

Université de Limoges

École Doctorale n°615 Sciences Biologique et Santé – SBS

UMR CNRS 7276 - INSERM U1262

Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations CRIBL
Génétique moléculaire de la cellule B et des syndromes immunoprolifératifs

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

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par

Jean-Marie Lambert

Le 29 septembre 2020

Impact des immunoglobulines tronquées produites par saut d'exon dans les plasmocytes : vers des approches thérapeutiques utilisant des oligonucléotides antisens

Thèse dirigée par Laurent Delpy, DR CNRS

Président du jury

Dr. Eric Pinaud, DR CNRS, CNRS UMR 7276 - INSERM U 1262, CRIBL, Limoges

Rapporteurs

Dr. Fabienne Meggetto, DR CNRS, INSERM U 1037 - CNRS, CRCT, Toulouse

Dr. Fabrice Lejeune, CR INSERM, CNRS UMR 9020 - INSERM U-S1277, Lille

Examinateur

Dr Jérôme Moreaux, MCU, Université de Montpellier, IGH - UMR 9002, Montpellier

Directeur de thèse

Dr. Laurent Delpy, DR CNRS, CNRS UMR 7276 - INSERM U 1262, CRIBL - Limoges



Université de Limoges

École Doctorale n°615 Sciences Biologique et Santé – SBS

UMR CNRS 7276 - INSERM U1262

Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations CRIBL
Génétique moléculaire de la cellule B et des syndromes immunoprolifératifs

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

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par

Jean-Marie Lambert

Le 29 septembre 2020

Impact des immunoglobulines tronquées produites par saut d'exon dans les plasmocytes : vers des approches thérapeutiques utilisant des oligonucléotides antisens

Thèse dirigée par Laurent Delpy, DR CNRS

Président du jury

Dr. Eric Pinaud, DR CNRS, CNRS UMR 7276 - INSERM U 1262, CRIBL, Limoges

Rapporteurs

Dr. Fabienne Meggetto, DR CNRS, INSERM U 1037 - CNRS, CRCT, Toulouse

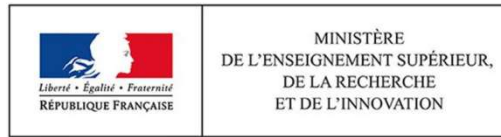
Dr. Fabrice Lejeune, CR, CNRS UMR 9020- INSERM - INSERM U-S1277, Lille

Examinateur

Dr Jérôme Moreaux, MCU, Université de Montpellier, IGH - UMR 9002, Montpellier

Directeur de thèse

Dr. Laurent Delpy, DR CNRS, CNRS UMR 7276 - INSERM U 1262, CRIBL - Limoges



Au cours de mes travaux de thèse, j'ai bénéficié durant les trois premières années d'un financement par l'Université de Limoges dans le cadre d'un contrat doctoral. J'ai ensuite obtenu une allocation doctorale de 4ème année de thèse par l'association « La Ligue Contre le Cancer » pour finaliser mes projets.

L'équipe bénéficie du soutien récurrent des comités départementaux (CD87, 19 et 23) de la Ligue Contre le Cancer et de financements d'autres organismes comme la Fondation ARC (PJA 20161204724) et la FFRMG (Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales). Ces subventions ont contribué à la concrétisation d'un programme de maturation avec la SATT Grand-Centre (Société d'Accélération et de Transfert de Technologie) pour les aspects liés à la valorisation et d'un projet ANR (coordonnateur L. Delpy) pour la partie fondamentale.



CRIBL « Contrôle de la réponse immune B et lymphoproliférations »

CNRS UMR 7276 - INSERM U 1262

Centre de Biologie et Recherche en Santé (CBRS)

2 RUE DU DOCTEUR MARCLAND

87025 LIMOGES CEDEX FRANCE

Résumé

Les projets développés au cours de cette thèse ont pour objectif d'explorer l'intérêt thérapeutique d'approches antisens ciblant les transcrits d'immunoglobulines (Ig) dans le traitement du myélome multiple (MM) et d'autres gammopathies monoclonales. Cette stratégie consiste à provoquer un saut d'exon à l'aide d'oligonucléotides antisens (ASO) pour induire la synthèse d'Ig tronquées et l'apoptose des plasmocytes tumoraux (Brevet WO 2017/089359). L'effet toxique des Ig sans domaine V résulte d'une amplification incontrôlée du stress du RE et de la réponse UPR (« Unfolded Protein Response »). Nous avons montré que des traitements à l'aide d'ASO dirigés contre les ARN pré-messagers de l'Ig monoclonale induisaient une forte toxicité dans des lignées de myélome et une régression tumorale dans un modèle de xéno greffe avec des injections intratumorales d'ASO. Bien que des améliorations en terme de biodistribution *in vivo* de ces ASO soient nécessaires, cette approche capable de cibler spécifiquement le clone tumoral en épargnant les plasmocytes sains pourrait permettre un traitement personnalisé des patients atteints de MM. De surcroît, nous avons également observé une diminution drastique de la production d'Ig à la suite d'un traitement par un ASO générique ciblant l'exon CH1 γ , aussi bien dans les LB humains stimulés ou dans des lignées de myélome; cet ASO pouvant être utilisé chez tous les patients exprimant une IgG. En parallèle, nous avons exploré les liens entre stress protéique et surveillance des ARN dans les plasmocytes. Contrairement aux données de la littérature concernant des cellules non-lymphoïdes, nous avons mis en évidence une coopération entre le mécanisme de NMD (« Nonsense-Mediated mRNA Decay ») et l'UPR (« Unfolded Protein Response ») dans les plasmocytes, qui est rendue possible grâce par une faible activation de la voie PERK de l'UPR. Cette thèse a pour but de mieux comprendre l'impact des Ig tronquées dans les cellules sécrétrices d'anticorps et le lien étroit entre survie des plasmocytes et stress protéique associé à la synthèse massive d'Ig.

Mots clefs : Immunoglobulines (Ig), Plasmocytes, Saut d'exon, Oligonucléotides antisens, NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response).

« ...[Il] faut être pessimiste par l'intelligence, mais optimiste par la volonté. Penser, en toute circonstance, à la pire hypothèse, pour mettre en branle toutes ses réserves de volonté et être capable d'abattre l'obstacle. [Il] ne faut jamais se faire d'illusions et ni avoir jamais de désillusions. En particulier [il] faut toujours s'armer d'une patience illimitée, non passive, inerte, mais animée de persévérance... »

Antonio Gramsci, Cahiers de prison (1948)

« ...I believe that the art of excellent science is to frame large important questions that are perhaps not immediately answerable with existing knowledge and methods, and then conceive a long-term research strategy that begins by answering the most pressing answerable questions on the path to the long-term goals... »

Stanley T. Crooke (2017)

*A ma petite mère,
A mon père,
A mes frères et ma sœur,*

Y para vos, mi poposom,



Remerciements

Voici maintenant quelques lignes pour vous remercier de m'avoir accompagné dans cette thèse...

Je commencerai mes remerciements en exprimant ma reconnaissance envers Laurent, mon maître de stage, puis mon directeur de thèse. Cela fait presque cinq années maintenant que j'évolue à tes côtés. Un jeune étudiant, pas très sûr de lui, est arrivé et un docteur accompli s'en ira, un bagage solide sur le dos. Merci pour l'autonomie et la liberté que tu as eu la confiance de m'accorder, qui m'ont permis de mûrir autant scientifiquement qu'humainement à bien des égards. Je sais que j'ai été un challenge pour toi, car je ne suis pas très expressif ; mais finalement, on a réussi ! On en aura « exploré des pistes » et c'est réellement ça que j'ai aimé faire ! Des idées, des questions, des intuitions à suivre, des « manips » sur le pouce ; parfois ça ne veut pas mais parfois oui ! Et on fait ce métier pour ça, car quand ça veut, c'est parfait !

Je remercie également le Professeur Michel Cogné de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de mon jury. Je remercie le Dr Fabienne Meggetto et le Dr Fabrice Lejeune de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse et aussi le Dr Jérôme Moreaux d'en être examinateur. Je remercie également Dr Éric Pinaud de présider ce jury. Merci de l'intérêt que vous avez porté à ces travaux.

J'aimerais ensuite exprimer ma sincère gratitude à tous les membres passés et présents de l'UMR CNRS 7276 et INSERM 1262. Je vous remercie pour toute l'aide et les conseils que vous m'avez apportés durant cette thèse. Bien que personnelle, la thèse ne se réalise pas seul. Alors MERCI à tous.

Merci à Jean-Claude, François, Yves, Jeanne, Sandrine, Jean, Nathalie, Chantal, Robin, Christelle, Cathy, Ahmed, Sophie, Hussein A, Oussama, Lilian, Bastien et Erwan, Armand, Julie, Zeliha, Anne D, Stéphanie. Un grand merci à Anderson, Batoul, Hend, Iman, Zeinab, Ophélie, Nour, Hussein I, Melissa, Justine, Eden, Lina, Charlotte, Morgane, Sarah, Marine A, Marie C, Marie M, Magali et Jérémy, Israa, Lea, Stecy, Dina, Jennifer et Nader.

Un grand MERCI à Julien et aux animaliers anciens ou présents : Sylvie, Bernadette, David et Karine. Je remercie chaleureusement Ophélie de s'être occupée de nos souris pendant tout ce temps et d'en avoir pris soin !

Je souhaitais remercier particulièrement Alexis pour toute l'attention et l'aide que tu m'as apportées. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer la Bio-info entre autres choses. Je te souhaite le meilleur possible dans ta nouvelle aventure. Et Tiffany, encore désolé pour le quiproquo. Je t'envoie ma recette de pain très bientôt promis ! Christelle des WB, merci pour tout ce que tu m'as appris en WB justement. Claire un grand merci pour ta disponibilité et ta patience au cyto ! (Bonne chance pour ta thèse !). Merci à Cendrine pour ta bonne humeur et ta motivation contagieuse. Très beau binôme de nettoyage. Merci pour tout.

Je souhaiterais remercier une personne qui a beaucoup compté dans mon choix de m'engager dans cette voie. Eh oui Brice ! Je ne t'ai pas oublié ! Petit MI que j'étais ! Je te remercie sincèrement de m'avoir transmis ta passion et ton engouement certain pour la biologie. Je me souviens de notre première journée, « Bonjour,

moi c'est Brice » ; « Bonjour Jean-Marie, enchanté ! » ; « Alors ça, c'est une paillasse ! Installe-toi, il y a 40 miniprep à faire ». Et ce fut le début de ma formation. Ce n'est que bien plus tard que je me suis rendu compte à quoi servaient réellement les MI ^^ . Mais bref, merci d'avoir fait ainsi, de m'avoir transmis ton savoir, ton savoir-faire, tes techniques, tes petits trucs en plus ! Merci également à Mylène de m'avoir beaucoup aidé et conseillé durant cette période. Merci de m'avoir rassuré et de m'avoir dit « Ne t'inquiète pas ! Brice, il est comme ça, un jour, il m'a écrit un protocole sur un emballage de KitKat® vide ».

Je voudrais ensuite remercier chaleureusement et avec toute mon amitié Nivine et Omar.

Nivine, je te remercie de m'avoir accueilli dans l'équipe et de t'être occupé de moi. Merci de m'avoir appris tout ce que tu savais et tout ce que je sais maintenant, mais surtout, d'avoir pris le temps de le faire. Tu as été une « mini » cheffe exceptionnelle. Etant fraîchement passé par là et avec le recul, je me rends bien compte que tu as dû combiner la rédaction de la thèse avec ma formation et que cela a dû être compliqué pour toi. Je te redis dans ces lignes toute ma reconnaissance envers toi. Je n'aurais pas pu rêver meilleure formatrice. Tu restes pour moi un exemple tant sur le plan scientifique qu'humain. Je te souhaite une très bonne continuation et plein de bonnes choses pour la suite.

Omar.. Que dire ! Tu sais ce que j'en pense. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi. J'espère que nous nourrirons, au fur et à mesure du temps, l'amitié que nous avons construite. Merci d'avoir été là et de m'avoir soutenu, même si pour cela, j'ai dû te ramener tous les soirs en voiture pendant 2 ans ! Merci pour ta bonne humeur qui restera pour moi légendaire et tellement bénéfique. Je souhaite le meilleur pour toi, Hazar et Youssef. Et je te dis : « à lun-diiiiiiii ».

Merci aussi à « m'dame Junca » ! Je ne t'oublie pas ! Merci d'avoir été le binôme idéal pour le M2. On aura vraiment bien ri ! Je te souhaite une très bonne continuation ! De toute façon, on se recontacte quand tu seras chef de service mais je l'espère bien avant ! J'attends toujours que tu passes à Limoges. Rectification : que tu « t'arrêtes » à Limoges.

J'aimerais remercier plus particulièrement la « Delpy's Team ».

Merci à Anne. Nous aurons fait cette thèse en même temps finalement et traversé les mêmes épreuves et le même stress mais avec de bons moments aussi. Merci pour ton aide en tout cas et je te souhaite bon courage pour la soutenance. On tient le bon bout en fin de compte. Bon courage pour la suite. Merci à « M'zelle Lepennec » ! Merci pour tes petites blagues que tu caractérisais souvent de « grivoises », mais on te pardonne. Merci pour ta bonne humeur quotidienne et de m'avoir apporté du soutien quand j'en avais besoin. Je te souhaite bonne continuation mais de toute façon en septembre tu restes à Limoges ! On croise les doigts ! Courage. Merci à Audrey, ou devrais-je dire 72,76 Audrey FM. Ahlala ! Tes chansonnettes vont me manquer ! Et je peux te l'avouer ici ! Tu chantes quand même relativement bien mais je n'osais pas le dire, car j'allais regretter après : tu n'as pas le bouton « mute ». Je t'aurai eu comme voisine pas très longtemps mais ça ne fut pas trop mal ! Tu mettais l'ambiance ! Toi, tu as encore un peu plus à faire encore. Je te souhaite donc beaucoup de courage et on se voit à ta soutenance. Merci à Marion pour ton passage dans l'équipe ! Je sais que tu attendais beaucoup de mes remerciements mais je serai succinct ^^ . Je te remercie sincèrement pour toute l'aide que tu m'as apportée, pour ta bonne humeur et ton soutien. Ça n'aurait pas été pareil sans toi ! Bon maintenant que tu es dans le Sud, tu vas nous oublier. Donc je te remercie encore pendant qu'il en est encore temps.

J'aimerais remercier la « Krap's Team ». Je tiens à remercier Christophe et Vincent pour leur aide. Merci à Marine, d'avoir été « responsable culture cell » avec moi. Je te souhaite plein de courage pour la fin de ta thèse et un très bon départ dans ta nouvelle équipe. Un énorme merci à papa Seb pour toute ton aide en tout.

« Eh Seb, dis voir » En général, quand cela commençait de cette manière, cela finissait toujours mal ! Un sincère merci pour toute l'aide que tu m'as apportée et tes yeux de la foi pour les gels PCR.

Je tenais aussi à remercier Faraj. Merci pour votre soutien durant ces 4 ans de thèse. Je vous remercie de m'avoir donné pas mal de conseils techniques, scientifiques et personnels. Merci chaleureusement pour votre soutien et pour nos petites pauses café.

Merci aussi à Jérôme, pour ta bonne humeur teintée d'un accent du sud ! Pour tous tes conseils scientifiques ; Les ARN, UPF1 et le fameux SRSF1 ! Je te souhaite une bonne continuation.

Une pensée toute particulière à mes voisins du second que l'on commence à connaître maintenant !! merci à Flo, Ben, Quentin, Hélène et les autres. Merci pour ces petits moments « pause-clope », ces discussions scientifiques ou non. C'était un plaisir de vous connaître ! Qui sait, on se recroisera peut-être !



J'aimerais remercier maintenant ma famille.

Un grand merci à mes parents : merci ma petite mère et merci papa. J'essaye de vous le dire souvent, mais sans doute insuffisamment quand même, je vous le répète ici. Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour votre amour, votre foyer, votre éducation et vos encouragements. Tout cela n'aurait pas été possible sans vous. Je pense que ce jour sonne comme la fin de contrat. Vous avez terminé et vous avez bien fait le travail ! Le dernier est (enfin) casé. J'espère que vous êtes fiers comme moi je suis fier de ce que vous avez fait et accompli. Je vous remercie encore pour tout.

Un grand merci à mes frères et à ma sœur. Par contre, je ne vous le dis pas assez à vous. Merci pour tout ce que vous faites. Vous comptez énormément pour moi et je n'aurai de cesse que d'essayer de vous égaler. La barre est haute. J'espère que vous êtes fiers de votre p'tit frère. Vous êtes pour moi une base solide, inébranlable sur laquelle je pourrai m'appuyer toute ma vie. Merci pour tout ! Infiniment !

Un merci tout particulier à Jean-Ba pour tout ce que tu m'as appris sur la vie et de tes expériences partagées, pour tes mises en garde et tes espoirs. Merci aussi d'avoir été la seule banque à un taux d'intérêt négatif lors de mon M2 ^^ ! Merci à Jean-No pour tout ce que tu as fait pour moi aussi. Tu as toujours été d'une aide précieuse, et tes avis aiguisés et toujours pertinents ont énormément compté pour moi. Je suis vraiment désolé que tu aies eu la « chance » de relire mon manuscrit en intégralité ! Enfin merci à Jean-Ga ! Jean-Ga, je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide que tu m'as apportée. Sans toi, je serais encore en train de tourner au rond-point de Poitiers dans ma fiesta ! Merci d'avoir aidé ton p'tit frère dans toute cette aventure. Tu sais ce qu'il en est mon frère !

Enfin, mes derniers remerciements vont pour toi. Je te remercie d'être entré dans ma vie. Je ne vais pas en dire plus ici mais tu sais à quel point tu l'as changée. Nous avons commencé et traversé cette thèse ensemble et on la termine ensemble... Je te propose qu'on embarque pour une autre aventure cette fois-ci, beaucoup plus belle et beaucoup plus longue, je l'espère. Est-ce que tu es prête ? Parce que moi, oui ! te amo tanto poposom...

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

Table des matières	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
ABREVIATIONS	4
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
Partie I. La lymphopoïèse B	8
I.1. Les immunoglobulines : structure et organisation génique	8
I.2. Le développement B précoce.....	12
I.2.1. Mécanismes impliqués dans les recombinaisons V(D)J	14
I.2.2. Recombinaisons V(D)J séquentielles et phénomène d'exclusion allélique.....	16
I.3. Le développement B tardif : les cellules B matures	19
I.3.1. Les cellules B1	21
I.3.2. Les cellules B2.....	21
I.4. Réaction du centre germinatif et remaniements secondaires des gènes d'Ig.....	23
I.4.1. L'hypermutation somatique : SHM	25
I.4.2. La commutation isotypique : CSR.....	27
I.4.3. Epissage des transcrits germinaux et recrutement d'AID	31
I.5. La différenciation en cellules B mémoires et en plasmocytes	33
I.5.1. Les cellules B mémoires	33
I.5.2. Les plasmocytes.....	33
I.6. Le Myélome Multiple	40
I.6.1. Caractéristiques de la maladie.....	40
I.6.2. Mécanismes d'action du Bortezomib dans le traitement du MM	43
Partie II. Sécrétion d'Ig et maintien de l'homéostasie protéique	48
II.1. La réponse UPR et le stress du RE	48
II.1.1. La voie IRE1 α	48
II.1.2. La voie ATF6.....	51
II.1.3. La voie PERK.....	52
II.1.4. La voie mTOR.....	54
II.2. Implication de l'autophagie au cours du développement B tardif.....	55
Partie III. Régulation de l'expression génique et surveillance des transcrits d'Ig	61
III.1. Epissage des ARN pré-messagers	61
III.2. L'épissage alternatif.....	63
III.3. Régulation de l'épissage alternatif	69
III.3.1. Les éléments cis-régulateurs	69
III.3.2. Les éléments trans-régulateurs	71
III.3.3. Régulation transcriptionnelle et modifications de la chromatine	72
III.4. Surveillance des ARNs : cas des transcrits d'Ig non-productifs	74
III.4.1. Nonsense-associated Altered Splicing (NAS).....	76
III.4.2. Dégradation des ARNm non-sens : Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)	
.....	79
III.4.2.1. Les acteurs majeurs du NMD.....	79



III.4.2.1.1. Les protéines UPF	81
III.4.2.1.2. Les protéines SMG.....	82
III.4.2.1.3. Les facteurs eRF « eukaryotic release factors »	83
III.4.2.1.4. Le complexe EJC	84
III.4.2.2. Dégradation par NMD dépendante de l'EJC : cas des ARNm IgH non-productifs.....	85
III.4.2.3. Dégradation par NMD indépendante de l'EJC : cas des ARNm Igc non-productifs.....	88
Partie IV. Modification de l'expression génique par administration d'oligonucléotides antisens (ASO)	91
IV.1. Généralités & contexte.....	91
IV.2. Modifications chimiques des ASO	91
IV.2.1. Les liaisons phosphodiesters.....	93
IV.2.2. Les modifications du ribose	93
IV.2.3. Modifications du squelette carboné	94
IV.3. Mécanismes d'action des ASO	94
IV.4. Vectorisation et utilisation thérapeutique des ASO	96
IV.4.1. Exemples de vectorisation.....	96
IV.4.2. Des études pré-cliniques à la mise sur le marché de médicaments : quelques exemples.....	97
POSITION DU PROBLEME	101
RESULTATS	103
Article 1.	105
Selective killing of plasma cell clones using splice switching oligonucleotides targeting unique variable exon RNA sequences.....	105
Résultats préliminaires.	141
Modulation de l'expression d'Ig par ciblage des exons constants à l'aide d'ASO.....	141
Article 2.	147
Uncoupling Splicing From Transcription Using Antisense Oligonucleotides Reveals a Dual Role for I Exon Donor Splice Sites in Antibody Class Switching.....	147
Article 3.	169
Crosstalk between unfolded protein response and nonsense-mediated mRNA decay in plasma cells.....	169
DISCUSSION & PERSPECTIVES	182
ANNEXES	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	238

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 : Structure des immunoglobulines.
- Figure 2 : Organisation des gènes d'Ig.
- Figure 3 : Les principales étapes du développement lymphocytaire B.
- Figure 4 : Réarrangements V(D)J ordonnés au locus IgH.
- Figure 5 : Introduction et résolution des cassures double-brins induites par le complexe protéique RAG.
- Figure 6 : Mécanisme d'édition du BCR (ou « Receptor Editing ») au locus Igk.
- Figure 7 : Localisation des LB spléniques et réaction du centre germinatif.
- Figure 8 : Motifs reconnus par AID et profil d'hypermutations somatiques.
- Figure 9 : Les différentes voies impliquées dans la prise en charge des mésappariements G:U durant la SHM.
- Figure 10 : La commutation isotypique (CSR) et ses multiples transcrits.
- Figure 11 : Résolution des cassures double-brins au cours de la CSR.
- Figure 12 : Transcription et modifications de la chromatine au niveau des régions « switch ».
- Figure 13 : Réactions folliculaires et extra-folliculaires et différenciation des cellules B.
- Figure 14 : Caractéristiques principales de la différenciation plasmocytaire.
- Figure 15 : Régulation transcriptionnelle au cours de la différenciation plasmocytaire.
- Figure 16 : Progression vers le développement du Myélome Multiple (MM).
- Figure 17 : Composition du protéasome.
- Figure 18 : La réponse aux protéines mal repliées ou UPR.
- Figure 19 : Liens entre l'UPR, mTORC1 et l'autophagie.
- Figure 20 : Déficit en autophagie et différenciation plasmocytaire abortive.
- Figure 21 : Réaction d'épissage et séquences consensus impliquées.
- Figure 22 : Assemblage séquentiel du spliceosome au cours de l'épissage.
- Figure 23 : Epissage alternatif.
- Figure 24 : Autorégulation du facteur d'épissage PTB par épissage alternatif couplé au NMD.
- Figure 25 : Les séquences régulatrices d'épissage.
- Figure 26 : Régulation de l'épissage alternatif par la vitesse d'élongation de l'ARN pol II.
- Figure 27 : Les mécanismes impliqués dans la surveillance des ARN.
- Figure 28 : NAS des transcrits Igk non-productifs et induction d'apoptose dans les plasmocytes.
- Figure 29 : Mécanisme de NMD et mise en place du complexe de surveillance.
- Figure 30 : Dégradation des ARNm substrats de NMD.
- Figure 31 : Principales modifications chimiques des ASO.
- Figure 32 : Les différents modes d'action des ASO.
- Figure 33: Tableau récapitulatif des thérapies antisens utilisant des ASO ayant reçu une autorisation de mise sur le marché.

ABREVIATIONS

α : alpha	BCR : B cell receptor	CXCR : C-X-C Motif Chemokine Receptor
β : beta	BER : Base excision repair	
γ : gamma	BID : BH3 interacting-domain death agonist	D
δ : delta	BIM : Bcl-2 interacting mediator	D : Segment de Diversité
ε : epsilon	BIP : Binding immunoglobulin protein	DAMP : Damage-associated molecular pattern
η : eta	BLIMPI : B-lymphocyte-induced maturation protein 1	DBR1 : Debranching RNA lariats 1
κ : kappa	BLNK : B cell linker protein	DCP2 : Decapping mRNA 2
λ : lambda	BNA : Bridged nucleic acid	DECID : Decay-inducing complex
μ : mu	BTK : Bruton's tyrosine kinase	DEPTOR : DEP-containing mTOR-interacting protein
5'-3' UTR : UnTranslated Regions	BZ : Bortézomib	DIS3L2 : DIS3-like exonuclease 2
5'-3' ss : 5'-3' splice site	bZIP : Basic leucine zipper	DLBCL : Diffuse large B-cell lymphoma
A	C	DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
A : Adenine	C : Région constante	DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
ABCE1 : ATP binding cassette subfamily E member 1	C : Cytosine	DR5 : Death receptor 5
Ac : Anticorps	CCR : C-C motif chemokine receptor	DSB : Double strand break
ADC : Antibody drug conjugate	CD : Cluster of differentiation	DZ : Dark zone
A-EJ : Alternative end-joining	CDR : Complementarity determining region	E
Ag : Antigènes	CES1 : carboxylesterase 1	EBM : EJC-binding motif
AID : Activation-induced deaminase	cET-BNA : ethyl bicyclic nucleic acids	EDEM1 : ER degradation enhance mannosidase alpha-like 1
ANGPTL3 : Angiopoietin-like protein 3	CHOP : C/EBP homologous protein	eIF : eukaryotic initiation factor
APE1/2 : Apurinic/aprimidinic endonuclease 1/2	CLP : Common lymphoid progenitor	EJC : Exon junction complex
APOBEC : Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like	CMA : Chaperone mediated autophagy	ERAD : ER associated Degradation
AS : Alternative splicing	CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	ERDJ4/DNAJB9 : DnaJ/Hsp40 homolog subfamily B member 9
ASC : Antibody secreting cells	C-MYC : Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog	eRF : eukaryotic release factor
ASGPR : Asialoglycoprotein receptor	C-NHEJ : Classical non-homologous end joining	ERSE : ER stress response element
ASK1 : Apoptosis signal-regulating Kinase 1	CPA : Cellule présentatrice d'antigène	ESE : Exonic splicing enhancers
ATF : Activating transcription factor	CPP : Cell penetrating peptide	ESS : Exonic splicing silencers
ATG : Autophagy-related genes	CSH : Cellules souches hématopoïétiques	F
ATM : Ataxia telangiectasia mutated	CSR : Class switch recombination	FACT : Facilitates chromatin transcription
B	CtIP : CtBP-interacting protein	FADD : FAS-associated death domain
BACH2 : BTB domain and CNC homolog 2	CTNNLB1 : Catenin cadherin-associated protein), β-like 1	FAS : FS-7-associated surface antigen
BAK : BCL2 antagonist/killer 1	CXCL : C-X-C motif chemokine ligand	Fc : Fragment Crystallizable region
BAX : BCL2 associated X protein		FDC : Follicular dendritic cells
BCL : B cell lymphoma		
BCL2L1 : B-cell lymphoma 2-like 1		
BCMA : B cell maturation antigen		

FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3	KO : Knock out	NMD : Nonsense-mediated mRNA decay
FO : Follicular	L : Light	NMUP : nonsense-mediated upregulation of pre-mRNA
FOXO1 : Forkhead box protein O1	L : Segment Leader	nt : nucléotide
FR : Framework region	LAMP-2A : Lysosome-associated membrane protein 2A	NXF1 : Nuclear RNA export factor 1
frVκKI : frameshift-inducing Vκ exon knock-in	LB : Lymphocytes B	P
G	LLPC : Long-lived plasma cells	P53BP1 : P53-Binding Protein 1
G : Guanine	LNA : Locked nucleic acid	P58IPK/DNAJC3 : DnaJ/Hsp40 homolog subfamily C member 3
G4 : G-quadruplexes	LNP : Lipid nanoparticles	PABP : (polyA)-binding protein
GADD34 : Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34	LPS : Lipopolysaccharides	PABPC1 : (poly A) -binding protein cytoplasmic 1
GalNAc : N-acétylgalactosamine	LT : Lymphocytes T	PABPN1 : (poly A) -binding protein nuclear 1
Gata-3 : GATA binding protein 3	LTFH : Lymphocytes T follicular helper	PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
GC : Germinal center	LZ : Light zone	PARP-1 : Poly ADP-Ribose Polymerase I
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor	M	Pax5 : Paired box 5
GRP78 : 78kDa Glucose-Regulated Protein	M1/M2 : Exons de membrane 1&2	Pb : Paire de base
H	MCL-1 : Induced myeloid leukemia cell differentiation protein	PC : Plasma cell
H : Heavy	MDM4 : Murine double minute 4	PD-L2 : Programmed cell death ligand2
H2AX : Histone 2A family member X	MGUS : Monoclonal gammopathy of undetermined significance	PDX : Patient-derived xenograft
HMGB1/2 : High mobility group box 1/2	MIF4G : Middle domain of eIF4G-like	PEG : Poly-ethylene glycol
HSC70 : Heat Shock Cognate protein of 70 kDa	MLH : Mut Homologue	PERK : Protein kinase RNA-like ER kinase
HSCT : Haematopoietic Stem Cell Transplantation	mLST8 : mammalian lethal with Sec13 protein 8	PIKKs : Phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases
I	MM : Myélome multiple	PIN : C-terminal pilt N-terminus
IFNγ : Interferon- γ	MMR : Mismatch repair	PKC : Protein kinase C
Ig : Immunoglobuline	MPP : Multipotent progenitors	PMO : Phosphorodiamidate morpholino oligomer
IL : Interleukine	MRN : Mre11/Rad50/Nbs1	PMS : Post meiotic segregation
iNKT : invariant natural killer T	MSH : MutS homologue	PNA : Peptide nucleic acid
IRE1α : inositol-requiring enzyme 1 α	mSIN1 : mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1	Pol : Polymérase
IRF : Interferon regulatory factor	mTOR : mammalian target of rapamycin	Poly-A : Site de poly-adénylation
ISE : Intronic splicing enhancers	mTORC1 : mTOR complex 1	PPI/2A : Protein phosphatase 1/2A
ISS : Intonic splicing silencers	MUC2 : Mucin 2	PRAS40 : Proline-Rich Akt Substrate 40
ITGAM : Integrin subunit alpha M	MZ : Marginal zone	PROTOR : Protein Observed with RICTOR
ITGB2 : Integrin beta 2	N	PTB : Polypyrimidine tract-binding protein 1
J	NAS : Nonsense-associated altered splicing	
J : Segment de Jonction	NFκB : Nuclear factor- κ B	
JNK : c-Jun N-terminal kinase	NHEJ : Non homologous end joining	
K	NK : Natural killer	
Kb : kilobases	NLS : Nuclear localization signal	
KDE : kappa-deleting element		
KI : Knock in		

PTBP2 : Polypyrimidine tract binding protein 2

PTC : Premature termination codon

R

RAG1/2 : Recombination activating genes 1&2

RAPTOR : Regulatory-associated protein of mTOR

RE : Réticulum endoplasmique

RENT1 : Regulator of nonsense transcripts 1

RICTOR : Raptor-independent companion of TOR

RIDD : Regulated IRE1-dependent decay

RRM : RNA recognition motif

RS : Recombining sequence

RSS : Recombination signal sequences

RUST : Regulated unproductive splicing and translation

S

S : Switch

S1P et S2P : Site-1 or site-2 proteases

S1P receptor 1 : Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1

Sca-1 : Stem cells antigen-1

SHM : Hypermutation somatique

SI : Système immunitaire

SMG : Suppressor of morphological defects on genitalia

SMN1: Survival of motor neuron 1

snRNA: small nuclear RNA

snRNP : small nuclear ribonucleo - protein

SOS : Suppression of splicing

SPT : Suppressor of Ty

SR : Serine/arginine-rich

SRE : Splicing regulatory elements

SSRp1 : Structure specific recognition protein 1

SWI / SNF : Switch/sucrose non-fermentable

Syk : Tyrosine-protein kinase

T

T : Thymine

TAC1 : Tachykinin precursor 1

TAP : Transporter associated with antigen presentation

TAPBP : TAP associated glycoprotein

T-bet : T-box expressed in T cells

TCR : T cell receptor

TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TGFβ: Transforming growth factor β

TLR: Toll like receptor

TNF: Tumor necrosis factor

TRAF2: Tumor necrosis factor (TNF) Receptor Associated Factor 2

U

U: Uracile

UFBP1: Ufm1-binding protein 1

UNG: Uracil DNA-glycosylase

uORF : upstream open reading frame

UPF1 : Up-frameshift protein 1

UPR : Unfolded protein response

UPS : Ubiquitin proteasome system

V/X

V : Segment de Variabilité

XBP1 : X-Box Binding Protein 1

XLA : X-linked agammaglobulinemia

XRCC : X-ray Repair Cross

Complementing Protein

Synthèse Bibliographique



Partie I. La lymphopoïèse B

Les cellules du système immunitaire (SI) assurent la protection de l'organisme contre les agressions extérieures en reconnaissant des substances étrangères d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. Cette protection est permise, car le SI a une capacité d'apprentissage, de reconnaissance et de mémoire permettant la discrimination des antigènes (Ag) du soi et du non soi. Le SI intervient également dans l'immunité anti-tumorale en reconnaissant des cellules du « soi altéré » impliquées dans la formation de tumeurs.

Le SI est défini par deux composantes : une immunité innée et une immunité adaptative. L'immunité innée ou naturelle, dont la mise en jeu est immédiate, fait appel à des mécanismes peu spécifiques. Elle repose sur la présence de barrières physiologiques (peau, muqueuse) et sur l'action des cellules immunitaires innées telles que les cellules « natural killer » (NK) ou les macrophages par le biais d'une interaction avec les motifs moléculaires associés aux pathogènes. En revanche, l'immunité adaptative permet une mémoire immunitaire et implique les lymphocytes T (LT) et B (LB). Au cours de la réponse immune, les lymphocytes peuvent se différencier en cellules mémoires spécifiques des Ag impliqués dans l'agression. Les LB et LT mémoires interviendront rapidement lors d'une seconde rencontre avec l'Ag. Les LB peuvent également s'engager dans un programme terminal de différenciation et devenir des plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Ac).

I.1. Les immunoglobulines : structure et organisation génique

La maturation des LB repose sur leur capacité à synthétiser des immunoglobulines (Ig) sous forme membranaire (BCR : *B-cell receptor*) ou sécrétée (Ac). Les Ig sont des glycoprotéines d'environ 150 kDa formées de 2 chaînes lourdes IgH (H pour « *Heavy* ») et 2 chaînes légères (L pour « *Light* ») identiques, reliées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 1**). Chaque chaîne possède une région variable (V) et une région constante (C). L'association des régions V des chaînes H et L constitue le site de fixation de l'antigène (Early et al., 1980), tandis que les régions constantes des chaînes lourdes (CH) sont à l'origine des propriétés effectrices de l'Ig, telles que l'activation du complément ou la liaison aux récepteurs des régions Fc (pour « *fragment crystallizable region* »). Il existe deux types de chaînes légères : kappa (κ) et lambda (λ) pouvant s'associer à 5 classes de chaînes lourdes mu (μ), delta (δ), gamma (γ), epsilon (ϵ), alpha (α) correspondant respectivement aux classes d'Ig suivantes : IgM, IgD, IgG, IgE et IgA.

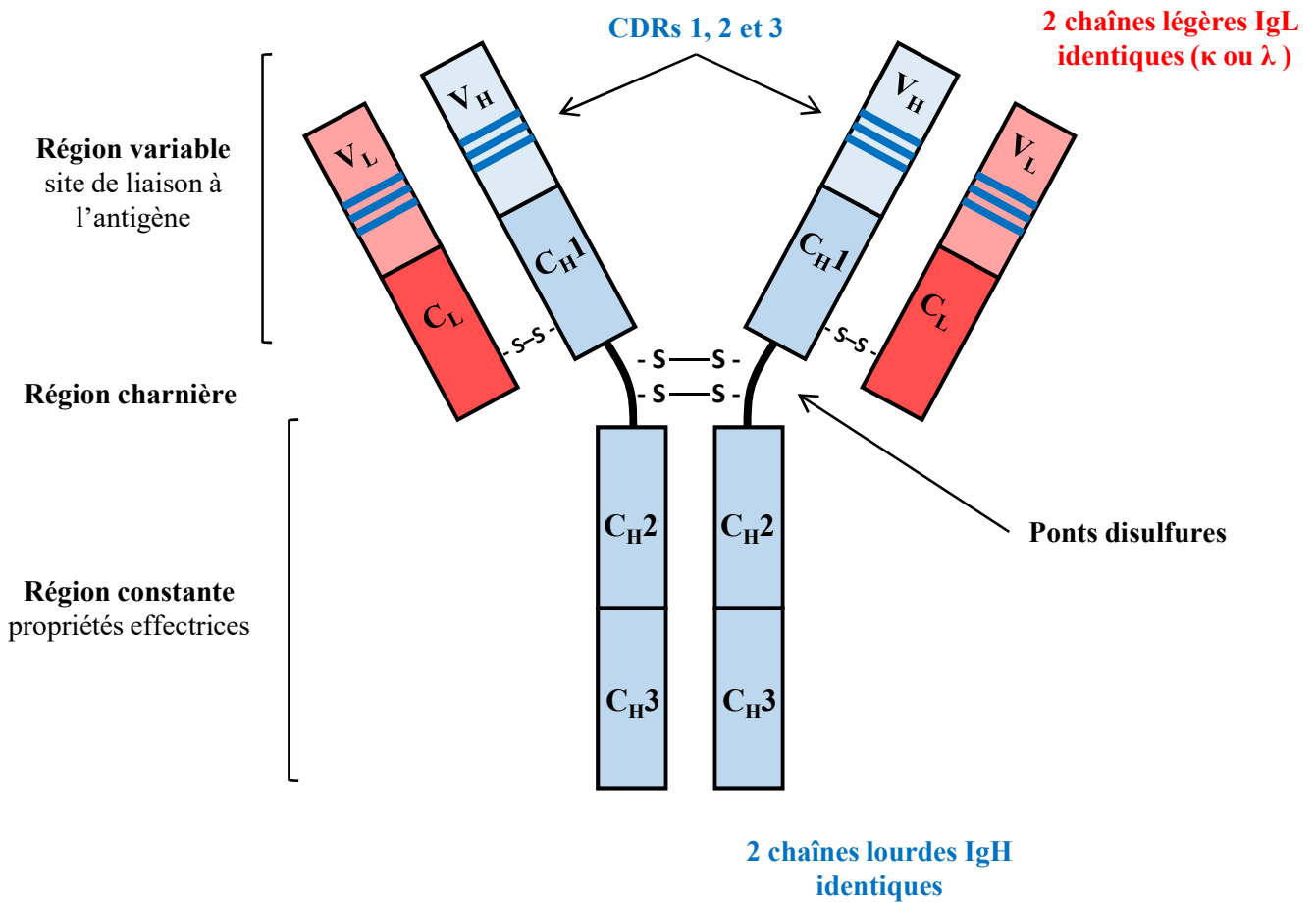


Figure 1 : Structure des immunoglobulines.

Exemple d'une IgG constituée de 2 chaînes lourdes (bleu), comprenant un domaine variable (V_H) et 3 domaines constants (C_H1, C_H2 et C_H3) et de 2 chaînes légères (rouge), comprenant un domaine variable (V_L) et un seul domaine constant (C_L). Les domaines C_H1 et C_H2 sont séparés par la région charnière permettant l'association des 2 chaînes lourdes par formation de ponts disulfures. Les régions V (H+L) contiennent trois régions hypervariables nommées CDR 1 à 3 (« Complementary determining region »).

La classe IgG est divisée en 4 sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 chez la souris et IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 chez l'homme. La classe IgA en 2 sous-classes : IgA1 et IgA2 chez l'homme. Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, 3 à 4 domaines C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} et C_{H4} (Rauta et al., 2012).

La structure tertiaire du domaine V est maintenue par quatre régions conservées : les régions d'armature ou « *framework regions* » (FR1, FR2, FR3 et FR4). Ces régions sont intercalées avec 3 régions de 5 à 10 acides aminés hypervariables : les régions déterminant la complémentarité avec l'Ag: CDR1, CDR2 et CDR3 (« *complementarity determining region* ») (**Figure 1**). Ces dernières forment en association des 2 chaînes (H et L) le paratope complémentaire de l'épitope ou motif antigénique. En amont de cette partie variable, une séquence de 60 à 90 nucléotides code un peptide signal L (L pour « *Leader* ») qui est ensuite clivé par la signal peptidase. Les parties 5' (L-part1) et 3' (L-part2) de la séquence L sont respectivement situées sur les exons L et V. Ce peptide signal est impliqué dans la synthèse et l'adressage des Ig dans les différents compartiments cellulaires.

Le locus IGH est situé sur le chromosome 14 en 14q32 chez l'homme (chromosome 12 chez la souris) où il s'étend sur 1250 kb. Dans sa configuration germinale, le locus IGH contient un grand nombre de segments géniques V_H (Variables), D_H (Diversité) et J_H (Jonction) (**Figure 2A**). La recombinaison aléatoire de ces segments forme l'exon V. Le locus IGH est constitué de 170 à 176 gènes et comprend 123-129 segments variables (dont seulement 38-46 fonctionnels) répartis en 7 sous-groupes de IGHV1 à IGHV7 avec une représentation très importante des groupes V3 et V4, 27 segments de diversité (dont 23 fonctionnels), 9 segments de jonction (dont 6 fonctionnels) ainsi que 11 gènes constants (C_H) (dont 9 fonctionnels), dont les différents isotypes sont répartis selon l'ordre suivant : μ , δ , γ 3, γ 1, α 1, γ 2, γ 4, ϵ , α 2. Chaque gène constant est composé d'exons CH (CH1 à CH4) codant les domaines structuraux de la partie constante, d'exons H (Hinge : H1 à H4) codant la région charnière des IgG et IgA, et d'exons de membrane (M1 et M2) codant la région transmembranaire et intracytoplasmique des Ig de surface. L'élimination des exons M1 et M2, suite à l'utilisation d'un site de polyadénylation (poly-A) alternatif en amont, permet le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig (Croce et al., 1979; Johnston et al., 2006; M. P. Lefranc, 2001; M.-P. Lefranc, 2001).

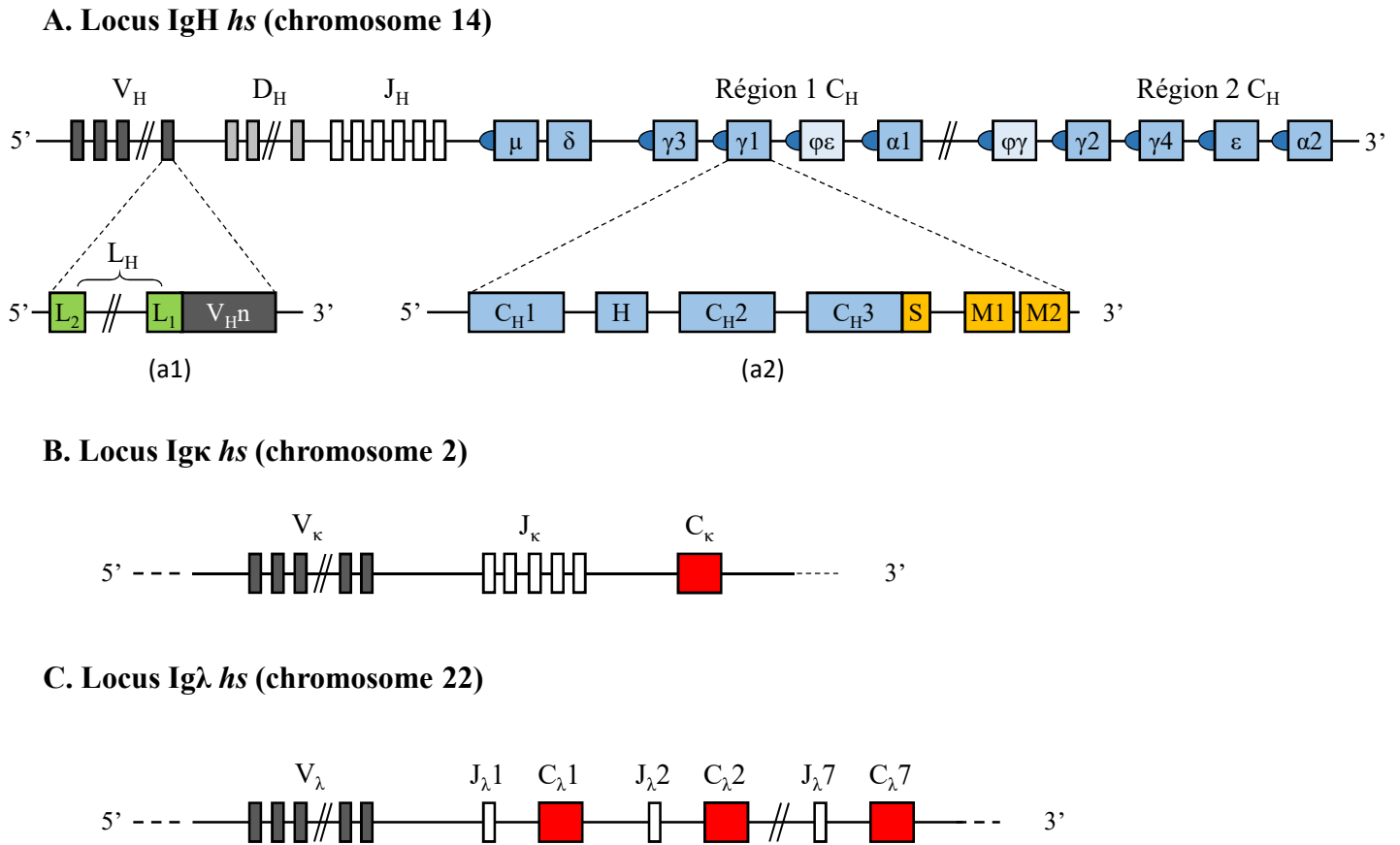


Figure 2 : Organisation des gènes d'Ig.

A. Représentation simplifiée du locus IgH humain (chromosome 14) comprenant de multiples segments variables V_H (gris), D_H (gris clair) et J_H (blanc) et, en 3', des gènes constants fonctionnels (bleu) et non fonctionnels (bleu clair). Les ellipses (bleu) précédant les gènes constants représentent les régions « switch » impliquées dans le processus de commutation isotypique. (a1) Structure des segments V_H comprenant une séquence leader située en 5' (L1 : L-part1) et dans l'exon V_H (L2 : L-part2). (a2) Structure d'un gène constant C_H1 comprenant les exons C_H1, H (« Hinge » ou charnière), C_H2 et C_H3. La région S (orange) code la forme sécrétée des Ig tandis que les exons de membrane M1 et M2 (orange) codent leur forme membranaire.

B. Le locus Igκ humain (chromosome 2) comprend des segments V_κ (gris), J_κ (blanc) et un seul gène constant C_κ (rouge).

C. Le locus Igλ humain (chromosome 22) comprend des segments V_λ (gris) situés en 5' et, en 3', des segments J_λ (blanc) suivi d'un gène constant C_λ (rouge) correspondant.

