sur la transcription afin d'étudier le rôle post-transcriptionnel des transcrits GLT. Cette technique a déjà été utilisée pour perturber l'épissage dans les cellules B dans quelques études (249,255,256) mais peu y recourent en immunologie à ce jour. Nos résultats ont montré que cibler les 5'SS des exons I GLT des régions switch donneuse (μ) et acceptrice ($\gamma 1$) avec un ASO ont permis une baisse de l'utilisation du 5'SS constitutif tout en promouvant l'utilisation de 5'SS alternatif. L'utilisation de ces 5'SS alternatifs n'a cependant pas été efficace pour restaurer la CSR puisque le nombre de cellules switchées vers IgG1 a significativement baissé en présence de l'ASO I_{μ} -dss et $I_{\gamma 1}$ -dss. Une précédente étude a montré que la délétion du 5'SS de l'exon I_{μ} n'avait pas d'impact sur la CSR et suggérait que la transcription de transcrits GLT alternatifs appelés « I_{μ} -like » pourraient jouer un rôle dans la restauration de la CSR (257). Cependant nos résultats montrent que ces GLT alternatifs, identiques à l'étude de Kuzin et collègues, ne seraient pas en mesure de restaurer la CSR, ce qui suggère le rôle d'autres mécanismes comme une adaptation cellulaire consécutive à une délétion génomique dans le modèle murin. De plus, nos résultats sont en accord avec l'étude de Ruminy et al qui a montré que la présence de mutation dans le 5'SS de l'exon I_{μ} était responsable d'une baisse de la CSR dans certains lymphomes (258) ainsi qu'avec une autre étude montrant que malgré une augmentation de l'épissage alternatif des transcrits GLT, la lignée CH12 était incapable de réaliser la CSR vers IgA lorsque l'expression de Spt4 était inhibée par siRNA (259).

L'hybridation des 5'SS des exons I avec un ASO pourrait avoir empêché la fixation d'une protéine importante pour la CSR et encore inconnue à ce jour, comme une protéine de liaison à l'ARN. En effet de nombreuses protéines de liaisons à l'ARN ont un rôle dans le recrutement d'AID au niveau des régions switch (87,260–262). De même, une diminution de l'épissage des transcrits GLT pourrait provoquer une baisse de la quantité de lariats générés au cours de

cette étape et avoir un effet direct sur la CSR, par l'inhibition de la formation des R-loop comme cela a été montré dans l'étude de Ribeiro de Almeida et collègues (84). De plus, même si le traitement ASO induit un faible taux d'épissage alternatif, ces « lariats GLT alternatifs » pourraient ne pas être reconnus par l'enzyme de débranchement DBR1, empêchant ainsi la génération de G-quadruplexes favorisant la CSR (83). Ces lariats alternatifs pourraient également être de moins bons substrats de l'hélicase DDX1, empêchant le recrutement d'AID au niveau des régions switch (84). Ces explications seraient en concordance avec l'hypothèse que chaque GLT épissé servirait de guide pour diriger AID vers sa région switch correspondante (83).

En conclusion, ces travaux ont permis de montrer que les ASO sont de bons outils pour étudier des mécanismes fondamentaux relatifs à l'épissage dans les cellules B et constituent une alternative de choix par rapport aux modèles de délétion génique, en permettant notamment de découpler les étapes interconnectées de transcription et d'épissage. De plus, ils sont rapidement et facilement utilisables *in vitro* bien que leur utilisation *in vivo* ait ses limites. La technologie ASO serait donc une méthode de choix pour les études relatives à l'épissage en complément de nouvelles techniques telles que la CRISPR-AID guidée qui permet d'insérer des mutations ponctuelles dans l'ADN, notamment sur les séquences des sites donneurs d'épissage (263).

II.3. Inhibition de l'expression génique par saut d'exon

Les oligonucléotides antisens modulant l'épissage (SSO) ont été largement utilisés pour rétablir l'expression des transcrits contenant un PTC en induisant un saut d'exon restaurant le cadre de lecture (197,198). A l'inverse, ils peuvent aussi être utilisés pour induire un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un PTC, entraînant la dégradation du transcrit ciblé par NMD. Ce mécanisme appelé FSD-NMD, décrit en 2011 par Zammarchi et collègues sur le gène *STAT3*, a permis de générer des transcrits *STAT3* sans exon 6 en ciblant les sites donneurs et accepteurs d'épissage de cet exon par un SSO. Le saut de l'exon 6 sur le transcrit *STAT3* induit un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un PTC dans l'exon 7, faisant de ce transcrit un bon substrat du NMD (208).

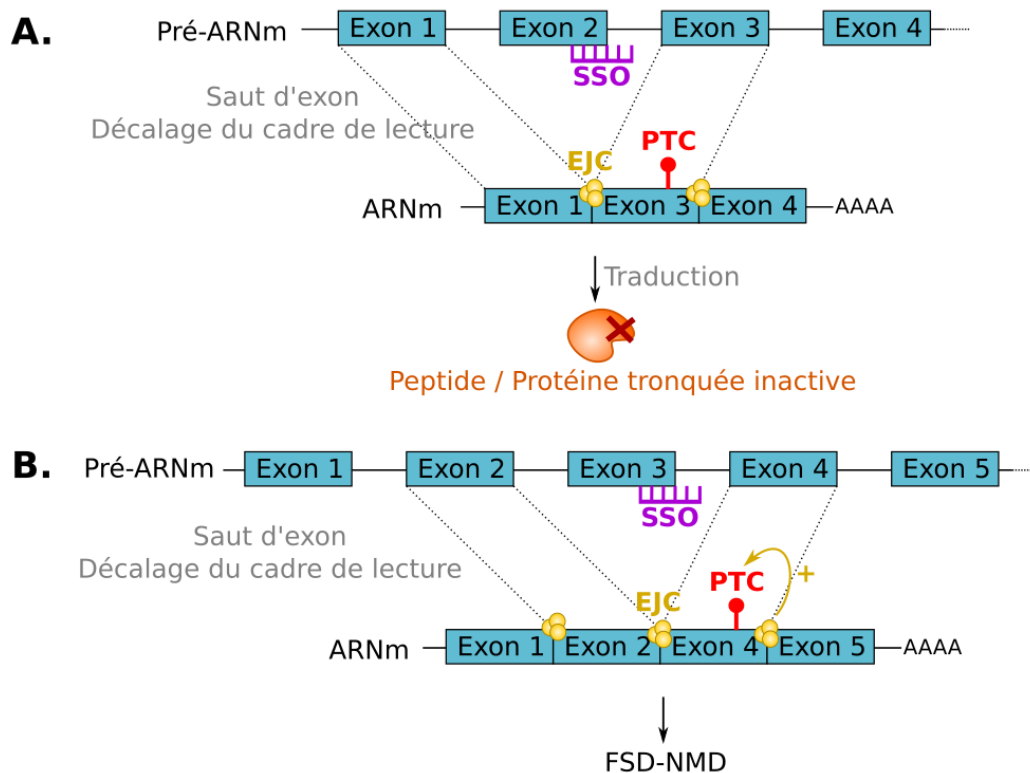


Figure 46. Principe d'une inhibition de l'expression génique à l'aide d'un SSO.

Cibler le site accepteur ou donneur d'épissage d'un exon possédant un nombre de nucléotides non multiple de trois à l'aide d'un SSO permet d'induire un épissage alternatif (le plus souvent un saut d'exon) donnant naissance à un décalage du cadre de lecture et à un codon stop prématuré (PTC). Le transcrit peut présenter un cadre de lecture très court n'autorisant pas le NMD mais entraînant la traduction d'un peptide trop petit pour être fonctionnel (A), ou être efficacement dégradé par NMD (B).

Durant ces travaux, j'ai pu mettre au point une technique d'inhibition de l'expression génique induite par un saut d'exon à l'aide d'un SSO et développer un outil bio-informatique pour l'aide au design d'un tel SSO. L'inhibition de l'expression génique est réalisée par le saut d'un exon au nombre de nucléotides non multiple de 3, un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un PTC dans le transcrit ciblé. Ces transcrits possédant des PTC peuvent être soit traduits en protéines trop petites pour être fonctionnelles soit dégradés par NMD, résultant dans les deux cas à une inhibition de l'expression génique (Figure 46). L'efficacité de cette stratégie a été testée dans des cellules B et des plasmocytes.

Durant ces travaux, j'ai pu mettre au point une technique d'inhibition de l'expression génique induite par un saut d'exon à l'aide d'un SSO et développer un outil bio-informatique pour l'aide au design d'un tel SSO. L'inhibition de l'expression génique est réalisée par le saut d'un exon au nombre de nucléotides non multiple de 3, un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un PTC dans le transcrit ciblé. Ces transcrits possédant des PTC peuvent être soit traduits en protéines trop petites pour être fonctionnelles soit dégradés par NMD, résultant dans les deux cas à une inhibition de l'expression génique (Figure 46). Cette méthode possède l'avantage d'éviter l'étape de transfection en utilisant des oligonucléotides de type morpholino complexés à un ligand de pénétration cellulaire dendrimère d'octaguanidine appelés vivomorpholino. En effet, jusqu'ici l'inhibition génique transitoire d'un gène dans des cellules B primaires et des plasmocytes est majoritairement réalisé à l'aide de la technologie RNAi mais cette dernière possède une faible pénétrance et provoque une forte mortalité cellulaire comparativement à des cellules B immortalisées (264). Récemment, la technologie CRISPR-Cas9 a été utilisée avec succès pour réaliser une inhibition de l'expression génique dans des cultures in vitro de cellules B primaires et dans un modèle de différenciation plasmocytaire (265,266) mais des outils pour réaliser une inhibition génique transitoire sans modifier d'ADN des cellules cibles est toujours souhaitable pour certaines études. L'efficacité de cette stratégie a été testée dans des cellules B et des plasmocytes avec des SSO dirigés contre les gènes *REL* (c-Rel) et *RELA*.

Ces travaux ont été publiés sur le serveur pré-print BioRxiv et ont fait l'objet d'une demande de brevet (Annexe 3).

II.3.1. Résultats

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.18.302984>; this version posted September 18, 2020. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. It is made available under a [CC-BY-NC-ND 4.0 International license](#).

Splice switching oligonucleotide mediated gene knockdown in B cells and plasma cells

Anne Marchalot^a, Jean-Marie Lambert^a, François Boyer^a, Justine Pollet^b, Jeanne Moreau^a, Jean Feuillard^a, Nathalie Faumont^a, Laurent Delpy^{a,*}.

^aCNRS UMR 7276 - INSERM U 1262 - Limoges University, Limoges, France

^bBISCEM US 42 INSERM / UMS 2015 CNRS - Limoges University, Limoges, France

*Corresponding author: Laurent Delpy (laurent.delpy@unilim.fr); CBRS-Faculté de Médecine, 2 Rue du Dr. Marcland, F- 87025 Limoges, France ; phone +33 519 564 214

FUNDING

This work was supported by grants from Fondation ARC (PJA 20161204724), ANR (2017-CE15-0024-01), Ligue Contre le Cancer (comités Corrèze, Haute-Vienne) and Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales (FFRMG).

KEYWORDS

Splice switching antisense oligonucleotide, Exon skipping, Nonsense Mediated Decay, NF- κ B, B cells, Plasma cells, Lymphoma, myeloma.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank BISCEM platform (US 42 INSERM / UMS 2015 CNRS - Limoges University, Limoges, France) for the technical help in bioinformatics and transcript analysis. We thank also Claire Carrion (CNRS UMR 7276 - INSERM U 1262 - Limoges University, Limoges, France) for her help with flow cytometry experiments.

ABSTRACT

The need to identify new therapeutic approaches to the treatment of cancers of the B lymphoid lineage is crucial. Unlike CRISPR/Cas technology, antisense strategies result in transient modifications of gene expression and lack mutagenic effects at the DNA level. Here, we provide evidence for efficient knockdown of c-REL and RELA expression after treatment with splice switching antisense oligonucleotides (SSO) inducing exon skipping and reading frameshifts. We also developed a tool to facilitate the choice of exons for on purpose inhibition of mouse and human gene expression. Interestingly, treatments with morpholino SSO targeting the c-REL exon 2 donor splice site or RELA exon 5 acceptor splice site elicited very efficient knockdown in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cell lines and antibody-secreting cells derived from primary human B cells. Consistent with the clinical relevance of c-REL activation in DLBCLs, treatment with c-REL SSO induced major alterations in NF- κ B and TNF signalling pathways and strongly decreased cell viability. Altogether, SSO-mediated knockdown is a powerful approach to transiently inhibit the expression of given genes in B-lineage cells that should pave the way for cancer treatments, provided optimized ligand-conjugations for *in vivo* delivery.

INTRODUCTION

B cells and plasma cells are key actors in humoral immune responses by producing antibodies that provide long-term defense against pathogens such as viruses, bacteria or fungi. B cells are activated when extracellular antigens bind their B cell receptor (BCR) which induces rapid cell proliferation and differentiation into antibody secreting cells (ASC), either plasmablasts or plasma cells, generating sustainable antibody production (1). However, even if this mechanism is well described in literature, some questions remains concerning the B cell differentiation process in humans, notably how plasma cells home to their bone marrow niches (2), how high affinity clones are selected (3) and what mechanism lies under their extended longevity (4,5). Unravelling these questions could give new leads to treat antibody-mediated diseases such as allergy, autoimmunity or multiple myeloma and even benefit vaccine development. Studying plasma cell differentiation using human *in vitro* models rather than mouse models which differ significantly in this area (6) and where some ASC related diseases still cannot be fully reproduced (7–9) seems to be the best approach. However, gene knockdown in primary human plasma cells and B cells has always been a struggle, impeding research in non-cancer human B cells and plasma cell studies. Indeed, RNAi mediated gene knockdown in primary B cells is known to induce high mortality rates and poor penetrance during transfection, responsible for a lower knockdown efficiency compared to transformed B and plasma cells (10). Recently, it was demonstrated that CRISPR-Cas9 technology is efficient for gene knockout in expanded primary B cells and plasma cell differentiation models (11,12) but additional tools to realize a transient knockdown and avoid DNA modifications that could affect other genes (13,14) are still needed.

Antisense oligonucleotides (ASO) are short single chains of modified DNA that can be used to degrade mRNA by RNase H1 recruitment or to modify pre-mRNA splicing among other mechanisms, depending of the oligonucleotide chemistry (for review see (15,16)). In addition to RNase H1-dependant RNA degradation, splice-switching oligonucleotides (SSO) can also be designed to knockdown gene expression, as shown for STAT3 by Zammarchi and colleagues (17). These authors demonstrated that

splice switching oligonucleotides (SSO) could be used to induce forced splicing-dependent nonsense-mediated decay (FSD-NMD), a mechanism based on SSO-mediated exon skipping to create a reading frameshift, the creation of a premature stop codon (PTC) and ultimately degradation of alternative mRNAs by NMD (17). While any splicing modulation producing a reading frameshift and the appearance of a PTC can be suitable for FSD-NMD, exon-skipping is the most frequent alternative splicing event in humans (18) and can be easily achieved with SSO hybridizing to either the donor splice site (5'SS), the acceptor splice site (3'SS) or exonic or intronic splicing enhancer (ESE or ISE) sequences (19). However, to efficiently knockdown gene expression, the delivery of sufficient SSO amounts into intracellular compartments remains challenging, as for RNAi technology. Over the last decades, numerous strategies have been developed to overcome this limitation and molecules such as peptide/ligand conjugates, nanoparticles or adeno-associated viruses (AAV) have been used to improve the delivery of antisense compounds (20). However, the development of such FSD-NMD strategies to modulate gene expression in B-lineage cells, including primary B or plasma cells, is still lacking.

During plasma cell differentiation, some key genes are differentially regulated including Bcl-6 and Blimp1 expressed in B cells and plasma cells respectively (21). Among those genes, NF- κ B components such as c-Rel and RelA are respectively down- and up-regulated during plasma cell differentiation. Blimp1 is upregulated by RelA expression which in turn, downregulates c-Rel expression by binding its enhancer in ASC (22). Moreover, c-Rel and RelA expression is upregulated in many cancers, especially those of B cell lineage origin (23,24). Therefore, c-Rel and RelA could be interesting targets to cure B cell and plasma cell malignancies like diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) or multiple myeloma (MM).

In this study, we describe a pipeline for the design of SSO to knockdown gene expression, either by inducing FSD-NMD or by shortening the open reading frame into an ineffective short polypeptide. Then, we evaluated this method in B cells using SSO targeting c-Rel and RelA transcripts, by comparing

morpholino SSO transfection to passive vivo-morpholino administration and finally, we verified the efficacy of this strategy in a plasma cell differentiation model.

MATERIAL & METHODS

ASO design

REL and RELA gene sequences were collected from NCBI, GRCh38.p12 assembly, 25 base pairs upstream to 25 base pairs downstream from each splice site. SSOs targeting c-Rel exon 2 donor splice site (5'-ACAGAAGAAGGGTCTATTACCTGGA-3'), RelA SSO targeting the acceptor splice site of exon 5 (5'-GAAACTGAGCGCCCCAGTCGTC-3'), and irrelevant Control ASO (5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA-3') were designed as morpholino or Vivo-morpholino and purchased from Gene Tools, LLC. 0.5mM ASO stock solutions were prepared with sterile nuclease-free water.

Cell culture and ASO treatments

SUDHL4 and OCILY10 (DLBCL) cell lines were cultivated in RPMI1640 medium with Ultraglutamine (Lonza) and 10% or 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Dominique Dutscher) at 37°C with 5% CO₂ and treated for 48 hours with 0.25 to 0.75 μM ASO for SUDHL4 and with 1.5 to 2 μM ASO for OCILY10. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained by density gradient centrifugation (Lympholyte-H Celardane) of cytopheresis rings from healthy donors (EFS Bordeaux) and B cells were sorted with the B cell isolation kit II (Miltenyi Biotec). Sorted B cells were cultured for 4 days in RPMI 1640 with UltraGlutamine (Lonza) containing 10% FBS (Dominique Dutscher), 1 mM sodium pyruvate (Eurobio), 1% AANE (Eurobio) and 50 U/ml penicillin/ 50 μg/ml streptomycin (Gibco) with 1μg/mL CPG-ODN2006 (Miltenyi), 2,4μg/mL BCR Fab'2 IgA+G+M (Jackson Immunoresearch), 5ng/mL hIL-2 (R&D Systems) and 100ng/mL Mega-CD40 ligand (Enzo Life Sciences) then washed and stimulated in the same media with 5ng/mL hIL-2 (R&D Systems), 12ng/mL hIL-10 (R&D Systems) and 5ng/mL human IL-4 (Peprotech) for 3 more days. Human B cells were treated with 2μM ASO for 72 hours at day 1 following stimulation for plasmablast studies and at day 4 following stimulation for plasma cell studies.

Flow Cytometry

Apoptosis in SUDHL4 cells was determined using AnnexinV antibody (BioLegend) and 7-AAD (BD Pharmingen) staining. Data were acquired on a Beckton Dickinson LSRII Fortessa cytometer and analyzed with FlowLogic software.

Western Blot

Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Thermo Scientific) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail. Lysates were sonicated and protein concentrations were determined using Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Proteins were denatured at 95°C for 5 minutes before separation on SDS-PAGE TGX 12% Stain-Free FastCast Acrylamide (Bio-Rad Laboratories). Proteins were then electro-transferred onto Trans Blot Turbo polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad Laboratories). Western blots were probed with rabbit anti-human c-Rel antibody (Cell Signaling), rabbit anti-human RelA antibody (Cell Signaling) or mouse anti-beta-actin antibody (Sigma). Detection was performed using an HRP-linked goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibody (Southern Biotech) and chemiluminescence detection (ECL Plus™, GE Healthcare) using ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories).

RT-PCR and qPCRs

Total RNA was prepared using Tri-reagent (Invitrogen) procedures. RT-PCR was carried out on 1µg DNase I (Invitrogen)-treated RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). PCRs were performed on cDNA samples equivalent to 10 to 20 ng of RNA per reaction using the Taq Core Kit (MP Biomedicals) and the following primer pairs: 1) forward 5'-GGCCTCTGACTGACTGACT and reverse 5'-GTAGCCGTCTCTGCAGTCTTT for c-Rel and 2) forward 5'-GCGAGAGGAGCACAGATACC and reverse 5'-TCACTCGGCAGATCTTGAGC for RelA. PCR products were separated on 2% agarose TBE gels. Quantitative PCRs were performed on cDNA samples equivalent to 5-10 ng of RNA per reaction, using SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), ROX plus or Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), ROX plus (Takara) 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

(Hs02758991_g1 ThermoFisher Scientific Probe). SYBR quantitative PCRs were performed for the quantification of c-Rel full length transcripts with forward 5'-GGCCTCCGGTGCATATAA and reverse 5'-TGTTCCGGTTGTGTCTGTGC primers and for exon 2 skipped c-Rel transcripts with forward 5'-AGCCATGGCCTCCGATTATG and reverse 5'-AAGGTCTGCGTTCTGTCCA primers.

RNA sequencing

Messenger RNA-sequencing was performed on the Illumina NextSeq500 and analyzed with DESeq2 statistical analysis at Nice-Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform. Differentially expressed genes were sorted when the adjusted p value was > 0.05 and the fold change was < 1.5 or > 1.5 . Reads were aligned with STAR on the hg38 genome version during the primary analysis. REL read visualization was performed on IGV software (Broad Institute and the Regents of the University of California) and sashimi plots were obtained by the ggsashimi tool on R studio software with a cutoff of 5 junctions. Heatmaps were obtained with R studio software using ggplot tool on statistically and differentially expressed gene lists. Pathways enrichments were analyzed on statistically and differentially expressed gene lists with g:Profiler website (25).

Transcriptomic analysis

The use of Python (26) package gffutils (27) was used to generate a database from the human genome annotation file (GTF format) of GENCODE 34 version (28). This database was used to search the number of exons among the coding sequence of each transcript. For figure 1B, coding sequences composed of less than 3 exons were excluded and only internal exons among these coding sequences, excluding first and last exons, were analyzed for the condition: number of nucleotides not divisible by 3 for each coding sequences. Results were written in a TSV file using Python libraries NumPy (29) and pandas (30) then used to generate pie charts with the Python graphic library Plotly (31).

Statistical analysis

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

RESULTS

Splice switching oligonucleotide selection workflow for exon skipping-mediated knockdown of gene expression.

Splice switching oligonucleotide (SSO) mediated gene knockdown can be achieved with an exon-skipping strategy for the vast majority of human genes, containing ≥ 3 exons with a targeted internal one not divisible by 3 for a reading frameshift to occur. In addition, exon skipping must provoke the appearance of a PTC to drastically shorten the open reading frame and/or support NMD degradation. Transcriptomic analysis revealed that 81.5% of human coding sequences exhibited at least 3 exons (Figure 1A). Among these coding sequences bearing at least 3 exons, the number of coding sequence harbouring 1, 2, 3, 4, 5 and >5 internal exons not divisible by 3 were 7.09%, 14.32%, 14.96%, 11.32%, 8.95% and 39.50% respectively and only 3.84% were not eligible for this strategy (Figure 1B).

We developed an R shiny tool called Exon Skipper (<https://cribl.shinyapps.io/ExonSkipper/>) for rapid identification of putative exon candidates for any mouse or human transcripts. This tool also indicates the PTC position for each exon skipping event and provides predictive information with regards to NMD degradation and ORF shortening. For each selected exon candidate, we then examined its nucleotide sequence, together with its surrounding 500 nucleotide intronic and exonic sequences, to detect unwanted restoration of the reading frame using cryptic splice sites. This analysis can be performed by any splice site scoring tools available such as Human Splicing Finder (HSF) (<https://hsf.genomnis.com/sequence>) (32). The selection of 3'SS targeting SSOs is preferred when a high risk of cryptic 5'SS that restores the reading frame is found and conversely. In the absence of predictive correction of reading frames after alternative splicing involving cryptic splice sites, SSOs can be designed to hybridize to either 5'SS, 3'SS or ESE/ISE sequences; the latter can be identified using Skip-E (<https://skip-e.geneticsandbioinformatics.eu>) , ESE finder (<http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>) (33) or other tools. Each SSO sequence must be carefully chosen as there are optimal parameters for each oligonucleotide chemistry related to RNA binding affinity (for design

tips see (19)). RNA binding parameters can be analysed through IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) and RNA availability through folding RNA simulators such as mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) (34). Finally, NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysis of selected SSO sequences towards other transcripts from the same organism is required to exclude SSOs with a high risk of cross-hybridization to off-targets (Figure 2). This complete method referred to as “Exon skipper pipeline” was used for the design of SSOs targeting two members of the NF- κ B pathway, c-Rel and RelA.

SSO targeting of the c-Rel exon 2 donor splice site efficiently knocksdown c-Rel expression in B-

lineage cells An SSO targeting the exon 2 donor splice site of c-Rel was designed with the previously described method in order to convert c-Rel protein translation into an inactive 21 amino acid peptide, lacking all active domains compared to the full-length c-Rel isoform. Consistent with the NMD escape of PTC-containing mRNAs with short ORFs (35,36), alternative c-Rel mRNAs lacking exon 2 are likely to be poor NMD substrates as the PTC is close to the translation initiation site (35,36) (Figure 3A). First, SUDHL4 (DLBCL) cells were used to evaluate the efficacy of passive administration of vivo-morpholino SSO targeting c-Rel. Treatment with 0.25 to 0.75 μ M vivo-morpholino SSO for 48 hours was sufficient to induce a dose-dependent decrease in c-Rel expression (Figure 3B,C), with a 10-fold reduction of full-length c-Rel mRNA expression compared to irrelevant control treated cells (CTRL) (Figure 3B,C) and a nearly complete absence of c-Rel protein at a concentration of 0.5 μ M. As predicted, the c-Rel exon 2 skipped transcripts induced in SSO conditions were readily detectable by RT-PCR as they are predicted to be poorly degraded by NMD (Figure 3B). Comparatively, transfection of morpholino SSO was far less efficient than passive administration of vivo-morpholino SSO and did not achieve complete knockdown of c-Rel expression (Figure S1). We further verified these results by other experiments on SUDHL4 treated with 0.5 μ M SSO and confirmed an effective reduction of full-length c-Rel mRNA expression (Figure 3E,F). c-Rel SSO was then used in a plasma cell differentiation model described by Le Gallou et al (37,38) and 2 μ M efficiently provoked c-Rel protein knockdown in pre-plasmablasts where c-Rel is still highly expressed (Figure 3G,H) and also in plasma cells where its expression was reduced (Figure

S2). Thus, we identified vivo-morpholino SSO targeting the c-Rel exon 2 donor splice site as simple and powerful tool to use for the inhibition of c-Rel expression in B and plasma cells.

Treatment with c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO alters Nf- κ B signalling and induces apoptosis of DLBCL cells

SUDHL4 cells treated with 0.5 μ M vivo-morpholino SSO were analysed by RNA sequencing to verify the absence of any other in-frame alternative transcripts. Only one out-of-frame junction resulting from intron retention downstream from exon 2 was detected in low amounts in SSO conditions (SSO) but was also present in the irrelevant control condition (CTRL) (Figure 4A). Simulating translation of this intron retention alternative transcript revealed the presence of a premature stop codon at position 319, making it a good substrate for NMD degradation and unable to restore partial c-Rel activity. Consistent with the increase of exon2-skipping events (Figure 4A), exon 2 reads including exon1-exon2 and exon2-exon3 junctions decreased while exon1-exon3 junctions appeared when cells were treated with SSO compared to the irrelevant control (CTRL).

RNA sequencing also revealed that 122 genes were differentially and significantly expressed in DLBCL cells treated with c-Rel SSO compared to control conditions (Figure 4B). Further pathway and gene enrichment analyses revealed that the main differentially expressed pathways were related to the NF- κ B signalling pathway and immune response to pathogens (Figure 4C). Among those genes, BCL3 was reduced by almost 2 fold, RELB by 2 fold, NF- κ B Inhibitor alpha ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), delta ($\text{I}\kappa\text{B}\delta/\text{p}100$) and zeta ($\text{I}\kappa\text{B}\zeta$) by 1.5, 1.5 and 3 fold respectively. NF- κ B2 was decreased by 1.5 fold, TNFAIP3/A20, NOTCH2, CD40 and CD83 by more than 1.5 fold and BIRC3 by more than 2.5 fold while PTPN6, VNN1 and FOS increased by 1.5 fold and CNTF increased by 2 fold (Table S1). Interestingly, these major transcriptomic modifications, including a deregulated TWEAK (TNF related weak inducer of apoptosis) signaling pathway, were associated with a strong increase in cell death and late apoptosis (Figure 4D).

RelA exon 5 acceptor splice site targeting SSO efficiently knocksdown RelA protein in B cells and plasmablasts

Another SSO targeting RelA at the exon 5 acceptor splice site was designed with the help of “Exon skipper pipeline” in order to reduce RelA expression. In that case, alternative mRNAs lacking exon 5 are predicted to be NMD targets, with a PTC located at position 460 eliciting interactions with downstream exon junction complex (EJC) components (Figure 5A). OCILY10 (DLBCL) cells were used to evaluate the efficacy of passive administration of vivo-morpholino SSO to inhibit RelA expression. We observed efficient dose-dependent knockdown of RelA expression with increasing doses of vivo-morpholino SSO (SSO) from 1.5 to 2 μ M compared to control conditions (Figure 5B,C). As expected, full-length RelA mRNAs drastically decreased after SSO treatment, and PTC-containing alternative mRNAs were not detected and most likely eliminated by NMD (Figure 5B). At the protein level, treatment with 2 μ M SSO during 48 hours resulted in a nearly complete absence of RELA proteins (Figure 5C). In addition, RelA SSO was tested at 2 μ M in a plasma cell differentiation model described by Le Gallou et al (37,38) and compared to irrelevant control ASO (Figure 5D,E). Again, treatment with RelA SSO diminished the amounts of full-length RelA mRNAs (Figure 5D) and proteins (Figure 5E) in plasma cells expressing RelA during their differentiation program.

DISCUSSION

An efficient transient knockdown of two differentially expressed genes during plasma cell differentiation, c-Rel and RelA, was successfully achieved with an SSO-mediated exon skipping strategy and could constitute a novel alternative to RNAi technology with known transfection efficiency limitations in primary B cells and plasma cells (10). In addition, the use of SSO could reduce off-target effects observed with RNAi technology or even RNase-H1 dependant ASO technologies, as they require direct mRNA degradation actors : RISC/Ago2 complex and RNase-H1 respectively. Indeed, it has been shown that as little as a 7 to 11 nucleotide homology between a siRNA and a mRNA was sufficient to recruit the RISC/Ago2 complex and induce RNA degradation, particularly in 5' untranslated regions (39,40). This aspect remains a major issue for the development of RNAi-based therapies despite many findings in the field to reduce off-target effects using chemical modifications and optimization of RNAi structure (41). Gapmer ASOs can also recruit RNase-H1 with unintended target binding and provoke off-target RNA degradation (42). By contrast, SSOs do not directly recruit RNA degradation machinery and therefore greatly minimize off-target effects. SSOs are also capable of weak binding to unintended sequences but the absence of RNA degradation limits the impact on off-target gene expression. However, SSOs are not completely devoid of off-target effects as splicing or RNA binding protein attachment on unintended transcripts can still be disturbed with an SSO (43).

SSO mediated c-Rel inhibition also showed interesting results in a DLBCL cell line, as it was able to reduce NF- κ B signalling and cell viability. Interestingly, BCL3 expression which was described to increase cell proliferation by inducing cyclin D1 transcription (44,45) was reduced upon SSO treatment in SUDHL4 cell line. BCL3 is also known to function as an NF- κ B inhibitor in the same manner as I κ B ζ , a Bcl-3 homolog which was also reduced after SSO treatment. It has been shown to potentiate NF- κ B pathway activity by binding to p50 homodimers where they may function as co-activators (46–48). Indeed, Bcl-3 overexpression is found in chronic lymphocytic leukemia where it is frequently rearranged within the IGH locus (49). Additionally, recent findings suggest I κ B ζ could be a key actor in

the development of psoriasis through activation of Th17 immune response (50,51) and could drive the pathogenesis of many haematological cancers (52,53). However, c-Rel is not known to have a direct effect on Bcl-3 and I κ B ζ expression, the latter preferentially interacting with p50 and p52 (54). Nonetheless, the *NFKB2* gene encoding p52 which is also reduced upon c-Rel targeting SSO treatment, could have influenced Bcl-3 expression as it is tightly regulated by this gene. According to our results, c-Rel was already found to be a direct regulator of NF- κ B2 expression in transitional B-cells (55) and in this way could have another indirect effect on RelB expression since NF- κ B2 processed protein p52 mainly associates with RelB in the alternative NF- κ B pathway (56). Thus, c-Rel inhibition had a broad effect on NF- κ B signalling, explaining the decreased viability found upon SSO treatment in DLBCL cells whose tumorigenicity relies on this pathway (57,58). These results still need to be confirmed in other DLBCL cell lines and patient cells to verify c-Rel knockdown benefits in this pathology but could constitute an interesting lead for the development of new innovative therapies.

Indeed, targeting the NF- κ B pathway could be an effective strategy for the treatment of B-cell malignancies (59) and all NF- κ B subunits (RelA, c-Rel, RelB, p52 and p50 as well as other NF- κ B pathway components such as IKKs or NEMO) could be targeted by our SSO induced gene knockdown therapy. Some existing drugs have in fact been found to be active NF- κ B inhibitors such as bortezomib which blocks I κ B degradation (60) but no specific NF- κ B inhibitor has currently shown promising results *in vivo* and furthermore they display a high risk of toxicity (61,62).

To conclude, our results show that efficient transient gene knockdown can be achieved by SSO mediated exon skipping with passive administration of *vivo*-morpholino oligos in primary B cells and plasma cells. Despite some limited exceptions identified with Exon skipper pipeline in mice and humans, this strategy can be implemented for most eukaryotic genes with the added advantage of a transfection-free system in primary cell cultures. Additionally, splicing modulation has the advantage of a low risk of off-target effects, as it does not rely on recruitment of direct mRNA degradation actors.

This tool could be an efficient complement to DNA modification tools such as CRISPR-Cas9 to study normal human B cells and uncover new plasma cell differentiation key mechanisms.

REFERENCES

1. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*. 2015 Mar;15(3):160–71.
2. Wilmore JR, Allman D. Here, There, and Anywhere? Arguments for and against the Physical Plasma Cell Survival Niche. *The Journal of Immunology*. 2017 Aug 1;199(3):839–45.
3. Suan D, Sundling C, Brink R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Current Opinion in Immunology*. 2017 Apr 1;45:97–102.
4. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 13];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00721/full>
5. Lightman SM, Utley A, Lee KP. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 13];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00965/full>
6. Brynjolfsson SF, Persson Berg L, Olsen Ekerhult T, Rimkute I, Wick M-J, Mårtensson I-L, et al. Long-Lived Plasma Cells in Mice and Men. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 13];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02673/full>
7. Libouban H. The use of animal models in multiple myeloma. *Morphologie*. 2015 Jun 1;99(325):63–72.
8. Gado K, Silva S, Paloczi K, Domjan G, Falus A. Mouse plasmacytoma: an experimental model of human multiple myeloma. *Haematologica*. 2001 Jan 1;86(3):227–36.
9. Braggio E, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R. Molecular pathogenesis of Waldenström’s macroglobulinemia. *Haematologica*. 2012 Sep 1;97(9):1281–90.

10. Shih T, De S, Barnes BJ. RNAi Transfection Optimized in Primary Naïve B Cells for the Targeted Analysis of Human Plasma Cell Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jul 23 [cited 2020 Aug 13];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6664017/>
11. Hung KL, Meitlis I, Hale M, Chen C-Y, Singh S, Jackson SW, et al. Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Molecular Therapy*. 2018 Feb 7;26(2):456–67.
12. Johnson MJ, Laoharawee K, Lahr WS, Webber BR, Moriarity BS. Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. *Scientific Reports*. 2018 Aug 14;8(1):12144.
13. Grünewald J, Zhou R, Garcia SP, Iyer S, Lareau CA, Aryee MJ, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*. 2019 May;569(7756):433–7.
14. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*. 2013 Sep;31(9):822–6.
15. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annual Review of Medicine*. 2019;70(1):307–21.
16. Smith CIE, Zain R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2019;59(1):605–30.
17. Zammarchi F, Stanchina E de, Bournazou E, Supakorndej T, Martires K, Riedel E, et al. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *PNAS*. 2011 Oct 25;108(43):17779–84.
18. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008 Nov;456(7221):470–6.

19. Maruyama R, Yokota T. Tips to Design Effective Splice-Switching Antisense Oligonucleotides for Exon Skipping and Exon Inclusion. In: Yokota T, Maruyama R, editors. Exon Skipping and Inclusion Therapies: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 [cited 2020 Jul 28]. p. 79–90. (Methods in Molecular Biology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8651-4_5
20. Godfrey C, Desviat LR, Smedsrød B, Piétri-Rouxel F, Denti MA, Disterer P, et al. Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies. *EMBO Mol Med*. 2017 May;9(5):545–57.
21. Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, Haren SD van, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, et al. STAT3-Mediated Up-Regulation of BLIMP1 Is Coordinated with BCL6 Down-Regulation to Control Human Plasma Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 2008 Apr 1;180(7):4805–15.
22. Roy K, Mitchell S, Liu Y, Ohta S, Lin Y, Metzger MO, et al. A regulatory circuit controlling the dynamics of the NF κ B cRel phases B cells from proliferation to plasma cell differentiation. *Immunity*. 2019 Mar 19;50(3):616-628.e6.
23. Hunter JE, Leslie J, Perkins ND. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. *British Journal of Cancer*. 2016 Jan;114(1):1–6.
24. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*. 2012;246(1):379–400.
25. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W191–8.
26. Van Rossum G, Drake FL. Python 3 Reference Manual. Scotts Valley, CA: CreateSpace; 2009.

27. Dale R. daler/gffutils [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 16]. Available from: <https://github.com/daler/gffutils>
28. Frankish A, Diekhans M, Ferreira A-M, Johnson R, Jungreis I, Loveland J, et al. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D766–73.
29. Walt S van der, Colbert SC, Varoquaux G. The NumPy array: a structure for efficient numerical computation. *Computing in Science and Engineering.* 2011 Mar 5;13(2):22–30.
30. Jeff Reback, Wes McKinney, jbrockmendel, Joris Van den Bossche, Tom Augspurger, Phillip Cloud, et al. pandas-dev/pandas: Pandas 1.1.2 [Internet]. Zenodo; 2020 [cited 2020 Sep 16]. Available from: <https://zenodo.org/record/4019559#.X2HYt2gzZPY>
31. Plotly Technologies Inc. Collaborative data science Publisher: Plotly Technologies Inc. [Internet]. Montréal, QC; 2015. Available from: <https://plot.ly>
32. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(9):e67.
33. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3568–71.
34. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3406–15.
35. Inácio Â, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F, et al. Nonsense Mutations in Close Proximity to the Initiation Codon Fail to Trigger Full Nonsense-mediated mRNA Decay. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32170–80.

36. Rebbapragada I, Lykke-Andersen J. Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? *Current Opinion in Cell Biology*. 2009 Jun 1;21(3):394–402.
37. Le Gallou S, Caron G, Delalay C, Rossille D, Tarte K, Fest T. IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol*. 2012 Jul 1;189(1):161–73.
38. Caron G, Hussein M, Kulis M, Delalay C, Chatonnet F, Pignarre A, et al. Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Reports*. 2015 Nov 3;13(5):1059–71.
39. Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, et al. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(14):4527–35.
40. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*. 2003 Jun;21(6):635–7.
41. Suter SR, Sheu-Gruttadauria J, Schirle NT, Valenzuela R, Ball-Jones AA, Onizuka K, et al. Structure-Guided Control of siRNA Off-Target Effects. *J Am Chem Soc*. 2016 Jul 20;138(28):8667–9.
42. Hagedorn PH, Pontoppidan M, Bisgaard TS, Berrera M, Dieckmann A, Ebeling M, et al. Identifying and avoiding off-target effects of RNase H-dependent antisense oligonucleotides in mice. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jun 20;46(11):5366–80.
43. Scharner J, Ma WK, Zhang Q, Lin K-T, Rigo F, Bennett CF, et al. Hybridization-mediated off-target effects of splice-switching antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 24;48(2):802–16.

44. Park SG, Chung C, Kang H, Kim J-Y, Jung G. Up-regulation of Cyclin D1 by HBx Is Mediated by NF- κ B2/BCL3 Complex through κ B Site of Cyclin D1 Promoter. *J Biol Chem*. 2006 Oct 20;281(42):31770–7.
45. Westerheide SD, Mayo MW, Anest V, Hanson JL, Baldwin AS. The Putative Oncoprotein Bcl-3 Induces Cyclin D1 To Stimulate G1 Transition. *Molecular and Cellular Biology*. 2001 Dec 15;21(24):8428–36.
46. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, et al. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature*. 2004 Jul;430(6996):218–22.
47. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, et al. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through κ B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*. 1993 Mar 12;72(5):729–39.
48. Caamaño JH, Perez P, Lira SA, Bravo R. Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF- κ B1 (p50) homodimers in vivo. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1342–8.
49. McKeithan TW, Takimoto GS, Ohno H, Bjorling VS, Morgan R, Hecht BK, et al. BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: A molecular and cytogenetic study. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 1997;20(1):64–72.
50. Müller A, Hennig A, Lorscheid S, Grondona P, Schulze-Osthoff K, Hailfinger S, et al. I κ B ζ is a key transcriptional regulator of IL-36–driven psoriasis-related gene expression in keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Oct 2;115(40):10088–93.

51. Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, et al. I κ B β regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*. 2010 Apr 29;464(7293):1381–5.
52. Willems M, Dubois N, Musumeci L, Bours V, Robe PA. I κ B ζ : an emerging player in cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 26;7(40):66310–22.
53. Nogai H, Wenzel S-S, Hailfinger S, Grau M, Kaergel E, Seitz V, et al. I κ B- ζ controls the constitutive NF- κ B target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood*. 2013 Sep 26;122(13):2242–50.
54. Nolan GP, Fujita T, Bhatia K, Huppi C, Liou HC, Scott ML, et al. The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I κ B-like molecule that preferentially interacts with NF- κ B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 1993 Jun;13(6):3557–66.
55. Castro I, Wright JA, Damdinsuren B, Hoek KL, Carlesso G, Shinnars NP, et al. B Cell Receptor-Mediated Sustained c-Rel Activation Facilitates Late Transitional B Cell Survival through Control of B Cell Activating Factor Receptor and NF- κ B2. *The Journal of Immunology*. 2009 Jun 15;182(12):7729–37.
56. Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*. 2007 Nov 1;13(11):460–9.
57. Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *JCO*. 2011 Apr 11;29(14):1803–11.
58. Young RM, Shaffer AL, Phelan JD, Staudt LM. B-Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B-Cell lymphoma. *Seminars in Hematology*. 2015 Apr 1;52(2):77–85.
59. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012 Feb;12(2):121–32.

60. Roccaro AM, Ribatti AV and D. Bortezomib in the Treatment of Cancer [Internet]. Vol. 1, Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 2006 [cited 2020 Aug 26]. p. 397–403. Available from: <https://www.eurekaselect.com/77311/article>
61. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007 Jan;8(1):49–62.
62. Chariot A. The NF- κ B-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends in Cell Biology*. 2009 Aug 1;19(8):404–13.

FIGURE LEGENDS

FIG 1. Human whole transcriptome analysis of coding sequences. **A**, Number of exons in the coding sequence **B**, Number of exons not divisible by 3 among coding sequences bearing at least 3 exons and excluding the first and last exons.

FIG 2. “Exon skipper pipeline” facilitates selection of splice switching oligonucleotides (SSO) to knockdown gene expression. Schematic representation of in-silico sequential steps performed to select exon targets and define the best SSO position for efficient inhibition of gene expression.

FIG 3. c-Rel exon 2 donor splice site targeting vivo-morpholino SSO induces efficient c-Rel knockdown in DLBCL cell lines and human plasmablasts differentiated from primary B cells. **A**, Illustration of SSO mediated knockdown of c-Rel transcripts. **B,C,D**, SUDHL4 cells were treated 48 hours with 0.25 to 0.75 μ M of c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL). **B**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **C**, Knockdown of full length c-Rel mRNAs (left) and levels of alternative c-Rel mRNAs lacking exon 2 were measured by qRT-PCR **D**, Knockdown of c-Rel protein was verified by western blot. **E,F**, SUDHL4 cells were treated 48 hours with 0.5 μ M c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL) (n=4). **E**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **F**, qRT-PCRs were performed as in **C**. **G,H**, Human plasmablasts differentiated from primary B cells were treated for 72 hours at day 1 following stimulation with 2 μ M SSO or CTRL. **G**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **H**, Knockdown of c-Rel protein was verified by western blot. **** p < 0.0001

FIG 4. RNAseq analysis of c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO on splicing and biologic effects on DLBCL cells. SUDHL4 cells (n=3) were treated 48 hours with 0.5 μ M c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL) (n=3). **A**, Splice junction read analyses of exons 1 to 4 of the c-Rel gene aligned with the two known transcript isoforms. **B**, Heatmap of 121 differentially expressed genes by DESeq2 RNA sequencing analysis. **C**, Significant Gene Ontology, KEGG, Reactome, WikiPathways and CORUM pathways performed on differentially expressed gene lists. **D**, Apoptosis was analysed by flow cytometry with annexin V and 7-AAD staining. **** p < 0.0001

FIG 5. RelA exon 5 acceptor splice site targeting vivo-morpholino SSO induces protein knockdown of RelA in DLBCL cells and human plasma cells differentiated from primary B cells. **A**, Illustration of SSO mediated knockdown of RelA transcripts. **B,C** OCILY10 cells were treated 48 hours with 1.5 to 2 μ M RelA exon 5 acceptor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL). **B**, Diminution of RelA transcripts was assessed by RT-PCR. **C**, Knockdown of RelA protein was verified by western blot. **D,E** Human plasma cells differentiated from primary B cells were treated for 72 hours at day 4 following differentiation with 2 μ M RelA exon 5 acceptor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL). **D**, Diminution of RelA transcripts was assessed by RT-PCR. **E**, Knockdown of RelA protein was verified by western blot.

Graphical Abstract

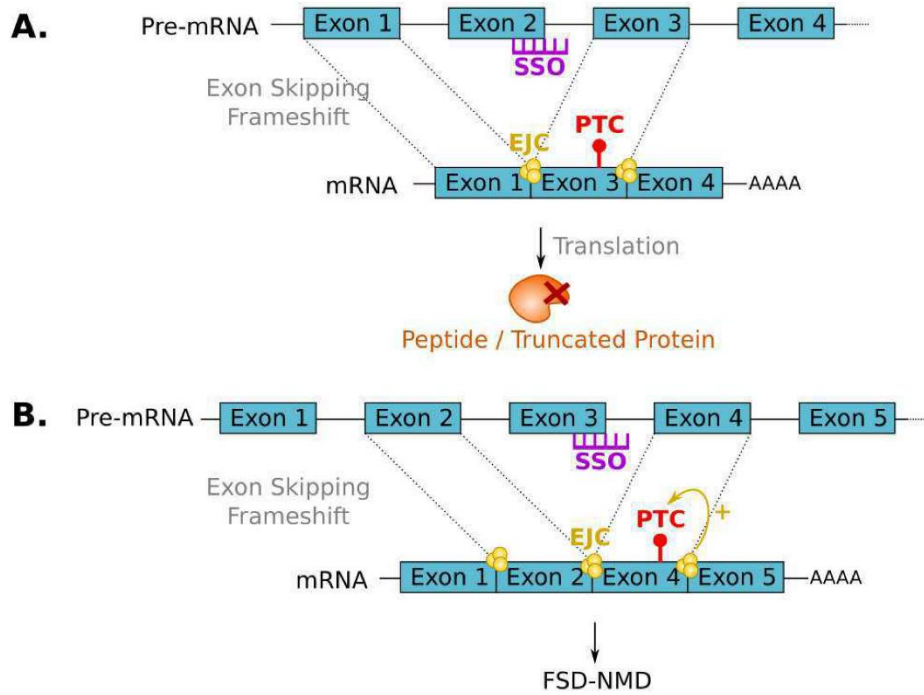


Figure 1

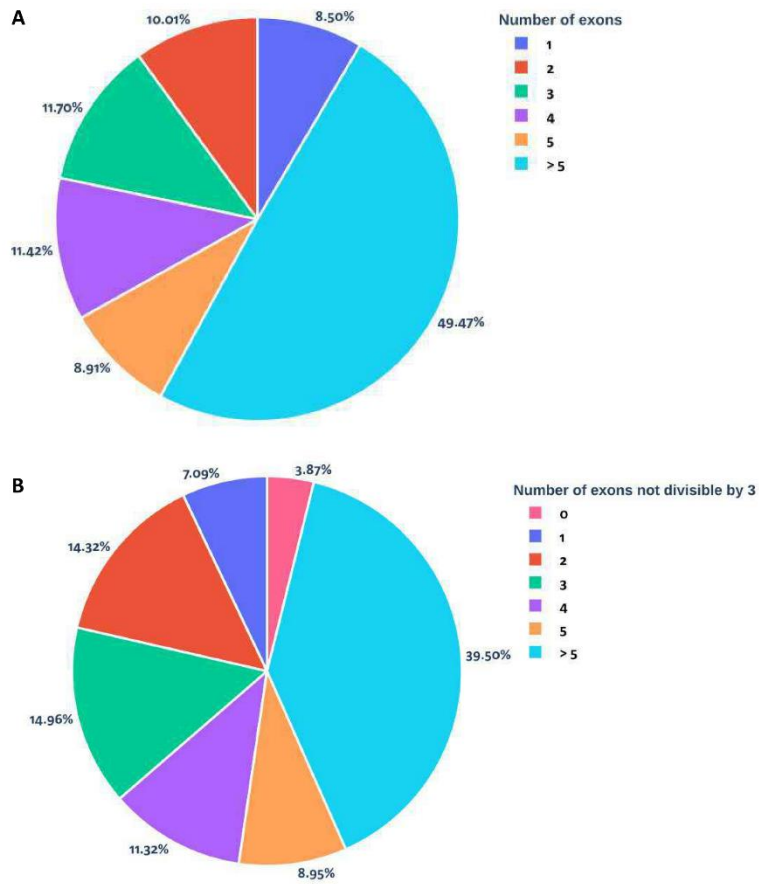


Figure 2

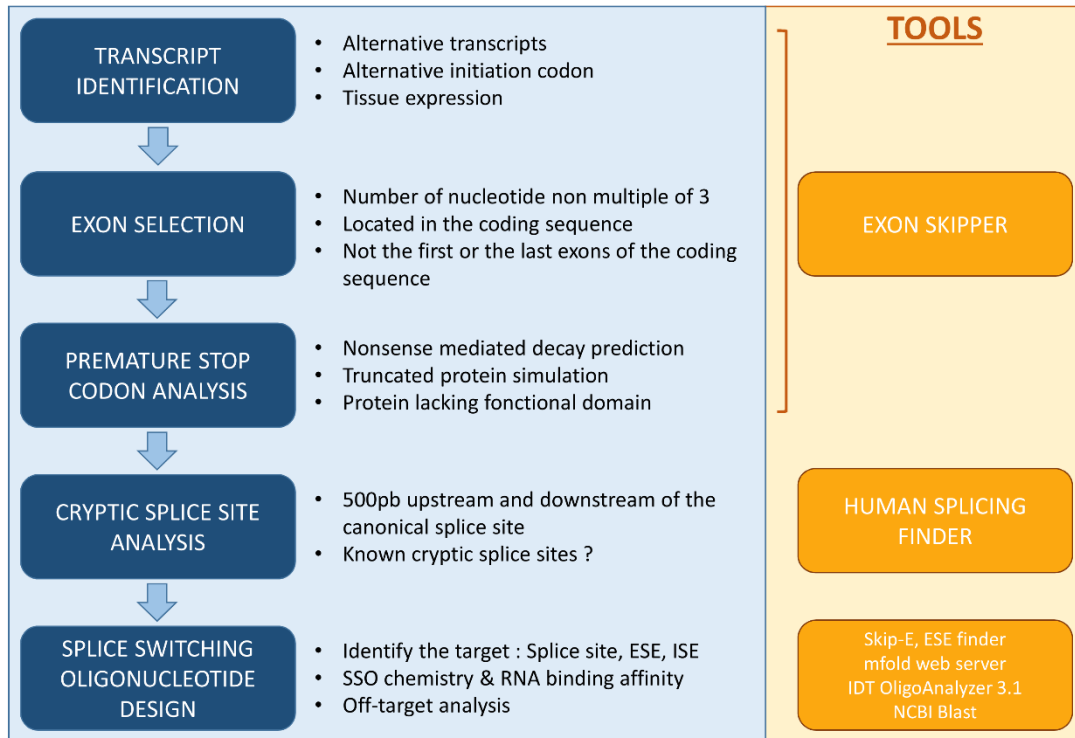


Figure 3

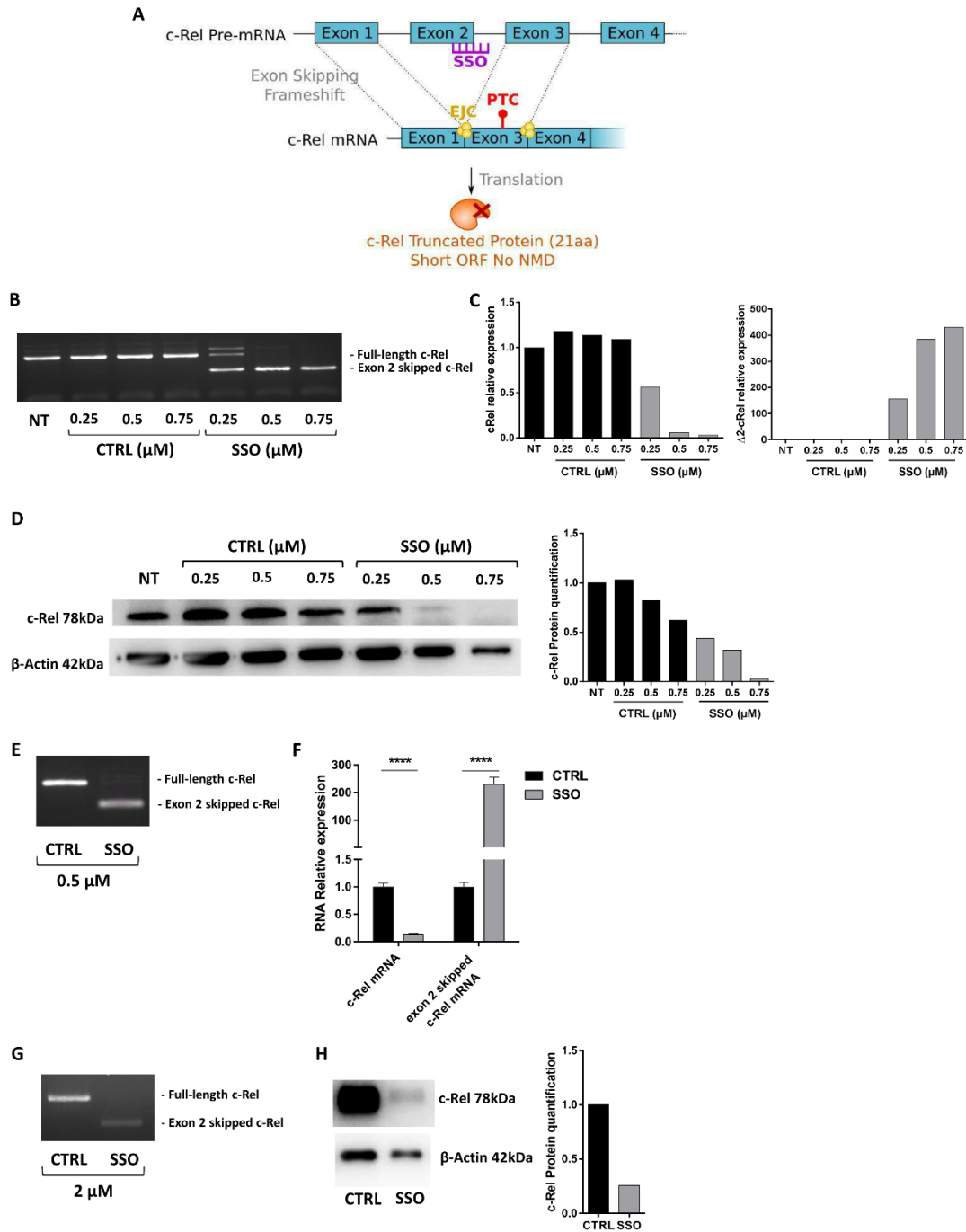


Figure 5

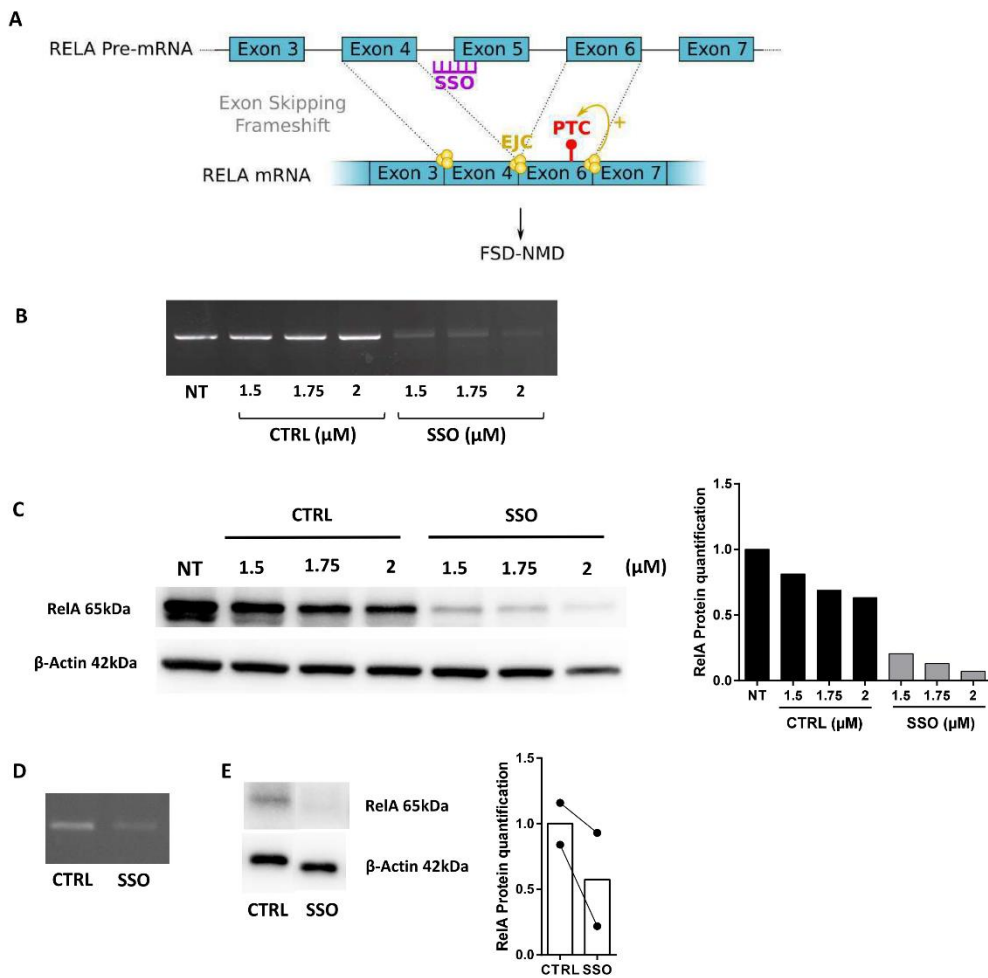


TABLE S1. Differentially expressed gene list analysed by DESeq2 on RNA sequencing results.

FIG S1. Transfection of morpholino SSO targeting c-Rel exon 2 donor splice induces protein knockdown of c-Rel at high concentrations. SUDHL4 cells were transfected with 10 to 30 μ M c-Rel exon 2 donor splice site targeting morpholino SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL) and collected at 48 hours. **A**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **B**, Knockdown of c-Rel protein was verified by western blot.

FIG S2. c-Rel exon 2 donor splice site targeting morpholino SSO transfection results in protein knockdown of c-Rel in human plasma cells. Human plasma cells differentiated from primary B cells were treated for 72 hours at day 4 following differentiation with 2 μ M c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL). **A**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **B**, Knockdown of c-Rel protein was verified by western blot.

Figure S1

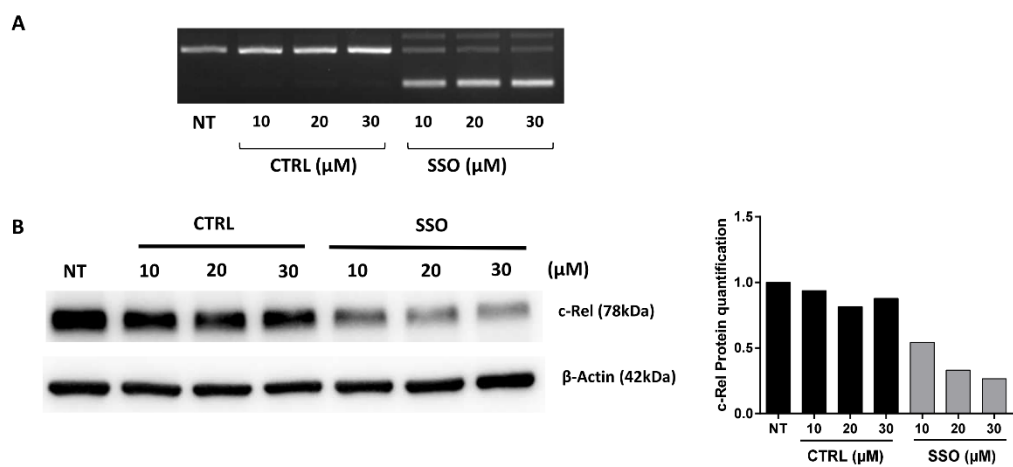


Figure S2

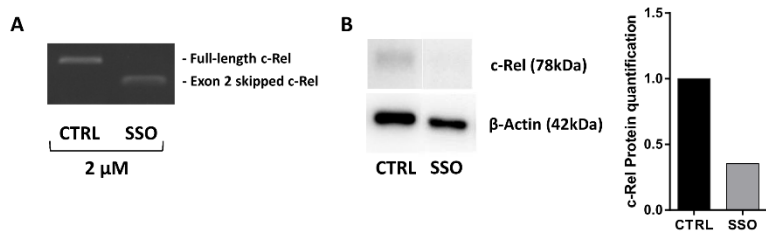


Table S1

Geneid	Fold change	Adjusted p value	Geneid	Fold change	Adjusted p value
Clorf132	5,022911295	7,1537E-123	IDUA	1,62335198	0,001174923
DOCK8	0,470644227	2,54258E-66	KLHL3	1,872499981	0,001343111
BIRC3	0,37996476	1,53621E-56	OPN3	1,873089614	0,001366676
COG4	0,46381148	1,35949E-42	ATP9B2	0,575910624	0,001398099
VPSL1	0,422596219	3,2518E-39	LSMEM1	1,882698275	0,002420449
RBLB	0,507445202	6,14813E-32	CNTF	2,123657127	0,002444089
POT1	0,521819259	7,0974E-31	SH2D5	0,58019066	0,002518911
MTR	0,50943553	9,72105E-31	SPP1	2,500680266	0,003164509
RTN3	0,523806126	6,89641E-29	VASN	1,510811058	0,003286523
ECl2	1,918821152	3,65586E-27	NOTCH2	0,634140282	0,003753088
ATAD2	0,603364575	1,48395E-26	MOV1C	2,865238372	0,00376341
CTPS2	0,547127552	1,2511E-24	KB-431CL4	0,658873969	0,004143892
ZMYM4	0,624784662	4,48979E-24	ST8SIA5	2,184458274	0,005116087
ADAR	0,644808804	3,88417E-23	PNMA5	0,503981424	0,005962646
KIAA0040	0,596174288	2,47178E-22	KCNH8	1,496592874	0,006039196
MIER1	1,574315593	3,08884E-21	FBXO32	1,887811574	0,006106661
CD83	0,593038068	5,11312E-21	KB-431CL5	4,082214851	0,006278356
FBXO3	0,537701066	5,27494E-20	AC079767.4	0,65944909	0,00671003
TRAF4	0,661348849	1,2192E-19	RP11-381K20.2	0,427723137	0,006881883
POLA2	0,626140895	1,20494E-18	KIAA1024	1,705004517	0,006908435
MIR146A	0,353977708	3,30288E-18	COLQ	3,565504285	0,007040877
LTB	0,378468803	5,71892E-18	RP11-251G23.5	0,619547653	0,007877189
HMGCS1	0,617564164	2,7258E-17	TNFAIP3	0,576843941	0,009515032
TMEM237	0,293582018	7,69124E-17	RP1-197B17.3	1,680528741	0,0125034
ANAPC16	1,545896055	1,40711E-16	PARP14	0,339009616	0,014814179
DDHD2	0,575888194	3,43356E-16	VNN1	1,734314435	0,017785402
PEX3	0,616478297	6,27134E-15	MGAT4A	1,542176466	0,018690718
MTRR	0,664136585	3,38583E-13	RPS-1071N3.1	0,504132238	0,018812245
EFCAB12	3,324981282	5,34512E-13	ARHGAP24	0,648495529	0,020392585
CYB561A3	0,666362231	2,93087E-12	C8orf58	1,502131263	0,022456807
NDUFB1	0,637459879	3,13359E-12	PPP4R4	0,398715297	0,025787332
CD40	0,628916087	1,43717E-11	ZCWPW1	0,623449764	0,02629655
NBAS	0,652615378	2,3053E-11	FOC	1,679558968	0,026874758
MAP9	0,631862638	6,47864E-11	PTPN6	1,521024774	0,028168663
FCRL3	0,610336216	7,98283E-11	FCRL5	0,482135405	0,029102959
NDUFV2	2,884664087	1,03942E-10	OXTR	1,83248997	0,030425779
MAPKAPK3	0,645072101	1,56824E-10	NFKB1Z	0,335128401	0,031063947
NFKB2	0,664213073	2,63961E-09	MAFIP	2,270467743	0,031533761
MT-TG	7,424980351	2,38681E-08	SYT16	1,628873488	0,032036446
WNT10A	0,508100298	3,1909E-08	OR5H6	0,424761529	0,033777723
PARVG	1,519739422	1,10035E-07	RP11-91P24.6	3,464564408	0,034763268
BCL3	0,573871398	1,354E-07	ASXL3	0,510497905	0,034763268
NFKB1A	0,651847682	1,47727E-07	AVIL	1,894696694	0,035959636
FAM43A	1,495399494	1,61102E-07	CLEC4A	1,727715061	0,036255539
LRRN3	0,546433797	1,62289E-07	IFIH1	0,33677313	0,038467647
NAALADL2-AS2	0,660553366	1,71901E-07	MTRNR2L12	1,857506939	0,04043463
CTD-2017D11.1	1,704172583	2,2197E-07	TNR	2,827475286	0,042379549
TTC36	40,33930008	4,0752E-07	C9orf57	1,655719698	0,042741232
TMEM25	2,594036474	5,68483E-07	RP11-768B22.2	0,595352947	0,043290168
BCL2A1	0,551211878	6,8468E-07	ULK4	0,637989413	0,043593424
COLCA1	2,115020101	7,52887E-07	TLN2	0,640763271	0,047640733
GPR135	1,644324424	2,03065E-06			
Clorf186	0,667486047	2,48889E-06			
TINCR	4,036950657	2,75898E-06			
COL24A1	1,739099864	5,93893E-06			
RP11-631N16.2	1,790169947	0,000031101			
NFKB1C	0,647982968	0,000034982			
GTF2IRD2P1	0,622022632	4,35506E-05			
CCDC141	0,594419028	0,000121908			
RP11-1072C15.4	2,838049507	0,000130096			
C18orf32	1,650368512	0,000150685			
TEK4P2	1,774722385	0,000173249			
Clorf228	1,636140247	0,000223959			
AC004540.4	0,240993734	0,000288077			
CAMKV	0,624740769	0,000380819			
GLRA3	1,605672679	0,000622837			
FBXO4	0,625584749	0,000655746			
RP11-152N13.16	0,487491646	0,00066788			
TMEM81	1,741140243	0,000715043			
SOSL-IT1	1,574607498	0,000945001			

II.3.2. Discussion

Nos travaux ont montré que l'inhibition de l'expression génique à l'aide de SSO est possible dans les cellules B et les plasmocytes et pourrait être une alternative de choix par rapport à d'autres méthodes antisens telles que les ARN interférents (siRNA et shRNA). En effet, inhiber l'expression d'un gène à l'aide d'ARN interférents présente un risque d'effets dits « off target » par l'inhibition de l'expression d'autres gènes que celui ciblé. Les ARN interférents reposent sur l'hybridation à une séquence cible sur l'ARN, or cette séquence peut posséder une faible homologie avec d'autres séquences suffisante pour l'hybridation des ARN interférents, le recrutement du complexe RISC et la dégradation des transcrits. Il a été montré que seulement 7 à 11 nucléotides homologues entre un siRNA et un transcrit peuvent induire une dégradation par RNAi et être originaire d'effets « off target », cette hybridation étant le plus souvent dans les régions 5'-UTR des transcrits (267,268). Ce problème reste majeur pour la mise au point de thérapies à base de RNAi malgré les nombreuses avancées dans le domaine pour réduire les effets « off target » à l'aide de modifications chimiques et d'optimisation de la structure des RNAi (269). La technologie SSO au contraire, ne recrute pas directement une machinerie de dégradation de l'ARN et évite de ce fait une grande partie des effets « off target », même si elle n'en est pas complètement dépourvue de part un risque de modulation de l'épissage d'autres gènes (270). En effet, les SSO sont également capables de se fixer partiellement sur des séquences non ciblées mais ne vont pas induire directement la dégradation du transcrit, évitant ainsi une inhibition de l'expression d'autres gènes même si la perturbation de l'épissage ou de la fixation de protéines de liaison à l'ARN peut survenir pour d'autres gènes que celui ciblé.

De plus, l'efficacité des technologies RNAi et par ASO RNase H-dépendant reposent en grande partie sur la disponibilité du complexe RISC/Ago2 et de la RNase H respectivement. Or la disponibilité de ces protéines peut être extrêmement variable d'un type cellulaire à l'autre et la possibilité d'une saturation des mécanismes de dégradation peut limiter l'efficacité de ces technologies (271,272). Un autre effet adverse de la saturation de ces mécanismes est qu'il peut gêner la prise en charge des miRNA et lncRNA naturels par le complexe RISC/Ago2, ce qui augmente l'expression de leur gènes cibles (273). Dans le cas de la RNase H1, son action sur la résolution des R-loop (186) pourrait aussi être perturbée ainsi que la dégradation des lncRNA (274).

Récemment, la découverte de la technique de modification ADN CRISPR-Cas9 a rapidement fait parlé d'elle et a généré un véritable engouement dans le monde scientifique et médical (275). Cette technique permet en effet de modifier l'ADN à façon, en supprimant ou insérant une séquence ADN ou en réalisant des mutations ponctuelles selon le type de protéines Cas utilisées, offrant l'opportunité de soigner des maladies génétiques jusque-là sans solution thérapeutique (276). Aujourd'hui, la méthode CRISPR a aussi été adaptée pour dégrader ou éditer l'ARN avec un orthologue de la Cas9 ou une Cas13 optimisée pour se lier à l'ARN et même pour moduler l'épissage à l'aide de Cas9 ou 13 catalytiquement inactives (276,277). Cependant la méthode CRISPR a éveillé des inquiétudes sur sa spécificité puisque de nombreux effets « off target » sur l'ARN et l'ADN ont été mis en évidence (278,279), suscitant des doutes quant à son application en thérapeutique. De plus, si cette technique peut être facilement appliquée *in vitro* ou *ex vivo* pour de la thérapie génique par exemple, elle reste pour le moment difficile à mettre en place *in vivo* par des soucis d'administration cellulaire. En effet, pour que cette technique fonctionne il faut apporter deux éléments dans la cellule : l'ARN guide associé à une CRISPR et la protéine Cas qui ne sont pas synthétisées naturellement par les cellules eucaryotes ; et peu de méthodes sont à ce jour efficaces pour délivrer une

CRISPR-Cas in vivo (280). Les SSO qui sont constitués d'une seule et même molécule d'ADN modifiée sont donc de meilleurs candidats pour le développement de thérapies in vivo de par leur plus grande facilité d'administration et le bénéfice de plusieurs dizaines d'années de recherches sur les différents moyens d'administration cellulaire et tissulaire (217,218).

La technologie d'inhibition de l'expression génique par SSO représente donc une bonne piste pour la mise au point de thérapie in vivo comparées aux autres techniques comme les ASO RNase H-dépendant, les ARN interférents ou encore CRISPR-Cas. Cependant elle aussi possède ses limites pour de potentielles applications thérapeutiques car les technologies d'administration spécifiques ne sont à ce jour que peu nombreuses. De plus, une autre limite inhérente à la technique par FSD-NMD est que cette approche exclut les gènes ne possédant aucun exon non multiple de trois ou un nombre d'exons trop faible, bien que d'autres modulations de l'épissage pourraient être utilisées pour outrepasser cette barrière, comme l'induction d'un 3'SS ou d'un 5'SS alternatif induisant un décalage du cadre de lecture. Nous avons néanmoins montré que cette technique est applicable dans les cellules B et les plasmocytes et peut être utilisée afin d'inhiber l'expression génique de manière efficace dans ce type cellulaire. Les SSO vivo-morpholino sont facilement utilisables dans des modèles ex vivo et in vitro et ne nécessitent pas de transfection, ce qui est intéressant pour éviter la mortalité lors de cette dernière.

Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis d'explorer trois utilisations différentes des oligonucléotides antisens (ASO). Premièrement, la modulation de la polyadénylation des transcrits d'immunoglobulines peut être réalisé à l'aide d'ASO afin de diminuer l'expression d'Ig sécrétée et favoriser l'expression d'Ig membranaire ou de diminuer l'expression d'Ig membranaire (BCR). Cette première piste, objet de la publication d'un brevet, s'avère prometteuse dans l'allergie où j'ai pu démontrer l'efficacité d'un ASO ciblant le site de polyadénylation encodant la forme sécrétée (PAS) de l'IgE pour diminuer significativement la sécrétion d'IgE tout en promouvant l'apoptose des cellules productrices d'IgE grâce à la réexpression du BCR. Un ASO ciblant le site de polyadénylation encodant la forme membranaire d'Ig (PAM) est également efficace pour réduire l'expression des Ig membranaire comme des résultats préliminaires avec un ASO spécifique du PAM de l'IgA humaine ont pu le montrer. Un deuxième projet a révélé l'importance de l'utilisation du site donneur constitutif des exons I dans l'épissage des transcrits germinaux d'Ig (GLT) pour réaliser la commutation de classe des immunoglobulines (CSR) grâce à l'utilisation d'un ASO masquant le site donneur d'épissage d'un exon I. Cette méthode a permis le découplage de la transcription et de l'épissage des transcrits GLT afin de dévoiler le rôle de ces derniers dans le mécanisme de CSR. Et enfin, mes travaux ont aussi permis de mettre au point une technique d'inhibition de l'expression génique à l'aide d'un ASO modulant l'épissage (SSO). Un SSO peut masquer un site donneur ou accepteur d'épissage d'un exon non multiple de 3 au sein d'un pré-ARNm afin d'induire un saut d'exon lors de l'épissage. Le transcrit résultant possèdera un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré (PTC), le rendant sensible à la dégradation par « nonsense-mediated mRNA decay » (NMD) ou étant traduit en une protéine incomplète, incapable d'assurer ses fonctions.

Le premier projet portant sur IgE a révélé le potentiel thérapeutique de notre ASO ciblant le PAS des IgE cependant bien que cette stratégie se soit avérée très efficace *in vitro* pour diminuer les IgE sécrétées et pour provoquer l'apoptose des cellules réexprimant le BCR IgE, il faudrait vérifier son efficacité *in vivo*. Le ligand « vivo » dendrimère d'octaguanidine que nous avons utilisé jusqu'alors est connu pour être toxique chez l'homme, ce qui nécessiterait de réaliser des expériences *in vivo* avec un ASO morpholino couplé à autre vecteur, véhicule ou ligand. Parmi toutes les stratégies possibles, un origami ADN portant un ligand ADN ou ARN aussi appelé « aptamer », spécifique d'un marqueur des cellules B ou des plasmocytes tels que le CD20 ou le CD38 respectivement, permettrait un ciblage spécifique des cellules d'intérêt. Des aptamers pour le marqueur CD20 (281) et CD38 (282) ont déjà été développés et pourraient être intégrés à des technologies origami ADN telles que celle décrite par Pan et al (283) permettant la délivrance de deux ASO et de doxorubicine grâce à un aptamer spécifique de MUC1, une protéine surexprimée à la surface des cellules cancéreuses. On pourrait également imaginer coupler cet ASO spécifique d'IgE à un anticorps monoclonal comme le rituximab (anti-CD20) ou le daratumumab (anti-CD38) pour une administration systémique et ciblée, cette stratégie s'étant déjà avérée efficace pour un ASO anti MXD3 couplé à un anticorps monoclonal anti-CD22 (225).

D'autre part, des gènes dont la polyadénylation est altérée dans la CLL, dont ceux présentant une utilisation préférentielle du PAS intronique, pourraient bénéficier d'une thérapie ASO. En effet, les gènes suppresseurs de tumeur *DICER* et *FOXN3* voient leur fonction altérée tandis que les gènes *CARD11*, *MGA* et *CHTS11* acquièrent une fonction oncogénique lors la

polyadénylation intronique dans la CLL (284). Ce type d'anomalie touche probablement d'autres syndromes lymphoprolifératifs que la CLL.

Nos travaux à l'aide d'ASO ciblant l'épissage des transcrits GLT ont permis de montrer que l'épissage était bien important dans la CSR, indépendamment de la transcription. Cependant nos travaux n'ont pas permis d'explorer finement les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la CSR consécutive à un traitement ASO. Ainsi, l'inhibition de l'épissage provoqué par les ASO ciblant le site donneur d'épissage des exons I a pu affecter la CSR en diminuant la quantité de lasso de switch généré, ce qui mécaniquement a généré moins de structure en G4 après débranchement par DBR1 et donc moins de recrutement d'AID. Il serait également intéressant d'étudier si l'inhibition de l'épissage des transcrits GLT en provoquant l'accumulation de transcrits non épissés pourraient avoir eu un effet inhibiteur de type lncRNA. Cette hypothèse pourrait être explorée en induisant l'expression ectopique de transcrits GLT non épissés pour vérifier leur effet sur la CSR en absence de traitement ASO. Pour cela, des transfections pourraient être réalisées dans la lignée murine CH12 capable de réaliser la CSR vers IgA (285). Enfin, il est également envisageable que l'appariement de l'ASO au niveau du site d'épissage des GLT ait empêché la fixation d'une protéine recrutant directement AID.

Notre méthode de design d'ASO pour inhiber l'expression génique s'est avérée efficace pour les gènes *REL* et *RELA*. Nos résultats ont montré que l'inhibition de c-Rel serait intéressante à étudier dans le cadre du DLBCL et des expériences complémentaires sur des cellules de patients pourraient être réalisées. Pour la même raison, l'inhibition de *RELA* pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans le DLBCL, comme l'a montré l'étude de Zheng et collègues (286). Notre modèle d'inhibition de *RELA* n'ayant pas induit d'augmentation de l'apoptose à lui seul, il permet peut-être d'augmenter la sensibilité à certains médicaments actuellement utilisés dans la prise en charge du DLBCL comme la doxorubicine qui fait partie de la thérapie R-CHOP (pour rituximab-cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) par exemple (287). De même, il serait intéressant de mettre en évidence l'efficacité du NMD sur le transcrit *RELA* sans exon 5 qui n'a pas pu être mise en évidence par RT-PCR. Les ASOs actuellement designés à l'aide du pipeline (pour le laboratoire CRIBL ou en collaboration avec d'autres équipes de recherche) se sont révélés efficaces pour réaliser une inhibition de l'expression génique dans 5 cas sur 7. Les deux ASO non concluants ont provoqué dans un cas un épissage alternatif de type intron rétention qui a rétabli le cadre de lecture, et dans l'autre cas l'apparition d'une isoforme protéique dont nous n'avons pas réussi à identifier l'origine. Afin d'augmenter les chances d'obtention de saut d'exon par ASO, le ciblage des sites ESE et ISE pourrait être utilisé à la place des sites d'épissage. En effet cibler les sites d'épissage résulte en un plus grand risque d'utilisation de sites cryptiques en 3' ou en 5' et masquer les séquences activatrices d'épissage pourrait améliorer les chances de succès dans l'induction d'un saut d'exon complet. Il serait aussi intéressant de compléter les résultats obtenus avec *REL* en vérifiant si cette technique d'inhibition est efficace sur d'autres gènes très fortement exprimés.

De manière générale, une analyse transcriptomique des effets de nos ASO sur cellules uniques ("single cell RNA-seq") permettrait également nous éclairer sur leur fonctionnement, par exemple en vérifiant si cet effet est hétérogène ou non entre les cellules ou encore si nos ASO de chimie vivo-morpholino ont une plus grande efficacité sur certains sous types de cellules B plutôt que d'autres. L'effet de l'ASO en fonction du cycle cellulaire pourrait également être étudié. Le cycle cellulaire pourrait en effet diluer les ASO délivrés aux cellules en division au cours du temps, ce qui rendrait le traitement moins efficace.

Ces résultats ont révélé l'intérêt de la modulation de l'épissage et de la polyadénylation par ASO pour un traitement des syndromes lymphoprolifératifs et des maladies liées à la lignée lymphoïde B. En effet, les ASO sont de bons outils pour diminuer la production d'une forme d'Ig donnée, soit sécrétée ou membranaire au niveau post-transcriptionnel et pourraient venir compléter les nouvelles thérapies à cible protéiques comme les anticorps monoclonaux, qui ne peuvent à ce jour pas agir sur les protéines intracellulaires et possèdent un champ d'application limité. Les SSO peuvent également être utilisés pour induire une inhibition de l'expression génique sans utiliser de machinerie de dégradation de l'ARN telles que la RNase H1 ou RISC/Ago2, limitant ainsi le risque d'effets « off target » par rapport à d'autres technologies de dégradation de l'ARN comme les ASO « gapmers » dépendants de la RNase H1 et les siRNA. De plus, ils constituent une alternative de choix par rapport à d'autres techniques de modification ADN telles que CRISPR-Cas, qui peuvent soulever des problèmes éthiques aussi bien que de sûreté et sont plus envisageables pour une application clinique.

Bien que les approches ASO soient prometteuses pour le développement de nouvelles thérapies elles possèdent cependant leurs limites, le plus grand défi actuel étant leur délivrance in vivo aussi bien au niveau cellulaire que tissulaire. La recherche en biochimie a permis de nouvelles avancées dans le domaine des conjugués et des vecteurs d'ASO et pourrait à terme favoriser l'émergence de nouveaux médicaments à base d'ASO dont la délivrance locale ou tissu spécifique permettra d'éviter de nombreux effets secondaires et d'atteindre des types cellulaires jusque-là non exploités. Au-delà des technologies ASO, ces avancées pourraient bénéficier aux autres stratégies de modulation génique comme les ARN interférents et CRISPR-Cas. Même si ces améliorations de biodistribution donnent de nombreux espoirs dans le traitement de maladies sans option thérapeutique à ce jour, ces prouesses technologiques ne doivent cependant pas faire oublier les limites bioéthiques.

Références bibliographiques

1. Sentenac A. Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Crit Rev Biochem.* 1985;18(1):31–90.
2. Stillman B. Histone Modifications: Insights into Their Influence on Gene Expression. *Cell.* 2018 Sep 20;175(1):6–9.
3. Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 2016 Jan 1;32(1):42–56.
4. Koyama M, Kurumizaka H. Structural diversity of the nucleosome. *J Biochem (Tokyo).* 2018 Feb 1;163(2):85–95.
5. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007 May 18;129(4):823–37.
6. Müller F, Tora L. Chromatin and DNA sequences in defining promoters for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech.* 2014 Mar 1;1839(3):118–28.
7. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011 May 15;25(10):1010–22.
8. Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Feb 18;16(3):nrm3952.
9. Harlen KM, Churchman LS. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Apr;18(4):263–73.
10. Ehara H, Yokoyama T, Shigematsu H, Yokoyama S, Shirouzu M, Sekine S. Structure of the complete elongation complex of RNA polymerase II with basal factors. *Science.* 2017 Sep 1;357(6354):921–4.
11. Core L, Adelman K. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: a nexus of gene regulation. *Genes Dev.* 2019 Jan 8;33(15–16):960–82.
12. Cramer P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature.* 2019 Sep;573(7772):45–54.
13. Saintamand A, Ghazzaoui N, Issaoui H, Denizot Y. 3'RR - Docteur Jekyll et Mister Hyde de la lymphopoïèse/lymphomagenèse B. médecine/sciences. 2017 Nov 1;33(11):963–70.
14. Soutourina J. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Apr;19(4):262–74.
15. Parua PK, Booth GT, Sansó M, Benjamin B, Tanny JC, Lis JT, et al. A Cdk9–PP1 switch regulates the elongation–termination transition of RNA polymerase II. *Nature.* 2018 Jun;558(7710):460–4.
16. Proudfoot NJ. Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut. *Science [Internet].* 2016 Jun 10 [cited 2020 Mar 25];352(6291). Available from: <https://science.sciencemag.org/content/352/6291/aad9926>

17. Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018 Jan;18(1):5–18.
18. Saldi T, Cortazar MA, Sheridan RM, Bentley DL. Coupling of RNA Polymerase II Transcription Elongation with Pre-mRNA Splicing. *J Mol Biol*. 2016 Jun 19;428(12):2623–35.
19. Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:291–323.
20. Zhang L, Vielle A, Espinosa S, Zhao R. RNAs in the spliceosome: Insight from cryoEM structures. *WIREs RNA*. 2019;10(3):e1523.
21. Schneider M, Will CL, Anokhina M, Tazi J, Urlaub H, Lührmann R. Exon Definition Complexes Contain the Tri-snRNP and Can Be Directly Converted into B-like Precatalytic Splicing Complexes. *Mol Cell*. 2010 Apr 23;38(2):223–35.
22. Li X, Liu S, Zhang L, Issaian A, Hill RC, Espinosa S, et al. A unified mechanism for intron and exon definition and back-splicing. *Nature*. 2019 Sep;573(7774):375–80.
23. Mokry M, Feitsma H, Nijman IJ, de Bruijn E, van der Zaag PJ, Guryev V, et al. Accurate SNP and mutation detection by targeted custom microarray-based genomic enrichment of short-fragment sequencing libraries. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jun 1;38(10):e116–e116.
24. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*. 2013 Feb;19(2):141–57.
25. Li X, Yang L, Chen L-L. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs. *Mol Cell*. 2018 Aug 2;71(3):428–42.
26. Salzman J. Circular RNA Expression: Its Potential Regulation and Function. *Trends Genet*. 2016 May 1;32(5):309–16.
27. Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Jul;18(7):437–51.
28. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct;431(7011):931–45.
29. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012 Sep;489(7414):101–8.
30. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1413–5.
31. Park E, Pan Z, Zhang Z, Lin L, Xing Y. The Expanding Landscape of Alternative Splicing Variation in Human Populations. *Am J Hum Genet*. 2018 Jan 4;102(1):11–26.
32. Montes M, Sanford BL, Comiskey DF, Chandler DS. RNA Splicing and Disease: Animal Models to Therapies. *Trends Genet*. 2019 Jan 1;35(1):68–87.
33. Robert C, Watson M. The incredible complexity of RNA splicing. *Genome Biol*. 2016 Dec 30;17(1):265.

34. Hoyos LE, Abdel-Wahab O. Cancer-Specific Splicing Changes and the Potential for Splicing-Derived Neoantigens. *Cancer Cell*. 2018 Aug 13;34(2):181–3.
35. Urbanski LM, Leclair N, Anczuków O. Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *WIREs RNA*. 2018;9(4):e1476.
36. Tian B, Manley JL. Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it. *Trends Biochem Sci*. 2013 Jun;38(6):312–20.
37. Elkon R, Ugalde AP, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet*. 2013 Jul;14(7):496–506.
38. Laffleur B, Debeaupuis O, Dalloul Z, Cogné M. B Cell Intrinsic Mechanisms Constraining IgE Memory. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Nov 13 [cited 2017 Dec 5];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5694035/>
39. Laffleur B, Duchez S, Tarte K, Denis-Lagache N, Péron S, Carrion C, et al. Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression. *Cell Rep*. 2015 Feb 17;10(6):900–9.
40. Nicholson AL, Pasquinelli AE. Tales of Detailed Poly(A) Tails. *Trends Cell Biol*. 2019 Mar 1;29(3):191–200.
41. Tian B, Manley JL. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Jan;18(1):18–30.
42. Gruber AJ, Zavolan M. Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease. *Nat Rev Genet*. 2019 Oct;20(10):599–614.
43. Takagaki Y, Seipelt RL, Peterson ML, Manley JL. The Polyadenylation Factor CstF-64 Regulates Alternative Processing of IgM Heavy Chain Pre-mRNA during B Cell Differentiation. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):941–52.
44. Singh I, Lee S-H, Sperling AS, Samur MK, Tai Y-T, Fulciniti M, et al. Widespread intronic polyadenylation diversifies immune cell transcriptomes. *Nat Commun*. 2018 Apr 30;9(1):1–16.
45. Wickramasinghe VO, Laskey RA. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Jul;16(7):431–42.
46. Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 03;10(12).
47. Hellen CUT. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 01;10(10).
48. Dever TE, Green R. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jan 7;4(7):a013706.
49. Reid DW, Nicchitta CV. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Mar 4;16(4):nrm3958.
50. Peck SA, Hughes KD, Victorino JF, Mosley AL. Writing a wrong: Coupled RNA polymerase II transcription and RNA quality control. *WIREs RNA*. 2019;10(4):e1529.