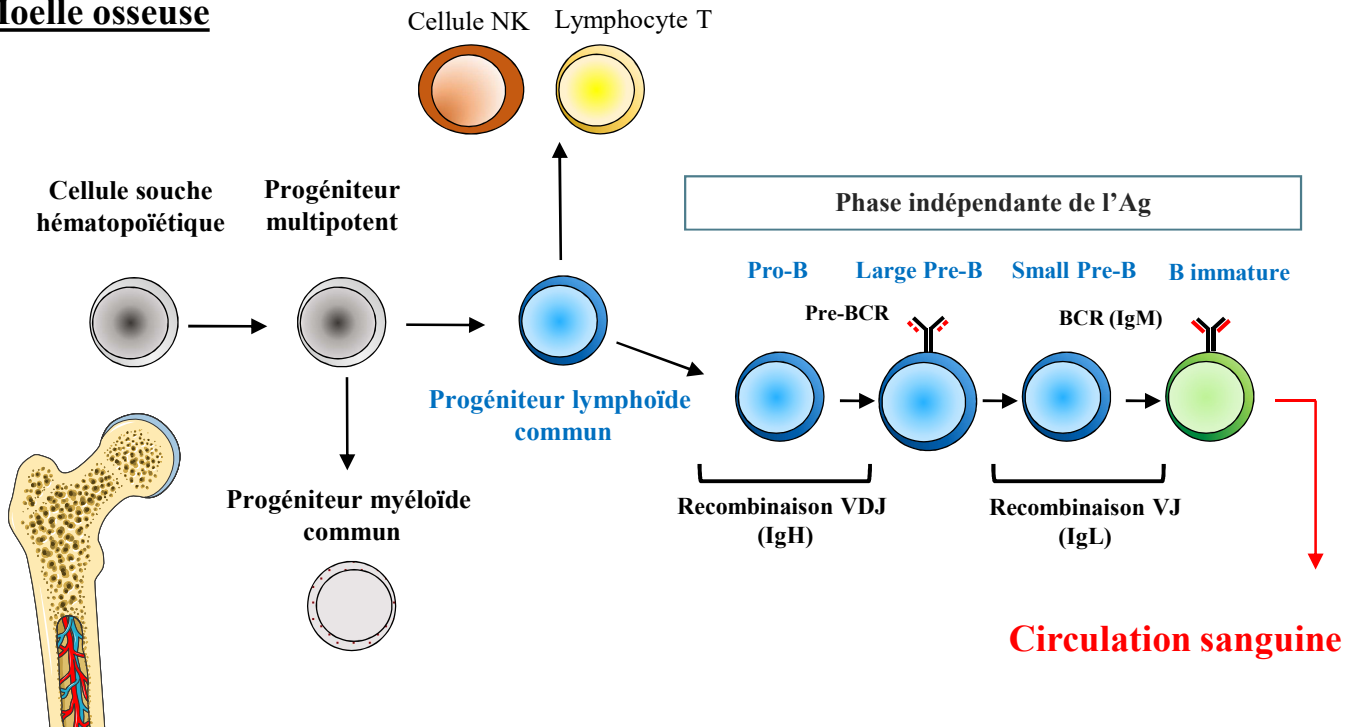
Le locus IGK est situé sur le chromosome 2 en 2p11.2 chez l'homme où il s'étend sur 1820 kb (**Figure 2B**). Il possède 82 gènes avec 76 segments variables IGKV (dont 31-35 fonctionnels) regroupés en 5 sous-familles, 5 segments de jonctions IGKJ tous fonctionnels et un segment unique constant IGKC. Chez la souris, le locus $Ig\kappa$ est situé sur le chromosome 6 et s'étend sur 3,2Mb. Il comporte 161 segments variables $V\kappa$ (dont 91-92 fonctionnels) et 5 segments de jonction $J\kappa$ (dont 1 non fonctionnel). La région constante $C\kappa$ est codée par un seul segment constant $C\kappa$. Les segments $V\kappa$ sont positionnés dans le même sens ou dans le sens inverse des segments $J\kappa$ - $C\kappa$.

Le locus IGL ($Ig\lambda$) est situé sur le chromosome 22 en 22q11.2 chez l'homme et s'étend sur 1050 kb (**Figure 2C**). Il possède au total 87-96 gènes avec 73-74 segments variables $V\lambda$ (dont 29-33 fonctionnels), 7-11 segments de jonction $J\lambda$ (dont 4-5* fonctionnels : $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 6^*$ et $J\lambda 7$) et 7-11 segments constants $C\lambda$ (dont 4-5 fonctionnels). Les segments $V\lambda$ se répartissent en 10 sous-familles avec une distribution assez homogène du nombre de gènes entre les sous-familles $V\lambda 1, 2, 3, 4$ et 5. Le locus $Ig\lambda$ a la particularité d'avoir un couplage des segments $J\lambda$ avec les segments $C\lambda$ correspondants. Le locus $Ig\lambda$ murin (chromosome 16) est plus petit (200 kb) et génère une diversité limitée. Il est formé de 2 clusters adjacents $VJ C\lambda$: $V2V3$ - $J2C2$ et $V1$ - $J3C3J4C4$. Chez l'homme environ 40% des LB expriment une $Ig\lambda$, alors que cet isotype ne représente qu'environ 5% du répertoire des Ig chez la souris (Aoki-Ota et al., 2012).

I.2. Le développement B précoce

L'ontogénie B débute dans le foie fœtal et se poursuit après la naissance dans la moelle osseuse (**Figure 3**). Les LB dérivent de cellules pluripotentes nommées cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui se différencient d'abord en progéniteurs multipotents (MPP) puis en précurseurs lymphoïdes communs (CLP) qui seront à l'origine des LB, LT et des lymphocytes NK. L'engagement dans le lignage B s'accompagne de réarrangements géniques séquentiels des segments V, D et J conduisant à l'expression d'un BCR à la surface des LB immatures. L'assemblage combinatoire des multiples segments et l'imprécision des jonctions V(D)J sont à l'origine de la très grande diversité du répertoire primaire des Ig, leur permettant de reconnaître une multitude d'Ag. Néanmoins, cette imprécision de jonction aboutit à la formation fréquente de réarrangements V(D)J non productifs (VDJ⁻ et/ou VJ⁻), présentant un décalage du cadre de lecture. Au cours de cette maturation, les précurseurs B

Moelle osseuse



Organes lymphoïdes secondaires

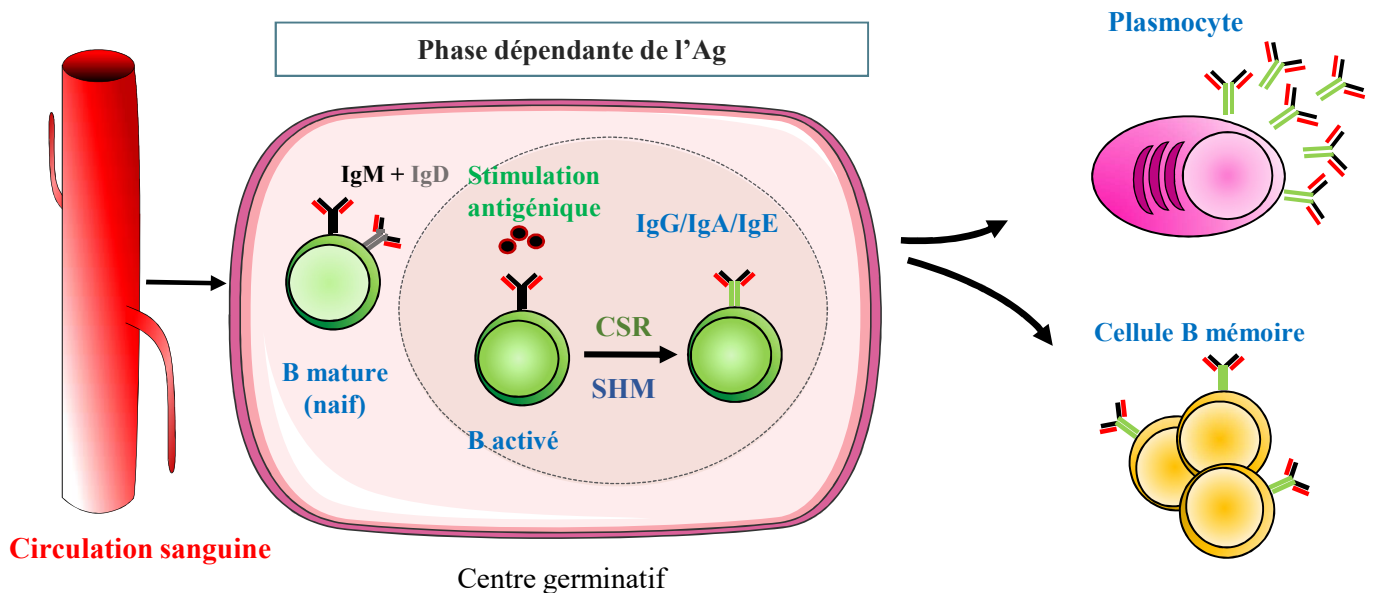


Figure 3 : Les principales étapes du développement lymphocytaire B.

Les lymphocytes B (LB) sont issus de cellules pluripotentes nommées cellules souches hématopoïétiques qui se différencient en progéniteurs multipotents puis en précurseurs lymphoïdes communs, à l'origine des LB, LT (pour Lymphocytes T) et des lymphocytes NK (pour « Natural Killer »). Dans la moelle osseuse, le processus de recombinaisons V(D)J ponctue les étapes précoces du développement B. Cette phase indépendante de l'antigène débute au locus des chaînes lourdes d'Ig (IgH) par réarrangements des segments DH vers JH au stade pro-B, et se poursuit par une recombinaison VH vers DJH. Au stade pré-B, l'expression de chaînes Igu codées par un réarrangement VDJ fonctionnel permet de former le récepteur des cellules pré-B (pré-BCR), par association avec les pseudo-chaînes légères λ5 et V-préB. La signalisation en aval du pré-BCR induit plusieurs cycles de prolifération, puis les clones B sélectionnés subissent des réarrangements V vers J au niveau des chaînes légères (IgL), au stade de cellules « small pré-B ». Un réarrangement VJ fonctionnel permet alors l'expression d'un BCR à la surface des cellules B immatures qui migrent ensuite à travers de la circulation sanguine pour terminer leur maturation dans les organes lymphoïdes secondaires. La stimulation antigénique des cellules B matures conduit le plus souvent à leur prolifération intense dans les centres germinatifs (GC). Au sein des GC, les LB peuvent encore modifier leur BCR par hypermutations somatiques (SHM) ou commutation de classe (CSR) puis se différencier en cellules B mémoire ou en plasmocytes (PC). Les PC peuvent alors migrer dans la moelle osseuse pour y survivre durant plusieurs années au sein de « niches ».

subissent des étapes de sélections positives ou négatives permettant de contrôler l'assemblage et l'absence d'autoréactivité du BCR.

I.2.1. Mécanismes impliqués dans les recombinaisons V(D)J

Le processus de recombinaisons V(D)J permet de générer un répertoire primaire d'Ig hautement diversifié à partir d'un nombre limité de gènes (Tonegawa, 1983). La formation de l'exon variable s'effectue par assemblage des segments V, D et J pour les chaînes lourdes, et seulement V et J pour les chaînes légères (**Figures 4A**) (pour revue Roth, 2014).

Ces remaniements géniques reposent sur la génération de cassures double brins (DSBs pour « *double strand break* ») sous l'action des endonucléases RAG-1 et RAG-2 (pour « *recombination activating genes* ») exprimées seulement dans les lymphocytes (pour revue Teng and Schatz, 2015) et des protéines ubiquitaires HMGB1/2 (pour « *high mobility group box1/2* ») qui participent à la reconnaissance des séquences signal de recombinaisons hautement conservées RSS (pour « *recombination signal sequences* ») (Little et al., 2013; Thwaites et al., 2019). Les RSS sont positionnées en 3' de chaque segment V, en 5' de chaque segment J et de part et d'autre des segments D (Leu and Schatz, 1995). Ces séquences sont composées de deux motifs hautement conservés : un nonamère riche en A (9 nt : ACAAAAACC) et un heptamère (7nt : CACAGTG) séparés par un enchaînement de 12 (12RSS) ou 23 (23RSS) nucléotides (Tonegawa, 1983) (**Figure 4B**). Selon la règle « 12-23 », les recombinaisons V(D)J se produisent uniquement entre des séquences 12RSS et 23RSS, permettant ainsi des réarrangements ordonnés (par exemple : D vers J puis V vers DJ au locus IGH) tout en évitant des recombinaisons anarchiques.

Le rapprochement des RSS12/23 sous forme d'une synapse va catalyser les DSBs et la formation de deux types d'extrémités : une structure en épingle à cheveux sur les segments à joindre et des extrémités franches au niveau des RSS (**Figure 5**). Puis, le recrutement de KU70/KU80 permet de protéger les extrémités jusqu'à la mise en place d'une voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante d'ATM (pour « *ataxia telangiectasia mutated* ») (McBlane et al., 1995; Schatz and Spanopoulou, 2005). La seconde phase du mécanisme de recombinaison V(D)J repose sur la jonction des DSBs par la voie de réparation des extrémités non homologues (NHEJ pour « *non homologous end joining* ») (Weterings and Chen, 2008). Ce processus de réparation fait intervenir plusieurs protéines comme DNA-PKcs (pour « *DNA dependant protein kinase catalytic subunit* »), XRCC4 (pour « *x-ray repair cross-complementing protein 4* »), DNA ligase-IV, Artemis, Cernunnos et le complexe KU70/KU80

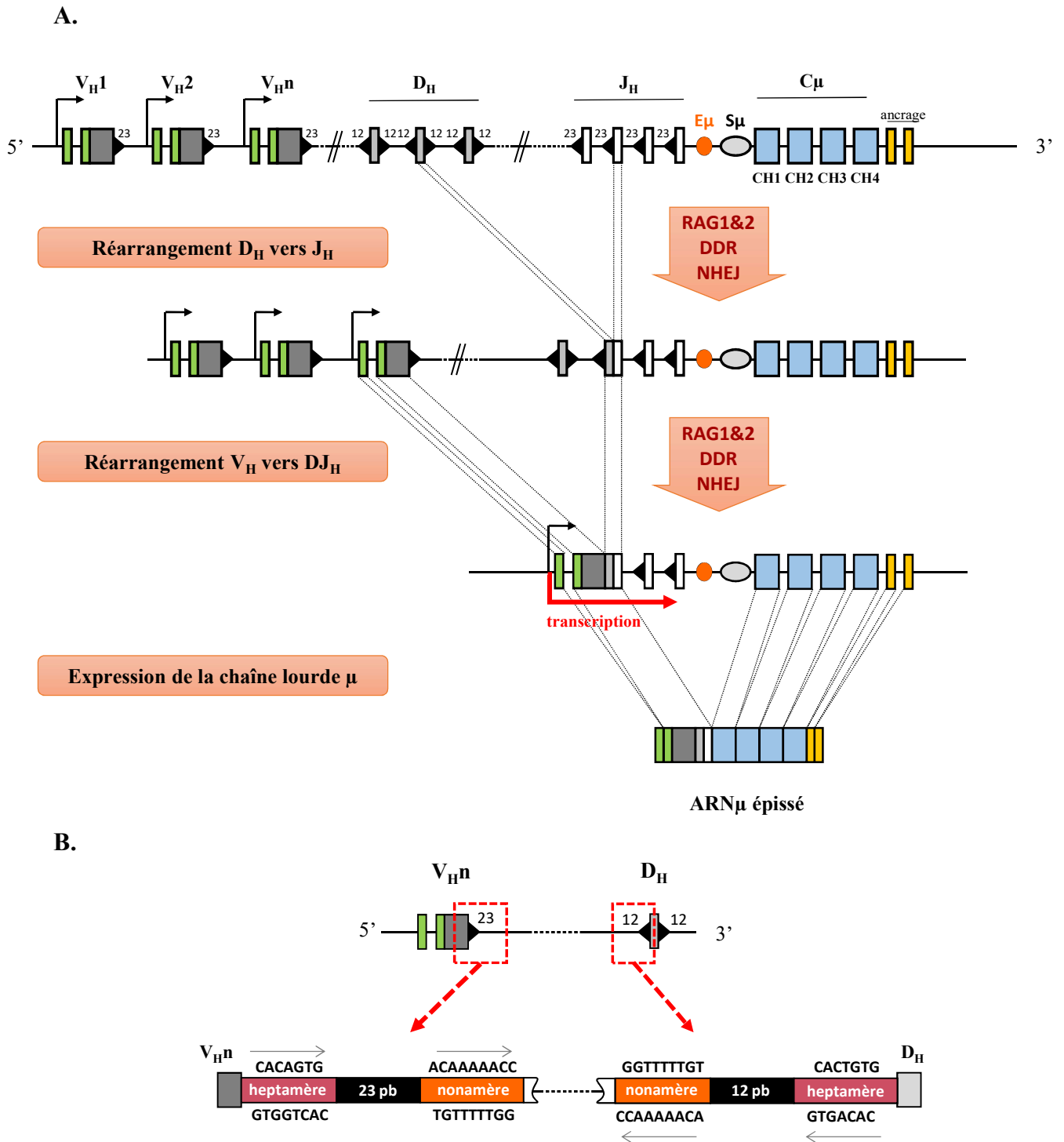


Figure 4 : Réarrangements V(D)J ordonnés au locus IgH.

A. Recombinaison aléatoire entre un segment D_H (gris clair) et J_H (blanc), suivie de l'assemblage avec un segment V_H (gris foncé).

B. Les séquences servant de signaux de recombinaison (RSS : triangle noir) sont hautement conservées, et formées d'un heptamère (CACAGTG) et d'un nonamère (ACAAAAACC), séparés par des séquences moins conservées de 12 ou 23 paires de bases nommées espaceurs (ou « spacers »). La règle 12/23 implique que les recombinaisons ne peuvent intervenir qu'entre des RSS contenant des « spacers » de tailles différentes, empêchant ainsi des réarrangements directs de V_H vers J_H (D'après Dudley et al., 2005).

(*RAG*: « recombination activating genes »; *DDR*: *DNA damage response* », *NHEJ*: *Non-homologous end joining*)

déjà présent (Yunmei Ma et al., 2002; Schlissel, 2002). Même si les mêmes voies de réparation sont impliquées, les deux types d'extrémités seront prises en charge différemment. La jonction des extrémités franches au niveau des RSS produit des épisomes rapidement dégradés, tandis que les extrémités codantes peuvent subir des modifications de séquences lors de la réparation, avec l'insertion ou la délétion de nucléotides. Une cassure asymétrique de l'épingle à cheveux va permettre des insertions de nucléotides P (pour « *Palindromic* ») sur le brin court par complémentarité au brin long opposé et former de courtes séquences palindromiques (Lafaille et al., 1989; Lewis, 1994; McCormack et al., 1989). En parallèle, des nucléotides N (pour « *non germline nucleotide* ») vont être introduits de manière aléatoire par l'enzyme TdT (pour « *terminal deoxynucleotidyl transferase* ») aux extrémités des régions codantes. Cet ajout, n'excédant jamais plus d'une dizaine de nucléotides (Alt and Baltimore, 1982; Roth et al., 1989), augmente considérablement la diversité des jonctions CDR3 des exons variables de chaînes lourdes d'Ig. En revanche, la TdT étant faiblement exprimée au stade pré-B, les jonctions CDR3 des exons variables de chaînes légères ne présentent peu ou pas d'insertions N.

1.2.2. Recombinaisons V(D)J séquentielles et phénomène d'exclusion allélique

Le phénomène d'exclusion allélique est une étape clef dans la génération du répertoire primaire des Ig et permet l'expression de BCR uniques à la surface des cellules B. En accord avec la théorie de la sélection clonale émise par Burnet, les cellules B exprimant un récepteur de spécificité antigénique unique, le plus souvent dépourvu d'auto-réactivité, pourront être sélectionnées positivement et subir des étapes d'amplification clonale (Burnet, 1959).

Au stade pro-B précoce, le processus ordonné de recombinaisons V(D)J débute par des jonctions bi-alléliques de segments D_H et J_H au locus IgH (Alt et al., 1981, 1984; Ehlich et al., 1994, 1993; ten Boekel et al., 1995) (**cf Annexe 2 Figure 1**). Cette étape est suivie par une recombinaison monoallélique d'un segment V_H sur le segment réarrangé DJ pour générer un exon variable VDJ. Dans environ deux tiers des cas, l'imprécision des jonctions CDR3 aboutit à un réarrangement non fonctionnel présentant un décalage du cadre de lecture (Mostoslavsky et al., 2004). En revanche, un réarrangement VDJ productif codant une chaîne lourde μ fonctionnelle (μ HC pour « *μ Heavy Chain* ») capable de s'apparier avec une pseudo-chaîne légère, formée des polypeptides invariants $V_{pr\acute{e}B}$ et λ_5 , marque la fin du stade pro-B et l'entrée au stade pré-B (pour revue Winkler and Mårtensson, 2018). En effet, le complexe formé de

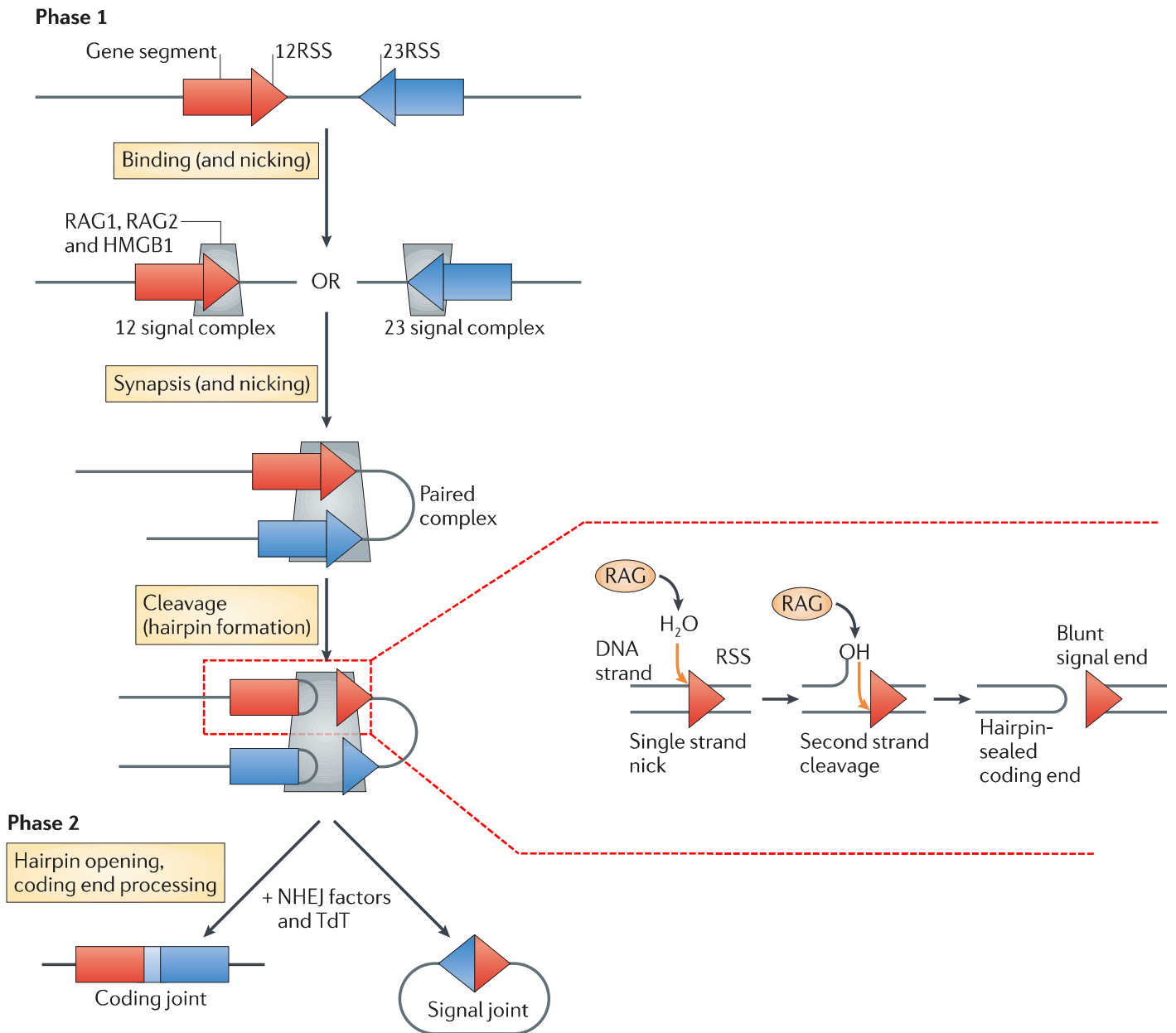


Figure 5 : Introduction et résolution des cassures double-brins induites par le complexe protéique RAG.

Phase 1 : le complexe composé de RAG-1, RAG-2 et HMGB1 se fixe au niveau des séquences RSS pour former une « synapse » et introduire les cassures double-brins (DSBs), générant ainsi des extrémités en épingle à cheveux (dites « codantes ») et à bouts francs (dites « signal »). Phase 2 : jonction des DSBs par la voie de réparation NHEJ. Encart à droite : après l'action du complexe RAG et la génération d'une cassure simple brin, le groupement 3' hydroxyle (3'OH) libre à l'extrémité du brin codant attaque le groupement phosphate sur le brin opposé par une réaction de transestérification (D'après Schatz and Ji, 2011).

(RSS: Recombination Signal Sequence; RAG: Recombination Activating Genes; HMGB1: High Mobility Group Protein B1; NHEJ: Non Homologous End Joining; TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase)

HC μ , V preB et $\lambda 5$ permet la formation du pré-BCR qui, en association avec Ig α /Ig β à la membrane, stimule une étape de prolifération intense. De manière concomitante à cette expansion clonale, le signal pré-BCR réprime l'expression des enzymes RAG pour inhiber les réarrangements, et en particulier, la recombinaison V H vers DJ H sur le second allèle (Jung et al., 2006; Kudo et al., 1987). En revanche, lorsque le réarrangement sur le premier allèle IgH est non-productif, l'absence d'expression du pré-BCR et la persistance de RAG autorisent les jonctions V H vers DJ H sur le second allèle. Si ce réarrangement n'est toujours pas productif, l'absence des signaux de survie du pré-BCR conduit à l'élimination des cellules par apoptose (Alt et al., 1984; Ehlich et al., 1993; Rajewsky, 1996). A l'inverse, un réarrangement productif sur le second allèle permet l'expression d'un pré-BCR et l'amplification clonale de cellules pré-B présentant des recombinaisons bi-alléliques (VDJ/VDJ $^+$) au locus IgH (Ehlich et al., 1994; ten Boekel et al., 1995). On estime qu'environ 40-50% des LB présentent cette configuration aboutissant à une transcription importante d'allèles IgH non-productifs (VDJ) pris en charge par des mécanismes de surveillance des ARN comme le NMD (« *nonsense-mediated mRNA decay* ») (voir § III.4) (Chemin et al., 2010; Daly et al., 2007; Tinguely et al., 2012; pour revue Lambert et al., 2020, 2019).

L'expression transitoire du pré-BCR joue un rôle crucial dans la sélection positive des cellules pré-B. En effet, le signal pré-BCR active la prolifération des cellules pré-B (stade « *large pre-B* ») tout en induisant une diminution de l'expression de RAG et des gènes V preB / $\lambda 5$ (Parker et al., 2005). Ce rétrocontrôle négatif menant à la baisse d'expression du pré-BCR s'accroît à chaque division cellulaire et aboutit à un arrêt de prolifération au stade « *small pre-B* ». La réexpression des enzymes RAG déclenche alors les réarrangements V L -J L sur les loci de chaînes légères (Reth and Nielsen, 2014). Les réarrangements des chaînes légères se produisent dans un premier temps sur le locus Ig κ , sur les deux allèles séquentiellement, puis sur le locus Ig λ si les premiers s'avèrent non productifs. Une chaîne légère Ig κ fonctionnelle, codée par un réarrangement V L -J L productif, pourra s'associer avec la chaîne μ et permettre l'expression d'un BCR de classe IgM à la surface des cellules B immatures. Le signal BCR induit un rétrocontrôle semblable à celui décrit précédemment pour le pré-BCR aboutissant à la diminution de l'expression de RAG et à l'arrêt des recombinaisons. En revanche, si le premier réarrangement d'un allèle Ig κ n'a pas été productif, l'absence de signalisation BCR autorise des réarrangements successifs, notamment sur le deuxième allèle Ig κ . Si celui-ci n'aboutit toujours pas à un réarrangement fonctionnel, alors les recombinaisons VJ s'effectuent selon le même principe au locus Ig λ . Cette accessibilité séquentielle (ou exclusion isotypique) permet

l'expression d'un seul type de chaînes légères, Ig κ ou Ig λ (Gorman and Alt, 1998; Jung et al., 2006; Mostoslavsky et al., 2004).

Les cellules B immatures exprimant un BCR de classe IgM subissent également un contrôle très strict visant à limiter l'apparition de récepteurs auto-réactifs. Nemazee avait d'ailleurs estimé que plus de la moitié des BCR à ce stade de maturation étaient capables de reconnaître des auto-antigènes (Nemazee, 1995). Lors de ce point de contrôle, un sauvetage nommé édition du BCR (ou « *receptor editing* ») peut être mis en place pour modifier la chaîne légère (Gay et al., 1993; Novobrantseva et al., 2005; Prak and Weigert, 1995; Radic et al., 1993; Tiegs et al., 1993). Ce processus a été abondamment étudié pour les gènes de chaînes légères Ig κ (**Figure 6**). L'exon variable (VJ κ) préalablement établi peut être remplacé en joignant un segment V κ en amont à un segment J κ en aval. Les cellules auto-réactives peuvent aussi subir un réarrangement conduisant à l'inactivation du locus Ig κ par délétion du gène constant (C κ) et des activateurs transcriptionnels (iE κ et 3'E κ), en utilisant des séquences « kappa-RS » (RS pour « *recombining sequence* ») dont le site KDE (*kappa-deleting element*) situé en 3' du locus. Cette situation autorise alors des réarrangements du second allèle Ig κ ou du locus Ig λ comme dernière tentative pour permettre d'exprimer un BCR non auto-réactif (Edry and Melamed, 2004). Si ce processus s'avère encore infructueux, la cellule B est éliminée par apoptose ou inactivée par un processus d'anergie (Niiri and Clark, 2002).

A ce stade, ponctuant la génération du répertoire primaire des Ig dans la moelle osseuse, les LB immatures expriment un BCR de classe IgM. Un épissage alternatif des transcrits de chaînes lourdes permet ensuite la co-expression d'IgM et IgD de même spécificité antigénique à la surface, donnant naissance aux cellules B matures transitionnelles qui vont quitter la moelle osseuse pour poursuivre leur développement dans les organes lymphoïdes secondaires.

I.3. Le développement B tardif : les cellules B matures

Au sein des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, plaques de Peyer ...), les cellules B transitionnelles dites « naïves » vis-à-vis de la rencontre avec un Ag sont caractérisées par l'expression de marqueurs de surface comme IgM, IgD, mais également CD93 (récepteur de C1q ; composante du complément) et CD24 (glycoprotéine membranaire impliquée dans la transduction de signaux de différenciation et de croissance) (Allman et al., 2001; Chen and Cerutti, 2011). Une caractérisation plus fine des cellules B transitionnelles permet de distinguer 3 sous-populations : les cellules B transitionnelles de type 1 (T1 : IgM^{High}IgD^{low}CD21⁻CD23⁻) et 2 (T2 : IgM^{High}IgD^{high}CD21⁺CD23⁺).

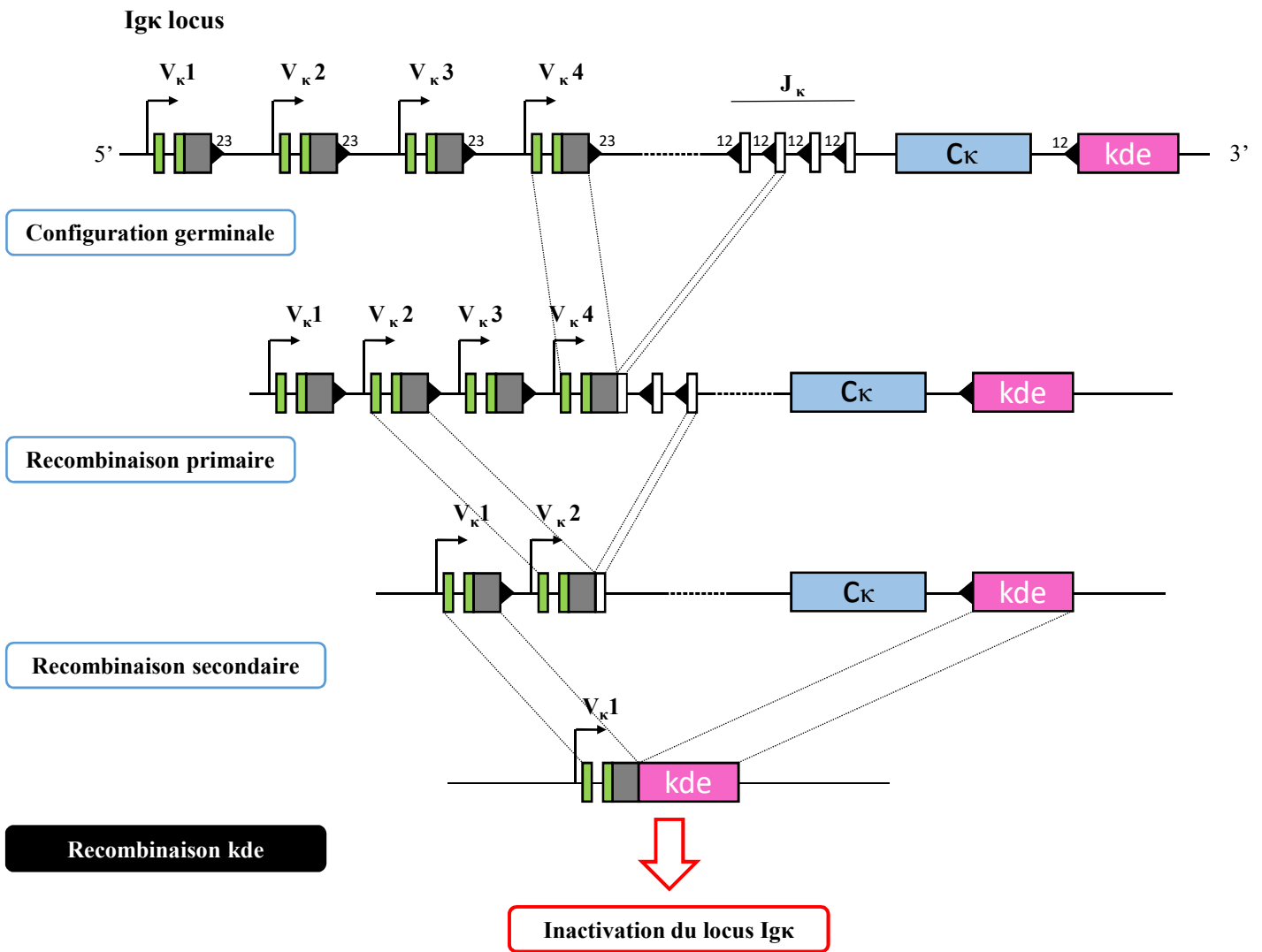


Figure 6 : Mécanisme d'édition du BCR (ou « Receptor Editing ») au locus Ig κ .

La partie haute montre la configuration germinale du locus Ig kappa avec les segments V κ (gris) et J κ (blanc), flanqués respectivement de séquences RSS 23 et 12 (triangle noir). Le site « kde » (kappa-deleting element) est également représenté (rose) en 3' de l'exon constant C κ (rouge). Les réarrangements secondaires permettent de remplacer certains réarrangements primaires aboutissant à l'expression de BCR non-fonctionnels ou autoréactifs. L'exemple présent montre le remplacement d'un réarrangement V κ 2J κ 2 par une jonction V κ 4J κ 5. En dernier recours, le locus peut être inactivé par la recombinaison kde qui supprime l'exon constant C κ et les activateurs transcriptionnels du Ig κ (D'après Nemazee, 2017).

Les cellules de type 3 (T3) moins décrites sont anergiques et non proliférantes.

Le CD21 correspond au récepteur du complément C3d et le CD23 au récepteur II du fragment Fc ϵ (Allman et al., 2001; Chung et al., 2002; Merrell et al., 2006). La maturation des cellules T2 est étroitement liée au signal BCR et permet leur différenciation en cellules B2 conventionnelles de type folliculaire (FO pour « *follicular B Cells* ») ou de la zone marginale (MZ pour « *marginal zone B cells* »). Les T2 acquièrent progressivement une résistance à l'apoptose et une capacité de prolifération en réponse à une stimulation par le BCR (Srivastava et al., 2005; Su et al., 2004).

I.3.1. Les cellules B1

Les cellules B1 constituent un lignage distinct et ne représentent que 5% des cellules B totales. Elles produisent principalement des anticorps naturels poly-réactifs de classe IgM et sont essentiellement localisées dans les cavités pleurales et péritonéales, où elles représentent 30 à 60% de la population des cellules B. En revanche, elles sont quasiment absentes des ganglions lymphatiques et de la rate (0.2 à 1% des LB totaux) (Baumgarth, 2016, 2013; Martin and Kearney, 2001). Les cellules B-1 IgM^{High} (IgD^{low}) expriment le marqueur de surface spécifique CD11b (ou ITGAM). De plus, on distingue deux catégories de cellules B1 : les B1a CD5⁺ et les B1b CD5⁻ (Haas, 2015).

I.3.2. Les cellules B2

Les cellules B2 conventionnelles se scindent en deux sous-catégories :

- **les cellules B MZ** qui représentent 5 à 10% des cellules B de la rate et se localisent dans la zone marginale à l'interface de la pulpe blanche et rouge (Cerutti et al., 2013) (**Figures 7A**). Elles possèdent des fonctions et des caractéristiques similaires aux cellules B1, avec l'expression d'un BCR peu diversifié capable de reconnaître des motifs partagés par différents micro-organismes (poly-réactivité) mais également des antigènes du soi (Pillai et al., 2005). Elles sont ainsi capables de reconnaître des PAMP (motifs moléculaires associés aux pathogènes : PAMP pour « *pathogen-associated molecular pattern* ») ou des débris de cellules apoptotiques DAMP (pour « *damage-associated molecular pattern* ») (Martin and Kearney, 2002; Pillai and Cariappa, 2009).

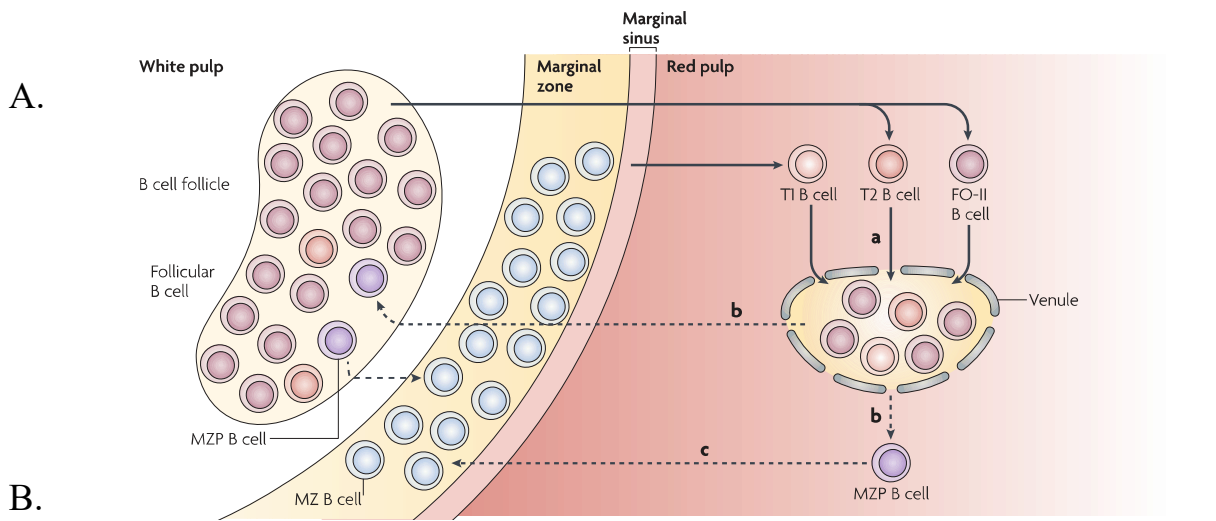


Figure 7 : Localisation des LB spléniques et réaction du centre germinatif.

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

B. Après activation par un antigène, les cellules B naïves peuvent poursuivre leur maturation au sein de centres germinatifs. La population appelée « centroblastes » prolifère intensément dans la zone sombre (DZ : « dark zone » ; bleu foncé) où se produit également le processus de SHM. Ces cellules deviennent ensuite des « centrocytes » après migration dans la zone claire (LZ : light zone ; bleu clair). Dans la LZ, leur affinité pour l'antigène sera testée avec l'aide des TFH (T follicular Helper) et des FDC (Follicular Dendritic Cells). Le mécanisme de CSR se déroule également dans la LZ. A noter que des retours dans la DZ permettent d'effectuer de nouveaux cycles de prolifération/SHM. Après sélection positive des cellules B les plus affines pour l'Ag, les centrocytes se différencient en plasmocytes ou en cellules B mémoire (Extrait de Basso and Dalla-Favera, 2015).

Ces cellules expriment également des TLR (pour « *toll like receptor* ») capables de reconnaître des motifs antigéniques d'origines bactériennes tels que les lipopolysaccharides (LPS) ou des séquences d'ADN type CpG (Genestier et al., 2007; Rubtsov et al., 2008). Les LB MZ participent essentiellement à la réponse immune T-indépendante et leur activation, via leur BCR ou les TLR, induit une différenciation en plasmocytes à courte durée de vie, sécréteurs d'anticorps de faible affinité de type IgM.

- **Les cellules B FO** représentent la majorité des cellules B spléniques et des ganglions lymphatiques. Elles sont localisées au niveau de la pulpe blanche des follicules (Pillai and Cariappa, 2009) (**Figures 7A**). Ces cellules ont une durée de vie assez longue avec une demi-vie d'environ 5 mois chez la souris (Förster and Rajewsky, 1990). Elles se caractérisent par une expression de CD23 forte et de CD21 faible. Après une rencontre avec un Ag, ces cellules B FO sont à l'origine des réponses immunes T-dépendantes qui vont entraîner la formation d'un centre germinatif GC (pour « *germinal center* »), foyer de prolifération intense et d'interactions soutenues entre les LB et les cellules T_{FH} (pour « *lymphocytes t follicular helper* ») (Good-Jacobson and Tarlinton, 2012; Okada and Cyster, 2006; Qi et al., 2008). Au sein des GC, les cellules B vont subir de nouveaux remaniements de leurs gènes d'Ig, par deux mécanismes distincts appelés hypermutation somatique (SHM pour « *somatic hypermutation* ») et commutation isotypique (CSR pour « *class switch recombination* »), puis se différencier en cellules B mémoires ou en plasmocytes.

I.4. Réaction du centre germinatif et remaniements secondaires des gènes d'Ig

Les GC sont divisés en deux compartiments fonctionnellement et histologiquement différents : la zone sombre (DZ pour « *Dark Zone* »), siège de prolifération intense des centroblastes et du mécanisme de SHM qui consiste à introduire des mutations au niveau des exons variables afin d'améliorer l'affinité des Ig vis-à-vis d'un Ag (Di Noia and Neuberger, 2007), et la zone claire (LZ pour « *Light Zone* ») où se déroule le mécanisme de CSR suivi de la différenciation des centrocytes en cellules B mémoires ou en plasmocytes (**Figures 7B**) (Chaudhuri et al., 2007; Chaudhuri and Alt, 2004). La CSR provoque le remplacement du domaine constant des chaînes lourdes afin de modifier les propriétés effectrices des Ig.

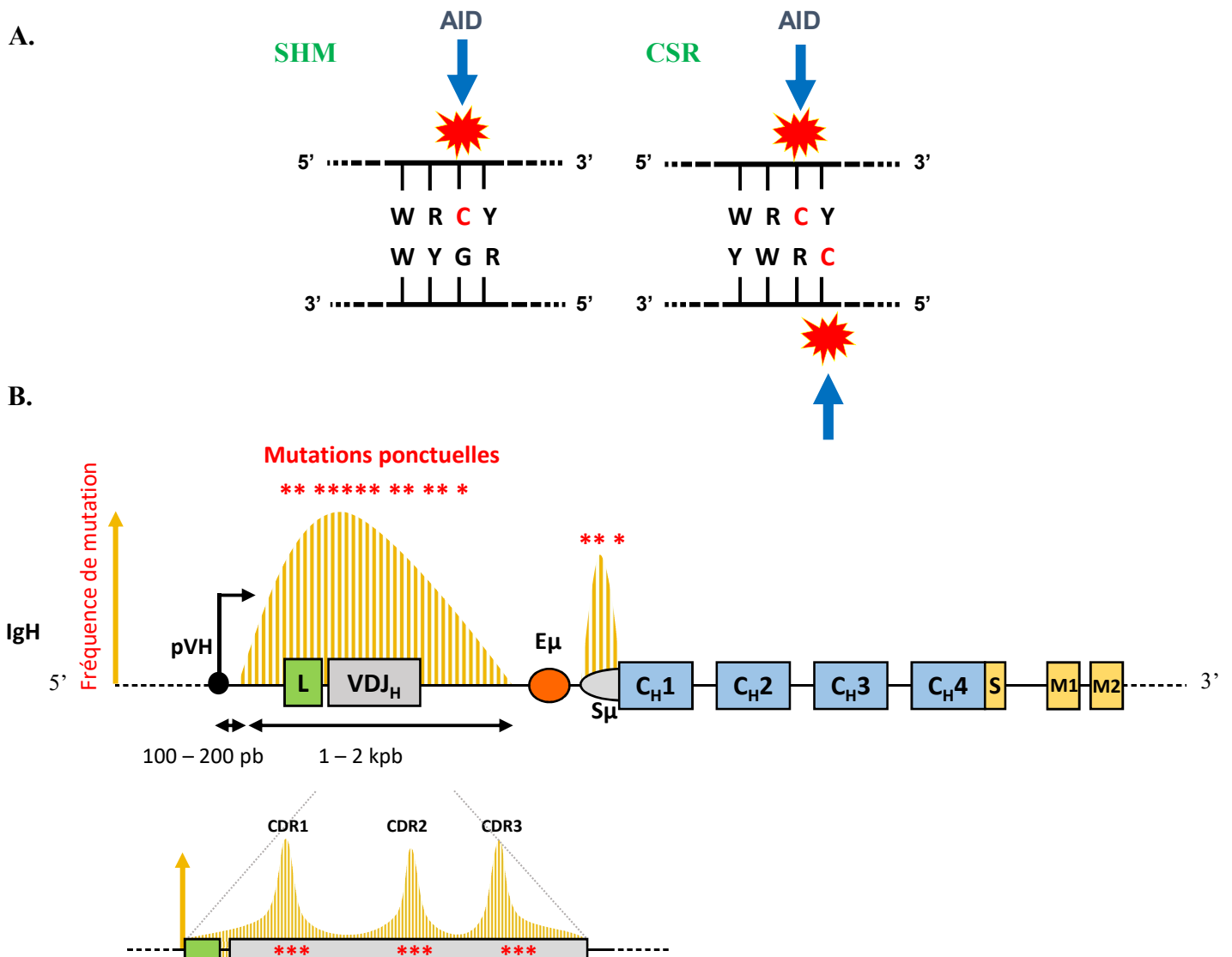


Figure 8 : Motifs reconnus par AID et profil d'hypermutations somatiques.

A. Motifs préférentiels permettant une déamination des résidus cytosines (C) en uracile par l'enzyme AID, lors des processus de SHM (gauche) et de CSR (droite). Ces séquences consensus d'ADN (nommés « points chauds ») ou « hotspots » présentent le motif WRCY (W=A/T ; R=A/G ; Y=T/C).

B. Au locus IgH, les régions switch contiennent une densité très importante du motif AGCT, souvent répété en tandem (région donneuse S_{μ} représentée). La fréquence de mutations induites par AID est indiquée en jaune. Pour la SHM, l'introduction de mutations ponctuelles débute ~120 pb en aval du site d'initiation de la transcription et s'étend sur plus de 1 kpb. Afin d'améliorer l'affinité des Ig, les exons variables réarrangés des chaînes lourdes (IgH) et légères (non montrées) sont soumis à un taux élevé de mutations ponctuelles, au niveau des régions CDR1, 2 et 3 impliquées dans la reconnaissance des motifs antigéniques. A l'inverse, les SHM sont peu fréquentes au niveau des activateurs transcriptionnels (E_{μ} ou E_{κ}) et des régions constantes (Adapté de Peled et al., 2008). (L; Leader; S_{μ} : Switch μ)

Les mécanismes de SHM et CSR sont dépendants de la transcription et reposent sur l'action de l'enzyme AID (pour « *activation-induced deaminase*), une protéine de 26 kDa codée par le gène *Aicda* appartenant à la famille des déaminases APOBEC (pour « *Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like* ») (Muramatsu et al., 2000, 1999; Revy et al., 2000).

Au sein du GC, les LB subissent une sélection positive qui repose sur la capacité du BCR à reconnaître l'Ag. En effet, seules les cellules exprimant un BCR de haute affinité pourront interagir efficacement avec les FDC (pour « *follicular dendritic cells* ») qui présentent l'Ag à leur surface sous forme de complexes immuns (Ac-Ag) fixés sur le récepteur au complément (CR1), et recevoir ainsi des signaux de survie par l'intermédiaire des molécules BAFF (pour « *b-cell activating factor* »). L'internalisation de l'Ag permet ensuite aux LB de se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et d'interagir avec des LT CD4⁺ de type Tfh qui expriment un TCR spécifique du complexe peptide antigénique/CMH II. Les Tfh fournissent à leur tour des signaux de survie/prolifération et de différenciation aux LB (e.g. liaison CD40/CD40L) (Fazilleau et al., 2009; Ma et al., 2012). En revanche, les LB exprimant un BCR de faible affinité ne recevront pas suffisamment de signaux de survie et seront éliminés par apoptose (Victora and Nussenzweig, 2012). En effet, les cellules B du GC expriment le récepteur pro-apoptotique FAS (CD95) permettant d'accroître leur engagement vers un processus apoptotique en absence de signaux de survie (Krammer, 2000; Naito et al., 2007; Wajant, 2002). Enfin, de nombreuses études ont révélé la structure dynamique du GC avec des migrations interzones autorisant plusieurs cycles de SHM afin de sélectionner des clones B exprimant des BCR de très forte affinité (pour revue De Silva and Klein, 2015; Ise and Kurosaki, 2019; Victora et al., 2010).

I.4.1. L'hypermutation somatique : SHM

Les SHM sont introduites au niveau des exons variables (V) principalement dans les CDRs. La fréquence de ces mutations touchant les exons V est de l'ordre de 10/1000pb, alors qu'elle est quasiment nulle au niveau des gènes constants (**Figures 8**) (pour revue Seki et al., 2005).

Sur le plan mécanistique, AID catalyse la déamination d'une cytosine (C) en uracile (U) sur l'ADN au niveau de points chauds (« *hotspots* ») présentant le motif WRCY (W=A/T ; R=A/G ; Y=T/C) (Dörner et al., 1998; Hwang et al., 2015). Le mésappariement de base U:G est ensuite pris en charge selon différents mécanismes de réparation (**Figure 9**) :

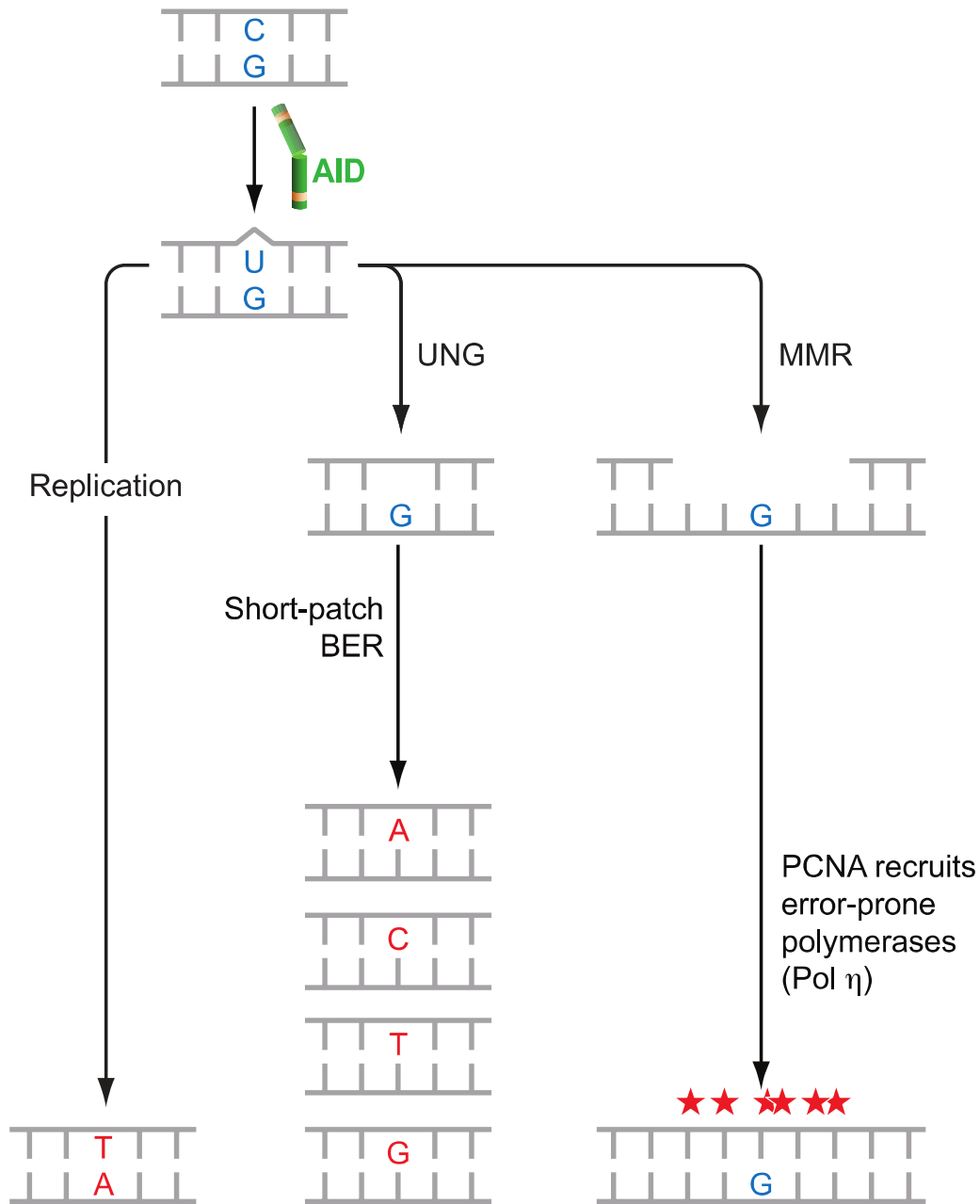


Figure 9 : Les différentes voies impliquées dans la prise en charge des mésappariements G:U durant la SHM.

AID initie le processus de SHM par déamination des cytosines sur un brin d'ADN, conduisant à l'apparition d'un résidu uracile U et donnant lieu à un mésappariement G:U. Des mutations de type transition peuvent ainsi apparaître après une étape de réplication (gauche). La voie BER (Base Excision Repair) (centre) fait intervenir l'enzyme UNG qui excise la base dU, créant un site abasique qui sera comblé par des polymérase infidèles (notamment REV1). Lors d'une prise en charge par la voie MMR (Mismatch Repair), le complexe MSH2/MSH6 et l'exonucléase EXO1 assure l'excision d'une portion du brin contenant le mésappariement. Des polymérase infidèles synthétisent alors un nouveau brin (Extrait de Peled et al., 2008).

(UNG: Uracil DNA-Glycosylase; EXO1: Exonuclease 1; MSH: Homologue of Escherichia coli MutS; Polη: Polymerase (DNA-directed)-η; PCNA: proliferating cell nuclear antigen)

- Les uraciles générées peuvent être ignorées et considérées comme des thymines lors de la réplication par l'ADN polymérase, aboutissant à des mutations C/T de type transition (Neuberger et al., 2005).
- Les uraciles peuvent également être excisées par l'enzyme UNG (pour « *uracil DNA-glycosylase* »), créant un site abasique pris en charge par la voie BER (pour « *base excision repair* »). La voie BER met en jeu les endonucléases APE1 ou APE2 (pour « *apuriniques/apyrimidiques endonucleases* ») qui clivent l'ADN en 5' du site abasique créant ainsi une cassure ADN simple brin (Hwang et al., 2015; Masani et al., 2013). Des ADN polymérases infidèles telles que REV1, pol β , pol η insèrent ensuite une base A, C, T ou G à la place du U aboutissant à des mutations de type transversion ou transition (Bahjat and Guikema, 2017; Pérez-Durán et al., 2012; Rada et al., 2002).
- Le mésappariement peut également être reconnu par la machinerie de réparation MMR (pour « *mismatch repair* ») faisant intervenir un hétérotétramère formé de MSH2/MSH6 (pour « *mutS homologue 2&6* ») et MLH1/PMS2 (pour « *mut homologue 1/ post meiotic segregation2* ») qui conduit au recrutement de l'exonucléase 1 (EXO1). Cette dernière va alors exciser l'uracile mais aussi les bases avoisinantes sur une longueur allant d'une dizaine de bases (« *short patch MMR* ») à plusieurs kilobases (« *long patch MMR* »), puis des polymérases infidèles (pol η) synthétisent un nouveau brin d'ADN en introduisant des mutations de type transition ou transversion (Hwang et al., 2015; Rada et al., 1998).

I.4.2. La commutation isotypique : CSR

La commutation de classe permet aux LB d'exprimer une chaîne lourde différente de l'IgM (ou d'IgD) via un mécanisme de recombinaison somatique irréversible ne modifiant pas la spécificité antigénique (**Figure 10**). Le choix de l'isotype secondaire dépend essentiellement du stimulus et de l'environnement cytokinique auquel le LB est soumis (pour revue Kinoshita and Honjo, 2001). Par exemple, la stimulation des LB de souris par du LPS en absence de cytokine induit des événements de CSR vers les isotypes IgG3 et IgG2b, alors que l'addition d'IL4 stimule la CSR vers IgG1 et d'IgE (Chaudhuri et al., 2007; Hwang et al., 2015). D'autres cytokines comme le TGF β (pour « *transforming growth factor β* ») ou l'interferon- γ (IFN γ)

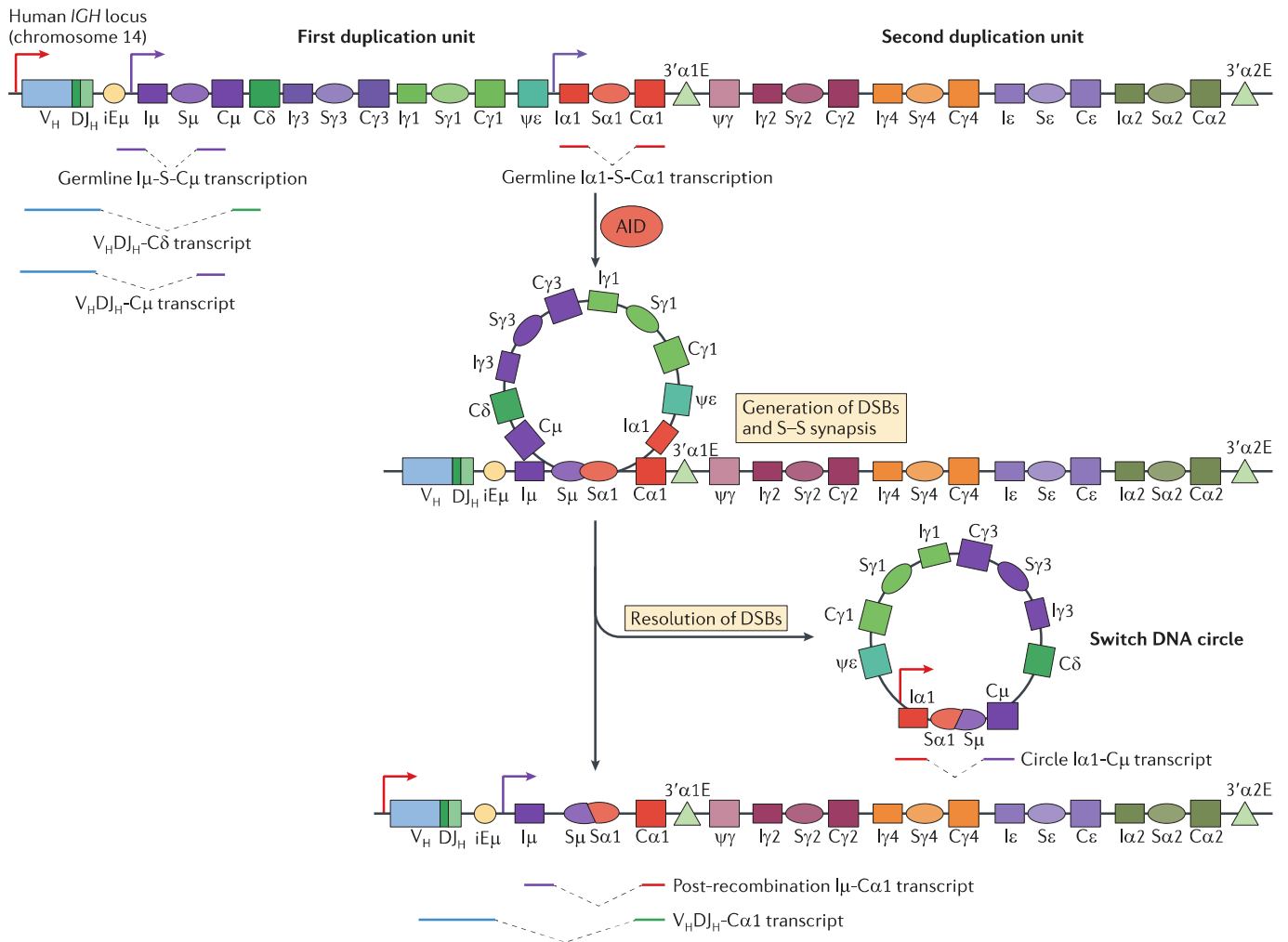


Figure 10 : La commutation isotypique (CSR) et ses multiples transcrits.

Représentation schématique du locus de IGH humain, illustrant un évènement de CSR entre les régions $S\mu$ (« switch donneuse » ; violet) et $S\alpha_1$ (« switch acceptrice » : rouge), permettant la production d'IgA1 à la place d'IgM. Les multiples sites d'initiation de la transcription sont indiqués par des flèches. La transcription des régions S donnant naissance aux transcrits germinaux $I\mu$ - $S\mu$ - $C\mu$ et $I\alpha$ - $S\alpha$ - $C\alpha$ joue un rôle essentiel lors de la CSR, car elle permet une ouverture de la chromatine nécessaire au recrutement d'AID et à l'introduction des cassures double-brins (DSBs). Le rapprochement des deux régions S sous forme de synapse et leur jonction autorisent ensuite l'expression du nouvel isotype. En parallèle, la réparation des DSBs génère un fragment d'ADN circulaire (« Switch DNA circle ») contenant la région éliminée, située entre $S\mu$ et $S\alpha$. La transcription initiée à partir des promoteurs I peut se poursuivre après la CSR et ces transcrits non-codants « post-CSR » sont souvent analysés en tant qu'indicateurs d'évènements de CSR. Enfin, la transcription initiée à partir du promoteur pVH est à l'origine des nouveaux transcrits de chaînes lourdes VDJH- $C\alpha_1$ (Extrait de Xu et al., 2012).

orientent le mécanisme de CSR, respectivement vers les isotypes IgA et IgG2a (Stavnezer and Schrader, 2014; Vaidyanathan et al., 2014).

Au locus IgH, toutes les régions constantes exceptée la région C δ sont précédées de régions S (« *switch* ») composées de répétitions en tandem de séquences riches en G/C (pour revue Hwang et al., 2015). Les séquences S présentent des tailles comprises entre 1 kb et 12kb et des « *hotspots* » ciblées par AID (Dunnick et al., 1993). La commutation isotypique est la conséquence de DSBs au niveau de 2 régions S dites donneuses et acceptrices, et leur réparation conduisant à la suppression de l'ADN intermédiaire par formation d'un cercle d'excision (Iwasato et al., 1990; Matsuoka et al., 1990; von Schwedler et al., 1990).

De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance de l'orientation, de la longueur et du caractère répétitif des régions S (Khamlichi et al., 2004; Luby et al., 2001; Ph et al., 2008; Shinkura et al., 2003; Zarrin et al., 2005). En effet, la transcription de ces régions riches en G/C induit la formation de structures hybrides ADN-ARN très stables appelées « boucles R » (ou « *R-loops* »), permettant de rendre le brin d'ADN non-matrice accessible à AID (Chaudhuri et al., 2003; Roy et al., 2008). Le ralentissement de l'ARN pol II au niveau des régions S participe également au recrutement d'AID sur l'ADN par l'intermédiaire de la protéine SPT5 (Pavri et al., 2010). De plus, le complexe SPT5/ARN pol II favorise la terminaison de la transcription conduisant à la dégradation de l'ARN formant une *R-loop* par le RNA exosome et à l'apparition de DSBs par exposition du brin codant à l'action d'AID (X. Wang et al., 2014).

Les DSBs sont ensuite reconnus par le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) qui se localise à la cassure et recrute ATM (pour « *ataxia telangiectasia mutated* ») (Dinkelmann et al., 2009) (**Figure 11**). ATM, ainsi activée, phosphoryle l'histone H2AX (pour « *histone 2a family member X* ») et la protéine 53BP1 (pour « *p53-binding protein 1* ») pour aboutir à un complexe, foyer de réparation, qui stabilise les DSBs (Franco et al., 2006; Lähdesmäki et al., 2004; Reina-San-Martin et al., 2004, 2003). La réparation des cassures et la jonction entre les deux régions S clivées font intervenir la voie de réparation C-NHEJ (pour « *classical non-homologous end joining* ») précédemment décrite lors des recombinaisons V(D)J, et impliquant de nombreuses protéines telles que Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Cernunnos, XRCC4 et l'ADN ligase IV. Il existe cependant une seconde voie de réparation alternative, la voie A-EJ (pour « *alternative end joining* ») faisant intervenir différents facteurs tels que MRN, XRCC1 (pour « *X-ray repair cross complementing protein 1* »), CtIP (pour « *CtBP-interacting protein* »), PARP-1 (pour « *poly ADP-ribose polymerase 1* ») et les ligases I et III (Vaidyanathan et al., 2014).

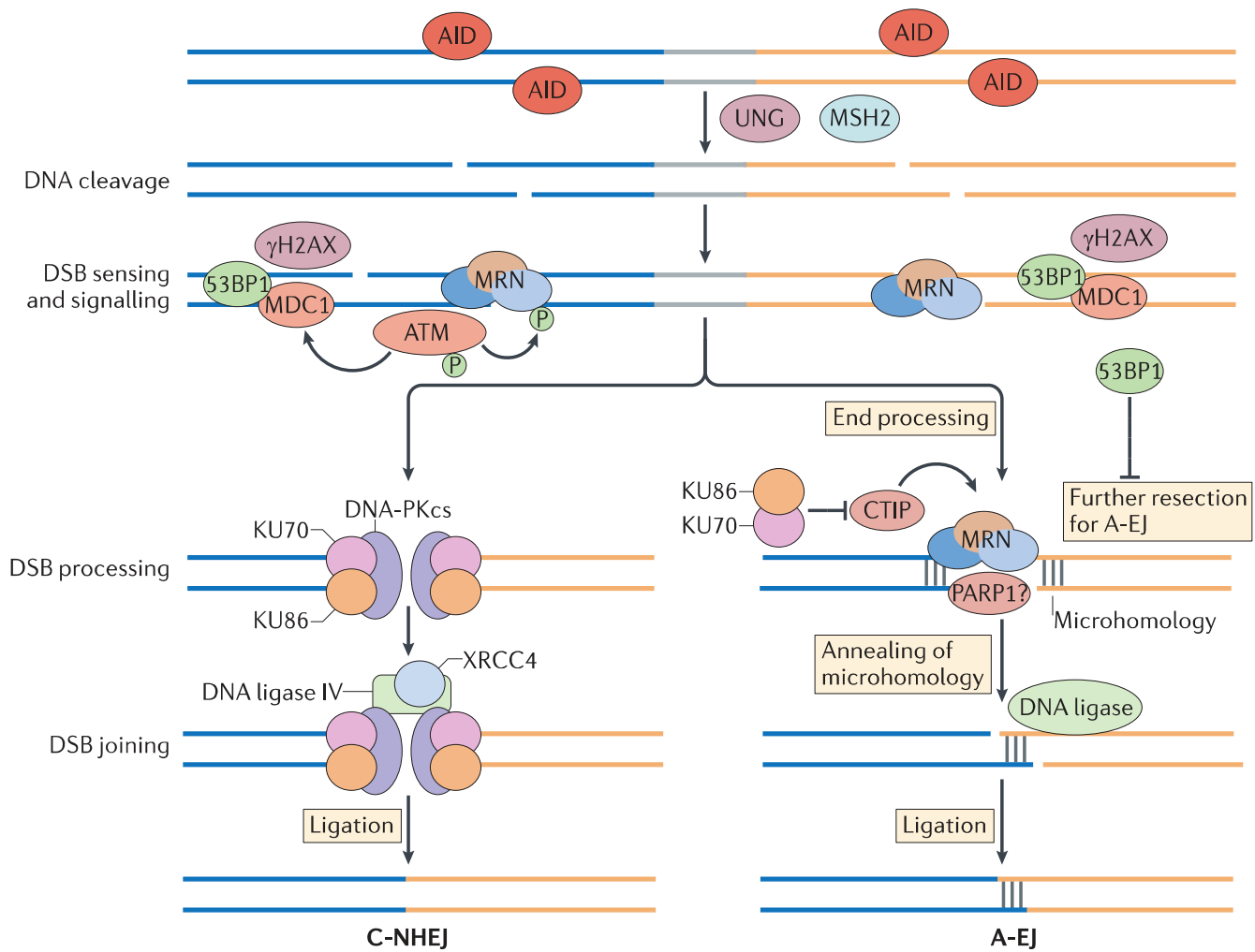


Figure 11 : Résolution des cassures double-brins au cours de la CSR.

La détection des DSBs au niveau des régions S repose sur le dépôt du complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) à proximité puis sur le recrutement de la sérine-protéine kinase ATM. La réparation des DSBs fait ensuite intervenir une voie classique nommée C-NHEJ (« classical non-homologous end joining ») ou une voie alternative (A-EJ : « alternative end joining »). Lors du NHEJ, les extrémités sont prises en charge notamment par Ku70, Ku86 et DNAPKcs, avant d'être ligaturées par la DNA ligase IV. La voie de l'AEJ fait intervenir les protéines CtIP et PARP1 et d'autres DNA ligases (Extrait de Xu et al., 2012).

Les régions S (donneuses et acceptrices) ciblées par le processus de CSR présentent également un enrichissement en marques H3K9/K14ac, H3K27ac, H4K8ac et H3K4me3, associées à un état transcriptionnel actif (**Figure 12**) (pour revue Sheppard et al., 2018). Par exemple, la triméthylation H3K4me3 est facilitée par le complexe FACT (pour « *facilitates chromatin transcription* ») et l'élimination de ses composantes SSRp1 (pour « *structure specific recognition protein 1* ») et SPT6 (pour « *suppressor of ty6* ») entraîne une diminution drastique de CSR vers IgA dans la lignée modèle CH12 (Aida and Honjo, 2013; Stanlie et al., 2010).

I.4.3. Epissage des transcrits germinaux et recrutement d'AID

Les gènes constants C_H sont organisés en « unités transcriptionnelles » composées d'un promoteur I, d'un exon I non-codant (présentant de nombreux codon stop), de la région S et des exons C_H. La transcription est initiée à partir des promoteurs I au niveau de la région donneuse S_μ et d'une région acceptrice donnée (S_x). La région donneuse S_μ est constitutivement transcrite tandis que la transcription des régions S acceptrices est induite par la stimulation des cellules B. De plus, l'environnement cytokinique oriente la CSR en stimulant la transcription germinale de certaines régions S acceptrices (Li et al., 1994; Matthews et al., 2014).

Même si la transcription germinale est essentielle à la CSR, elle ne semble pas suffisante puisque le remplacement de l'exon I_e par un promoteur fort (E_μ associé au promoteur pV_H), chez un modèle murin, entraîne une transcription normale mais ne permet pas une CSR vers IgE efficace, avec une diminution d'un facteur 10 à 100 (Bottaro et al., 1994). Les expériences menées par les équipes d'Alt et de Radbruch ont apporté une première réponse en soulignant l'importance des sites donneurs d'épissage des exons I durant le processus de CSR (Hein et al., 1998; Lorenz et al., 1995; Seidl et al., 1998). D'autres travaux ont également mis en évidence des interactions entre AID et les protéines CTNBL1 (pour « *catenin (cadherin-associated protein), β-like 1* ») et PTBP2 (pour « *polypyrimidine tract binding protein 2* »), impliquées respectivement dans l'épissage et sa régulation, apportant ainsi une explication moléculaire en suggérant un rôle direct de la machinerie d'épissage dans le recrutement d'AID au niveau des régions S (Conticello et al., 2008; Nowak et al., 2011). De façon intéressante, un rôle direct des introns épissés contenant les régions S a été récemment identifié. Ces régions introniques générées sous forme de lassos (« *lariats* ») circulaires peuvent être linéarisées, après une étape de débranchage catalysée par l'enzyme DBR1 (pour « *debranching RNA lariats 1* »). L'ARN linéaire riche en G ainsi formé pourrait alors adopter des structures particulières type G-

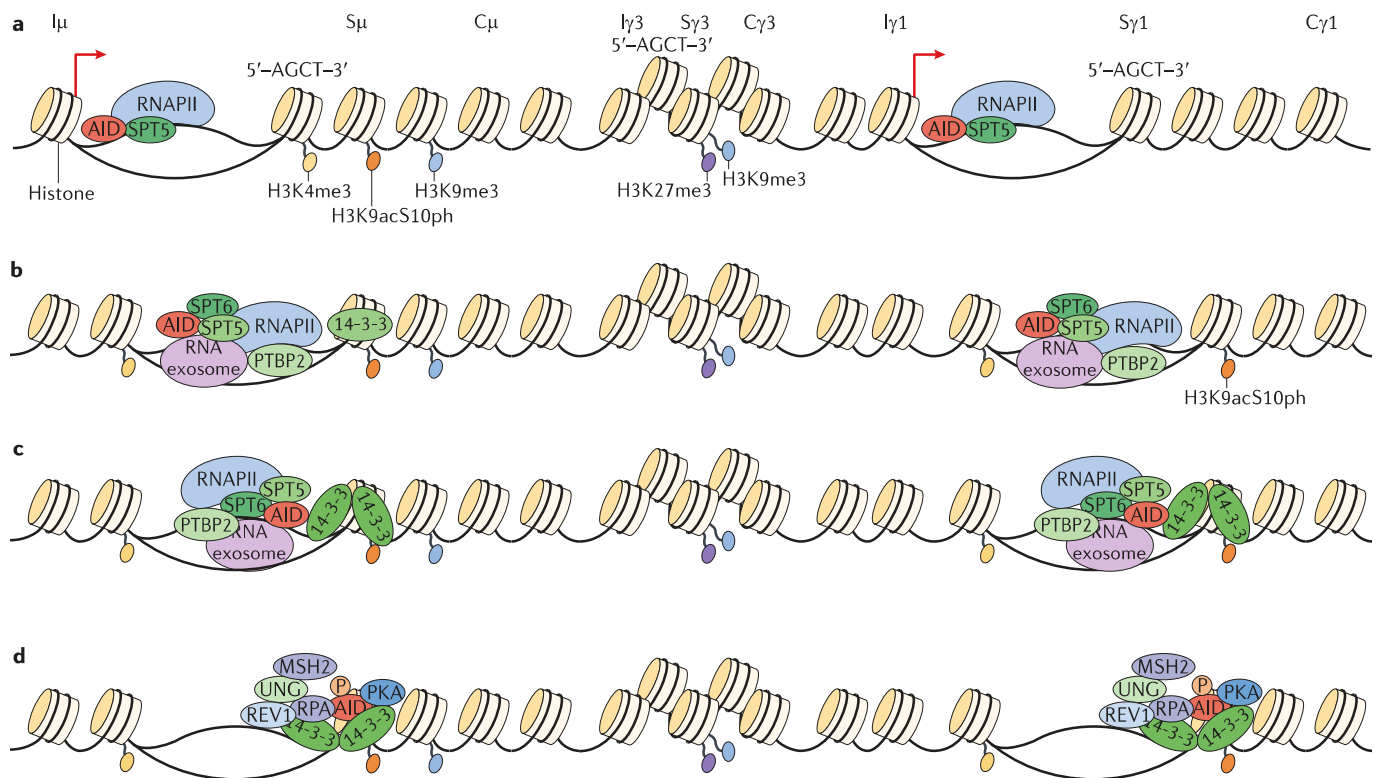


Figure 12 : Transcription et modifications de la chromatine au niveau des régions « switch ».

A. Exemple illustrant un évènement de CSR vers la région $\gamma 1$. L'ARN polymérase II (ARN Pol II) est recrutée au niveau des promoteurs $I\mu$ et $I\gamma 1$ pour assurer la transcription des régions $S\mu$ (donneuse) et $S\gamma 1$ (acceptrice).

B. Durant l'élongation de transcription, l'ARN pol II, complexée à plusieurs protéines comme SPT5, SPT6, PTBP2 et l'ARN exosome, marque une pause. Cette pause a un rôle dans le recrutement et la stabilisation des enzymes de remodelage chromatinien, telles que les complexes d'histone méthyltransférase et d'histone acétyltransférase qui catalysent la triméthylation de l'histone H3 lysine 4 (H3K4me3; ovals jaunes) et l'acétylation de la lysine 9 combinée à la phosphorylation de la sérine 10 dans l'histone H3 (H3K9acS10ph; ovals orange). Ces modifications permissives et la perte de modifications répressives des histones, telles que H3K9me3 (ovales bleu clair) et H3K27me3 (ovales violets), permettent de maintenir un état de chromatine ouvert aux niveaux de $S\mu$ et $S\gamma 1$.

C. Les protéines adaptatrices 14-3-3 sont recrutées et stabilisées par des interactions avec des répétitions 5'-AGCT-3' sur l'ADN et par les marques H3K9acS10ph.

D. Les protéines 14-3-3 participent aussi au recrutement d'AID et à d'autres facteurs essentiels à la CSR comme RPA (« replication protein A »), PKA (« protein kinase A »), UNG et MSH2 (Extrait de Xu et al., 2012).

quadruplexes (G4) qui permettraient de lier AID et de lui servir de guide pour la diriger vers les régions S impliquées dans la CSR (Zheng et al., 2015).

La contribution de l'épissage dans le processus de CSR est essentielle mais les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus et font l'objet d'une partie de mes travaux de thèse présentés dans la partie résultat (**Article 2**).

I.5. La différenciation en cellules B mémoires et en plasmocytes

La réaction du centre germinatif entraîne également la différenciation des LB en cellules B mémoires, qui permettront une réponse adaptative rapide et efficace lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène, ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (pour revue Shlomchik and Weisel, 2012).

I.5.1. Les cellules B mémoires

Les LB mémoires expriment généralement un BCR de haute affinité et sont capables de se différencier rapidement en plasmocytes lors d'une nouvelle agression par le même pathogène ou de former un nouveau GC (**Figure 13**) (Dogan et al., 2009; Good-Jacobson and Shlomchik, 2010).

Chez l'Homme, le CD27 appartenant à la famille des récepteurs TNF (pour « *tumor necrosis factor* ») est un excellent marqueur des LB mémoires (Klein et al., 1998; Tangye et al., 1998). D'autres marqueurs comme CD38, CD73, CD80 et PD-L2 sont également utilisés pour définir des sous-classes de cellules B mémoires (Anderson et al., 2007; Conter et al., 2014; Tomayko et al., 2010; Zuccarino-Catania et al., 2014).

I.5.2. Les plasmocytes

Les plasmocytes (PC pour « *plasma cell* » ou ASC pour « *antibody secreting cells* ») sont générés par différenciation terminale des LB. Au niveau morphologique, ces cellules sont caractérisées par une grande taille et un réticulum endoplasmique (RE) très développé permettant une sécrétion massive d'anticorps. Le marqueur de surface spécifique CD138 et la perte des marqueurs B CD19 et B220 caractérisent cette population (Smith et al., 1996).

La différenciation plasmocytaire débute par une étape de prolifération et des changements morphologiques majeurs. Ces cellules proliférantes nommées plasmablastes ont un phénotype

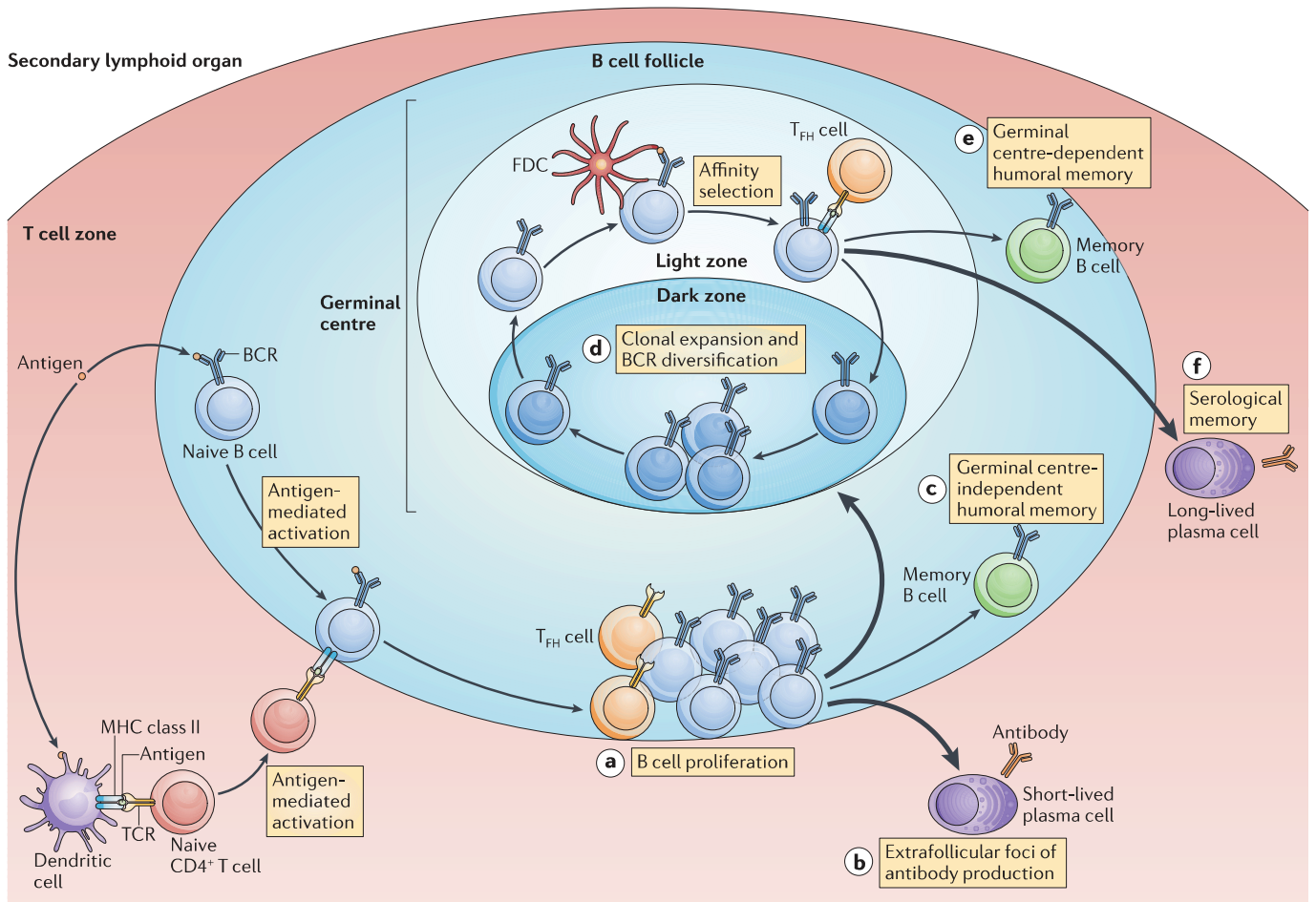


Figure 13 : Réactions folliculaires et extra-folliculaires et différenciation des cellules B.

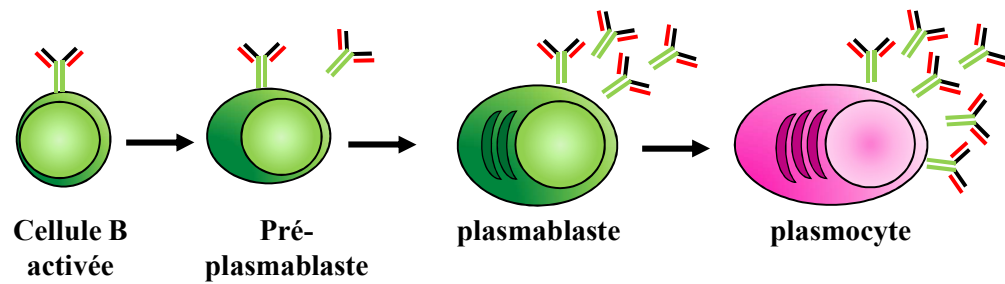
Au sein des organes lymphoïdes secondaires, les LB activés par l'antigène migrent en bordure des follicules B, à proximité de la zone riche en LT, pour établir des interactions stables avec les LT CD4⁺ de même spécificité antigénique. Les cellules B migrent ensuite vers l'extérieur des follicules, où elles subissent une prolifération (a). Certaines cellules B donnent naissance aux foyers extrafolliculaires et se différencient en plasmocytes de courte durée de vie (b) ou en cellules B mémoire indépendantes du GC (c). A l'intérieur du follicule, les cellules B activées subissent de nouveaux cycles de prolifération pour former le GC (d). La réaction du GC, dont les processus de SHM/CSR et de sélection positive ont été décrits Figure 9B, permet la différenciation en cellules B mémoire dépendantes du GC (e) ou en plasmocytes à longue durée de vie (f) (Extrait de Kurosaki et al., 2015).

mixte de blastes exprimant encore des marqueurs de lignage B tels que le BCR, CD80/86, le complexe majeur d'histocompatibilité II et de cellules sécrétrices d'anticorps exprimant CD138 (pour revue Oracki et al., 2010). Les plasmablastes représentent donc un stade intermédiaire entre les cellules B et les plasmocytes. Ils se situent principalement dans la rate, les ganglions lymphatiques, la *lamina propria* et les sites inflammatoires (pour revue Nutt et al., 2015).

L'arrêt de la prolifération des plasmablastes entraîne ensuite leur différenciation en PC dont le devenir dépend en grande partie des sous-populations B dont ils dérivent. Ainsi, les cellules B de la zone marginale (MZ) se différencient principalement en plasmocytes extrafolliculaires à courte durée de vie, sécrétant des anticorps de faible affinité (« *short-lived plasma cell* ») (Gunn and Brewer, 2006; Oliver et al., 1997). En revanche, les cellules B du GC se différencient principalement en PC à longue durée de vie (LLPC pour « *long-lived plasma cell* ») sécrétant des anticorps de haute affinité (**Figure 13**) (Dufaud et al., 2017; McHeyzer-Williams et al., 2011; Mesin et al., 2016; Qi, 2016; Vinuesa et al., 2016). Les LLPCs migrent ensuite dans la moelle osseuse, où ils peuvent survivre au sein de « niches » durant plusieurs années chez la souris voire des décennies chez l'Homme (pour revue Oracki et al., 2010). L'expression du récepteur CXCR4 (pour « *C-X-C motif chemokine receptor 4* ») favorise leur migration vers la moelle osseuse riche en CXCL12 (pour « *C-X-C motif chemokine ligand 12* ») (Hargreaves et al., 2001; Hauser et al., 2002; Nie et al., 2004).

La différenciation plasmocytaire s'accompagne d'une perte d'expression du marqueur d'identité B PAX5 (pour « *paired box 5* ») (Cobaleda et al., 2007), mais également de BCL-6, BACH2 (pour « *BTB domain and CNC homolog 2* ») et d'IRF8 (pour « *interferon regulatory factor 8* ») (Nutt et al., 2015). A l'inverse, cette différenciation stimule l'expression de marqueurs plasmocytaires comme BLIMP-1 (pour « *b-lymphocyte-induced maturation protein 1* »), XBP1 (pour « *X-box binding protein 1* ») et IRF4 (**Figure 14-15**). La fonction de ces principaux acteurs est détaillée ci-dessous :

- **BCL-6** est un facteur de transcription en doigt de zinc fortement exprimé dans les cellules B (Crotty et al., 2010; De Silva and Klein, 2015) et les cellules T_{fh} (Kitano et al., 2011). BCL-6 réprime l'expression de *Blimp-1* empêchant ainsi leur différenciation en PC. A l'inverse, BLIMP-1 réprime l'expression de *Bcl-6* (Shaffer et al., 2002).



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

Figure 14 : Caractéristiques principales de la différenciation plasmocytaire.

Tableau récapitulatif indiquant les principales étapes et modifications (durée de vie, localisation, expression de marqueurs et programme transcriptionnel) qui se produisent lors de la différenciation plasmocytaire (Adapté de Nutt et al., 2015).

- **PAX5** est essentiel pour l'engagement précoce vers le lignage B et le maintien de l'identité B durant le développement (Horcher et al., 2001; Nutt et al., 1999). En effet, PAX5 agit comme un activateur transcriptionnel et stimule l'expression de *CD19*, *CD79a*, *Syk* et *Blnk* qui participent à la signalisation du BCR. PAX5 lie également la région promotrice d'*Aicda* pour activer l'expression d'AID lors de la CSR (Hauser et al., 2016). A l'inverse, PAX5 bloque la différenciation plasmocytaire en réprimant l'expression des gènes impliqués dans la sécrétion d'Ig comme *Xbp-1* (Reimold et al., 1996) et la chaîne J (Wallin et al., 1999, 1998).

- L'expression transitoire et faible d'**IRF4** conduit à l'induction de *Bcl-6* pendant la phase précoce de la formation du GC, tandis qu'une expression soutenue et forte d'IRF4 permet la différenciation plasmocytaire (Klein et al., 2006; Ochiai et al., 2013; Sciammas et al., 2011). IRF4 s'associe notamment avec le facteur de transcription PU.1 pour activer les « *enhancers* » des chaînes légères $Ig\lambda$ et $Ig\kappa$ (Eisenbeis et al., 1995; Pongubala et al., 1993, 1992). Ainsi les souris *Irf4*^{-/-} sont incapables de développer des réponses anticorps et présentent un blocage de la différenciation plasmocytaire dans le GC (Mittrücker et al., 1997).

- **BLIMP-1** est un facteur de transcription en doigt de zinc codé par le gène *Prdm1*. BLIMP-1 peut agir comme un répresseur transcriptionnel et réprimer l'expression des gènes *c-Myc*, *Bcl-6* ou *Pax5* (Lin et al., 2002, 1997; Shaffer et al., 2002). A l'inverse, BLIMP-1 stimule la transcription de *Xbp-1* pour permettre l'activation du programme de différenciation plasmocytaire (Klein et al., 2006; Lin et al., 2002; Reimold et al., 2001, 2001; Shaffer et al., 2004). A noter que BLIMP-1 n'est pas indispensable pour l'engagement initial de la différenciation des PCs (Kallies et al., 2007). En effet, des quantités non négligeables d'Ig sont détectées dans des souris *Rag1*^{-/-} reconstituées par des cellules B *Blimp1*^{-/-}.

- **XBP-1** (pour « *X-box-binding protein-1* ») a été démontrée comme un acteur essentiel dans la différenciation PC par l'analyse des lymphocytes déficients en *Xbp-1* (Reimold et al., 2001). Il est impliqué dans la réponse UPR (pour « *unfolded protein response* ») qui permet d'augmenter la capacité de production des anticorps (Reimold et al., 1996; Shaffer et al., 2004). En effet, XBP-1 induit l'expression de

gènes impliqués dans l'adressage des protéines vers le réticulum endoplasmique (RE), le repliement, la dégradation des protéines mal repliées, la glycosylation, le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi, et l'adressage des vésicules sécrétoires vers la membrane plasmique (Shaffer et al., 2004). De façon analogue à BLIMP-1, une différenciation en plasmocytes est possible en absence d'XBP-1 mais ces derniers présentent un RE peu développé et un déficit majeur de sécrétion d'Ig (Taubenheim et al., 2012).

Ainsi, l'analyse des profils d'expression de *Pax5*, *Xbp-1* et *Blimp-1* permet d'apprécier l'engagement vers un programme de différenciation plasmocytaire (Recaldin and Fear, 2016). Les PC expriment également des facteurs anti-apoptotiques comme MCL-1, BCL-2, BCLx1, BIM et BCLw (Chevrier et al., 2014; Tellier and Nutt, 2019; Wang and Bhattacharya, 2014) et, à l'inverse, présentent une expression diminuée des facteurs pro-apoptotiques BAX et BID (Carrington et al., 2010; Peperzak et al., 2013; Strasser et al., 1991).

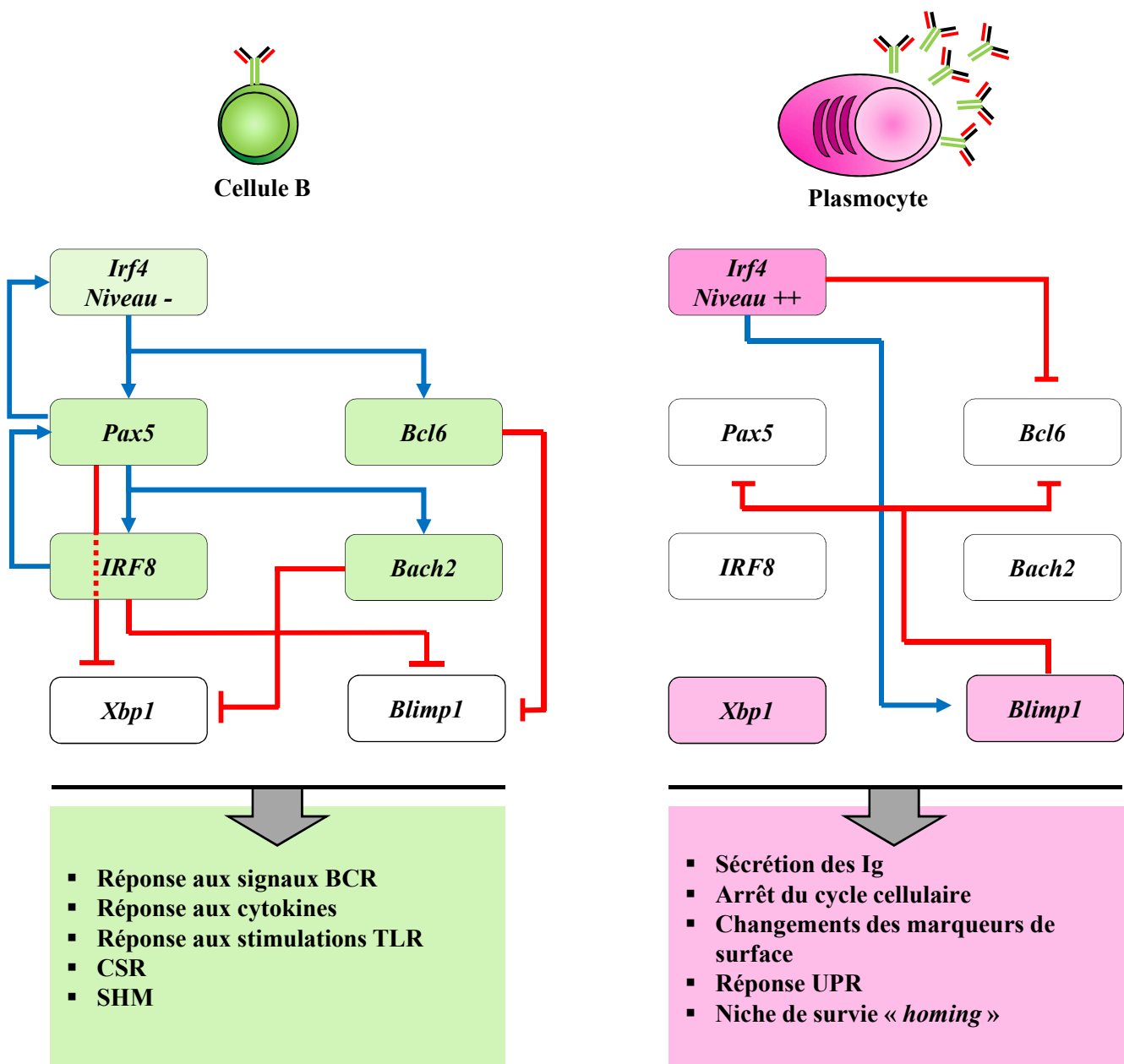


Figure 15 : Régulation transcriptionnelle au cours de la différenciation plasmocytaire.

Représentation schématique des interactions entre les principaux facteurs impliqués dans la différenciation des cellules B activées (gauche) en plasmocytes (droite). Les lignes indiquent une interaction directe des facteurs de transcription avec les séquences régulatrices des gènes cibles, entraînant une activation (bleu) ou une inhibition (rouge) transcriptionnelle. Les gènes fortement exprimés sont en couleur, tandis que les gènes exprimés à de faibles niveaux (voire pas du tout) sont en blanc. A noter que Pax5 active Irf8 et Bach2, et que ces 3 facteurs inhibent Xbp1 et Blimp1. De plus, le facteur de transcription Bcl6 réprime Blimp1, et en retour ce dernier inhibe l'expression des gènes Pax5 et Bcl6 impliqués dans le maintien de l'identité B (Adapté de Nutt et al., 2015).

(*Bach2*, *BTB and CNC homologue 2*; *Bcl6*, *B cell lymphoma 6*; *Blimp1*, *B lymphocyte-induced maturation protein 1*; *Irf*, *interferon-regulatory factor*; *Pax5*, *paired box protein 5*; *Xbp1*, *X box-binding protein 1*)

I.6. Le Myélome Multiple

I.6.1. Caractéristiques de la maladie

La prolifération incontrôlée d'un clone plasmocytaire dans la moelle osseuse est à l'origine du myélome multiple (MM). En France, on recense 5000 nouveaux cas par an dont 54% chez l'homme. Le MM représente environ 2% de l'ensemble des cancers et entre 10-12% des hémopathies malignes. L'âge médian au diagnostic est de 70 ans chez les hommes et de 74 ans chez les femmes (Kyle et al., 2003; Lin et al., 2004). En 2005, la survie relative à 5 ans était environ de 40 % (Fonseca et al., 2009). Bien que le pronostic ne cesse de s'améliorer, le MM reste une maladie biologiquement hétérogène, avec des résultats de survie variant de moins d'un an à plus de 10 ans (Franssen et al., 2019; Kumar et al., 2018; pour revue LeBlanc et al., 2019). Cette amélioration de la survie a également été observée aux États-Unis et dans d'autres pays développés (Cowan et al., 2018; Siegel et al., 2019). Elle est due à une augmentation de l'utilisation de la greffe autologue de cellules souches pour les patients éligibles et à la disponibilité de nouvelles thérapies anti-myélome (Fonseca et al., 2017). On compte parmi ces nouvelles thérapies émergentes les immunothérapies, dont les IMiDs (pour « *immunomodulatory drugs* ») comme par exemple le Ibrdomide (en phase II), les Ac monoclonaux (anti-CD38) ou bispécifiques (BCMA-CD3), les ADC (pour « *antibody drug conjugate* ») comme le Belantamab en phase III, et enfin, les CAR-T cells (pour « *chimeric antigen receptor T cell* ») avec le bb2121 ou le JNJ4528, tous deux en phase III (Gazeau and Manier, 2020).

Les cellules de myélome sont principalement de type post-GC avec de nombreuses SHM dans leurs parties variables et une grande proportion des cellules ayant subi la CSR. Le MM s'accompagne donc le plus souvent d'une production élevée d'Ig monoclonales de type IgG ou IgA, très rarement IgD et exceptionnellement IgE ou IgM. En effet, seulement 1% des MM sont de types IgM (Kuehl and Bergsagel, 2012). Des anomalies de la chaîne lourde (mutation, translocation...) peuvent entraîner également une sécrétion de chaînes légères seules (de type Igλ ou Igκ).