51. Puno MR, Weick E-M, Das M, Lima CD. SnapShot: The RNA Exosome. *Cell*. 2019 Sep 19;179(1):282-282.e1.
52. Durand S, Lykke-Andersen J. SnapShot: Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Cell*. 2011 Apr 15;145(2):324-324.e2.
53. Hug N, Longman D, Cáceres JF. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res*. 2016 Feb 29;44(4):1483–95.
54. Simms CL, Thomas EN, Zaher HS. Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *WIREs RNA*. 2017;8(1):e1366.
55. Harigaya Y, Parker R. No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *WIREs RNA*. 2010;1(1):132–41.
56. Karamyshev AL, Karamysheva ZN. Lost in Translation: Ribosome-Associated mRNA and Protein Quality Controls. *Front Genet* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 1];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00431/full>
57. Sanchez P, Rueff-juy D, Boudinot P, Hachemi-rachedi S, Cazenave P-A. The λ B Cell Repertoire of K-Deficient Mice. *Int Rev Immunol*. 1996 Jan 1;13(4):357–68.
58. IMGT Repertoire - Locus representation: House mouse (*Mus musculus*) IGH [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=mouse&group=IGH>
59. IMGT Repertoire - Locus representation: House mouse (*Mus musculus*) IGK [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=mouse&group=IGK>
60. IMGT Repertoire - Locus representation: House mouse (*Mus musculus*) IGL [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=mouse&group=IGL>
61. IMGT Repertoire - Locus representation: Human (*Homo sapiens*) IGH [Internet]. [cited 2020 Apr 7]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=IGH>
62. IMGT Repertoire - Locus representation: Human (*Homo sapiens*) IGK [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=IGK>
63. IMGT Repertoire - Locus representation: Human (*Homo sapiens*) IGL [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=IGL>
64. Roy AL, Sen R, Roeder RG. Enhancer–promoter communication and transcriptional regulation of *Igh*. *Trends Immunol*. 2011 Nov 1;32(11):532–9.

65. Hewitt SL, Farmer D, Marszalek K, Cadera E, Liang H-E, Xu Y, et al. Association between the Igk and Igh immunoglobulin loci mediated by the 3' Igk enhancer induces "decontraction" of the Igh locus in pre-B cells. *Nat Immunol.* 2008 Apr;9(4):396–404.
66. Haque SFY, Bevington SL, Boyes J. The E λ 3–1 enhancer is essential for V(D)J recombination of the murine immunoglobulin lambda light chain locus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 15;441(2):482–7.
67. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, et al. Chapter 2 - The IgH Locus 3' Regulatory Region: Pulling the Strings from Behind. In: Alt FW, Austen KF, Honj T, Melchers F, Uhr JW, Unanue ER, editors. *Advances in Immunology* [Internet]. Academic Press; 2011 [cited 2020 Apr 9]. p. 27–70. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123876638000028>
68. Dunn-Walters D, Townsend C, Sinclair E, Stewart A. Immunoglobulin gene analysis as a tool for investigating human immune responses. *Immunol Rev.* 2018;284(1):132–47.
69. Teng G, Schatz DG. Chapter One - Regulation and Evolution of the RAG Recombinase. In: Murre C, editor. *Advances in Immunology* [Internet]. Academic Press; 2015 [cited 2020 Apr 7]. p. 1–39. (Molecular Mechanisms that Orchestrate the Assembly of Antigen Receptor Loci; vol. 128). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277615000474>
70. Ru H, Zhang P, Wu H. Structural gymnastics of RAG-mediated DNA cleavage in V(D)J recombination. *Curr Opin Struct Biol.* 2018 Dec 1;53:178–86.
71. Lin SG, Ba Z, Alt FW, Zhang Y. Chapter Three - RAG Chromatin Scanning During V(D)J Recombination and Chromatin Loop Extrusion are Related Processes. In: Alt F, editor. *Advances in Immunology* [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2020 Apr 6]. p. 93–135. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277618300282>
72. Outters P, Jaeger S, Zaarour N, Ferrier P. Chapter Eight - Long-Range Control of V(D)J Recombination & Allelic Exclusion: Modeling Views. In: Murre C, editor. *Advances in Immunology* [Internet]. Academic Press; 2015 [cited 2020 Apr 8]. p. 363–413. (Molecular Mechanisms that Orchestrate the Assembly of Antigen Receptor Loci; vol. 128). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006527761500053X>
73. Vettermann C, Schlissel MS. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol Rev.* 2010;237(1):22–42.
74. Mostoslavsky R, Singh N, Tenzen T, Goldmit M, Gabay C, Elizur S, et al. Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature.* 2001 Nov;414(6860):221–5.
75. Alves-Pereira CF, de Freitas R, Lopes T, Gardner R, Marta F, Vieira P, et al. Independent recruitment of Igh alleles in V(D)J recombination. *Nat Commun.* 2014 Dec 17;5:5623.
76. Bergman Y, Cedar H. A stepwise epigenetic process controls immunoglobulin allelic exclusion. *Nat Rev Immunol.* 2004 Oct;4(10):753–61.
77. Brady BL, Steinel NC, Bassing CH. Antigen Receptor Allelic Exclusion: An Update and Reappraisal. *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):3801–8.

78. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu Rev Biochem.* 2007;76(1):1–22.
79. Methot SP, Di Noia JM. Chapter Two - Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. In: Alt FW, editor. *Advances in Immunology* [Internet]. Academic Press; 2017 [cited 2020 Apr 13]. p. 37–87. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277616300530>
80. Yu K, Lieber MR. Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2019 Jul 4;54(4):333–51.
81. Zarrin AA, Tian M, Wang J, Borjeson T, Alt FW. Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 Feb 15;102(7):2466–70.
82. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jun 25;12(7):517–31.
83. Zheng S, Vuong BQ, Vaidyanathan B, Lin J-Y, Huang F-T, Chaudhuri J. Non-coding RNA Generated following Lariat Debranching Mediates Targeting of AID to DNA. *Cell.* 2015 May 7;161(4):762–73.
84. Ribeiro de Almeida C, Dhir S, Dhir A, Moghaddam AE, Sattentau Q, Meinhart A, et al. RNA Helicase DDX1 Converts RNA G-Quadruplex Structures into R-Loops to Promote IgH Class Switch Recombination. *Mol Cell.* 2018 May 17;70(4):650-662.e8.
85. Basu U, Meng F-L, Keim C, Grinstein V, Pefanis E, Eccleston J, et al. The RNA Exosome Targets the AID Cytidine Deaminase to Both Strands of Transcribed Duplex DNA Substrates. *Cell.* 2011 Feb 4;144(3):353–63.
86. Lorenz M, Jung S, Radbruch A. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science.* 1995 Mar 24;267(5205):1825–8.
87. Nowak U, Matthews AJ, Zheng S, Chaudhuri J. The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat Immunol.* 2011 Feb;12(2):160–6.
88. Conticello SG, Ganesh K, Xue K, Lu M, Rada C, Neuberger MS. Interaction between Antibody-Diversification Enzyme AID and Spliceosome-Associated Factor CTNNB1. *Mol Cell.* 2008 Aug 22;31(4):474–84.
89. Stavnezer J, Schrader CE. Ig heavy chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2014 Dec 1;193(11):5370–8.
90. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:261–92.
91. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jan;15(1):7–18.
92. Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest.* 2015 Jun 1;125(6):2203–10.

93. Winkler TH, Mårtensson I-L. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 2];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02423/full>
94. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2017 May;17(5):281–94.
95. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar;15(3):160–71.
96. Baumgarth N. A Hard(y) Look at B-1 Cell Development and Function. *J Immunol*. 2017 Nov 15;199(10):3387–94.
97. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016 Sep 20;45(3):471–82.
98. Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, et al. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity*. 2019 Aug 20;51(2):337-350.e7.
99. Flemming A. Class-switch recombination revised. *Nat Rev Immunol*. 2019 Oct;19(10):596–7.
100. Johansson SGO, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56(9):813–24.
101. Rajan TV. The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*. 2003 Jul 1;24(7):376–9.
102. Han H, Roan F, Ziegler SF. The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. *Immunol Rev*. 2017;278(1):116–30.
103. Camelo A, Rosignoli G, Ohne Y, Stewart RA, Overed-Sayer C, Sleeman MA, et al. IL-33, IL-25, and TSLP induce a distinct phenotypic and activation profile in human type 2 innate lymphoid cells. *Blood Adv*. 2017 Apr 11;1(10):577–89.
104. Murakami-Satsutani N, Ito T, Nakanishi T, Inagaki N, Tanaka A, Vien PTX, et al. IL-33 Promotes the Induction and Maintenance of Th2 Immune Responses by Enhancing the Function of OX40 Ligand. *Allergol Int*. 2014 Jan 1;63(3):443–55.
105. Kumar A, Rani L, Mhaske ST, Pote ST, Behera S, Mishra GC, et al. IL-3 Receptor Expression on Activated Human Th Cells Is Regulated by IL-4, and IL-3 Synergizes with IL-4 to Enhance Th2 Cell Differentiation. *J Immunol*. 2020 Feb 15;204(4):819–31.
106. Prout MS, Kyle RL, Ronchese F, Le Gros G. IL-4 Is a Key Requirement for IL-4- and IL-4/IL-13-Expressing CD4 Th2 Subsets in Lung and Skin. *Front Immunol*. 2018;9:1211.
107. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 16];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00888/full>
108. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev*. 2017;278(1):162–72.

109. Turqueti-Neves A, Otte M, Schwartz C, Schmitt MER, Lindner C, Pabst O, et al. The Extracellular Domains of IgG1 and T Cell-Derived IL-4/IL-13 Are Critical for the Polyclonal Memory IgE Response In Vivo. *PLOS Biol.* 2015 Nov 2;13(11):e1002290.
110. Kubo M. Mast cells and basophils in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2018 Oct 1;54:74–9.
111. Acharya M, Borland G, Edkins AL, MacLellan LM, Matheson J, Ozanne BW, et al. CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(1):12–23.
112. Noval Rivas M, Chatila TA. Regulatory T cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Sep 1;138(3):639–52.
113. Angkasekwinai P. Th9 Cells in Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019 Mar 26;19(5):29.
114. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, et al. Platelet-Activating Factor, PAF Acetylhydrolase, and Severe Anaphylaxis [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa070030>. Massachusetts Medical Society; 2009 [cited 2020 Apr 16]. Available from: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa070030?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
115. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2016 Dec;16(12):751–65.
116. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Dec 1;126(6, Supplement):S1–58.
117. Wasserbauer N, Ballou M. Atopic Dermatitis. *Am J Med.* 2009 Feb 1;122(2):121–5.
118. Wheatley LM, Togias A. Allergic Rhinitis. *N Engl J Med.* 2015 Jan 29;372(5):456–63.
119. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *The Lancet.* 2013 Oct 19;382(9901):1360–72.
120. Wu A, Sur S, Grant J, Tripple J. Interleukin-4/interleukin-13 versus interleukin-5: a comparison of molecular targets in biologic therapy for the treatment of severe asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2019 Feb;19(1):30–7.
121. Kawakami T, Blank U. From IgE to Omalizumab. *J Immunol.* 2016 Dec 1;197(11):4187–92.
122. Maurer M, Altrichter S, Schmetzer O, Scheffel J, Church MK, Metz M. Immunoglobulin E-Mediated Autoimmunity. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 4];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00689/full>
123. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med.* 2001 Aug;7(8):899–905.
124. Lebowitz B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. *The Lancet.* 2018 Jan 6;391(10115):70–81.
125. Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. *N Engl J Med.* 2016 Oct 20;375(16):1552–65.

126. Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N. Vitiligo. *The Lancet*. 2015 Jul 4;386(9988):74–84.
127. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *The Lancet*. 2019 Sep 7;394(10201):882–94.
128. Rollino C, Vischini G, Coppo R. IgA nephropathy and infections. *J Nephrol*. 2016 Aug 1;29(4):463–8.
129. Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet*. 2014 Nov 22;384(9957):1878–88.
130. Kiriakidou M, Cotton D, Taichman D, Williams S. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med*. 2013 Oct 1;159(7):ITC4-1.
131. Wang Y, Lloyd KA, Melas I, Zhou D, Thyagarajan R, Lindqvist J, et al. Rheumatoid arthritis patients display B-cell dysregulation already in the naïve repertoire consistent with defects in B-cell tolerance. *Sci Rep*. 2019 Dec 27;9(1):1–13.
132. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2016 Oct 22;388(10055):2023–38.
133. Mahajan VS, Mattoo H, Deshpande V, Pillai SS, Stone JH. IgG4-Related Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9(1):315–47.
134. Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *The Lancet*. 2017 Apr 29;389(10080):1741–55.
135. Roberts ISD. Pathology of IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Aug;10(8):445–54.
136. Wehbi B, Oblet C, Boyer F, Huard A, Druilhe A, Paraf F, et al. Mesangial Deposition Can Strongly Involve Innate-Like IgA Molecules Lacking Affinity Maturation. *J Am Soc Nephrol*. 2019 Jul 1;30(7):1238–49.
137. Chang S, Li X-K. The Role of Immune Modulation in Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Front Med [Internet]*. 2020 [cited 2020 May 26];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.00092/full>
138. Sparks JA. Rheumatoid Arthritis. *Ann Intern Med*. 2019 01;170(1):ITC1–16.
139. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90.
140. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015 Oct 15;373(16):1541–52.
141. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. 2018 Apr 14;391(10129):1524–37.
142. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Nov;16(11):684–701.
143. Mottok A, Steidl C. Biology of classical Hodgkin lymphoma: implications for prognosis and novel therapies. *Blood*. 2018 Apr 12;131(15):1654–65.

144. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma—treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Jan;11(1):12–23.
145. Kahl BS, Yang DT. Follicular lymphoma: evolving therapeutic strategies. *Blood*. 2016 Apr 28;127(17):2055–63.
146. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 2015 Aug;21(8):922–6.
147. Bartlett NL, Costello BA, LaPlant BR, Ansell SM, Kuruvilla JG, Reeder CB, et al. Single-agent ibrutinib in relapsed or refractory follicular lymphoma: a phase 2 consortium trial. *Blood*. 2018 11;131(2):182–90.
148. Dimopoulos MA, Kastiris E. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2019 Dec 5;134(23):2022–35.
149. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):296–303.
150. Brito JLR, Walker B, Jenner M, Dickens NJ, Brown NJM, Ross FM, et al. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2009 Jan;94(1):78–86.
151. Pawlyn C, Davies FE. Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood*. 2019 Feb 14;133(7):660–75.
152. Mouhieddine TH, Weeks LD, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2019 Jun 6;133(23):2484–94.
153. Sethi S, Rajkumar SV, D'Agati VD. The Complexity and Heterogeneity of Monoclonal Immunoglobulin–Associated Renal Diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Jul 1;29(7):1810–23.
154. Kastiris E, Dimopoulos MA. Recent advances in the management of AL Amyloidosis. *Br J Haematol*. 2016;172(2):170–86.
155. Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Jan;75(1):285–8.
156. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science*. 1999 Oct 29;286(5441):950–2.
157. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–21.
158. Kurreck J, Wyszko E, Gillen C, Erdmann VA. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 1;30(9):1911–8.
159. Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2017 Mar;35(3):238–48.

160. Goyenvalle A, Griffith G, Babbs A, Andaloussi SE, Ezzat K, Avril A, et al. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat Med*. 2015 Mar;21(3):270–5.
161. Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995 Apr;374(6522):546–9.
162. Agrawal S, Tamsamani J, Tang JY. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1;88(17):7595–9.
163. Srinivasan SK, Tewary HK, Iversen PL. Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res Dev*. 1995;5(2):131–9.
164. Juliano RL, Carver K. Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Jun 29;87:35–45.
165. Juliano R I. Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Don't. *Nucleic Acid Ther*. 2018 Apr 30;28(3):166–77.
166. Chi X, Gatti P, Papoian T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. *Drug Discov Today*. 2017 May 1;22(5):823–33.
167. Iwamoto N, Butler DCD, Svrzikapa N, Mohapatra S, Zlatev I, Sah DWY, et al. Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2017 Aug 21 [cited 2017 Sep 7];advance online publication. Available from: <http://www.nature.com/nbt/journal/vaop/ncurrent/full/nbt.3948.html?foxtrotcallback=true>
168. Manoharan M. 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr*. 1999 Dec 10;1489(1):117–30.
169. Shen W, Liang X, Sun H, Crooke ST. 2'-Fluoro-modified phosphorothioate oligonucleotide can cause rapid degradation of P54nrb and PSF. *Nucleic Acids Res*. 2015 May 19;43(9):4569–78.
170. Shen W, De Hoyos CL, Sun H, Vickers TA, Liang X, Crooke ST. Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5–10–5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018 Mar 16;46(5):2204–17.
171. Janas MM, Jiang Y, Schlegel MK, Waldron S, Kuchimanchi S, Barros SA. Impact of Oligonucleotide Structure, Chemistry, and Delivery Method on In Vitro Cytotoxicity. *Nucleic Acid Ther*. 2016 Dec 6;27(1):11–22.
172. Hagedorn PH, Persson R, Funder ED, Albæk N, Diemer SL, Hansen DJ, et al. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discov Today*. 2018 Jan 1;23(1):101–14.
173. Smith CIE, Zain R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2019;59(1):605–30.

174. Aupy P, Echevarría L, Relizani K, Goyenville A. The Use of Tricyclo-DNA Oligomers for the Treatment of Genetic Disorders. *Biomedicines*. 2017 Dec 22;6(1):2.
175. Walder JA, Walder RY. Nucleic acid hybridization and amplification method for detection of specific sequences in which a complementary labeled nucleic acid probe is cleaved. *Univ Iowa Pat [Internet]*. 1995 Apr 4; Available from: <https://ir.uiowa.edu/patents/133>
176. Monia BP, Lesnik EA, Gonzalez C, Lima WF, McGee D, Guinasso CJ, et al. Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem*. 1993 Jul 5;268(19):14514–22.
177. Lima WF, Rose JB, Nichols JG, Wu H, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, et al. Human RNase H1 Discriminates between Subtle Variations in the Structure of the Heteroduplex Substrate. *Mol Pharmacol*. 2007 Jan 1;71(1):83–91.
178. Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, et al. 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. *The Lancet*. 2011 Aug 13;378(9791):595–605.
179. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997 Jun;7(3):187–95.
180. Summerton JE. Invention and Early History of Morpholinos: From Pipe Dream to Practical Products. In: Moulton HM, Moulton JD, editors. *Morpholino Oligomers: Methods and Protocols [Internet]*. New York, NY: Springer; 2017 [cited 2020 Apr 23]. p. 1–15. (Methods in Molecular Biology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6817-6_1
181. Bennett CF, Baker BF, Pham N, Swayze E, Geary RS. Pharmacology of Antisense Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2017 06;57:81–105.
182. Buchanan RM, Popowych Y, Arsic N, Townsend HGG, Mutwiri GK, Potter AA, et al. B-cell activating factor (BAFF) promotes CpG ODN-induced B cell activation and proliferation. *Cell Immunol*. 2011 Jan 1;271(1):16–28.
183. Krieg AM. CpG Still Rocks! Update on an Accidental Drug. *Nucleic Acid Ther*. 2012 Feb 21;22(2):77–89.
184. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu Rev Med*. 2019;70(1):307–21.
185. Crooke ST. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*. 2017 Apr 1;27(2):70–7.
186. Hyjek M, Figiel M, Nowotny M. RNases H: Structure and mechanism. *DNA Repair*. 2019 Dec 1;84:102672.
187. Lima WF, Murray HM, Damle SS, Hart CE, Hung G, De Hoyos CL, et al. Viable RNaseH1 knockout mice show RNaseH1 is essential for R loop processing, mitochondrial and liver function. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 20;44(11):5299–312.
188. Mello CC, Conte D. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004 Sep 1;431(7006):338–42.

189. Zhou W, Ding J, Liu J. Theranostic DNAzymes. *Theranostics*. 2017 Feb 23;7(4):1010–25.
190. Park SV, Yang J-S, Jo H, Kang B, Oh SS, Jung GY. Catalytic RNA, ribozyme, and its applications in synthetic biology. *Biotechnol Adv*. 2019 Dec 1;37(8):107452.
191. Boiziau C, Kurfurst R, Cazenave C, Roig V, Thuong NT, Toulmé J-J. Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism. *Nucleic Acids Res*. 1991 Mar 11;19(5):1113–9.
192. Beigel JH, Voell J, Muñoz P, Kumar P, Brooks KM, Zhang J, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of radavirsen (AVI-7100), an antisense oligonucleotide targeting influenza A M1/M2 translation. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(1):25–34.
193. Liang X, Sun H, Shen W, Wang S, Yao J, Migawa MT, et al. Antisense oligonucleotides targeting translation inhibitory elements in 5' UTRs can selectively increase protein levels. *Nucleic Acids Res*. 2017 Sep 19;45(16):9528–46.
194. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Mar;16(3):203–22.
195. Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res*. 2016 Aug 19;44(14):6549–63.
196. Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther*. 2017 May 3;25(5):1069–75.
197. Jacobson RD, Feldman EL. Antisense Oligonucleotides for Duchenne Muscular Dystrophy: Why No Neurologist Should Skip This. *JAMA Neurol*. 2016 Mar 1;73(3):259–60.
198. Corey DR. Nusinersen, an antisense oligonucleotide drug for spinal muscular atrophy. *Nat Neurosci*. 2017 Apr;20(4):497–9.
199. Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, Boyero-Corral S, Moreno-Castro C, El Yousfi Y, Suñé-Negre JM, et al. Targeting Splicing in the Treatment of Human Disease. *Genes*. 2017 Mar;8(3):87.
200. Lee SC-W, Abdel-Wahab O. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat Med*. 2016 Sep;22(9):976–86.
201. Wang L, Brooks AN, Fan J, Wan Y, Gambe R, Li S, et al. Transcriptomic Characterization of SF3B1 Mutation Reveals Its Pleiotropic Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2016 Nov 14;30(5):750–63.
202. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6239–46.
203. Jung H, Lee D, Lee J, Park D, Kim YJ, Park W-Y, et al. Intron retention is a widespread mechanism of tumor-suppressor inactivation. *Nat Genet*. 2015 Nov;47(11):1242–8.
204. Lee GD, Lee SE, Oh D-Y, Yu D, Jeong HM, Kim J, et al. MET Exon 14 Skipping Mutations in Lung Adenocarcinoma: Clinicopathologic Implications and Prognostic Values. *J Thorac Oncol*. 2017 Aug 1;12(8):1233–46.

205. Leeman JR, Weniger MA, Barth TF, Gilmore TD. Deletion analysis and alternative splicing define a transactivation inhibitory domain in human oncoprotein REL. *Oncogene*. 2008 Aug 11;27(53):6770–81.
206. Denichenko P, Mogilevsky M, Cléry A, Welte T, Biran J, Shimshon O, et al. Specific inhibition of splicing factor activity by decoy RNA oligonucleotides. *Nat Commun*. 2019 Apr 8;10(1):1–15.
207. Ward AJ, Norrbom M, Chun S, Bennett CF, Rigo F. Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2014 May 14;42(9):5871–9.
208. Zammarchi F, Stanchina E de, Bournazou E, Supakorndej T, Martires K, Riedel E, et al. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Oct 25;108(43):17779–84.
209. Liang X, Nichols JG, Hsu C-W, Vickers TA, Crooke ST. mRNA levels can be reduced by antisense oligonucleotides via no-go decay pathway. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 26;47(13):6900–16.
210. Nomakuchi TT, Rigo F, Aznarez I, Krainer AR. Antisense oligonucleotide-directed inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Biotechnol*. 2016 Feb;34(2):164–6.
211. Vickers TA, Wyatt JR, Burckin T, Bennett CF, Freier SM. Fully modified 2' MOE oligonucleotides redirect polyadenylation. *Nucleic Acids Res*. 2001 Mar 15;29(6):1293–9.
212. Vorlová S, Rocco G, LeFave CV, Jodelka FM, Hess K, Hastings ML, et al. Induction of Antagonistic Soluble Decoy Receptor Tyrosine Kinases by Intronic PolyA Activation. *Mol Cell*. 2011 Sep 16;43(6):927–39.
213. Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, et al. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*. 2010 Dec;468(7324):664–8.
214. Peterson ML. Immunoglobulin heavy chain gene regulation through polyadenylation and splicing competition. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011 Jan 1;2(1):92–105.
215. Peng Y, Yuan J, Zhang Z, Chang X. Cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) interacts with the RNA-binding protein hnRNPLL and thereby regulates immunoglobulin secretion in plasma cells. *J Biol Chem*. 2017 Jul 21;292(29):12285–95.
216. Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Jun 29;87:46–51.
217. Godfrey C, Desviat LR, Smedsrød B, Piétri-Rouxel F, Denti MA, Disterer P, et al. Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies. *EMBO Mol Med*. 2017 May;9(5):545–57.
218. Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2016 Aug 19;44(14):6518–48.
219. McClorey G, Banerjee S. Cell-Penetrating Peptides to Enhance Delivery of Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Biomedicines*. 2018 Jun;6(2):51.

220. Wu B, Moulton HM, Iversen PL, Jiang J, Li J, Li J, et al. Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):14814–9.
221. Betts C, Saleh AF, Arzumanov AA, Hammond SM, Godfrey C, Coursindel T, et al. Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012 Aug;1(8):e38.
222. Ferguson DP, Dangott LJ, Lightfoot JT. Lessons learned from vivo-morpholinos: How to avoid vivo-morpholino toxicity. *BioTechniques*. 2014 May 1;56(5):251–6.
223. Wang Y, Yu RZ, Henry S, Geary RS. Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology Considerations of GalNAc3-Conjugated Antisense Oligonucleotides. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019 Jun 3;15(6):475–85.
224. Cuellar TL, Barnes D, Nelson C, Tanguay J, Yu S-F, Wen X, et al. Systematic evaluation of antibody-mediated siRNA delivery using an industrial platform of THIOMAB–siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan 30;43(2):1189–203.
225. Satake N, Duong C, Yoshida S, Oestergaard M, Chen C, Peralta R, et al. Novel Targeted Therapy for Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Anti-CD22 Antibody-MXD3 Antisense Oligonucleotide Conjugate. *Mol Med*. 2016 Jul 22;22:632–42.
226. Craig K, Abrams M, Amiji M. Recent preclinical and clinical advances in oligonucleotide conjugates. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018 Jun 3;15(6):629–40.
227. Moss KH, Popova P, Hadrup SR, Astakhova K, Taskova M. Lipid Nanoparticles for Delivery of Therapeutic RNA Oligonucleotides. *Mol Pharm*. 2019 Jun 3;16(6):2265–77.
228. Mokhtarzadeh A, Vahidnezhad H, Youssefian L, Mosafer J, Baradaran B, Uitto J. Applications of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles as Delivery Systems. *Trends Mol Med*. 2019 Dec 1;25(12):1066–79.
229. Merkel OM, Kissel T. Quo vadis polyplex? *J Controlled Release*. 2014 Sep 28;190:415–23.
230. Goyenvalle A. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science*. 2004 Dec 3;306(5702):1796–9.
231. Denti MA, Rosa A, D'Antona G, Sthandier O, Angelis FGD, Nicoletti C, et al. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Mar 7;103(10):3758–63.
232. Linko V, Ora A, Kostianen MA. DNA Nanostructures as Smart Drug-Delivery Vehicles and Molecular Devices. *Trends Biotechnol*. 2015 Oct 1;33(10):586–94.
233. Li S, Jiang Q, Liu S, Zhang Y, Tian Y, Song C, et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. *Nat Biotechnol*. 2018 Mar;36(3):258–64.
234. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654–9.

235. Zhou Y, Zhou G, Tian C, Jiang W, Jin L, Zhang C, et al. Exosome-mediated small RNA delivery for gene therapy. *WIREs RNA*. 2016;7(6):758–71.
236. Bak A, Ashford M, Brayden DJ. Local delivery of macromolecules to treat diseases associated with the colon. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018 Nov 1;136–137:2–27.
237. Brand RM, Iversen PL. Transdermal delivery of antisense compounds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Oct 31;44(1):51–7.
238. Pinto D, Montani E, Bolli M, Garavaglia G, Sallusto F, Lanzavecchia A, et al. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood*. 2013 May 16;121(20):4110–4.
239. Donaldson GP, Ladinsky MS, Yu KB, Sanders JG, Yoo BB, Chou W-C, et al. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. *Science*. 2018 May 18;360(6390):795–800.
240. Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, Akdis M, Akdis CA. Il-10 producing T and B cells in allergy. *Semin Immunol*. 2019 Aug 1;44:101326.
241. Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T Regulatory-1 Cells Induce IgG4 Production by B Cells: Role of IL-10. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):4718–26.
242. He J-S, Subramaniam S, Narang V, Srinivasan K, Saunders SP, Carbajo D, et al. IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nat Commun*. 2017 Sep 21;8(1):641.
243. Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and FcγRIIb cross-linking. *J Clin Invest*. 2006 Mar 1;116(3):833–41.
244. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP, et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2013 Nov;74(5):637–47.
245. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>. Massachusetts Medical Society; 2017 [cited 2020 Jul 9]. Available from: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1702752?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0www.ncbi.nlm.nih.gov
246. Brown JR. How I treat CLL patients with ibrutinib. *Blood*. 2018 Jan 25;131(4):379–86.
247. Kondo K, Shaim H, Thompson PA, Burger JA, Keating M, Estrov Z, et al. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway. *Leukemia*. 2018 Apr;32(4):960–70.
248. Matthews AJ, Zheng S, DiMenna LJ, Chaudhuri J. Chapter One - Regulation of Immunoglobulin Class-Switch Recombination: Choreography of Noncoding Transcription, Targeted DNA Deamination, and Long-Range DNA Repair. In: Alt FW, editor. *Advances in Immunology* [Internet]. Academic Press; 2014 [cited 2020 Jul 10]. p. 1–57. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002674000018>

249. Ashi MO, Srour N, Lambert J-M, Marchalot A, Martin O, Le Noir S, et al. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell Mol Immunol*. 2019 Oct;16(10):810–9.
250. Hein K, Lorenz MGO, Siebenkotten G, Petry K, Christine R, Radbruch A. Processing of Switch Transcripts Is Required for Targeting of Antibody Class Switch Recombination. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2369–74.
251. Moabbi AM, Agarwal N, Kaderi BE, Ansari A. Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 May 29;109(22):8505–10.
252. Damgaard CK, Kahns S, Lykke-Andersen S, Nielsen AL, Jensen TH, Kjems J. A 5' Splice Site Enhances the Recruitment of Basal Transcription Initiation Factors In Vivo. *Mol Cell*. 2008 Feb 1;29(2):271–8.
253. Seidl KJ, Bottaro A, Vo A, Zhang J, Davidson L, Alt FW. An expressed neo(r) cassette provides required functions of the 1gamma2b exon for class switching. *Int Immunol*. 1998 Nov 1;10(11):1683–92.
254. Shaul O. How introns enhance gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017 Oct 1;91:145–55.
255. Dewaele M, Tabaglio T, Willekens K, Bezzi M, Teo SX, Low DHP, et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J Clin Invest*. 2016;126(1):68–84.
256. Bestas B, Moreno PMD, Blomberg KEM, Mohammad DK, Saleh AF, Sutlu T, et al. Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J Clin Invest*. 2014 Sep 2;124(9):4067–81.
257. Kuzin II, Ugine GD, Wu D, Young F, Chen J, Bottaro A. Normal Isotype Switching in B Cells Lacking the I μ Exon Splice Donor Site: Evidence for Multiple I μ -Like Germline Transcripts. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1451–7.
258. Ruminy P, Jardin F, Penther D, Picquenot J-M, Parmentier F, Buchonnet G, et al. Recurrent disruption of the I μ splice donor site in t(14;18) positive lymphomas: A potential molecular basis for aberrant downstream class switch recombination. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(8):735–44.
259. Stanlie A, Begum NA, Akiyama H, Honjo T. The DSIF Subunits Spt4 and Spt5 Have Distinct Roles at Various Phases of Immunoglobulin Class Switch Recombination. *PLOS Genet*. 2012 Apr 26;8(4):e1002675.
260. Chen J, Cai Z, Bai M, Yu X, Zhang C, Cao C, et al. The RNA-binding protein ROD1/PTBP3 cotranscriptionally defines AID-loading sites to mediate antibody class switch in mammalian genomes. *Cell Res*. 2018 Oct;28(10):981–95.
261. Hu W, Begum NA, Mondal S, Stanlie A, Honjo T. Identification of DNA cleavage- and recombination-specific hnRNP cofactors for activation-induced cytidine deaminase. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 May 5;112(18):5791–6.
262. Mondal S, Begum NA, Hu W, Honjo T. Functional requirements of AID's higher order structures and their interaction with RNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 2016 Mar 15;113(11):E1545–54.

263. Yuan J, Ma Y, Huang T, Chen Y, Peng Y, Li B, et al. Genetic Modulation of RNA Splicing with a CRISPR-Guided Cytidine Deaminase. *Mol Cell*. 2018 Oct 18;72(2):380-394.e7.
264. Shih T, De S, Barnes BJ. RNAi Transfection Optimized in Primary Naïve B Cells for the Targeted Analysis of Human Plasma Cell Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jul 23 [cited 2020 Aug 13];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6664017/>
265. Hung KL, Meitlis I, Hale M, Chen C-Y, Singh S, Jackson SW, et al. Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Mol Ther*. 2018 Feb 7;26(2):456–67.
266. Johnson MJ, Laoharawee K, Lahr WS, Webber BR, Moriarity BS. Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. *Sci Rep*. 2018 Aug 14;8(1):12144.
267. Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, et al. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(14):4527–35.
268. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*. 2003 Jun;21(6):635–7.
269. Suter SR, Sheu-Gruttadauria J, Schirle NT, Valenzuela R, Ball-Jones AA, Onizuka K, et al. Structure-Guided Control of siRNA Off-Target Effects. *J Am Chem Soc*. 2016 Jul 20;138(28):8667–9.
270. Scharner J, Ma WK, Zhang Q, Lin K-T, Rigo F, Bennett CF, et al. Hybridization-mediated off-target effects of splice-switching antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 24;48(2):802–16.
271. Grimm D, Wang L, Lee JS, Schürmann N, Gu S, Börner K, et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J Clin Invest*. 2010 Sep 1;120(9):3106–19.
272. Vickers TA, Crooke ST. The rates of the major steps in the molecular mechanism of RNase H1-dependent antisense oligonucleotide induced degradation of RNA. *Nucleic Acids Res*. 2015 Oct 15;43(18):8955–63.
273. Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*. 2009 Jun;27(6):549–55.
274. Tan-Wong SM, Dhir S, Proudfoot NJ. R-Loops Promote Antisense Transcription across the Mammalian Genome. *Mol Cell*. 2019 Nov 21;76(4):600-616.e6.
275. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28;346(6213):1258096.
276. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Aug;20(8):490–507.
277. Wang F, Wang L, Zou X, Duan S, Li Z, Deng Z, et al. Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. *Biotechnol Adv*. 2019 Sep 1;37(5):708–29.

278. Grünewald J, Zhou R, Garcia SP, Iyer S, Lareau CA, Aryee MJ, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*. 2019 May;569(7756):433–7.
279. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013 Sep;31(9):822–6.
280. Glass Z, Lee M, Li Y, Xu Q. Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. *Trends Biotechnol*. 2018 Feb 1;36(2):173–85.
281. Haghghi M, Khanahmad H, Palizban A. Selection and Characterization of Single-Stranded DNA Aptamers Binding Human B-Cell Surface Protein CD20 by Cell-SELEX. *Molecules*. 2018 Apr;23(4):715.
282. Wen J, Tao W, Hao S, Iyer SP, Zu Y. A unique aptamer-drug conjugate for targeted therapy of multiple myeloma. *Leukemia*. 2016 Apr;30(4):987–91.
283. Pan Q, Nie C, Hu Y, Yi J, Liu C, Zhang J, et al. Aptamer-Functionalized DNA Origami for Targeted Codelivery of Antisense Oligonucleotides and Doxorubicin to Enhance Therapy in Drug-Resistant Cancer Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 Jan 8;12(1):400–9.
284. Lee S-H, Singh I, Tisdale S, Abdel-Wahab O, Leslie CS, Mayr C. Widespread intronic polyadenylation inactivates tumor suppressor genes in leukemia. *Nature*. 2018 Sep;561(7721):127–31.
285. Nakamura M, Kondo S, Sugai M, Nazarea M, Imamura S, Honjo T. High frequency class switching of an IgM+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells. *Int Immunol*. 1996 Feb 1;8(2):193–201.
286. Zhang M, Xu-Monette ZY, Li L, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. RelA NF- κ B subunit activation as a therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma. *Aging*. 2016 Dec;8(12):3321.
287. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology (Phila)*. 2018 Jan 1;50(1):74–87.

Annexes

Annexe 1. Brevet « Methods for modulating immunoglobulin expression ».....	192
Annexe 2. Article : Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells	232
Annexe 3. Brevet « Use of splice switching oligonucleotides for exon skipping-mediated knockdown of NF- κ B components in B cells ».....	243

Annexe 1. Brevet « Methods for modulating immunoglobulin expression »

(inventors : Delpy Laurent, Marchalot Anne, Cogné Michel, Laffleur Brice)

1 -

METHODS FOR MODULATING IMMUNOGLOBULIN EXPRESSION

FIELD OF THE INVENTION:

5 The present invention is in the field of medicine, in particular immunology.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Immunoglobulins are molecules produced by activated B cells and plasma cells in response to exposure to antigens. There are five immunoglobulin classes (isotypes) of antibody molecules found in serum: IgG, IgM, IgA, IgE and IgD. They are distinguished by the type of heavy chain they contain. IgG molecules possess heavy chains known as γ -chains; IgM have μ -chains; IgA have α -chains; IgE have ϵ -chains; and IgD have δ -chains. The variation in heavy chain polypeptides allows each immunoglobulin class to function in a different type of immune response or during a different stage of the body's defense. Upon antigen exposure, these molecules are secreted allowing the immune system to recognize and effectively respond to a myriad of pathogens. Immunoglobulin or antibody secreting cells are the mature form of B lymphocytes, which during their development undergo gene rearrangements and selection in the bone marrow ultimately leading to the generation of B cells, each expressing a single antigen-specific receptor/immunoglobulin molecule. Each individual immunoglobulin molecule has an affinity for a unique motif, or epitope, found on a given antigen. When presented with an antigen, activated B cells differentiate into either plasma cells (which secrete large amounts of antibody that is specific for the inducing antigen), or memory B cells (which are long-lived and elicit a stronger and faster response if the host is re-exposed to the same antigen). The secreted form of immunoglobulin, when bound to an antigen, serves as an effector molecule that directs other cells of the immune system to facilitate the neutralization of soluble antigen or the eradication of the antigen-expressing pathogen. The immunoglobulin gene encodes both membrane-associated and secreted proteins through alternative RNA processing reactions. This gene indeed contains competing cleavage-polyadenylation and RNA splicing reactions and the relative use of the two pathways is differentially regulated between B cells and plasma cells. More particularly, one mRNA is cleaved and polyadenylated at an upstream poly(A) signal while the other mRNA removes this poly(A) signal by RNA splicing and is cleaved and polyadenylated at a downstream poly(A) site. General cleavage-polyadenylation and RNA splicing reactions are tightly regulated during B cell maturation to affect immunoglobulin expression. Regulation of the production of secreted immunoglobulins is

highly important for an effective immune response and dysregulation of immunoglobulin production is characteristic of several antibody-mediated diseases. Inversely, regulation of the production of membrane-anchored immunoglobulins would be suitable for the treatment of B-cell lymphomas by reducing the survival signaling induced by the BCR in malignant B cells.

5

SUMMARY OF THE INVENTION:

As defined by the claims, the present invention relates to methods for modulating immunoglobulin expression in subjects in need thereof.

10

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

Immunoglobulins (Ig) are expressed either on the surface of B cells or as secreted antibodies by plasma cells that represents the final stage of B cell differentiation. The present invention involves the use of antisense oligonucleotides (ASOs) for either reducing the production of the secreted form or either reducing the production of the membrane form. In particular, the inventors show that antisense oligonucleotides masking the secretory polyadenylation signal induce a decrease in the production of the secreted immunoglobulin. Inversely, antisense oligonucleotides masking the membrane polyadenylation signal induce a decrease in the production of the membrane-anchored immunoglobulin. The proof of concept has been obtained using an ASO hybridizing to the polyadenylation signal (PAS) sequence of the transcript encoding the secreted form of IgE. Indeed, the targeting of this PAS sequence induces a drastic decrease in IgE production. Thus the choice of the right antisense oligonucleotide would be suitable for the treatment of diseases associated to B-cell development (e.g. autoimmune diseases, inflammation or B-cell malignancies).

Accordingly, the first object of the present invention relates to a method of modulating the expression of an immunoglobulin in a subject in need thereof comprising administering to the subject an effective amount of:

- an antisense oligonucleotide complementary to a sequence comprising the secretory polyadenylation signal within the pre-mRNA molecule encoding for the immunoglobulin heavy chain for reducing the production of the secreted immunoglobulin or
- an antisense oligonucleotide complementary to a sequence comprising the membrane-anchored specific polyadenylation signal within the pre-mRNA molecule encoding for the immunoglobulin heavy chain for reducing the production of the membrane-anchored immunoglobulin.

30

As used herein, the term "immunoglobulin" or "antibody" has its general meaning in the art and refers to a glycoprotein composed of one or more units, each containing four polypeptide chains: two identical heavy chains (H) and two identical light chains (L). The amino terminal ends of the polypeptide chains show considerable variation in amino acid composition and are referred to as the variable (V) regions to distinguish them from the relatively constant (C) regions. Each L chain consists of one variable domain, VL, and one constant domain, CL. The H chains consist of a variable domain, VH, and 3-4 constant domains CH1, CH2, CH3 and optionally CH4 depending of the Ig subclass. Each heavy chain has about twice the number of amino acids and molecular weight (~50,000) as each light chain (~25,000), resulting in a total immunoglobulin monomer molecular weight of approximately 150,000. The term "immunoglobulin" encompasses "membrane-anchored immunoglobulins" as well as "secreted immunoglobulins". Membrane-anchored or membrane-bound immunoglobulins are also termed surface immunoglobulins, which are generally part of the BCR. There are five immunoglobulin classes (isotypes) of antibody molecules found in serum: IgG, IgM, IgA, IgE and IgD.

In some embodiments, the method of the present is particularly suitable for modulating the expression of IgG immunoglobulins.

As used herein, the term "IgG" has its general meaning in the art and refers to an immunoglobulin that possesses heavy γ -chains. Produced as part of the secondary immune response to an antigen, this class of immunoglobulin constitutes approximately 75% of total serum Ig. IgG is the only class of Ig that can cross the placenta in humans, and it is largely responsible for protection of the newborn during the first months of life. IgG is the major immunoglobulin in blood, lymph fluid, cerebrospinal fluid and peritoneal fluid and a key player in the humoral immune response. Serum IgG in healthy humans presents approximately 15% of total protein beside albumins, enzymes, other globulins and many more. There are four IgG subclasses described in human, mouse and rat (e.g. IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 in humans). The subclasses differ in the number of disulfide bonds and the length and flexibility of the hinge region. Except for their variable regions, all immunoglobulins within one class share about 90% homology, but only 60% among classes.

IgG1 comprises 60 to 65% of the total main subclass IgG, and is predominantly responsible for the thymus-mediated immune response against proteins and polypeptide antigens. IgG1 binds to the Fc-receptor of phagocytic cells and can activate the complement

cascade via binding to C1 complex. IgG1 immune response can already be measured in newborns and reaches its typical concentration in infancy.

5 IgG2, the second largest of IgG isotypes, comprises 20 to 25% of the main subclass and is the prevalent immune response against carbohydrate/polysaccharide antigens. "Adult" concentrations are usually reached by 6 or 7 years old.

IgG3 comprises around 5 to 10% of total IgG and plays a major role in the immune responses against protein or polypeptide antigens. The affinity of IgG3 can be higher than that of IgG1.

10 Comprising usually less than 4% of total IgG, IgG4 does not bind to polysaccharides. In the past, testing for IgG4 has been associated with food allergies, and recent studies have shown that elevated serum levels of IgG4 are found in patients suffering from sclerosing pancreatitis, cholangitis and interstitial pneumonia caused by infiltrating IgG4 positive plasma cells.

The properties of IgG are:

- 15
- Molecular weight: 150,000
 - H-chain type (MW): gamma (53,000)
 - Serum concentration: 10 to 16 mg/mL
 - Percent of total immunoglobulin: 75%
 - Glycosylation (by weight): 3%
- 20
- Distribution: intra- and extravascular
 - Function: secondary response

In some embodiments, the method of the present is particularly suitable for modulating the expression of IgA immunoglobulins.

25 As used herein, the term "IgA" has its general meaning in the art and refers to an immunoglobulin that possesses heavy α -chains. IgA comprises approximately 15% of all immunoglobulins in healthy serum. IgA in serum is mainly monomeric, but in secretions, such as saliva, tears, colostrums, mucus, sweat, and gastric fluid, IgA is found as a dimer connected by a joining peptide. Most IgA is present in secreted form. This is believed to be due to its

30 properties in preventing invading pathogens by attaching and penetrating epithelial surfaces. IgA is a very weak complement-activating antibody; hence, it does not induce bacterial cell lysis via the complement system. However, secretory IgA works together with lysozymes (also present in many secreted fluids), which can hydrolyze carbohydrates in bacterial cell walls thereby enabling the immune system to clear the infection. IgA is predominantly found on

epithelial cell surfaces where it acts as a neutralizing antibody. Two IgA subtypes exist in humans, IgA1 and IgA2, while mice have only one subclass. They differ in the molecular mass of the heavy chains and in their concentration in serum. IgA1 comprises approximately 85% of total IgA concentration in serum. Although IgA1 shows a broad resistance against several proteases, there are some that can affect/splice on the hinge region. IgA1 shows a good immune response to protein antigens and, to a lesser degree, polysaccharides and lipopolysaccharides. IgA2, representing only up to 15% of total IgA in serum, plays a crucial role in the mucosa of the airways, eyes and the gastrointestinal tract to fight against polysaccharide and lipopolysaccharide antigens. It also shows good resistance to proteolysis and many bacterial proteases, supporting the importance of IgA2 in fighting bacterial infections.

Properties of IgA are:

- Molecular weight: 320,000 (secretory)
- H-chain type (MW): alpha (55,000)
- Serum concentration: 1 to 4 mg/mL
- Percent of total immunoglobulin: 15%
- Glycosylation (by weight): 10%
- Distribution: intravascular and secretions
- Function: protect mucus membranes

In some embodiments, the method of the present is particularly suitable for modulating the expression of IgM immunoglobulins.

As used herein, the term "IgM" has its general meaning in the art and refers to an immunoglobulin that possesses heavy μ -chains. Serum IgM exists as a pentamer in mammals and comprises approximately 10% of normal human serum Ig content. It predominates in primary immune responses to most antigens and is the most efficient complement-fixing immunoglobulin. IgM is also expressed on the plasma membrane of B lymphocytes as a monomer. In this form, it is a B cell antigen receptor, with the H chains each containing an additional hydrophobic domain for anchoring in the membrane. Monomers of serum IgM are bound together by disulfide bonds and a joining (J) chain. Each of the five monomers within the pentamer structure is composed of two light chains (either kappa or lambda) and two heavy chains. Unlike in IgG (and the generalized structure shown above), the heavy chain in IgM monomers is composed of one variable and four constant regions, with the additional constant domain replacing the hinge region. IgM can recognize epitopes on invading microorganisms, leading to cell agglutination. This antibody-antigen immune complex is then destroyed by

complement fixation or receptor-mediated endocytosis by macrophages. IgM is the first immunoglobulin class to be synthesized by the neonate and plays a role in the pathogenesis of some autoimmune diseases. Immunoglobulin M is the third most common serum Ig and takes one of two forms:

- 5
- a pentamer where all heavy chains are identical and all light chains are identical
 - a monomer (e.g., found on B lymphocytes as B cell receptors)

IgM is the first antibody built during an immune response. It is responsible for agglutination and cytolytic reactions since in theory, its pentameric structure gives it 10 free antigen-binding sites as well as it possesses a high avidity. Due to conformational constraints among the 10 Fab
10 portions, IgM only has a valence of 5. Additionally, IgM is not as versatile as IgG. However, it is of vital importance in complement activation and agglutination. IgM is predominantly found in the lymph fluid and blood and is a very effective neutralizing agent in the early stages of disease. Elevated levels can be a sign of recent infection or exposure to antigen.

Properties of IgM are:

- 15
- Molecular weight: 900,000
 - H-chain type (MW): mu (65,000)
 - Serum concentration: 0.5 to 2 mg/mL
 - Percent of total immunoglobulin: 10%
 - Glycosylation (by weight): 12%
- 20
- Distribution: mostly intravascular
 - Function: primary response

In some embodiments, the method of the present is particularly suitable for modulating the expression of IgE immunoglobulins.

25

As used herein, the term "IgE" has its general meaning in the art and refers to an immunoglobulin that possesses heavy ϵ -chains. The heavy chain of IgE contains an extra domain, by which it attaches with high affinity to Fc epsilon Receptor I (Fc ϵ RI) found primarily on eosinophils, mast cells and basophils. When antigens such as pollen, venoms, fungus, spores, dust mites or pet dander bind with the Fab portion of the IgE attached to the cells, the cells
30 degranulate and release factors like heparin, histamine, proteolytic enzymes, leukotrienes and cytokines. As a consequence, vasodilatation and increased small vessel permeability causes fluid to escape from capillaries into the tissues, leading to the characteristic symptoms of an allergic reaction. Most of these typical allergic reactions like mucus secretion, sneezing, coughing or tear production are considered beneficial to expel remaining allergens from the

body. Studies have shown that conditions such as asthma, rhinitis, eczema, urticaria, dermatitis and some parasitic infections (e.g., helminths and tapeworms) lead to increased IgE levels. Binding of eosinophils with Fc receptors to IgE-coated parasitic helminth worms results in death of the parasite.

- 5 Properties of IgE are:
- Molecular weight: 200,000
 - H-chain type (MW): epsilon (73,000)
 - Serum concentration: 10 to 400 ng/mL
 - Percent of total immunoglobulin: 0.002%
 - 10 - Glycosylation (by weight): 12%
 - Distribution: basophils and mast cells in saliva and nasal secretions
 - Function: protect against parasites

As used herein, the expression “reducing the production of a [secreted or membrane] immunoglobulin” means a measurable decrease in the number of said immunoglobulin either in the serum or in the membrane. The reduction can be at least about 10%, e.g., at least about 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or more. In some embodiments, the term refers to a decrease in the number of said immunoglobulin to an amount below detectable limits. Methods for quantifying expression of immunoglobulins are well known in the art (see e.g. Normansell, David E., and L. M. Killingsworth. "Quantitation of serum immunoglobulins." CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 17.2 (1982): 103-170).

As used herein, the term “polyadenylation signal” or “PAS” has its general meaning in the art and refers to a particular region of the gene encoding for the immunoglobulin heavy chain. Said gene comprises two polyadenylation signals: the secretory specific polyadenylation signal (“pAS”) and the membrane-anchored specific polyadenylation signal (“pAM”). Indeed for all genes encoding immunoglobulin heavy chains, there is an exon in the constant region that is either spliced at an internal 5' splice site or cleaved and polyadenylated at the secretory-specific poly(A) signal (pAS). When the pre-mRNA is cleaved at the pAS, the mRNA encodes the secretory immunoglobulin. When the pre-mRNA is spliced to one or two downstream exons and the downstream poly(A) signal (pAM or membrane-anchored specific poly(A)) is used, the mRNA encodes the membrane-anchored immunoglobulin. More specifically, the pAS signal is preferably about 100-150 nucleotides downstream of the last constant region exon which encodes the 3' end of the secretory-specific mRNA. The 3' end of membrane-anchored specific

mRNA is encoded by a large portion of the last constant region and by two downstream exons, M1 and M2. Membrane-anchored specific mRNA is produced when splicing of the last constant region exon to M1 takes place using the internal 5' splice site within the last constant region exon, polyadenylation occurs at the pAM site at the end of M2, and preferably the intronic
 5 sequence between the M1 and M2 exons is also spliced.

As well-known from the skilled person, the highly conserved polyadenylation signal sequence 5'-ANUAAA-3' (SEQ ID NO:1) is typically embedded in an AU-rich region (28 of 29 nucleotides surrounding the ANUAAA are A or U) and wherein N is A excepting for the pAM signal for IgE wherein N is G. The polyadenylation signal preferably contains two
 10 downstream GU-rich sequences that are located at 1 and 38 nucleotides from the cleavage site.

Figures 4 and 5 shows the different secretory and membrane polyadenylation signals (pAS and pAM respectively) for IgG, IgA, IgM and IgE classes.

As used herein, the term "antisense oligonucleotide" or ASO refers to a single strand of DNA, RNA, or modified nucleic acids that is complementary to a chosen sequence. Antisense
 15 RNA can be used to prevent protein translation of certain mRNA strands by binding to them. Antisense DNA can be used to target a specific, complementary (coding or non-coding) RNA. In some embodiments, the antisense oligonucleotide of the present invention is an antisense RNA. In some embodiments, the antisense oligonucleotide of the present invention is an antisense DNA.

As used herein, the term "complementary" as used herein includes "fully complementary" and "substantially complementary", meaning there will usually be a degree of complementarity between the oligonucleotide and its corresponding target sequence of more than 80%, preferably more than 85%, still more preferably more than 90%, most preferably more than 95%. For example, for an oligonucleotide of 20 nucleotides in length with one
 25 mismatch between its sequence and its target sequence, the degree of complementarity is 95%.

In some embodiments, the antisense oligonucleotide of the present invention comprises the 5'-TTTANT-3' sequence (SEQ ID NO:2) wherein N is T and can be exceptionally C (i.e. for targeting the pAM for IgE) or the 5'-UUUANU-3' sequence (SEQ ID NO:3) wherein N is U and can be exceptionally C (i.e. for targeting the pAM for IgE).

In some embodiments, the antisense oligonucleotide of the present invention has a length of at least 15 nucleotides. The optimal length of the ASO's for a targeted complementary sequence is generally in the range of from about 15 to about 30 nucleotides long depending on the chemical backbone used and on the target sequence. Thus, in some embodiments, the antisense oligonucleotide has a length of at least 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,

27, 28, 29, or 30 nucleotides. Typically, morpholino-ASOs are about 25 nucleotides long, 2'-modified-ASOs are about 20 nucleotides long, and tricyclo-ASOs are about 15 nucleotides long.

For reducing the production of the secreted form, the antisense oligonucleotide of the present invention is designed to be complementary to a sequence comprising the secretory polyadenylation signal within the pre-mRNA molecule encoding for the immunoglobulin heavy chain (**Figure 1A**). The antisense oligonucleotide thus will sterically hinder the secretory polyadenylation signal during the splicing reaction so as to promote the use of the alternative membrane-anchored specific polyadenylation signal encoding the membrane form of the corresponding immunoglobulin (**Figure 1A**). In some embodiments, the antisense oligonucleotide is thus complementary to a sequence comprising the secretory polyadenylation signal within the sequences depicted in **Figure 4**.

In some embodiments, the antisense oligonucleotide is complementary to the sequence as set forth in SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, or SEQ ID NO:11.

```

SEQ ID NO:4>PAS_IGHA1
CCCGCCTGTCCCCACCCCTGAATAAACTCCATGCTCCCCCAAGCAG
SEQ ID NO:5>PAS_IGHA2
CCCGCCTGTCCCCACCCCTGAATAAACTCCATGCTCCCCCAAGCAG
SEQ ID NO:6>PAS_IGHG1
TCCCAGGCACCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTTCCCTGGG
SEQ ID NO:7>PAS_IGHG2
TCCCGGGCACCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG
SEQ ID NO:8>PAS_IGHG3
TCCCGGGCACCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG
SEQ ID NO:9>PAS_IGHG4
TCCCGGGCGCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG
SEQ ID NO:10>PAS_IGHM
TTGCATCTTATAAAATTAGAAATAAAAAGATCCATTCAAAGATAC
SEQ ID NO:11>PAS_IGHE
GACCCAGGAAGCTACCCCAATAAACTGTGCCTGCTCAGAGCCCC

```

In some embodiments, for reducing the production of the secreted immunoglobulin, the antisense oligonucleotide of the present invention, comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:15.

In some embodiments, an antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:12 is used for reducing the production of secreted IgM immunoglobulins.

5 In some embodiments, an antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:13 is used for reducing the production of secreted IgG immunoglobulins.

In some embodiments, an antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:14 is used for reducing the production of secreted IgE immunoglobulins.

10 In some embodiments, an antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:15 is used for reducing the production of secreted IgA immunoglobulins.

15 SEQ ID NO:12> IgM-PAS : 5' - CTTTGAATGGATCTTTTATTCT
 SEQ ID NO:13> IgG-PAS : 5' - GCGCTGGGTGCTTTATTTCCATG
 SEQ ID NO:14> IgE-PAS : 5' - GCTCTGAGCAGGCACAGTTTATTG
 SEQ ID NO:15> IgA-PAS : 5' - GGGAGCATGGAGTTTATTCA

20 For reducing the production of the membrane form, the antisense oligonucleotide of the present invention is designed to be complementary to a sequence comprising the membrane-anchored specific polyadenylation signal within the pre-mRNA molecule encoding for the immunoglobulin heavy chain. The antisense oligonucleotide thus will sterically hinder the membrane-anchored specific polyadenylation signal during the splicing reaction so as to promote the use of the alternative secretory specific polyadenylation signal encoding the secreted form of the corresponding immunoglobulin. In some embodiments, the antisense oligonucleotide is thus complementary to a sequence comprising the membrane-anchored specific polyadenylation signal within the sequences depicted in **Figure 5**.

25 In some embodiments, the antisense oligonucleotide is complementary to the sequence as set forth in SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 30 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, or SEQ ID NO:23.

35 SEQ ID NO:16>PAM_IGHA1
 CTCACATGCCTTCCAGGTGCAATAAAGTGGCCCCAAGGAAAATGTT
 SEQ ID NO:17 >PAM_IGHA2
 CTCACGTGGCTTCCAGGTGCAATAAAGTGGCCCCAAGGAAAATGTT

SEQ ID NO :18>PAM_IGHG1
 GATGTTTCTTTTGTGATGACAATAAAATATCCTTTTAAAGTCTTGT
 SEQ ID NO :19>PAM_IGHG2
 GATGTTTCTTTTGTGATGACAATAAAATATCCTTTTAAAGTCTTGT
 5 SEQ ID NO :20>PAM_IGHG3
 GATGTTTCTTTTGTGATGACAATAAAATATCCTTTTAAAGTCTTGT
 SEQ ID NO :21>PAM_IGHG4
 GATGTTTCTTTTGTGATGACAATAAAATATCCTTTTAAAGTCTTGT
 SEQ ID NO :22>PAM_IGHM
 10 GTATACGCTTGTGCCCTGAAATAAATATGCACATTTTATCCATGA
 SEQ ID NO :23>PAM_IGHE
 TCTTCTCTCTGGGTTTCTTAGTAAAGATCCTTTTCACAAACCCCA

In some embodiments, for reducing the production of the membrane-anchored
 15 immunoglobulin, the antisense oligonucleotide of the present invention, comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, and SEQ ID NO:26.

In some embodiments, an antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:24 is used for reducing the production of membrane-anchored IgM
 20 immunoglobulins.

In some embodiments, an antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:25 is used for reducing the production of membrane-anchored IgG immunoglobulins.

In some embodiments, an antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:26 is used for reducing the production of membrane-anchored IgA
 25 immunoglobulins.

SEQ ID NO:24> IgM-PAM : 5' - TGTGCATATTTATTTTCAGGGCAACA
 SEQ ID NO:25> IgG-PAM : 5' - AGGATATTTATTTGTCATCACAAAA
 30 SEQ ID NO:26> IgA-PAM : 5' - GGGCCACTTTATTTGCACCTGGAAGG

The sequence of the ASO is selected so as to be specific, i.e. the ASO's are complementary only to the sequences of the pre-mRNA and not to other nucleic acid sequences.

In some embodiments, the antisense oligonucleotide of the present invention is
 35 stabilized. A "stabilized" ASO refers to an ASO that is relatively resistant to in vivo degradation (e.g. via an exo- or endo-nuclease). Stabilization can be a function of length or secondary

structure. Alternatively, ASO stabilization can be accomplished via phosphate backbone modifications. Preferred stabilized ASO's of the instant invention have a modified backbone, e.g. have phosphorothioate linkages to provide maximal activity and protect the ASO from degradation by intracellular exo- and endo-nucleases. Other possible stabilizing modifications include phosphodiester modifications, combinations of phosphodiester and phosphorothioate modifications, methylphosphonate, methylphosphorothioate, phosphorodithioate, p-ethoxy, and combinations thereof. Chemically stabilized, modified versions of the ASO's also include "Morpholinos" (phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMOs), 2'-O-Met oligomers, 2'-Methoxy-ethyl oligomers, 2'-Fluoro (2'-F) oligomers, tricyclo (tc)-DNAs, U7 short nuclear (sn) RNAs, tricyclo-DNA-oligoantisense molecules (U.S. Provisional Patent Application Serial No. 61/212,384 For: Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions and Methods for the Treatment of Disease, filed April 10, 2009, the complete contents of which is hereby incorporated by reference, unlocked nucleic acid (UNA), locked nucleic acid (LNA), peptide nucleic acid (PNA), serinol nucleic acid (SNA), twisted intercalating nucleic acid (TINA), anhydrohexitol nucleic acid (HNA), cyclohexenyl nucleic acid (CeNA), D-altritol nucleic acid (ANA) and morpholino nucleic acid (MNA) have also been investigated in splice modulation. Recently, nucleobase-modified AOs containing 2-thioribothymidine, and 5-(phenyltriazol)-2-deoxyuridine nucleotides have been reported to induce exon skipping (Chen S, Le BT, Chakravarthy M, Kosbar TR, Veedu RN. Systematic evaluation of 2'-Fluoro modified chimeric antisense oligonucleotide-mediated exon skipping in vitro. *Sci Rep.* 2019 Apr 15;9(1):6078.). In some embodiments, the antisense oligonucleotides of the invention may be 2'-O-Me RNA/ENA chimera oligonucleotides (Takagi M, Yagi M, Ishibashi K, Takeshima Y, Surono A, Matsuo M, Koizumi M. Design of 2'-O-Me RNA/ENA chimera oligonucleotides to induce exon skipping in dystrophin pre-mRNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2004;(48):297-8).

Other forms of ASOs that may be used to this effect are ASO sequences coupled to small nuclear RNA molecules such as U1 or U7 in combination with a viral transfer method based on, but not limited to, lentivirus or adeno-associated virus (Denti, MA, et al, 2008; Goyenvalle, A, et al, 2004). In some embodiments, the antisense oligonucleotides of the invention are 2'-O-methyl-phosphorothioate nucleotides.

The ASOs of the invention can be synthesized de novo using any of a number of procedures well known in the art. For example, the b-cyanoethyl phosphoramidite method (Beaucage et al., 1981); nucleoside H-phosphonate method (Garegg et al., 1986; Froehler et al., 1986, Garegg et al., 1986, Gaffney et al., 1988). These chemistries can be performed by a variety of automated nucleic acid synthesizers available in the market. These nucleic acids may

be referred to as synthetic nucleic acids. Alternatively, ASO's can be produced on a large scale in plasmids (see Sambrook, et al., 1989). ASO's can be prepared from existing nucleic acid sequences using known techniques, such as those employing restriction enzymes, exonucleases or endonucleases. ASO's prepared in this manner may be referred to as isolated nucleic acids.

5 In some embodiments, the antisense oligonucleotide of the invention may be delivered in vivo alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the antisense oligonucleotide of the invention to the cells. Preferably, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors
10 useful in the invention include, but are not limited to, naked plasmids, non-viral delivery systems (electroporation, sonoporation, cationic transfection agents, liposomes, nanoparticles, peptide-bound ASO, etc...), phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the antisense oligonucleotide nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include,
15 but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: RNA viruses such as a retrovirus (as for example moloney murine leukemia virus and lentiviral derived vectors), harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rous sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus. One can readily employ other
20 vectors not named but known to the art. Typically, viral vectors according to the invention include adenoviruses and adeno-associated (AAV) viruses, which are DNA viruses that have already been approved for human use in gene therapy. Actually 12 different AAV serotypes (AAV1 to 12) are known, each with different tissue tropisms (Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27). Recombinant AAV are derived from the dependent parvovirus AAV (Choi, VW J Virol
25 2005; 79:6801-07). The adeno-associated virus type 1 to 12 can be engineered to be replication deficient and is capable of infecting a wide range of cell types and species (Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27). It further has advantages such as, heat and lipid solvent stability; high transduction frequencies in cells of diverse lineages, including hematopoietic cells; and lack of superinfection inhibition thus allowing multiple series of transductions. In addition, wild-type
30 adeno-associated virus infections have been followed in tissue culture for greater than 100 passages in the absence of selective pressure, implying that the adeno-associated virus genomic integration is a relatively stable event. The adeno-associated virus can also function in an extrachromosomal fashion. Other vectors include plasmid vectors. Plasmid vectors have been extensively described in the art and are well known to those of skill in the art. See e.g. Sambrook

et al., 1989. In the last few years, plasmid vectors have been used as DNA vaccines for delivering antigen-encoding genes to cells in vivo. They are particularly advantageous for this because they do not have the same safety concerns as with many of the viral vectors. These plasmids, however, having a promoter compatible with the host cell, can express a peptide from a gene operatively encoded within the plasmid. Some commonly used plasmids include pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, and pBlueScript. Other plasmids are well known to those of ordinary skill in the art. Additionally, plasmids may be custom designed using restriction enzymes and ligation reactions to remove and add specific fragments of DNA. Plasmids may be delivered by a variety of parenteral, mucosal and topical routes. For example, the DNA plasmid can be injected by intramuscular, intradermal, subcutaneous, or other routes. It may also be administered by, intranasal sprays or drops, rectal suppository and orally. It may also be administered into the epidermis or a mucosal surface using a gene-gun. The plasmids may be given in an aqueous solution, dried onto gold particles or in association with another DNA delivery system including but not limited to liposomes, dendrimers, cochleate and microencapsulation. In some embodiments, the antisense oligonucleotide nucleic acid sequence is under the control of a heterologous regulatory region, e.g., a heterologous promoter. The promoter can also be, e.g., a viral promoter, such as CMV promoter or any synthetic promoters.

As used herein, the term "subject", refers to any mammals, such as a rodent, a feline, a canine, and a primate.

By reducing the amount of secreted immunoglobulins, the method of the present invention is particularly suitable for the treatment of diseases associated to autoimmunity or inflammation. Examples of said diseases include, but are not limited to arthritis (rheumatoid arthritis such as acute arthritis, chronic rheumatoid arthritis, gout or gouty arthritis, acute gouty arthritis, acute immunological arthritis, chronic inflammatory arthritis, degenerative arthritis, type II collagen-induced arthritis, infectious arthritis, Lyme arthritis, proliferative arthritis, psoriatic arthritis, Still's disease, vertebral arthritis, and juvenile-onset rheumatoid arthritis, osteoarthritis, arthritis chronica progrediente, arthritis deformans, polyarthritis chronica primaria, reactive arthritis, and ankylosing spondylitis), inflammatory hyperproliferative skin diseases, psoriasis such as plaque psoriasis, gutatte psoriasis, pustular psoriasis, and psoriasis of the nails, atopy including atopic diseases such as hay fever and Job's syndrome, dermatitis including contact dermatitis, chronic contact dermatitis, exfoliative dermatitis, allergic dermatitis, allergic contact dermatitis, dermatitis herpetiformis, nummular dermatitis, seborrheic dermatitis, non-specific dermatitis, primary irritant contact dermatitis, and atopic dermatitis, x-linked hyper IgM syndrome, allergic intraocular inflammatory diseases, urticaria

such as chronic allergic urticaria and chronic idiopathic urticaria, including chronic autoimmune urticaria, myositis, polymyositis/dermatomyositis, juvenile dermatomyositis, toxic epidermal necrolysis, scleroderma (including systemic scleroderma), sclerosis such as systemic sclerosis, multiple sclerosis (MS) such as spino-optical MS, primary progressive MS (PPMS), and relapsing remitting MS (RRMS), progressive systemic sclerosis, atherosclerosis, arteriosclerosis, sclerosis disseminata, ataxic sclerosis, neuromyelitis optica (NMO), inflammatory bowel disease (IBD) (for example, Crohn's disease, autoimmune-mediated gastrointestinal diseases, colitis such as ulcerative colitis, colitis ulcerosa, microscopic colitis, collagenous colitis, colitis polyposa, necrotizing enterocolitis, and transmural colitis, and autoimmune inflammatory bowel disease), bowel inflammation, pyoderma gangrenosum, erythema nodosum, primary sclerosing cholangitis, respiratory distress syndrome, including adult or acute respiratory distress syndrome (ARDS), meningitis, inflammation of all or part of the uvea, iritis, choroiditis, an autoimmune hematological disorder, rheumatoid spondylitis, rheumatoid synovitis, hereditary angioedema, cranial nerve damage as in meningitis, herpes gestationis, pemphigoid gestationis, pruritis scroti, autoimmune premature ovarian failure, sudden hearing loss due to an autoimmune condition, IgE-mediated diseases such as anaphylaxis and allergic and atopic rhinitis, encephalitis such as Rasmussen's encephalitis and limbic and/or brainstem encephalitis, uveitis, such as anterior uveitis, acute anterior uveitis, granulomatous uveitis, nongranulomatous uveitis, phacoantigenic uveitis, posterior uveitis, or autoimmune uveitis, glomerulonephritis (GN) with and without nephrotic syndrome such as chronic or acute glomerulonephritis such as primary GN, immune-mediated GN, membranous GN (membranous nephropathy), idiopathic membranous GN or idiopathic membranous nephropathy, membrano- or membranous proliferative GN (MPGN), including Type I and Type II, and rapidly progressive GN, proliferative nephritis, autoimmune polyglandular endocrine failure, balanitis including balanitis circumscripta plasmacellularis, balanoposthitis, erythema annulare centrifugum, erythema dyschromicum perstans, erythema multiform, granuloma annulare, lichen nitidus, lichen sclerosus et atrophicus, lichen simplex chronicus, lichen spinulosus, lichen planus, lamellar ichthyosis, epidermolytic hyperkeratosis, premalignant keratosis, pyoderma gangrenosum, allergic conditions and responses, allergic reaction, eczema including allergic or atopic eczema, asteatotic eczema, dyshidrotic eczema, and vesicular palmoplantar eczema, asthma such as asthma bronchiale, bronchial asthma, and auto-immune asthma, conditions involving infiltration of T cells and chronic inflammatory responses, immune reactions against foreign antigens such as fetal A-B—O blood groups during pregnancy, chronic pulmonary inflammatory disease, autoimmune myocarditis, leukocyte

adhesion deficiency, lupus, including lupus nephritis, lupus cerebritis, pediatric lupus, non-renal lupus, extra-renal lupus, discoid lupus and discoid lupus erythematosus, alopecia lupus, systemic lupus erythematosus (SLE) such as cutaneous SLE or subacute cutaneous SLE, neonatal lupus syndrome (NLE), and lupus erythematosus disseminatus, juvenile onset (Type

5 I) diabetes mellitus, including pediatric insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), adult onset diabetes mellitus (Type II diabetes), autoimmune diabetes, idiopathic diabetes insipidus, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, diabetic large-artery disorder, immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis including lymphomatoid granulomatosis, Wegener's

10 granulomatosis, agranulocytosis, vasculitides, including vasculitis, large-vessel vasculitis (including polymyalgia rheumatica and giant-cell (Takayasu's) arteritis), medium-vessel vasculitis (including Kawasaki's disease and polyarteritis nodosa/periarteritis nodosa), microscopic polyarteritis, immunovasculitis, CNS vasculitis, cutaneous vasculitis, hypersensitivity vasculitis, necrotizing vasculitis such as systemic necrotizing vasculitis, and

15 ANCA-associated vasculitis, such as Churg-Strauss vasculitis or syndrome (CSS) and ANCA-associated small-vessel vasculitis, temporal arteritis, aplastic anemia, autoimmune aplastic anemia, Coombs positive anemia, Diamond Blackfan anemia, hemolytic anemia or immune hemolytic anemia including autoimmune hemolytic anemia (AIHA), pernicious anemia (anemia perniosa), Addison's disease, pure red cell anemia or aplasia (PRCA), Factor VIII

20 deficiency, hemophilia A, autoimmune neutropenia, pancytopenia, leukopenia, diseases involving leukocyte diapedesis, CNS inflammatory disorders, multiple organ injury syndrome such as those secondary to septicemia, trauma or hemorrhage, antigen-antibody complex-mediated diseases, anti-glomerular basement membrane disease, anti-phospholipid antibody syndrome, allergic neuritis, Behcet's disease/syndrome, Castleman's syndrome, Goodpasture's

25 syndrome, Reynaud's syndrome, Sjogren's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, pemphigoid such as pemphigoid bullous and skin pemphigoid, pemphigus (including pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, pemphigus mucus-membrane pemphigoid, and pemphigus erythematosus), autoimmune polyendocrinopathies, Reiter's disease or syndrome, thermal injury, preeclampsia, an immune complex disorder such as immune complex nephritis,

30 antibody-mediated nephritis, polyneuropathies, chronic neuropathy such as IgM polyneuropathies or IgM-mediated neuropathy, thrombocytopenia (as developed by myocardial infarction patients, for example), including thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), post-transfusion purpura (PTP), heparin-induced thrombocytopenia, and autoimmune or immune-mediated thrombocytopenia such as idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) including

chronic or acute ITP, scleritis such as idiopathic cerato-scleritis, episcleritis, autoimmune disease of the testis and ovary including autoimmune orchitis and oophoritis, primary hypothyroidism, hypoparathyroidism, autoimmune endocrine diseases including thyroiditis such as autoimmune thyroiditis, Hashimoto's disease, chronic thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis), or subacute thyroiditis, autoimmune thyroid disease, idiopathic hypothyroidism, 5 Grave's disease, polyglandular syndromes such as autoimmune polyglandular syndromes (or polyglandular endocrinopathy syndromes), paraneoplastic syndromes, including neurologic paraneoplastic syndromes such as Lambert-Eaton myasthenic syndrome or Eaton-Lambert syndrome, stiff-man or stiff-person syndrome, encephalomyelitis such as allergic 10 encephalomyelitis or encephalomyelitis allergica and myasthenia gravis such as thymoma-associated myasthenia gravis, cerebellar degeneration, neuromyotonia, opsoclonus or opsoclonus myoclonus syndrome (OMS), and sensory neuropathy, multifocal motor neuropathy, Sheehan's syndrome, autoimmune hepatitis, chronic hepatitis, lupoid hepatitis, giant-cell hepatitis, chronic active hepatitis or autoimmune chronic active hepatitis, lymphoid 15 interstitial pneumonitis (LIP), bronchiolitis obliterans (non-transplant) vs NSIP, Guillain-Barre syndrome, Berger's disease (IgA nephropathy), idiopathic IgA nephropathy, linear IgA dermatosis, acute febrile neutrophilic dermatosis, subcorneal pustular dermatosis, transient acantholytic dermatosis, cirrhosis such as primary biliary cirrhosis and pneumocirrhosis, autoimmune enteropathy syndrome, Celiac or Coeliac disease, celiac sprue (gluten 20 enteropathy), refractory sprue, idiopathic sprue, cryoglobulinemia, amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Lou Gehrig's disease), coronary artery disease, autoimmune ear disease such as autoimmune inner ear disease (AIED), autoimmune hearing loss, polychondritis such as refractory or relapsed or relapsing polychondritis, pulmonary alveolar proteinosis, Cogan's syndrome/nonsyphilitic interstitial keratitis, Bell's palsy, Sweet's disease/syndrome, rosacea 25 autoimmune, zoster-associated pain, amyloidosis, a non-cancerous lymphocytosis, a primary lymphocytosis, which includes monoclonal B cell lymphocytosis (e.g., benign monoclonal gammopathy and monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), peripheral neuropathy, paraneoplastic syndrome, channelopathies such as epilepsy, migraine, arrhythmia, muscular disorders, deafness, blindness, periodic paralysis, and channelopathies of the CNS, 30 autism, inflammatory myopathy, focal or segmental or focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), endocrine ophthalmopathy, uveoretinitis, chorioretinitis, autoimmune hepatological disorder, fibromyalgia, multiple endocrine failure, Schmidt's syndrome, adrenalitis, gastric atrophy, presenile dementia, demyelinating diseases such as autoimmune demyelinating diseases and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, Dressler's syndrome,

alopecia areata, alopecia totalis, CREST syndrome (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia), male and female autoimmune infertility, e.g., due to anti-spermatozoan antibodies, mixed connective tissue disease, Chagas' disease, rheumatic fever, recurrent abortion, farmer's lung, erythema multiforme, post-cardiotomy syndrome, Cushing's syndrome, bird-fancier's lung, allergic granulomatous angiitis, benign lymphocytic angiitis, Alport's syndrome, alveolitis such as allergic alveolitis and fibrosing alveolitis, interstitial lung disease, transfusion reaction, leprosy, malaria, parasitic diseases such as leishmaniasis, kypanosomiasis, schistosomiasis, ascariasis, aspergillosis, Sampter's syndrome, Caplan's syndrome, dengue, endocarditis, endomyocardial fibrosis, diffuse interstitial pulmonary fibrosis, interstitial lung fibrosis, pulmonary fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, cystic fibrosis, endophthalmitis, erythema elevatum et diutinum, erythroblastosis fetalis, eosinophilic facitis, Shulman's syndrome, Felty's syndrome, flariasis, cyclitis such as chronic cyclitis, heterochronic cyclitis, iridocyclitis (acute or chronic), or Fuch's cyclitis, Henoch-Schonlein purpura, human immunodeficiency virus (HIV) infection, SCID, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), echovirus infection, sepsis, endotoxemia, pancreatitis, thyroxicosis, parvovirus infection, rubella virus infection, post-vaccination syndromes, congenital rubella infection, Epstein-Barr virus infection, mumps, Evan's syndrome, autoimmune gonadal failure, Sydenham's chorea, post-streptococcal nephritis, thromboangitis ubiterans, thyrotoxicosis, tabes dorsalis, chorioiditis, giant-cell polymyalgia, chronic hypersensitivity pneumonitis, keratoconjunctivitis sicca, epidemic keratoconjunctivitis, idiopathic nephritic syndrome, minimal change nephropathy, benign familial and ischemia-reperfusion injury, transplant organ reperfusion, retinal autoimmunity, joint inflammation, bronchitis, chronic obstructive airway/pulmonary disease, silicosis, aphthae, aphthous stomatitis, arteriosclerotic disorders, aspermiogenese, autoimmune hemolysis, Boeck's disease, cryoglobulinemia, Dupuytren's contracture, endophthalmia phacoanaphylactica, enteritis allergica, erythema nodosum leprosum, idiopathic facial paralysis, chronic fatigue syndrome, febris rheumatica, Hamman-Rich's disease, sensoneural hearing loss, haemoglobinuria paroxysmatica, hypogonadism, ileitis regionalis, leucopenia, mononucleosis infectiosa, traverse myelitis, primary idiopathic myxedema, nephrosis, ophthalmia symphatica, orchitis granulomatosa, pancreatitis, polyradiculitis acuta, pyoderma gangrenosum, Quervain's thyreoiditis, acquired spenic atrophy, non-malignant thymoma, vitiligo, toxic-shock syndrome, food poisoning, conditions involving infiltration of T cells, leukocyte-adhesion deficiency, immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes, diseases involving leukocyte diapedesis, multiple organ injury syndrome,

antigen-antibody complex-mediated diseases, antiglomerular basement membrane disease, allergic neuritis, autoimmune polyendocrinopathies, oophoritis, primary myxedema, autoimmune atrophic gastritis, sympathetic ophthalmia, rheumatic diseases, mixed connective tissue disease, nephrotic syndrome, insulinitis, polyendocrine failure, autoimmune polyglandular syndrome type I, adult-onset idiopathic hypoparathyroidism (AOIH), cardiomyopathy such as dilated cardiomyopathy, epidermolysis bullosa acquisita (EBA), hemochromatosis, myocarditis, nephrotic syndrome, primary sclerosing cholangitis, purulent or nonpurulent sinusitis, acute or chronic sinusitis, ethmoid, frontal, maxillary, or sphenoid sinusitis, an eosinophil-related disorder such as eosinophilia, pulmonary infiltration eosinophilia, eosinophilia-myalgia syndrome, Loffler's syndrome, chronic eosinophilic pneumonia, tropical pulmonary eosinophilia, bronchopneumonic aspergillosis, aspergilloma, or granulomas containing eosinophils, anaphylaxis, seronegative spondyloarthritides, polyendocrine autoimmune disease, sclerosing cholangitis, sclera, episclera, chronic mucocutaneous candidiasis, Bruton's syndrome, transient hypogammaglobulinemia of infancy, Wiskott-Aldrich syndrome, ataxia telangiectasia syndrome, angiectasis, autoimmune disorders associated with collagen disease, rheumatism, neurological disease, lymphadenitis, reduction in blood pressure response, vascular dysfunction, tissue injury, cardiovascular ischemia, hyperalgesia, renal ischemia, cerebral ischemia, and disease accompanying vascularization, allergic hypersensitivity disorders, glomerulonephritis, reperfusion injury, ischemic reperfusion disorder, reperfusion injury of myocardial or other tissues, lymphomatous tracheobronchitis, inflammatory dermatoses, dermatoses with acute inflammatory components, multiple organ failure, bullous diseases, renal cortical necrosis, acute purulent meningitis or other central nervous system inflammatory disorders, ocular and orbital inflammatory disorders, granulocyte transfusion-associated syndromes, cytokine-induced toxicity, narcolepsy, acute serious inflammation, chronic intractable inflammation, pyelitis, endarterial hyperplasia, peptic ulcer, valvulitis, and endometriosis.

In some embodiments, the method for reducing the production of the secreted IgE immunoglobulins is particularly suitable for the treatment of IgE-mediated diseases. "The term "IgE-mediated diseases" includes atopic disorders, which are characterized by a general inherited propensity to respond immunologically to many common naturally occurring inhaled and ingested antigens and the continual production of IgE antibodies. Specific atopic disorders include allergic asthma, allergic rhinitis (conjunctivitis), atopic dermatitis, food allergy, anaphylaxis, contact dermatitis, allergic gastroenteropathy, allergic bronchopulmonary aspergillosis and allergic purpura (Henoch-Schönlein). Atopic patients often have multiple

allergies, meaning that they have IgE antibodies to, and symptoms from, many environmental allergens, including seasonal, perennial and occupational allergens. Example seasonal allergens include pollens (e.g., grass, tree, rye, timothy, ragweed), while example perennial allergens include fungi (e.g., molds, mold spores), feathers, animal (e.g., pet or other animal dander) and insect (e.g., dust mite) debris. Example occupational allergens also include animal (e.g. mice) and plant antigens as well as drugs, detergents, metals and immunoenhancers such as isocyanates. Non-antigen specific stimuli that can result in an IgE-mediated reaction include infection, irritants such as smoke, combustion fumes, diesel exhaust particles and sulphur dioxide, exercise, cold and emotional stress. Specific hypersensitivity reactions in atopic and nonatopic individuals with a certain genetic background may result from exposure to proteins in foods (e.g., legumes, peanuts), venom (e.g., insect, snake), vaccines, hormones, antiserum, enzymes, latex, antibiotics, muscle relaxants, vitamins, cytotoxins, opiates, and polysaccharides such as dextrin, iron dextran and polygeline. Other disorders associated with elevated IgE levels, that appear to be IgE-mediated and are treatable with the method of the present invention include: ataxia-telangiectasia, Churg-Strauss Syndrome, eczema, enteritis, gastroenteropathy, graft-versus-host reaction, hyper-IgE (Job's) syndrome, hypersensitivity (e.g., anaphylactic hypersensitivity, candidiasis, vasculitis), IgE myeloma, inflammatory bowel disease (e.g., Crohn's disease, ulcerative colitis, indeterminate colitis and infectious colitis), mucositis (e.g., oral mucositis, gastrointestinal mucositis, nasal mucositis and proctitis), necrotizing enterocolitis and esophagitis, parasitic diseases (e.g., trypanosomiasis), hypersensitivity vasculitis, urticaria and Wiskott-Aldrich syndrome. Additionally, disorders that may be treatable by lowering IgE levels, regardless of whether the disorders themselves are associated with elevated IgE, and thus should be considered within the scope of "IgE-mediated disorder" include: Addison's disease (chronic adrenocortical insufficiency), alopecia, hereditary angioedema, anigioedema (Bannister's disease, angioneurotic edema), ankylosing spondylitis, aplastic anemia, arteritis, amyloidosis, immune disorders, such as autoimmune hemolytic anemia, autoimmune oophoritis, autoimmune orchitis, autoimmune polyendocrine failure, autoimmune hemolytic anemia, autoimmunocytopenia, autoimmune glomerulonephritis, Behcet's disease, bronchitis, Buerger's disease, bullous pemphigoid, Caplan's syndrome (rheumatoid pneumoconiosis), carditis, celiac sprue, Chediak-Higashi syndrome, chronic obstructive lung Disease (COPD), Cogan-Reese syndrome (iridocorneal endothelial syndrome), CREST syndrome, dermatitis herpetiformis (Duhning's disease), diabetes mellitus, eosinophilic fasciitis, eosinophilic nephritis, episcleritis, extrinsic allergic alveolitis, familial paroxysmal polyserositis, Felty's syndrome, fibrosing alveolitis, glomerulonephritis,

Goodpasture's syndrome, granulocytopenia, granuloma, granulomatosis, granuloma myositis, Graves' disease, Guillain-Barre syndrome (polyneuritis), Hashimoto's thyroiditis (lymphadenoid goiter), hemochromatosis, histiocytosis, hypereosinophilic syndrome, irritable bowel syndrome, juvenile arthritis, keratitis, leprosy, lupus erythematosus, Lyell's disease, 5 Lyme disease, mixed connective tissue disease, mononeuritis, mononeuritis multiplex, Muckle-Wells syndrome, mucocutaneous lymphoid syndrome (Kawasaki's disease), multicentric reticulohistiocytosis, multiple sclerosis, myasthenia gravis, mycosis fungoides, panniculitis, pemphigoid, pemphigus, pericarditis, polyneuritis, polyarteritis nodoas, psoriasis, psoriatic arthritis, pulmonary arthritis, pulmonary adenomatosis, pulmonary fibrosis, relapsing 10 polychondritis, rheumatic fever, rheumatoid arthritis, rhinosinusitis (sinusitis), sarcoidosis, scleritis, sclerosing cholangitis, serum sickness, Sézary syndrome, Sjögren's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, systemic mastocytosis, transplant rejection, thrombocytopenic purpura, thymic aplasia, uveitis, vitiligo, Wegener's granulomatosis.

In some embodiments, by reducing the production of the membrane-anchored 15 immunoglobulin (i.e. BCR), the method of the present invention is suitable for inducing the apoptosis of malignant B cells. Thus the method of the present invention is thus particularly suitable for the treatment of B cell malignancies. As used herein, the term "B-cell malignancy" includes any type of leukemia or lymphoma of B cells. The term "B cell lymphoma" refers to a cancer that arises in cells of the lymphatic system from B cells. B cells are white blood cells 20 that develop from bone marrow and produce antibodies. They are also known as B lymphocytes. B-cell malignancies include, but are not limited to, non-Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, small lymphocytic lymphoma, primary effusion lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, splenic marginal zone lymphoma, MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma, hairy cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia, B-cell prolymphocytic 25 leukemia, B cell lymphomas (e.g. various forms of Hodgkin's disease, B cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and related lymphomas (e.g. Waldenstrom's macroglobulinaemia (also called lymphoplasmacytic lymphoma or immunocytoma) or central nervous system lymphomas), leukemias (e.g. acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia (CLL; also termed B cell chronic lymphocytic leukemia BCLL), hairy cell leukemia 30 and chronic myeloid leukemia) and myelomas (e.g. multiple myeloma). Additional B cell malignancies include, lymphoplasmacytic lymphoma, plasma cell myeloma, solitary plasmacytoma of bone, extraosseous plasmacytoma, extra-nodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa-associated (MALT) lymphoid tissue, nodal marginal zone B cell lymphoma, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, , mediastinal (thymic) large B cell

lymphoma, intravascular large B cell lymphoma, primary effusion lymphoma, Burkitt's lymphoma/leukemia, grey zone lymphoma, B cell proliferations of uncertain malignant potential, lymphomatoid granulomatosis, and post-transplant lymphoproliferative disorder.

As used herein, the terms “treating” or “treatment” refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of subject at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as subject who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a subject during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a subject during treatment of an illness, e.g., to keep the subject in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., pain, disease manifestation, etc.]).

A “therapeutically effective amount” is intended for a minimal amount of the active agent (i.e the ASO of the present invention) which is necessary to impart therapeutic benefit to a subject. For example, a "therapeutically effective amount" to a subject is such an amount which induces, ameliorates or otherwise causes an improvement in the pathological symptoms, disease progression or physiological conditions associated with or resistance to succumbing to a disorder. It will be understood that the total daily usage of the compounds of the present

invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific compound employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

Typically, the antisense oligonucleotide of the present invention is administered in the form of a pharmaceutical composition. Pharmaceutical compositions of the present invention may also include a pharmaceutically or physiologically acceptable carrier such as saline, sodium phosphate, etc. The compositions will generally be in the form of a liquid, although this need not always be the case. Suitable carriers, excipients and diluents include lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, starches, gum acacia, calcium phosphates, alginate, tragacanth, gelatin, calcium silicate, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, cellulose, water syrup, methyl cellulose, methyl and propylhydroxybenzoates, mineral oil, etc. The formulations can also include lubricating agents, wetting agents, emulsifying agents, preservatives, buffering agents, etc. Those of skill in the art will also recognize that nucleic acids are often delivered in conjunction with lipids (e.g. cationic lipids or neutral lipids, or mixtures of these), frequently in the form of liposomes or other suitable micro- or nano-structured material (e.g. micelles, lipocomplexes, dendrimers, emulsions, cubic phases, nanoparticles, etc.).

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

FIGURE 1. Decreased IgE production upon passive administration of ASO targeting the secreted immunoglobulin poly-adenylation signal (PAS) sequence. **A.** U266 cells were treated with 6 μ M Vivo-Morpholino Standard-Control ASO (CTRL) or IgE-PAS targeting ASO for 48 hours. **B.** Specific secreted IgE RT-qPCR normalized on untreated cells was performed on 48 hours total RNA, n=7. **C.** Total IgE ImmunoCAP assay showing IgE production in culture supernatants, n=7. **D.** Reads exon coverage aligned on IGHE gene. Representative alignment of n=4 per group. Student T-test, **p<0.01, ****p<0.0001.