La prolifération médullaire du clone tumoral perturbe l'hématopoïèse et entraîne une augmentation de la résorption ostéoclastique avec une inhibition de l'ostéoformation. La maladie peut ainsi provoquer des complications osseuses, une hypercalcémie avec des manifestations cliniques de complications neurologiques, des infections, ainsi qu'une insuffisance rénale, une amylose ou un syndrome d'hyperviscosité lié à l'excès d'Ig

monoclonales. Dans la grande majorité des cas, l'origine du myélome est inconnue bien que des facteurs génétiques et environnementaux soient impliqués.

Le MM est généralement précédé par une tumeur bénigne nommée MGUS (pour « *monoclonal gammopathy of undetermined significance* ») (**Figure 16**), qui est présente chez 1% des adultes de plus de 25 ans (Röllig et al., 2015). Les sujets porteurs d'une MGUS présentent un pic monoclonal peu élevé (<30g/l) avec un myélogramme contenant moins de 10 % de plasmocytes, sans signes osseux et sans insuffisance rénale. La fréquence des MGUS augmente avec l'âge et on les retrouve chez 6,1 % des sujets de plus de 70 ans. Certaines restent stables pendant des années, d'autres se transforment en myélome au bout d'un temps variable. Le risque de transformation en myélome d'une MGUS est de 1 % par an. Il est actuellement impossible de prédire la transformation en MM, d'où la nécessité d'une surveillance tous les 6 à 12 mois basée sur : un examen clinique, une électrophorèse des protéines sériques, une évaluation de la protéinurie sur 24 heures et une électrophorèse des protéines urinaires.

Outre la présence d'un taux de PC > 10% dans la moelle, le diagnostic du MM repose sur des critères supplémentaires regroupés sous la dénomination « CRAB ». Ils comprennent : l'hypercalcémie (concentration de calcium sérique supérieure à la limite normale, > 2,75 mmol/L), l'insuffisance rénale (clairance de la créatinine < 40 mL/min ou une créatinine sérique > 177 µmol/L), l'anémie (valeur d'hémoglobine inférieure à la limite normale, <10 g/dL), des lésions osseuses lytiques observables en radiographie ou en tomodensitométrie ou une immunodéficience (International Myeloma Working Group, 2003).

Bien que le MM soit considéré comme une maladie unique, il comprend plusieurs entités sur le plan cytogénétique. Ainsi, les cellules de myélome peuvent héberger des translocations chromosomiques au niveau de leurs gènes d'Ig suite à des erreurs lors du processus de recombinaisons V(D)J, de SHM ou de CSR. Les trisomies et les translocations IgH (14q32) sont considérées comme des anomalies cytogénétiques primaires retrouvées dès le stade MGUS. D'autres translocations impliquent également les loci de chaînes légères Igκ (2p12) et Igλ (22q11). Les translocations IgH peuvent modifier l'expression d'une variété d'oncogènes en les mettant sous le contrôle des éléments régulateurs forts, comme l'enhancer Eμ et la région 3'RR au locus IgH (Walker et al., 2013). Ces translocations peuvent impliquer cycline D1 (11q13, la plus commune), FGFR3 (4p16.3), cycline D3 (6p21), c-maf (16q23) et mafB (20q11) (Avet-Loiseau et al., 2007; Facon et al., 2001; Walker et al., 2013).

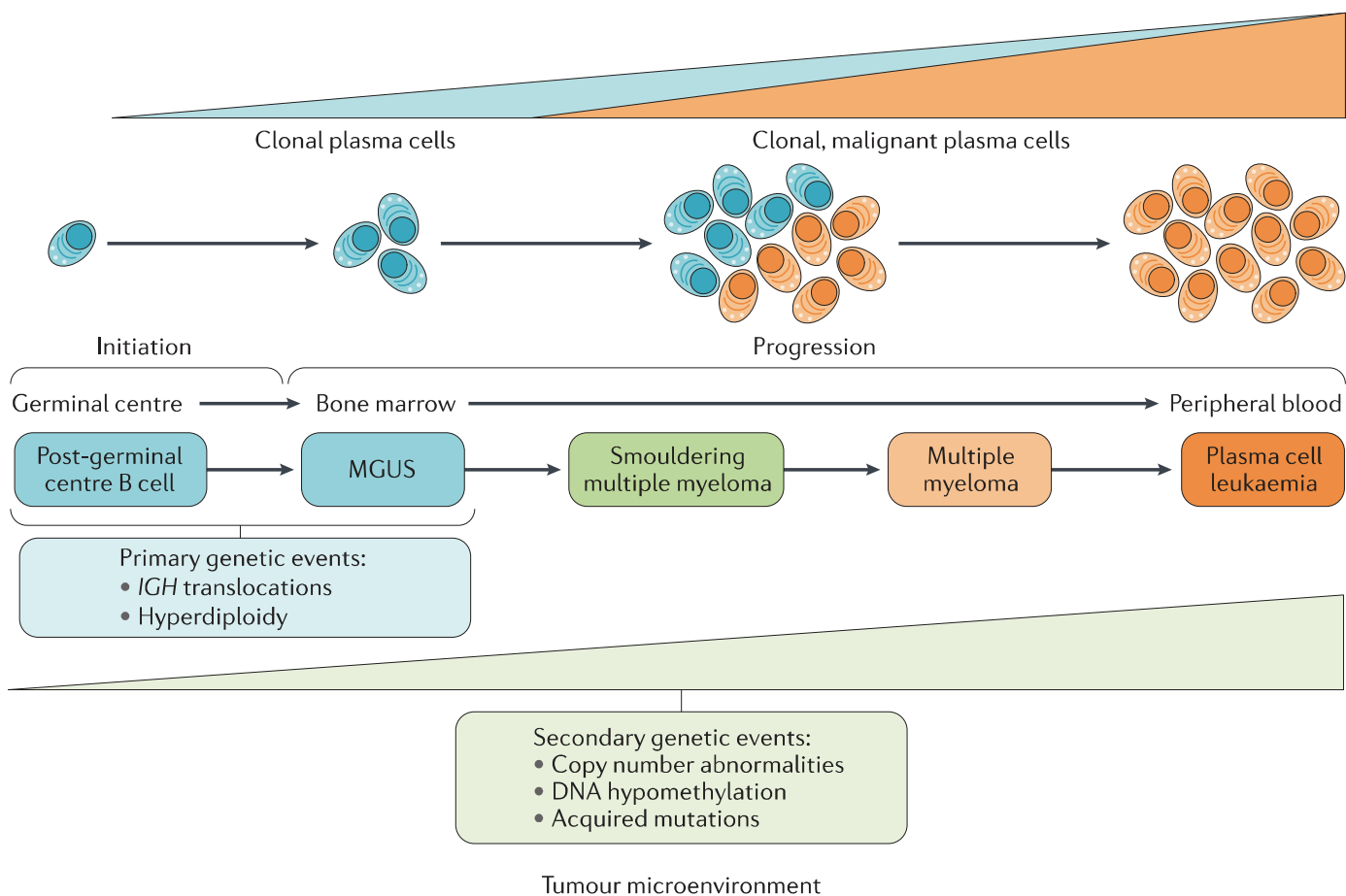


Figure 16 : Progression vers le développement du Myélome Multiple (MM).

Le développement du MM, à partir d'une cellule B post-GC, est un processus en plusieurs étapes qui commence par des états indolents, tels que MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) et le SMM (Smouldering Multiple Myeloma). La progression vers le MM se traduit par une accumulation importante de clones plasmocytaires dans la moelle osseuse et l'apparition des premiers signes cliniques. Le MM peut ensuite évoluer vers des maladies indépendantes de la moelle osseuse, comme le myélome extramédullaire et la leucémie à plasmocytes. Les événements génétiques primaires sont constatés dès le stade MGUS et incluent notamment les translocations chromosomiques impliquant le locus IgH et l'hyperdiploïdie. La grande instabilité génétique du MM provoque des altérations génétiques secondaires (mutations activatrices de NRAS et KRAS, dérégulations de c-Myc et Bcl-2, délétions de TP53 ...) qui augmentent au cours de l'évolution de cette pathologie (D'après Kumar et al., 2017).

Actuellement, le traitement usuel des patients MM de moins de 65 ans est la chimiothérapie suivie d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT pour « *Haematopoietic Stem Cell Transplantation* »). Le traitement d'induction, court (3-4 cycles), vise à diminuer la masse tumorale. Les cellules souches hématopoïétiques sont ensuite prélevées dans le sang périphérique par 1 ou 2 cytophères après stimulation par le G-CSF (pour « *granulocyte-colony stimulating factor* »). L'arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement du MM repose sur l'administration combinée d'agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide), de corticostéroïdes (prednisone, dexaméthasone), d'immunomodulateurs (thalidomide, lénalidomide, pomalidomide) et d'inhibiteurs du protéasome (bortézomib, carfilzomib, ixazomib). Une exacerbation du stress protéique et l'induction d'une réponse UPR terminale pourraient expliquer la forte sensibilité des cellules de MM aux traitements par inhibiteurs du protéasome (Meister et al., 2007; Zhou et al., 2014). La plupart de ces chimiothérapies sont relativement inefficaces si elles sont administrées seules (Kyle et al., 2003; Moreau et al., 2012). Des Ac monoclonaux comme l'élotuzumab et le daratumumab ciblant respectivement SLAMF7 et CD38 sont récemment venus compléter cet arsenal thérapeutique avec des résultats très prometteurs.

I.6.2. Mécanismes d'action du Bortezomib dans le traitement du MM

Le Bortezomib (Bz) est un inhibiteur du protéasome utilisé depuis de nombreuses années chez les patients atteints de MM. Depuis, de nouvelles générations d'inhibiteurs comme le Carfilzomib et l'Ixazomib sont venus compléter l'arsenal thérapeutique.

Le système ubiquitine/protéasome UPS (pour « *ubiquitin proteasome system* ») est un des principaux systèmes de dégradation des protéines intracellulaires et fait partie de la voie ERAD (pour « *ER associated degradation* ») (Bernasconi and Molinari, 2011; Guerriero and Brodsky, 2012; Hirsch et al., 2009). Il est responsable de la dégradation des protéines mal repliées, endommagées, incomplètes ou non nécessaires présentant un greffage précis d'ubiquitine (Arrigo et al., 1988; Hershko et al., 1983; Hough et al., 1987, 1986; Wilk and Orłowski, 1980). Physiologiquement, le système UPS a un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes comme la régulation du stress du RE, la progression du cycle cellulaire, le maintien de l'intégrité du génome, l'apoptose et les réponses immunes (Bassermann et al., 2014; Ben-Neriah, 2002; Hershko and Ciechanover, 1998; Peters, 2002).

Le protéasome 26S est un complexe multi-protéique de 2,4 MDa, composé d'une partie centrale catalytique 20S et de deux extrémités régulatrices 19S comportant une base et un

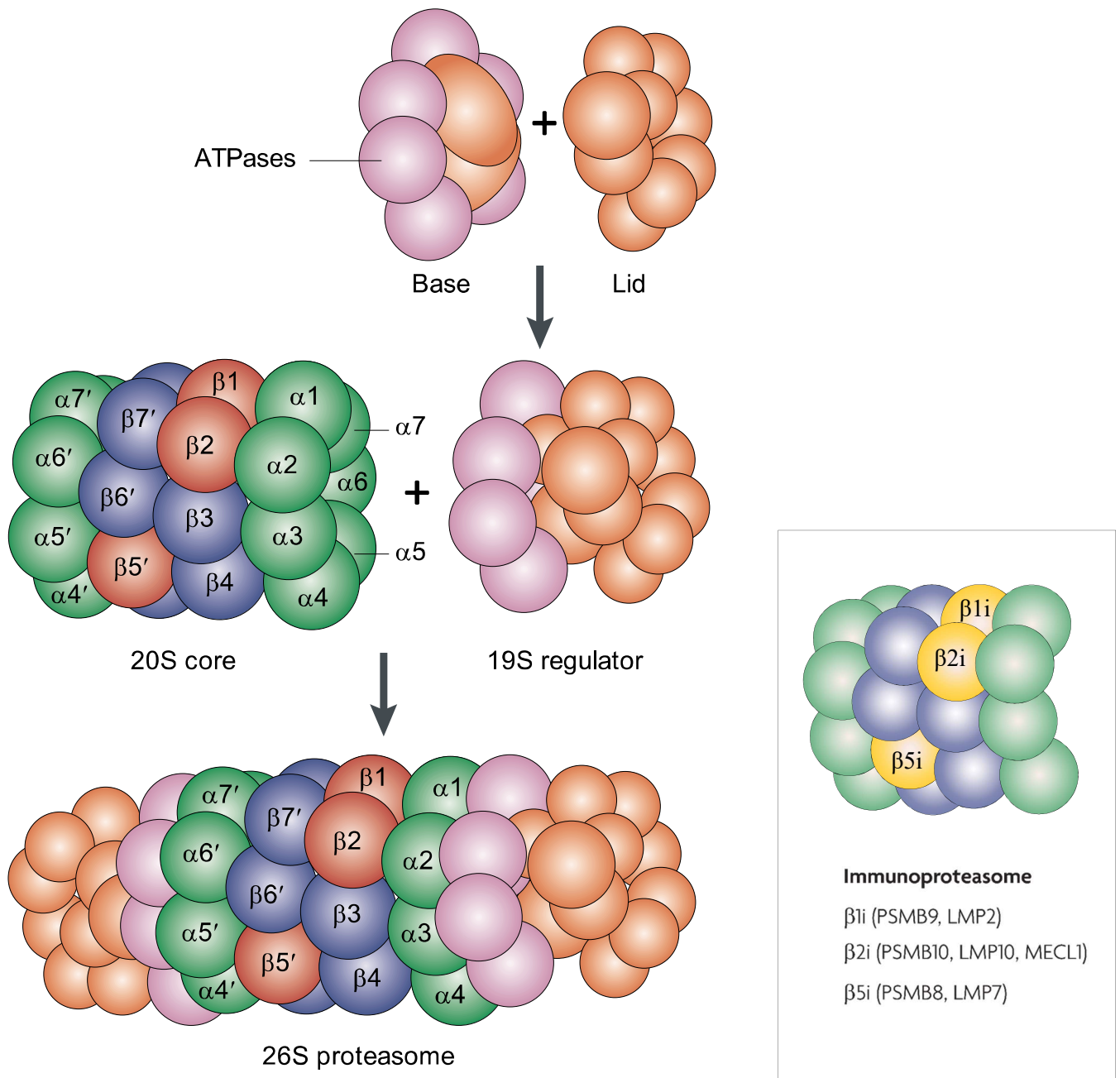


Figure 17 : Composition du protéasome.

Le protéasome 20S se compose de 28 sous-unités de 21 à 31 kDa, qui sont disposées en quatre anneaux heptamériques. Les deux anneaux externes contiennent les sous-unités α ($\alpha 1$ à $\alpha 7$ et $\alpha 1'$ à $\alpha 7'$, en vert), dont les terminaisons N-ter obstruent l'ouverture centrale du cylindre. Les deux anneaux internes contiennent les sous-unités β ($\beta 1$ à $\beta 7$ ou $\beta 1'$ à $\beta 7'$, bleu et rouge), dont trois ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$; rouge) abritent les sites actifs. La sous-unité 19S comprend deux sous-structures. La base, qui s'attache aux deux anneaux α , est composée de six sous-unités avec des activités ATPase (rose) et de deux sous-unités structurales sans activités enzymatiques (orange). Le couvercle (« Lid »), qui contient jusqu'à dix sous-unités (orange), est responsable de la liaison du substrat. L'encart à droite décrit la composition des sous-unités des sites actifs du protéasome constitutif et de l'immunoprotéasome. Les sous-unités protéolytiques du protéasome constitutif sont $\beta 1$ (également connu sous le nom de PsMB6), $\beta 2$ (ou PsMB7) et $\beta 5$ (ou PsMB5). Les sous-unités de l'immunoprotéasome protéolytique sont $\beta 1i$ (également connu sous le nom de PsMB9 et LMP2), $\beta 2i$ (ou PsMB10 ; LMP10) et $\beta 5i$ (ou PsMB8 ; LMP7) (jaune). Comparé au protéasome constitutif, l'immunoprotéasome a une activité de type caspase fortement diminuée et une activité de type chymotrypsine accrue (D'après Kloetzel, 2001).

couvercle (**Figure 17**). La dégradation des protéines par le protéasome dépend de l'ubiquitine et nécessite plusieurs étapes : (1) la liaison des protéines ubiquitinylées à la sous-unité 19S et leur dépliement, (2) l'ouverture du pore de la sous-unité 20S, (3) la translocation des protéines dans la chambre catalytique, (4) la déubiquitinylation, et enfin (5) la dégradation. Le protéasome possède une structure en cylindre creux composée de 4 anneaux hétéroheptamériques identiques 2 à 2. Les 7 sous-unités des anneaux présentent des homologies de séquences et peuvent être divisées en deux groupes : les sous-unités α qui forment les anneaux externes du cylindre et les sous-unités β qui composent les anneaux internes et portent les activités catalytiques. Les extrémités N-terminales des sous-unités α agissent comme une porte d'entrée en se repliant dans le pore central et en obstruant l'accès aux sites protéolytiques situés sur les sous-unités β . Ce mécanisme de passage permet de réguler le débit et protège les dégradations non régulées de protéines (Groll et al., 2000; Köhler et al., 2001). L'activité catalytique est portée par six sous-unités β actives, réparties par 3 sur chaque anneau β et qui reconnaissant des substrats différents. Ces multiples sites catalytiques aux spécificités variables permettent la dégradation rapide et complète des protéines cellulaires : le site $\beta 5$ de type chymotrypsine clive préférentiellement les résidus hydrophobes, le site $\beta 2$ de type trypsine clive préférentiellement les résidus basiques et le site $\beta 1$ de type caspase clive préférentiellement les résidus acides (Arendt and Hochstrasser, 1997; Voges et al., 1999).

Les cellules immunitaires expriment de manière constitutive des sous-unités catalytiques alternatives β avec des sites modifiés. Les sites $\beta 1c$, $\beta 2c$ et $\beta 3c$ (c pour « *constitutive* ») de la sous-unité 20S, sont remplacés par les sites : $\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL-1 et $\beta 5i$ /LMP7. Le protéasome est alors appelé immunoprotéasome (**Figure 17 encadré à droite**) (Tanaka, 1994). Il sert à générer des peptides ligands adaptés pour les molécules du CMH de classe I (ou MHCI pour « *Major Histocompatibility Complex Class I* ») qui permettent la surveillance immunitaire (Rock and Goldberg, 1999; Van Kaer et al., 1994). Par exemple, la sous-unité $\beta 1i$ /LMP2 n'a pas d'activité de type caspase comme son homologue $\beta 1c$, en revanche, elle clive préférentiellement après des résidus hydrophobes. Cette activité spécifique permet de générer des peptides ligands de huit à neuf acides aminés avec un résidu d'ancrage hydrophobe ou basique à l'extrémité C-ter qui permet une liaison de haute affinité avec le CMHI (Groll and Huber, 2004; Rock and Goldberg, 1999).

Le protéasome 26S est également impliqué dans l'activation de la voie NF κ B (pour « *nuclear factor- κ B* ») au cours du développement B et des réactions inflammatoires. La voie NF κ B apparaît fréquemment dérégulée dans de nombreux cancers dans lesquels son

activation constitutive peut conduire à l'expression de gènes anti-apoptotiques comme *Bcl-2* (Chen et al., 2000; Wang et al., 1998; Zong et al., 1999). A l'état basal, les sous-unités inhibitrices I κ B lient et séquestrent des dimères comme par exemple NF κ B1/RelA (p50/p65) dans le cytoplasme (Baldwin, 2001). Lors d'une activation, le complexe I κ B kinase (IKK) phosphoryle I κ B conduisant à son ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi NF κ B1/RelA qui peut alors migrer dans le noyau pour activer ses gènes cibles (Chen et al., 1995; Scherer et al., 1995; Spencer et al., 1999; Winston et al., 1999).

Le Bz est un inhibiteur réversible dipeptidique de l'activité endopeptidase de type chymotrypsine du protéasome 26S, en se liant à la sous-unité β 5 et β 1. L'atome de bore du Bz se lie au site catalytique actif du protéasome 26S avec une affinité et une spécificité élevée bloquant ainsi l'activité de dégradation (Kale and Moore, 2012; Kawamura et al., 2013). Aux doses thérapeutiques, le Bz inhibe la dégradation par le protéasome d'environ 30% mais cela est suffisant pour induire l'apoptose des cellules de myélome sans provoquer de toxicité majeure sur les cellules saines (Adams, 2001).

Plusieurs mécanismes d'action peuvent expliquer les effets toxiques du Bz sur les cellules de myélome. D'une part, l'inhibition du protéasome peut stabiliser le complexe NF κ B1/RelA dans le cytoplasme en empêchant la dégradation d'I κ B, réduisant ainsi la signalisation NF κ B impliquée dans la survie et la prolifération des cellules de myélome (Hideshima et al., 2002). D'autre part, l'inhibition du protéasome peut stabiliser plusieurs suppresseurs de tumeurs, notamment p27 ou p53, et empêcher la progression du cycle cellulaire (Chen et al., 2007). Enfin, le Bz peut inhiber l'élimination des protéines mal repliées et provoquer l'apoptose par exacerbation du stress du RE dans les cellules de myélome. En effet, ces cellules sécrétant des quantités importantes d'Ig sont dépendantes du fonctionnement optimal du protéasome et du système ERAD pour maintenir l'homéostasie protéique (Chhabra, 2017). Ainsi, le traitement Bz peut entraîner une accumulation de protéines mal repliées, dont une quantité considérable de chaînes d'Ig, et induire l'apoptose via l'activation de la kinase JNK (pour « *c-Jun N-terminal kinase* ») médiée par CHOP (pour revue Guang et al., 2019; Zhou et al., 2014). Dans ce sens, plusieurs études menées au laboratoire ont révélé qu'une accumulation d'Ig aberrantes, dépourvues de domaine C_{H1} rendait les plasmocytes hautement sensibles au bortézomib (Bender et al., 2018; Bonaud et al., 2015).

Malgré l'efficacité du Bz dans le traitement du MM, des phénomènes de résistance peuvent survenir chez les patients initialement répondeurs. Les mécanismes de résistance peuvent être la conséquence de modifications dans l'expression et la composition des sous-unités du protéasome. Par exemple, des mutations de la sous-unité β 5 ont été rapportées comme induisant

des résistances dans les lignées de MM, même si de telles mutations n'ont pas encore été observées chez les patients (Lü et al., 2008; Oerlemans et al., 2008). A l'échelle transcriptomique, les cellules de myélome résistantes au Bz présentent une expression élevée de Bcl-2 et de protéines chaperonnes (HSP27, HSP70 et HSP90), favorisant ainsi la survie et l'adaptation au stress du RE provoqué par le traitement (Smith et al., 2011; Zhu et al., 2011). Enfin, les cellules du microenvironnement tumoral pourraient jouer un rôle important dans la résistance au Bz, en modifiant leur profil d'expression afin de synthétiser des cytokines ou d'autres facteurs impliqués dans la survie des cellules de myélome (Hao et al., 2011).

Partie II. Sécrétion d'Ig et maintien de l'homéostasie protéique

II.1. La réponse UPR et le stress du RE

Les PC produisent généralement un taux d'Ig compris entre ~ 10 et 1000, celui-ci pouvant atteindre ~10000 molécules d'Ig / cellule / seconde, ce qui correspond à ~0,2 à 22 pg / cellule / jour (Corti et al., 2011; Corti and Lanzavecchia, 2014; Eyer et al., 2017a; Helmreich et al., 1961; Hibi and Dosch, 1986; Lanzavecchia, 2018). Cette synthèse massive déclenche un stress du RE et l'activation de voies de signalisation visant à maintenir l'homéostasie protéique (« protéostasie ») intracellulaire. La survie de ces cellules sécrétrices professionnelles est par conséquent intimement liée à l'activation de l'UPR (pour « *unfolded protein response* ») et, en cas de stress protéique prolongé, un processus apoptotique peut entraîner la mort des PC (Gass et al., 2004; Harding et al., 2002; Janssens et al., 2014).

L'UPR a pour fonction de maintenir la protéostasie en augmentant l'expression de protéines chaperonnes pour favoriser le repliement et l'assemblage des protéines nouvellement synthétisées (Gass et al., 2004) et en stimulant la dégradation des protéines aberrantes par la voie ERAD (pour « *ER associated degradation* »). L'UPR comprend 3 voies distinctes : (1) la voie IRE1 α (pour « *inositol-requiring enzyme 1 α* »), (2) la voie ATF6 (pour « *activating transcription factor 6* ») et (3) la voie PERK (pour « *RNA-dependent protein kinase (PRK)-like Endoplasmique Reticulum (ER) kinase* ») (**Figure 18**) (pour revue Hetz et al., 2020). Nous détaillerons ensuite l'activation précoce de la voie mTOR pour contrer le stress de RE dans les PC.

II.1.1. La voie IRE1 α

La voie IRE1 α /XBP1 joue un rôle crucial lors de la différenciation plasmocytaire et permet d'améliorer la capacité de sécrétion des cellules tout en maintenant l'homéostasie du RE (**Figure 18a**).

Les deux isoformes IRE1 α et IRE1 β sont des protéines transmembranaires du RE (Chen and Brandizzi, 2013). Des souris déficientes en IRE1 α ne survivent pas au stade embryonnaire tandis que l'extinction de IRE1 β n'induit pas d'anomalies phénotypiques majeures chez les

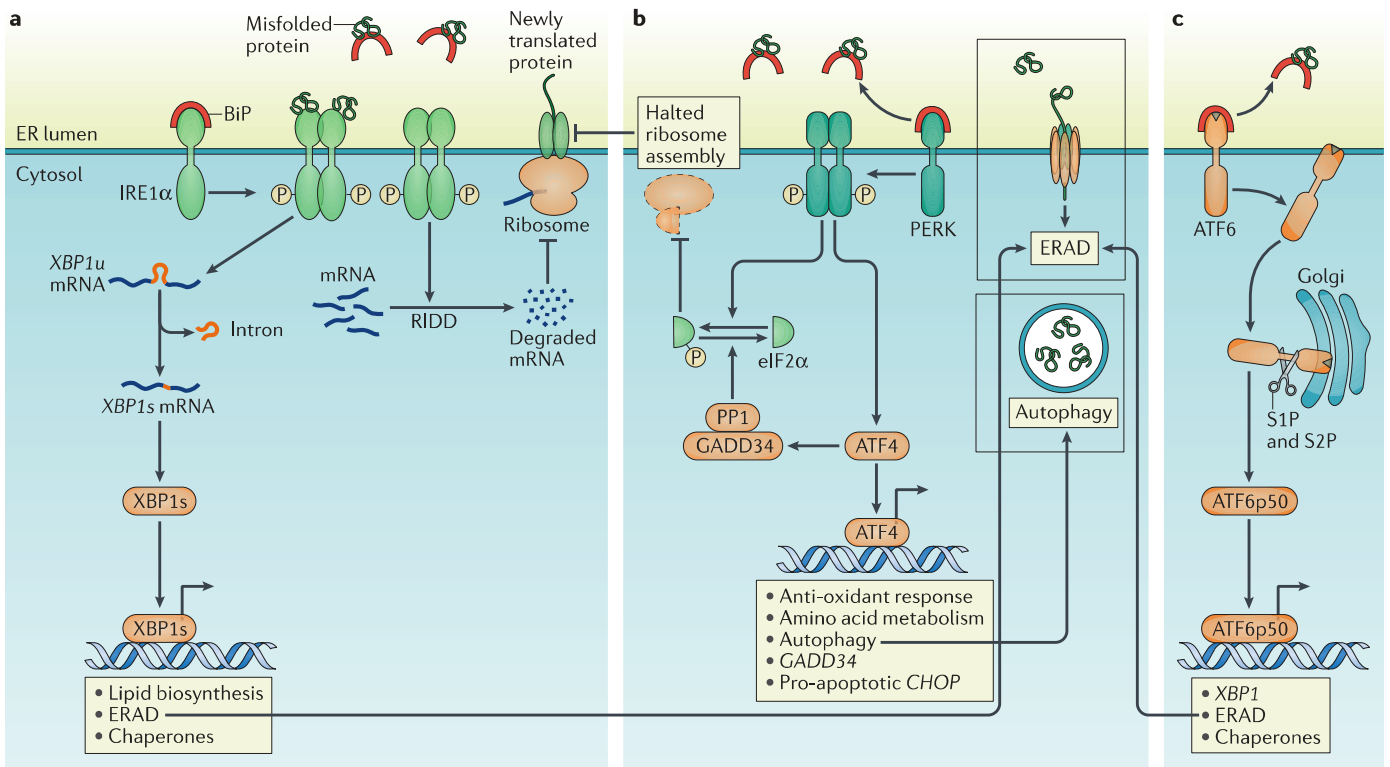


Figure 18 : La réponse aux protéines mal repliées ou UPR.

L'UPR implique trois voies principales : IRE1, ATF6 et PERK. En absence de stress du réticulum endoplasmique (RE), ces molécules s'associent avec la protéine chaperonne BiP. Suite à l'accumulation des protéines mal repliées dans le RE, l'interaction préférentielle de BiP avec ces protéines aberrantes permet une oligomérisation activatrice des facteurs PERK, ATF6 et IRE1.

(a) La dissociation de BiP de IRE1 α , ou la liaison directe de protéines mal repliées sur ce dernier, active le domaine endoribonucléase de IRE1 α . Ce domaine cytosolique assure notamment l'épissage non conventionnel de l'ARNm Xbp1u (pour « unspliced X-box binding protein 1 ») en Xbp1s (s pour « spliced ») qui active alors la transcription de chaperonnes et d'acteurs de l'ERAD (ER-associated degradation). IRE1 α participe également à la dégradation d'ARNm par le système RIDD (regulated IRE1 α -dependent decay) pour réduire la charge protéique du RE.

(b) L'activation de la voie PERK aboutit à la phosphorylation de eIF2 α qui provoque une inhibition de la traduction en perturbant l'assemblage des ribosomes, permettant ainsi aux cellules de diminuer le stress du RE de manière temporaire. ATF4 (Activating Transcription Factor 4) échappe quant à lui à cette inhibition, et induit notamment la transcription de gènes qui favorisent la survie et l'autophagie. Lorsque le stress du RE diminue, eIF2 α est déphosphorylé par le complexe GADD34/PP1 pour restaurer la traduction des protéines. Cependant, en cas de stress prolongé, ATF4 peut activer la transcription de CHOP (C/EBP homologous protein) pour induire l'apoptose.

(c) Lorsque BiP se dissocie d'ATF6, celui-ci se déplace vers l'appareil de Golgi où il est coupé par les protéases S1P et S2P (site 1 or 2 protease) pour produire un fragment p50 cytosolique. ATF6p50 stimule la transcription d'XBP1, de protéines chaperonnes et de facteurs de l'ERAD. Ainsi, de nombreuses connexions existent entre les 3 voies majeures de l'UPR et la dissociation de BiP joue un rôle central dans leur activation (D'après Grootjans et al., 2016).

souris adultes. En effet, leur profil d'expression varie, avec une expression ubiquitaire d'IRE1 α et restreinte à l'épithélium muqueux pulmonaire et au tractus gastro-intestinal pour l'isoforme β (Iwawaki et al., 2009; Tsuru et al., 2013). La partie N-terminale d'IRE1 α , localisée dans la lumière du RE, possède un domaine de liaison à BIP (pour « *binding immunoglobulin protein* » ou GRP78 pour « *78kDa Glucose-Regulated Protein* ») et un domaine d'activité sérine/thréonine kinase. L'activité endoribonucléase est quant à elle située sur la partie C-terminale cytoplasmique.

En absence de stress du RE, IRE1 α est maintenue inactive par association à la protéine chaperonne BIP dans la lumière du RE. En revanche, l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE entraîne la dissociation de BIP pour prendre en charge ces protéines anormales et une oligomérisation immédiate d'IRE1 α s'accompagnant d'une autophosphorylation de son domaine kinase (Hetz, 2012; Shamu and Walter, 1996). Ce changement de conformation stimule l'activité RNase d'IRE1 α , provoquant une excision de 26 nucléotides de l'ARNm d'XBP1 (Xbp1u pour « *unspliced* ») pour générer le variant XBP1s (s pour « *spliced* »). XBP1s est une protéine de 371 acides aminés beaucoup plus stable que l'isoforme XBP1 de 267 acides aminés, leur demi-vie étant respectivement de 22 et 11 min (pour revue He et al., 2018). Le décalage du cadre de lecture consécutif à cet épissage non conventionnel induit également l'apparition d'un nouveau domaine de transactivation dans la partie C-Ter d'XBP1s (Calfon et al., 2002; He et al., 2010; Hetz, 2012). L'expression du variant XBP1s permet de restaurer l'homéostasie du RE en activant la transcription de gènes de l'UPR comme les chaperonnes ERDJ4/DNAJB9 (pour « *DnaJ/Hsp40 homolog subfamily B member 9* ») et P58IPK/DNAJC3 (pour « *DnaJ/Hsp40 homolog subfamily C member 3* ») impliquées dans le repliement protéique (Shaffer et al., 2004), et de facteurs impliqués dans l'ERAD comme EDEM1 (pour « *ER degradation enhance mannosidase alphaslike 1* ») (pour revue Needham et al., 2019).

L'activité RNase d'IRE1 α permet également de cliver et d'inactiver son propre ARNm pour contrôler son expression (Tirasophon et al., 1998). Cette autorégulation est nécessaire à la survie cellulaire, car une production continue d'IRE1 α entraîne une activation permanente de l'UPR et un retard de la croissance cellulaire (Shamu and Walter, 1996; Tirasophon et al., 1998). De façon intéressante, l'activité RNase d'IRE1 α agit sur de nombreux transcrits par le mécanisme RIDD (pour « *regulated IRE1-dependent decay* ») (Coelho and Domingos, 2014; Hollien et al., 2009; Hollien and Weissman, 2006). Plusieurs études ont montré que les substrats dégradés par RIDD avaient une structure particulière composée de 2 boucles présentant une séquence consensus CUGCAG (Calfon et al., 2002; Han et al., 2009; Hollien et al., 2009; Moore and Hollien, 2015; Oikawa et al., 2010; So et al., 2015). Le système RIDD régule ainsi

diverses fonctions physiologiques et agit notamment sur la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques CD8 α^+ en ciblant *Itgb2* ou *Tapbp*, de même que sur la production de cytokines par les cellules iNKT (pour « *invariant natural killer T* ») en ciblant *T-bet* ou *Gata-3* (pour revue Maurel et al., 2014).

En tant qu'acteur de l'UPR, une activation soutenue et chronique de la voie RIDD favorise le mécanisme de mort cellulaire (Sano and Reed, 2013; Tabas and Ron, 2011). A l'instar de la voie PERK qui entraîne une diminution globale de la traduction (voir ci-après), le mécanisme de RIDD pourrait cibler préférentiellement des ARNm de protéines sécrétées afin de diminuer la charge du RE (Hollien and Weissman, 2006). De manière très intéressante, IRE1 α est capable de cliver les ARNm Ig μ (sec) codant pour la forme sécrétée des chaînes lourdes Ig μ dans les cellules B activées afin de réduire la synthèse et la sécrétion d'Ig et par conséquent, le stress du RE (Anken et al., 2014; Benhamron et al., 2014; Tang et al., 2018). Plusieurs études ont également montré que l'inactivation d'XBP1s, qui n'empêche pas une expression forte d'IRE1 α , induit une diminution des transcrits IgH et IgL dans les PC, ainsi qu'une baisse de sécrétion des Ig. En revanche, les taux d'ARNm IgH et IgL sont partiellement restaurés dans les PC de souris double KO IRE1 α et XBP1. La diminution des transcrits IgH/IgL est donc expliquée par une dégradation par IRE1 α (Benhamron et al., 2014; Tellier et al., 2016).

En plus de son activité RNase, IRE1 α active la signalisation JNK (pour « *c-jun N-terminal kinase* ») par interaction directe avec TRAF2 (pour « *tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 2* ») (Urano et al., 2000). Ce complexe IRE1 α -TRAF2 recrute et active ASK1 (pour « *apoptosis signal-regulating kinase 1* »), une protéine de régulation du signal d'apoptose, conduisant à l'activation de la voie de la kinase JNK et au déclenchement de la mort cellulaire (Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000). Dans des conditions de stress, IRE1 α peut également se lier à BAX et BAK, deux protéines mitochondriales impliquées dans l'apoptose (Hetz et al., 2006).

II.1.2. La voie ATF6

ATF6 est une protéine transmembranaire du RE composée de deux sous-unités : ATF6 α et ATF6 β . ATF6 contient un domaine cytosolique de type bZIP (pour « *basic leucine zipper* ») et un domaine d'interaction à BIP dans la lumière du RE (**Figure 18c**) (Adachi et al., 2008; Haze et al., 1999). En condition de stress, BIP interagit avec les protéines mal repliées et permet la translocation d'ATF6 vers l'appareil de Golgi (Nadanaka et al., 2004; Shen et al., 2002), où elle subit un clivage séquentiel par les protéases S1P et S2P (pour « *site-1 or site-2 proteases* ») (Ye

et al., 2000). La partie N-terminale d'ATF6 (ATF6-N) ainsi générée passe alors dans le noyau et se lie aux éléments de réponse au stress (ERSE pour « *ER stress response element* »), contenant la séquence consensus (CCAAT-N₉-CCACG) pour induire l'expression de gènes cibles comme les chaperonnes *Bip* et *Grp94*, les composants de l'ERAD et XBP1 (Chen et al., 2010; Yamamoto et al., 2004; Yoshida et al., 2001). Le faible délai d'activation d'ATF6 qui s'effectue par simple clivage, permet une réponse rapide face à un stress protéique.

II.1.3. La voie PERK

Comme IRE1 α , la protéine PERK (pour « *protein kinase RNA-like ER kinase* ») est une protéine transmembranaire. Elle possède une activité sérine/thréonine kinase à son extrémité C-terminale cytoplasmique et reconnaît une accumulation de protéines mal repliées grâce à son senseur au niveau N-terminal dans la lumière du RE (**Figure 18b**) (Bertolotti et al., 2000; Harding et al., 1999). Comme pour IRE1 α , BIP se dissocie du domaine luminal de PERK lors d'un stress du RE, ce qui active son oligomérisation et une autophosphorylation de son domaine kinase cytosolique (Ron and Walter, 2007a).

L'activation de la voie PERK aboutit à une atténuation transitoire de la traduction protéique, permettant ainsi de surmonter le stress du RE (Chen and Brandizzi, 2013). La forme phosphorylée de PERK est active et phosphoryle à son tour la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (pour « *eukaryotic initiation factor 2 α* ») au niveau de la sérine 51, conduisant à une inhibition générale de la traduction protéique (Harding et al., 2000b, 2000a). Bien que la phosphorylation de eIF2 α diminue la synthèse globale des protéines et réduit la charge des protéines dans le RE, elle autorise néanmoins la traduction de certaines protéines, dont le facteur de transcription ATF4 (pour « *activating transcription factor 4* ») (Lu et al., 2004). ATF4 contrôle des programmes de transcription spécifiques de l'UPR (Walter and Ron, 2011), elle induit notamment l'expression de gènes cibles comme *Chop* (pour « *C/EBP homologous protein* ») et *Gadd34* (pour « *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34* ») (Fawcett et al., 1999; Yanjun Ma et al., 2002; Ma and Hendershot, 2003; Ron and Habener, 1992). Lorsque le stress du RE diminue, l'association de GADD34 avec PP1 (pour « *protein phosphatase 1* ») favorise la déphosphorylation de eIF2 α pour restaurer la synthèse protéique (Harding et al., 2009; Novoa et al., 2003). En revanche, si le stress du RE reste fort, CHOP induit l'apoptose en augmentant l'expression du facteur pro-apoptotique *Bim* (pour « *Bcl-2 interacting mediator* ») et du gène *Dr5* (pour « *death receptor 5* ») codant un récepteur de mort cellulaire (Iurlaro and Muñoz-Pinedo, 2016; Puthalakath et al., 2007). DR5 induit des

voies extrinsèques de l'apoptose en recrutant la protéine adaptatrice FADD (pour « *FAS-associated death domain protein* ») qui recrute et active la CASPASE 8, ce qui déclenche la cascade des caspases conduisant à l'apoptose. En parallèle, la protéine BIM active BAX (pour « *BCL2 associated X protein* ») et BAK (pour « *BCL2 antagonist/killer 1* ») qui induisent une perméabilisation de la membrane mitochondriale pour libérer le cytochrome *c* (Iurlaro and Muñoz-Pinedo, 2016; Urra et al., 2013). Ainsi, l'activation de la voie PERK peut exercer un rôle ambivalent selon l'intensité et la durée du stress du RE, en favorisant la survie par inhibition de la synthèse protéique et en déclenchant un processus pro-apoptotique en cas de stress prolongé du RE.

La voie PERK joue un rôle critique dans le développement et la fonction des cellules sécrétrices spécialisées comme les cellules pancréatiques, et les souris *Perk*^{-/-} présentent des défauts de sécrétion endocrine et exocrine (Harding et al., 2001; Zhang et al., 2002, 2006). Néanmoins, cette voie est réprimée dans les plasmocytes qui constituent un autre type de cellules sécrétrices. En effet, les souris *Perk*^{-/-} et *Perk*^{+/+} présentent un développement B et une différenciation plasmocytaire similaire. De même, les analyses *in vitro* réalisées après stimulation (LPS) des cellules B de rate *Perk*^{-/-} et *Perk*^{+/+} ont révélé une viabilité cellulaire et un taux de sécrétion d'IgM identiques, ainsi qu'un profil de synthèse protéique comparable (Zhang et al., 2005). Dans une étude analysant l'activation des différentes voies de l'UPR au cours d'une stimulation de cellules B par du LPS, les résultats ont confirmé l'absence d'activation de la voie PERK, contrairement aux voies IRE1 α /XBP1 et ATF6 activées dès le premier jour de la stimulation du LPS (Gass et al., 2008). De la même manière, une reconstitution de souris *Rag2*^{-/-} par des cellules hématopoïétiques mutantes exprimant le dominant négatif eIF2 α ^{S51A} non phosphorylable n'altère ni le développement des cellules B matures, ni les concentrations sériques d'Ig (Mielke et al., 2011).

L'ensemble de ces données suggère que l'activation de la voie PERK et la phosphorylation de eIF2 α ne jouent pas un rôle prépondérant dans la différenciation en PC et la sécrétion des Ig. Un modèle reposant sur un décrochage différentiel de BIP entre PERK et IRE1 α a été proposé par l'équipe de Ron *et al* pour expliquer l'absence d'activation de la voie PERK au cours de différenciation plasmocytaire. Selon ce modèle, BIP se décrocherait plus facilement d'IRE1 α que de PERK, inhibant l'activation de cette dernière pour permettre une synthèse massive d'Ig (Bertolotti et al., 2000). L'absence d'activation de la voie PERK contribuerait également à limiter l'apoptose des PC. L'équipe de Walter *et al* avaient également proposé un modèle alternatif d'activation d'IRE1 α impliquant une liaison directe de la partie luminaire d'IRE1 α avec les protéines mal repliées qui conduirait à son activation sélective (Credle et al., 2005).

Néanmoins, la résolution de la structure protéique d'IRE1 α par l'équipe de Kaufman *et al* semble indiquer que le sillon est trop étroit pour établir une telle liaison peptidique (Zhou et al., 2006). D'autres scénarios restent possibles et il a été montré qu'un stress artificiel provoqué par des agents pharmacologiques tels que la tunicamycine ou la thapsigargine permettait d'activer les trois branches de l'UPR dans les PC (Ma et al., 2010). Ainsi, les signaux de différenciation des cellules plasmocytaires conduiraient à une réponse UPR modifiée dans laquelle IRE1 α serait activée dès le début conduisant à la synthèse d'XBPs alors que la voie PERK serait spécifiquement inhibée. Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence récente de l'implication de UFBP1 (pour « *Ufm1-binding protein 1* ») dans l'inhibition de PERK lors de la différenciation des cellules B en plasmocytes. UFBP1 est une protéine de la voie de l'ufmylation qui permet la liaison d'un polypeptide UFM1 à des protéines cibles pour modifier leur fonction et leur stabilité par un processus semblable à l'ubiquitination. Les souris présentant une invalidation conditionnelle de ce gène dans la lignée B (*Ufbp1^{F/F}CD19^{cre}*) présentent des taux d'anticorps diminués en réponse à des immunisations T-dépendantes ou indépendantes, de même qu'une altération de la différenciation plasmocytaire. De façon intéressante, la stimulation par le LPS de cellules B déficientes en *Ufbp1* induit l'apparition de la forme phosphorylée de PERK (p-PERK), conduisant à la phosphorylation de eIF2 α (p-eIF2 α) ainsi qu'à l'expression d'ATF4. Ces données suggèrent que UFBP1 est un régulateur négatif de l'activation de PERK pendant la différenciation plasmocytaire. Le mécanisme d'action est en cours d'étude mais il a également été montré que UFBP1 stabilise IRE1 α . Par conséquent, l'absence d'UFBP1 entraînerait une diminution de la signalisation IRE1 α / XBP1 qui pourrait perturber l'homéostasie du RE et conduire à l'activation de la voie PERK (Liu et al., 2017). D'autres mécanismes restent cependant envisageables comme une interaction (directe ou indirecte) d'UFBP1 avec des composants de la voie PERK (Zhu et al., 2019).

II.1.4. La voie mTOR

mTOR (pour "*mammalian target of rapamycin*") est une sérine/thréonine kinase qui contrôle la prolifération cellulaire et le métabolisme en fonction de divers stimuli tels que la disponibilité en nutriments et en facteurs de croissance, ou en cas de stress protéique intracellulaire (Dazert and Hall, 2011; Laplante and Sabatini, 2012). De nombreuses études ont révélé l'implication de la voie mTOR dans les cellules immunitaires comme les lymphocytes B, T et NK, les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles (Thomson et al., 2009). Au niveau moléculaire mTOR peut former deux complexes fonctionnellement

différents : mTORC1 (pour « *mTOR complex 1* ») comprenant la protéine mTOR et son adaptateur RAPTOR (pour « *regulatory-associated protein of mTOR* »), ainsi que DEPTOR (pour « *DEP-containing mTOR-interacting protein* »), mLST8 (pour « *mammalian lethal with Sec13 protein 8* ») et PRAS40 (pour « *proline-rich akt substrate 40* ») ; et mTORC2 comprenant mTOR, DEPTOR, RICTOR (pour « *raptor-independent companion of TOR* »), PROTOR (pour « *protein observed with RICTOR* »), mLST8 et mSin1 (pour « *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1* ») (Laplanche and Sabatini, 2009). Le complexe kinase mTORC1 joue un rôle clé dans l'activation de l'UPR au cours de la différenciation plasmocytaire (Laplanche and Sabatini, 2013, 2012). En effet, mTORC1 permet d'augmenter l'expression de la protéine chaperonne BIP et de nombreux gènes de l'UPR comme les protéines chaperonnes, les composants de l'ERAD et les enzymes impliquées dans la sécrétion protéique, et ceci avant l'expression d'XBPs et l'amplification de la sécrétion d'Ac (Gaudette et al., 2020; Jones et al., 2016; Pincus et al., 2010). Ainsi, la formation et l'activité du complexe mTORC1 permettraient aux cellules B engagées dans la différenciation plasmocytaire de se préparer à une synthèse massive d'Ac.

II.2. Implication de l'autophagie au cours du développement B tardif

L'autophagie est un processus cellulaire catabolique d'auto-digestion qui conduit à la dégradation des constituants cytoplasmiques dans les lysosomes. Chez les eucaryotes, la principale fonction de l'autophagie est de soutenir le métabolisme cellulaire dans des conditions de privation en nutriments (He and Klionsky, 2009; Lum et al., 2005; Mizushima and Komatsu, 2011). En effet, l'autophagie est une voie de recyclage majeure fournissant les éléments nécessaires au « *turn-over* » des protéines et des organites cellulaires. Elle est notamment impliquée dans le développement B et la sécrétion d'Ac par les plasmocytes (Arbogast et al., 2018; Mizushima and Komatsu, 2011; Mizushima and Levine, 2010; Pengo et al., 2013).

Il existe trois types d'autophagies qui diffèrent par la manière dont les substrats sont adressés aux lysosomes : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie induite par les protéines chaperonnes ou CMA (pour « *chaperone mediated autophagy* »).