FIGURE 2. Drastic decrease of IgE production upon treatment of primary cells secreting human IgE. InEps mice has been described previously (Laffleur B et al, Cell Reports 2015). Spleen cells were cultivated at 1x10⁶ cells/mL for 3 days with 1 μ g/mL LPS and treated at day 1 with 1 μ M hydroxy-tamoxifen and 2 μ M Vivo-Morpholino Standard-Control ASO (CTRL) or IgE-PAS targeting ASO for 48 hours. **A.** Representation of InEps mice Igh locus, these mice were bred with CreERT2 mice. Cre recombination is allowed by hydroxy-tamoxifen in-vitro treatment. **B.** Specific secreted-IgE and membrane-IgE RT-qPCR normalized on cells treated with hydroxy-tamoxifen only were performed on day 3 total RNA, n=5. **C.** B220+ cells were analyzed by flow cytometry at day 3 for intracellular-IgE expression **D.** B220+ IgE+ Cells analyzed by flow cytometry are significantly decreased upon ASO treatment, n=3 **E.** Total IgE ImmunoCAP assay showing IgE production in culture supernatants n=5. Student T-test, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.

FIGURE 3. Decrease allergen-specific IgE expression upon treatment of InEps hybridoma cells. Hybridomas (allergen-specific InEps B cells merged with SP2/0 cell line) were kindly provided by Dr A. Cuvillier (B-Cell Design company) and cultured for 48 hours with 3 μ M Vivo-Morpholino Standard-Control ASO (CTRL) or IgE-PAS targeting ASO. **A.** Total IgE ImmunoCAP assay showing IgE production in culture supernatants, n=4. **B.** Specific secreted IgE RT-qPCR normalized on control treated cells was performed on 48 hours total RNA, n=4. **C.** Specific membrane-anchored IgE RT-qPCR normalized on control treated cells was performed on 48 hours total RNA, n=4. Student T-test, ns. non-significant, *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001.

FIGURE 4. Design of specific human Ig-PAS ASOs. Specific human Ig-PAS ASO sequences and Ig PAS sequence alignments. Alignments show a 100% homology between IgA1 and IgA2. IgG-PAS ASO is covering IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 sequence with 100% homology, avoiding mismatch between these 4 sequences. IgE, IgM, IgA and IgG-PAS

sequences don't show a significant similarity between one another. Ig PAS sequences were collected from NCBI database, GRCh38.p12 assembly, 20 base pairs upstream to 20 base pairs downstream from secreted Ig PAS on IGH locus. Multiple sequence alignments were made using MView bioinformatic tool.

5 **FIGURE 5. Design of specific human Ig-PAM ASOs.** Specific human Ig-PAM ASO sequences and Ig PAM sequence alignments. Ig PAM sequences were collected from NCBI database, GRCh38.p12 assembly, 20 base pairs upstream to 20 base pairs downstream from secreted Ig PAM on IGH locus. Multiple sequence alignments were made using MView bioinformatic tool.

10 **FIGURE 6. Decreased membrane IgA expression upon passive administration of ASO targeting the membrane immunoglobulin poly-adenylation signal (PAM) sequence.**
 A. AMO-1 cells were treated with 3 μ M Vivo-Morpholino Standard-Control ASO (CTRL) or IgA-PAM targeting ASO for 48 hours and membrane IgA expression was measured by RT-qPCR on total RNA. **B.** IgA#6 hybridoma cells derived from transgenic mice expressing
 15 humanized IgA1 were treated with 6 μ M Vivo-Morpholino Standard-Control ASO (CTRL) or IgA-PAM targeting ASO for 48 hours and membrane IgA expression was measured by RT-qPCR on total RNA

EXAMPLE:

20 **Methods**

ASO design

Secreted immunoglobulin polyadenylation signal sequences (PAS) were collected from NCBI, GRCh38.p12 assembly, 20 base pairs upstream to 20 base pairs downstream from secreted Ig PAS on IGH locus. Multiple sequence alignments were made using MView
 25 bioinformatic tool. Vivo-morpholino IgE-PAS ASO (5'-GCTCTGAGCAGGCACAGTTTATTG- 3') (SEQ ID NO:14), Vivo-morpholino IgA-PAM ASO (5' - GGGCCACTTTATTGCACCTGGAAGG- 3') (SEQ ID NO:26) and irrelevant VivoStandard Control ASO (5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') (SEQ ID NO:27) were designed and purchased at Gene Tools, LLC. ASO stock solutions were made at 5mM
 30 with sterile nuclease-free water.

Mice

The InEps mouse model, harboring an insertion of a floxed human C μ gene followed by a human C ϵ gene at the IgH locus, has been previously described (Laffleur et al, Cell Reports 2015). These mice were crossed with CreERT2 mice in order to induce Tamoxifen dependent expression of human IgE. Nine- to ten-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 (No. CREEAL 6-07-2012).

Cell culture and ASO treatments

U266 cell line was cultivated in RPMI1640 medium with Ultraglutamine and 20% FBS at 37°C with 5% CO₂ and treated for 48 hours with 6 μ M ASO. AMO-1 cell line was cultivated in RPMI1640 medium with Ultraglutamine and 10% FBS at 37°C with 5% CO₂ and treated for 48 hours with 3 μ M ASO. Allergen-specific InEps hybridoma cell lines (anti-Penicillin, anti-Wasp Venom and anti-Ovalbumin) and IgA#6 hybridoma cells lines were kindly provided by Dr A. Cuvillier (B-Cell Design company) and cultured for 48 hours in DMEM Glutamax, high glucose medium 10% FBS at 37°C with 5% CO₂ with 3 μ M ASO (InEps) or 6 μ M (IgA#6) ASO. Splenic B cells isolated from InEps/CreERT2+ mice were stimulated (1 \times 10⁶ cells/ml) with 1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) (LPS-EB Ultrapure; InvivoGen) in RPMI 1640 medium with 10% FBS. At day 1, cells were treated for 48 hours with 1 μ M Hydroxy-tamoxifen (Sigma H7904) and 2 μ M ASO.

Flow Cytometry

InEps spleen cells were briefly washed with Trypsin-EDTA 0.05% (Gibco) to remove passively bound IgE before staining. Intracellular IgE staining was performed with IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter), using FITC anti-human IgE (A80-108F Bethyl Laboratories) and BV421 anti-mouse B220 (RA3-6B2 BioLegend). Data were acquired on a Beckton Dickinson LSRII Fortessa cytometer and analyzed with FlowLogic software.

Immuno-Assays

IgE concentrations were determined in culture supernatants by Total IgE ImmunoCap (ThermoFisher Diagnostic) assay on a Phadia250 instrument.

RT-qPCRs

Total RNA was prepared using Tri-reagent (Invitrogen) procedures. RT-PCR was carried out on 1µg DNase I (Invitrogen)-treated RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). Priming for reverse transcription was done with Oligo(dT)₂₀ (Invitrogen). Quantitative PCRs were performed on cDNA samples equivalent to 5-10 ng of RNA per reaction, using SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), ROX plus or Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), ROX plus (Takara) 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 (Hs02758991_g1 ThermoFisher Scientific Probe) or Gapdh (Mm99999915_g1 ThermoFisher Scientific Probe). For the quantification of secreted-IgE mRNA amounts, SYBR quantitative PCR were performed with forward 5'-CGAGCGGTGTCTGTAAATCC (SEQ ID NO:28) and reverse 5'-CACTGCACAGCTGGATGG (SEQ ID NO:29) primers. Membrane-IgE transcript mRNAs were quantified using Taqman quantitative PCR with an M1-M2 exon spanning probe designed and purchased at ThermoFisher Scientific. For the quantification of membrane-IgA mRNA amounts, SYBR quantitative PCR were performed with forward 5'-CCTTCGCTGTGACCAGCATA (SEQ ID NO:30) and reverse 5'-GTCCAGCACCACATAGGGAG (SEQ ID NO:31) primers.

Exon coverage Analysis

Poly-adenylated mRNA-sequencing was performed on the Illumina NextSeq500 at the Functional Genomics Platform of Nice (Valbonne-Sophia-Antipolis, France). Reads were aligned with STAR on the hg38 genome version during the primary analysis. IGHE reads visualization was performed on IGV software.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM), and overall differences between variables were evaluated by Student t test using Prism GraphPad software (San Diego, CA).

Results

Immunoglobulins (Ig) are expressed either on the surface of B cells or as secreted antibodies by plasma cells that represents the final stage of B cell differentiation. The proof of concept has been obtained using an ASO hybridizing to the polyadenylation signal (PAS) sequence of the transcript encoding the secreted form of IgE. Indeed, the targeting of this PAS

sequence induces a drastic decrease in IgE production (**Figures 1A-1D, figures 2A-2E and figures 3A-3C**). The particular configuration of the Ig heavy (IGH) chain locus makes it possible to mask the secreted poly-A site (PAS) of a particular subclass of Ig while promoting the use of an alternative polyadenylation signal encoding the membrane form of the corresponding Ig (**Figure 4**). In the case of IgE, a previous study by the team demonstrated that membrane-anchored IgE expression has a pro-apoptotic effect in B cells (Laffleur et al, Cell Reports 2015). The overproduction of allergen-specific secreted IgE is one of the established features of many forms of allergies including chronic allergic asthma or some food or skin allergies (Platts-Mills et al J Allergy Clin Immunol 2016). This invention could be extended to other Ig subclasses (i.e. IgM, IgG or IgA) and to membrane-anchored polyadenylation signals (PAM), and hence, should have broad clinical applications in B-cell malignancies and antibody-mediated pathologies (**Figure 5**).

Figures 6A and 6B show decreased membrane IgA expression upon passive administration of ASO targeting the membrane immunoglobulin poly-adenylation signal (PAM) sequence.

15

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

20

CLAIMS:

1. A method of modulating the expression of an immunoglobulin in a subject in need thereof comprising administering to the subject an effective amount of:
 - 5 - an antisense oligonucleotide complementary to a sequence comprising the secretory polyadenylation signal within the pre-mRNA molecule encoding for the immunoglobulin heavy chain for reducing the production of the secreted immunoglobulin or
 - 10 - an antisense oligonucleotide complementary to a sequence comprising the membrane-anchored specific polyadenylation signal within the pre-mRNA molecule encoding for the immunoglobulin heavy chain for reducing the production of the membrane-anchored immunoglobulin.
2. The method of claim 1 wherein the immunoglobulin is an IgG, IgA, IgM, or IgE.
3. The method of claim 1 wherein the antisense oligonucleotide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or the sequence as set forth in SEQ ID NO:3.
- 15 4. The method of claim 1 wherein the antisense oligonucleotide has a length of at least 15 nucleotides.
5. The method of claim 4 wherein the antisense oligonucleotide has a length of 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, or 30 nucleotides.
- 20 6. The method of claim 1 wherein the antisense oligonucleotide is complementary to the sequence as set forth in SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, or SEQ ID NO:11.
7. The method of claim 6 wherein the antisense oligonucleotide comprises a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:15.
- 25 8. The method of claim 1 wherein the antisense oligonucleotide is complementary to the sequence as set forth in SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, or SEQ ID NO:23.

9. The method of claim 8 wherein the antisense oligonucleotide comprises a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, and SEQ ID NO:26.
 10. The method of claim 1 wherein the antisense oligonucleotide is stabilized.
 - 5 11. The method of claim 1 wherein the subject suffers from a disease associated to B-cell development.
 12. The method of claim 11 wherein the subject suffers from autoimmunity or inflammation.
 13. The method of claim 1 wherein the subject suffers from an IgE-mediated disease.
 - 10 14. The method of claim 1 wherein the subject suffers from a B cell malignancy.
 15. An antisense oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, and SEQ ID NO:26.
 16. A pharmaceutical composition comprising the antisense oligonucleotide of claim 15.
- 15

ABSTRACT OF THE INVENTION**METHODS FOR MODULATING IMMUNOGLOBULIN EXPRESSION**

5

Immunoglobulins (Ig) are expressed either on the surface of B cells or as secreted antibodies by plasma cells that represents the final stage of B cell differentiation. The present invention involves the use of antisense oligonucleotides (ASOs) for either reducing the production of the secreted form or either reducing the production of the membrane form. In particular, the inventors show that antisense oligonucleotides masking the secretory polyadenylation signal induce a decrease in the production of the secreted immunoglobulin. Inversely, antisense oligonucleotides masking the membrane polyadenylation signal induce a decrease in the production of the membrane-anchored immunoglobulin. The proof of concept has been obtained using an ASO hybridizing to the polyadenylation signal (PAS) sequence of the transcript encoding the secreted form of IgE. Indeed, the targeting of this PAS sequence induces a drastic decrease in IgE production. Thus the choice of the right antisense oligonucleotide would be suitable for the treatment of diseases associated to B-cell development (e.g. autoimmune diseases, inflammation or B-cell malignancies).

10
15

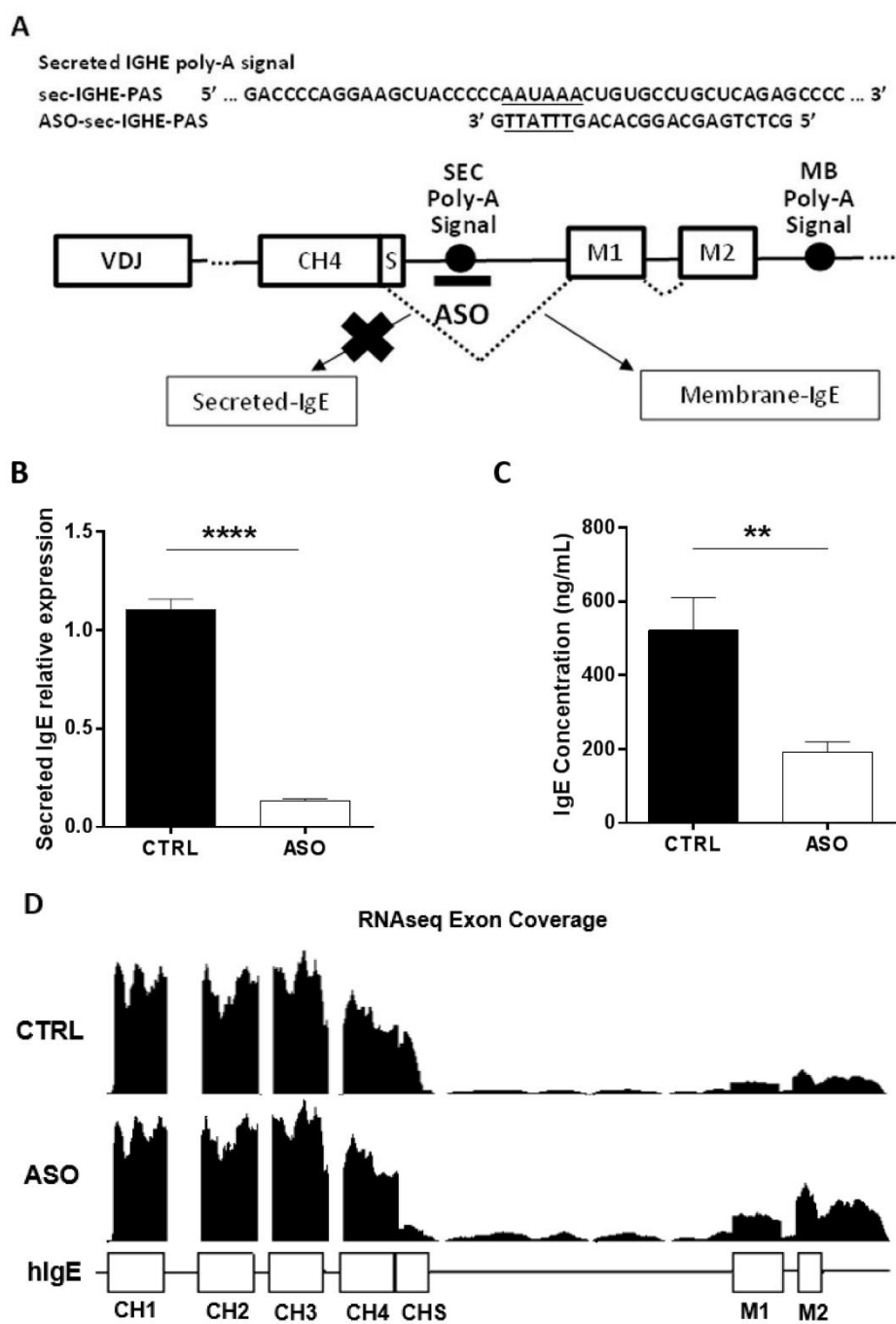


Figure 1A-ID

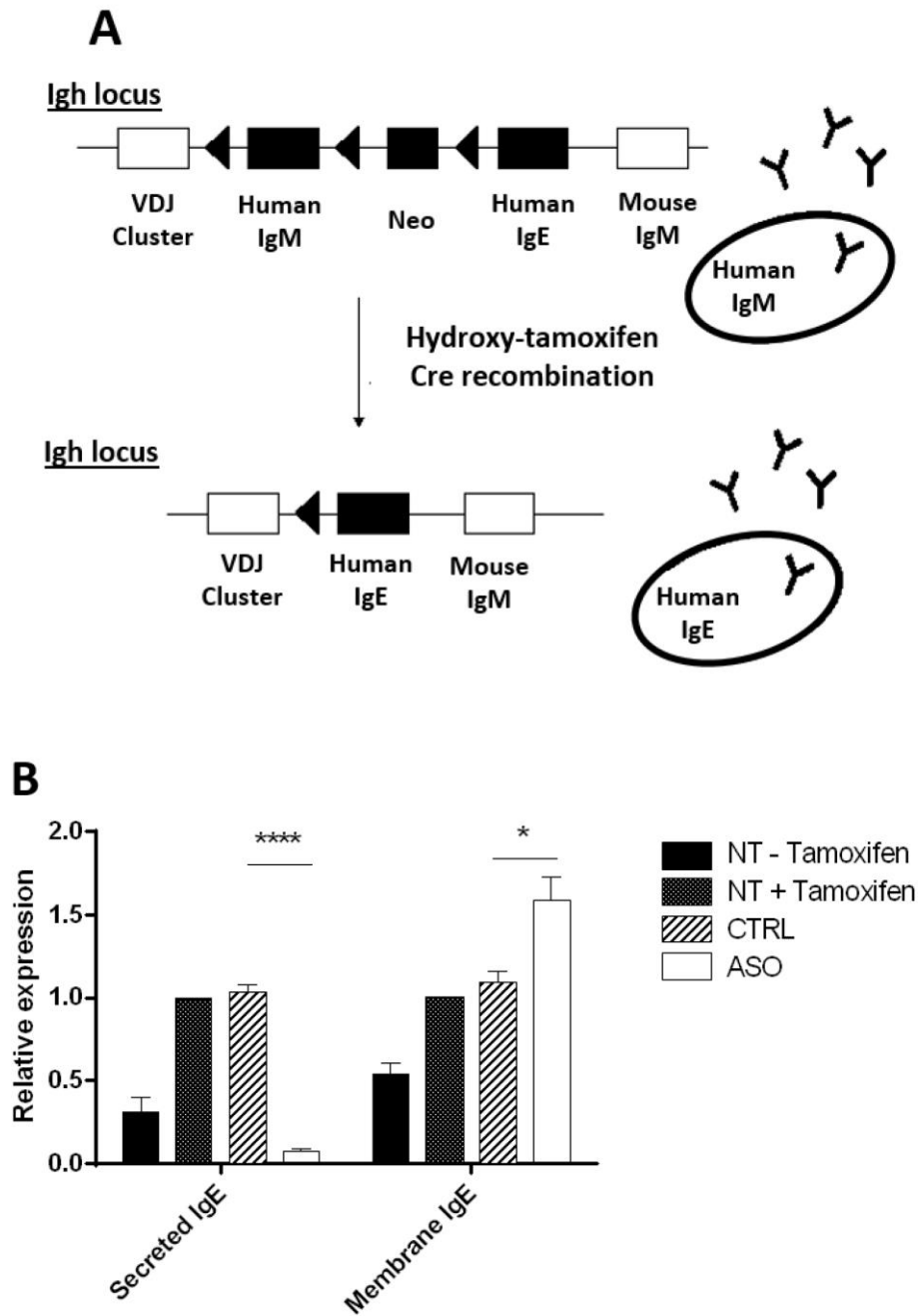


Figure 2A and 2B

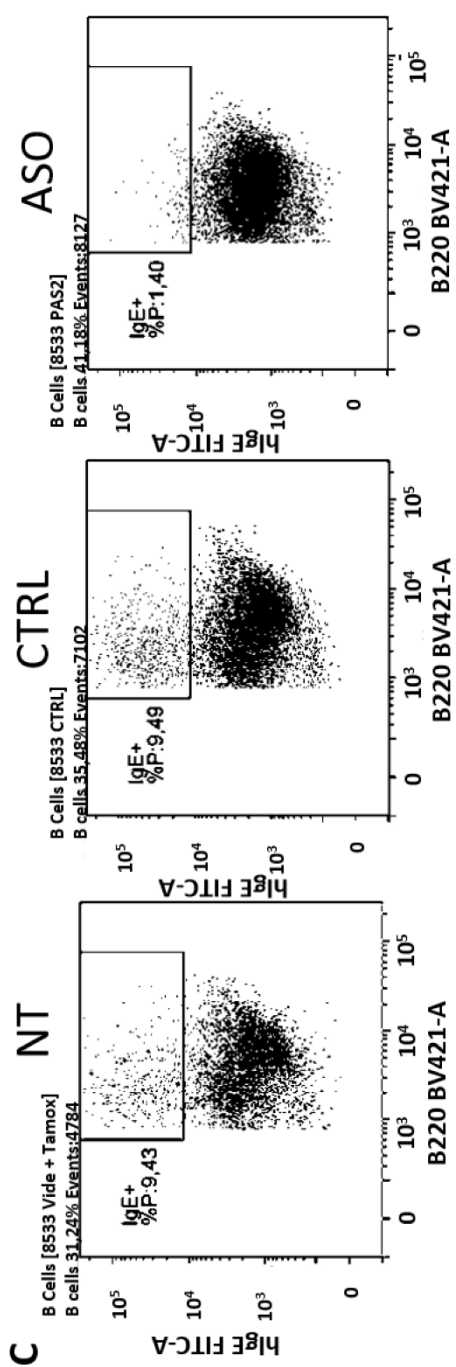
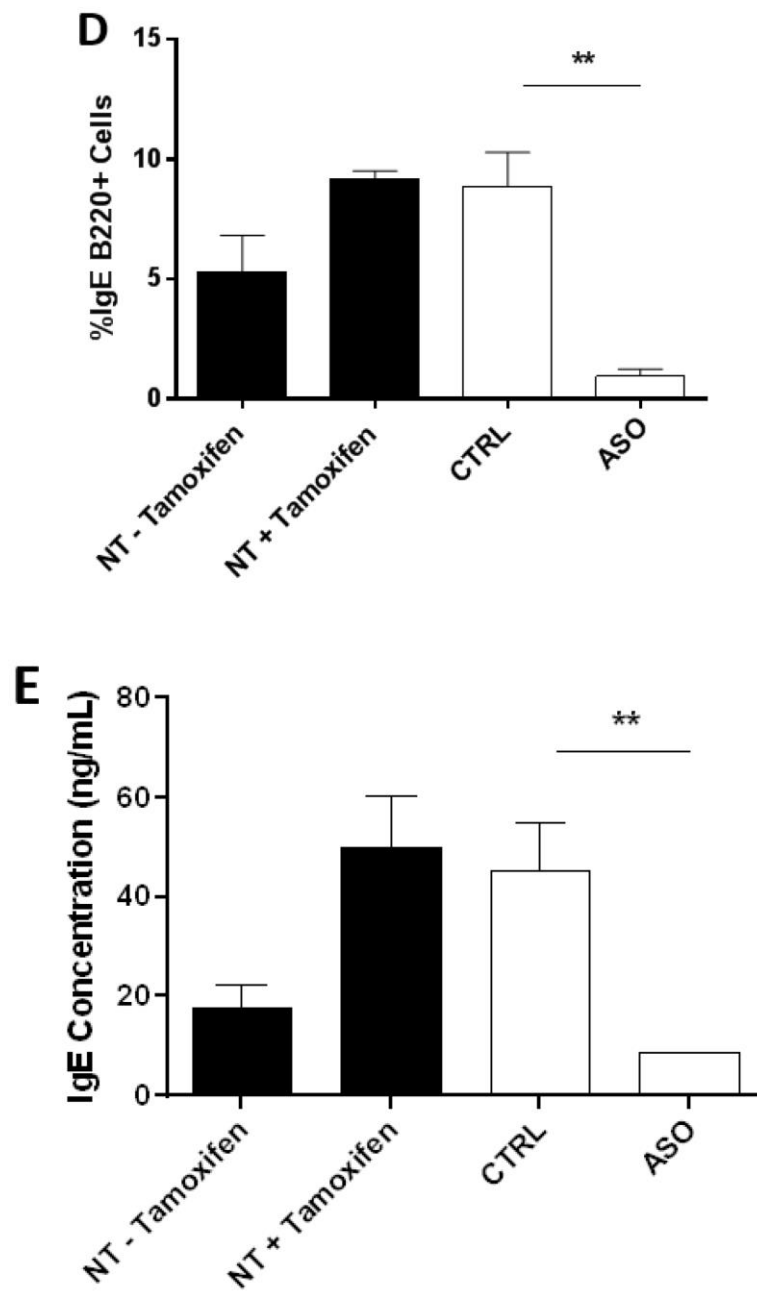


Figure 2C



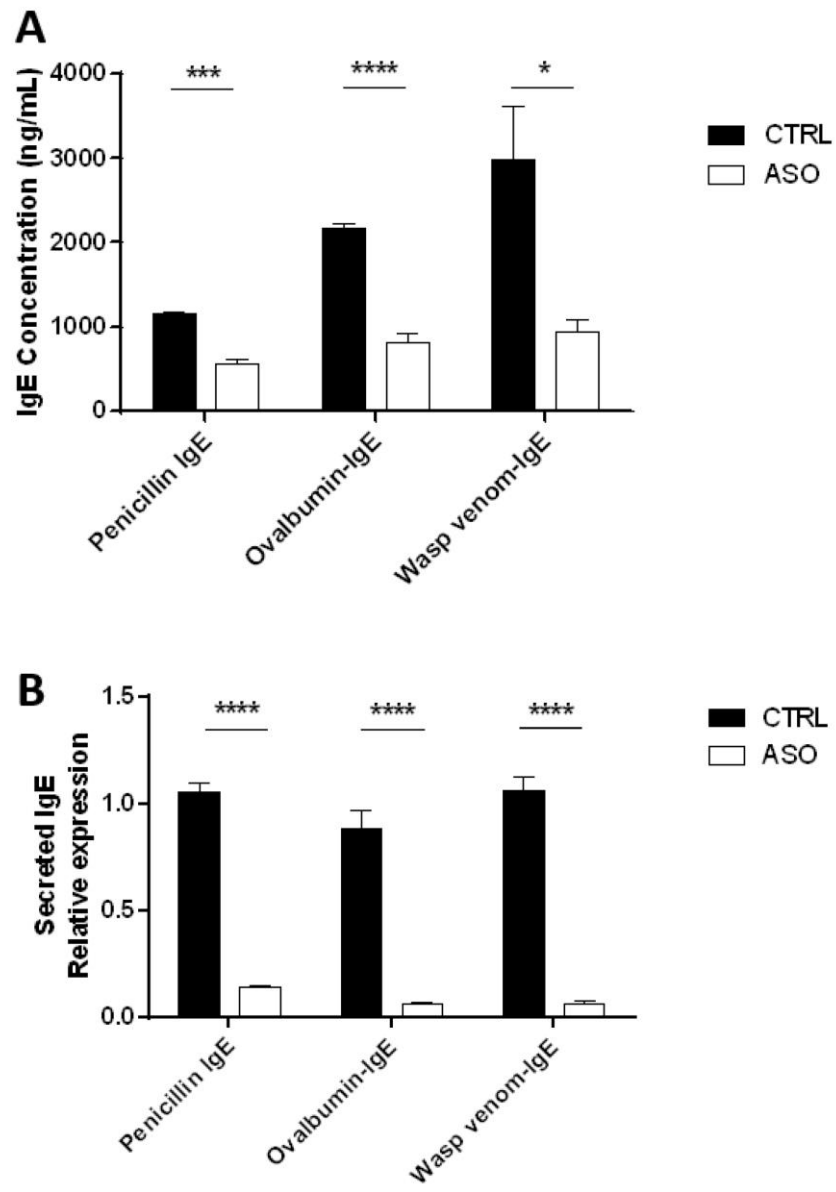


Figure 3A and 3B

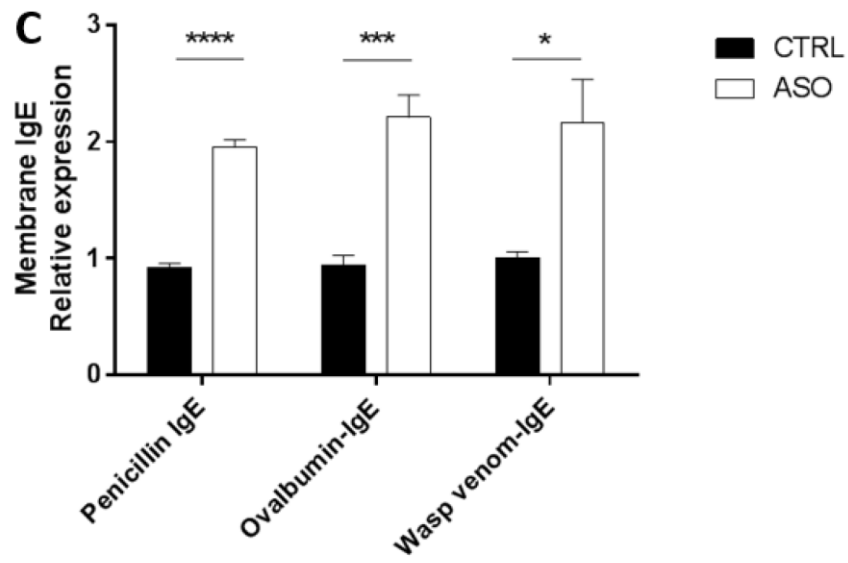


Figure 3C

IgM-PAS

	cov	pid	1 [3'-TCTTTATTTTCTAGGTAAGTTTC] 46
PAS_IGHM	100.0%	100.0%		TTCATCTTAATAAAATTAGAAAATAAAGATCCATTCAAAAGATAC	
PAS_IGHE	100.0%	34.8%		GACCCAGGAAGCTACCCCAAATAACTGTGCCTGCTCAGAGCCCC	
PAS_IGHA1	100.0%	26.1%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	
PAS_IGHA2	100.0%	26.1%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	
PAS_IGHG1	100.0%	32.6%		TCCAGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTTCCCTGGG	
PAS_IGHG2	100.0%	30.4%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG3	100.0%	30.4%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG4	100.0%	30.4%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	

IgG-PAS

	cov	pid	1 [3'-GTACCTTATTTCTGGGTCGCG] 46
PAS_IGHG1	100.0%	100.0%		TCCAGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG2	100.0%	95.7%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG3	100.0%	95.7%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG4	100.0%	93.5%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHM	100.0%	32.6%		TTGCATCTTATAAATAATTAGAAAATAAAGATCCATTCAAAGATAC	
PAS_IGHE	100.0%	19.6%		GACCCAGGAAGCTACCCCAAATAACTGTGCCTGCTCAGAGCCCC	
PAS_IGHA1	100.0%	34.8%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	
PAS_IGHA2	100.0%	34.8%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	

IgE-PAS

	cov	pid	1 [3'-GTTATTGACACGGACGAGTCTCG] 46
PAS_IGHE	100.0%	100.0%		GACCCAGGAAGCTACCCCAAATAACTGTGCCTGCTCAGAGCCCC	
PAS_IGHA1	100.0%	43.5%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	
PAS_IGHA2	100.0%	43.5%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	
PAS_IGHM	100.0%	34.8%		TTGCATCTTATAAATAATTAGAAAATAAAGATCCATTCAAAGATAC	
PAS_IGHG1	100.0%	19.6%		TCCAGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTTCCCTGGG	
PAS_IGHG2	100.0%	19.6%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG3	100.0%	19.6%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG4	100.0%	21.7%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	

IgA-PAS

	cov	pid	1 [3'-ACTTATTGAGGTACGAGGG] 46
PAS_IGHA1	100.0%	100.0%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	
PAS_IGHA2	100.0%	100.0%		CCCGCTGTCCCACCCCTGAAATAACTCCATGCTCCCCAAGCAG	
PAS_IGHG1	100.0%	34.8%		TCCAGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTTCCCTGGG	
PAS_IGHG2	100.0%	34.8%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG3	100.0%	34.8%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHG4	100.0%	34.8%		TCCGGGCACCCAGCATGGAAAATAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGG	
PAS_IGHM	100.0%	26.1%		TTGCATCTTATAAATAATTAGAAAATAAAGATCCATTCAAAGATAC	
PAS_IGHE	100.0%	43.5%		GACCCAGGAAGCTACCCCAAATAACTGTGCCTGCTCAGAGCCCC	

Figure 4

IgM-PAM

	cov	pid	1 [3'-ACAACGGGACTTTATTTATACGTGT] 46
1 PAM_IGHM	100.0%	100.0%	G A A C G C T G T G C C C G A A A A A A G C A C A T T T A T C C A G A
2 PAM_IGHG1	100.0%	41.3%	G A T G T T C T T G T G A T G A C A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
3 PAM_IGHG2	100.0%	41.3%	G A T G T T C T T G T G A T G A C A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
4 PAM_IGHG3	100.0%	41.3%	G A T G T T C T T G T G A T G A C A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
5 PAM_IGHG4	100.0%	41.3%	G A T G T T C T T G T G A T G A C A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
6 PAM_IGHE	100.0%	37.0%	T C T T C T C T C T G G G T T T C T T A G A A A G A C C T T T C A C A A A C C C A
7 PAM_IGHA1	100.0%	30.4%	C T C A C A T G C C T T C C A G G T G C A A A A A G T G G C C C A A G G A A A T G T
8 PAM_IGHA2	100.0%	30.4%	C T C A C G T G G C T T C C A G G T G C A A A A A G T G G C C C A A G G A A A T G T

IgG-PAM

	cov	pid	1 [3'-AAAACACTACTGTTATTTATAGGA] 46
1 PAM_IGHG1	100.0%	100.0%	G A G T T C T T T G A T G A C A A A A A A C C T T T T A A G C T G T
2 PAM_IGHG2	100.0%	100.0%	G A G T T C T T T G A T G A C A A A A A A C C T T T T A A G C T G T
3 PAM_IGHG3	100.0%	100.0%	G A G T T C T T T G A T G A C A A A A A A C C T T T T A A G C T G T
4 PAM_IGHG4	100.0%	100.0%	G A G T T C T T T G A T G A C A A A A A A C C T T T T A A G C T G T
5 PAM_IGHM	100.0%	41.3%	G T A T A C G C T G T G C C C T G A A A A A T A T G C A C A T T T A T C C A G A
6 PAM_IGHE	100.0%	41.3%	T C T T C T C T C T G G G T T T C T T A G A A A G A T C C T T T C A C A A C C C A
7 PAM_IGHA1	100.0%	34.8%	C T C A C A T G C C T T C C A G G T G C A A A A A G T G G C C C A A G G A A A T G T
8 PAM_IGHA2	100.0%	34.8%	C T C A C G T G G C T T C C A G G T G C A A A A A G T G G C C C A A G G A A A T G T

IgA-PAM

	cov	pid	1 [3'-GGAAGTCCACGTATTTACCCGGG] 46
1 PAM_IGHA1	100.0%	100.0%	C T C A C A T G C C T T C C A G G T G C A A A A A G T G G C C C A A G G A A A T G T
2 PAM_IGHA2	100.0%	95.7%	C T C A C G T G G C T T C C A G G T G C A A A A A G T G G C C C A A G G A A A T G T
3 PAM_IGHG1	100.0%	34.8%	G A T G T T C T T T G T G A T G A C A A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
4 PAM_IGHG2	100.0%	34.8%	G A T G T T C T T T G T G A T G A C A A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
5 PAM_IGHG3	100.0%	34.8%	G A T G T T C T T T G T G A T G A C A A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
6 PAM_IGHG4	100.0%	34.8%	G A T G T T C T T T G T G A T G A C A A A A A A T A T C C T T T T A A G T C T G T
7 PAM_IGHM	100.0%	30.4%	G T A T A C G C T T G T G C C T G A A A A A T A T G C A C A T T T A T C C A T G A
8 PAM_IGHE	100.0%	28.3%	T C T T C T C T C T G G G T T T C T T A G A A A G A T C C T T T C A C A A C C C A

Figure 5

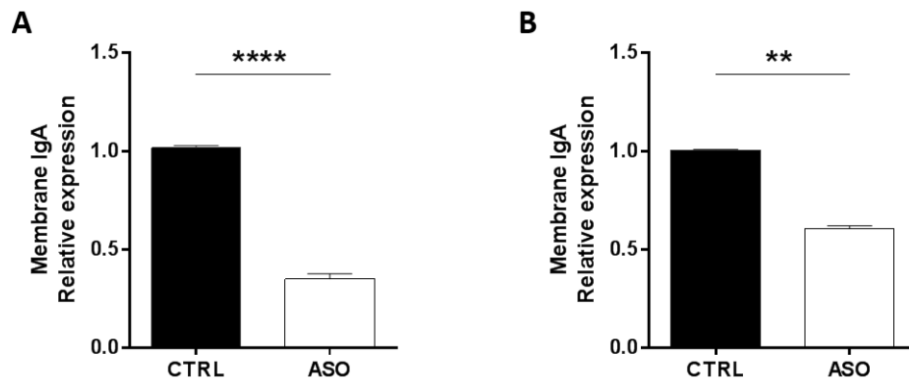


Figure 6A and 6B

Annexe 2. Article : Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells



ARTICLE

Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells

Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srour⁴, Jean-Marie Lambert¹, Anne Marchalot¹, Ophélie Martin¹, Sandrine Le Noir¹, Eric Pinaud¹, Maria Victoria Ayala¹, Christophe Sirac¹, Jérôme Saulière¹, Jérôme Moreaux², Michel Cogné^{1,3} and Laurent Delpy¹

The error-prone V(D)J recombination process generates considerable amounts of nonproductive immunoglobulin (Ig) pre-mRNAs. We recently demonstrated that aberrant Ig chains lacking variable (V) domains can be produced after nonsense-associated altered splicing (NAS) events. Remarkably, the expression of these truncated Ig polypeptides heightens endoplasmic reticulum stress and shortens plasma cell (PC) lifespan. Many questions remain regarding the molecular mechanisms underlying this new truncated Ig exclusion (TIE-) checkpoint and its restriction to the ultimate stage of B-cell differentiation. To address these issues, we evaluated the extent of NAS of Ig pre-mRNAs using an Ig heavy chain (IgH) knock-in model that allows for uncoupling of V exon skipping from TIE-induced apoptosis. We found high levels of V exon skipping in PCs compared with B cells, and this skipping was correlated with a biallelic boost in IgH transcription during PC differentiation. Chromatin analysis further revealed that the skipped V exon turned into a pseudo-intron. Finally, we showed that hypertranscription of Ig genes facilitated V exon skipping upon passive administration of splice-switching antisense oligonucleotides (ASOs). Thus, V exon skipping is coupled to transcription and increases as PC differentiation proceeds, likely explaining the late occurrence of the TIE-checkpoint and opening new avenues for ASO-mediated strategies in PC disorders.

Keywords: Immunoglobulin; Exon skipping; Plasma cells; Antisense Oligonucleotides; Nonsense-associated altered splicing

Cellular & Molecular Immunology _____; <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0160-6>

INTRODUCTION

During the V(D)J recombination process, 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.^{1,2} The nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway is very active in B-lineage cells and ensures the rapid degradation of PTC-containing Ig mRNAs, limiting the synthesis of truncated Ig polypeptides.^{3–6}

Whereas NMD basically protects cells from truncated protein synthesis, the activation of another RNA surveillance pathway referred as nonsense-associated altered splicing (NAS) can exert opposite effects and yield internally deleted mRNAs and proteins.^{7–9} We previously observed that the presence of nonsense codons within the variable (V) exon enhanced exon skipping and the production of Igκ light chains without V domains (Δ V- κ LCs).^{5,10} Remarkably, these truncated Ig chains exhibited toxic effects and induced endoplasmic reticulum (ER) stress-associated apoptosis in antibody-secreting cells.¹⁰ Hence, the production of Δ V- κ LCs blunts plasma cell (PC) differentiation

through activation of an antigen-independent process known as the truncated Ig Exclusion (TIE-) checkpoint. This novel PC checkpoint modifies the Ig repertoire by eliminating terminally differentiated cells harboring biallelic Igκ 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.

Because the TIE-checkpoint provokes PC death as a consequence of 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.¹⁰ To overcome this issue and decipher how exon skipping events are regulated during PC differentiation, we utilized a mouse model harboring an additional frameshift-inducing V exon (frVk) at the Ig heavy (IgH) chain locus.^{11,12} Using this dedicated model, skipping of the supplemental frVk 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

¹Unité 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; ²Institute of Human Genetics, CNRS-UM UMR9002, Department of Biological Haematology, CHU Montpellier, University of Montpellier, UFR Médecine, Montpellier, France and ³Institut Universitaire de France, Université de Limoges, Limoges, France

Correspondence: Laurent Delpy (laurent.delpy@unilim.fr)

⁴Present address: Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, 3755 Cote Ste-Catherine Road, Montreal, QC H3T 1E2, Canada

These authors contributed equally: Mohamad Omar Ashi, Nivine Srour.

Received: 30 April 2018 Accepted: 7 July 2018

Published online: 20 August 2018

assessed whether V exon skipping was achievable with splice-switching antisense oligonucleotides (ASOs). The proof of the concept for ASO-mediated V exon skipping should thus open new avenues for "inducible-TIE" therapeutic approaches in PC dyscrasias.

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.^{11,12} 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.⁶ By contrast, the activation of the NAS pathway can yield functional IgH chains by eliminating the frVκ exon from transcripts with in-frame VDJ junctions (Fig. 1a).

In IgH^{wt/frVκ} mice with a mixed B6/129 background, allotypic differences allowed for us 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 the 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. 1b, d). Interestingly, we found significant amounts of IgM^a in sera from IgH^{wt/frVκ} mice, albeit diminished compared with F1 (B6/129) mice in which ~50% of the B-lineage cells express a functional IgHa allotype (Fig. 1c). 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 this quantification, 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.¹³ The expression of *LMP2A* drives B-cell development and PC differentiation.^{13,14} In heterozygous IgH^{DH-LMP2A/frVκ} mice, VDJ-rearranged IgH transcripts arise solely from the nonproductive IgH^{frVκ} allele, facilitating the analysis of NAS of IgH^{frVκ} pre-mRNAs. B cells (B220⁺/CD138⁻) and PCs (B220⁻/CD138⁺) were isolated from the spleens of IgH^{DH-LMP2A/frVκ} mice (Fig. 2a), and RT-PCR analysis revealed high alt-mRNA amounts in PCs whereas a faint band was detected in B cells (Fig. 2b). Next, the rate of NAS of IgH^{frVκ} transcripts was determined by qPCR and corresponded to alt-mRNA/pre-mRNA ratios. Likewise, this NAS rate was strongly increased in PCs compared with B cells (Fig. 2c). We then analyzed the VDJ repertoire of alt-mRNAs, as described.¹⁵ Highly diverse productive CDR3 junctions were obtained among the 11,506 clonotypes identified using IMG/HighV-QUEST¹⁶ (Fig. 2d). In addition, VDJ junctions involved numerous VH and DH families and all the JH segments (Supplementary Fig. 1). The near absence (0.35%) of nonproductive CDR3 junctions reflected the strong degradation of PTC-containing Igμ mRNAs⁶ and the coupling of the NMD and NAS pathways.¹⁷ 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 studies have reported that the rate of transcription by RNA polymerase II (RNAPII) can regulate alternative splicing.^{18,19} To

address this question, the transcription of nonproductive IgH^{frVκ} 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. 3a). Consistent with the increase in Ig gene transcription during PC differentiation,²⁰ we found approximately threefold more IgH^{frVκ} pre-mRNA levels in PCs than in B cells (Fig. 3b). 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. 3c, 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. 3e). 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).²¹ 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; Supplementary Table 1). 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 as identified by gene set expression analysis.

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 frVκ exon

To evaluate the interplay between NAS and chromatin structure, a comparative analysis of specific histone H3 marks was conducted among the alternative frVκ exon, constitutive CH1μ exon, and intronic "JH-Eμ" sequence (Fig. 5a). ChIP experiments were performed using anti-H3K4me3, H3K9me3, H3K9ac, and H3K36me3 antibodies in LPS-stimulated B cells isolated from IgH^{wt/frVκ} mice. H3K4me3, H3K9ac, and H3K36me3 marks are associated with transcriptional activation, whereas H3K9me3 is linked to transcriptional repression.^{22,23} Remarkably, the alternative frVκ exon and the "JH-Eμ" intron exhibited highly similar chromatin profiles for all epigenetic marks investigated (Fig. 5b-e). By contrast, alternative frVκ and constitutive CH1μ exons displayed striking differences. The levels of H3K4me3 and H3K9ac increased (Fig. 5b, c), whereas H3K9me3 amounts decreased in the alternative frVκ exon compared with the constitutive CH1μ exon (Fig. 5e). The comparative analysis of H3K36me3 levels did not reveal any significant changes (Fig. 5d). Supporting the idea that epigenetic histone marks can influence the pattern of alternative splicing by favoring exclusion or inclusion of alternative exons,^{22,24-26} skipped frVκ 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 has driven the development of these molecules for medical purposes in various genetic diseases and, in particular, for the treatment of neuromuscular disorders.²⁷⁻²⁹ By simply monitoring the production of IgM^a

a Mouse IgH locus

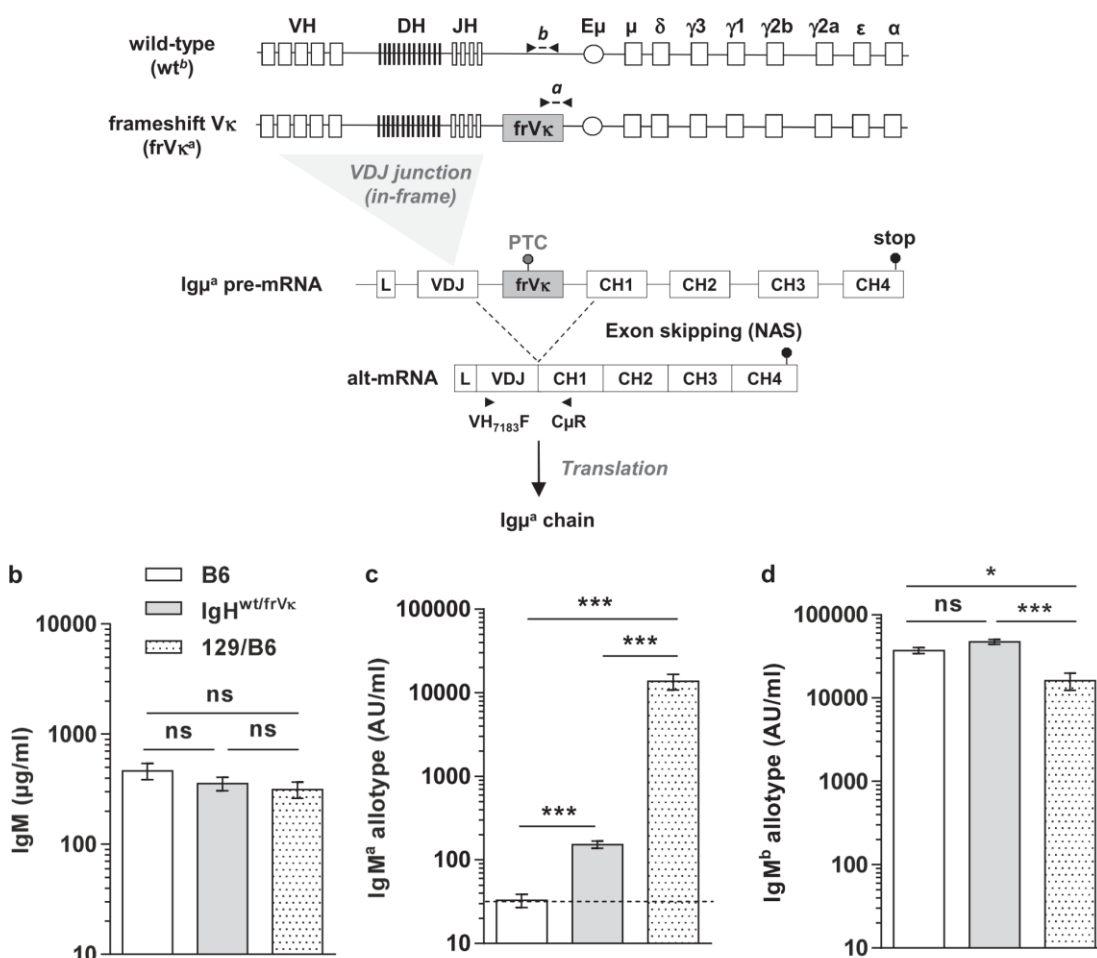


Fig. 1 Assessment of exon skipping of nonproductive VDJ-recombined IgH transcripts in vivo. **a** Map of wild-type (*b* allotype) and targeted (*a* allotype) IgH loci. IgH^{wt/frVκ} knock-in mice were created by insertion of an additional frameshift-inducing Vκ exon (frVκ) between J_H4 and Eμ. Skipping of frVκ exon occurs after NAS of nonproductive IgH^{frVκ} pre-mRNAs, allowing for 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-week-old IgH^{wt/frVκ} (wt^b/frVκ^a), B6/129 F1 (wt^b/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 the mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance (ns not significant; **P* < 0.05; ****P* < 0.001)

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 “vivomorpholino” ASO targeting the frVκ exon donor splice site (ASO-frVκ_{dss}) (Fig. 6a) or with an irrelevant ASO as a control (ASO-ctrl). Remarkably, the passive administration of ASO-frVκ_{dss} strongly increased the secretion of IgM^a in culture supernatants (Fig. 6b). We also observed that both the frequency of IgM^a-positive cells (Fig. 6c, d) and the mean fluorescence intensity (MFI) of IgM^a (Fig. 6e) were increased after ASO-frVκ_{dss} treatment compared with the ASO-ctrl. Based on previous observations showing that biallelic VDJ-rearrangements are retrieved in ~40% of B-lineage cells³⁰ and that ~22% of VDJ-rearranged IgH^{frVκ} transcripts

exhibited in-frame CDR3 junctions,⁶ we estimated a theoretical maximum of IgM^a-expressing cells of ~8.8%. Interestingly, the frequency of 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) and targeted nearly all antibody-secreting cells (Fig. 6d). Likewise, we found that ASO-frVκ_{dss} treatment drastically increased the rate of frVκ exon skipping by monitoring alt-mRNA/pre-mRNA ratios (Fig. 6f). Of note, we observed similar proliferative responses (Supplementary Fig. 2a) and Igκ light chain production (Supplementary Fig. 2b) in LPS-stimulated B cells treated or not with ASOs, indicating that ASO treatment did not induce adverse toxic effects. Hence, passive administration of ASO targeting V exon donor splice sites strongly induced exon skipping in PCs.

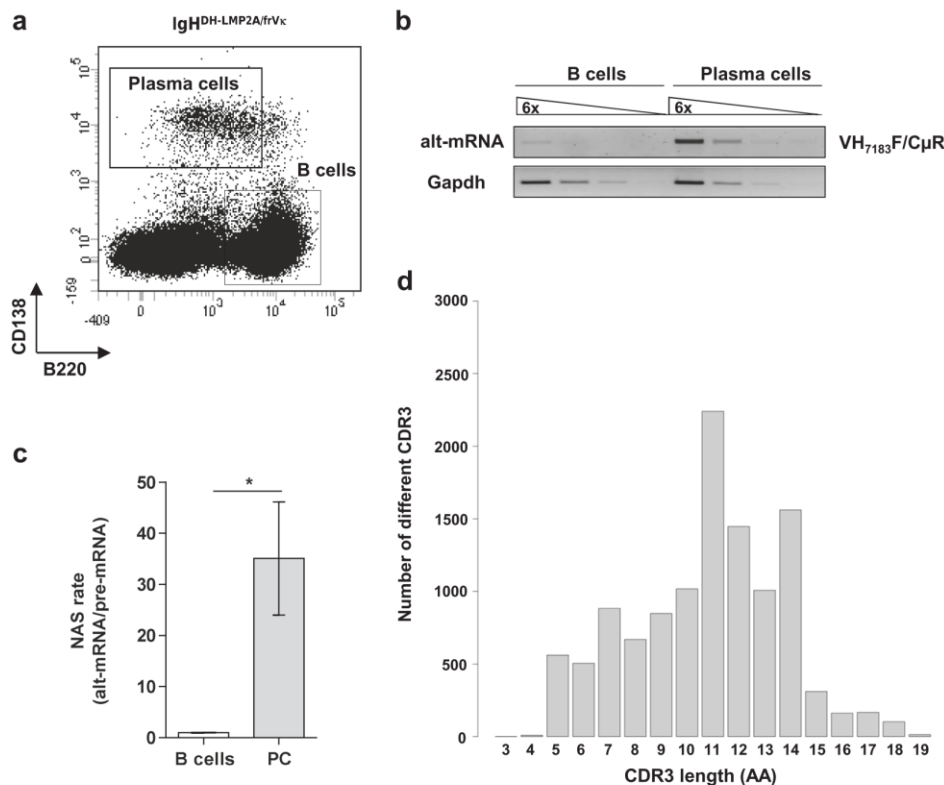


Fig. 2 Comparative analysis of NAS of IgH pre-mRNAs in B cells and PCs. **a** B cells and PCs were isolated from the spleens of IgH^{DH-LMP2A/frVκ} mice after staining with anti-B220 and anti-CD138 mAbs. Representative dot plot and gates for cell sorting are depicted. The purity of sorted populations 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 three 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. 1a. NAS rates corresponding to the relative alt-mRNA/pre-mRNA ratios were determined in sorted B cells (empty bar) and PCs (gray 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)

DISCUSSION

Alternative splicing regulates gene expression and affects more than 90% of multiexonic pre-mRNAs in humans.^{31–33} Likewise, ASO-mediated splicing modulation can be exploited for numerous therapeutic purposes.³⁴ In this study, we provide evidence that the biallelic 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.^{6,20,35–37} Accordingly, we found that ~80% of mature B cells and PCs exhibited no IgH allele in heterochromatin. This observed frequency is consistent with previous 3D RNA FISH data showing that >80% of IgH and Igk genes are biallelically transcribed in PCs.²⁰ 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 in Ig gene transcription during PC differentiation, we found that the amount of nonproductive IgH pre-mRNAs was ~3-fold higher in PCs compared with B cells. Altogether, biallelic hypertranscription of Ig genes generates high levels of nonproductively V(D)J-rearranged Ig pre-mRNAs in antibody-secreting cells.

Because the TIE-checkpoint eliminates PC-expressing truncated Ig chains,¹⁰ it remains very challenging to evaluate the extent of

exon skipping during splicing of Ig pre-mRNAs. Using our dedicated IgH^{frVκ} model allowing for skipping of V exon without production of shortened Ig polypeptides, we provided evidence that NAS of IgH pre-mRNAs is greatly enhanced in PCs compared with B cells. These data strongly suggest that NAS and conventional alternative splicing are governed by similar rules and controlled by the transcription elongation rate.^{19,26,38–40} 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. Further investigations are necessary to define the role of differentially expressed RNA splicing regulators. 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.

Several studies have identified a specific histone mark signature around alternative exons.^{22,24–26} Interestingly, trimethylation and acetylation of H3K9 have been associated with inclusion or exclusion of alternative exons, respectively.^{19,25} High levels of H3K9me3 promotes heterochromatin protein 1γ (HP1γ) recruitment and provokes a local slowdown of RNAPII, supporting the inclusion of CD44 variant exons.²⁵ By contrast, a local increase in H3K9ac is associated with the exclusion of NCAM (neural cell adhesion molecule) exon 18 during the

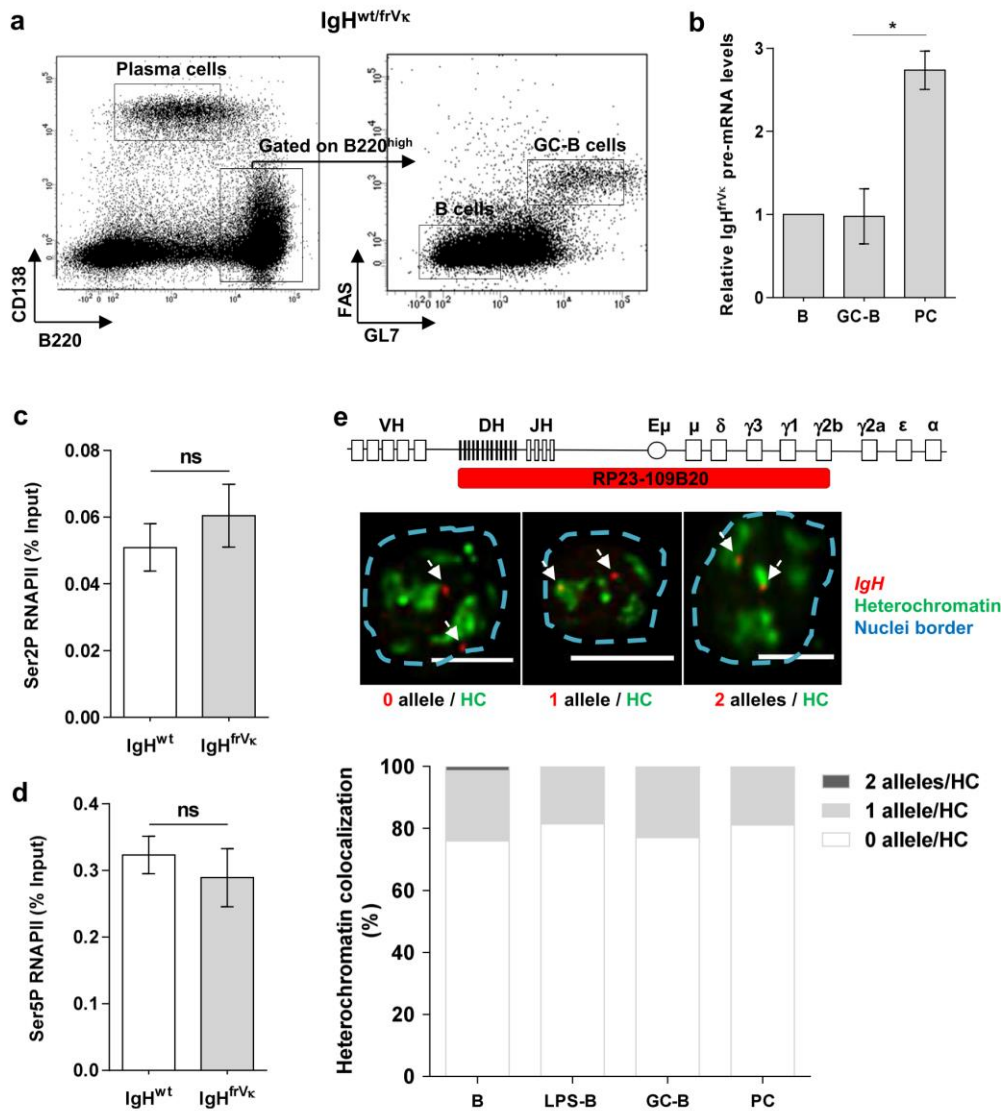


Fig. 3 Biallelic transcription of IgH alleles during PC differentiation. **a** B cells, germinal center (GC-) B cells, and PCs were isolated from the spleens of SRBC-immunized $IgH^{wt/frV\kappa}$ mice after staining with anti-B220, anti-GL7, anti-FAS, and anti-CD138 mAbs. Representative dot plots and gates used for cell sorting are depicted. The purity of each sorted population was always above 90%. **b** Relative $IgH^{frV\kappa}$ pre-mRNA levels were determined by qPCR as described in Fig. 1a (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, d** Resting B cells were isolated from the spleens of $IgH^{wt/frV\kappa}$ mice and stimulated with LPS (1 μ g/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 $IgH^{frV\kappa}$ alleles, respectively). Background signals from mock samples with irrelevant antibody staining 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 or 1 or 2 alleles within heterochromatin (scale bars: 5 μ m). 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 three individual mice. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance (ns not significant; * $P < 0.05$)

depolarization of human neuronal cells.¹⁹ Remarkably, we observed a massive enrichment in H3K9ac and an opposite decrease in H3K9me3 at the skipped frV κ exon compared with the constitutive CH1 μ exon. Altogether, this chromatin profile revealed that the alternative frV κ exon is turned into a pseudo-intron.

This study provides evidence that NAS of Ig pre-mRNAs is coupled to transcription and increases as PC differentiation proceeds. We propose that the late occurrence of TIE-induced apoptosis eliminating PCs with biallelic Ig gene rearrangements results from the combined effects of enhanced NAS activation during splicing of nonproductive Ig pre-mRNAs and the intrinsic

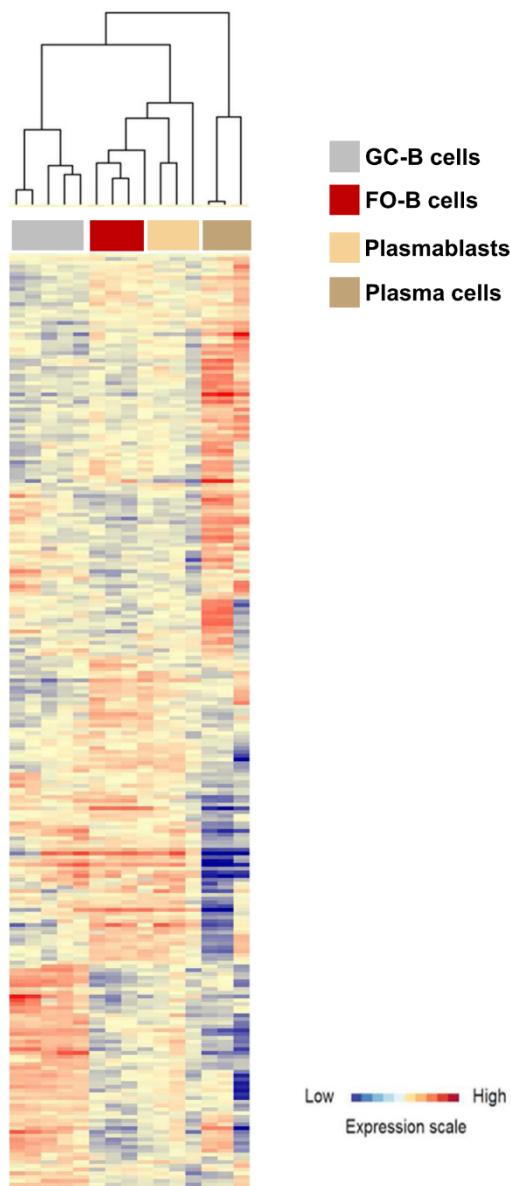


Fig. 4 Analysis of RNA splicing gene expression profiles during PC differentiation. Clustergram of GO RNA splicing gene list significantly differentially expressed between follicular B cells (FO B cells, $n = 3$), germinal center B cells (GC B cells, $n = 5$), plasmablasts (PBs, $n = 4$), and plasma cells (PCs, $n = 3$) (fold change > 1.5 and FDR < 0.05)

sensitivity of antibody-secreting cells towards prolonged ER stress. Altogether, these data reinforce the idea that nonproductively V (D)J-recombined alleles can be considered as drivers rather than passengers at late steps of B-cell differentiation.

Finally, we validated that ASO-mediated Ig exon skipping can be easily achieved by targeting the donor splice site of V exons. Thus, the use of ASOs to induce massive production of detrimental truncated Ig chains represents an attractive therapeutic approach that should be of great interest in patients with monoclonal gammopathies.

MATERIALS AND METHODS

Mice

IgH^{frVk} mice harboring an extra frameshift-inducing Vk exon between J_H4 and E_μ have been described elsewhere previously.⁶ Heterozygous IgH^{wt/frVk} mice were backcrossed to C57BL/6 (B6) background to distinguish between IgH^{wt} (*b* allotype) and IgH^{frVk} (*α* allotype) alleles. F1 (B6^b/129^α) mice were used as a 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.¹³ The expression of LMP2A mimics the BCR tonic signal, allowing for B-cell development and PC differentiation.^{13,14} 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 (No. CREAL 6-07-2012).

ASO treatments

Vivo-morpholino ASOs (ASO-frVk_{dss}: 5'-ATGCTCGAGACT-TACCCGTTTGATT-3') and an irrelevant ASO (ASO-Ctrl: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') were designed and purchased at Gene Tools, LLC. Splenic B cells isolated from IgH^{wt/frVk} mice were purified by negative selection using anti-CD43 magnetic beads (Miltenyi Biotec) and stimulated (0.8×10^6 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 10 μM AON (4 h in PBS). After incubation, the cells were stimulated with LPS for 2 days in the presence of AON (1 μM) in culture media.

Flow cytometry and cell sorting

Erythrocyte-depleted spleen cells were labeled with anti-mouse CD138 (281-2; BD Pharmingen), B220 (RA3-6B2; BioLegend), anti-mouse- and B-cell 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 an LSR II Fortessa apparatus using FACS-Diva software (BD Pharmingen). B cells, GC-B cells, and PCs were sorted from the spleens of B6 or IgH^{wt/frVk} 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 the gates used are depicted in dot plots (purity was above 90%).

ELISA assays

Sera from IgH^{wt/frVk} (wt^b/frVk^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.^{41,42} Ig amounts were revealed by the addition of p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) and blocked with the addition of 3 M NaOH; optic density was measured at 405 nm.

Chromatin immunoprecipitation 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 ser2P (Abcam, ab5095), and anti-RNA Pol II ser5P (Abcam, ab5131), as previously described.⁴³ In brief, 1×10^7 LPS-stimulated B cells from IgH^{wt/frVk} mice were harvested at day 3, washed twice in PBS and cross-linked at 37 °C for 15 min in 15 ml of PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 0.125 M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to

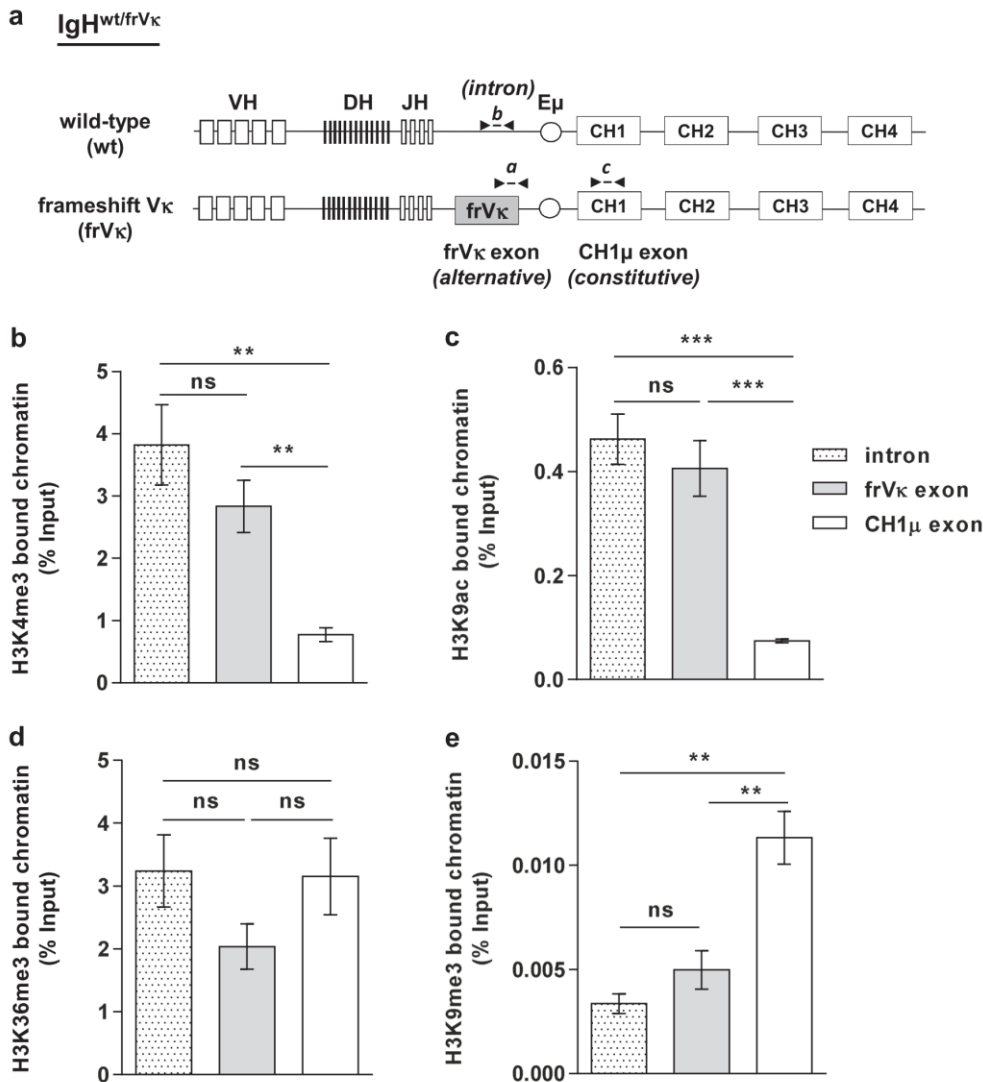


Fig. 5 Analysis of the alternative frVκ exon chromatin profile. **a** Chromatin marks were analyzed comparatively at the JH4-Eμ intron, the alternative frVκ exon, and the constitutive CH1μ exon. Primers and probes used in qPCR are depicted. **b–e** ChIP assays were performed in splenic B cells isolated from $IgH^{wt/frV\kappa}$ mice 3 days after stimulation with LPS (1 μg/ml). Immunoprecipitation experiments were conducted 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 ± SEM ($n = 5$), and unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance (ns not significant; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167 mM 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 × 10⁶ cell equivalents were saved as input, and 3–5 × 10⁶ 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 was prepared using Tri-reagent (Invitrogen) procedures. RT-PCR was carried out on 1–3 μg of DNase I (Invitrogen)-treated RNA using Superscript III (Invitrogen). Priming for reverse transcription was done with random hexamers. Quantitative PCR was performed on cDNA samples equivalent to 10 ng of 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^{-ΔΔCt} method after normalization to *Gapdh* (Mm99999915_g1). Primers and probes used for Q-PCR are listed in Supplementary Table 2.

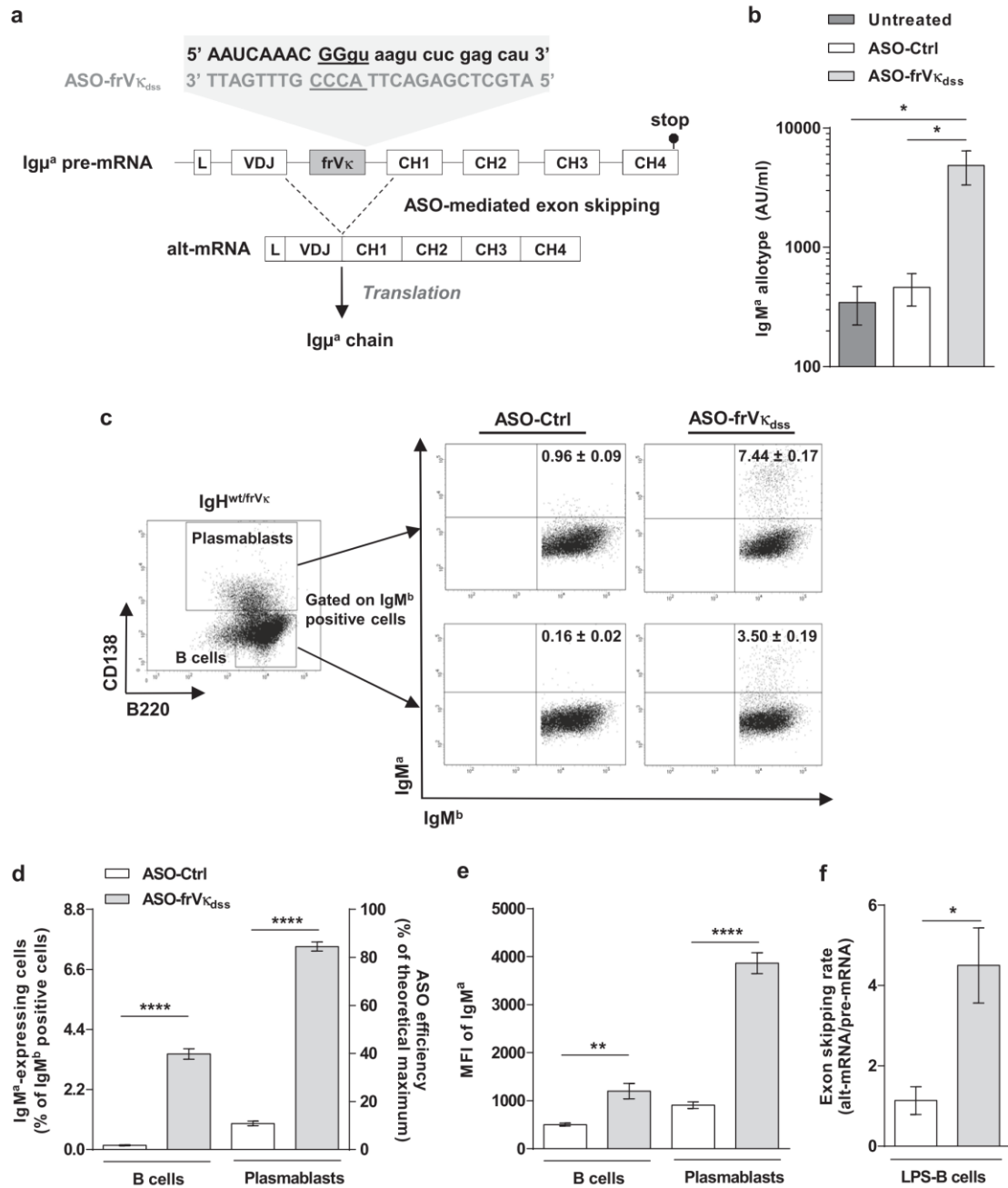


Fig. 6 Significant IgM^a production upon passive administration of ASOs. **a** An ASO sequence targeting the donor splice site of the frV_κ exon (AON-frV_κ_{dss}) was designed and synthesized as “vivo-morpholino ASO” (Gene Tools, LLC). **b** Splenic B cells isolated from IgH^{wt/frVκ} mice were stimulated with LPS (1 μg/ml) for 4 days and treated with ASO-frV_κ_{dss} or irrelevant ASO (ASO-Ctrl) during the last 2 days, as described in the Methods. At day 4, supernatants were harvested, and IgM^a levels were determined. **c** Cells were labeled 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** The left y-axis represents the percentage of IgM^a-expressing cells in IgM^b-positive B cells and plasmablasts treated with ASO-frV_κ_{dss} (gray bars) or ASO-Ctrl (empty bars). The 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^{DHLM2A/frVκ} LPS-stimulated B cells, as described in Fig. 2c. Passive ASO administration was performed as described in panel (b). Data are representative of five independent experiments. Bars represent the mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student’s *t* test was performed to determine significance (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; *****P* < 0.0001)

3D-DNA FISH experiments

A DNA probe specific to the IgH locus was prepared with the RP23-109B20 BAC construct (Life Technologies) labeled by random priming with digoxigenin-11-dUTP (Roche). A DNA probe specific to heterochromatin compartment was prepared with the pySat plasmid (kindly provided by Dr. Nial Dillon) containing multiple copies of the 234 bp major satellite (γ -satellite) repeat labeled by random priming with Alexa Fluor 488-dUTP (Life Technologies). Before hybridization, the probes were denatured in 2 \times 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 min at room temperature (RT). After washing steps with PBS, cells were permeabilized using pepsin 0.02%/HCl 10 mM for 15 min at RT. Cells were washed with PBS, post-fixed with PBS/1% paraformaldehyde for 5 min at RT, washed with PBS/0.2 M MgCl₂, dehydrated by successive incubations in ethanol solutions (70, 90, 100%, 2 min each), denatured for 5 min in 2 \times 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 labeled probe in hybridization buffer in a dark humid chamber under coverslips. The next day, the slides were washed three times with 1 \times SSC, and a blocking step was performed by incubating slides in 4 \times SSC/3% BSA for 30 min followed by incubation with rhodamine-conjugated anti-digoxigenin secondary antibody (Roche) diluted 1/200 in 4 \times SSC/3% BSA for 60 min. Slides were washed four times in 2 \times 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 a \times 100 oil objective. Fifty-one optical sections separated by 0.2 μ m were collected, and 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 the xy and 0.2 μ m in the z-direction.

Bioinformatics analysis

Gene expression profiles of purified mouse follicular (FO-) B cells, GC-B cells, PBs, and PCs were obtained from the publicly available dataset GSE 26408 (Gene Expression Omnibus database).⁴⁴ Affymetrix Mouse Genome 430A 2.0 Array gene expression data were analyzed with the GenomicScape bioinformatics platform (www.genomicscape.com).²¹ Clustering was performed and visualized with Cluster and TreeView.⁴⁵ Differentially expressed genes between cell populations were identified with the significance analysis of microarray statistical method (fold change \geq 1.5, false discovery rate \leq 0.05).⁴⁶

High throughput sequencing of the IgH repertoire

Repertoire sequencing was performed as previously described.⁴⁷ In brief, RNA (500 ng) was extracted from sorted PCs of IgH^{DH-LMP2A/trV κ} mice, and RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction) was performed using a CH1 μ reverse primer.⁴⁸ Sequencing adapter sequences were added by primer extension, and amplicons were sequenced on an MiSeq sequencing apparatus (Illumina). Repertoire was analyzed using IMGT/High-V-Quest⁴⁹ and the bcRep R package⁵⁰ available on the IMGT Web site (<https://www.imgt.org>).

Statistical analysis

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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. Diallyon (MRC Clinical Sciences Centre, London, UK) for providing the pySat plasmid and M. Alizadeh (UMR S 917, Rennes, France) for repertoire sequencing. This work was supported by grants from Fondation ARC (PJA 20161204724/PGA120150202338), 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). M.O.A. and N.S. were funded by Société Française d'Hématologie (SFH) and Région Limousin, respectively.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.O.A. and N.S. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. J.-M.L. and A.M. contributed data to Fig. 6. O.M., S.L.N., and E.P. contributed 3D DNA-FISH data in Fig. 3. J.M. performed gene expression analysis in Fig. 4. M.V.A., J.S., C.S., and M.C. helped with the experiments and interpretation of the data. L.D. conceived the project, designed experiments, analyzed data and wrote the paper.

ADDITIONAL INFORMATION

The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41423-018-0160-6>) contains supplementary material.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Data availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- Li, S. & Wilkinson, M. F. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* **8**, 135–141 (1998).
- Deiss, T. C. et al. Immunogenetic factors driving formation of ultralong VH CDR3 in Bos taurus antibodies. *Cell Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.117> (2017).
- Baumann, B., Potash, M. J. & Köhler, G. Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J.* **4**, 351–359 (1985).
- Jäck, H. M., Berg, J. & Wabl, M. Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* **19**, 843–847 (1989).
- Chemin, G. et al. Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J. Immunol.* **184**, 5009–5017 (2010).
- Tinguely, A. et al. Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell Biol.* **32**, 107–117 (2012).
- Valentine, C. R. The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* **411**, 87–117 (1998).
- Maquat, L. E. 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 (2002).
- Chang, Y.-F., Chan, W.-K., Imam, J. S. & Wilkinson, M. F. 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 (2007).
- Srouf, N. et al. A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.* **213**, 109–122 (2016).
- Delpy, L., Le Bert, M., Cogné, M. & Khamlichi, A. A. 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 (2003).
- Reynaud, S. et al. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* **174**, 6176–6183 (2005).
- Casola, S. et al. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* **5**, 317–327 (2004).
- Lehouane, F. et al. B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 619–628 (2013).
- Wesemann, D. R. et al. Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. *Nature* **501**, 112–115 (2013).

16. Aouinti, S. et al. 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 (2016).
17. Pan, Q. et al. 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 (2006).
18. de la Mata, M. et al. RNA polymerase II elongation at the crossroads of transcription and alternative splicing. *Genet. Res. Int.* **2011**, 309865 (2011).
19. Schor, I. E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M. & Kornblihtt, A. R. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 4325–4330 (2009).
20. Park, S.-K., Xiang, Y., Feng, X. & Garrard, W. T. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* **28**, 1159–1164 (2014).
21. Kassambara, A. et al. 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 (2015).
22. Kolasinska-Zwierz, P. et al. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat. Genet.* **41**, 376–381 (2009).
23. Meda, F., Folci, M., Baccarelli, A. & Selmi, C. The epigenetics of autoimmunity. *Cell Mol. Immunol.* **8**, 226–236 (2011).
24. Luco, R. F. et al. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* **327**, 996–1000 (2010).
25. Saint-André, V., Batsché, E., Rachez, C. & Muchardt, C. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 γ favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 337–344 (2011).
26. Zhou, H.-L., Luo, G., Wise, J. A. & Lou, H. Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **42**, 701–713 (2014).
27. Benchaouir, R., Robin, V. & Goyenvalle, A. Gene and splicing therapies for neuromuscular diseases. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **20**, 1190–1233 (2015).
28. Groen, E. J. N., Talbot, K., Gillingwater, T. H. Advances in therapy for spinal muscular atrophy: promises and challenges. *Nat. Rev. Neurol.* <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2018.4> (2018).
29. Stein, C. A. & Castanotto, D. FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **25**, 1069–1075 (2017).
30. Mostoslavsky, R., Alt, F. W. & Rajewsky, K. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* **118**, 539–544 (2004).
31. Blencowe, B. J. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37–47 (2006).
32. Johnson, K., Angelin-Duclos, C., Park, S. & Calame, K. L. 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 (2003).
33. Wang, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470–476 (2008).
34. Aartsma-Rus, A. & van Ommen, G.-J. B. Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 146–153 (2010).
35. Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G. & Mårtensson, I.-L. Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* **26**, 4273–4282 (2007).
36. Delpy, L., Sirac, C., Le Morvan, C. & Cogné, M. Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol.* **173**, 1842–1848 (2004).
37. Holwerda, S. J. B. et al. Allelic exclusion of the immunoglobulin heavy chain locus is independent of its nuclear localization in mature B cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6905–6916 (2013).
38. Nogués, G. et al. Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life* **55**, 235–241 (2003).
39. Pandit, S., Wang, D. & Fu, X.-D. Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 260–265 (2008).
40. Shukla, S. & Oberdoerffer, S. Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 673–683 (2012).
41. Pinaud, E. et al. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**, 187–199 (2001).
42. Sirac, C. et al. Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi syndrome. *Blood* **108**, 536–543 (2006).
43. Rouaud, P. et al. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* **210**, 1501–1507 (2013).
44. Green, M. R. et al. Signatures of murine B-cell development implicate Yy1 as a regulator of the germinal center-specific program. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 2873–2878 (2011).
45. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 14863–14868 (1998).
46. Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 5116–5121 (2001).
47. Li, S. et al. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat. Commun.* **4**, 2333 (2013).
48. Boice, M. et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell* **167**, 405–418.e13 (2016).
49. Alamyar, E., Duroux, P., Lefranc, M.-P. & Giudicelli, V. 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.* **882**, 569–604 (2012).
50. Bischof, J. & Ibrahim, S. M. bcRep: R package for comprehensive analysis of B cell receptor repertoire data. *PLoS ONE* **11**, e0161569 (2016).

Annexe 3. Brevet « Use of splice switching oligonucleotides for exon skipping-mediated knockdown of NF-κB components in B cells »

(inventors : Delpy Laurent, Marchalot Anne, Nathalie Faumont, Jean Feuillard, François Boyer)

1 -

USE OF SPLICE SWITCHING OLIGONUCLEOTIDES FOR EXON SKIPPING-MEDIATED KNOCKDOWN OF NF-KB COMPONENTS IN B CELLS

5 FIELD OF THE INVENTION:

The present invention is in the field of medicine, in particular oncology.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

10 B cells and plasma cells are key actors in humoral immune response allowing antibody production and long-term defence against pathogens such as virus, bacteria or fungus. B cells are activated when an extracellular antigen binds their B cell receptor (BCR) which induces rapid cell proliferation and differentiation into antibody secreting cells (ASC), either plasmablasts or plasma cells, to allow a sustainable antibody production (1). However, even if this mechanism is well described in literature, some questions remains concerning the B cell
15 differentiation process in humans, notably how plasma cells are homed to their bone marrow niches (2), how high affinity clones are selected (3) and what mechanism lies under their extended longevity (4,5). Unravelling these questions could give new leads to treat antibody-mediated diseases such as allergy, autoimmunity or multiple myeloma and even benefit vaccine development. Studying plasma cell differentiation with human in vitro models rather than
20 mouse models that showed significant differences in this matter (6) and where some ASC related diseases still cannot be fully reproduced (7-9) seems to be the best way to go. However, gene knockdown in primary human plasma cells and B cells has always been a struggle, impeding research progress on non-cancer human B cells and plasma cell studies. Indeed, RNAi mediated gene knockdown in primary B cell is known to induce high mortality rates and poor
25 penetrance during transfection, responsible for a lower knockdown efficiency compared to transformed B cells and plasma cells (10). Recently, it was demonstrated that CRISPR-Cas9 technology is efficient for gene knockout on expended primary B cells and plasma cell differentiation models (11,12) but additional tools to realize a transient knockdown and avoid DNA modifications that could affect other genes (13,14) are still needed.

30

Antisense oligonucleotides (ASO) are a short single chain of modified DNA that can be used to degrade mRNA by RNase H1 recruitment or to modify pre-mRNA splicing among others mechanisms, depending of the oligonucleotide chemistry (for review see (15,16)). In addition to RNase H1-dependant RNA degradation, splice-switching oligonucleotides (SSO) can also

be designed to knockdown gene expression, as shown for STAT3 by Zammarchi and colleagues (17). These authors described that splice switching oligonucleotides (SSO) could be used to induce forced splicing-dependent nonsense-mediated decay (FSD-NMD), a mechanism based on SSO-mediated exon skipping to create a reading frameshift, the apparition of a premature stop codon (PTC) and ultimately the degradation of alternative mRNAs by NMD (17). While any splicing modulation producing a reading frameshift and the appearance of PTC can be suitable for FSD-NMD, exon-skipping is the most frequent alternative splicing event in humans (18), and can be easily achieved with SSO hybridizing to either the donor splice site (5'SS), the acceptor splice site (3'SS) or exonic or intronic splicing enhancer (ESE or ISE) sequences (19).
5
10 However, to efficiently knockdown gene expression, the delivery of sufficient SSO amounts into intracellular compartments remains challenging, as for RNAi technology. Over the last decades, numerous strategies have been developed to overcome this limitation and molecules such as peptide/ligand conjugates, nanoparticles or adeno-associated virus (AAV) have been used to improve the delivery of antisense compounds (20). However, the development of such
15 FSD-NMD strategies to modulate gene expression in B-lineage cells, including primary B or plasma cells, is still lacking.

During plasma cell differentiation, some key genes are differentially regulated like Bcl-6 and Blimp1 expressed in B cells and plasma cells respectively (21). Among those genes, NF- κ B components such as c-REL and RELA are respectively down- and up-regulated during plasma cell differentiation, Blimp1 being upregulated by RELA expression which in turn, downregulates c-REL expression by binding its enhancer in ASC (22). Moreover, c-REL and RELA expression is upregulated in many cancers, especially of B cell lineage origin (23,24). Therefore, c-REL and RELA could be interesting targets to cure B cells and plasma cells
25 malignancies like diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) or multiple myeloma (MM).

SUMMARY OF THE INVENTION:

The present invention is defined by the claims. In particular, the present invention relates to the use of splice switching oligonucleotides for exon skipping-mediated knockdown of a NF- κ B component in B cells.
30

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The need to identify new therapeutic approaches in the treatment of cancers of the B lymphoid lineage is crucial. Unlike CRISPR/Cas technology, antisense strategies allow transient

modification of gene expression and lack mutagenic effects at the DNA level. Here, the inventors provide evidence for efficient knockdown of c-REL and RELA expression after treatment with splice switching antisense oligonucleotides (SSO) inducing exon skipping and reading frameshift. They also developed a tool to facilitate the choice of exons for on purpose inhibition of mouse and human gene expression. Interestingly, treatments with morpholino SSO targeting c-REL exon 2 donor splice site or RELA exon 5 acceptor splice site elicited very efficient knockdown in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cell lines and antibody-secreting cells derived from primary human B cells. Consistent with the clinical relevance of c-REL activation in DLBCL, treatment with c-REL SSO induced major alterations in NF- κ B and TNF signalling pathways and strongly decreased cell viability. Altogether, SSO-mediated knockdown is a powerful approach to inhibit transiently the expression of a NF- κ B component in B-lineage cells that should open new avenues for cancer treatments.

Main definitions:

15

As used herein, the term “**subject**” refers to any mammals, such as a rodent, a feline, a canine, and a primate.

As used herein, the term “**B cell**” has its general meaning in the art and is used herein to mean an immune cell that develops in the bone marrow and is highly specialized for making immunoglobulins and antibodies. A B cell is a lymphocyte which is derived from bone marrow and provides humoral immunity. A B cell recognizes antigen molecules in solution and matures into a plasma cell. Thus, when the term “B cell” is used herein it is intended to encompass cells developed from B cells such as plasma cells.

25

As used herein, the term “**plasma cell**” has its general meaning in the art and is intended to mean a cell that develops from a B lymphocyte in reaction to a specific antigen. Plasma cells are found in bone marrow and blood. A plasma cell may also be called a plasma B cell or plasmacyte and are cells in the immune system which secrete large amounts of antibodies. Plasma cells differentiate from B cells upon stimulation by CD4⁺ lymphocytes. A plasma cell is a type of white blood cell that produces antibodies and is derived from an antigen-specific B cell.