- (1) La **macro-autophagie** se traduit par la séquestration de constituants cytoplasmiques à partir de membranes isolées qui vont englober le cytoplasme et se réarranger pour former une structure à double membrane : l'autophagosome, qui fusionne ensuite avec le lysosome pour dégrader son contenu. La formation de l'autophagosome est

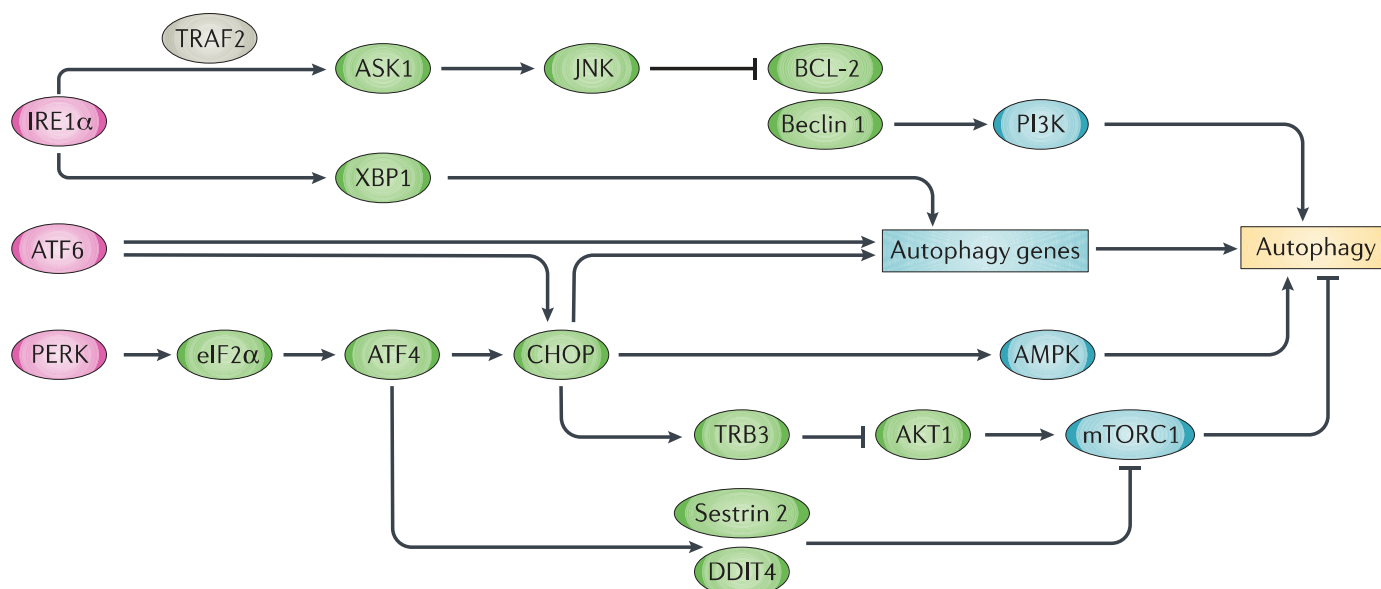


Figure 19 : Liens entre l'UPR, mTORC1 et l'autophagie.

L'activation des 3 voies de l'UPR (IRE1 α /XBP1, PERK et ATF6) peut augmenter la transcription des gènes de l'autophagie. IRE1 α active la voie JNK en formant un complexe protéique avec TRAF2 et ASK1. Il en résulte une phosphorylation de BCL2 par JNK, avec une dissociation de Beclin1 et une activation de la PI3K qui stimule l'autophagie. L'activation de PERK et la signalisation en aval d'ATF4 et CHOP, aboutit également à stimuler l'autophagie par l'intermédiaire de la protéine AMPK et de l'inhibition de mTORC1 (D'après Cybulsky, 2017).

(IRE1 α , inositol-requiring enzyme 1 α ; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2 ; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1 ; BCL2, B cell lymphoma 2 ; JNK, JUN N terminal kinase ; AKT1, RAC α serine/threonine protein kinase ; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase ; XBP1, X box-binding protein 1 ; ATF6/4, activating transcription factor 6/4 ; CHOP, C/EBP homologous protein ; DDIT4, DNA damage-inducible transcript 4 ; eIF2 α , eukaryotic translation initiation factor 2 α ; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase ; mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1 ; TRB3, tribbles homologue 3.)

régulée par les protéines ATG (pour « *autophagy-related* ») (Klionsky et al., 2003). Cette autophagie permet de dégrader des protéines mal repliées ou anormales, des agrégats, des organites entiers ou des pathogènes.

- (2) La **micro-autophagie** est un processus qui correspond à l'internalisation directe d'une partie de cytoplasme ou d'organites directement par invagination du lysosome (Li et al., 2012; Mijaljica et al., 2011).
- (3) L'**autophagie médiée par les protéines chaperonnes** est un mécanisme d'autophagie faisant intervenir des intermédiaires protéiques. La protéine chaperonne HSC70 (pour « *Heat Shock Cognate protein of 70 kDa* ») joue un rôle majeur dans ce processus (Agarraberes and Dice, 2001). Elle est capable de reconnaître un motif spécifique (KFERQ) sur une protéine cible, puis de former un complexe stable en recrutant d'autres protéines chaperonnes telles que HSP40 ou HSP90. Ce complexe sera ensuite adressé aux lysosomes via un canal formé sur la membrane lysosomale par l'oligomérisation de la protéine LAMP-2A (pour « *lysosome-associated membrane protein 2A* ») (Majeski and Dice, 2004).

Il a été recensé plusieurs processus autophagiques responsables de la dégradation de compartiments cellulaires spécifiques : les peroxysomes avec la pexophagie (Iwata et al., 2006), les mitochondries avec la mitophagie (Geisler et al., 2010; Novak et al., 2010; Okamoto et al., 2009), les ribosomes avec la ribophagie (Kraft et al., 2008), les granules sécrétoires avec la zymophagie (Grasso et al., 2011), les gouttelettes lipidiques avec la lipophagie (Singh et al., 2009), les agrégats protéiques avec l'agrophagie (Filimonenko et al., 2010; Komatsu et al., 2007; Szeto et al., 2006) et le réticulum endoplasmique avec la reticulophagie (Bernales et al., 2006).

L'autophagie et l'UPR sont des mécanismes interconnectés (Bachar-Wikstrom et al., 2013; Chandrika et al., 2015) et les voies IRE1 α et PERK peuvent conduire à une activation de l'autophagie pour réduire le stress du RE (**Figure 19**) (B'chir et al., 2013; Ogata et al., 2006). Au niveau moléculaire, IRE1 α , via son interaction avec TRAF2 (pour « *TNF receptor-associated factor 2* ») induit la phosphorylation de ASK1 (pour « *apoptosis signal-regulating kinase 1* ») (pour revue Huang et al., 2019), conduisant à la phosphorylation de JNK (pour « *c-Jun N-terminal kinases* ») qui phosphoryle à son tour BCL2 (Corazzari et al., 2017). Cette phosphorylation provoque la dissociation du complexe BCL2/BECLIN1. BCL2 est un médiateur anti-apoptotique par sa capacité à antagoniser BAX et BAK tandis que BECLIN1 est un initiateur essentiel de l'autophagie en recrutant des protéines clés dans les structures

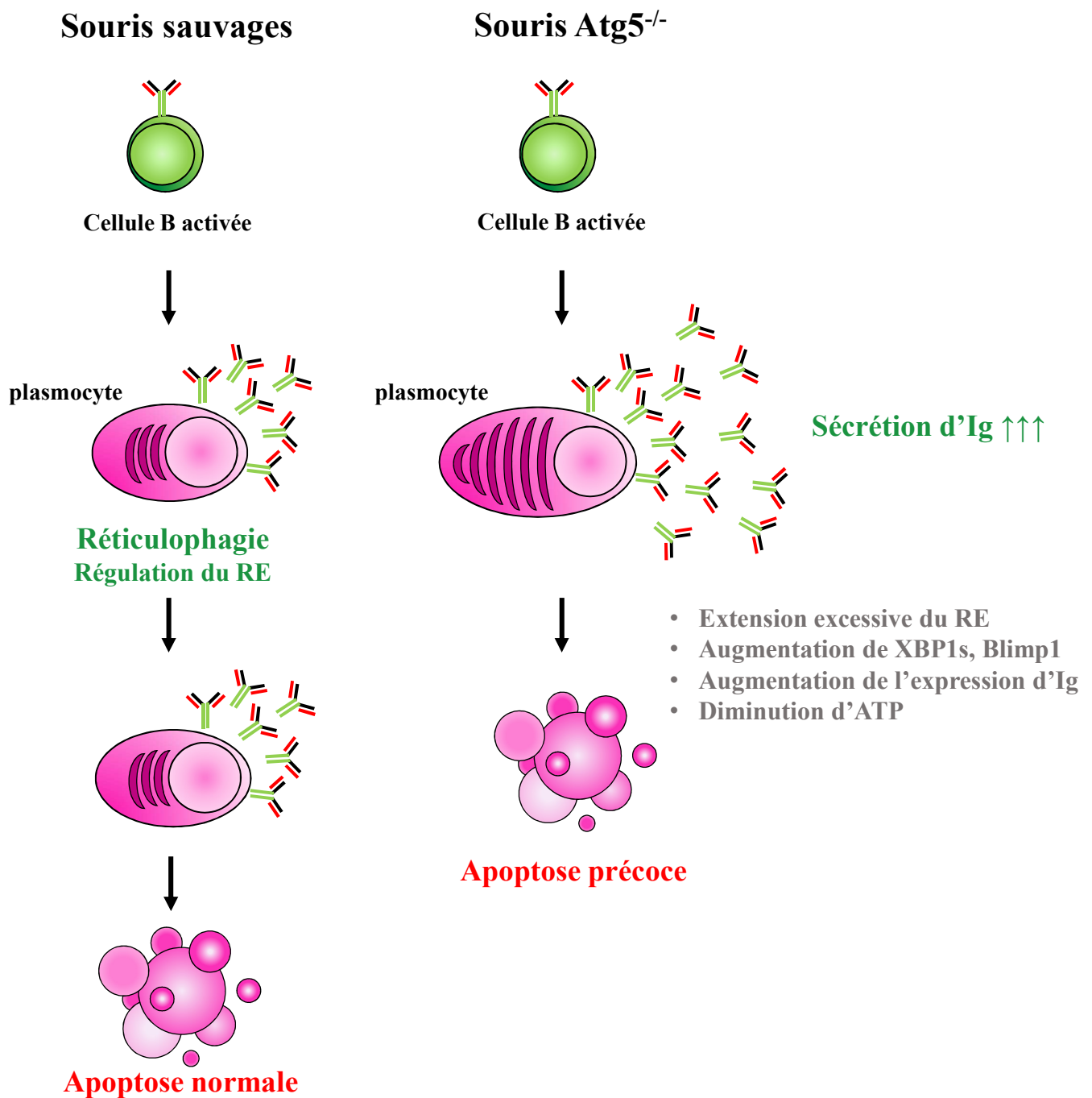


Figure 20 : Déficit en autophagie et différenciation plasmocytaire abortive.

De façon physiologique, l'autophagie limite l'expansion du RE et agit comme un frein physiologique sur la différenciation et la fonction des PC, en les protégeant ainsi d'une induction d'apoptose prématurée. En effet, comparativement à leurs homologues sauvages, les PC Atg5^{-/-} présentent une expression élevée d'XBP1s, Blimp1 et des gènes d'Ig. Néanmoins, la déficience en autophagie s'accompagne d'une apoptose précoce des PCs et de réponses anticorps défectueuses *in vivo* (D'après Milan et al., 2016).

pré-autophagosomales. L'assemblage de BCL2 avec BECLIN1 permet d'inactiver BECLIN1 et donc l'autophagie en empêchant la formation des autophagosomes. La dissociation du complexe active BECLIN1 et l'autophagie. IRE1 α active aussi la voie MAPK8/JNK1/MAPK9/MAPK10 qui favorise l'autophagie (Bao et al., 2018). De plus, la voie JNK peut augmenter la transcription de *Beclin1* (Li et al., 2009; pour revue Yan et al., 2015).

Le rôle de l'autophagie au cours du développement B tardif a été relativement bien étudié. Les souris présentant une invalidation conditionnelle d'*Atg7* dans les LB sont capables de générer une réponse primaire normale mais pas de réponse secondaire protectrice lors d'une deuxième infection par le virus de la grippe (Chen et al., 2015, 2014). Dans ce contexte, l'autophagie serait impliquée dans le maintien des cellules B mémoire plutôt que dans leur génération. En effet, le flux autophagique permet de limiter la production de ROS mitochondrial et la toxicité des lipides peroxydés dans les cellules B mémoires. Il est également possible que la mobilisation des lipides par lipophagie soit nécessaire à la survie des cellules B et T mémoires (Chen et al., 2015, 2014). Les PCs dépendent également de l'autophagie pour surmonter le stress prolongé du RE en lien avec leur activité sécrétrice. En accord avec son rôle clé au cours de la différenciation plasmocytaire, les souris *Atg5^{fl/fl} CD19-Cre* produisent moins d'Ig en réponse à des immunisations de type T-dépendant et T-indépendant (Conway et al., 2013; Pengo et al., 2013). De façon intéressante, l'autophagie semble limiter l'expansion du RE et les PCs *Atg5^{-/-}* possèdent un RE plus abondant que leurs homologues de type sauvage (Milan et al., 2016) (**Figure 20**). Par conséquent, les PCs déficients en autophagie sont capables de produire des Ig mais succombent à un stress massif du RE. Cette courte durée de vie des PCs *Atg5^{-/-}* permet ainsi d'expliquer les réponses anticorps défectueuses observées *in vivo* (Conway et al., 2013; Pengo et al., 2013). En limitant l'expansion du RE, l'autophagie agit comme un frein physiologique lors de la différenciation plasmocytaire, en maintenant la production d'Ac à des niveaux compatibles avec leur longue durée de vie (Milan et al., 2016).

Récemment, l'équipe de F. Gros *et al* a mis en évidence le rôle de l'autophagie dans l'endocytose et le trafic du BCR après son activation. La protéine ATG5 permettrait de relier l'internalisation du BCR avec le recrutement des centrosomes. En son absence, la relocalisation des centrosomes, dépendante de PCM1, est abolie, entraînant une altération de la nucléation de l'actine qui compromet la polarisation de la synapse immunologique (Arbogast et al., 2018).

D'autres études ont également montré que l'activation du flux autophagique pouvait favoriser la progression du lupus en régulant la survie des cellules immunitaires autoréactives (Arnold et al., 2016; Liu et al., 2020). En effet, chez les souris *Lpr* (« *lupus prone* ») sujettes au lupus, l'équipe de Sun *et al* a observé que la sévérité de la maladie était corrélée avec une

élévation de l'activité autophagique dans les splénocytes et les lymphocytes du sang périphérique (Liu et al., 2020). Une extinction d'*Atg5* par un lentivirus sh*Atg5* a permis de diminuer les signes cliniques du lupus chez ces souris, avec une diminution des taux d'auto-anticorps sériques, des dépôts de complexes immuns glomérulaires, de même que du facteur d'activation des cellules B (BAFF). Le ciblage de l'autophagie dans les cellules immunitaires pourrait ainsi être une piste prometteuse dans le traitement du lupus (Liu et al., 2020).

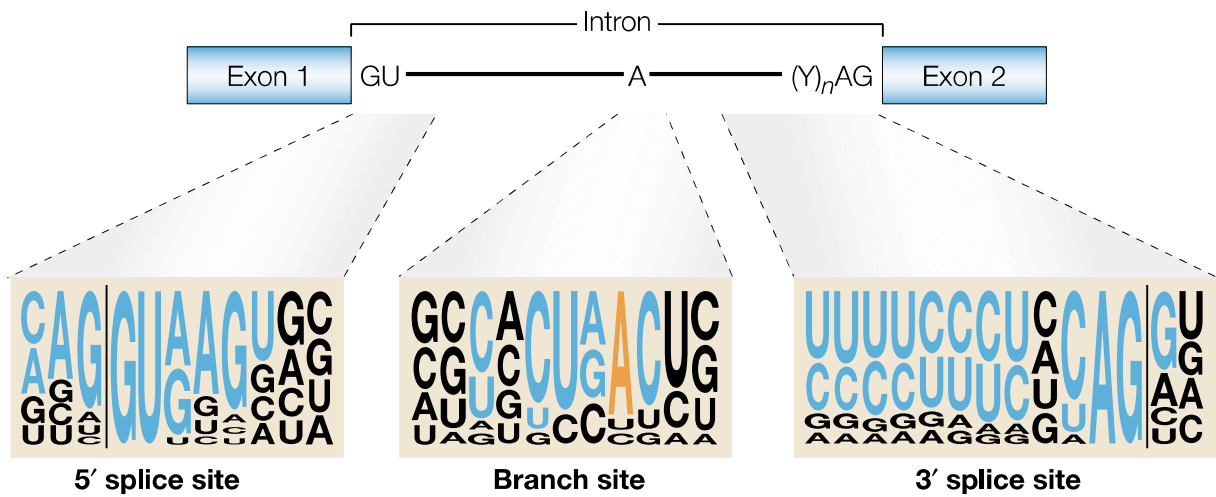
Partie III. Régulation de l'expression génique et surveillance des transcrits d'Ig

La transcription des gènes dans les cellules eucaryotes est effectuée par trois ARN polymérases (ARN pol) différentes : ARN Pol I, Pol II et Pol III. L'ARN Pol I produit l'ARN ribosomal, l'ARN Pol II synthétise des ARN pré-messagers (pré-ARNm) et de petits ARN nucléaires (snRNA pour « small nuclear RNA »), enfin l'ARN Pol III produit des ARN de transfert et d'autres petits ARN. Deux autres ARN polymérases (IV et V) ont également été découvertes chez les plantes (Wierzbicki et al., 2009). Les ARN Pol I, II et III comprennent respectivement 14, 12 et 17 sous-unités et ont un poids moléculaire de 589, 514 et 693 kDa. La transcription d'un gène par l'ARN Pol II permet la synthèse d'un ARN pré-messager qui va subir plusieurs modifications dans le noyau avant d'être exporté dans le cytoplasme en tant qu'ARN messenger mature (ARNm) qui sera traduit par la suite. La maturation nucléaire des pré-ARNm comprend plusieurs étapes dont la principale est l'épissage, qui permet d'éliminer les séquences introniques. Ce processus nécessite l'assemblage dynamique du complexe ribonucléoprotéique (RNP) ou « spliceosome » qui catalyse l'élimination des introns et la ligature des régions codantes (pour revue Wilkinson et al., 2019).

III.1. Epissage des ARN pré-messagers

La reconnaissance des jonctions exon/intron et l'excision de l'intron qui résulte de l'épissage sont guidées par trois déterminants de séquences : un site donneur d'épissage 5' en amont, un site accepteur d'épissage 3' en aval, ainsi qu'un point de branchement et un tractus polypyrimidine à l'extrémité 3' de l'intron (**Figure 21A**). Les sites donneurs d'épissage, dans leur grande majorité, contiennent un dinucléotide GU au site 5'ss (5'ss pour « *splice site* ») avec une séquence consensus GURAGU où le R est une base purique (A ou G). Les sites accepteurs d'épissage 3'ss contiennent un dinucléotide AG et la séquence consensus du site est formée par une succession de bases pyrimidiques (C ou U) se terminant par une séquence CAG en amont de l'exon. Le point de branchement est un A situé entre 20 à 40 nucléotides en amont de l'extrémité 3' de l'intron.

A.



B.

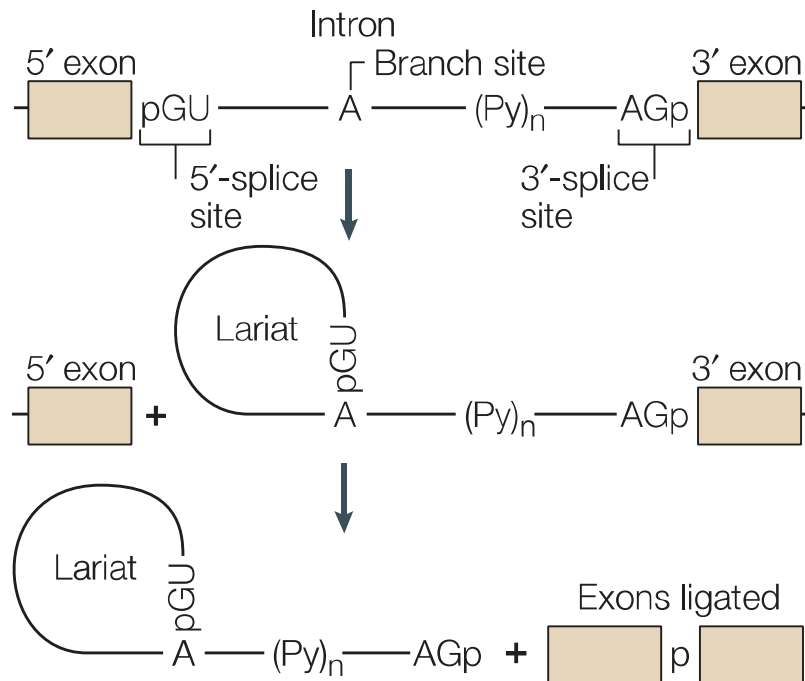


Figure 21 : Réaction d'épissage et séquences consensus impliquées.

A. Position des séquences consensus au niveau des sites d'épissage situés en 5' (donneur) et 3' (accepteur). Les dinucléotides GU et AG invariants aux extrémités de l'intron, le tractus polypyrimidine (Y)_n juste en amont du AG en 3' et le point de branchement sont représentés. Les motifs de séquence qui entourent ces nucléotides conservés sont présentés ci-dessous. La taille d'un nucléotide à une position donnée est proportionnelle à la fréquence de ce nucléotide dans un alignement de séquences humaines. Les nucléotides de couleur bleue représentent les résidus les plus fréquents. Les lignes verticales indiquent les limites exon-intron.

B. Réaction d'épissage simplifiée. L'épissage se déroule en deux étapes de transestérification. Dans la première étape, le groupe 2'-hydroxyle du résidu A au site de branchement attaque le phosphate (p) au site d'épissage 5'. Cela conduit au clivage de l'exon 5' de l'intron et à la formation d'un lasso (« lariat »). Dans l'étape suivante, une deuxième réaction de transestérification implique le phosphate à l'extrémité 3' de l'intron et le groupe 3'-hydroxyle de l'exon détaché. La ligature des deux exons libère simultanément l'intron sous forme de lasso (D'après Pagani and Baralle, 2004; Cartegni et al., 2002).

La réaction d'épissage repose sur deux étapes de transestérification (**Figure 21B**). Dans la première étape, le groupement 2' hydroxyle de l'adénosine (A) du point de branchement effectue une attaque nucléophile sur le groupement phosphate du site donneur d'épissage 5'ss au niveau de la guanosine (G) et clive la liaison phosphodiester à la jonction exon-intron. Cette étape libère l'exon 5' avec le groupement hydroxyle (-OH) à son extrémité 3' et produit deux intermédiaires : l'exon 5' détaché et le fragment intron-exon 3' dans une structure en boucle. Dans la deuxième étape de transestérification, une attaque nucléophile va s'effectuer par le groupement 3' hydroxyle de l'exon libre sur le groupement phosphate du site accepteur 3' d'épissage entraînant la ligature des deux exons et la libération de l'intron sous forme de « lariat » (lasso).

Le spliceosome est un complexe formé à partir de 5 petits ARN nucléaires (snRNA pour « small nuclear RNA ») U1, U2, U4, U5 et U6, et d'environ 100 protéines associées (pour revue Kastner et al., 2019). Sept protéines homologues Sm s'assemblent en anneau autour d'une séquence riche en U (site Sm) située vers les extrémités 3' des snRNA U1, U2, U4 et U5. Pour U6 se sont sept protéines LSm paralogues (LSm2–8) qui s'assemblent à l'extrémité 3'. Au final, chacun des snRNA forme une petite particule de ribonucléoprotéine nucléaire (snRNP pour « small nuclear ribonucleo -protein ») (pour revue Patel and Bellini, 2008).

Dans le spliceosome, les snRNA jouent des rôles essentiels de catalyse et de reconnaissance du substrat par un assemblage séquentiel autour de l'ARNm (**Figure 22**). Les snRNP U1 et U2 reconnaissent respectivement les séquences des sites donneurs d'épissage 5'ss et les points de branchements. Ils forment ainsi le prés spliceosome (ou complexe A) qui s'associe ensuite avec le complexe pré-assemblé snRNP U4 / U6-U5 pour former le spliceosome complet (ou complexe B). La première réaction de transestérification génère le complexe C. Les exons 5' et 3' sont ensuite ligaturés et après la ligature, le spliceosome se dissocie libérant l'ARNm épissé, le « lariat » de l'intron et les différents snRNP (pour revue Wilkinson et al., 2019). Un complexe de jonction exon-exon EJC (pour « *exon junction complex* ») vient alors s'ajouter dans une région située à environ 24 nucléotides (nt) en amont de la jonction d'épissage nouvellement générée. Le complexe EJC sera détaillé dans le chapitre III.4.2.1.4.

III.2. L'épissage alternatif

Identifié pour la première fois par l'équipe de Walter *et al* en 1978 (Gilbert, 1978), l'épissage alternatif (AS pour « *Alternative Splicing* ») est un processus complexe et hautement

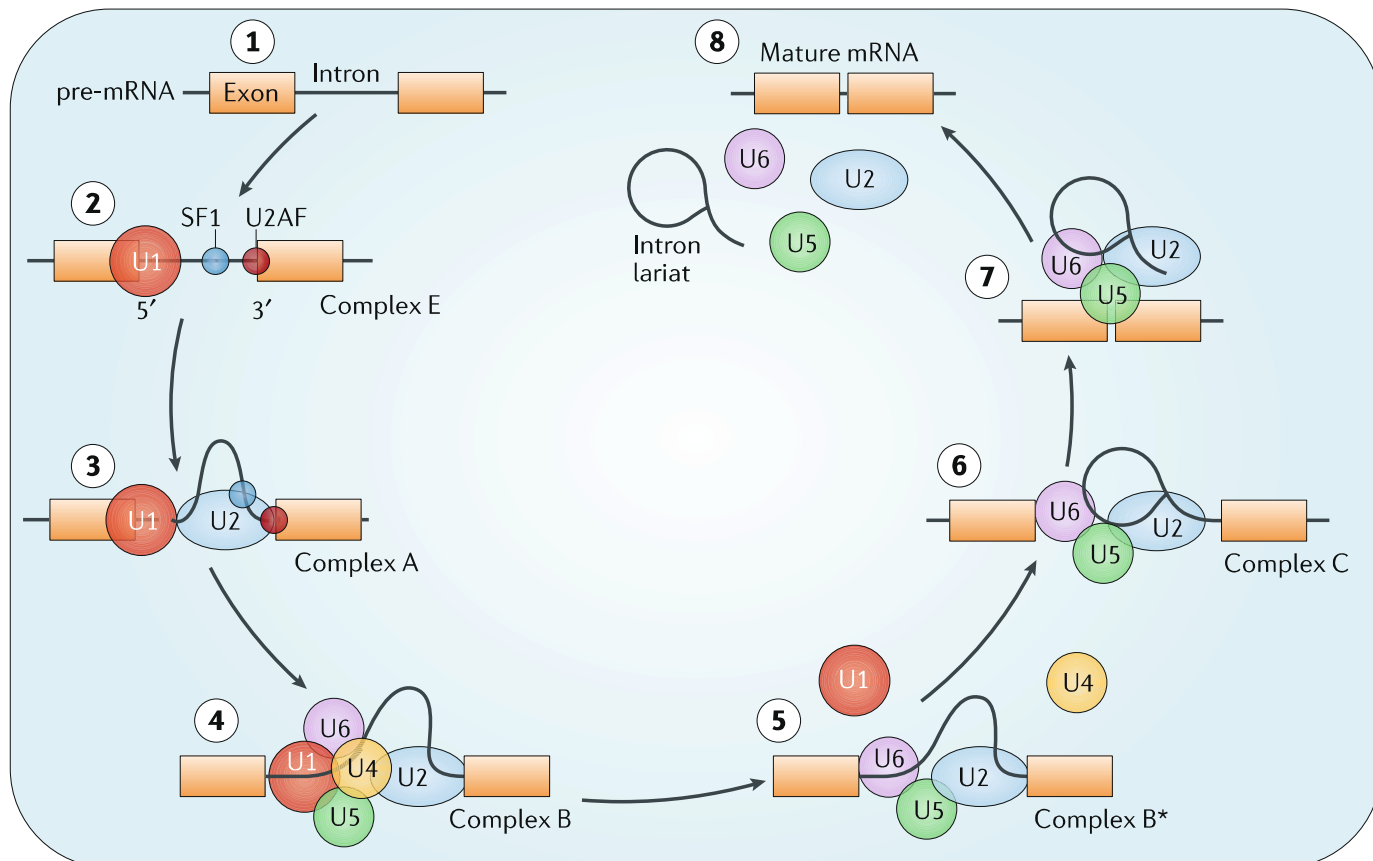


Figure 22 : Assemblage séquentiel du spliceosome au cours de l'épissage.

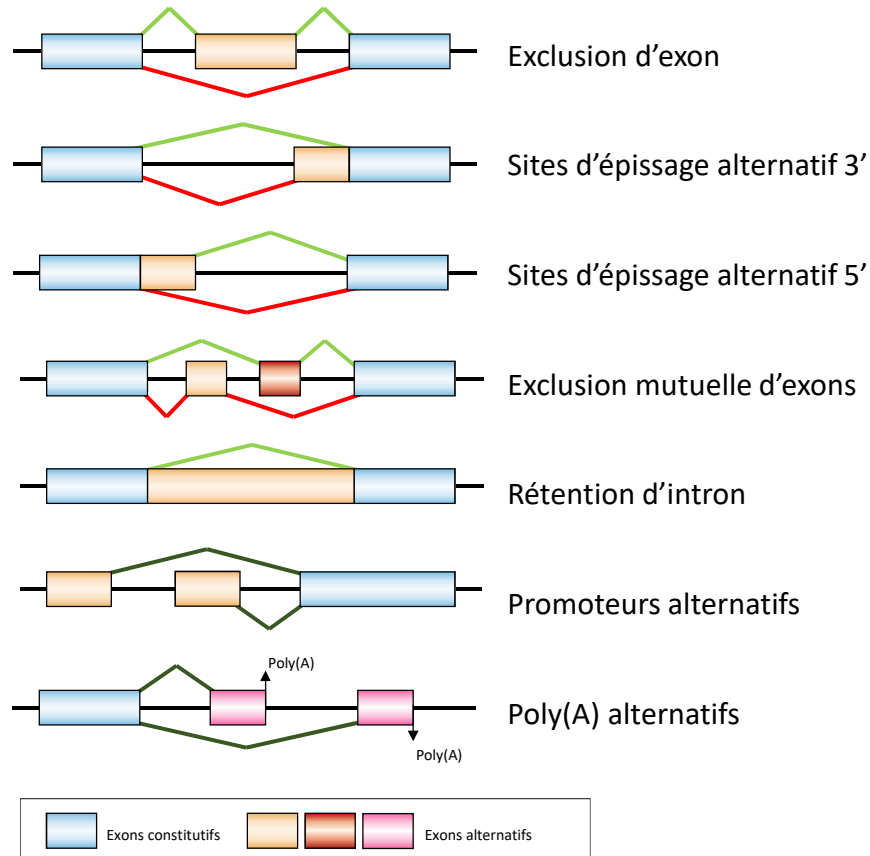
L'épissage d'un pré-ARNm par le spliceosome repose sur la formation de quatre complexes distincts. Le complexe E est le plus précoce et contient notamment snRNP U1 qui se lie à la séquence AG-GU sur le site 5' d'épissage donneur. Dans le même temps, la protéine SF1 se lie au point de branchement et U2AF au tractus polypyrimidine situé entre le point de branchement et l'extrémité 3' de l'intron. Ensuite, SF1 est enlevé du point de branchement par snRNP U2, pour former le complexe A dépendant de l'ATP. L'interaction entre le point de branchement et snRNP U2 est stabilisée par des hélicases à ARN spécifiques (Prp5 et Sub2), qui recrutent tri-snRNP U4/5/6 pour former le complexe B. L'hélicase d'ARN provoque ensuite un changement de conformation du spliceosome qui conduit à la libération des snRNP U1 et U4 et à l'interaction entre U6 avec le snRNP U2 pour la formation d'une boucle pré-ARNm et du complexe C. Dans ce complexe, deux réactions de transestérification ont lieu, l'intron est retiré sous forme de « lariat » et les extrémités de l'exon sont jointes (D'après Paschalis et al., 2018).

régulé permettant à un gène unique de produire plusieurs ARNm codant des protéines différentes. L'AS représente donc un mécanisme de régulation supplémentaire de l'expression génique. Des études transcriptomiques par séquençage haut-débit ont révélé que plus de 90% des transcrits chez l'homme subissent un épissage alternatif, générant ainsi plus de 250 000 protéines à partir d'environ 20000 gènes (Aken et al., 2017; Gaudet et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017).

Les profils d'utilisation des sites donneurs (5') et accepteurs (3') d'épissage donnent lieu à plusieurs types d'AS (pour revue Bergsma et al., 2018) (**Figure 23A**) :

- **Les exons définis par des promoteurs alternatifs** : l'initiation de la transcription au niveau de promoteurs différents, dits alternatifs, donne lieu à différents ARNm.
- **Les exons cassettes** : ces exons sont soit inclus soit exclus lors de l'épissage, car ils sont limités par des sites 5' et 3' alternatifs. L'exclusion de l'exon correspond à un phénomène de « saut d'exon » et représente 40% des événements d'AS chez les eucaryotes supérieurs. Le récepteur de mort cellulaire FAS peut subir un saut d'exon comme décrit précédemment.
- **Les exons définis par des sites 5' ou 3' d'épissage alternatifs** : les exons peuvent posséder deux sites 5' ou deux sites 3' d'épissage, qui sont en compétition. C'est l'exemple du pré-ARNm BCL2L1 qui peut donner le variant long anti-apoptotique BCL-xL ou le variant court pro-apoptotique BCL-xS.
- **La rétention d'intron** : certains sites d'épissage peuvent être ignorés, aboutissant à la conservation de l'intron au niveau de l'ARNm. Cette séquence intronique pourra ainsi être traduite ou introduire un PTC. La rétention d'intron est la forme d'AS la plus rare chez les vertébrés et les invertébrés, constituant moins de 5% des événements. En revanche, c'est le mode le plus utilisé chez les plantes, les champignons et les protozoaires.
- **Les exons mutuellement exclusifs** : ces exons ne sont jamais présents simultanément dans un ARNm ; un seul exon (ou groupe d'exons) sera donc retenu lors de l'épissage. Les exons concernés étant généralement de taille similaire, la longueur des ARNm générés varie peu. En revanche, la fonction des protéines codées par ces différents ARNm est généralement modifiée. L'exemple d'épissage des transcrits FGFR2 possédant deux exons mutuellement exclusifs est présenté **Figure 23B**. Dans les cellules B matures naïves, un AS de ce type régule deux groupes d'exons constants C μ et C δ . Pour exprimer une IgD, les exons C μ (groupe

A.



B.

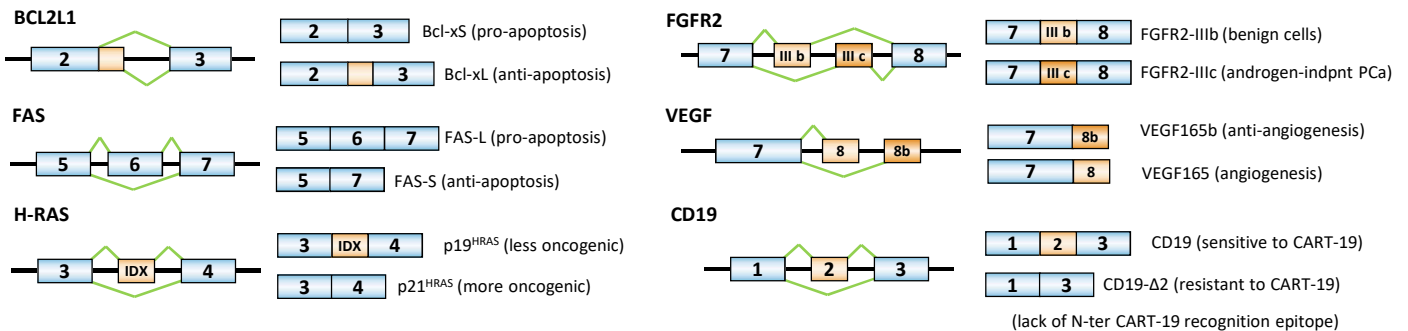


Figure 23 : Epissage alternatif.

A. Représentation schématique des différents types d'épissage : constitutifs (trait vert) et alternatif (trait rouge) ; ainsi que les transcrits générés par utilisation de promoteurs ou de sites de polyadénylation alternatifs (Adapté de Cartegni et al., 2002).

B. Exemples d'épissage alternatif fréquemment observés dans de nombreux cancers et participant à la tumorigénèse (Adapté de Wang and Lee, 2018).

de 6 exons : CH1, CH2, CH3, CH4, M1, M2) sont exclus lors de l'épissage du transcrit primaire IgH.

- **Les exons composites internes/terminaux** : ces exons peuvent être utilisés comme des exons internes lorsque le site interne 5' d'épissage est reconnu, ou comme des exons terminaux quand le signal de poly(A) qui suit est sélectionné. Cet AS est utilisé lors du passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des chaînes lourdes d'Ig. En effet, l'exon CH4 est utilisé en tant qu'exon interne épissé sur les exons de membrane M1 et M2 pour exprimer les Ig membranaires alors que ce même exon constitue l'exon terminal de la forme sécrétée des Ig.

Les isoformes protéiques générées après AS peuvent avoir des activités biologiques distinctes voire radicalement opposées. Dans le cas du gène *Bcl2L1* (pour « *B-cell lymphoma 2-like 1* »), l'AS permet de synthétiser les variants BCL-xL (isoforme longue) et BCL-xS (isoforme courte), respectivement anti- et pro-apoptotiques (Akgul et al., 2004). Un autre exemple d'un gène lié à l'apoptose qui subit un épissage alternatif d'ARN dans les cellules cancéreuses est le récepteur FAS. Il est exprimé à la membrane de nombreux types cellulaires et initie une cascade de signalisation conduisant à l'apoptose après activation par son ligand FASL (pour « *FAS-ligand* ») produit par les cellules T cytotoxiques. L'AS induit un variant court FAS-s dépourvu de l'exon 6 qui code une protéine sans domaine transmembranaire (**Figure 23B**). Cette isoforme agit comme un leurre pour FASL, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose (pour revue Wang and Lee, 2018). Un dernier exemple concerne l'AS des transcrits *CXCR3* (pour « *G protein-coupled receptor (GPCR) CXC chemokine receptor 3* ») qui génère 3 isoformes : CXCR3A, CXCR3B et CXCR3Alt. Pour ces deux premières isoformes, leurs activation respectives par CXL10 et CXCL11 aboutit à différentes voies de signalisation (Berchiche and Sakmar, 2016).

L'AS joue également un rôle majeur d'autorégulation de l'expression génique par un mécanisme nommé RUST (pour « *regulated unproductive splicing and translation* »). L'AS peut introduire des codons stop prématurés (PTC pour « *Premature Termination codon* ») par décalage du cadre de lecture et forcer ainsi la dégradation des ARNm par NMD (AS-NMD pour « *Nonsense-Mediated mRNA Decay* »). Des événements d'épissage au niveau des régions non traduites 5' ou 3'UTR (UTR pour « *UnTranslated Regions* ») peuvent également affecter la stabilité, la localisation ou l'efficacité de traduction des ARNm. De nombreux facteurs d'épissage s'autorégulent grâce à ce mécanisme, comme par exemple SC35, CLKs, TIAR/TIA-1, PTB, AUF1 et TRA2-beta (pour revue Soergel et al., 2013; Sureau et al., 2001). L'exemple

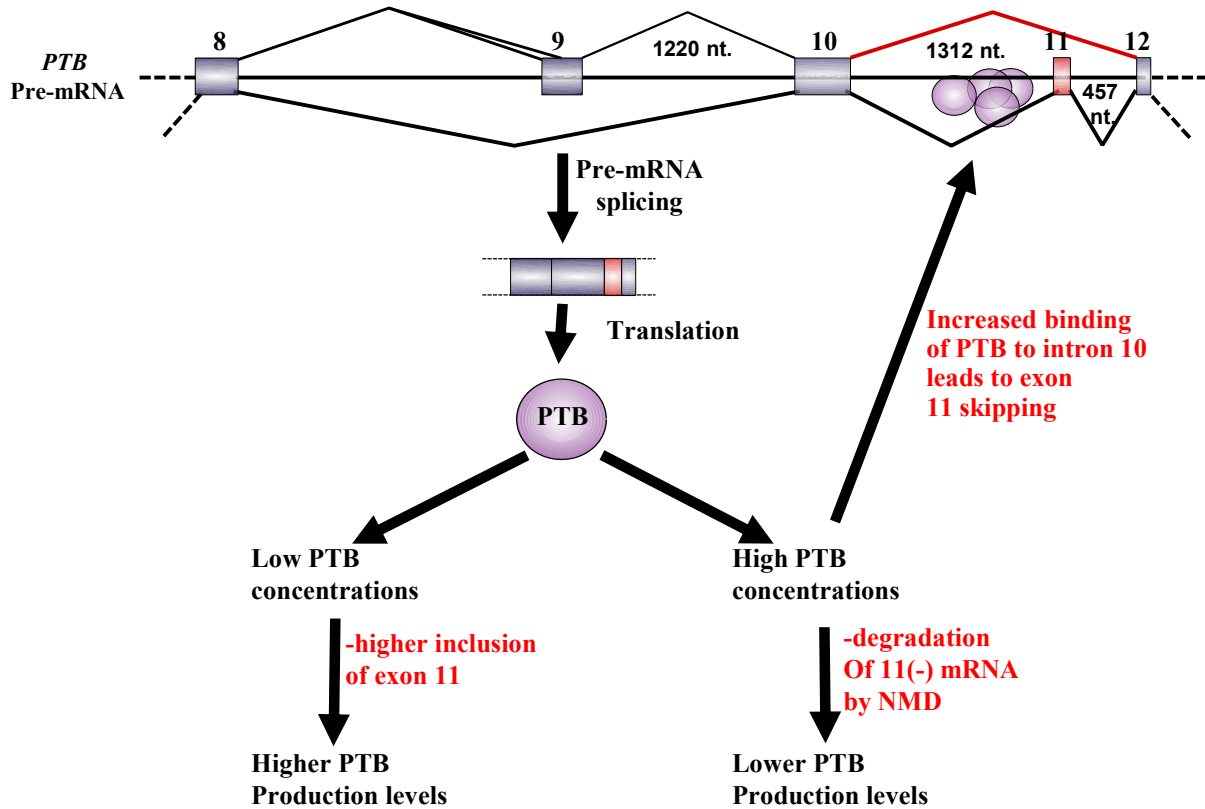


Figure 24 : Autorégulation du facteur d'épissage PTB par épissage alternatif couplé au NMD.

Certains facteurs d'épissage, tels que PTB et SC35, régulent leur abondance par épissage alternatif (AS). Représentation schématique du processus d'autorégulation de PTB par élimination de l'exon 11 lors de l'épissage. Une multimerisation de PTB en amont de l'exon 11 permet de bloquer le site 3' d'épissage de l'intron 10 (interférence avec la fixation de U2AF). Le saut de l'exon 11 induit un décalage de cadre de lecture et entraîne l'introduction d'un PTC dans l'exon 12, activant ainsi la dégradation de ce variant d'épissage par NMD. (Buratti and Baralle, 2011). (*PTB* : Polypyrimidine tract-binding protein 1, encore appelée hnRNP I : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I)

de la protéine PTB (pour « *polypyrimidine tract-binding protein 1* ») est illustré **Figure 24**. A noter que PTB a un rôle ambivalent, car il peut soit favoriser le saut d'exon soit l'inclusion d'exon (Xue et al., 2009).

III.3. Régulation de l'épissage alternatif

La régulation de l'assemblage du spliceosome est un point de contrôle permettant d'orienter vers un épissage constitutif ou alternatif. Les introns humains peuvent mesurer plusieurs centaines de kilobases et contenir de nombreux sites d'épissage « leurres » présentant des séquences proches des motifs consensus précédemment décrits. Malgré l'abondance de sites d'épissage leurres (sites accepteurs et donneurs) capables de former des pseudo-exons, ces événements ne sont que très rarement observés (Sun and Chasin, 2000). Le processus d'épissage se produit donc avec une grande fidélité et sa régulation fait intervenir de nombreux éléments qui agissent en *cis* et/ou en *trans* sur le pré-ARNm et permettent une définition précise des exons et des introns.

III.3.1. Les éléments *cis*-régulateurs

L'épissage alternatif est contrôlé par de nombreux éléments *cis* régulateurs qui servent soit d'activateurs, soit d'inhibiteurs d'épissage. Ces éléments régulateurs (SRE pour « *Splicing Regulatory Elements* ») sont répartis en quatre catégories : les séquences exoniques activatrices d'épissage (ESE pour « *Exonic Splicing Enhancers* »), les séquences exoniques inhibitrices (ESS pour « *Exonic Splicing Silencers* »), les séquences introniques activatrices (ISE pour « *Intronic Splicing Enhancers* ») et les séquences introniques inhibitrices (ISS pour « *Intronic Splicing Silencers* ») (pour revue Shenasa and Hertel, 2019) (**Figure 25**). Ces séquences régulatrices fonctionnent en recrutant des facteurs d'épissage à action *trans* qui activent ou suppriment différentes étapes de la réaction d'épissage. Les ESE/ISE favorisent l'assemblage du spliceosome et l'inclusion des exons en liant généralement les protéines de la famille des protéines SR (pour « *Serine/arginine-rich* ») et par des protéines de la famille des hnRNP (pour « *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* »), comme les protéines hnRNP I (ou PTB), hnRNP A1 ou hnRNP L. Les ESS bloquent l'assemblage du spliceosome et répriment l'inclusion des exons en liant des protéines de la famille hnRNP et les ISS ayant le même rôle, sont reconnus par la protéine hnRNP L et par d'autres protéines de la famille des hnRNP

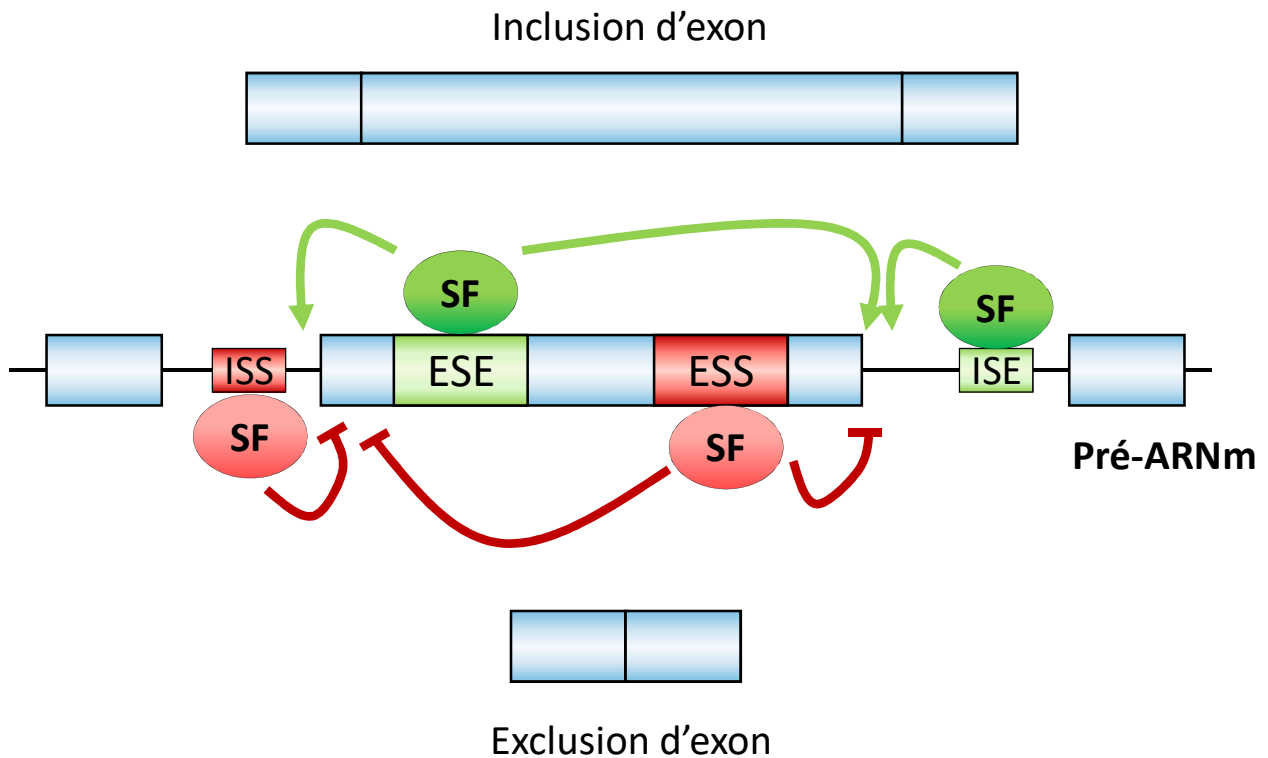


Figure 25 : Les séquences régulatrices d'épissage.

Les éléments cis-régulateurs contrôlant l'épissage peuvent être des séquences activatrices (ESE et ISE en vert : exonic/intronic splicing enhancers) ou inhibitrices (ESS et ISS en rouge : exonic/intronic splicing silencers). Les facteurs agissant en trans sont également représentés. La fixation des facteurs d'épissage (SF : splicing factors) sur les ESE /ISE favorise l'inclusion d'exon, alors que les facteurs se fixant sur les séquences ESS/ISS favorisent l'exclusion (« saut d'exon »).

SF: Splicing Factors; ESE: Exonic Splicing Enhancer; ISE: Intronic Splicing Enhancer; ESS: Exonic Splicing Silencer; ISS: Intronic Splicing Silencer

(pour revue Geuens et al., 2016; Jeong, 2017). Les protéines SR sont généralement considérées comme favorisant l'inclusion d'exon, alors que les hnRNP sont classiquement considérées comme des répresseurs d'épissage favorisant l'exclusion d'exon. Cette distinction est toutefois trop simpliste et la fonction de ces protéines varie selon leurs positions, ou en fonction de l'effet coopératif/compétitif entre les protéines (pour revue Dvinge, 2018).