30

As used herein, the terms “**polypeptide**,” “**peptide**,” and “**protein**” are used interchangeably herein to refer to polymers of amino acids of any length. The terms also encompass an amino acid polymer that has been modified; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, phosphorylation, or conjugation with a labeling component. Polypeptides when
 5 discussed in the context of gene therapy refer to the respective intact polypeptide, or any fragment or genetically engineered derivative thereof, which retains the desired biochemical function of the intact protein.

As used herein, the term “**NF- κ B**” has its general meaning in the art and refers to the nuclear
 10 factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. NF- κ B is a protein complex that controls transcription of DNA, cytokine production and cell survival.

As used herein, the term “**NF- κ B component**” refers to a protein that has a Rel homology domain in their N-terminus. A subfamily of NF- κ B proteins, including RELA, RelB, and c-
 15 REL, have a transactivation domain in their C-termini. In contrast, the NF- κ B1 and NF- κ B2 proteins are synthesized as large precursors, p105, and p100, which undergo processing to generate the mature NF- κ B subunits, p50 and p52, respectively. The processing of p105 and p100 is mediated by the ubiquitin/proteasome pathway and involves selective degradation of their C-terminal region containing ankyrin repeats. Whereas the generation of p52 from p100
 20 is a tightly regulated process, p50 is produced from constitutive processing of p105.

As used herein, the term “**RELA**” has its general meaning in the art and refers to the transcription factor p65. An exemplary amino acid sequence for RELA is shown as SEQ ID
 NO:1.

25

```

  SEQ ID NO:1 >sp|Q04206|TF65_HUMAN Transcription factor p65 OS=Homo sapiens
  OX=9606 GN=RELA PE=1 SV=2
  MDELFLPIFPAEPAQASGPYVEIIEQPKQRGMRFRYKCEGRSAGSIPGERSTDTTKTHPT
  30 IKINGYTGPGTVRISLVTKDPPHRPHHELVGKDCRDGFYEAELCPDRCIHSFQNLGIQC
  VKKRDLEQAI SQRIQTNNPFQVPIEEQRGDYDLNAVRLCFQVTVRDPSGRPLRLPPVLS
  HPIFDNRAPNTAELKICRVNRNSGSLGGDEIFLLCDKVQKEDIEVYFTGPGWEARGSFS
  QADVHRQVAIVFRTPPYADPSLQAPVRVSMQLRRPSDRELSEPMEFQYLPDTPDRHRIEE
  KRKRTYETFKSIMKKSPPFSGPTDRPPRRRIAVPSRSSASVPKPAPQYPFTSSLSTINY
  DEFPTMVFPSGQISQASALAPAPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPLAPGPPQA
  35 VAPPAPKPTQAGEGLSEALLQLQFDDDELGALLGNSTDPVFTDLASVDNSEFQQLLNQ
  GIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGPGLPNGLLSGDEDFSSIADM
  DFSALLSQISS
  
```

As used herein, the term “**RELB**” has its general meaning in the art and refers to the Transcription factor RelB. An exemplary amino acid sequence for RELB is shown as SEQ ID NO:2.

5 SEQ ID NO:2 >sp|Q01201|RELB_HUMAN Transcription factor RelB OS=Homo sapiens
OX=9606 GN=RELB PE=1 SV=2
MLRSGPASGSPVPTGRAMPSRRVARPPAAPEL GALGSPDLSSLSLAVSRSTDELEI IDEY
IKENGFGLDGGQPGPEGLPRLVSRGAASLSTVTLGPVAPPATPPPWGCPLGRLVSPAPG
10 PGPQPHLVITTEQPKQRGMRFRYECEGRSAGSILGESSTEASKTLPAIELRDCGGLREVEV
TACLWVKDWPVRVHPSLVGKDCDTCGICRVRLRPHVSPRHSFNNLGIQCVRKKEIEAAIE
RKIQGLGIDPYNAGSLKNHQEVDMMNVVVICFQASYRDQQGQMRMDPVLSEPVYDKKSTNT
SELRICRINKESGPCGTGGEELYLLCDKVQKEDISVVFSTRASWEGRADFSQADVHRQIAIV
FKTPPYEDLEIVPEVTVNVFLQRLTDGVCSEPLPFTYLPDRHDSYGVDKRKRGMPPDLG
15 ELNSSDPHGIKSKRKKKPAILDHFLPNHSGSPFLPPSALLPDPDFFSGTVSLPGLPEPPG
GPDLLDDGFAYDPTAFTLFTMLDLLPPAPPASAVVCSGGAGAVVGETPGPEPLTLDYSYQ
APGPGDGGTASLVGSNMFPNHYREAAFGGGLLSPGPPEAT

As used herein, the term “**c-REL**” has its general meaning in the art and refers to the Proto-oncogene c-REL. An exemplary amino acid sequence for c-REL is shown as SEQ ID NO:3.

20
SEQ ID NO:3 >sp|Q04864|REL_HUMAN Proto-oncogene c-REL OS=Homo sapiens
OX=9606 GN=REL PE=1 SV=1
MASGAYNPYIEIIEQPRQRGMRFYKCEGRSAGSIPGEHSTDNNRTPSIQIMNYYGKKG
VRITLVTKNDPYKPHPHDLVKGDCRDGYEAEFGQERRPLFFQNLGIRCVKKKEVKEAII
25 TRIKAGINPFNVPEKQLNDIEDCDLNVVRLCFQVFLPDEHGNLTTALPPVVSNIYDNRA
PNTAELRICRVNKNCGSVRGGDEIFLLCDKVQKDDIEVRFVLDWEAKGIFSQADVHRQV
AIVFKTPPYCKAITEPVTVKMLRRPSDQEVSESMDFRYLPDEKDTYGNKAKKQKTTLLF
QKLCQDQHVETGFRHVDQDGLLELLTSGDPPPTLASQSAGITVNFPERPRPGLLGSIGEGRYF
KKEPNLFSHDAVVREMPGTGSSQAESYYPSPGPISSGLSHHSMAPLPSSSSWVAHPTP
30 RSGNTNPLSSFSTRTPSNSQGI PPFLRIPVGNLDLNASNACIYNNADDIVGMEASSMPSA
DLYGISDPNMLSNCSVNMMTSSSDSMGETDNPRLLSMNLENPSCNSVLDPRDLRQLHQMS
SSSMSAGANSNTTVFVSQSDAFEGSDFCADNSMINESGPNSTNPNSHGFVQDSQYSYGI
GSMQNEQLSDSFPYEFYFQV

35 As used herein, the term “**IKK2**” has its general meaning in the art and refers to the Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta. An exemplary amino sequence for IKK2 is shown as SEQ ID NO:4.

40 SEQ ID NO:4 >sp|O14920|IKKB_HUMAN Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IKKB PE=1 SV=1
MSWSPSLTTQCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQETGEQIAIKQCRQELSPNRERWCL
EIQIMRRLTHPNVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCCGGDLRKYLNQFENCCGLREG
AII LLLSDIASALRYLHENRI IHRDLKPENIVLQQGEQRLIHKIIDLGYAKELDQGS LCT
45 SFVGTLLQYLAPELLEQQKYTVTVDYWSFGTLAFECITGFRPFLPNWQPVQWHSKVRQKSE
VDIVVSEDLNGTVKFSSSLPYPNLNSVLAERLEKWLQMLMWHPRQRTDPTYGPNCGF
KALDDILNLKLVHILNMVTGTIHTYPTVEDESLQSLKARIQQDTGIPEEDQELLQEAGLA
LIPDKPATQCISDGKLNEGHTLMDLVFLFDNSKITYETQISPRQPESVSCILQEPKRN
LAFQFLRKVWQVWHSIQTLKEDCNRLQQGQRAAMNLLRNNSCLSKMKNMSMSSQQLK
AKLDFFKTSIQIDLEKYSEQTEFGITSDKLLAWREMEQAVELCGRENEVKLLVERMMAL
50 QTDIVDLQRSFMGRKQGGTLDLLEEQARELYRRLREKPRDQRTGDSQEMVRLLLQAIQS
FEKKVRVIYTLQSKTVVCKQKALELLPKVEEVVSLMNEDEKTVVRLQEKRQKELWNLLKI

ACSKVRGVPVSGSPDSMNASRLSQPGQLMSQSPSTASNSLPEPAKKSEELVAEAHNLCTLLE
 NAIQDQTVREQDQSFTALDWSWLQTEEEHSCLEQAS

As used herein, the expression “**reducing the expression of NF-κB component**” means a
 5 measurable decrease in the number of said NF-κB component in the B cells of the subject. The
 reduction can be at least about 10%, e.g., at least about 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,
 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or more. In some embodiments, the term refers to a decrease
 in the number of said NF-κB component to an amount below detectable limits. Methods for
 quantifying expression of NF-κB component are well known in the art and typically include
 10 those described in the EXAMPLE.

As used herein, the term “**pre-mRNA**”, “**precursor mRNA**” or “**primary RNA transcript**”
 refers to a strand of messenger ribonucleic acid (mRNA), synthesized from a DNA template in
 the nucleus of a cell by transcription, prior to processing events such as splicing. Generally,
 15 eukaryotic pre-mRNA exists only briefly before it is fully processed into mature mRNA. Pre-
 mRNA includes two different types of segments, exons and introns. Most of exons encode
 protein, while introns are usually excised before translation by a process known as “**splicing**”.

As used herein, the term “**exon**” refers to a defined section of nucleic acid that encodes for a
 20 protein, or a nucleic acid sequence that is represented in the mature form of an RNA molecule
 after either portions of a pre-processed (or precursor) RNA have been removed by splicing. The
 mature RNA molecule can be a messenger RNA (mRNA) or a functional form of a non-coding
 RNA, such as rRNA or tRNA.

As used herein, the term “**intron**” refers to a nucleic acid region (within a gene) that is not
 25 translated into a protein. An intron is a non-coding section that is transcribed into a precursor
 mRNA (pre-mRNA), and subsequently removed by splicing during formation of the mature
 RNA.

As used herein, the term “**splice site**” in the context of a pre-mRNA molecule, refers to the
 30 short conserved sequence at the 5' end (donor site) or 3' end (acceptor site) of an intron to
 which a spliceosome binds and catalyzes the splicing of the intron from the pre-mRNA.

As used herein, the term “**exon skipping**” refers generally to the process by which an entire
 35 exon, or a portion thereof, is removed from a given pre-processed RNA, and is thereby excluded

from being present in the mature RNA. According to the present invention the exon deletion leads to a reading frame shift in the shortened transcribed mRNA that would lead to the generation of truncated non-functional protein or nonsense-mediated decay (NMD) degradation.

- 5 As used herein, the term “**antisense oligonucleotide**” or “**ASO**” refers to a single strand of DNA, RNA, or modified nucleic acids that is complementary to a chosen sequence. Antisense RNA can be used to prevent protein translation of certain mRNA strands by binding to them. Antisense DNA can be used to target a specific, complementary (coding or non-coding) RNA. Such an antisense oligomer can be designed to block or inhibit translation of mRNA or to inhibit
- 10 natural pre-mRNA splice processing, and may be said to be “**directed to**” or “**targeted against**” a target sequence with which it hybridizes. According to the present invention, the target sequence is a splice site of a pre-processed mRNA. In said embodiments, the ASO is named as a “**splice switching antisense oligonucleotide**” or “**SSO**”. For instance, the target sequence for a splice site may include an mRNA sequence having its 5' end 1 to about 25 base pairs
- 15 downstream of a normal splice acceptor junction in a preprocessed mRNA. A preferred target sequence is any region of a precursor mRNA that includes a splice site or is contained entirely within an exon coding sequence or spans a splice acceptor or donor site or exon/intron regulatory sequences (ESE, ISE).
- 20 As used herein, the term “**complementary**” as used herein includes “fully complementary” and “substantially complementary”, meaning there will usually be a degree of complementarity between the oligonucleotide and its corresponding target sequence of more than 80%, preferably more than 85%, still more preferably more than 90%, most preferably more than 95%. For example, for an oligonucleotide of 20 nucleotides in length with one mismatch
- 25 between its sequence and its target sequence, the degree of complementarity is 95%.

- As used herein, the term “**isolated**” means material that is substantially or essentially free from components that normally accompany it in its native state. For example, an “isolated polynucleotide,” as used herein, may refer to a polynucleotide that has been purified or removed
- 30 from the sequences that flank it in a naturally-occurring state, e.g., a DNA fragment that has been removed from the sequences that are normally adjacent to the fragment.

As used herein, the term “**stabilized SSO**” refers to a SSO that is relatively resistant to in vivo degradation (e.g. via an exo- or endo-nuclease).

As used herein, the term “**B-cell malignancy**” includes any type of leukemia or lymphoma of B cells.

- 5 As used herein, the term “**B cell lymphoma**” refers to a cancer that arises in cells of the lymphatic system from B cells.

As used herein, the term “**multiple myeloma**” as used herein means a disseminated malignant neoplasm of plasma cells which is characterized by multiple bone marrow tumor foci and
10 secretion of an M component (a monoclonal immunoglobulin fragment), associated with widespread osteolytic lesions resulting in bone pain, pathologic fractures, hypercalcaemia and normochromic normocytic anaemia.

As used herein, the terms “**treating**” or “**treatment**” refer to both prophylactic or preventive
15 treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of subject at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as subject who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay
20 the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction
25 period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a subject during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen,
30 administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a subject during treatment of an illness, e.g., to keep the subject in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous

therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., pain, disease manifestation, etc.]).

5

As used herein, the term “**therapeutically effective amount**” is intended for a minimal amount of the active agent (i.e the SSO of the present invention) which is necessary to impart therapeutic benefit to a subject. For example, a "therapeutically effective amount" to a subject is such an amount which induces, ameliorates or otherwise causes an improvement in the pathological symptoms, disease progression or physiological conditions associated with or resistance to succumbing to a disorder.

10

Methods of the present invention:

15 An object of the present invention relates to a method of reducing the expression of a NF- κ B component in the B cells of a subject in need thereof comprising administering to the subject an effective amount of at least one splice switching antisense oligonucleotide targeting a splice site of one exon, or a splicing regulatory sequence in the pre-mRNA molecule encoding for the NF- κ B component to alter splicing by blocking the recognition of said splice site by splicing machinery and thus inducing the exon skipping.

20

According to the present invention the splice switching oligonucleotide (SSO) mediates the exon-skipping for a pre-mRNA having at least 3 exons with a targeted internal one having a number of nucleotides not divisible by 3 for inducing a reading frameshift. In addition, the exon skipping must provoke the appearance of a premature termination codon (PTC) to shorten drastically the open reading frame and/or support NMD degradation. Typically, the splice switching oligonucleotide (SSO) of the present invention is designed according to the method disclosed in the EXAMPLE and as depicted in Figure 1.

25

30 In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention is an antisense RNA.

In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention is an antisense DNA.

The length of the splice switching antisense oligonucleotide may vary so long as it is capable of binding selectively to the intended location within the pre-mRNA molecule. The length of such sequences can be determined in accordance with selection procedures described herein.

5 Generally, the antisense molecule will be from about 10 nucleotides in length up to about 50 nucleotides in length. It will be appreciated however that any length of nucleotides within this range may be used in the method. Preferably, the length of the antisense molecule is between 10-30 nucleotides in length. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention has a sufficient length. As used herein, “sufficient

10 length” refers to an antisense oligonucleotide that is complementary to at least 8, more typically 8-30, contiguous nucleobases in the target pre-mRNA. In some embodiments, an antisense of sufficient length includes at least 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20 or more contiguous nucleobases in the target pre-mRNA. In some embodiments an antisense of sufficient length includes at least 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 contiguous nucleobases in the target

15 pre-mRNA.

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for reducing the expression of c-REL in the B cells of the subject. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the c-REL exon 2 donor splice site.

20 In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention is complementary to the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO:5. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention converts the c-Rel protein translation into an inactive peptide of 21 amino acids, lacking all active domains compared to full-length c-Rel isoform. In some embodiments, the inactive peptide

25 consists of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:6. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the c-REL exon 2 donor splice site and comprises the sequences as set forth in SEQ ID NO:7.

SEQ ID NO:5 target sequence for c-Rel (25nt exon + 25nt intron)

30 5'-caaccgaacatacccttctatccaggaatagacccttcttctgtgtcta-3'

SEQ ID NO:6 inactive peptide of 21 amino acids
MASDYELLWKRKSENYISNKE* (*=stop codon)

35 SEQ ID NO:7 splice switching antisense oligonucleotide for c-Rel

5' -ACAGAAGAAGGGTCTATTACCTGGA- 3'

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for reducing the expression of RELA in the B cells of the subject. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the RELA acceptor splice site of exon 5. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention is complementary to the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO:8. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the RELA acceptor splice site of exon 5 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:8 target sequence for RelA (25nt intron + 25nt EXON) :
5'-gggacagacgactggggcgctcagTTCCAGAACCTGGGAATCCAGTGT-3'

15 SEQ ID NO:9 splice switching antisense oligonucleotide for RELA
5' -GAAACTGAGCGCCCCAGTCGTC-3'

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for reducing the expression of RELB in the B cells of the subject. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the RELB acceptor splice site of exon 5. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the RELB acceptor splice site of exon 5 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:10.

25 SEQ ID NO:10 splice switching antisense oligonucleotide for RELB
5' - CGGAGCTGCAGGAAGAGAAGTCCTC- 3'

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for reducing the expression of IKK2 in the B cells of the subject. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the IKK2 acceptor splice site of exon 3 or exon 5. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention targets the IKK2 acceptor splice site of exon 3 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:11. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide

of the present invention targets the IKK2 acceptor splice site of exon 5 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:12.

5 SEQ ID NO:11 splice switching antisense oligonucleotide for IKK2 (IKK2-ex3-3' SS):
5'-GTTTCCTACAGAAACAGCACAGTGG-3'

10 SEQ ID NO:12 splice switching antisense oligonucleotide for IKK2 (IKK2-ex5-3' SS):
5'-GGTTCAGGTACTGTCAAGAAAGTGA -3'

In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention is stabilized. Stabilization can be a function of length or secondary structure. Alternatively, SSO stabilization can be accomplished via phosphate backbone modifications. Preferred stabilized SSOs of the present invention have a modified backbone, e.g. have phosphorothioate linkages to provide maximal activity and protect the SSO from degradation by intracellular exo- and endo-nucleases. Other possible stabilizing modifications include phosphodiester modifications, combinations of phosphodiester and phosphorothioate modifications, methylphosphonate, methylphosphorothioate, phosphorodithioate, p-ethoxy, and combinations thereof. Chemically stabilized, modified versions of the SSO's also include "Morpholinos" (phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMOs), 2'-O-Met oligomers, 2'-Methoxy-ethyl oligomers, 2'-Fluoro (2'-F) oligomers, tricyclo (tc)-DNAs, U7 short nuclear (sn) RNAs, tricyclo-DNA-oligoantisense molecules (U.S. Provisional Patent Application Serial No. 61/212,384 For: Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions and Methods for the Treatment of Disease, filed April 10, 2009, the complete contents of which is hereby incorporated by reference, unlocked nucleic acid (UNA), locked nucleic acid (LNA), peptide nucleic acid (PNA), serinol nucleic acid (SNA), twisted intercalating nucleic acid (TINA), anhydrohexitol nucleic acid (HNA), cyclohexenyl nucleic acid (CeNA), D-altritol nucleic acid (ANA) and morpholino nucleic acid (MNA) have also been investigated in splice modulation. Recently, nucleobase-modified AOs containing 2-thioribothymidine, and 5-(phenyltriazol)-2-deoxyuridine nucleotides have been reported to induce exon skipping (Chen S, Le BT, Chakravarthy M, Kosbar TR, Veedu RN. Systematic evaluation of 2'-Fluoro modified chimeric antisense oligonucleotide-mediated exon skipping in vitro. *Sci Rep.* 2019 Apr 15;9(1):6078.). In some embodiments, the antisense oligonucleotides of the invention may be 2'-O-Me RNA/ENA chimera oligonucleotides (Takagi M, Yagi M, Ishibashi K, Takeshima Y, Surono

A, Matsuo M, Koizumi M. Design of 2'-O-Me RNA/ENA chimera oligonucleotides to induce exon skipping in dystrophin pre-mRNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2004;(48):297-8. Other forms of SSOs that may be used to this effect are SSO sequences coupled to small nuclear RNA molecules such as U1 or U7 in combination with a viral transfer method based on, but not limited to, lentivirus or adeno-associated virus (Denti, MA, et al, 2008; Goyenvallé, A, et al, 2004). In some embodiments, the antisense oligonucleotides of the invention are 2'-O-methyl-phosphorothioate nucleotides.

The SSOs of the invention can be synthesized de novo using any of a number of procedures well known in the art. For example, the b-cyanoethyl phosphoramidite method (Beaucage et al., 1981); nucleoside H-phosphonate method (Garegg et al., 1986; Froehler et al., 1986, Garegg et al., 1986, Gaffney et al., 1988). These chemistries can be performed by a variety of automated nucleic acid synthesizers available in the market. These nucleic acids may be referred to as synthetic nucleic acids. Alternatively, SSO's can be produced on a large scale in plasmids (see Sambrook, et al., 1989). SSO's can be prepared from existing nucleic acid sequences using known techniques, such as those employing restriction enzymes, exonucleases or endonucleases. SSO's prepared in this manner may be referred to as isolated nucleic acids.

In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention may be delivered in vivo alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention to the cells. Preferably, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors useful in the invention include, but are not limited to, naked plasmids, non-viral delivery systems (electroporation, sonoporation, cationic transfection agents, liposomes, nanoparticules, peptide-bound SSO, etc...), phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the antisense oligonucleotide nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include, but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: RNA viruses such as a retrovirus (as for example moloney murine leukemia virus and lentiviral derived vectors), harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rous sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus. One can readily employ other vectors not named but known to the art. Typically, viral

vectors according to the invention include adenoviruses and adeno-associated (AAV) viruses, which are DNA viruses that have already been approved for human use in gene therapy. Actually 12 different AAV serotypes (AAV1 to 12) are known, each with different tissue tropisms (Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27). Recombinant AAV are derived from the dependent parvovirus AAV (Choi, VW J Virol 2005; 79:6801-07). The adeno-associated virus type 1 to 12 can be engineered to be replication deficient and is capable of infecting a wide range of cell types and species (Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27). It further has advantages such as, heat and lipid solvent stability; high transduction frequencies in cells of diverse lineages, including hematopoietic cells; and lack of superinfection inhibition thus allowing multiple series of transductions. In addition, wild-type adeno-associated virus infections have been followed in tissue culture for greater than 100 passages in the absence of selective pressure, implying that the adeno-associated virus genomic integration is a relatively stable event. The adeno-associated virus can also function in an extrachromosomal fashion. Other vectors include plasmid vectors. Plasmid vectors have been extensively described in the art and are well known to those of skill in the art. See e.g. Sambrook et al., 1989. In the last few years, plasmid vectors have been used as DNA vaccines for delivering antigen-encoding genes to cells in vivo. They are particularly advantageous for this because they do not have the same safety concerns as with many of the viral vectors. These plasmids, however, having a promoter compatible with the host cell, can express a peptide from a gene operatively encoded within the plasmid. Some commonly used plasmids include pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, and pBlueScript. Other plasmids are well known to those of ordinary skill in the art. Additionally, plasmids may be custom designed using restriction enzymes and ligation reactions to remove and add specific fragments of DNA. Plasmids may be delivered by a variety of parenteral, mucosal and topical routes. For example, the DNA plasmid can be injected by intramuscular, intradermal, subcutaneous, or other routes. It may also be administered by, intranasal sprays or drops, rectal suppository and orally. It may also be administered into the epidermis or a mucosal surface using a gene-gun. The plasmids may be given in an aqueous solution, dried onto gold particles or in association with another DNA delivery system including but not limited to liposomes, dendrimers, cochleate and microencapsulation. In some embodiments, the antisense oligonucleotide nucleic acid sequence is under the control of a heterologous regulatory region, e.g., a heterologous promoter. The promoter can also be, e.g., a viral promoter, such as CMV promoter or any synthetic promoters.

The method of the present invention is particularly suitable for the treatment of B cell malignancies. B-cell malignancies include, but are not limited to, non-Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, small lymphocytic lymphoma, primary effusion lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, splenic marginal zone lymphoma, MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma, hairy cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia, B-cell prolymphocytic leukemia, B cell lymphomas (e.g. various forms of Hodgkin's disease, B cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and related lymphomas (e.g. Waldenstrom's macroglobulinaemia (also called lymphoplasmacytic lymphoma or immunocytoma) or central nervous system lymphomas), leukemias (e.g. acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia (CLL; also termed B cell chronic lymphocytic leukemia BCLL), hairy cell leukemia and chronic myeloblastic leukemia) and myelomas (e.g. multiple myeloma). Additional B cell malignancies include, lymphoplasmacytic lymphoma, plasma cell myeloma, solitary plasmacytoma of bone, extraosseous plasmacytoma, extra-nodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa-associated (MALT) lymphoid tissue, nodal marginal zone B cell lymphoma, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, , mediastinal (thymic) large B cell lymphoma, intravascular large B cell lymphoma, primary effusion lymphoma, Burkitt's lymphoma/leukemia, grey zone lymphoma, B cell proliferations of uncertain malignant potential, lymphomatoid granulomatosis, and post-transplant lymphoproliferative disorder.

20 More particularly, the method of the present invention is suitable for the treatment of multiple myeloma.

The method of the present invention is also particularly suitable for the treatment of diseases associated to autoimmunity or inflammation. Examples of said diseases include, but are not limited to arthritis (rheumatoid arthritis such as acute arthritis, chronic rheumatoid arthritis, gout or gouty arthritis, acute gouty arthritis, acute immunological arthritis, chronic inflammatory arthritis, degenerative arthritis, type II collagen-induced arthritis, infectious arthritis, Lyme arthritis, proliferative arthritis, psoriatic arthritis, Still's disease, vertebral arthritis, and juvenile-onset rheumatoid arthritis, osteoarthritis, arthritis chronica progrediente, arthritis deformans, polyarthritis chronica primaria, reactive arthritis, and ankylosing spondylitis), inflammatory hyperproliferative skin diseases, psoriasis such as plaque psoriasis, gutatte psoriasis, pustular psoriasis, and psoriasis of the nails, atopy including atopic diseases such as hay fever and Job's syndrome, dermatitis including contact dermatitis, chronic contact dermatitis, exfoliative dermatitis, allergic dermatitis, allergic contact dermatitis, dermatitis

herpetiformis, nummular dermatitis, seborrheic dermatitis, non-specific dermatitis, primary irritant contact dermatitis, and atopic dermatitis, x-linked hyper IgM syndrome, allergic intraocular inflammatory diseases, urticaria such as chronic allergic urticaria and chronic idiopathic urticaria, including chronic autoimmune urticaria, myositis, 5 polymyositis/dermatomyositis, juvenile dermatomyositis, toxic epidermal necrolysis, scleroderma (including systemic scleroderma), sclerosis such as systemic sclerosis, multiple sclerosis (MS) such as spino-optical MS, primary progressive MS (PPMS), and relapsing remitting MS (RRMS), progressive systemic sclerosis, atherosclerosis, arteriosclerosis, sclerosis disseminata, ataxic sclerosis, neuromyelitis optica (NMO), inflammatory bowel 10 disease (IBD) (for example, Crohn's disease, autoimmune-mediated gastrointestinal diseases, colitis such as ulcerative colitis, colitis ulcerosa, microscopic colitis, collagenous colitis, colitis polyposa, necrotizing enterocolitis, and transmural colitis, and autoimmune inflammatory bowel disease), bowel inflammation, pyoderma gangrenosum, erythema nodosum, primary sclerosing cholangitis, respiratory distress syndrome, including adult or acute respiratory 15 distress syndrome (ARDS), meningitis, inflammation of all or part of the uvea, iritis, choroiditis, an autoimmune hematological disorder, rheumatoid spondylitis, rheumatoid synovitis, hereditary angioedema, cranial nerve damage as in meningitis, herpes gestationis, pemphigoid gestationis, pruritus scroti, autoimmune premature ovarian failure, sudden hearing loss due to an autoimmune condition, IgE-mediated diseases such as anaphylaxis and allergic and atopic 20 rhinitis, encephalitis such as Rasmussen's encephalitis and limbic and/or brainstem encephalitis, uveitis, such as anterior uveitis, acute anterior uveitis, granulomatous uveitis, nongranulomatous uveitis, phacoantigenic uveitis, posterior uveitis, or autoimmune uveitis, glomerulonephritis (GN) with and without nephrotic syndrome such as chronic or acute glomerulonephritis such as primary GN, immune-mediated GN, membranous GN 25 (membranous nephropathy), idiopathic membranous GN or idiopathic membranous nephropathy, membrano- or membranous proliferative GN (MPGN), including Type I and Type II, and rapidly progressive GN, proliferative nephritis, autoimmune polyglandular endocrine failure, balanitis including balanitis circumscripta plasmacellularis, balanoposthitis, erythema annulare centrifugum, erythema dyschromicum perstans, erythema multiform, granuloma 30 annulare, lichen nitidus, lichen sclerosus et atrophicus, lichen simplex chronicus, lichen spinulosus, lichen planus, lamellar ichthyosis, epidermolytic hyperkeratosis, premalignant keratosis, pyoderma gangrenosum, allergic conditions and responses, allergic reaction, eczema including allergic or atopic eczema, asteatotic eczema, dyshidrotic eczema, and vesicular palmoplantar eczema, asthma such as asthma bronchiale, bronchial asthma, and auto-immune

asthma, conditions involving infiltration of T cells and chronic inflammatory responses, immune reactions against foreign antigens such as fetal A-B—O blood groups during pregnancy, chronic pulmonary inflammatory disease, autoimmune myocarditis, leukocyte adhesion deficiency, lupus, including lupus nephritis, lupus cerebritis, pediatric lupus, non-renal lupus, extra-renal lupus, discoid lupus and discoid lupus erythematosus, alopecia lupus, systemic lupus erythematosus (SLE) such as cutaneous SLE or subacute cutaneous SLE, neonatal lupus syndrome (NLE), and lupus erythematosus disseminatus, juvenile onset (Type I) diabetes mellitus, including pediatric insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), adult onset diabetes mellitus (Type II diabetes), autoimmune diabetes, idiopathic diabetes insipidus, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, diabetic large-artery disorder, immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis including lymphomatoid granulomatosis, Wegener's granulomatosis, agranulocytosis, vasculitides, including vasculitis, large-vessel vasculitis (including polymyalgia rheumatica and giant-cell (Takayasu's) arteritis), medium-vessel vasculitis (including Kawasaki's disease and polyarteritis nodosa/periarteritis nodosa), microscopic polyarteritis, immunovascularitis, CNS vasculitis, cutaneous vasculitis, hypersensitivity vasculitis, necrotizing vasculitis such as systemic necrotizing vasculitis, and ANCA-associated vasculitis, such as Churg-Strauss vasculitis or syndrome (CSS) and ANCA-associated small-vessel vasculitis, temporal arteritis, aplastic anemia, autoimmune aplastic anemia, Coombs positive anemia, Diamond Blackfan anemia, hemolytic anemia or immune hemolytic anemia including autoimmune hemolytic anemia (AIHA), pernicious anemia (anemia perniciosa), Addison's disease, pure red cell anemia or aplasia (PRCA), Factor VIII deficiency, hemophilia A, autoimmune neutropenia, pancytopenia, leukopenia, diseases involving leukocyte diapedesis, CNS inflammatory disorders, multiple organ injury syndrome such as those secondary to septicemia, trauma or hemorrhage, antigen-antibody complex-mediated diseases, anti-glomerular basement membrane disease, anti-phospholipid antibody syndrome, allergic neuritis, Behcet's disease/syndrome, Castleman's syndrome, Goodpasture's syndrome, Reynaud's syndrome, Sjogren's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, pemphigoid such as pemphigoid bullous and skin pemphigoid, pemphigus (including pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, pemphigus mucus-membrane pemphigoid, and pemphigus erythematosus), autoimmune polyendocrinopathies, Reiter's disease or syndrome, thermal injury, preeclampsia, an immune complex disorder such as immune complex nephritis, antibody-mediated nephritis, polyneuropathies, chronic neuropathy such as IgM polyneuropathies or IgM-mediated neuropathy, thrombocytopenia (as developed by myocardial

infarction patients, for example), including thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), post-transfusion purpura (PTP), heparin-induced thrombocytopenia, and autoimmune or immune-mediated thrombocytopenia such as idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) including chronic or acute ITP, scleritis such as idiopathic cerato-scleritis, episcleritis, autoimmune disease of the testis and ovary including autoimmune orchitis and oophoritis, primary

5 hypothyroidism, hypoparathyroidism, autoimmune endocrine diseases including thyroiditis such as autoimmune thyroiditis, Hashimoto's disease, chronic thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis), or subacute thyroiditis, autoimmune thyroid disease, idiopathic hypothyroidism, Grave's disease, polyglandular syndromes such as autoimmune polyglandular syndromes (or

10 polyglandular endocrinopathy syndromes), paraneoplastic syndromes, including neurologic paraneoplastic syndromes such as Lambert-Eaton myasthenic syndrome or Eaton-Lambert syndrome, stiff-man or stiff-person syndrome, encephalomyelitis such as allergic encephalomyelitis or encephalomyelitis allergica and myasthenia gravis such as thymoma-associated myasthenia gravis, cerebellar degeneration, neuromyotonia, opsoclonus or

15 opsoclonus myoclonus syndrome (OMS), and sensory neuropathy, multifocal motor neuropathy, Sheehan's syndrome, autoimmune hepatitis, chronic hepatitis, lupoid hepatitis, giant-cell hepatitis, chronic active hepatitis or autoimmune chronic active hepatitis, lymphoid interstitial pneumonitis (LIP), bronchiolitis obliterans (non-transplant) vs NSIP, Guillain-Barre syndrome, Berger's disease (IgA nephropathy), idiopathic IgA nephropathy, linear IgA

20 dermatosis, acute febrile neutrophilic dermatosis, subcorneal pustular dermatosis, transient acantholytic dermatosis, cirrhosis such as primary biliary cirrhosis and pneumocirrhosis, autoimmune enteropathy syndrome, Celiac or Coeliac disease, celiac sprue (gluten enteropathy), refractory sprue, idiopathic sprue, cryoglobulinemia, amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Lou Gehrig's disease), coronary artery disease, autoimmune ear disease such as autoimmune inner

25 ear disease (AIED), autoimmune hearing loss, polychondritis such as refractory or relapsed or relapsing polychondritis, pulmonary alveolar proteinosis, Cogan's syndrome/nonsyphilitic interstitial keratitis, Bell's palsy, Sweet's disease/syndrome, rosacea autoimmune, zoster-associated pain, amyloidosis, a non-cancerous lymphocytosis, a primary lymphocytosis, which includes monoclonal B cell lymphocytosis (e.g., benign monoclonal gammopathy and

30 monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), peripheral neuropathy, paraneoplastic syndrome, channelopathies such as epilepsy, migraine, arrhythmia, muscular disorders, deafness, blindness, periodic paralysis, and channelopathies of the CNS, autism, inflammatory myopathy, focal or segmental or focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), endocrine ophthalmopathy, uveoretinitis, chorioretinitis, autoimmune hepatological disorder,

fibromyalgia, multiple endocrine failure, Schmidt's syndrome, adrenalitis, gastric atrophy, presenile dementia, demyelinating diseases such as autoimmune demyelinating diseases and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, Dressler's syndrome, alopecia areata, alopecia totalis, CREST syndrome (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia), male and female autoimmune infertility, e.g., due to anti-spermatozoan antibodies, mixed connective tissue disease, Chagas' disease, rheumatic fever, recurrent abortion, farmer's lung, erythema multiforme, post-cardiotomy syndrome, Cushing's syndrome, bird-fancier's lung, allergic granulomatous angiitis, benign lymphocytic angiitis, Alport's syndrome, alveolitis such as allergic alveolitis and fibrosing alveolitis, interstitial lung disease, transfusion reaction, leprosy, malaria, parasitic diseases such as leishmaniasis, 5 kypanosomiasis, schistosomiasis, ascariasis, aspergillosis, Sampter's syndrome, Caplan's syndrome, dengue, endocarditis, endomyocardial fibrosis, diffuse interstitial pulmonary fibrosis, interstitial lung fibrosis, pulmonary fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, cystic fibrosis, endophthalmitis, erythema elevatum et diutinum, erythroblastosis fetalis, eosinophilic 10 faciitis, Shulman's syndrome, Felty's syndrome, flariasis, cyclitis such as chronic cyclitis, heterochronic cyclitis, iridocyclitis (acute or chronic), or Fuch's cyclitis, Henoch-Schonlein purpura, human immunodeficiency virus (HIV) infection, SCID, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), echovirus infection, sepsis, endotoxemia, pancreatitis, thyroxicosis, parvovirus infection, rubella virus infection, post-vaccination syndromes, congenital rubella 15 infection, Epstein-Barr virus infection, mumps, Evan's syndrome, autoimmune gonadal failure, Sydenham's chorea, post-streptococcal nephritis, thromboangitis obliterans, thyrotoxicosis, tabes dorsalis, chorioiditis, giant-cell polymyalgia, chronic hypersensitivity pneumonitis, keratoconjunctivitis sicca, epidemic keratoconjunctivitis, idiopathic nephritic syndrome, minimal change nephropathy, benign familial and ischemia-reperfusion injury, transplant organ 20 reperfusion, retinal autoimmunity, joint inflammation, bronchitis, chronic obstructive airway/pulmonary disease, silicosis, aphthae, aphthous stomatitis, arteriosclerotic disorders, aspermiogenese, autoimmune hemolysis, Boeck's disease, cryoglobulinemia, Dupuytren's contracture, endophthalmia phacoanaphylactica, enteritis allergica, erythema nodosum leprosum, idiopathic facial paralysis, chronic fatigue syndrome, febris rheumatica, Hamman- 25 Rich's disease, sensorineural hearing loss, haemoglobinuria paroxysmatica, hypogonadism, ileitis regionalis, leucopenia, mononucleosis infectiosa, transverse myelitis, primary idiopathic myxedema, nephrosis, ophthalmia sympathica, orchitis granulomatosa, pancreatitis, polyradiculitis acuta, pyoderma gangrenosum, Quervain's thyroiditis, acquired splenic atrophy, non-malignant thymoma, vitiligo, toxic-shock syndrome, food poisoning, conditions involving 30

- infiltration of T cells, leukocyte-adhesion deficiency, immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes, diseases involving leukocyte diapedesis, multiple organ injury syndrome, antigen-antibody complex-mediated diseases, antiglomerular basement membrane disease, allergic neuritis, autoimmune
- 5 polyendocrinopathies, oophoritis, primary myxedema, autoimmune atrophic gastritis, sympathetic ophthalmia, rheumatic diseases, mixed connective tissue disease, nephrotic syndrome, insulinitis, polyendocrine failure, autoimmune polyglandular syndrome type I, adult-onset idiopathic hypoparathyroidism (AOIH), cardiomyopathy such as dilated cardiomyopathy, epidermolysis bullosa acquisita (EBA), hemochromatosis, myocarditis, nephrotic syndrome,
- 10 primary sclerosing cholangitis, purulent or nonpurulent sinusitis, acute or chronic sinusitis, ethmoid, frontal, maxillary, or sphenoid sinusitis, an eosinophil-related disorder such as eosinophilia, pulmonary infiltration eosinophilia, eosinophilia-myalgia syndrome, Loffler's syndrome, chronic eosinophilic pneumonia, tropical pulmonary eosinophilia, bronchopneumonic aspergillosis, aspergilloma, or granulomas containing eosinophils,
- 15 anaphylaxis, seronegative spondyloarthritides, polyendocrine autoimmune disease, sclerosing cholangitis, sclera, episclera, chronic mucocutaneous candidiasis, Bruton's syndrome, transient hypogammaglobulinemia of infancy, Wiskott-Aldrich syndrome, ataxia telangiectasia syndrome, angiectasis, autoimmune disorders associated with collagen disease, rheumatism, neurological disease, lymphadenitis, reduction in blood pressure response, vascular dysfunction,
- 20 tissue injury, cardiovascular ischemia, hyperalgesia, renal ischemia, cerebral ischemia, and disease accompanying vascularization, allergic hypersensitivity disorders, glomerulonephritis, reperfusion injury, ischemic re-perfusion disorder, reperfusion injury of myocardial or other tissues, lymphomatous tracheobronchitis, inflammatory dermatoses, dermatoses with acute inflammatory components, multiple organ failure, bullous diseases, renal cortical necrosis,
- 25 acute purulent meningitis or other central nervous system inflammatory disorders, ocular and orbital inflammatory disorders, granulocyte transfusion-associated syndromes, cytokine-induced toxicity, narcolepsy, acute serious inflammation, chronic intractable inflammation, pyelitis, endarterial hyperplasia, peptic ulcer, valvulitis, and endometriosis.
- 30 It will be understood that the total daily usage of the compounds of the present invention (i.e. the SSO of the present invention) will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition

employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific compound employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

15

Typically, the splice switching antisense oligonucleotide of the present invention is administered in the form of a pharmaceutical composition. Pharmaceutical compositions of the present invention may also include a pharmaceutically or physiologically acceptable carrier such as saline, sodium phosphate, etc. The compositions will generally be in the form of a liquid, although this need not always be the case. Suitable carriers, excipients and diluents include lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, starches, gum acacia, calcium phosphates, alginate, tragacanth, gelatin, calcium silicate, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, cellulose, water syrup, methyl cellulose, methyl and propylhydroxybenzoates, mineral oil, etc. The formulations can also include lubricating agents, wetting agents, emulsifying agents, preservatives, buffering agents, etc. Those of skill in the art will also recognize that nucleic acids are often delivered in conjunction with lipids (e.g. cationic lipids or neutral lipids, or mixtures of these), frequently in the form of liposomes or other suitable micro- or nano-structured material (e.g. micelles, lipocomplexes, dendrimers, emulsions, cubic phases, nanoparticles, etc.).

20
25
30

A further object of the present invention relates to a splice switching antisense oligonucleotide as described above. In some embodiments, the splice switching antisense oligonucleotide comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:12.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

5

FIGURES:

Figure 1. “Exon skipper pipeline” facilitates selection of splice switching oligonucleotides (SSO) to knockdown gene expression. Schematic representation of in-silico sequential steps performed to select exon targets and define the best SSO position for efficient inhibition of gene expression.

Figure 2. c-Rel exon 2 donor splice site targeting vivo-morpholino SSO allows efficient c-Rel knockdown in DLBCL cell lines and human plasmablasts differentiated from primary B cells. **A**, Illustration of SSO mediated knockdown of c-Rel transcripts. **B,C,D**, SUDHL4 cells were treated 48 hours with 0.25 to 0.75 μM of c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL). **B**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **C**, Knockdown of full length c-Rel mRNAs (left) and the levels of alternative c-Rel mRNAs lacking exon 2 were measured by qRT-PCR **D**, Knockdown of c-Rel protein was verified by western blot. **E,F**, SUDHL4 cells were treated 48 hours with 0.5 μM of c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL) (n=4). **E**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **F**, qRT-PCR were performed as in C. **G,H**, Human plasmablasts differentiated from primary B cells were treated for 72 hours at day 1 following stimulation with 2 μM of SSO or CTRL. **G**, Exon 2 skipping was assessed by RT-PCR **H**, Knockdown of c-Rel protein was verified by western blot. **** p < 0.0001

Figure 3. Treatment with c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO reduces viability of DLBCL cells. Apoptosis was analysed by flow cytometry with annexin V and 7-AAD staining. **** p < 0.0001

30

Figure 4. RelA exon 5 acceptor splice site targeting vivo-morpholino SSO allows protein knockdown of RelA in DLBCL cells and human plasma cells differentiated from primary B cells. **A**, Illustration of SSO mediated knockdown of RelA transcripts. **B,C** OCILY10 cells were treated 48 hours with 1.5 to 2 μM of RelA exon 5 acceptor splice site targeting SSO (SSO)

or irrelevant control ASO (CTRL). **B**, Diminution of RelA transcripts was assessed by RT-PCR. **C**, Knockdown of RelA protein was verified by western blot. **D,E** Human plasma cells differentiated from primary B cells were treated for 72 hours at day 4 following differentiation with 2 μM of RelA exon 5 acceptor splice site targeting SSO (SSO) or irrelevant control ASO (CTRL). **D**, Diminution of RelA transcripts was assessed by RT-PCR. **E**, Knockdown of RelA protein was verified by western blot.

EXAMPLE:

10 **Methods:**

SSO design

REL and RELA gene sequences were collected from NCBI, GRCh38.p12 assembly, 25 base pairs upstream to 25 base pairs downstream from each splice site. SSO targeting c-REL exon 2 donor splice site (5'-ACAGAAGAAGGGTCTATTACCTGGA- 3') (SEQ ID NO:7), RELA SSO targeting the acceptor splice site of exon 5 (5'-GAAACTGAGCGCCCCCAGTCGTC-3') (SEQ ID NO:9), and irrelevant Control SSO (5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') (SEQ ID NO:13) were designed as morpholino or Vivo-morpholino and purchased at Gene Tools, LLC. SSO stock solutions were made at 0.5mM with sterile nuclease-free water.