La formation de structures secondaires au sein du pré-ARNm peut également moduler l'accessibilité des sites d'épissage ou des motifs de reconnaissance par les RNP, et ainsi agir comme activateur ou inhibiteur d'épissage. La formation d'une épingle à cheveux sur l'ARN ou d'un duplex ARN/ARN peut favoriser l'exclusion d'un exon en masquant le site d'épissage 5' ou 3' (Hiller et al., 2007). Les structures secondaires peuvent également agir sur l'épissage en exposant des motifs activateurs ou inhibiteurs. De plus, des RNP comme hnRNP F peuvent se lier aux structures introniques en G-quadruplex et favoriser l'inclusion de l'exon en amont (pour revue Dvinge, 2018; Huang et al., 2017).

III.3.2. Les éléments trans-régulateurs

Les deux principales familles de protéines impliquées dans la régulation de l'épissage sont les protéines SR (pour « *Serine/arginine-rich* ») et hnRNPs (pour « *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* ») (Han et al., 2010; Zhou and Fu, 2013).

Les protéines SR contiennent un à deux domaines de reconnaissance d'ARN de type RRM (pour « *RNA recognition motif* ») à leur extrémité N-terminale et un domaine riche en sérine/arginine à l'extrémité C-terminale facilitant les interactions avec d'autres protéines. Les premières protéines SR identifiées étaient SRSF1 et SRSF2. Les protéines SR constituent la famille la plus étudiée qui comprend plus d'une vingtaine de membres, dont les plus connus sont SRSF1, SRSF2 (SC35), SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7 et SRSF9. La plupart des protéines SR sont localisées dans le noyau, mais certaines d'entre elles (principalement SRSF1, SRSF3 et SRSF7) peuvent faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, et jouer un rôle dans l'exportation des ARNm en interagissant avec les récepteurs d'exportation TAP ou NXF1 (pour « *Tip-associated protein* » ou « *Nuclear RNA export factor 1* ») (Huang et al., 2003; Müller-McNicoll et al., 2016).

La modification chimique de l'ARN comme sa méthylation (N-6-méthyladenosine : m-6-A) peut moduler l'accès des protéines SR à l'ARNm cible via l'interaction avec la protéine YTHDC1 qui reconnaît cette modification et recrute SRSF3 tout en bloquant l'accès à SRSF10

(Xiao et al., 2016). Le degré de phosphorylation des protéines SR modifie également leur fonction dans l'assemblage du spliceosome et leur localisation intracellulaire. Les protéines SR déphosphorylées semblent être associées à l'exportation de certains ARNm (Huang et al., 2004). Enfin, les protéines SR régulent également la traduction et par conséquent la dégradation des ARNm par NMD. Par exemple, SRSF1 augmente l'efficacité du NMD des ARNm β -globine contenant un PTC (Zhang and Krainer, 2004).

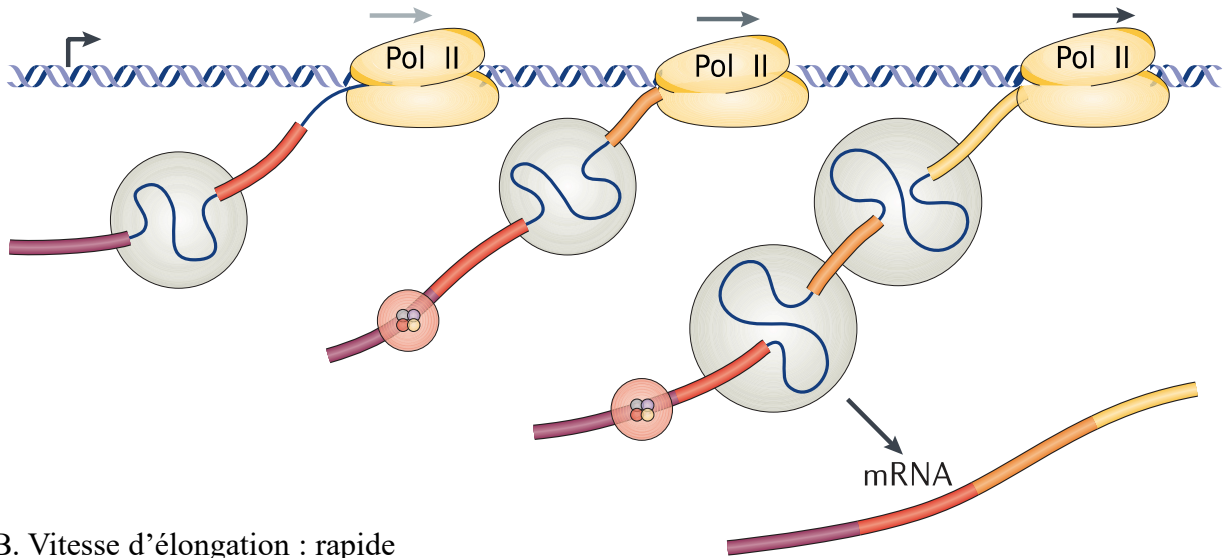
Les protéines hnRNP sont très abondantes dans la cellule et sont classiquement considérées comme des inhibiteurs d'épissage en se liant préférentiellement aux ISS (Huelga et al., 2012). Cette famille comprend au moins une vingtaine de membres dont hnRNP A1 ou L, B, C, F, G, H, K, et hnRNP I aussi appelée PTB. La plupart des protéines hnRNP possèdent un signal conventionnel de localisation nucléaire (NLS pour « *nuclear localization signal* ») et sont principalement présentes dans le noyau. Comme les protéines SR, elles sont capables de se déplacer dans le cytosol (Han et al., 2010) et subissent des modifications post-traductionnelles (méthylation, phosphorylation, ...) entraînant des changements de localisation et d'activité (Chaudhury et al., 2010).

III.3.3. Régulation transcriptionnelle et modifications de la chromatine

Les événements d'AS sont fonctionnellement couplés à la vitesse d'élongation lors de la transcription et sont donc dépendants de facteurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, le positionnement des nucléosomes ou les modifications post-traductionnelles des histones. De façon générale, si l'ARN Pol II est peu processive ou si elle effectue une pause durant l'élongation, cela favorise l'inclusion d'exons alternatifs même s'ils présentent des sites d'épissage peu efficaces (**Figure 26**). Inversement, un fort taux d'élongation de l'ARN Pol II ou l'absence de pause durant l'élongation favorise le phénomène de saut d'exon (Mata et al., 2003). Le taux de synthèse de pré-ARNm peut également affecter la formation de structures secondaires et par conséquent l'accessibilité des sites d'épissage, et d'autres motifs de facteurs d'épissage (ESE, ESS, ISE et ISS) présents sur le pré-ARNm (pour revue Bartys et al., 2019; Eperon et al., 1988).

L'environnement chromatinien d'un gène en cours de transcription peut avoir un impact sur l'épissage au travers de la localisation des histones mais aussi de leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, ou méthylation) (Venkatesh and Workman, 2015). Par exemple, les nucléosomes présentent un enrichissement préférentiel au niveau des exons, favorisant ainsi la pause de l'ARN Pol II et leur épissage

A. Vitesse d'élongation : lente



B. Vitesse d'élongation : rapide

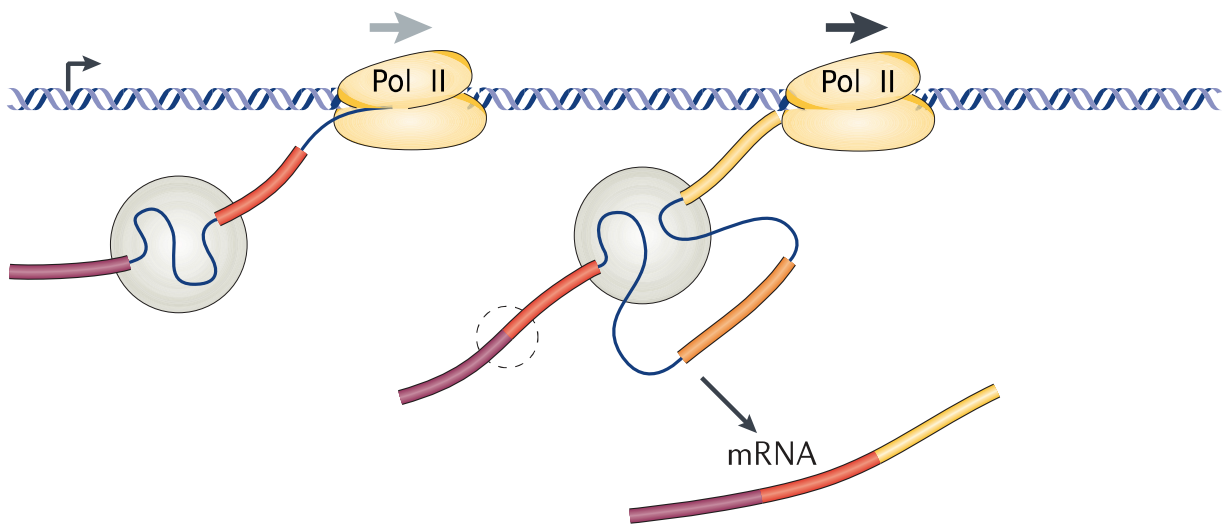


Figure 26 : Régulation de l'épissage alternatif par la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II.

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

(Hodges et al., 2009; Schwartz et al., 2009). Dans ce sens, la protéine SF3B1 du complexe U2 snRNP se lie aux nucléosomes positionnés sur les exons pour aider la reconnaissance des sites d'épissage (Kfir et al., 2015). Le complexe de remodelage de nucléosomes SWI / SNF (pour « *switch/sucrose non-fermentable* ») peut également agir comme régulateur d'épissage, en diminuant le taux d'élongation de l'ARN Pol II pour faciliter l'inclusion d'exons avec des sites d'épissage faibles (Batsché et al., 2006). Certaines marques d'histones sont enrichies au niveau des exons et peuvent influencer la sélection du site d'épissage en recrutant des facteurs d'épissage, directement ou indirectement. La triméthylation H3K4me3 peut favoriser l'épissage en recrutant snRNP U2 sur le pré-ARNm (Sims et al., 2007). La triméthylation de H3K36me3 peut induire un saut d'exon en recrutant la protéine PTB (Luco et al., 2010) mais peut également interagir avec le facteur d'épissage SRSF1 (Pradeepa et al., 2012). D'autres modifications de méthylation des histones telles que H3K27me1, H3K27me2, H4K20me1 et H3K79me1 ont également été signalées comme marqueurs d'exons. L'acétylation des histones influençant la vitesse d'élongation de l'ARN pol II, l'activité des histones désacétylases (HDAC) a un impact considérable sur l'AS, en permettant notamment le recrutement des facteurs d'épissage tels que SRSF5 sur les sites cibles (Hnilicová et al., 2011). Ainsi, certains inhibiteurs d'HDAC pourraient potentiellement être utilisés dans le traitement des maladies liées aux défauts d'épissage (Rahhal and Seto, 2019).

III.4. Surveillance des ARNs : cas des transcrits d'Ig non-productifs

Dans les cellules B, les recombinaisons V(D)J entraînent un décalage du cadre de lecture aboutissant à l'apparition d'un codon stop prématuré PTC (pour « *premature termination codons* ») dans environ deux tiers des cas (voir § I.2.2). Dans les GC, le processus de SHM peut également conduire à l'apparition de mutations non-sens (voir § I.4.1). Ainsi, les transcrits d'Ig contenant des PTCs sont extrêmement abondants dans la lignée B et subissent des mécanismes de surveillance des ARN comme le NMD et le NAS (pour « *nonsense-associated altered splicing* »). La description de ces mécanismes, de même que leur implication au cours du développement B et de la différenciation plasmocytaire a fait l'objet de 2 revues présentées en annexes (Lambert et al., 2020, 2019). Seuls les points clés seront présentés plus loin.

De nombreuses études incluant celles menées au sein du laboratoire ont mis en évidence une transcription active des allèles d'Ig non-productifs (Li and Wilkinson, 1998). En effet, les allèles VDJ+/VDJ- présentent des taux de transcription équivalents et une charge d'ARN Pol II similaire dans des cellules B stimulées par le LPS (Ashi et al., 2019; Tinguely et al., 2012).

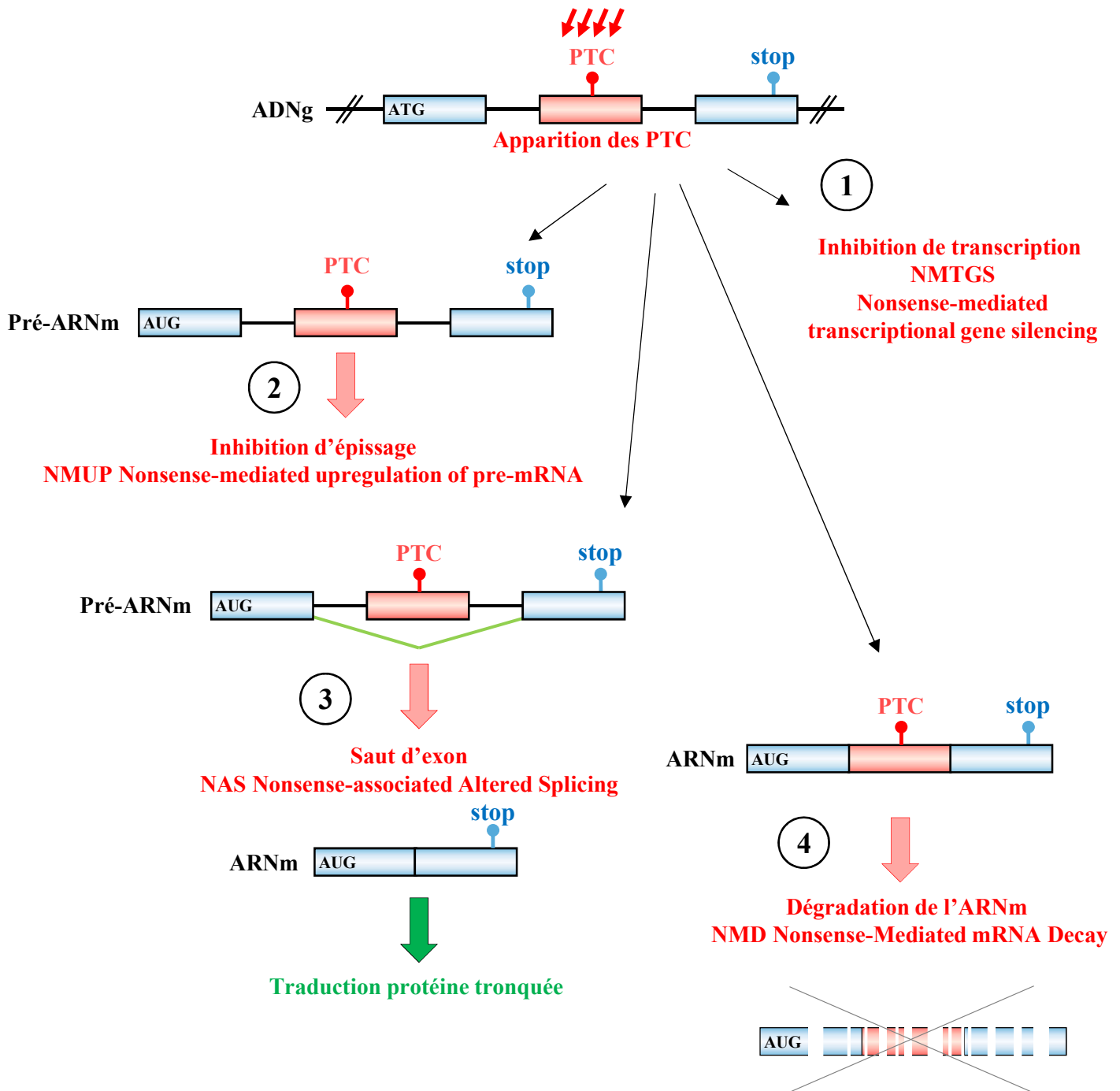


Figure 27 : Les mécanismes impliqués dans la surveillance des ARN.

La surveillance des transcrits présentant des codons stop prématurés (PTC) peut s'effectuer à différents stades. Tout d'abord une inhibition spécifique de la transcription (1) peut se produire par le mécanisme de NMTGS. Une inhibition d'épissage des transcrits primaires contenant des PTCs encore appelée NMUP a également été observée (2). Le phénomène de NAS permet quant à lui d'éliminer l'exon contenant un PTC, le plus souvent par saut d'exon (3). Enfin, les ARNm contenant un PTC peuvent être dégradés par NMD.

PTC: Premature Termination Codon

Malgré cette transcription bi-allélique, les ARNm d'Ig contenant des PTCs subissent une dégradation par NMD très efficace et sont quasiment indétectables dans les cellules B matures, limitant ainsi la production d'Ig aberrantes potentiellement toxiques (Tinguely et al., 2012 ; Li and Wilkinson, 1998) (**Figure 27**). D'autres mécanismes de surveillance contribuent à diminuer le taux d'ARNm d'Ig contenant des PTC en agissant au niveau de l'épissage. Ces transcrits primaires peuvent subir : soit une inhibition d'épissage qui bloque leur maturation par un mécanisme nommé NMUP (pour « *nonsense-mediated upregulation of pre-mRNA* »), soit un phénomène analogue de suppression d'épissage appelé SOS (pour « *suppression of splicing* »), soit un épissage alternatif appelé NAS qui aboutit le plus souvent à l'exclusion de l'exon contenant le PTC (Lambert et al., 2020, 2019).

III.4.1. Nonsense-associated Altered Splicing (NAS)

Hormis le fait d'assurer une diminution de la quantité d'ARNm contenant des PTC, l'activation du NAS ne semble pas avoir de but précis puisque les transcrits alternatifs produits par ce processus vont eux-mêmes coder des protéines tronquées, potentiellement fonctionnelles mais dans certains cas, toxiques pour la cellule (Maquat, 2002; Srour et al., 2016). Selon la nature des mutations, deux classes de NAS ont été décrites : le NAS de classe I dont l'appellation est discutable puisque ce processus ne repose pas sur la présence d'un PTC mais sur des mutations de séquences régulatrices d'épissage et le NAS de classe II qui est induit par le PTC mais dont les mécanismes moléculaires sont mal connus, en particulier les étapes clés permettant la reconnaissance d'un PTC avant ou moment de l'épissage (Bühler et al., 2005; Chang et al., 2007; Mohn et al., 2005).

Le NAS de classe I est déclenché lors de l'apparition de mutations perturbant les éléments cis-régulateurs de l'épissage comme des mutations inactivant des ESE ou inhibant des ESS. Tous les types de mutations (non-sens, faux-sens ou silencieuses) capables de perturber l'assemblage du spliceosome peuvent être mises en cause (Cartegni et al., 2002; Chang et al., 2007; Maquat, 2002; Valentine, 1998). Le NAS de classe I est un phénomène indépendant de la traduction qui est notamment décrit pour les gènes du TCR β et I γ μ (Buchner et al., 2003; Bühler and Mühlemann, 2005; Caputi et al., 2002; Chang et al., 2007; Liu et al., 2001; Mohn et al., 2005; Pagani et al., 2003). Une étude sur le TCR β , menée par l'équipe de Wilkinson, a également montré que ces transcrits pouvaient être soumis aux NAS I et II. A l'aide de constructions TCR β abritant soit des mutations non-sens, soit des mutations faux-sens ou

silencieuses, ces auteurs ont montré que les mutations au niveau des ESE augmentaient le NAS indépendamment du cadre de lecture, tandis qu'en dehors des ESE, seules les mutations non-sens favorisaient ce phénomène uniquement en présence d'un PTC (Chang et al., 2007).

Le NAS de classe II intervient donc seulement en présence d'un PTC et il se manifeste par une altération de l'épissage menant à un saut d'exon complet (ou partiel, des sites d'épissages cryptiques existent sur l'exon). Contrairement au NAS de classe I, le NAS de classe II (appelé NAS pour la suite) dépendrait donc de la synthèse protéique. Dans ce sens, l'activation du NAS peut être inhibée par l'absence d'ARNt (Gersappe et al., 1999) ou par des mutations sur le site initiateur de la traduction AUG ou sur la séquence régulatrice de Kozak (Wang et al., 2002b, 2002a). La connexion du NAS avec la traduction est également soutenue par l'intervention d'UPF1 (pour « *up-frameshift protein 1* ») qui est un acteur majeur du processus de NMD dépendant de la traduction (voir ci-après). Cependant, NMD et NAS sont des processus très différents, et la suppression d'autres facteurs du NMD comme UPF2, UPF3A, UPF3B et SMG1 n'a aucun effet significatif sur le NAS (Chang et al., 2007; Hwang and Kim, 2013; Mendell et al., 2002).

Les études menées par notre équipe sur les transcrits d'Ig non-productifs plaident plutôt en faveur d'un NAS dépendant de la position du PTC. En effet, suite à l'utilisation des mini-gènes porteurs de mutations à la jonction VJ conduisant à l'apparition de PTC soit à la fin de l'exon V (V^{PTC}) soit dans l'exon constant en aval C κ (C^{PTC}) (Chemin et al., 2010; Srour et al., 2016), un taux élevé de transcrits alternatifs dépourvus d'exon V a été observé uniquement dans les cellules transfectées avec les constructions V^{PTC} . De plus, des analyses bio-informatiques n'ont pas relevé de différences sur les séquences ESE ou ESS entre les constructions V^{PTC} et C^{PTC} , renforçant ainsi l'hypothèse d'un NAS dépendant du cadre de lecture et induit par la présence d'un PTC (Chemin et al., 2010). Une autre étude a récemment mis en évidence que l'efficacité du NAS des transcrits d'Ig non-productifs est considérablement augmentée dans les PC par rapport aux cellules B (Ashi et al., 2019), suggérant un lien étroit entre le NAS et l'élongation de la transcription comme décrit précédemment pour l'AS (voir § III.4.1). En effet, dans les PC, les gènes Ig sont localisés dans des usines de transcription qui autorisent la coopération avec des « enhancers » pour augmenter leur transcription (Park et al., 2014).

La forte activation du NAS des transcrits d'Ig non-productifs dans les PC conduit à un saut de l'exon V^{PTC} et à la production d'Ig sans domaine V (**Figure 28**). De façon intéressante, les PC exprimant ces chaînes d'Ig tronquées présentent un stress exacerbé du RE conduisant à l'apoptose (Srour et al., 2016). Ce nouveau point de contrôle tardif appelé « *TIE-checkpoint* »

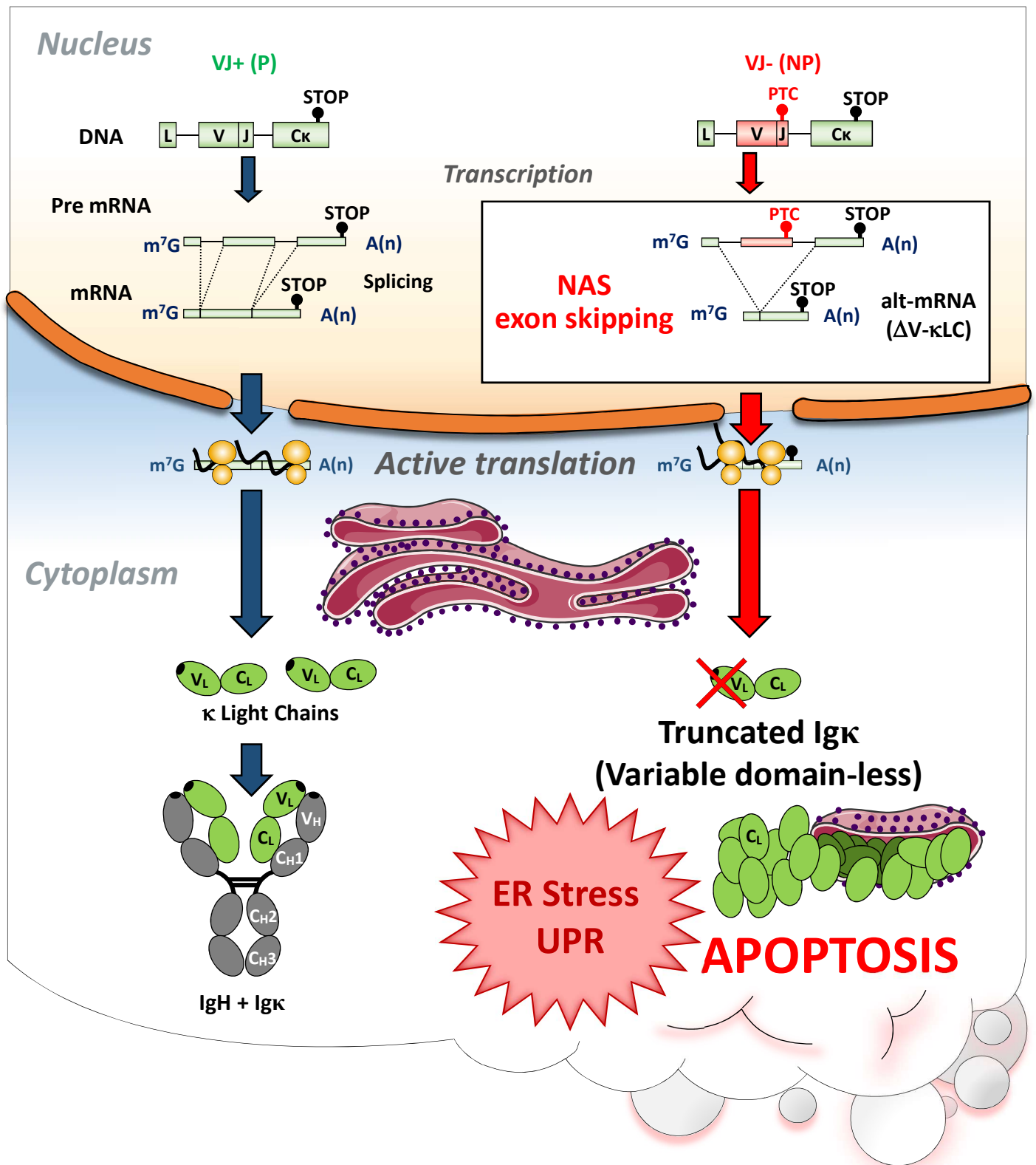


Figure 28 : NAS des transcrits Igk non-productifs et induction d'apoptose dans les plasmocytes.

La plupart des cellules B hébergent des réarrangements de gènes d'Ig non-productifs (NP) (voir Figure 1 Annexe 2). L'augmentation de la transcription des gènes d'Ig qui accompagne la différenciation plasmocytaire active le NAS et provoque un saut de l'exon variable (V) contenant un PTC, induisant la production de chaînes d'Ig tronquées sans domaine V (ΔV - κLC). Les PC étant naturellement sensibles à des variations de stress du RE, la présence de ces chaînes aberrantes conduit à leur l'apoptose prématurée. Ainsi, de nombreux clones de PC hébergeant des réarrangements d'Igk bi-alléliques sont éliminés, par ce processus nommé TIE-checkpoint (« Truncated-Ig exclusion »), indépendamment de leur spécificité antigénique. L'existence de ce nouveau point de contrôle tardif révèle que les allèles d'Ig NP peuvent avoir un impact fort sur le développement B. Concernant le NAS, ces observations confirment que ce processus de surveillance des ARN ne présente pas de réel avantage, et semble même au contraire très risqué (D'après Lambert et al., 2020).

(« *truncated-Ig exclusion* ») permet d'éliminer les PC hébergeant des réarrangements d'Igk non-productifs et exprimant des Ig tronquées.

Mon travail de thèse repose sur ces résultats permettant d'envisager une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement du MM (Delpy et al., 2017; WO2017/089359). Cette stratégie de saut d'exon est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides-antisens (ASO) capables de masquer les sites d'épissage de l'exon V pour induire la production d'Ig tronquées. Dans le cadre d'une médecine personnalisée, cette thérapie par saut d'exon pourrait conduire à l'élimination spécifique du clone tumoral (**Article1**).

III.4.2. Dégradation des ARNm non-sens : Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)

Le NMD est un mécanisme contrôlant la qualité de l'expression génique, dépendant de la traduction et très conservé au cours de l'évolution. Historiquement, ce mécanisme a été découvert chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Losson and Lacroute, 1979). Initialement décrit comme impliqué dans la dégradation des ARNm contenant des PTC, le NMD peut également cibler environ 10% des ARNm normaux chez les mammifères (Martins et al., 2012; Ottens and Gehring, 2016). Le NMD cible donc des ARNm présentant les caractéristiques suivantes : une mutation non-sens, un événement d'AS induisant l'apparition d'un PTC, la présence d'un cadre ouvert de lecture en amont (uORF) ou de codons sélénocystéine, et enfin une région 3'UTR anormalement longue ou un événement d'épissage au sein de cette dernière. Il a été estimé qu'environ 30% des maladies humaines héréditaires sont dues à la présence de PTC dans les ARNm (Popp and Maquat, 2016). Concernant l'implication du NMD dans les cellules B, de nombreuses études ont montré une dégradation très efficace pouvant diminuer jusqu'à 100 fois le taux de ARNm d'Ig porteurs de PTC (Chemin et al., 2010; Delpy et al., 2004; Lambert et al., 2020, 2019; Li and Wilkinson, 1998; Tinguely et al., 2012).

III.4.2.1. Les acteurs majeurs du NMD

Chez les mammifères, la machinerie NMD comprend plusieurs protéines importantes qui constituent des complexes clés : le complexe kinase (SMG1, SMG8 et SMG9), les protéines UPF (UPF1, UPF2, UPF3A et UPF3B), les facteurs de libération eucaryotes (eRF1 et eRF3), le complexe de jonction d'exon (EJC pour « *exon junction complex* ») (eIF4A3, RBM8A, MAGOH et MLN51) et les protéines SMG (SMG5, SMG6 et SMG7) qui déclenchent la

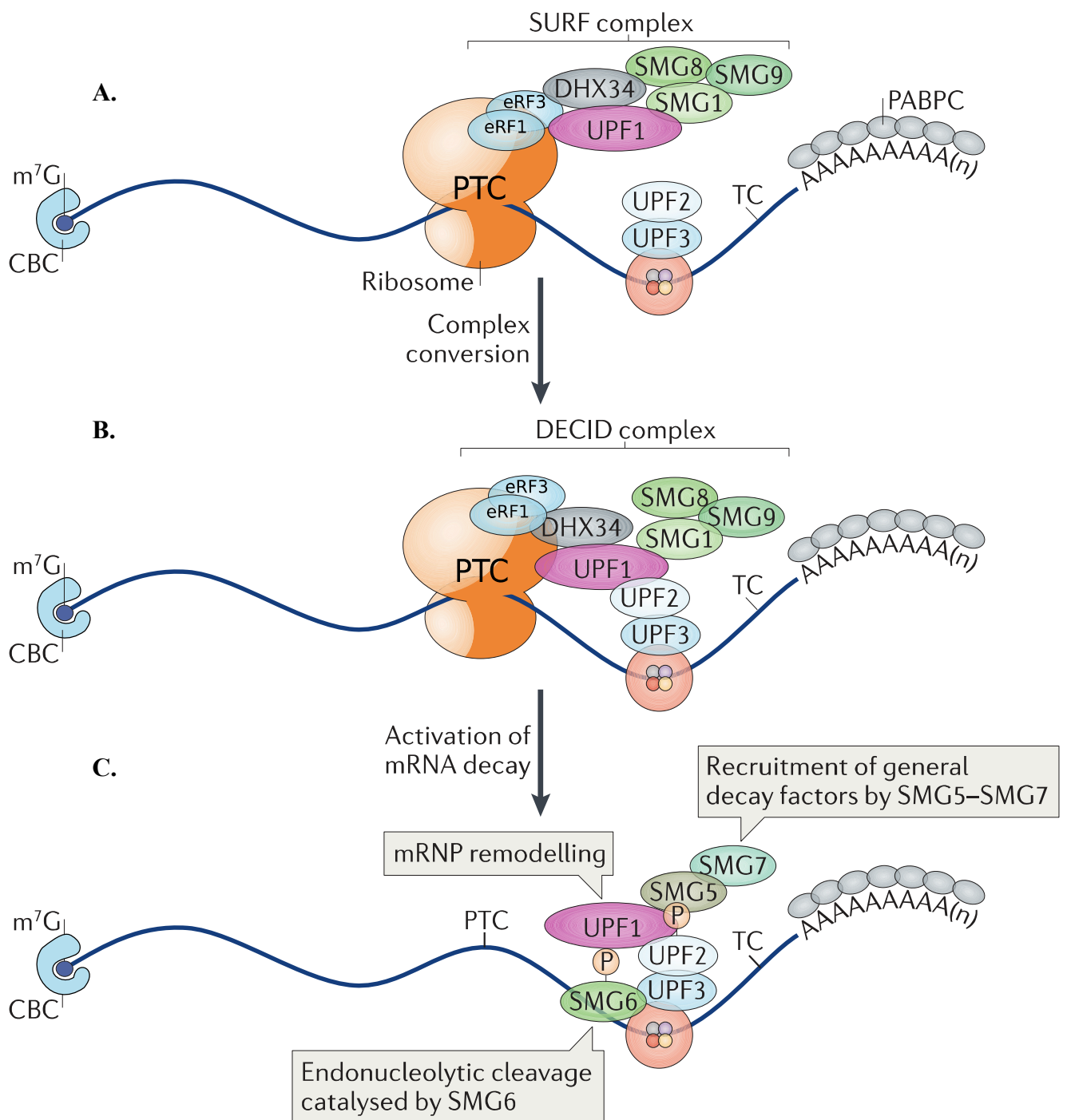


Figure 29 : Mécanisme de NMD et mise en place du complexe de surveillance.

A. La première lecture d'un ARNm par le ribosome permet de décrocher les complexes EJC présents en amont de chaque jonction exon-exon. La présence de PTC provoque un arrêt de la traduction, empêchant ainsi le décrochage des EJC situés en aval tout en favorisant le recrutement du complexe SURF (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 et aussi SMG8-SMG9).

B. UPF1 interagit alors avec UPF2-UPF3 fixés à l'EJC en aval pour former le complexe DECID.

C. L'hélicase DHX34 va activer SMG1 et permettre la phosphorylation d'UPF1 pour déclencher la dégradation par NMD. En effet, UPF1 phosphorylée recrute SMG6 et le complexe SMG5-SMG7 respectivement responsables de la dégradation endo- et exo-nucléolytique des transcrits contenant des PTC (Extrait de Le Hir et al., 2016).

PTC: premature terminaison codon, CBC: Cap-Binding Complex; EJC: Exon Junction Complex; eRF: eukaryotic Release Factor; m⁷G: 7-methylGuanosine; PABPC: cytoplasmic poly(A)-binding protein.

dégradation des cibles d'ARNm (**Figure 29**) (Boehm and Gehring, 2016; Karousis et al., 2016; Lykke-Andersen and Jensen, 2015; Schweingruber et al., 2013).

III.4.2.1.1. Les protéines UPF

Les protéines UPF (pour « *up-frameshift protein* ») sont les actrices majeures du mécanisme de NMD. Quatre protéines UPF ont été identifiées : UPF1, UPF2, UPF3a et UPF3b (ou UPF3X).

UPF1 et UPF2 sont localisées principalement dans le cytoplasme, tandis que UPF3 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme. Les 3 UPF interagissent ensemble, mais aussi avec les ribosomes, et d'autres molécules de la machinerie de traduction et du NMD. UPF1 ou RENT1 (pour « *regulator of nonsense transcripts 1* ») a un rôle central dans le mécanisme de NMD. UPF1 contient deux domaines fonctionnels conservés : un domaine ATPase dépendant de l'ARN riche en cystéine et histidine en N-ter, et un domaine hélicase ARN dépendant de l'ATP en C-ter (Chamieh et al., 2008; Fiorini et al., 2013; Gupta and Li, 2018; Shigeoka et al., 2012). UPF1 hydrolyse l'ATP pour se déplacer de 5' à 3' le long des ARN et déroule l'ARN grâce à son activité hélicase dans cette même direction, probablement pour éliminer les ribonucléoprotéines (RNP) des ARNm ciblés et ainsi favoriser leur dégradation par d'autres facteurs NMD (Fiorini et al., 2015; Franks et al., 2010). Le domaine hélicase des UPF1 humaines s'associe à environ 10 nucléotides sur l'ARN et a une activité de translocation lente (1,92 pb/s) mais hautement processive (environ 10kb) (Chakrabarti et al., 2011; Chamieh et al., 2008; Fiorini et al., 2015; Kanaan et al., 2018). Les mutations qui éliminent les activités de liaison et d'hydrolyse de l'ATP d'UPF1 abolissent le NMD (Weng et al., 1998, 1996a, 1996b). De plus, une élimination de ces activités empêche l'association avec la sous-unité 40S du ribosome (Min et al., 2013), inhibe le désassemblage des RNP terminaux, étape essentielle à la dégradation 3' exonucléolytique du substrat NMD (Franks et al., 2010), et pour finir empêche le recyclage des composants de la traduction et notamment des ribosomes après l'arrêt de la traduction ainsi que des facteurs de NMD (Ghosh et al., 2010). L'activité hélicase de UPF1 est aussi importante, car par exemple, une mutation (R844C) abolissant cette activité inhibe l'activité NMD dans les cellules de mammifères (Sun et al., 1998). Les extensions N- et C-terminales d'UPF1 contiennent de multiples résidus de sérine ou thréonine phosphorylables qui permettent d'interagir avec les différentes protéines SMG5, SMG6 et SMG7 (Nicholson et al., 2014; Ohnishi et al., 2003; Okada-Katsuhata et al., 2012; pour revue Chakrabarti et al., 2014). De plus, ces extensions peuvent lier la protéine DCP2 (pour « *decapping mRNA 2* ») impliquée dans le « décoiffage » des extrémités 5'm7G, indispensable pour l'élimination de l'ARNm

(Lykke-Andersen, 2002). Pour finir, UPF1 s'associe aussi avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (pour « *eukaryotic release factor* ») pour former le complexe SURF (SMG1 – UPF1 – eRF1 – eRF3) (Kashima et al., 2006).

UPF2 est considéré comme un adaptateur moléculaire entre UPF1 et UPF3 (Chamieh et al., 2008; Clerici et al., 2009) et contient des domaines MIF4G (pour « *Middle domain of eIF4G-like* ») dans sa région centrale et N-terminale. Ces domaines permettent l'interaction d'UPF2 avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4/eIF3 (pour « *eukaryotic initiation factor* »), et avec UPF3 et SMG1. Sa partie C-ter possède un domaine de localisation nucléaire NLS (pour « *nuclear localization sequence* ») et permet l'interaction avec UPF1 (Mendell et al., 2000). L'interaction UPF1/UPF2 favorise l'activité d'hélicase d'UPF1 et permet le déroulement de l'ARN (Chakrabarti et al., 2011; Chamieh et al., 2008). Lors de l'apoptose, un clivage d'UPF1 et UPF2 par des caspases conduit à une inhibition du NMD (Jia et al., 2015; Lejeune, 2017).

UPF3 est le moins conservé des trois facteurs UPF (Culbertson and Leeds, 2003). Il existe deux isoformes UPF3a (nommée aussi UPF3 et située sur le chromosome 13) et UPF3b (ou UPF3X sur le chromosome X) dans les cellules de mammifères (Serin et al., 2001). Ces protéines possèdent un domaine RRM central (pour « *RNA recognition motif* ») qui peut se lier à UPF2 (Kadlec et al., 2004; Serin et al., 2001), et leur domaine C-terminal se lie sur le complexe de jonction exon-exon (EJC) (Buchwald et al., 2010; Ghosh et al., 2010). UPF3X peut aussi se lier à la partie N-terminale du facteur de terminaison de la traduction eRF3 pour former un complexe eRF1/eRF3/UPF3X qui provoque la libération du ribosome bloqué sur le PTC (Neu-Yilik et al., 2017). UPF3 est une protéine de navette entre le cytoplasme et le noyau mais qui, à l'état d'équilibre, se trouve principalement dans le noyau (Serin et al., 2001). Les deux isoformes ne semblent pas avoir la même fonction. Si UPF3X se fixe sur la partie 3'UTR d'ARNm exempt de PTC, elle induit sa dégradation par NMD de manière importante alors que l'effet de UPF3 est moindre dans les mêmes conditions (Lykke-Andersen et al., 2000). De plus, l'inactivation de UPF3X par ARNi inhibe le NMD contrairement à celle de UPF3 (Kunz et al., 2006).

III.4.2.1.2. Les protéines SMG

En plus des principaux facteurs UPF, l'activation du NMD nécessite les protéines SMG (pour « *suppressor of morphological defects on genitalia* ») au nombre de 6 : SMG1 et SMG 5 à 9.

SMG1, SMG8 et SMG9 forment un complexe kinase qui catalyse la phosphorylation de UPF1. SMG8 et SMG9 permettent la régulation de SMG1 mais aussi la mise en place du

complexe SURF (SMG1, UPF1 et les facteurs eRF1 et eRF3). SMG8 régule négativement l'activité kinase de SMG1 par sa liaison à sa partie N-ter et SMG9 permet l'interaction de SMG1 à SMG8. Lors de la dissociation de SMG8 et SMG9, l'activité kinase est assurée par SMG1, une protéine de la famille des PIKKs (pour « *phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases* ») qui phosphoryle UPF1 dans sa partie N-ter. La phosphorylation se produit dans le complexe DECID (pour « *decay-inducing complex* ») avec la présence de UPF2, UPF3, et les composants de l'EJC (Kashima et al., 2006).

SMG5, SMG6 et SMG7 sont des protéines préférentiellement impliquées dans la déphosphorylation d'UPF1, sans activité phosphatase directe mais par le biais d'un recrutement des protéines phosphatase telles que PP2A (pour « *phosphatase protein 2a* »). Elles possèdent des domaines de type 14.3.3 qui interagissent avec UPF1 phosphorylée (Chakrabarti et al., 2014; Fukuhara et al., 2005; Jonas et al., 2013; Ohnishi et al., 2003; Okada-Katsuhata et al., 2012). SMG5 et SMG6 contiennent chacune un domaine PIN (pour « *C-terminal pilt N-terminus* »), un motif similaire lié aux ribonucléases de la famille RNase H qui provoque un clivage des ARNm substrats de NMD pour initier leur dégradation (Boehm et al., 2014; Eberle et al., 2009; Glavan et al., 2006; Huntzinger et al., 2008; Lykke-Andersen et al., 2014; Schmidt et al., 2015). SMG5 et SMG7 forment un hétérodimère avec leurs domaines de type 14-3-3 qui interagit avec SMG7 pour recruter le complexe CCR4-NOT, une déadénylase qui favorise le « decapping » de l'ARNm en 3' (Loh et al., 2013; Unterholzner and Izaurralde, 2004).

III.4.2.1.3. Les facteurs eRF « eukaryotic release factors »

L'arrêt de la traduction de l'ARNm se produit lorsqu'un codon stop normal ou prématuré (UAA, UAG et UGA) se localise dans le site A du ribosome. Chez les eucaryotes cet arrêt est médié par les facteurs de libération eRF1 et eRF3.

eRF1 possède un domaine N-ter qui est responsable de la reconnaissance du codon stop dans le site A du ribosome, un domaine central contenant un motif GGQ qui induit la libération du polypeptide naissant du site ribosomal P et un domaine C-ter qui se lie à eRF3 et ABCE1 (pour « *ATP binding cassette subfamily E member 1* »). eRF3 a un domaine N-ter qui se lie à la protéine PABP (pour « *poly(A)-binding protein* ») et à UPF3X (pour revue Hellen, 2018). Les facteurs eRF1 et eRF3 sont liés fonctionnellement au NMD par l'interaction avec les 3 protéines UPF et ces interactions permettent de recruter la machinerie du NMD. UPF1 interagit avec eRF1 et eRF3, et conduit à la formation du complexe SURF. La liaison d'UPF1 à eRF1 et eRF3 inhibe son activité ATPase, soutenant l'hypothèse qu'UPF1 est initialement recrutée sous

une forme inactive sur un ribosome prématurément bloqué et est ensuite activée par interaction avec le complexe UPF2/UPF3 (Chamieh et al., 2008; Czaplinski et al., 1998).

III.4.2.1.4. Le complexe EJC

Le complexe EJC (pour « *exon junction complex* ») est un complexe ribonucléoprotéique de liaison à l'ARN qui est assemblé et déposé sur les ARNm à 20–24 nt en amont d'une jonction exon-exon pendant l'épissage (Le Hir et al., 2000). Le recrutement et la liaison stable de ce complexe dépendent de l'épissage et se déroulent dans le noyau. Ce complexe reste ensuite associé dans le cytoplasme jusqu'à la traduction. L'EJC est considéré comme un élément régulateur post-transcriptionnel permettant le lien entre l'épissage, le NMD, le transport et la traduction (Hir et al., 2016a). Le cœur de ce complexe est formé de quatre protéines conservées: eIF4AIII (DDX48), Y14 (RBM8A), MAGOH et MLN51 (BTZ ou CASC3) (Tange et al., 2005).

La protéine eIF4AIII (pour « *eukaryotic initiation factor 4AIII* ») est la principale protéine de liaison à l'ARN de l'EJC avec deux domaines de type RecA qui se lie sur une séquence d'environ huit nucléotides d'ARN (Bono et al., 2006) à 20–24 nt en amont d'une jonction exon-exon. La séquence peut varier, car cette liaison n'implique pas les bases d'ARN mais se produit principalement via le squelette ribose-phosphate. Néanmoins, les EJC montrent une préférence de liaison aux séquences riches en purines, en particulier un motif GAAGAA qui ressemble au site de liaison des protéines riches en sérine/arginine (protéines SR) (Boehm and Gehring, 2016; Saulière et al., 2012). La liaison directe de MLN51 à EIF4A3 est indépendante de MAGOH-Y14, et la fonction principale de ce dernier hétérodimère est de verrouiller EIF4A3 dans sa conformation liée à l'ARN en inhibant son activité ATPase (Ballut et al., 2005). Le complexe EIF4A3, MAGOH et Y14 se lie au spliceosome de manière transitoire pour donner un complexe trimérique pré-EJC qui s'associe à l'ARN au site de liaison de l'EJC. Après l'épissage, la ligature des exons et la libération du spliceosome, MLN51 rejoint le pré-EJC pour former l'EJC tétramérique stable et mature (Gehring et al., 2009).

La fixation de l'EJC permet d'initier une cascade d'interactions protéine-protéine aboutissant à l'assemblage d'un complexe NMD fonctionnel (pour revue Fatscher et al., 2015). Ainsi, l'EJC interagit grâce à son site de liaison composite formé par l'assemblage du complexe EIF4A3, Y14 et MAGOH directement avec le facteur du NMD UPF3, qui est recruté via son motif de liaison à l'EJC (EBM pour « EJC-binding motif ») (Buchwald et al., 2010; Gehring et al., 2003). Après recrutement de UPF2, le complexe UPF2/UPF3 forme un pont moléculaire entre l'EJC et UPF1 qui fait partie du complexe SURF. Cette étape aboutit à la formation du complexe

DECID (pour « *decay inducing complex* ») et à la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 de (Yamashita, 2013) (**Figure 29**).

L'association différentielle de l'EJC avec d'autres facteurs tels que RNPS1 (Lykke-Andersen et al., 2001; Viegas et al., 2007), SRSF1 (Aznarez et al., 2018; Sato et al., 2008; Zhang and Krainer, 2004), CWC22 (Steckelberg et al., 2015) et ICE1 (Baird et al., 2018) peut également moduler l'efficacité du NMD.

Au final, beaucoup de protéines interagissant avec l'EJC ont été identifiées comme par exemple, des facteurs liés à l'épissage RNPS1, SRM 160, PININ et UAP56, des facteurs de localisation ou d'export de l'ARN tels que ALY/REF et TAP (pour revue Le Hir et al., 2016). Au-delà du NMD, l'EJC participe à la régulation de l'épissage alternatif (Ashton-Beaucage et al., 2010; Roignant and Treisman, 2010; Z. Wang et al., 2014), à l'exportation (Le Hir et al., 2001; Schmidt et al., 2006) et à la traduction des ARNm (Chazal et al., 2013; Diem et al., 2007; Isken et al., 2008).

III.4.2.2. Dégradation par NMD dépendante de l'EJC : cas des ARNm IgH non-productifs

Dans les cellules eucaryotes, le mécanisme de NMD dépendant de l'EJC repose sur la présence d'un PTC positionné à au moins à 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon (règle des 50-55nt) (Nagy and Maquat, 1998). La fixation de l'EJC à 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon est à l'origine de cette règle de position. Ainsi, les codons stop physiologiques situés dans le dernier exon sont insensibles au NMD (Maquat and Li, 2001).

En absence de PTC, la première étape de lecture de l'ARNm par le ribosome permet de retirer tous les complexes EJC fixés et conduit au remplacement de l'hétérodimère CBP20/CBP80 (CBC) par eIF4E sur la coiffe à l'extrémité 5' et de la protéine PABPN1 (pour « *poly (A)-binding protein nuclear 1* ») par PABPC1 (pour « *poly (A)-binding protein cytoplasmic 1* ») à l'extrémité 3'. Ces modifications autorisent de multiples étapes de traduction par de nombreux ribosomes (pour revue Rissland, 2017; Sato and Maquat, 2009). Si le ribosome rencontre un PTC respectant la règle des 50-55 nt, celui-ci sera arrêté et ne pourra pas continuer sa primo-lecture afin de déplacer les derniers complexes EJC (**Figure 29**). Les complexes de terminaison de la traduction (eRF1, eRF3) vont se fixer au site A du ribosome. SMG1 et UPF1 sont ensuite recrutés par eRF1 et eRF3 pour former le complexe SURF (SMG1 – UPF1 – eRF1 – eRF3). La protéine de la coiffe CBP80 favorise aussi l'association de SURF (pour revue Schoenberg and Maquat, 2012). Ensuite, favorisé par l'ARN hélicase DHX34 et par la protéine

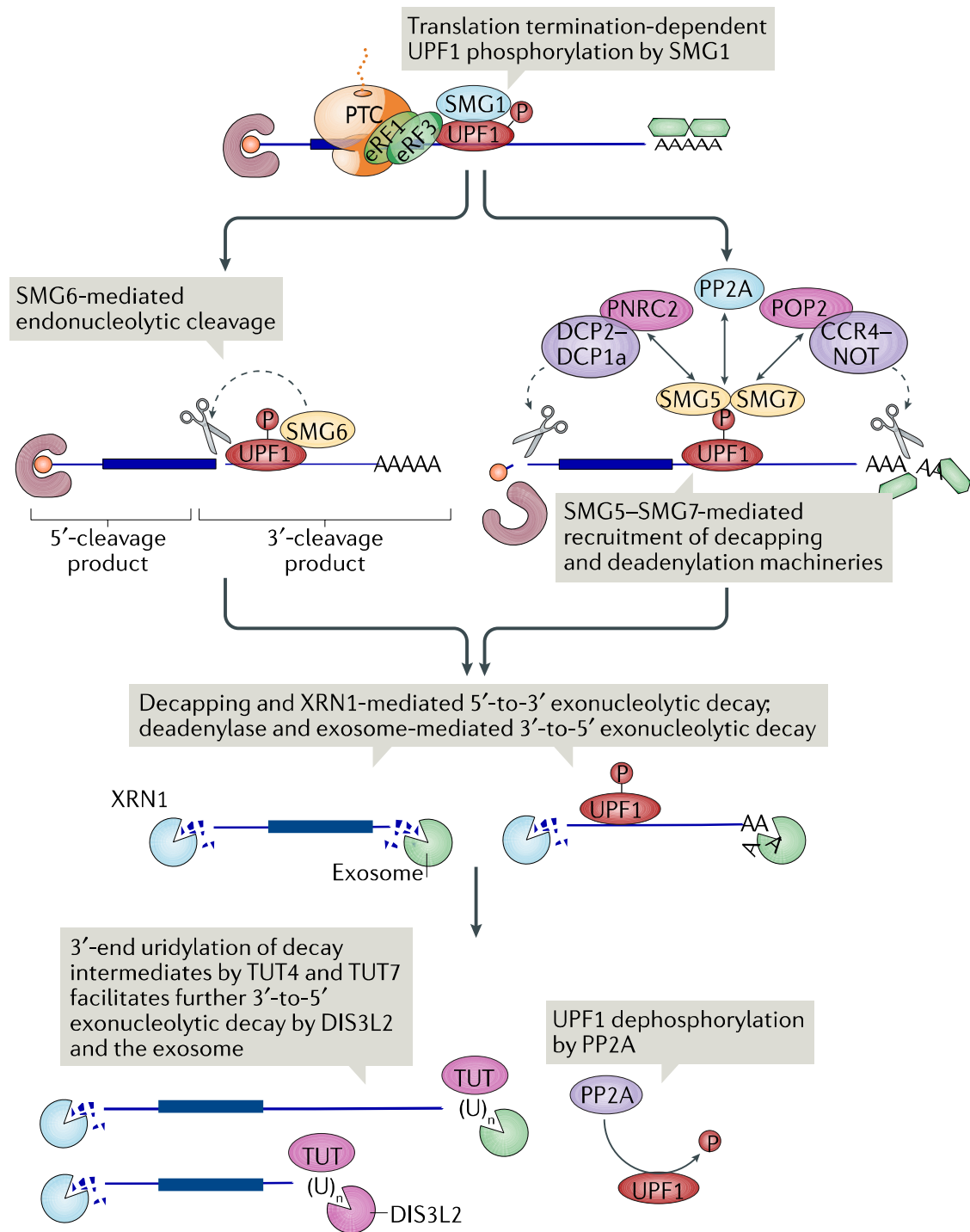


Figure 30 : Dégradation des ARNm substrats de NMD.

SMG6 clive l'ARNm près du PTC, tandis que SMG5-SMG7 recrute le complexe de deadénylation CCR4-NOT via sa sous-unité POP2 et l'enzyme de « decapping » DCP2-DCP1a via sa sous-unité PNRC2. SMG5-SMG7 recrute également la protéine phosphatase PP2A, qui déphosphoryle UPF1. Les intermédiaires de dégradation de l'une ou l'autre des voies sont dégradés de 5' vers 3' par l'exonucléase XRN1 et de 3' vers 5' par l'exosome ou l'exonucléase DIS3L2. Les uridylyltransférases terminales TUT4 et TUT7 peuvent ajouter des uridines aux extrémités 3' pour favoriser la dégradation par DIS3L2 (D'après Kurosaki et al., 2019).

de coiffe CBP80, UPF1 rejoint l'EJC en aval en interagissant avec UPF2 et UPF3, formant le complexe DECID (pour « *decay-inducing complex* ») (Hug and Cáceres, 2014; Kashima et al., 2006). La phosphorylation de UPF1 par SMG1 conduit à l'inhibition de la traduction (Isken et al., 2008) et également au recrutement de SMG6 et du complexe SMG5/SMG7 (Okada-Katsuhata et al., 2012; pour revue Hir et al., 2016b). Ainsi, deux voies sont possibles pour la dégradation des ARNm substrats de NMD après la phosphorylation d'UPF1 : la voie de dégradation médiée par SMG6 qui induit un clivage endonucléolytique à proximité du PTC puis la dégradation des deux fragments par des exonucléases, et la voie de dégradation exonucléolytique médiée par SMG5-SMG7 qui conduit au recrutement des enzymes de déadénylation et de « *decapping* » (**Figure 30**). Le complexe SMG5-SMG7 recrute la déadénylase CCR4-NOT via sa sous-unité POP2 et les enzymes de « *decapping* » DCP2-DCP1a (pour « *mRNA-decapping enzyme* ») via sa sous-unité PNRC2. La dégradation est réalisée par les exonucléases 3'-5' comme le « *RNA exosome* » et par les exonucléases 5'-3' telles que XRN1 ou DIS3L2 (pour « *DIS3-like exonuclease 2* ») (Kurosaki et al., 2019). Les intermédiaires de dégradation peuvent subir aussi des ajouts d'uridine par l'uridylyltransférase 4 (TUT4) et TUT7. Alors que l'ajout de résidus non uridiques aux extrémités 3' inhibe la dégradation, l'addition d'uridines favorise la dégradation de 3' à 5' par la DIS3L2 (Kurosaki et al., 2018). SMG5-SMG7 recrute également la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui déphosphoryle UPF1, permettant de déclencher le processus de dégradation.

Concernant les chaînes lourdes d'Ig, les processus de recombinaisons VDJ ou de SHM peuvent entraîner l'apparition de PTC au niveau de l'exon variable ou dans le premier exon constant (CH1). Dans ces deux cas, les positions des PTC respectent la règle des 50-55nt et les transcrits non productifs sont très efficacement dégradés par un mécanisme de NMD dépendant de l'EJC. Il a été montré que les ARNm d'IgH contenant des PTC sont fortement dégradés par le NMD (jusqu'à 100 fois) (Baumann et al., 1985; Li and Wilkinson, 1998; Tinguely et al., 2012). Cependant, certains PTC dans la moitié 5' de l'exon VDJ ne provoquent pas une forte dégradation par NMD (Bühler et al., 2004). De même, les transcrits avec des PTC proches du codon d'initiation ne sont pas sensibles au NMD dans d'autres modèles, probablement en raison d'une interaction critique entre PABPC1 et le complexe d'initiation de la traduction (Inácio et al., 2004; Peixeiro et al., 2012).

Afin d'étudier la dégradation par NMD des ARNm d'IgH contenant des PTC au cours du développement B, notre équipe a développé une souche de souris avec un allèle IgH non fonctionnel grâce à l'insertion d'un exon (V κ) non-sens supplémentaire entre JH et C μ

(Tinguely et al., 2012). Ce modèle « frVκKI » (pour « *frameshift-inducing Vκ exon knock-in* ») autorise les recombinaisons VDJ et, selon le nombre de nucléotides insérés à la jonction, les PTC apparaissent soit dans l'exon VDJ, soit dans l'exon additionnel « frVκKI », soit dans l'exon constant CH1. Ainsi, la position des PTC sur les ARNm d'IgH « frVκKI » permet un NMD dépendant de l'EJC quelle que soit la nature de la jonction VDJ. L'efficacité du NMD a pu être facilement évaluée dans des souris hétérozygotes, en quantifiant la quantité d'ARNm d'IgH « frVκKI » contenant un PTC après traitement avec des inhibiteurs du NMD classiquement utilisés, comme le cycloheximide (CHX) ou le wortmannin (wort). Grâce à ce modèle, il a été montré que l'efficacité du NMD fluctuait au cours du développement des lymphocytes B. Dans les cellules B de la moelle osseuse, y compris les précurseurs et les plasmocytes, le traitement avec des inhibiteurs de NMD a augmenté le niveau d'ARNm d'IgH « frVκKI » contenant des PTC d'environ 5 fois, indiquant qu'environ 80% des transcrits d'IgH non productifs étaient dégradés par NMD. En revanche, dans les cellules B matures naïves, la dégradation des transcrits d'IgH non productifs a chuté à environ 50%. De plus, l'efficacité du NMD augmente après l'activation des cellules B, avec une dégradation par NMD d'environ 95% des ARNm d'IgH contenant du PTC (Tinguely et al., 2012) (cf **Annexe 3 Figure 2**). Cette fluctuation reflète la corrélation positive entre le taux épissage et l'efficacité du NMD, comme observé pour les transcrits TCRβ (Gudikote et al., 2005).

III.4.2.3. Dégradation par NMD indépendante de l'EJC : cas des ARNm Igκ non-productifs

Concernant les chaînes légères d'Ig comme Igκ, le processus de recombinaison VJ peut induire l'apparition de PTC soit dans l'exon constant Cκ, soit trois nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon (Delpy et al., 2004). Ainsi, la position du PTC sur les ARNm d'Igκ non productifs ne répond pas à la règle des 50-55nt et leur dégradation est réalisée par un type de NMD dit « EJC-indépendant », moins efficace que le NMD EJC-dépendant précédemment décrit pour les transcrits IgH non productifs (cf **Annexe 3 Figure 1**). En effet, seulement 40% à 60% des ARNm Igκ contenant des PTC sont éliminés par ce mécanisme de NMD (Chemin et al., 2010). Ces résultats sont en accord avec les données du laboratoire de Mühlemann, obtenues en utilisant des constructions de minigènes hébergeant un PTC en aval de 50 nt de la dernière jonction exon-exon (Bühler et al., 2004). Par conséquent, la présence de l'EJC permet d'amplifier l'efficacité du NMD. Ces mêmes auteurs ont également démontré que le déclenchement du mécanisme de NMD EJC-indépendant reposait sur la longueur 3'UTR (Bühler et al., 2006).

En effet, chez les mammifères, le NMD EJC-indépendant est souvent observé au niveau des transcrits endogènes non mutés avec des 3' UTR très longues (> 1 kb) (Singh et al., 2008) même en absence de PTC. Cet NMD est ainsi appelé « *long 3' UTR-mediated NMD* » (Kebaara and Atkin, 2009) ou plus connu sous le nom de « Faux 3'UTR » chez la levure. Cependant, des analyses transcriptomiques étudiant l'abondance et la demi-vie des ARNm chez l'homme et la souris, indiquent que la longueur de la 3'UTR n'est pas forcément corrélée à la sensibilité au NMD EJC-indépendant (Hurt et al., 2013; Tani et al., 2012). Chez les mammifères, la 3'UTR peut contenir divers éléments régulateurs agissant en cis qui inhibent directement ou indirectement le NMD (Toma et al., 2015). Par exemple, les complexes et protéines APOBEC1, PTB ou hnRNPL peuvent inhiber le NMD en se fixant directement en aval du codon stop normal afin de protéger la 3'UTR de la liaison à UPF1 et empêcher ainsi la reconnaissance de l'ARNm comme cible du NMD (Chester et al., 2003; Ge et al., 2016; Kishor et al., 2019). Malgré l'absence d'EJC et du complexe DECID, ce NMD est dépendant de la présence d'UPF1 phosphorylée. UPF1 non phosphorylée peut se lier transitoirement à l'ARNm, en utilisant son activité d'hélicase ARN dépendante de l'ATP. Une fois lié à l'ARNm, elle peut se déplacer le long de l'ARN ou être activement éliminée par translocation des ribosomes sauf dans l'extrémité 3'UTR. Une longue 3'UTR augmenterait dans ce cas, la probabilité d'occupation d'UPF1 et donc les chances que UPF1 soit phosphorylée activant ensuite le NMD EJC-indépendant (Imamachi et al., 2017; Kurosaki et al., 2014; Lee et al., 2015). De plus, UPF1 est fréquemment observée sur les séquences riches en G ou GC qui forment des structures secondaires stables sur l'ARN (Hurt et al., 2013; Imamachi et al., 2017). Ces structures bloquent la translocation d'UPF1, et augmentent ainsi ses chances de phosphorylation et de recrutement d'autres facteurs induisant la dégradation par NMD.

Dans le cas d'un PTC, la voie du NMD EJC-indépendant postule que la reconnaissance du PTC dépend de la distance entre le complexe de terminaison ribosomique à l'arrêt sur le PTC et PABPC1 sur la queue polyA de l'ARNm. Cela semble s'appuyer sur la compétition entre PABPC1 et UPF1 pour l'interaction avec eRF3 au niveau du ribosome (Eberle et al., 2008; Ivanov et al., 2008; Silva et al., 2008; Singh et al., 2008). L'interaction eRF3 avec PABPC1 est cruciale pour une terminaison normale, car cette interaction réprime le NMD en empêchant l'interaction UPF1-eRF3 et l'initiation du NMD (Kashima et al., 2006; Kononenko et al., 2010; Wang et al., 2001). Puisqu'il n'y a pas d'EJC pour potentialiser le NMD, l'interaction entre UPF1, UPF2 et UPF3 peut se produire par diffusion des deux derniers facteurs présents dans le cytoplasme vers UPF1 liée à l'ARNm (Metze et al., 2013). Les étapes suivantes du NMD sont les mêmes que celles du modèle dépendant de l'EJC. Récemment, il a été démontré que le

facteur d'épissage SRSF1 favorise le NMD en se liant directement à UPF1, améliorant la liaison de ce dernier à l'ARNm. De plus, l'action de SRSF1 est indépendante de UPF3 et UPF2 et donc de l'EJC, ce qui pourrait constituer une nouvelle branche de NMD dépendant de SRSF1 et reliée à l'épissage en amont (Aznarez et al., 2018).

Partie IV. Modification de l'expression génique par administration d'oligonucléotides antisens (ASO)

IV.1. Généralités & contexte

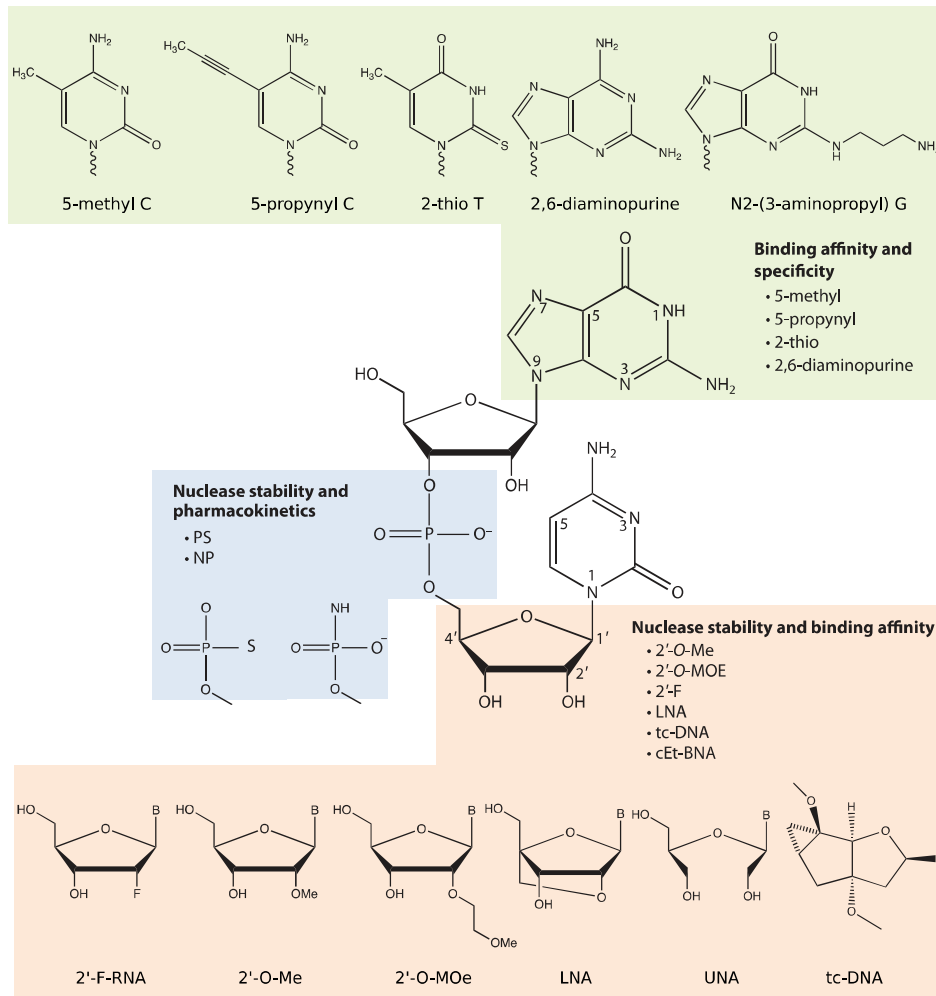
Contrairement aux stratégies d'édition du génome comme CRISPR-Cas9, les thérapies antisens sont de puissants outils capables de modifier l'expression génique de façon transitoire. Ces stratégies reposent sur l'utilisation de siRNA (pour « *small-interfering RNA* ») synthétiques mimant l'activité des miRNA (« *micro RNA* ») endogènes, ou d'oligonucléotides antisens (ASO) dont les particularités seront détaillées ci-dessous.

Les ASO sont des courtes séquences synthétiques d'acides nucléiques simples brins d'environ 15-30 nt, capables de s'hybrider par appariement de bases à une séquence ARN spécifique. Ces acides nucléiques diffèrent des nucléotides ADN ou ARN et présentent des modifications chimiques permettant d'augmenter leur efficacité. Selon leur spécificité de liaison, les ASO peuvent modifier l'expression génique en agissant à différentes étapes. Ils sont utilisés pour inhiber la traduction en bloquant de façon stérique le complexe d'initiation de la traduction, modifier l'épissage en se fixant sur des sites impliqués dans le processus d'épissage du pré-ARNm (sites de fixation de ribonucléoprotéines ou site donneur/accepteur d'épissage), promouvoir la dégradation des ARN par recrutement de la RNase H (voir § IV.3), ou encore neutraliser l'action de miRNA ou d'autres ncRNA (« *non-coding* ») (pour revue Smith and Zain, 2019; Shen and Corey, 2018).

IV.2. Modifications chimiques des ASO

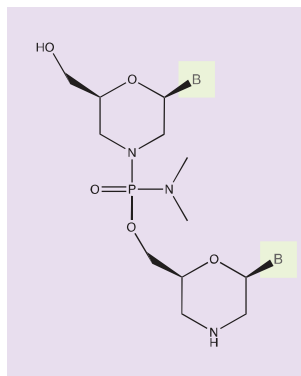
L'utilisation d'ASO non modifiés est problématique, car leur charge électrique les empêche de passer la membrane cellulaire et ils sont rapidement dégradés par tous les types d'endonucléases et d'exonucléases. De nombreuses modifications chimiques ont été ainsi développées pour prolonger leur demi-vie, réduire leur toxicité, augmenter leur affinité pour l'ARN et améliorer leur pénétration intracellulaire.

A.

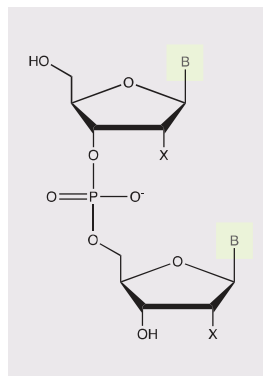


B.

a. Phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO)



b. DNA or RNA



c. Peptide nucleic acid (PNA)

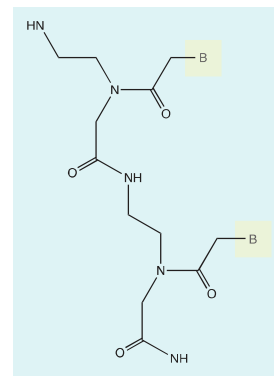


Figure 31 : Principales modifications chimiques des ASO.

A. Les ASO sont de courtes séquences d'acides nucléiques (ARN ou ADN) simples brins, présentant des modifications chimiques leur permettant de résister à la dégradation par les nucléases, d'améliorer leur affinité pour l'ARN voire de favoriser leur pénétration à travers la membrane plasmique. Ces modifications portent essentiellement sur les liaisons phosphodiesteres (bleu), les riboses (orange) et les bases (vert).

B. Les modifications profondes du squelette carboné sont également bénéfiques pour faire un compromis entre stabilité et efficacité. Les deux exemples ici, sont les PMO et les PNA (Smith and Zain, 2019).

(2'-F, 2'-fluoro; 2'-O-Me, 2'-O-methyl; 2'-O-MOE, 2'-O-methoxyethyl; cEt-BNA, constrained ethyl BNA; LNA, locked nucleic acid; NP, N3'-phosphoramidate; PS, phosphorothioate; tc-DNA, tricyclo-DNA; B, heterocyclic nucleobase; LNA, locked nucleic acid; PO, phosphodiester, PS, phosphorothioate; tc-DNA, tricyclo-DNA; UNA, unlocked nucleic acid; PMO, phosphorodiamidate morpholino oligomer; PNA, peptide nucleic acid).

IV.2.1. Les liaisons phosphodiesters

Les nucléotides ARN ou ADN sont reliés par une liaison phosphodiester sensible aux nucléases intracellulaires ou présentes dans le sérum (pour revue Juliano, 2016). Le principe d'élaboration des premières générations d'ASO a consisté à remplacer l'atome d'oxygène non pontant des liaisons phosphodiester par un atome de soufre pour créer des liaisons phosphorothioate (PS) (**Figure 31A**). Ces modifications PS sont faciles à intégrer dans les étapes de synthèse. Les ASO PS présentent une certaine résistance à la dégradation et des demi-vies de l'ordre de la minute à plusieurs heures. Ils possèdent également des propriétés pharmacocinétiques qui leur permettent de se lier à de très nombreuses protéines sériques, membranaires ou intracellulaires (Crooke et al., 2020). Par exemple, les ASO PS peuvent se lier à l'albumine, à l'IgG, à la fibronectine au niveau sérique, aux protéines intracellulaires eIF4H, aux hnRNP et à de nombreuses protéines chaperonnes telles que Hsp90 ou BIP. Cette liaison accrue aux protéines sériques ralentit l'élimination des ASO PS par le foie, augmentant ainsi le temps disponible pour l'absorption dans les tissus cibles. En revanche, la modification PS présente une certaine toxicité et peut induire des réactions inflammatoires, comme par exemple l'activation du complément (Iannitti et al., 2014). D'autres modifications ont donc été développées pour réduire ces effets secondaires et augmenter l'affinité des ASO pour l'ARN.

IV.2.2. Les modifications du ribose

La présence d'un résidu 2'OH nucléophile sur le ribose de l'ARN est à l'origine de la stabilité plus importante des duplex ARN/ARN, comparativement aux duplex ADN/ADN. En s'inspirant de cette particularité, plusieurs modifications en position 2' du ribose ont été développées pour améliorer la stabilité des duplex ASO/ARN. Ainsi, les ASO présentent très souvent des résidus 2'-O-méthyle (2'O-Me), 2'-O-méthoxyéthyle (2'O-MEO) ou 2'-fluoro (2'-F) en remplacement du résidu 2'-OH du ribose (pour revue Prakash, 2011) (**Figure 31A**). L'avantage des modifications en 2' du ribose est que l'ASO devient similaire à l'ARN. Ainsi, des hybridations ASO/ARN cellulaires ne sont pas des substrats pour la RNase H et permettent d'exploiter l'ASO dans des mécanismes de blocage stérique ou pour moduler l'épissage.

Plus récemment, de nouvelles modifications permettant un pontage entre le 2'OH au carbone 4'C du ribose ont encore amélioré l'efficacité d'hybridation des ASO. Les acides nucléiques pontés ou BNA (pour « *bridged nucleic acid* ») les plus couramment utilisés sont les LNA (pour « *locked nucleic acid* ») caractérisés par une liaison 2'-4'-méthylène, mais il en

existe d'autres types tels que le cET-BNA (pour « *ethyl bicyclic nucleic acids* ») ou le N -MeO-amino BNA (Pabon-Martinez et al., 2017; Prakash et al., 2010; Seth et al., 2009). L'introduction d'une seule substitution de type BNA peut augmenter la température de dissociation de 5 à 10 °C et donc augmenter l'affinité afin d'éviter les appariements hors cible et diminuer la taille de l'ASO (pour revue Benizri et al., 2019). Enfin, une autre modification du ribose a été mise au point pour former les bicyclo- et tricyclo-ADN (bc/tc-ADN). L'ADN-tc a trois atomes de carbone supplémentaires entre C5' et C3' qui améliorent la liaison de l'ASO à l'ARN cible. Les tc-ADN présentent également l'avantage de former spontanément des nanoparticules de 40 à 100 nm, mimant la structure des agents de transfection et augmentant considérablement leur distribution tissulaire (Goyenvalle et al., 2015). Cette technologie ADN-tc a été notamment utilisée dans des modèles murins, pour moduler l'expression de gènes impliqués dans des pathologies comme la dystrophie musculaire de Duchenne, de l'atrophie musculaire spinale et la maladie de Huntington (Aupy et al., 2020; Goyenvalle et al., 2015; Imbert et al., 2019; Robin et al., 2017).

IV.2.3. Modifications du squelette carboné

Les liaisons phosphodiester des acides nucléiques leur confèrent une charge négative au pH physiologique. Cette caractéristique chimique permet une grande solubilité en milieu aqueux et la formation de liaison hydrogène (**Figure 31B**). En revanche, cette charge n'est pas compatible avec la traversée de la membrane plasmique cellulaire. Deux classes différentes de modifications du squelette carboné permettent de neutraliser la charge électrique : l'acide nucléique peptidique (PNA pour « *peptide nucleic acid* »), dont le squelette est composé de N-(2-aminoéthyl) glycine, et l'oligomère morpholino phosphorodiamidate (PMO pour « *phosphorodiamidate morpholino oligomer* ») dont le squelette est composé de cycles morpholine reliés par des liaisons phosphorodiamidate (pour revue Saarbach et al., 2019). La majeure partie de mon travail de thèse a été réalisée avec des ASO de type PMO.

IV.3. Mécanismes d'action des ASO

Selon leur chimie, leur séquence et leur cible, les ASO vont moduler l'expression génique par différents mécanismes (**Figure 32**). Les ASO dits « gapmers » présentent une structure mimant l'ADN et sont utilisés pour induire la dégradation des ARN cibles par la RNase H. En effet, cette ribonucléase reconnaît les hybrides ARN/ADN ou « *R-loops* ». Elle assure

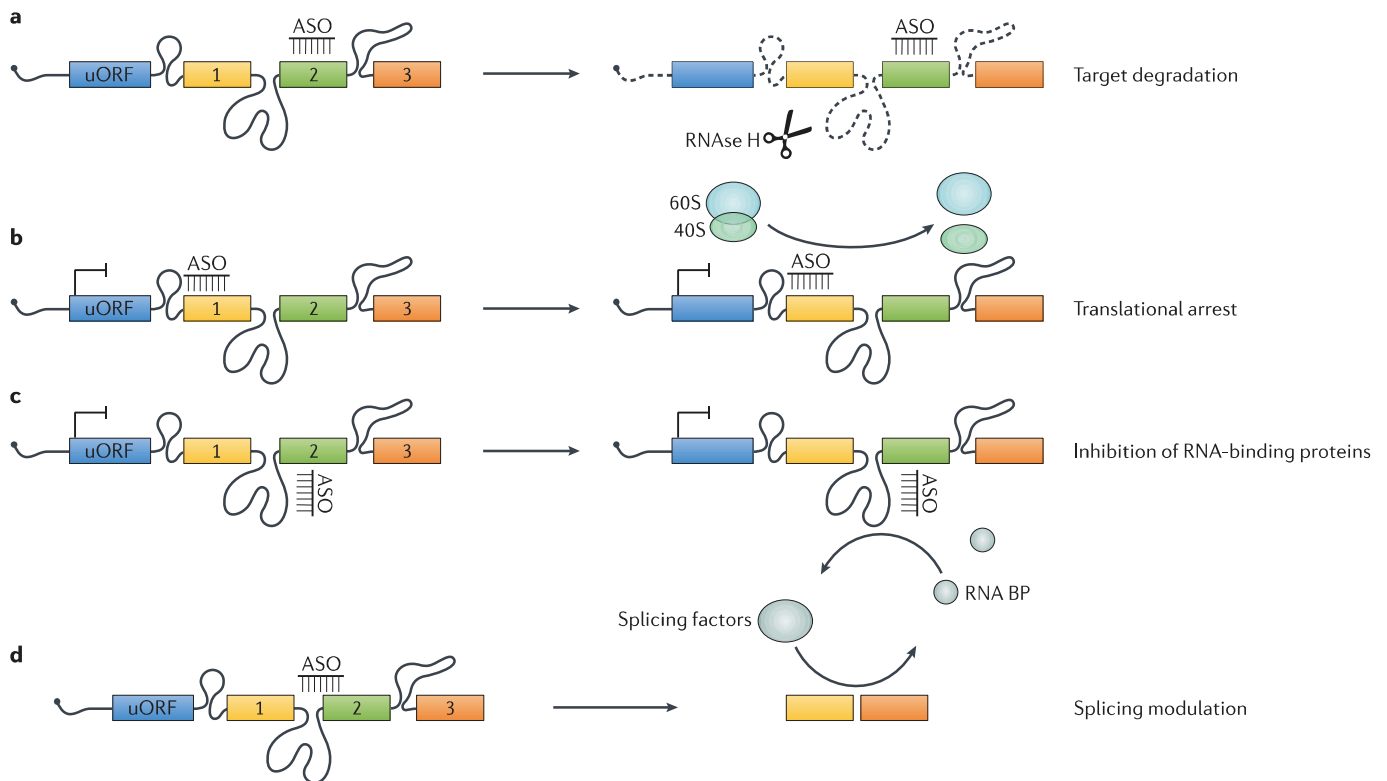


Figure 32 : Les différents modes d'action des ASO.

- a) Les ASO peuvent former un hybride ARN-ADN qui devient un substrat pour la RNase H et entraîne une dégradation de l'ARNm cible.
- b) Les ASO ciblant le site AUG ou d'autres séquences de l'ARNm peuvent bloquer stériquement la liaison à des complexes protéiques tels que les sous-unités ribosomales, supprimant la traduction de l'ARNm cible.
- c) Les ASO conçus pour se lier de manière complémentaire avec une affinité élevée aux régions non traduites peuvent empêcher la liaison et la séquestration des protéines de liaison à l'ARN, par encombrement stérique, et ainsi inactiver l'expression en inhibant la maturation du pré-ARNm.
- d) La liaison de l'ASO aux sites donneurs/accepteurs d'épissage ou aux séquences régulatrices de l'épissage (ESE/ISE, ESS/ISS) peuvent moduler l'épissage alternatif entraînant le saut ou l'inclusion de l'exon ciblé (Rinaldi and Wood, 2018).

notamment la dégradation des fragments d'Okazaki nécessaires à la synthèse du brin retardé lors de la réplication de l'ADN et peut également dégrader les ARN formant des *R-loops* dans le cytoplasme (Vickers and Crooke, 2015). La synthèse des ASO « *gapmers* » repose sur l'addition d'une séquence centrale de 8 à 10 bases analogue à l'ADN servant de substrat à la RNase H. Les séquences situées aux extrémités présentent quant à elles, des modifications chimiques capables d'améliorer l'affinité des ASO pour l'ARN (**Figure 32a**) (pour revue Kole et al., 2012). De nombreux ASO « *gapmers* » sont actuellement en essais cliniques (voir § IV.4.2). Les autres types d'ASO utilisés pour moduler l'expression génique ne reposent pas sur une dégradation des ARN cibles mais agissent par blocage stérique. Ils peuvent ainsi empêcher la traduction d'un ARNm par inhibition de l'assemblage des ribosomes (**Figure 32b**). Une partie très importante est également utilisée pour modifier l'épissage. Ces ASO se lient au pré-ARNm dans le noyau et entrent en compétition avec la fixation de facteurs d'épissage (**Figure 32c**). Ils s'hybrident le plus souvent au niveau d'un site d'épissage (donneur ou accepteur) ou d'une séquence régulatrice (ESE/ISE ou ESS/ISS) et permettent d'activer ou inhiber différentes étapes lors de la réaction d'épissage (**Figure 32d**). Enfin, ces ASO peuvent être exploités pour masquer les signaux de polyadénylation (polyA) et perturber la terminaison de la transcription, afin de forcer l'utilisation de sites polyA alternatifs (pour revue Rinaldi and Wood, 2018).

IV.4. Vectorisation et utilisation thérapeutique des ASO

Le premier exemple d'utilisation d'un ASO remonte à plus de 40 ans quand l'équipe de Stephenson a réussi à modifier la production virale et la transformation cellulaire de fibroblastes en culture en ciblant l'ARN d'un virus avec un ASO (Zamecnik and Stephenson, 1978). Néanmoins, la biodistribution des ASO et leur pénétration dans les cellules cibles sont les principaux obstacles au développement de ces stratégies thérapeutiques antisens.

IV.4.1. Exemples de vectorisation

La pénétration intracellulaire des ASO peut être améliorée *in vitro* par des agents transfectants, comme des lipides cationiques qui permettent la formation d'agrégats avec des ASO chargés négativement (Wasungu and Hoekstra, 2006). Cette stratégie d'absorption est néanmoins limitée *in vivo* par la présence des protéines sériques qui déstabilisent les agrégats et par l'accumulation de ces derniers dans le foie lors d'une injection sous-intraveineuse. Ces nanoparticules lipidiques (LNP pour « *lipid nanoparticles* ») peuvent être couplées avec des

composés tels que le PEG (pour « *poly-ethylene glycol* ») (Bonora, 2002) ou encore à de l'albumine pour favoriser l'absorption cellulaire tout en limitant la toxicité (Jiang et al., 2014). Pour augmenter la spécificité de l'adressage *in vivo*, les ASO peuvent également être couplés à des anticorps dirigés contre des récepteurs membranaires des cellules cibles pour former des ADC-ASO (pour « *antibody drug conjugate* »). En 2015, l'équipe de Sikorski a développé une formulation efficace ciblant spécifiquement les cellules B leucémiques grâce à la conjugaison d'un ASO dirigé contre BCL-2 avec un anticorps anti-CD20 (Meissner et al., 2015). L'équipe de Tuscano, a quant à elle, pu cibler les transcrits MXD3 spécifiquement dans les cellules de leucémie aiguë lymphoblastique-B (LAL-B) à l'aide d'un ASO couplé avec un anticorps dirigé contre CD22 (Satake et al., 2016). A noter que l'internalisation des récepteurs après fixation des ADC-ASO est nécessaire pour délivrer une quantité suffisante d'ASO dans les cellules cibles. Récemment, le couplage des ASO à des structures GalNAc (pour « *N-acétylgalactosamine* ») a permis d'augmenter considérablement leur biodistribution dans les cellules hépatiques, grâce à la liaison au récepteur ASGPR (pour « *asialoglycoprotein receptor* »). Les ASO peuvent également être couplés à des petites séquences peptidiques CPP (pour « *cell penetrating peptide* »). Les CPP sont soit des peptides naturels dérivant de protéines, soit des peptides chimériques formés par la fusion de deux séquences naturelles ou soit des peptides synthétiques basés sur des études *in silico*. En règle générale, les CPP sont de courtes séquences peptidiques qui possèdent la capacité de traverser la membrane plasmique (pour revue McClorey and Banerjee, 2018). D'autres conjugués ont également été développés comme un couplage à de l' α -Tocopherol (vitamine E), des dérivés du cholestérol, des squalènes, des acides gras ou des nucléolipides (pour revue Benizri et al., 2019). En s'inspirant de la capacité de pénétration de la membrane plasmique des résidus guanidinium des arginines, l'entreprise GeneTools a développé des ASO de type PMO couplés de façon covalente à un dendrimère d'octa-guanidine. Ces ASO appelés vivo-morpholinos sont capables de pénétrer efficacement dans la membrane plasmique et ont été utilisés durant ma thèse.

IV.4.2. Des études pré-cliniques à la mise sur le marché de médicaments : quelques exemples

Malgré des efforts considérables visant à améliorer l'efficacité des ASO et à diminuer leur toxicité, très peu de molécules possèdent actuellement une autorisation de mise sur le marché (AMM). Les stratégies antisens au sens large (ASO, siRNA) sont cependant en plein essor, avec 102 essais cliniques recensés en 2020 (ClinicalTrials.gov, 2020 lien: <http://clinicaltrials.gov>).

A travers les quelques exemples d'études pré-cliniques ou d'essais cliniques présentés ci-dessous, il semble assez clair que les ASO présentent un intérêt thérapeutique majeur (**Figure 33**).

En 2014, l'équipe de Wengel et Smith a étudié une approche antisens pour le traitement de la XLA (XLA pour «*X-linked agammaglobulinemia*»). Cette maladie est une immunodéficience héréditaire liée à la présence de mutations sur le gène codant la protéine BTK (pour «*Bruton's tyrosine kinase*») produisant un défaut d'épissage. Les mutations touchent les cellules de la lignée B bloquant le développement entre le stade pro-B et pré-B. Il a été répertorié 544 mutations sur le gène codant la BTK, donnant 341 événements d'épissage uniques (Vihinen et al., 1999). Les auteurs se sont focalisés sur une mutation particulière : une transition A à T dans l'intron 4 du gène BTK qui aboutit à la création un nouveau site donneur d'épissage cryptique conjointement à un site accepteur cryptique préexistant. Le pseudo-exon (exon 4a) qui en résulte est inclus lors de l'épissage et modifie le cadre de lecture avec l'apparition d'un PTC, rendant non fonctionnelle la protéine BTK. Ils ont élaboré des ASO dirigés contre les sites donneur/accepteur du pseudo exon 4a et les séquences régulatrices ESE environnantes avec plusieurs chimies d'ASO telles que les 2'OMePS, LNA, PMO ou B-PMO. Les résultats obtenus *in vivo*, à l'aide d'un modèle de souris transgéniques hébergeant le locus BTK humain muté, ont révélé que l'administration systémique par injection intra-veineuse d'ASO de type B-PMO permet de corriger efficacement l'épissage et de restaurer l'expression de BTK dans les LB, augmentant ainsi leur survie et leur activation après stimulation du BCR (Bestas et al., 2014).

En 2016, l'équipe de Guccione a établi une stratégie à base d'ASO pour cibler MDM4 (pour «*murine double minute 4*») dans des modèles PDX (pour «*patient-derived xenograft*») de cellules de mélanomes et de DLBCL (pour «*diffuse large B-cell lymphoma*»). La protéine MDM4 inhibe le facteur suppresseur de tumeur p53, en se liant à son domaine d'activation transcriptionnelle dans les cellules normales. L'isoforme courte et non fonctionnelle MDM4-S est produite dans les tissus adultes normaux à la suite du saut de l'exon 6 alors que l'isoforme complète est quasiment indétectable. Cette dernière est cependant retrouvée dans un grand nombre de cancers et l'épissage de l'exon 6 est favorisé par la présence de SRSF3. Dans cette étude, les auteurs sont parvenus à moduler l'épissage de MDM4 en utilisant un ASO de type vivo-morpholino (GeneTools) dirigé contre le site donneur d'épissage de l'exon 6 et chevauchant le site de liaison de SRSF3. Des injections intra-tumorales de cet ASO ont permis d'induire un saut de l'exon 6 et de diminuer la quantité de protéine MDM4 pleine taille, inhibant la croissance tumorale (Dewaele et al., 2016).

Le groupe « *Ionis Pharmaceuticals* » est un acteur majeur dans le développement des ASO à usage thérapeutique, avec 20 essais cliniques de Phase II et 5 de Phase III actuellement répertoriés (Ionis, 2020). Par exemple, le volanesorsen (Waylivra®) a été approuvé pour un usage médical dans l'Union européenne en mai 2019 pour le traitement du syndrome de chylomicronémie familiale (FCS). Il s'agit d'un ASO de type « gapmer » qui cible l'ARNm de l'apolipoprotéine C3 pour induire sa dégradation par la RNase H, diminuant ainsi le taux de triglycérides dans le sang et le risque de pancréatite (Paik and Duggan, 2019; Witztum et al., 2019). En 2016, le Nusinersen (Spinraza®) injecté par voie intrathécale a été approuvé dans l'amyotrophie spinale (pour revue Li, 2020; Hoy, 2017). Cette maladie est causée par une perte de fonction du gène SMN1 (pour « *survival of motor neuron 1* »). L'ASO module l'épissage du gène SMN2, qui en condition normale présente un saut d'exon 7 invalidant la fonction protéique. Cet ASO se fixe sur la séquence ISS-N1 située en aval de l'exon 7 pour favoriser son inclusion, rétablissant ainsi une protéine SMN2 fonctionnellement proche de SMN1. Les résultats cliniques spectaculaires obtenus avec cet ASO l'ont propulsé en traitement de première intention dans cette pathologie, mais son coût exorbitant (85 000 €/flacon et plus de 500 000 €/patient la première année) a fait l'objet d'un énorme remous médiatique. Enfin, le groupe « *Sarepta Therapeutics* » est quant à lui, spécialisé depuis de nombreuses années dans le développement d'ASO pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Les 2 molécules commercialisées : l'Eteplirsén (EXONDYS 51®) et le Golodirsén (VYONDYS 53®), permettent de moduler l'épissage du gène DMD muté chez certains patients afin de restaurer l'expression de dystrophine partiellement fonctionnelle (Dhillon, 2020; Heo, 2020; Nelson et al., 2009; Syed, 2016). L'efficacité de ces approches est cependant moindre compte tenu de la difficulté de ciblage des cellules musculaires.

Année	Nom	Industrie	Maladie	Administration	Gène cible	Mécanisme	Modification	Organe cible
2013	Kynamro (mipomersen sodium)	Isis Pharmaceuticals	hypercholestérolémie familiale	injection sous-cutanée	apolipoprotéine B-100	dégradation par la RNase H	2'O-MEO C5 methyl PS linkage gap (2'H,C5 methyl,PS)	foie
2016	Exondys 51 (eteplirsén)	Sarepta Therapeutics	dystrophie musculaire de Duchenne	injection intraveineuse	DMD	épissage alternatif	PMO	muscle
2016	Spinraza (nusinersén)	Biogen	atrophie musculaire spinale	injection intrathécale	SMN2	épissage alternatif	2'O-MEO PS linkage C5 methyl	système nerveux central
2018	Tegsedi (inotersén sodium)	Akcea Therapeutics	amylose héréditaire médée par la transthyrétine	injection sous-cutanée	TTR	dégradation par la RNase H	2'O-MEO C5 methyl PS linkage gap (2'H,C5 methyl,PS)	foie
2019	Vyondys 53 (golodirsén)	Sarepta Therapeutics	dystrophie musculaire de Duchenne	injection intraveineuse	DMD	épissage alternatif	PMO	muscle
2019	Waylivra (Volanesorsén)	Ionis Pharmaceuticals	syndrome de chylomicronémie familiale	injection sous-cutanée	apolipoprotéine C3	dégradation par la RNase H	2'O-MEO C5 methyl PS linkage gap (2'H,C5 methyl,PS)	foie
2020	NS-065/NCNP-01 (Viltolarsén)	NS Pharma, Inc.	dystrophie musculaire de Duchenne	injection intraveineuse	DMD	épissage alternatif	PMO	muscle

Figure 33 : Tableau récapitulatif des thérapies antisens utilisant des ASO ayant reçu une autorisation de mise sur le marché.

Position du problème



Les principaux objectifs de mon projet de thèse consistent à analyser l'efficacité d'approches utilisant des ASO pour modifier l'épissage des transcrits d'Ig et à étudier les relations entre le NMD et la réponse UPR dans les plasmocytes. Dans un premier temps, j'ai participé à une étude soulignant l'efficacité des ASOs de type "VivoMorpholinos" (Gene Tools, LLC) pour moduler l'épissage des transcrits d'Ig dans les plasmocytes (Annexe 1 : Ashi et al., 2019). Ce type d'ASO a ensuite été utilisé pour explorer l'intérêt thérapeutique d'approches antisens ciblant spécifiquement l'Ig monoclonale (Ig-mo) dans le traitement du myélome multiple (MM). Cette stratégie consiste à provoquer un saut d'exon à l'aide d'ASO pour forcer la synthèse d'Ig tronquées, induire un stress protéique et provoquer l'apoptose des plasmocytes tumoraux (WO/2017/089359, Delpy et al., 2017). Le rationnel de ce projet s'appuie sur les travaux précédents de l'équipe montrant qu'un phénomène de saut d'exon conduisant à la production d'Ig dépourvues de domaine V provoque une apoptose prématurée des plasmocytes (Srouf et al., 2016). L'effet toxique des Ig sans domaine V est la conséquence d'une amplification incontrôlée du stress du RE et de la réponse UPR. Ainsi, un traitement ASO ciblant l'exon V de l'Ig-mo pourrait provoquer l'apoptose des cellules de myélome (**Article 1**, Lambert et al, en préparation).

En parallèle du ciblage spécifique de l'exon V, nous avons testé également une stratégie de ciblage des exons constants (CH1, CH2 ou CH3) de chaînes lourdes d'Ig. Cette approche antisens ciblant les séquences constantes très conservées (pas de SHM) présentent un caractère générique intéressant, limitant ainsi le nombre d'ASO à tester. Les bénéfices de ces stratégies ciblant les exons constants pourraient s'étendre aux manifestations allergiques (impliquant des IgE), à la maladie de Berger (néphropathie à dépôts d'IgA) voire aux maladies auto-immunes dépendantes des anticorps (IgG). Les résultats préliminaires obtenus à l'aide d'un ASO ciblant l'exon constant CH1 des chaînes lourdes seront détaillés ci-après (« **Résultats préliminaires** »). Concernant cette partie ASO, j'ai également réalisé les expériences de révision d'une étude démontrant l'efficacité des approches antisens pour moduler le processus de CSR (Article 2, Marchalot et al., 2020). Enfin, le deuxième axe de recherche m'a permis de mettre en évidence une coopération entre les mécanismes impliqués dans la surveillance des ARNm comme le NMD (« Nonsense-Mediated mRNA Decay ») et ceux régulant l'homéostasie protéique comme l'UPR (« Unfolded Protein Response ») dans les plasmocytes. Au regard de la littérature, cette boucle de régulation positive représente une exception des cellules sécrétrices d'anticorps et permettrait une synthèse massive d'Ig tout en limitant l'apparition de protéines et/ou d'Ig tronquées (**Article 3**, Lambert et al, en préparation). Cette problématique m'a également permis de participer à la rédaction de deux revues traitant de la surveillance des ARN dans les cellules B et les plasmocytes (Annexes 2 et 3 : Lambert et al., 2019, 2020).

Résultats



Article 1.

Selective killing of plasma cell clones using splice switching oligonucleotides targeting unique variable exon RNA sequences

Jean-Marie Lambert¹, Anne Marchalot¹, Marion Contini¹, Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srour^{1,2}, Soazig Le Penne¹ and Laurent Delpy¹

En préparation

Résultats préliminaires.

Modulation de l'expression d'Ig par ciblage des exons constants à l'aide d'ASO.

Article 2.

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

Anne Marchalot¹†, Mohamad Omar Ashi¹†, **Jean-Marie Lambert** ¹†, Claire Carrion¹, Sandrine Lecardeur¹, Nivine Srour^{1,2}, Laurent Delpy^{1,*†} and Soazig Le Penne^{1,*†}

Frontiers in Immunology – B cell Biology, 2020

(†: contribution équivalente)

Article 3.

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

Jean-Marie Lambert¹, Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srour¹, Estelle Troadec¹, Faraj Terro¹ and Laurent Delpy¹

En préparation

Article 1.

Selective killing of plasma cell clones using splice switching oligonucleotides targeting unique variable exon RNA sequences

Jean-Marie Lambert¹, Anne Marchalot¹, Marion Contini¹, Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srour^{1,2}, Soazig Le Pennec¹ and Laurent Delpy^{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

**Correspondence: Laurent Delpy, laurent.delpy@unilim.fr;*

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

› Communication Orale

Lambert Jean-Marie (2019), 2ème JOURNÉE RECHERCHE EN CANCÉROLOGIE, Ligue Contre le Cancer 87, 14 nov 2019, Limoges (France).

› Communications Affichées

Lambert Jean-Marie (2019), Cancéropôle Grand Sud-Ouest 15th Annual Meeting, 20-22 nov 2019, Arcachon (France)

1^{er} Prix poster.

Lambert Jean-Marie, (2017), 1ère JOURNÉE RECHERCHE EN CANCÉROLOGIE, Ligue Contre le Cancer 87, 9 nov 2017, Limoges (France). **2^{ième} Prix poster.**

Lambert Jean-Marie, (2016), Annual meeting of the French Society for Immunology, 28-30 nov 2016, Paris (France).