20

Cell culture and SSO treatments

SUDHL4 and OCILY10 (DLBCL) cell lines were cultivated in RPMI1640 medium with Ultraglutamine (Lonza) and 10% or 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Dominique Dutscher) at 37°C with 5% CO₂ and treated for 48 hours with 0.25 to 0.75 μM SSO for SUDHL4 and with 1.5 to 2 μM SSO for OCILY10. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained by ficoll (Lympholyte-H Celardane) of cytapheresis rings of healthy donors (EFS Bordeaux) and B cells were sorted with the B cell isolation kit II (Miltenyi Biotec). Sorted B cells were cultured for 4 days in RPMI 1640 with UltraGlutamine (Lonza) containing 10% FBS (Dominique Dutscher), 1 mM sodium pyruvate (Eurobio), 1% AANE (Eurobio) and 50 U/ml penicillin/ 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Gibco) with 1 $\mu\text{g/ml}$ CPG-ODN2006 (Miltenyi), 2,4 $\mu\text{g/ml}$ BCR Fab'2 IgA+G+M (Jackson Immunoresearch), 5ng/mL hIL-2 (R&D Systems) and 100ng/mL Mega-CD40 ligand (Enzo Life Sciences) then washed and stimulated in the same media with 5ng/mL hIL-2 (R&D Systems), 12ng/mL hIL-10 (R&D Systems) and 5ng/mL human IL-4 (Peprotech) for 3 more days. Human B cells were treated with 2 μM SSO for 72

hours at day 1 following stimulation for plasmablast study and at day 4 following stimulation for plasma cell study.

Flow Cytometry

- 5 Apoptosis assay was performed on SUDHL4 cells with AnnexinV antibody (BioLegend) and 7-AAD (BD Pharmingen) staining. Data were acquired on a Beckton Dickinson LSRII Fortessa cytometer and analyzed with FlowLogic software.

Western Blot

- 10 Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Thermo Scientific) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail. Lysates were sonicated and protein concentrations were determined using Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Proteins were denaturated at 95°C 5 minutes before separation on SDS-PAGE TGX 12% Stain-Free FastCast Acrylamide (Bio-Rad Laboratories). Proteins were then electro-
15 transferred onto Trans Blot Turbo polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad Laboratories). Western blots were probed with rabbit anti-human c-REL antibody (Cell Signaling), rabbit anti-human RELA antibody (Cell Signaling) or mouse anti-beta-actin antibody (Sigma). Detection was performed using an HRP-linked goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibody (Southern Biotech) and chemiluminescence detection kit (ECL Plus™, GE Healthcare) using
20 ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories).

RT-PCR and qPCRs

- Total RNA was prepared using Tri-reagent (Invitrogen) procedures. RT-PCR was carried out on 1µg DNase I (Invitrogen)-treated RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription
25 Kit (Applied Biosystem). PCRs were performed on cDNA samples equivalent to 10 to 20 ng of RNA per reaction using the Taq Core Kit (MP Biomedicals) and the primer pair forward 5'-GGCCTCCTGACTGACTGACT (SEQ ID NO:14) and reverse 5'-GTAGCCGCTCTGCAGTCTTT (SEQ ID NO:15) for c-REL and the primer pair forward 5'-GCGAGAGGAGCACAGATACC (SEQ ID NO:16) and reverse 5'-
30 TCACTCGGCAGATCTTGAGC (SEQ ID NO:17) for RELA. PCRs products were migrated on 2% agarose TBE gels. Quantitative PCRs were performed on cDNA samples equivalent to 5-10 ng of RNA per reaction, using SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), ROX plus or Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), ROX plus (Takara) 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 (Hs02758991_g1 ThermoFisher Scientific Probe). SYBR quantitative PCR were performed for the quantification of c-REL full length transcripts with forward 5'-GGCCTCCGGTGCATATAA (SEQ ID NO:18) and reverse 5'-TGTTCCGGTTGTTGTCTGTGC (SEQ ID NO:19) primers and for exon 2 skipped c-REL transcripts with forward 5'-AGCCATGGCCTCCGATTATG (SEQ ID NO:20) and reverse 5'-AAGGTCTGCGTTCTTGTCCA (SEQ ID NO:21).

RNA sequencing analysis

Messenger RNA-sequencing was performed on the Illumina NextSeq500 and analyzed with DESeq2 statistical analysis at Nice-Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform. Differentially expressed gene were sorted when the adjusted p value was > 0.05 and the fold change was < 1.5 or > 1.5 . Reads were aligned with STAR on the hg38 genome version during the primary analysis. REL reads visualization was performed on IGV software (Broad Institute and the Regents of the University of California) and sashimi plot were obtained by ggsashimi tool on R studio software with a cutoff of 5 junctions. Heatmap was obtained with R studio software using ggplot tool on statistically and differentially expressed gene list. Pathways enrichment were analyzed on statistically and differentially expressed gene list with g:Profiler website (25).

20 Statistical analysis

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

25 Results

Splice switching oligonucleotide selection workflow for exon skipping-mediated knockdown of gene expression.

Splice switching oligonucleotide (SSO) mediated gene knockdown can be realized with an exon-skipping strategy for the vast majority of human genes, containing ≥ 3 exons with a targeted internal one not divisible by 3 for a reading frameshift to occur. In addition, exon skipping must provoke the appearance of a PTC to shorten drastically the open reading frame and/or support NMD degradation.

We developed an R shiny tool called Exon Skipper (<https://cribl.shinyapps.io/ExonSkipper/>) for rapid identification of putative exon candidates for any mouse or human transcripts. This tool also indicates the PTC position for each exon skipping events, providing predictive information with regard to NMD degradation and ORF shortening. For selected exon candidates, we then inspected its nucleotide sequence, together with its surrounding 500 nucleotides intronic sequences, to scrutinize unwanted restoration of the reading frame using cryptic splice sites. This analysis can be made by any splice site scoring tools available like human splicing finder (HSF) (<https://hsf.genomnis.com/sequence>) (26). The selection of 3'SS targeting SSO is preferred when high risk of cryptic 5'SS that restore reading frame are found and conversely.

In the absence of predictive correction of reading frame after alternative splicing involving cryptic splice sites, SSO can be designed to hybridize either 5'SS, 3'SS or ESE/ISE sequences, the latter can be identified using Skip-E (<https://skip-e.geneticsandbioinformatics.eu>), ESE finder (http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi) (27) or other tools. Each SSO sequence must be carefully chosen as there is optimal parameters for each oligonucleotide chemistry related to RNA binding affinity (for design tips see (19)). RNA binding parameters can be analysed through IDT OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) and RNA availability through folding RNA simulators such as mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) (28). Finally, NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysis of selected SSO sequences towards other transcripts from the same organism is required to exclude SSO with high risk of cross-hybridization to off-targets (**Figure 1**). This complete method referred as “Exon skipper pipeline” has been used for the design of SSO targeting two members of the NF- κ B pathway, c-Rel and RelA.

25 ***SSO targeting c-Rel exon 2 donor splice site efficiently knockdown c-Rel expression in B-lineage cells***

An SSO targeting exon 2 donor splice site of c-Rel was designed with the previously described method in order to convert c-Rel protein translation into an inactive peptide of 21 amino acids, lacking all active domains compared to full-length c-Rel isoform. Consistent with the NMD escape of PTC-containing mRNAs with short ORFs (29,30), alternative c-Rel mRNAs lacking exon 2 are likely poor NMD substrates as the PTC is close to the translation initiation site (29,30) (**Figure 2A**). First, SUDHL4 (DLBCL) cells were used to evaluate the efficacy of passive administration of vivo-morpholino SSO targeting c-Rel. Treatments with 0.25 to 0.75 μ M vivo-morpholino SSO (SSO) for 48 hours were sufficient to induce a dose-dependent

decrease of c-Rel expression (Figure 3B,C), with a 10-fold reduction of c-Rel full-length mRNA expression compared to irrelevant control treated cells (CTRL) (**Figure 2B,C**) and a nearly complete absence of c-Rel protein at 0.5 μ M dose. As predicted, the c-Rel exon 2 skipped transcript induced in SSO conditions was readily detectable by RT-PCR as it must be poorly degraded by NMD (**Figure 2B**). Comparatively, transfection of morpholino SSO was far less efficient than passive administration of vivo-morpholino SSO and did not achieve complete knockdown of c-Rel expression (**not shown**). We further verified these results by other experiments on SUDHL4 treated with 0.5 μ M of SSO and confirmed an effective reduction of full-length c-Rel mRNA expression (**Figure 2E,F**). Then, c-Rel SSO was used in a plasma cell differentiation model described by Le Gallou et al (31,32) and was efficient to provoke c-Rel protein knockdown with a 2 μ M dose in pre-plasmablasts (**Figure 2G,H**) where c-Rel is still highly expressed and also in plasma cells where its expression is reduced (**not shown**). Thus, we identified vivo-morpholino SSO targeting c-Rel exon 2 donor splice site as simple and powerful tools to use for the inhibition of c-Rel expression in B and plasma cells.

15

Treatment with c-Rel exon 2 donor splice site targeting SSO alters Nf- κ B signalling and induce apoptosis of DLBCL cells

SUDHL4 cells treated with 0.5 μ M vivo-morpholino SSO were analysed by RNA sequencing to verify the absence of any other in-frame alternative transcripts. Only one out-of-frame junction resulting from intron retention downstream exon 2 was detected in low amount in SSO condition (SSO) but was also present in the irrelevant control condition (CTRL) (**not shown**). Simulation of translation of this intron retention alternative transcript revealed the presence of a premature stop codon at position 319, making it a good substrate for NMD degradation and unable to restore a partial c-Rel activity. Consistent with the increase of exon2-skipping events (**not shown**), exon 2 reads including exon1-exon2 and exon2-exon3 junctions decreased while exon1-exon3 junctions appeared when cells were treated with SSO compared to the irrelevant control (CTRL).

RNA sequencing also revealed that 122 genes were differentially and significantly expressed in DLBCL cells treated with c-Rel SSO compared to control conditions (**not shown**). Further pathways and gene enrichment analysis revealed that the main differentially expressed pathways were related to NF- κ B signalling pathway and immune response to pathogens (Figure 4C). Among those genes, BCL3 is reduced by almost 2 fold, RELB by 2 fold, NF- κ B Inhibitor alpha (I κ B α), delta (I κ B δ /p100) and zeta (I κ B ζ) by 1.5 ,1.5 and 3 fold respectively, NF- κ B2 by

1.5 fold, TNFAIP3/A20, NOTCH2, CD40 and CD83 by more than 1.5 fold and BIRC3 by more than 2.5 fold while PTPN6, VNN1 and FOS increase by 1.5 fold and CNTF increase by 2 fold (**not shown**). Interestingly, these major transcriptomic modifications, including a deregulated TWEAK (TNF related weak inducer of apoptosis) signaling pathway, were associated with a strong increase of cell death and late apoptosis (**Figure 3**).

RelA exon 5 acceptor splice site targeting SSO efficiently knockdown RelA protein in B cell and plasmablasts

Another SSO targeting RelA at the exon 5 acceptor splice site was designed with the help of “Exon skipper pipeline” in order to reduce RelA expression. In that case, alternative mRNAs lacking exon 5 are predicted to be NMD targets, with a PTC located at position 460 eliciting interactions with downstream exon junction complex (EJC) components (**Figure 4A**). OCILY10 (DLBCL) cells was used to evaluate the efficacy of passive administration of vivo-morpholino SSO to inhibit RelA expression. We observed efficient dose-dependent knockdown of RelA expression with increasing doses of vivo-morpholino SSO (SSO) from 1.5 to 2µM compared to control conditions (**Figure 4B,C**). As expected, full-length RelA mRNAs drastically decreased after SSO treatment, and PTC-containing alternative mRNAs were not detected and likely eliminated by NMD (**Figure 4B**). At the protein level, treatment with 2µM SSO during 48 hours achieved a nearly complete absence of RELA proteins (**Figure 4C**). In addition, RelA SSO was tested at 2µM in a plasma cell differentiation model described by Le Gallou et al (31,32) and compared to irrelevant control SSO (**Figure 4D,E**). Again, treatment with RelA SSO diminished the amounts of full-length RelA mRNAs (**Figure 4D**) and proteins (**Figure 4E**) in plasma cells expressing RelA during their differentiation program.

Discussion:

An efficient transient knockdown of two differentially expressed genes during plasma cell differentiation, c-Rel and RelA, was successfully achieved with an SSO-mediated exon skipping strategy and could constitute a great alternative to RNAi technology with known transfection efficiency limitations in primary B cells and plasma cells (10). In addition, the use of SSO could reduce off-target effects observed with RNAi technology or even RNase-H1 dependant SSO technologies, as they require direct mRNA degradation actors : RISC/Ago2 complex and RNase-H1 respectively. Indeed, it was shown that as little as 7 to 11 nucleotides homology between an siRNA and an mRNA was sufficient to recruit RISC/Ago2 complex and induce RNA degradation, particularly in 5’ untranslated regions (33,34). This aspect keeps

being a major issue for the development of RNAi-based therapies despite many findings in the field to reduce off-target effects using chemical modifications and optimization of RNAi structure (35). Gapmer ASOs can also recruit RNase-H1 with unintended target binding and provoke off-target RNA degradation (36). By contrast, SSOs do not directly recruit an RNA
 5 degradation machinery and therefore greatly minimize off-target effects. Indeed, SSOs are also capable of weak binding to unintended sequences but the absence of RNA degradation limits the impact on off-target gene expression. However, SSO are not completely deprived of off-target effects as splicing or RNA binding proteins attachment on unintended transcripts can still be disturbed with an SSO (37).

10

SSO mediated c-Rel inhibition also showed interesting results in a DLBCL cell line, as it was able to reduce NF- κ B signalling and cell viability. Interestingly, BCL3 which expression was reduced upon SSO treatment was described to increase cell proliferation by inducing cyclin D1 transcription (38,39). BCL3 is also known to function as an NF- κ B inhibitor in the same manner
 15 as I κ B ζ , a Bcl-3 homolog also reduced after SSO treatment, that was shown to potentiate the NF- κ B pathway activity by binding to p50 homodimers where they may function as co-activators (40–42). Indeed, Bcl-3 overexpression is found in chronic lymphocytic leukemia where it is frequently rearranged inside IGH locus (43). Additionally, recent findings suggest I κ B ζ could be a key actor in the development of psoriasis through activation of Th17 immune
 20 response (44,45) and could drive the pathogenesis of many haematological cancers (46,47). However, c-Rel is not known to have a direct effect on Bcl-3 and I κ B ζ expression, the latter preferentially interacting with p50 and p52 (48). Nonetheless, *NFKB2* gene encoding p52 which is also reduced upon c-Rel targeting SSO treatment could have influenced Bcl-3 expression as it is tightly regulated by this gene. Accordingly to our results, c-Rel was already found as a
 25 direct regulator of NF- κ B2 expression in transitional B-cells (49) and could have by this way another indirect effect on RelB expression as NF- κ B2 processed protein p52 mainly associate with RelB in the alternative NF- κ B pathway (50). Thus, c-Rel inhibition had a broad effect on NF- κ B signalling, explaining the decreased viability found upon SSO treatment in DLBCL cells whose tumorigenicity rely on this pathway (51,52). These results still needs to be confirmed in
 30 other DLBCL cells lines and patients cells to verify c-Rel knockdown benefits in this pathology but could constitute an interesting lead for new therapy development.

Indeed, targeting NF- κ B pathway could be an adequate strategy for the treatment of B-cell malignancies (53) and all NF- κ B subunits RelA, c-Rel, RelB, p52 and p50 as well as other NF-

κ B pathway components such as IKKs or NEMO could be targeted by our SSO induced gene knockdown therapy. Some existing drugs have in fact been found to be active NF- κ B inhibitors such as bortezomib which blocks I κ B degradation (54) but no specific NF- κ B inhibitor has currently shown promising results in vivo and display an high risk of toxicity (55,56).

5

To conclude, our results show that an efficient transient gene knockdown can be made by SSO mediated exon skipping with passive administration of vivo-morpholino oligos in primary B cells and plasma cells. Despite some limited exceptions identified with Exon skipper pipeline in mice and humans, this strategy can be applied to most eukaryotic genes and benefit from its
10 transfection-free system in primary cell cultures. Additionally, splicing modulation has the advantage of a low risk of off-target effects, as it does not rely on direct mRNA degradation actors' recruitment. This tool could be an efficient complement to DNA modifications tools such as CRISPR-Cas9 to study normal human B cells and uncover new plasma cell differentiation key mechanisms.

15

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference
20 into the present disclosure.

1. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*. 2015 Mar;15(3):160–71.
2. Wilmore JR, Allman D. Here, There, and Anywhere? Arguments for and against the Physical Plasma Cell Survival Niche. *The Journal of Immunology*. 2017 Aug 1;199(3):839–45.
- 25 3. Suan D, Sundling C, Brink R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Current Opinion in Immunology*. 2017 Apr 1;45:97–102.
4. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 13];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00721/full>
- 30 5. Lightman SM, Utley A, Lee KP. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 13];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00965/full>
6. Brynjolfsson SF, Persson Berg L, Olsen Ekerhult T, Rimkute I, Wick M-J, Mårtensson I-L, et al. Long-Lived Plasma Cells in Mice and Men. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited

- 2020 Aug 13];9. Available from:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02673/full>
7. Libouban H. The use of animal models in multiple myeloma. *Morphologie*. 2015 Jun 1;99(325):63–72.
 - 5 8. Gado K, Silva S, Paloczi K, Domjan G, Falus A. Mouse plasmacytoma: an experimental model of human multiple myeloma. *Haematologica*. 2001 Jan 1;86(3):227–36.
 9. Braggio E, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R. Molecular pathogenesis of Waldenström’s macroglobulinemia. *Haematologica*. 2012 Sep 1;97(9):1281–90.
 - 10 10. Shih T, De S, Barnes BJ. RNAi Transfection Optimized in Primary Naïve B Cells for the Targeted Analysis of Human Plasma Cell Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jul 23 [cited 2020 Aug 13];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6664017/>
 11. Hung KL, Meitlis I, Hale M, Chen C-Y, Singh S, Jackson SW, et al. Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Molecular Therapy*. 2018 Feb 7;26(2):456–67.
 - 15 12. Johnson MJ, Laoharawee K, Lahr WS, Webber BR, Moriarity BS. Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. *Scientific Reports*. 2018 Aug 14;8(1):12144.
 - 20 13. Grünewald J, Zhou R, Garcia SP, Iyer S, Lareau CA, Aryee MJ, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*. 2019 May;569(7756):433–7.
 14. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*. 25 2013 Sep;31(9):822–6.
 15. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annual Review of Medicine*. 2019;70(1):307–21.
 16. Smith CIE, Zain R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2019;59(1):605–30.
 - 30 17. Zammarchi F, Stanchina E de, Bournazou E, Supakorndej T, Martires K, Riedel E, et al. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *PNAS*. 2011 Oct 25;108(43):17779–84.
 18. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008 Nov;456(7221):470–6.

19. Maruyama R, Yokota T. Tips to Design Effective Splice-Switching Antisense Oligonucleotides for Exon Skipping and Exon Inclusion. In: Yokota T, Maruyama R, editors. Exon Skipping and Inclusion Therapies: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 [cited 2020 Jul 28]. p. 79–90. (Methods in Molecular Biology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8651-4_5
20. Godfrey C, Desviat LR, Smedsrød B, Piétri-Rouxel F, Denti MA, Disterer P, et al. Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies. *EMBO Mol Med*. 2017 May;9(5):545–57.
21. Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, Haren SD van, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, et al. STAT3-Mediated Up-Regulation of BLIMP1 Is Coordinated with BCL6 Down-Regulation to Control Human Plasma Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 2008 Apr 1;180(7):4805–15.
22. Roy K, Mitchell S, Liu Y, Ohta S, Lin Y, Metzger MO, et al. A regulatory circuit controlling the dynamics of the NFκB cRel phases B cells from proliferation to plasma cell differentiation. *Immunity*. 2019 Mar 19;50(3):616–628.e6.
23. Hunter JE, Leslie J, Perkins ND. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. *British Journal of Cancer*. 2016 Jan;114(1):1–6.
24. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*. 2012;246(1):379–400.
25. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W191–8.
26. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009 May;37(9):e67.
27. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1;31(13):3568–71.
28. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1;31(13):3406–15.
29. Inácio Â, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F, et al. Nonsense Mutations in Close Proximity to the Initiation Codon Fail to Trigger Full Nonsense-mediated mRNA Decay. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32170–80.
30. Rebbapragada I, Lykke-Andersen J. Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? *Current Opinion in Cell Biology*. 2009 Jun 1;21(3):394–402.

31. Le Gallou S, Caron G, Delaloy C, Rossille D, Tarte K, Fest T. IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol.* 2012 Jul 1;189(1):161–73.
32. Caron G, Hussein M, Kulis M, Delaloy C, Chatonnet F, Pignarre A, et al. Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Reports.* 2015 Nov 3;13(5):1059–71.
33. Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, et al. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(14):4527–35.
- 10 34. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology.* 2003 Jun;21(6):635–7.
35. Suter SR, Sheu-Gruttadauria J, Schirle NT, Valenzuela R, Ball-Jones AA, Onizuka K, et al. Structure-Guided Control of siRNA Off-Target Effects. *J Am Chem Soc.* 2016 Jul 20;138(28):8667–9.
- 15 20;138(28):8667–9.
36. Hagedorn PH, Pontoppidan M, Bisgaard TS, Berrera M, Dieckmann A, Ebeling M, et al. Identifying and avoiding off-target effects of RNase H-dependent antisense oligonucleotides in mice. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jun 20;46(11):5366–80.
37. Scharner J, Ma WK, Zhang Q, Lin K-T, Rigo F, Bennett CF, et al. Hybridization-mediated off-target effects of splice-switching antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 24;48(2):802–16.
- 20 2020 Jan 24;48(2):802–16.
38. Park SG, Chung C, Kang H, Kim J-Y, Jung G. Up-regulation of Cyclin D1 by HBx Is Mediated by NF- κ B2/BCL3 Complex through κ B Site of Cyclin D1 Promoter. *J Biol Chem.* 2006 Oct 20;281(42):31770–7.
- 25 2006 Oct 20;281(42):31770–7.
39. Westerheide SD, Mayo MW, Anest V, Hanson JL, Baldwin AS. The Putative Oncoprotein Bcl-3 Induces Cyclin D1 To Stimulate G1 Transition. *Molecular and Cellular Biology.* 2001 Dec 15;21(24):8428–36.
- 2001 Dec 15;21(24):8428–36.
40. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, et al. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature.* 2004 Jul;430(6996):218–22.
- 30 2004 Jul;430(6996):218–22.
41. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, et al. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through κ B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell.* 1993 Mar 12;72(5):729–39.

42. Caamaño JH, Perez P, Lira SA, Bravo R. Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-kappaB1 (p50) homodimers in vivo. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1342–8.
43. McKeithan TW, Takimoto GS, Ohno H, Bjorling VS, Morgan R, Hecht BK, et al. BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: A molecular and cytogenetic study. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 1997;20(1):64–72.
44. Müller A, Hennig A, Lorscheid S, Grondona P, Schulze-Osthoff K, Hailfinger S, et al. IκBζ is a key transcriptional regulator of IL-36–driven psoriasis-related gene expression in keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Oct 2;115(40):10088–93.
- 10 45. Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, et al. IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 2010 Apr 29;464(7293):1381–5.
46. Willems M, Dubois N, Musumeci L, Bours V, Robe PA. IκBζ: an emerging player in cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 26;7(40):66310–22.
- 15 47. Nogai H, Wenzel S-S, Hailfinger S, Grau M, Kaergel E, Seitz V, et al. IκB-ζ controls the constitutive NF-κB target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood.* 2013 Sep 26;122(13):2242–50.
48. Nolan GP, Fujita T, Bhatia K, Huppi C, Liou HC, Scott ML, et al. The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 1993 Jun;13(6):3557–66.
- 20 49. Castro I, Wright JA, Damdinsuren B, Hoek KL, Carlesso G, Shinnars NP, et al. B Cell Receptor-Mediated Sustained c-Rel Activation Facilitates Late Transitional B Cell Survival through Control of B Cell Activating Factor Receptor and NF-κB2. *The Journal of Immunology.* 25 2009 Jun 15;182(12):7729–37.
50. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine.* 2007 Nov 1;13(11):460–9.
51. Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *JCO.* 2011 Apr 11;29(14):1803–11.
- 30 52. Young RM, Shaffer AL, Phelan JD, Staudt LM. B-Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B-Cell lymphoma. *Seminars in Hematology.* 2015 Apr 1;52(2):77–85.
53. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2012 Feb;12(2):121–32.

54. Roccaro AM, Ribatti AV and D. Bortezomib in the Treatment of Cancer [Internet]. Vol. 1, Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 2006 [cited 2020 Aug 26]. p. 397–403. Available from: <https://www.eurekaselect.com/77311/article>
55. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2007 Jan;8(1):49–62.
56. Chariot A. The NF- κ B-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. Trends in Cell Biology. 2009 Aug 1;19(8):404–13.

CLAIMS:

1. A method of reducing the expression of a NF- κ B component in the B cells of a subject in need thereof comprising administering to the subject an effective amount of at least one splice switching antisense oligonucleotide targeting a splice site of one exon, or a splicing regulatory sequence, in the pre-mRNA molecule encoding for the NF- κ B component to alter splicing by blocking the recognition of said splice site by splicing machinery and thus inducing the exon skipping.
5
2. The method of claim 1 wherein the splice switching oligonucleotide (SSO) mediates the exon-skipping for a pre-mRNA having at least 3 exons with a targeted internal one having a number of nucleotides not divisible by 3 for inducing a reading frameshift. In addition, the exon skipping must provoke the appearance of a premature termination codon (PTC) to shorten drastically the open reading frame and/or support NMD degradation.
10
3. The method of claim 1 wherein the splice switching antisense oligonucleotide is an antisense RNA or DNA.
15
4. The method of claim 1 for reducing the expression of c-REL in the B cells of the subject.
5. The method of claim 4 wherein the splice switching antisense oligonucleotide targets the c-REL exon 2 donor splice site.
6. The method of claim 4 wherein the splice switching antisense oligonucleotide is complementary to the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO:5.
20
7. The method of claim 4 wherein the splice switching antisense oligonucleotide converts the c-Rel protein translation into an inactive peptide of 21 amino acids, lacking all active domains compared to full-length c-Rel isoform and having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:6.
8. The method of claim 4 wherein the splice switching antisense oligonucleotide targets the c-REL exon 2 donor splice site and comprises the sequences as set forth in SEQ ID NO:7.
25
9. The method of claim 1 for reducing the expression of RELA in the B cells of the subject.

10. The method of claim 9 wherein the splice switching antisense oligonucleotide targets the RELA acceptor splice site of exon 5.
11. The method of claim 9 wherein the splice switching antisense oligonucleotide is complementary to the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO:8.
- 5 12. The method of claim 9 wherein the splice switching antisense oligonucleotide targets the RELA acceptor splice site of exon 5 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:9.
13. The method of claim 1 for reducing the expression of RELB in the B cells of the subject.
- 10 14. The method of claim 13 wherein the splice switching antisense oligonucleotide targets the RELB acceptor splice site of exon 5 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:10.
- 15 15. The method of claim 1 for reducing the expression of IKK2 in the B cells of the subject.
16. The method of claim 15 wherein the splice switching antisense oligonucleotide targets the IKK2 acceptor splice site of exon 3 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:11.
17. The method of claim 15 wherein the splice switching antisense oligonucleotide targets the IKK2 acceptor splice site of exon 5 and comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:12.
- 20 18. The method of claim 1 wherein the splice switching antisense oligonucleotide is stabilized.
19. The method of claim 1 wherein the subject suffers from a B cell malignancy such as diffuse large B cell lymphoma.
20. The method of claim 1 wherein the subject suffers from multiple myeloma.
21. The method of claim 1 wherein the subject suffers from a disease associated to autoimmunity or inflammation.
- 25 22. A splice switching antisense oligonucleotide that comprises the sequence as set forth in SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:12.

ABSTRACT OF THE INVENTION**USE OF SPLICE SWITCHING OLIGONUCLEOTIDES FOR EXON SKIPPING-MEDIATED KNOCKDOWN OF NF-KB COMPONENTS IN B CELLS**

5

The need to identify new therapeutic approaches in the treatment of cancers of the B lymphoid lineage is crucial. Here, the inventors provide evidence for efficient knockdown of c-REL and RELA expression after treatment with splice switching antisense oligonucleotides (SSO) inducing exon skipping and reading frameshift. For instance, treatments with morpholino SSO targeting c-REL exon 2 donor splice site or RELA exon 5 acceptor splice site elicited very efficient knockdown in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cell lines and antibody-secreting cells derived from primary human B cells. Consistent with the clinical relevance of c-REL activation in DLBCL, treatment with c-REL SSO induced major alterations in NF- κ B and TNF signalling pathways and strongly decreased cell viability. Altogether, SSO-mediated knockdown is a powerful approach to inhibit transiently the expression of a NF- κ B component in B-lineage cells that should open new avenues for cancer treatments. Accordingly, the present invention relates to the use of splice switching oligonucleotides for exon skipping-mediated knockdown of a NF- κ B component in B cells.

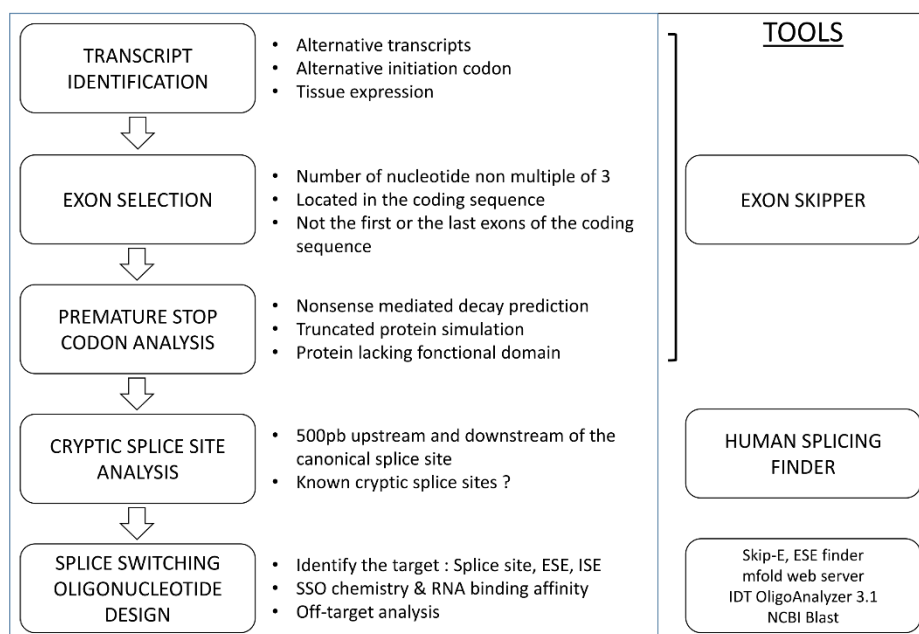


Figure 1

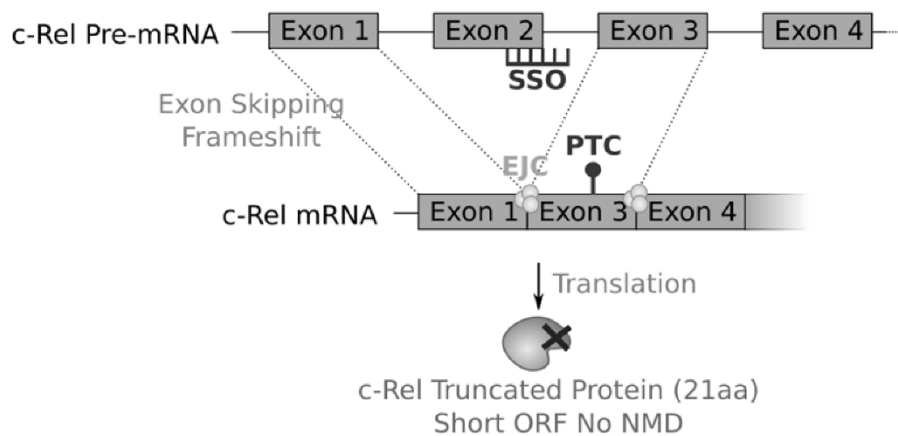


Figure 2A

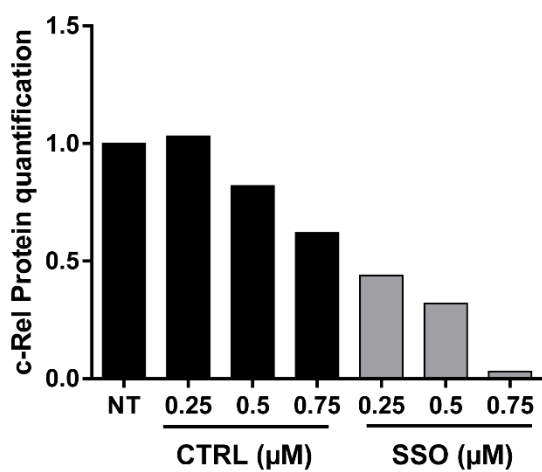
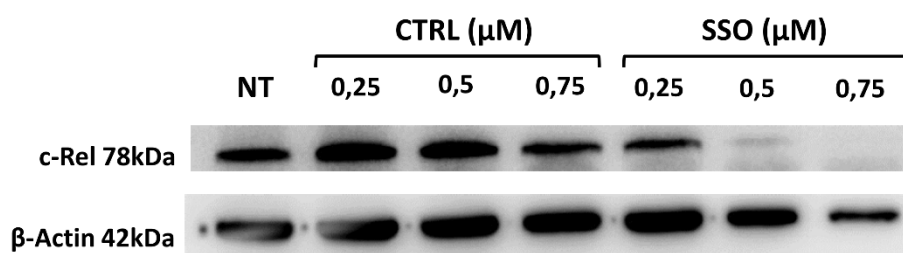


Figure 2D

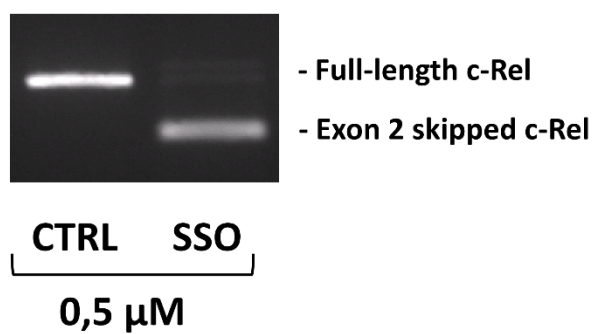


Figure 2E

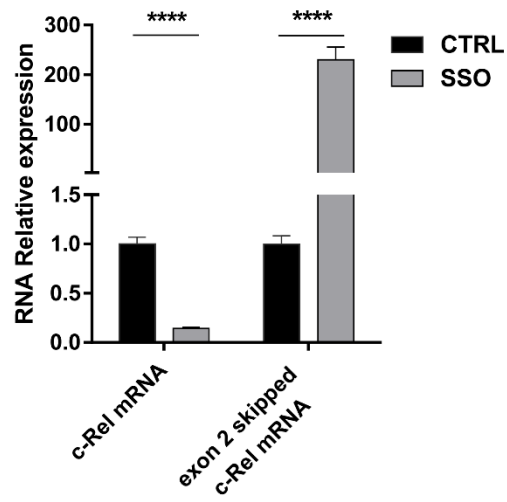


Figure 2F

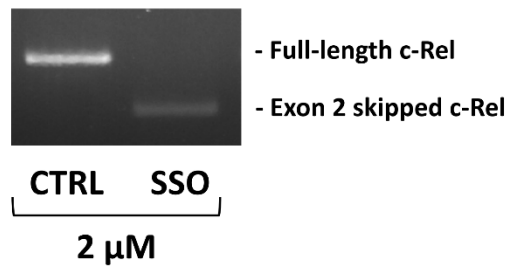


Figure 2G

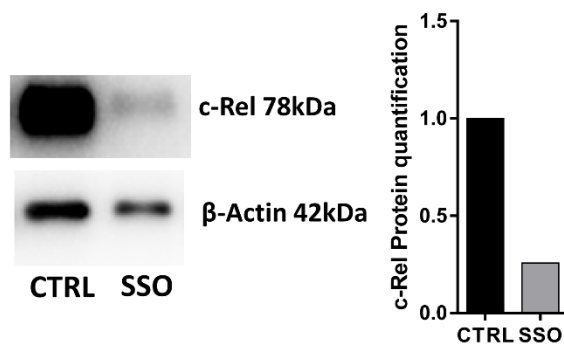


Figure 2H

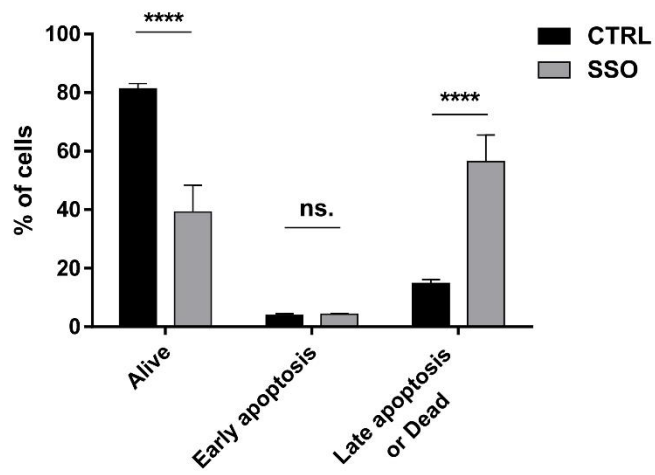


Figure 3

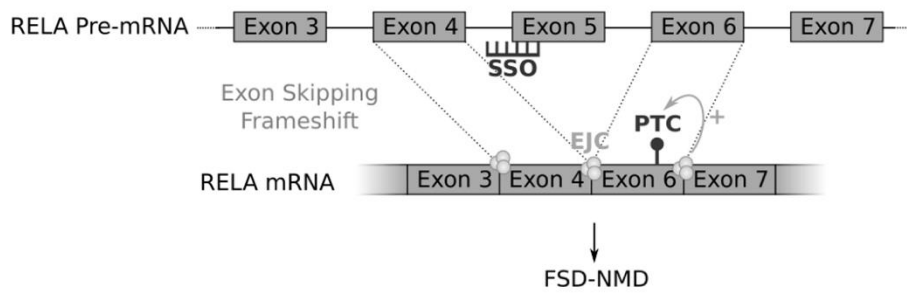


Figure 4A

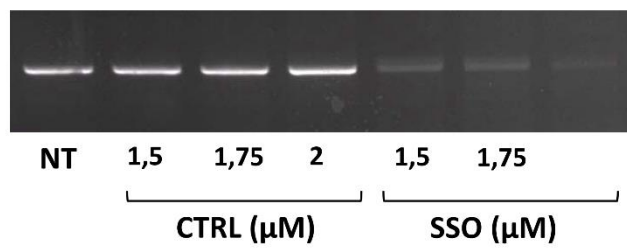


Figure 4B

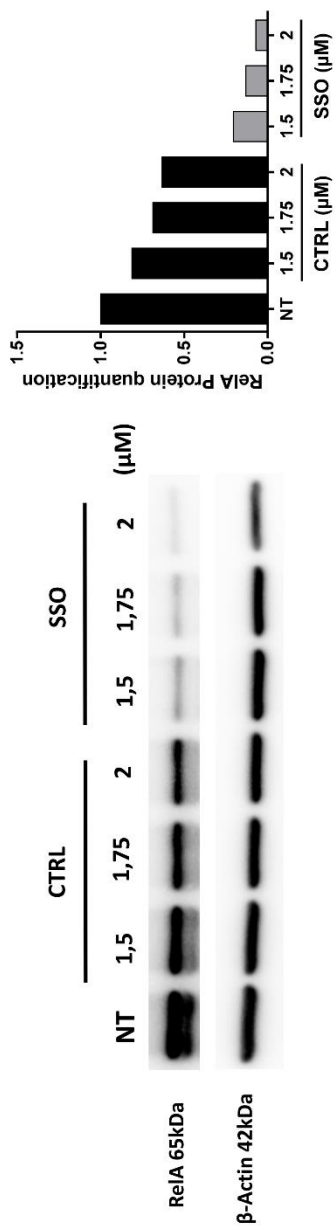


Figure 4C

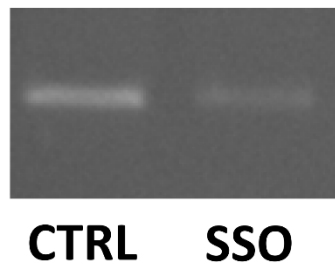


Figure 4D

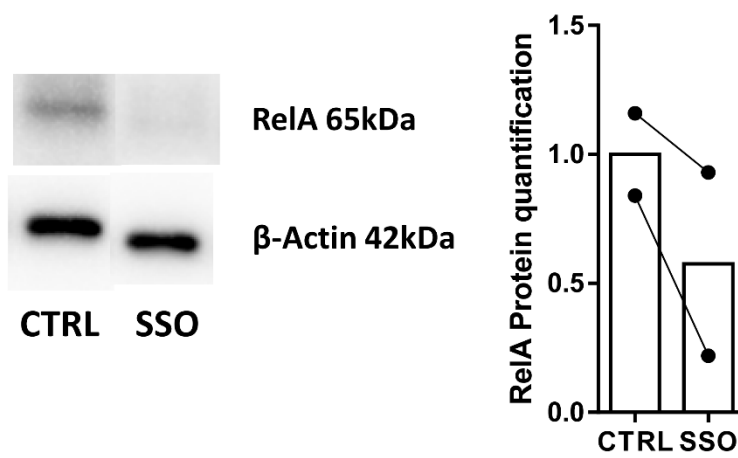


Figure 4E

Analyse exploratoire de thérapies antisens innovantes dans le traitement des syndromes lymphoprolifératifs et autres maladies impliquant la lignée lymphoïde B

Les oligonucléotides antisens (ASO) peuvent être utilisés pour diriger certaines étapes de la maturation des ARN comme l'épissage et la polyadénylation afin de moduler l'expression génique. Durant le développement des cellules de la lignée lymphoïde B, la maturation des transcrits d'immunoglobulines (Ig) fait intervenir des mécanismes d'épissage et de polyadénylation alternatifs.

Mes travaux de thèse ont montré que les ASO peuvent être utilisés pour découpler les deux étapes interconnectées que sont l'épissage et la transcription des transcrits germinaux (GLT) des Ig afin d'étudier l'impact de l'épissage seul sur la commutation de classe d'Ig. Le dépôt du brevet n°EP19305716.3 m'a également permis de faire une preuve de concept dans l'utilisation des ASO pour influencer la polyadénylation d'un isotype spécifique d'Ig en ciblant les sites de polyadénylation (PAS) alternatifs responsables de la production d'Ig membranaire ou sécrétée. En effet, cibler le PAS utilisé pour le transcrit de l'IgE sécrétée avec un ASO a permis de réduire la sécrétion d'IgE et pourrait constituer une nouvelle piste thérapeutique dans les allergies IgE dépendantes. Enfin, j'ai développé une méthode de knock down par oligonucléotide modulant l'épissage (SSO) qui induit un saut d'exon lors de l'épissage et l'apparition d'un transcrit alternatif portant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. Cette méthode permettrait de cibler de nombreux gènes exprimés dans les cellules eucaryotes comme la cellule B ou le plasmocyte.

En dépit de leurs limitations en termes de biodistribution, les ASO constituent des pistes innovantes pour le développement de nouvelles thérapies contre les maladies impliquant la lignée lymphoïde B ou les lymphoproliférations.

Mots-clés : Oligonucléotide Antisens, Cellule B, Plasmocyte, Immunoglobuline, Thérapie génique, Epissage, Lymphome, Myélome, Allergie, Auto-immune

Exploratory analysis of innovative antisense therapies in lymphoproliferative syndromes and B lineage related diseases

Antisense oligonucleotides (ASO) can be used to direct some steps in mRNA maturation as splicing and polyadenylation in order to modulate gene expression. During lymphoid B-lineage development, maturation of immunoglobulin (Ig) transcripts involves alternative splicing and polyadenylation mechanisms.

My thesis work has shown that ASO can be used to dissociate the two interconnected steps of transcription and splicing in order to study the sole impact of splicing of Ig germinal transcripts (GLT) during Ig class switch recombination. The submission of patent n°EP19305716.3 also allowed me to make a proof of concept for ASO usage to influence the polyadenylation of a specific Ig isotype by targeting the alternative polyadenylation sites (PAS) responsible for the production of membrane or secreted Ig. In fact, targeting the PAS used for the secreted IgE transcript with an ASO has made it possible to reduce IgE secretion and could be a new therapeutic strategy in IgE-dependent allergies. Finally, I developed a knock down method using splice switching oligonucleotide (SSO) that induces exon skipping during splicing and the appearance of alternative transcripts carrying a reading frameshift and a premature stop codon. This method could be used to target many genes expressed in eukaryotic cells, like B or plasma cells.

Despite their limitations in terms of biodistribution, ASOs constitute innovative avenues for the development of new therapies against B lineage related diseases and lymphoproliferations.

Keywords : Antisense oligonucleotide, B Cell, Plasma Cell, Immunoglobulin, Gene Therapy, Splicing, Lymphoma, Myeloma, Allergy, Autoimmune