Objectifs :

Les plasmocytes sont des cellules sécrétrices d'immunoglobulines (Ig) générées par différenciation terminale des lymphocytes B matures. Chaque clone produit une Ig dite monoclonale, présentant des séquences uniques au niveau des domaines variables (V) qui déterminent la spécificité antigénique. Les processus de recombinaisons V(D)J et d'hypermutations somatiques (SHM) aux loci des chaînes lourdes et légères d'Ig sont à l'origine de la diversification du répertoire des Ig. Les plasmocytes doivent leur survie à un contrôle très strict de l'homéostasie protéique, visant à limiter le stress du réticulum endoplasmique (RE) et la surcharge du protéasome à cause de la synthèse massive d'anticorps. Les travaux précédents de l'équipe ont montré qu'un phénomène de saut d'exon conduisant à la production d'immunoglobulines (Ig) dépourvues de domaine V provoque une apoptose prématurée des plasmocytes (Srouf et al., 2016). Nous avons voulu explorer l'intérêt thérapeutique d'approches antisens ciblant les transcrits codant l'Ig monoclonale dans des cellules de myélome. Cette stratégie consiste à utiliser des oligonucléotides antisens (ASO) pour provoquer un saut de l'exon V et forcer la synthèse d'Ig tronquées. Le stress protéique dû à l'accumulation d'Ig tronquées permettrait alors d'induire l'apoptose des plasmocytes tumoraux ou de les sensibiliser à des traitements par inhibiteurs du protéasome (WO/2017/089359, Delpy et al., 2017).

Méthodologie :

Dans un premier temps, j'ai participé à une étude montrant l'efficacité des ASOs de type "VivoMorpholinos" (Gene Tools, LLC) pour moduler l'épissage des transcrits d'Ig dans les plasmocytes (Annexe 1: Ashi et al., 2019). Ces ASOs correspondent à des PMO (Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotide) complexés à un dendrimère d'octaguanidine pour permettre la pénétration cellulaire par diffusion passive (sans transfection).

Pour cibler spécifiquement l'Ig monoclonale exprimée par les cellules de myélome, en tenant compte de la variabilité des réarrangements V(D)J et des fréquentes mutations par SHM, un séquençage précis des jonctions intron-exon V en 5' et exon V-intron en 3' est nécessaire. Nous avons travaillé sur deux lignées de myélome : RPMI 8226 exprimant une chaîne légère Ig λ avec un réarrangement V λ 2-14-J λ 2, et SK-MM-2 exprimant une Ig κ avec un réarrangement V κ 3-15-J κ 4. L'ASO-J λ 2-5'ss cible le site donneur d'épissage (dss) du segment J λ 2 (**Fig.1A**) et l'ASO-V κ 3-15-3'ss cible le site accepteur d'épissage (ass) du segment V κ 3-15 (**Fig.2A**). Les traitements in vitro ont été réalisés à des concentrations de 3 μ M durant 24 à 48h. Nous avons

aussi étudié l'impact d'une administration intratumorale d'ASO après greffage (sous-cutané en matrigel : $2 \cdot 10^6$ cellules/souris) de cellules SK-MM-2 dans des souris immunodéficientes Rag2^{-/-}γC^{-/-}. Quatre injections d'ASO (25 nmoles : ASO-Vκ3-15-3'ss ou ASO contrôle) ont été réalisées durant 2 semaines lorsque les tumeurs atteignaient 100-200mm³. Nous avons aussi analysé l'impact du traitement ASO sur des tumeurs établies (~500mm³) avec une seule injection d'ASO (50 nmoles).

Nous avons aussi utilisé deux ASO ciblant le dss des segments Jκ1 ou JH2 murins (ASO-Jκ1-5'ss et ASO-JH2-5'ss) (**Fig.4A**) afin de cibler les cellules présentant des réarrangements VnJκ1 et VnDnJH2 au sein du répertoire B naïf. L'objectif étant d'apporter une preuve de concept que les ASO sont de bons outils pour modifier à façon le répertoire des Ig. Des cellules B isolées de rate de souris C57BL/6 ont été stimulées par du LPS (3-4 jours) en présence d'ASO contrôle ou d'ASO-Jκ1-5'ss et ASO-JH2-5'ss (2-3 μM). L'analyse du répertoire des Ig a été réalisée par séquençage haut débit en utilisant une technique de RACE-PCR (pour « Rapid amplification of cDNA ends »), à l'aide d'amorces de RT s'hybridant sur les exons constants.

Résultats :

L'ASO-Jλ2-5'ss ciblant le dss du segment Jλ2 a tout d'abord été testé sur la lignée RPMI 8226. Après traitement ASO, nous avons observé un fort épissage alternatif des transcrits Iglλ (**Fig.1B**). Ces transcrits alternatifs utilisent un dss cryptique au niveau du CDR1 aboutissant à une chaîne Iglλ dont le domaine V est dépourvu de sa partie FR2 à FR4 (**Fig.1C**). Ce site cryptique a vraisemblablement été introduit par SHM puisqu'il est localisé dans un « hotspot » (CDR1) et est absent de la séquence germinale Vλ2-14 (**Fig.S1A**). De façon intéressante, l'expression de cette chaîne partiellement tronquée de son domaine V semble très toxique puisqu'un traitement de 48h avec l'ASO-Jλ2-5'ss aboutit à une mortalité cellulaire d'~80%, contre ~20% après traitement avec un ASO contrôle (**Fig.1D**). Nous avons ensuite appliqué ce même traitement sur la lignée de myélome XG6, dont l'Iglλ exprimée (Vλ1-40-Jλ2) permet l'utilisation de l'ASO-Jλ2-5'ss. Nous avons observé un épissage alternatif similaire impliquant un site cryptique au sein du CDR2 (**Fig.1E et S1B**) et entraînant la production d'une Iglλ tronquée de sa partie FR3 à FR4 (**Fig.1F**). Néanmoins, la toxicité de cette Ig était quasiment inexistante (**Fig.1G**), suggérant qu'une délétion partielle de l'exon V ne provoque pas un stress protéique suffisant pour induire la mort cellulaire. Ainsi, de nombreux dss cryptiques peuvent apparaître par SHM dans les cellules post-GC. Les événements d'épissage et les effets obtenus après traitement par un ASO ciblant le dss de l'exon V semblent donc difficiles à déterminer. Pour parvenir à nos fins sur les cellules de myélome hautement mutées et tenter d'obtenir un

saut complet de l'exon V, nous avons ensuite privilégié un ciblage du site ass, dont la séquence très conservée limite l'apparition de sites cryptiques. Les analyses par RT-PCR (**Fig.2B**) et WB (**Fig.2C**) ont révélé que le traitement des cellules SK-MM-2 par l'ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss induit l'expression d'une chaîne dépourvue de domaine V (Δ V- κ LC). De façon similaire aux résultats obtenus avec la lignée RPMI 8226, l'analyse de la viabilité cellulaire (marquage 7-AAD et tests MTS) a révélé une forte mortalité après traitement par l'ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss (**Fig.2D**). L'analyse par RNAseq a aussi révélé que 1100 et 524 gènes étaient respectivement sur- et sous-exprimés après traitement par l'ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss, comparativement à la condition contrôle ((abs(log2FC) \geq 0,75 ; pvalue Adj < 0,05). En accord avec un stress protéique et une toxicité provoqués par la production de chaîne Δ V- κ LC, ces gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans des voies telles que l'autophagie, l'apoptose, l'ubiquitination, la mort cellulaire et le stress du RE. Concernant les études *in vivo* après xénogreffes de cellules SK-MM-2 et injections intratumorales d'ASO, nous avons observé un ralentissement de la croissance tumorale et une médiane de survie plus élevée dans le groupe traité avec l'ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss par rapport au groupe contrôle (ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss 29j, ASO-Ctrl 18j ; n=11, *p=0.03) (**Fig.3A**). De plus, l'analyse des sérums des souris a révélé que l'ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss diminuait la sécrétion des Ig κ sécrétées par les cellules SK-MM-2 (**Fig.3B**). L'analyse par RT-PCR effectuée sur les cellules tumorales prélevées après traitement a confirmé l'apparition de transcrits Δ V- κ LC (**Fig.3C**).

Enfin, nous avons analysé les effets des traitements ASO ciblant les dss des segments J κ 1 et JH2 sur le répertoire B naïf (non muté). Après traitement par l' ASO-J κ 1-5'ss, nous avons observé l'apparition de transcrits alternatifs sans exon V (Δ V- κ LC) (**Fig.4B**). De façon intéressante, l'analyse du répertoire Ig par RACE-PCR a révélé une disparition drastique et sélective des clones exprimant des Ig avec des réarrangements de type VnJ κ 1 après traitement par l'ASO-J κ 1-5'ss (**Fig.4C-D**), et de ceux exprimant des Ig de type VnDnJH2 après traitement par l'ASO-JH2-5'ss (**Fig.4E-F**). Ces données constituent la première mise en évidence d'une modulation ciblée du répertoire des Ig par traitement ASO.

Ainsi, les traitements ASO permettant d'induire la production d'Ig tronquées sans domaine V peuvent être considérés comme des approches thérapeutiques intéressantes capables de provoquer la mort sélective des PC tumoraux dans les gammopathies monoclonales. Des optimisations en terme de biodistribution pour permettre un ciblage efficace des niches médullaires pourraient promouvoir le développement de ces stratégies personnalisées innovantes, épargnant les cellules saines. Ces résultats font l'objet de l'article suivant (Lambert et al, Article 1, en préparation).

Selective killing of plasma cell clones using splice switching oligonucleotides targeting unique variable exon RNA sequences.

Jean-Marie Lambert¹, Anne Marchalot¹, Marion Contini¹, Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srour^{1,2}, Soazig Le Pennec¹ and Laurent Delpy^{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

*Correspondence: Laurent Delpy, laurent.delpy@unilim.fr

ABSTRACT

Deregulated proliferation of a plasma cell (PC) clone is accompanied by an excess production of a monoclonal immunoglobulin (mo-Ig) component with unique V(D)J rearrangement features. Recent advances in exon skipping therapy using splice switching antisense oligonucleotides (ASO) prompted us to examine a new antisense strategy targeting the variable (V) exon in myeloma cells. Indeed, we previously observed that the production of truncated Ig light chains, encoded by alternatively spliced mRNAs lacking V exon, heightened endoplasmic reticulum (ER) stress and provoke apoptosis of antibody-secreting plasma cells. We designed ASO hybridizing mo-Ig RNAs at donor or acceptor V exon splice site in myeloma cells and found that they were very potent alternative splicing inducers leading to elevated production of V-domain-less truncated Ig chains. Remarkably, *in vitro* experiments and tumor xenografts revealed that myeloma cells were highly sensitive to specific ASO treatment, compared to irrelevant control-ASO. RNA-seq experiments further confirmed that the ASO-mediated production of truncated Ig provoked a massive myeloma cell death through ER stress-associated apoptosis. In addition, high throughput sequencing of Ig repertoire demonstrated that ASO targeting JH2 or Jκ1 donor splice sites induced massive elimination of VDJH2- or VJκ1-rearranged clones respectively, while sparing the others. Collectively, these data provide evidence that ASO targeting V exon of mo-Ig can emerge as new weapons to induce selective killing of myeloma cells.

INTRODUCTION

Plasma cells (PCs) are immunoglobulin (Ig) production factories that can secrete as many as 10^3 Ig per second (Eyer et al., 2017; Khodadadi et al., 2019). The survival of antibody-secreting cells depends on their ability to alleviate endoplasmic reticulum (ER) stress associated with massive Ig synthesis. To ensure high Ig secretion, the unfolded protein response (UPR) is activated during PC differentiation. The UPR pathway adjusts ER capacity and promotes protein folding while increasing the proteasomal degradation of unfolded/misfolded proteins (Shaffer et al., 2004; Todd et al., 2009; Zhu et al., 2019). The three branches of the UPR are mediated by inositol-requiring protein-1 (IRE1), activating transcription factor-6 (ATF6) and protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK) (Ron and Walter, 2007). The latter branch mediates translational control through the phosphorylation of early initiation factor 2alpha (eIF2 α) and is suppressed during PC differentiation, whereas activation of the IRE1/ X-box binding protein 1 (XBP1) branch is critical (Gass et al., 2008; Reimold et al., 2001). IRE1 α ensures the excision of 26-nt from XBP1 mRNA to encode a short XBP1 isoform (XBP1s: XBP1 “spliced”) that regulates genes involved in protein synthesis and secretion, and also in the ER-associated degradation (ERAD) pathway (Acosta-Alvear et al., 2007; Shaffer et al., 2004). Because PC survival involves a tight regulation of intracellular protein homeostasis (proteostasis), modulating the ubiquitin-proteasome degradation with proteasome inhibitors (PI) stands as a gold standard therapeutic approach in patients with PC disorders (Auner and Cenci, 2015; Cohen et al., 2015; Gandolfi et al., 2017; Jaccard et al., 2014).

As a new PC checkpoint involving proteostasis deregulation, alternative splicing of nonproductive Ig transcripts can generate truncated Ig polypeptides that blunt PC differentiation through ER stress-associated apoptosis (Srouf et al., 2016). Indeed, the presence of a nonsense codon within the variable (V) exon activates a RNA surveillance pathway, referred as nonsense-associated altered splicing (NAS), that promotes skipping of the offending exon (Lambert et al., 2019, 2020). The extent of V exon skipping closely correlates with Ig gene transcription and is highly active in PC (Ashi et al., 2019). Consistent with the occurrence of a Truncated-Ig Exclusion (TIE-) checkpoint, mice expressing V-

domain-less truncated Ig κ light chains (Δ V- κ LCs) exhibited a PC deficiency due to prolonged ER stress. Interestingly, the production of Δ V- κ LCs affects both the expansion of PC after short-term immunization and the survival of long-lived PCs in bone marrow (Srouf et al., 2016). In a physiological context, the production of Δ V- κ LCs after NAS activation is limited to some PC clones harboring biallelic Ig gene rearrangements with a nonsense V exon on the nonproductive allele. Therefore, modulating Ig RNA splicing to produce truncated Ig polypeptides and eliminate abnormal PC clones should stand as a very attractive therapeutic approach for monoclonal gammopathies.

Antisense technology based on the use of splice-switching antisense oligonucleotides (ASOs) that modify RNA splicing is very promising, with significant results for type II spinal muscular atrophy (SMA) patients (Li, 2020; Hoy, 2017). In B-cell lineage, similar "gene surgery" strategies have been developed to correct splicing of BTK (Bruton's tyrosine kinase) and restore its function in an animal model of XLA (X-linked gammaglobulinemia) (Bestas et al., 2014). Likewise, ASO-mediated skipping of exon 6 of MDM4 (mouse double minute 4) reduces tumor growth in patient-derived xenograft (PDX) models of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) (Dewaele et al., 2016). Since we recently demonstrated that morpholino oligos efficiently modulate Ig RNA splicing (Ashi et al., 2019; Marchalot et al., 2020), we examined the toxicity of ASO treatments targeting the V exon donor or acceptor splice sites (dss or ass) in normal and malignant antibody-secreting cells (ASCs).

RESULTS

ASO-mediated targeting of V exon 5'ss in malignant plasma cells

In monoclonal gammopathies, it has been suggested that the production of abnormal Ig impedes the proliferation of malignant PCs. According to this assumption, PCs from light chain amyloidosis (AL-amyloidosis) patients exhibited cellular stress features, and transduced NS0 PC clones expressing amyloidogenic LCs showed slower growth rates compared to nonamyloidogenic LC-expressing

counterparts (Oliva et al., 2017). To investigate whether an excess synthesis of truncated Ig polypeptides was toxic for myeloma cells, we used antisense technology to modulate mo-Ig RNA splicing through the targeting of V exon splice sites (ss). First, we specifically targeted the mo-Ig λ expressed in RPMI 8226 cells by using an ASO hybridizing surrounding the IGV λ 2-14-J λ 2 exon dss on pre-mRNAs (**Fig.1A**). We observed a strong enhancement of alternative splicing in cells treated with ASO-J λ 2-5'ss, compared to an irrelevant control ASO (ASO-Ctrl). The quantification by the AGILENT bioanalyzer of the Ig λ transcripts shows that at 24 h and 48 h the ASO caused $44.7 \pm 24.4\%$ and $62.9 \pm 21.2\%$ of alternative splicing against approximately $13.9 \pm 7.2\%$ at the basal level (**Fig.1B**). Sequencing of alternative transcripts ($\Delta V'$ - λ LC) revealed a cryptic dss within the CDR1 region, encoding a truncated λ LC polypeptide lacking the FR2 to FR4 region (**Fig.S1A**). Based on Human Splicing Finder (HSF) splice site prediction algorithm (Desmet et al., 2009), this cryptic splice site is absent in the germline V λ 2-14 sequence suggesting that it was introduced by somatic hypermutation (SHM). Alternative splicing allowed translation of a truncated immunoglobulin as observed by Western blot (WB) (**Fig.1C**). Interestingly, a 48h treatment with ASO-J λ 2-5'ss was highly toxic for RPMI 8226 cells, with ~80% cell death compared to ~20% in control conditions (**Fig.1D**). Thus, the ASO-mediated production of truncated $\Delta V'$ - λ LC was correlated with an increased cell death in myeloma cells. Similar ASO treatments were then performed using another Ig λ -expressing myeloma cell line (XG6; V λ 1-40-J λ 2), exhibiting only 1nt mismatch with the ASO-J λ 2-5'ss (**Fig.S1B**). Again, we observed that ASO-mediated alternative splicing involved a cryptic dss located in the CDR2 and with SHM features (**Fig.1E and Fig.S1B**), leading to the production of a truncated $\Delta V''$ - λ LC lacking the FR3 to FR4 region (**Fig.1F and Fig.S1B**). Contrasting with data in **Fig.1D**, viability comparative assays performed after 24h or 48h ASO treatments indicated that the synthesis of $\Delta V''$ - λ LC polypeptides did not significantly modify the proliferative index of XG6 cells (**Fig. 1G**), suggesting that the expression of truncated LCs with small V deletions could be tolerated. Thus, the impact of ASO targeting V exon dss in post-GC (germinal center) cells seems difficult to predict because SHM-related cryptic dss greatly influenced the pattern of ASO-mediated alternative splicing.

Impact of ASO-mediated targeting of V exon 3'ss in myeloma cells

Consensus splice site profiling revealed more constrained sequences for functional 3'ss than 5'ss and ASO hybridizing surrounding the former gave generally better outcomes with regard to exon skipping efficiency. To this end, Igκ-expressing SK-MM-2 cells were treated with an ASO targeting the 3'ss of IGVκ3-15-Jκ4 exon (**Fig.2A**). RT-PCR analysis and sequencing of alternative splicing transcripts revealed that ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss strongly induced a complete V exon skipping, compared to control conditions (**Fig. 2B**). The quantification by the AGILENT bioanalyzer of the Igκ transcripts shows that at 24 h and 48 h the ASO caused 67.7 ±7.1 % and 79,5 ±9.0 % of alternative splicing without any basal level. At the protein level, ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss treatment lead to the production of a truncated ΔV-κLC at ~12 kDA (**Fig.2C**). As expected, the quantity of complete Igκ protein encoded by full length κLC mRNAs was also simultaneously decreased by ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss treatment (**Fig.S2**). Consistent with data in **Fig.1D**, the production of ΔV-κLC was correlated with increased cell death in SK-MM-2 cells treated with ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss compared to control conditions (**Fig. 2D**). In addition, the analysis of differentially expressed (DE) genes ((abs (log₂FC) ≥ 0,75); pvalue Adj < 0,05) from RNA-seq data revealed 1100 upregulated and 524 downregulated genes in cells treated with ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss compared to ASO-Ctrl (**Table S1 and Fig. 2E**). Interestingly, these differentially expressed genes were involved in cell death, apoptotic, autophagy, protein ubiquitination and ER stress pathways, indicating that ER stress-associated apoptosis was likely responsible for ASO-mediated massive cell death.

ASO-mediated production of ΔV-κLC limits the growth of myeloma tumors *in vivo*

To address the impact of ASO treatment on tumor growth, SK-MM-2 were engrafted in immunodeficient mice and intratumoral (i.t.) injection of ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss, ASO-Ctrl or PBS were performed when tumors reached 100-200mm³. Interestingly, tumor volumes were significantly reduced in mice receiving 4 i.t. injections of ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss, compared to control conditions. In addition, mice injected with ASO-Vκ₃₋₁₅-3'ss exhibited a better survival than controls (**Fig. 3A**). We also

observed a strong decrease in human Igk secreted by tumors, following treatment with ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss (**Fig.3B**).

Next, we sought to determine the impact of ASO treatment on established tumours. A single ASO injection was performed when tumors reached $\sim 600\text{mm}^3$ and we observed tumour regression in mice treated with ASO-V κ ₃₋₁₅-3'ss whereas tumors still grew upon treatment with ASO-Ctrl (**Fig. 3C**). Exon skipping analysis performed on ASO-injected tumor cells further confirmed that tumor regression was correlated with the appearance of ΔV - κ LC mRNAs (**Fig 3C**). Therefore, ASO targeting V exon 5'ss induced exon skipping and limits the growth of myeloma tumors *in vivo*.

Shaping of Ig repertoire using ASO targeting given V(D)J-rearranged RNA sequences

Using a dedicated mouse model harboring an extra-V exon in the *Igh* locus, we previously demonstrated that ASO treatment greatly induced V exon skipping in LPS-stimulated B cells, with more than 80% efficacy in CD138-positive plasmablasts (Ashi et al., 2019). To address whether the production of ΔV - κ LC after ASO-mediated V exon skipping induced selective depletion of ASCs, splenic B cells were stimulated with LPS in presence or absence of ASO targeting germline J κ 1 3'ss (**Fig. 4A, left**). Treatment with ASO-J κ 1-3'ss induced a complete V exon skipping in naïve B cells having not undergone SHM (**Fig.4B**). Interestingly, RACE-PCR analysis of Ig repertoire revealed selective disappearance of full length V κ J κ 1-rearranged transcripts, representing only 2.6 ± 1.5 % of total reads instead of 16.4 ± 3.9 % in ASO-Ctrl conditions (**Fig. 4C**). Similar results were obtained after analysis of VJ κ -rearranged clone frequency, with almost complete elimination of VJ κ 1 clones (8.5 ± 4.5 %) compared to ASO-Ctrl (26.9 ± 1.7 %) (**Fig. 4D**). Thus, V exon skipping after treatment with ASO hybridizing J-segment 5'ss could shape the Ig repertoire by mimicking the physiological TIE-checkpoint. Next, we performed similar experiments by using an ASO targeting JH2-5'ss (**Fig. 4A, right**). Again, RACE-PCR Ig repertoire analysis revealed that ASO treatment blunted the differentiation of most VD κ H2-rearranged clones (**Fig. 4E and 4F**). We obtained the same results with the ASO of decrease in reads (VD κ H2 total reads (6.75 ± 4.0 %) compared to ASO-Ctrl (37.2 ± 0.9 %)) and decrease in clones

(VDJH2 clones ($10.3 \pm 5.8\%$) compared to ASO-Ctrl ($37.4 \pm 1.3\%$). This selective elimination of ASC-expressing truncated V-less IgHC was consistent with previous findings for ER-stress associated apoptosis after production of ΔV - κ LC (Srour et al., 2016). Therefore, it should be tempting to speculate that the TIE-checkpoint could broadly act on most PCs harboring biallelic V(D)J rearrangement of Igh and Ig κ genes.

DISCUSSION:

In this study, we validated that ASO-mediated Ig exon skipping can be easily achieved by targeting the donor or acceptor splice site of V exons. This opens new pathways for therapeutic activation of the TIE-checkpoint in monoclonal gammopathies (patent WO2017089359A1) (Srour et al., 2016). The use of ASOs to induce massive production of truncated Ig chains represents a pioneer therapeutic approach that should be of great interest for these patients. Here we have shown that the splicing of Ig κ or λ transcripts can be modulated in multiple myeloma cells, causing a rapid toxicity followed by cell death by apoptosis.

The development of ASOs to specifically target the monoclonal Ig expressed by myeloma cells relies on the identification of the V(D)J rearrangement and the intronic sequences flanking this V exon. Precise sequencing of these regions is necessary as myeloma cells stand as post-GC cells, with many SHMs in their variable regions and having mostly undergone class switch recombination (CSR). We have seen that mutations introduced by SHM can create or reinforce the predictive score of cryptic donor splice sites (dss) within the CDRs, making it hazardous to anticipate the pattern of ASO-mediated alternative splicing. However, the targeting acceptor splice site (ass) with a more constrained consensus sequence due to the polypyrimidine tract, limits the use of unwanted cryptic splice sites and is very attractive to induce a complete V exon skipping.

Our results obtained after engraftment of SK-MM-2 cells revealed slower tumor growth and a higher median survival in the group treated with ASO hybridizing V exon ass, compared to control conditions. The development of ASO compounds capable of targeting tumour PC in medullary niches after systemic administration will be of great interest for the treatment of monoclonal gammopathies.

Improving the biodistribution of ASOs remains a major challenge common to all antisense approaches and new ASO conjugates are constantly being developed. To specifically target PC in BM it should be tempting to conjugate ASO with anti-CD38 antibodies currently used in MM (Satake et al., 2016; van de Donk and Usmani, 2018). Many chemical modifications of ASO have been tested over the last twenty-five years (Dominski and Kole, 1993), and PPMO (peptide conjugated-phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides) like B-PMOs (B peptide-conjugated PMO) could be useful to target B-lineage cells while ensuring a good splice switching efficiency (Bestas et al., 2014).

The impact of truncated Ig chains produced by alternative splicing in ASCs is largely unknown. Consistent with previous findings revealing the occurrence of a TIE-checkpoint during normal PC differentiation (Srour et al., 2016), ASO-mediated production of V-domain-less truncated Ig should be considered as an interesting therapeutic approach for monoclonal gammopathies. The delivery optimization, with more accurate biodistribution in BM niches, should boost the development of these innovative personalized strategies, targeting specifically tumor PC clones while sparing the other cells.

Figure 1: ASO targeting V exon 5'ss of monoclonal Igλ light chains

(A) Sequence of ASO (ASO- Jλ2-5'ss) targeting the monoclonal Igλ expressed by RPMI 8226 myeloma cells, at the donor splice site (dss) of the Vλ2-14-Jλ2 exon. ASO were synthesized as "vivo-morpholino ASO" for passive administration (Gene Tools, LLC). (Uppercase: exon sequence; lowercase: intron sequence; L1: Leader part 1; L2: Leader part 2; Vλ: variable segmentλ; Jλ2: junction segment λ2; Cλ: Constant exonλ). Schematic representation of Igλ spliced transcripts are also depicted (dashed grey lines (1) represent normal splicing and blue (B) or orange (G) ones splicing involving a cryptic dss (2)). **(B – G)** Experiments were performed in RPMI 8226 **(B-D)** and XG6 **(E-G)** cells treated or not with ASO (ASO: ASO- Jλ2-5'ss and Ctrl: ASO-Ctrl; 3 μM for 24 or 48 hours) **(B, top and E)** RT-PCR was performed using "Lpart1λ hs cons for" and "Cλ hs rev" primers to identify simultaneously constitutive and alternative splicing of Igλ transcripts. PCR products were analyzed on agarose gels. Schematic representation of Igλ mRNAs is indicated on the right. **(B, bottom)** Relative quantification of amplification products was done using Agilent 2100 Bioanalyzer. **(C and F)** Igλ light chain protein levels were analyzed by Western Blot. **(D and G)** Percentage of 7-ADD-positive cells was determined by flow cytometry. Data from n=4-8 experiments are represented as mean ± SEM and unpaired two-tailed Student's t test was used to determine statistical significance. (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001)

Figure 2: Exon skipping and production of harmful V-domain-less Igκ light chains using ASO targeting V exon 3'ss

(A) Sequence of "vivo-morpholino ASO" (ASO-Vκ3-3'ss) targeting the monoclonal Igκ expressed by SK-MM-2 myeloma cells, at the splice acceptor site of the IGVκ3-15-Jκ4 exon. (Uppercase: exon sequence; lowercase: intron sequence; L1: Leader part 1; L2: Leader part 2; Vκ3: variable segment κ3; Jκ: junction segment κ; Cκ: Constant exon κ). **(B – F)** Experiments were performed in SK-MM-2 cells treated or not with ASO (ASO: ASO-Vκ3-15-3'ss, Ctrl: ASO-Ctrl, (-): untreated ; 3 μM for 24 or 48 hours) **(B, top)** RT-PCR was performed using "Lpart1 Vκ3 hs for" and "Cκ hs rev" primers to identify simultaneously

constitutive and alternative splicing of Igκ transcripts. PCR products were analyzed on agarose gels. Schematic representation of Igκ mRNAs is indicated on the right. **(B, bottom)** Relative quantification of amplification products was done using Agilent 2100 Bioanalyzer. **(C)** Igκ light chain protein levels were analyzed by Western Blot. **(D)** Percentage of 7ADD-positive cells was determined by flow cytometry. **(E, left)** Heat map of RNA-Seq transcriptome analysis for 1624 selected genes ($(\text{abs}(\log_2\text{FC}) \geq 0,75)$; $\text{pvalue Adj} < 0,05$) from ASO, Ctrl and untreated groups. The differential analysis was performed using the following contrasts: Ctrl vs (-) and Ctrl vs ASO. The “DESeq2” package was used to perform the statistical modeling. **(E, right)** Among the differentially expressed genes identified in **Table S1**, “IPA software” was performed on specific genes involved in different cell death and proteostasis pathways and represented as heat map. Data from n=4-7 experiments are represented as mean \pm SEM and unpaired two-tailed Student's t test was used to determine statistical significance. (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001).

Figure 3: Antitumoral effect of ASO-inducing V exon skipping after engraftment of SK-MM-2 cells

(A, top) Representation of the experimental treatment protocol on mouse cohorts (ASO-Ctrl: Ctrl, n=11; ASO-V κ_{3-15} -3'ss: ASO, n=11; PBS, n=6). SK-MM-2 (2×10^6 cells/mice) mixed with Matrigel were grafted in Rag2^{-/-}γC^{-/-} by subcutaneous injection. The tumor size was calculated using the elipsa volume formula. When the tumour reached $\sim 100\text{mm}^3$, mice received intratumoural injections of ASO (25 nmoles/injection) or PBS, 4 times every 2-3 days. The size of each tumour was measured daily and blood was collected every 4 days. **(A, bottom)** ASO injections are represented by arrows. The mean tumor volume (left) and the mouse survival curve (right) are shown (median survival: Ctrl 18j, ASO 29j, n = 11, * p = 0.03). **(B)** Concentrations of human Igκ in mice sera (ELISA assays) at D4, D11 and D18. **(C)** A single injection of ASO (50 nmoles) was performed on established tumours ($\sim 600\text{mm}^3$) and the tumor volume were determined at D_n and D_{n+1}. RNA was extracted from tumor cells after ASO treatment (D_{n+1}) and RT-PCR were performed using “Lpart1 Vκ3 hs for” and “Cκ hs”. Data from n=4-11

experiments are expressed as mean \pm SEM and unpaired two-tailed Student's t test was used to determine statistical significance. (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001.)

Figure 4: ASO Shaping of primary Ig repertoire using ASO targeting given J segment 5'ss.

(A, left) Sequence of "vivo-morpholino ASO" (ASO-J κ 1-5'ss) targeting J κ 1 dss and, **(A, right)** sequence of ASO-JH2-5'ss targeting JH2 dss (uppercase: exon sequence; lowercase: intron sequence; L1: Leader part 1; L2: Leader part 2; V κ /H: variable segment κ or H; J κ /H: junction segment κ /H; C κ /H: Constant exon κ /H). **(B – C)** Splenic B cells were isolated from C57BL/6 mice, stimulated with LPS for 4 days and treated with 2 μ M ASO-J κ 1-5'ss, ASO-JH2-5'ss or an irrelevant control ASO (ASO-Ctrl), during the last 3 days **(B, left)** RT-PCR were performed using "Lpart1 V κ 1- 135 mur for" and "C κ mur rev" primers to identify simultaneously constitutive and alternative splicing of Ig κ transcripts **(B, right)** Relative quantification of amplification products was done using Agilent 2100 Bioanalyzer. **(C-F)** After RNA extraction, 5'RACE-PCR were performed using C κ **(C-D)** or CH1 γ **(E-F)** reverse primers and the clonal abundance was estimated after high-throughput sequencing of V(D)J junctions using the IMGT/HighV-QUEST software. Bar graphs represent the number of reads from VJ **(C)** and VDJ **(E)** junctions according to the presence of specific J κ and JH segments, respectively **(D and F)**. Pie charts and bar graphs represent the distribution of V(D)J clonotypes indicating a marked decrease in the frequency of VnJ κ 1 clones after treatment with ASO- J κ 1-5'ss **(D)** and VnDnJH2 clones after treatment with ASO-JH2-5'ss **(F)**. Data from n=4-6 experiments are expressed as mean \pm SEM and unpaired two-tailed Student's t test was used to determine statistical significance. (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001)

Figure S1: Sequence of Ig λ transcripts expressed in RPMI 8226 and XG6 myeloma cells

(A-B) Representation of the Ig λ sequence from RPMI 8226 **(A)** and XG6 **(B)** cells. Sequences were aligned using IMGT-VQUEST software and cryptic donor splice sites involved in alternative splicing are

shown in red, with predictive splicing scores noted below. ASO hybridization is also represented (blue), and **(B)** the asterisk indicates the mismatch identified for Ig λ sequence from XG6 cells.

Figure S2: Decreased Ig κ production after treatment of SK-MM-2 cells with ASO-V κ 3-3'ss.

SK-MM-2 cells were untreated (-) or treated with ASO-V κ 3-15-3'ss (ASO) or an irrelevant control ASO (Ctrl) after 48h ASO treatment. **(A)** Ig κ light chain protein levels were analyzed by Western Blot after normalization to the expression of actin. **(B)** ELISA assays were performed in culture supernatants to determine total Ig κ amounts. Data from n=5-6 experiments are expressed as mean \pm SEM and unpaired two-tailed Student's t test was used to determine statistical significance. (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001).

TABLE S1 : List of differentially expressed genes after treatment of SK-MM-2 cells with ASO-V κ 3-15-3'ss or control ASO. (abs(log2FC) \geq 0,75) ; pvalue Adj < 0,05).

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human myeloma cell lines SK-MM-2 from DSMZ (Germany) and RPMI 8226 from ATTC (USA) were cultured in RPMI 1640 medium in the presence of 10% fetal calf serum (FCS). Patient-derived XG6 cells were kindly provided by J. Moreaux (IGH - UMR 9002 Montpellier, France) and in RPMI 1640 medium in the presence of 10% FCS and 5 ng/ml recombinant human IL-6. All cell lines were checked for the absence of mycoplasma (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit; Lonza, Levallois, France). For ASO treatments, vivo-morpholino ASOs (ASO-J λ 2-5'ss: 5'- AGAAGAGACTCACGTAGGACGGTCA -3'; ASO-V κ 3-5'ss: 5'- CCAGTGGTATCTGAAATTGGAAATA-3') and an irrelevant ASO (ASO-Ctrl: 5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') were designed and purchased at Gene Tools, LLC (Philomath,

USA). Experiments were performed at 0.5 million cells/mL in the presence of 3 μ M ASO. Culture samples and supernatants were harvested at day 1 or 2 for subsequent flow cytometry analysis, MTS assays or RNA/protein extraction, as described below. Supernatants of cells were collected and stored at -20°C until used for enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs).

RT-PCR and PCR

RNA was extracted using the TRIzol™ reagent (Invitrogen) procedure. Reverse transcription was carried out on 1 μ 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 exon skipping, PCRs were performed on cDNA using the Taq Core Kit (MP Biomedicals) and appropriate primer pairs (Lpart1 λ hs cons for: 5'-ATGGCCTGGDYVYDCTVYTYCT-3'; C λ hs rev: 5'-CTCCCGGGTAGAAGTCACT-3'; Lpart1 V κ 3 hs for: 5'-ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTT-3'; C κ hs rev : 5'-GCGGGAAGATGAAGACAGAT-3'; Lpart1 V κ 1-33 mur for: 5'-ACGGCCCAGCATGGACATGAGGGTCCCTGCTC-3', C κ mur rev : 5'-GCACCTCCAGATGTAACTGC-3'; D = A or G or C, Y = C or T, V = A or C or G). 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 primers. 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 BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on a 3130 \times I Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems). Quantification of PCR products was also performed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) according to the Agilent High Sensitivity DNA kit instructions.

ELISA

Culture supernatants and sera were analyzed for the presence of Igκ by ELISA. ELISAs were performed in polycarbonate 96-multiwell plates, coated overnight at 4°C (100 μl per well) with 2 μg/ml Igκ antibodies (Goat Anti-Human kappa-UNLB, SouthernBiotech, ref 2060-01) in PBS. After three successive washing steps in PBS with 0.05% Tween® 20 (Sigma-Aldrich), a blocking step with 100 μl of 3% bovine serum albumin (BSA) (Euromedex) in PBS was performed for 30 min at 37°C. After three washing steps, 50 μl of sera/supernatant or standards Igκ/Igλ (Southern Biotechnologies, 400 ng/ml) were diluted into successive wells in 1% BSA/PBS buffer and incubated for 2 h at 37°C. After three washing steps, 100 μl per well of 1 μg/l alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-human antibodies (Goat Anti-Human kappa-AP, SouthernBiotech, ref 2060-04) was incubated in PBS with 0.05% Tween® 20 for 2 h at 37°C. After three washing steps, AP activity was determined by adding 100 μl of substrate for AP (SIGMAFAST™ p-nitrophenyl phosphate tablets, Sigma-Aldrich) during ~15 min, the reaction was then blocked with the addition of 50 μl of 3 M NaOH (Sigma-Aldrich). Optic density was measured at 405 nm on a Multiskan FC microplate photometer (Thermo Scientific).

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-Human lambda-UNLB (SouthernBiotech, ref 2070-01) or Goat Anti-Human kappa-UNLB (SouthernBiotech, ref 2060-01) antibodies. Detection was performed using an HRP-linked rabbit anti-goat secondary antibody 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.

Cell viability assays

Cell viability was assessed by flow cytometry after staining with 7-AAD (BD Pharmingen, ref 559925). Briefly, 500,000 cells were incubated for 15 min with 7-AAD (200 µl) in PBS supplemented with 2% FCS and 2 mM (ethylenedinitrilo) tetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich), at 4 °C in the dark. Data were acquired on a BD Pharmingen Fortessa LSR2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using Flowlogic™ software (Miltenyi Biotec).

Engraftment of SK-MM-2 myeloma cells in Rag2^{-/-}γC^{-/-} mice

3–4-mo-old mice were used in all experiments and maintained in our animal facilities, at 21–23°C with a 12-h light/dark cycle. Experiments were performed according to the guidelines of the ethics committee in Animal Experimentation of Limousin (registered by the National Committee). SK-MM-2 were harvested during the exponential growth phase (5×10^5 cells/ml), mixed with Matrigel (Becton Dickinson) and engrafted by subcutaneous injection in previously shaved Rag2^{-/-}γC^{-/-} mice (2×10^6 cells/mice) . The mice were palpated every 2 days. When the tumour became detectable, two perpendicular diameters were measured and the tumor size was calculated using the elipsa volume formula. When the tumour reached $\sim 100\text{mm}^3$, mice received intratumoural injections of ASO (ASO-Vκ3-5'ss or ASO-Ctrl: 25 nmoles/injection) or PBS, 4 times every 2-3 days. The size of the tumour was then measured daily and serum was taken every 4 days. Mice were ethically sacrificed when tumor volumes reached $\sim 800\text{-}900\text{mm}^3$ as represented in the death curve.

LPS stimulation of mouse B cells and ASO treatments

Splenic B cells isolated from C57BL/6, mice were purified with the EasySep Mouse B Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies). B cells were cultured for 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 µg/ml streptomycin (Gibco), and 129 µM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Splenic B cells were stimulated with either 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) (LPS-EB Ultrapure, InvivoGen) for 4 days.

For ASO treatments, vivo-morpholino ASOs (ASO-Jκ1-5'ss ASO : 5'-ACTTTGGATTCTACTTACGTTTGAT-3'; ASO-JH2-5'ss ASO: 5'-AGAGGTTGTAAGGACTCACCTGA-3') and an irrelevant ASO (ASO control: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA-3') were designed and purchased at Gene Tools, LLC (Philomath, USA). Stimulated splenic B cells were cultured in the presence of 3 µM ASO for 3 days, starting from day 1 of LPS stimulation. Culture samples were harvested at day 4 for subsequent RNA extraction and analysis by RT-PCR and RACE-PCR.

High-throughput sequencing of immunoglobulin repertoire

The clonal abundance was estimated after high-throughput sequencing of VDJ junctions. Repertoire sequencing was performed as previously described (Li et al., 2013). Briefly, RNA (100-500 ng) was extracted from cells, and 5'RACE-PCR (rapid amplification of 5' cDNA-ends by polymerase chain reaction) was performed using CH1γ or Cκ specific reverse primers (Boice et al., 2016). Sequencing adapter sequences were added by primer extension. The amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq sequencing system using the MiSeq kit Reagent V3 600 cycles. Repertoire analysis was performed using the IMGT/HighV-QUEST tool and the R software (Alamyar et al., 2012; Bischof and Ibrahim, 2016). Briefly, CDR3 junctions were identified using HighV-QUEST. Based on these annotations, the reads were grouped into clonotypes that shared the same CDR3 and V, D (for heavy chains) and J sequences. To define the extent of variability allowed between CDR3, each CDR3 amino acid sequence was aligned against itself to define a maximum alignment score. Then, all CDR3 bearing

the same V(D)J segments were aligned against each other. CDR3 were considered as coming from the same clonotype if their alignment score was superior or equal to 70% of their maximum alignment score. Then, the relative abundance of each clonotype was calculated. For this study, clones are defined either by a single read or by several identical reads, which makes it possible to consider all clones.

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SEM, and overall differences between variables were evaluated by a Student's t test using Prism GraphPad software (San Diego, CA)

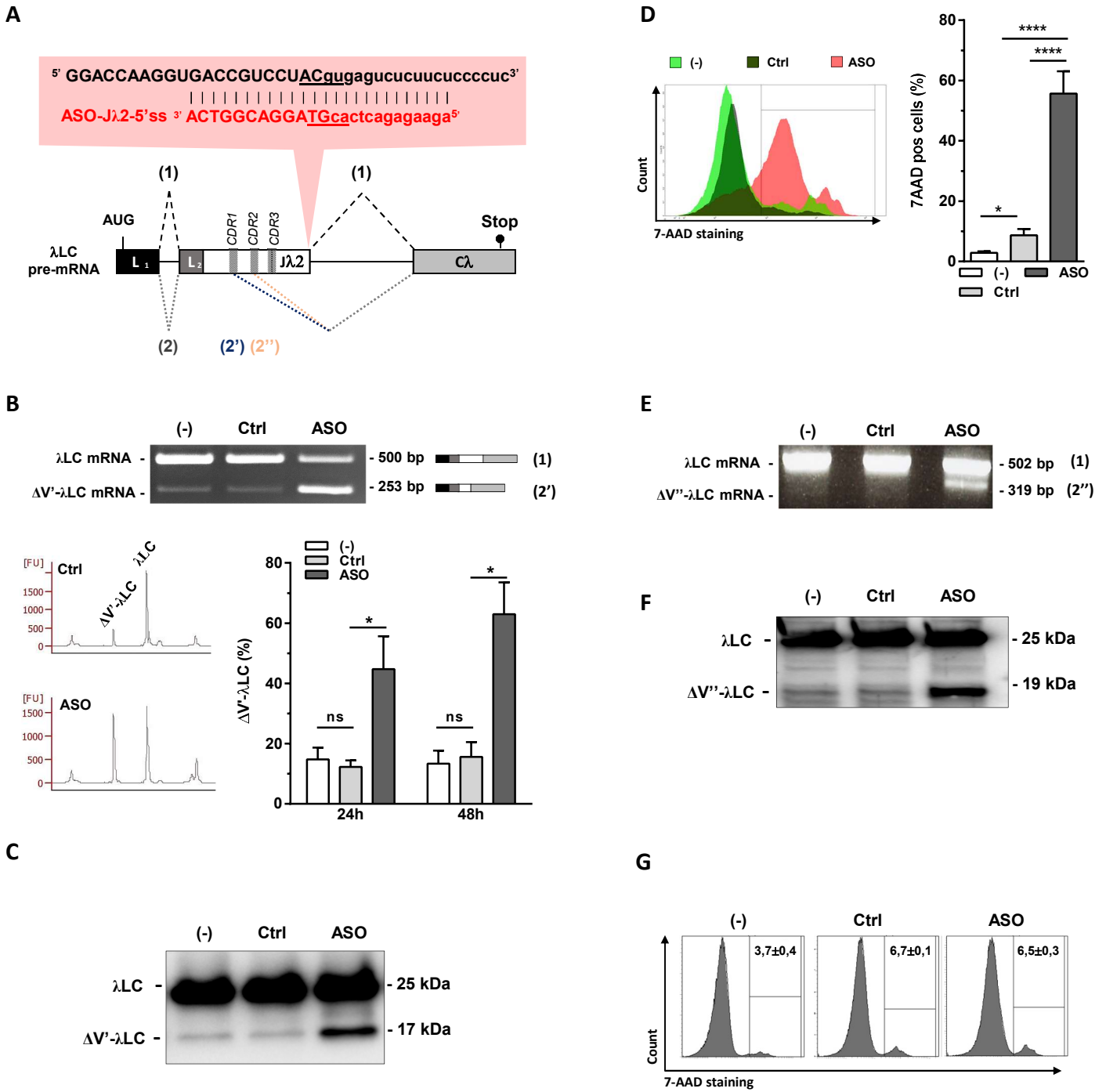


Figure 1

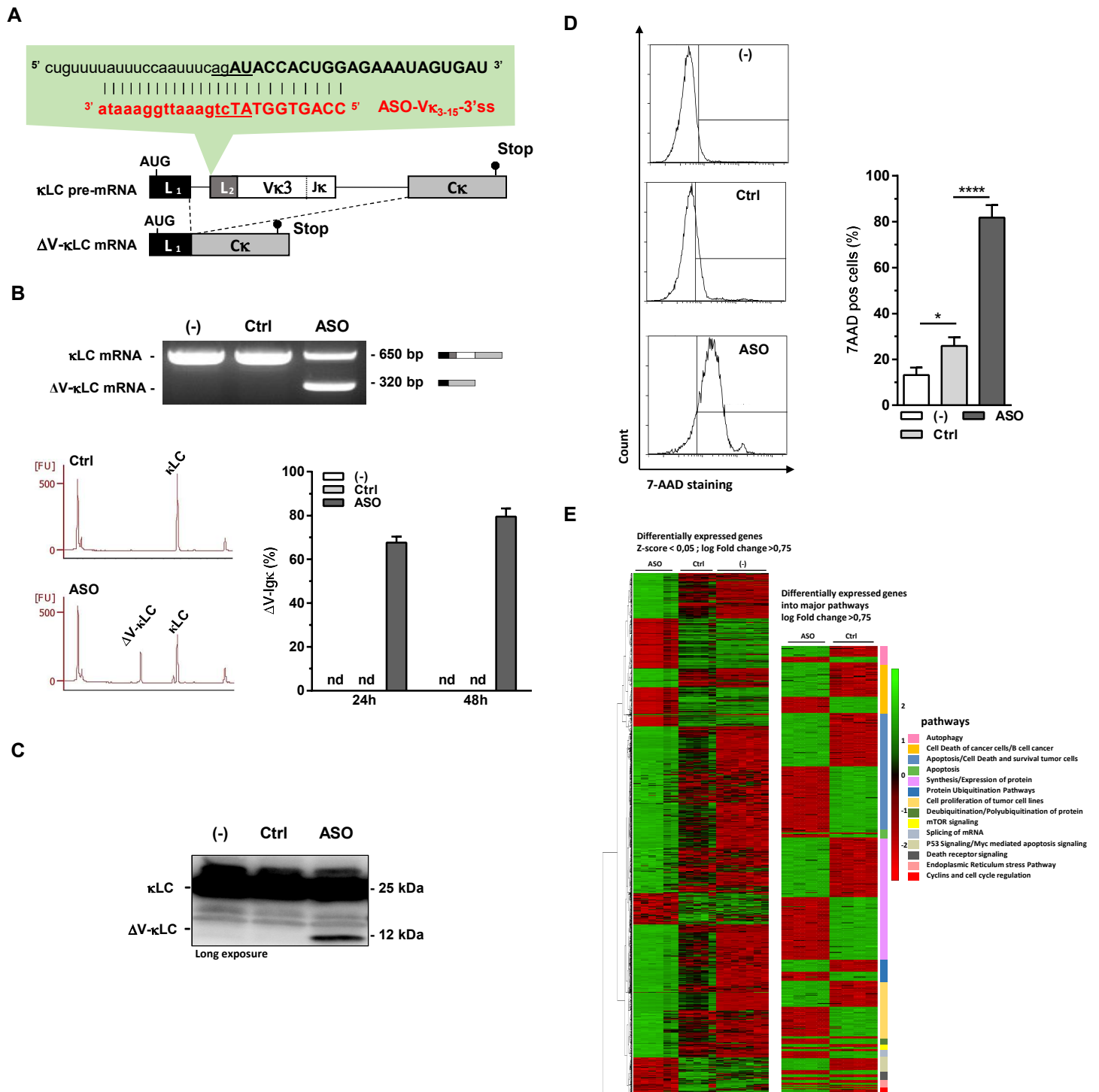


Figure 2

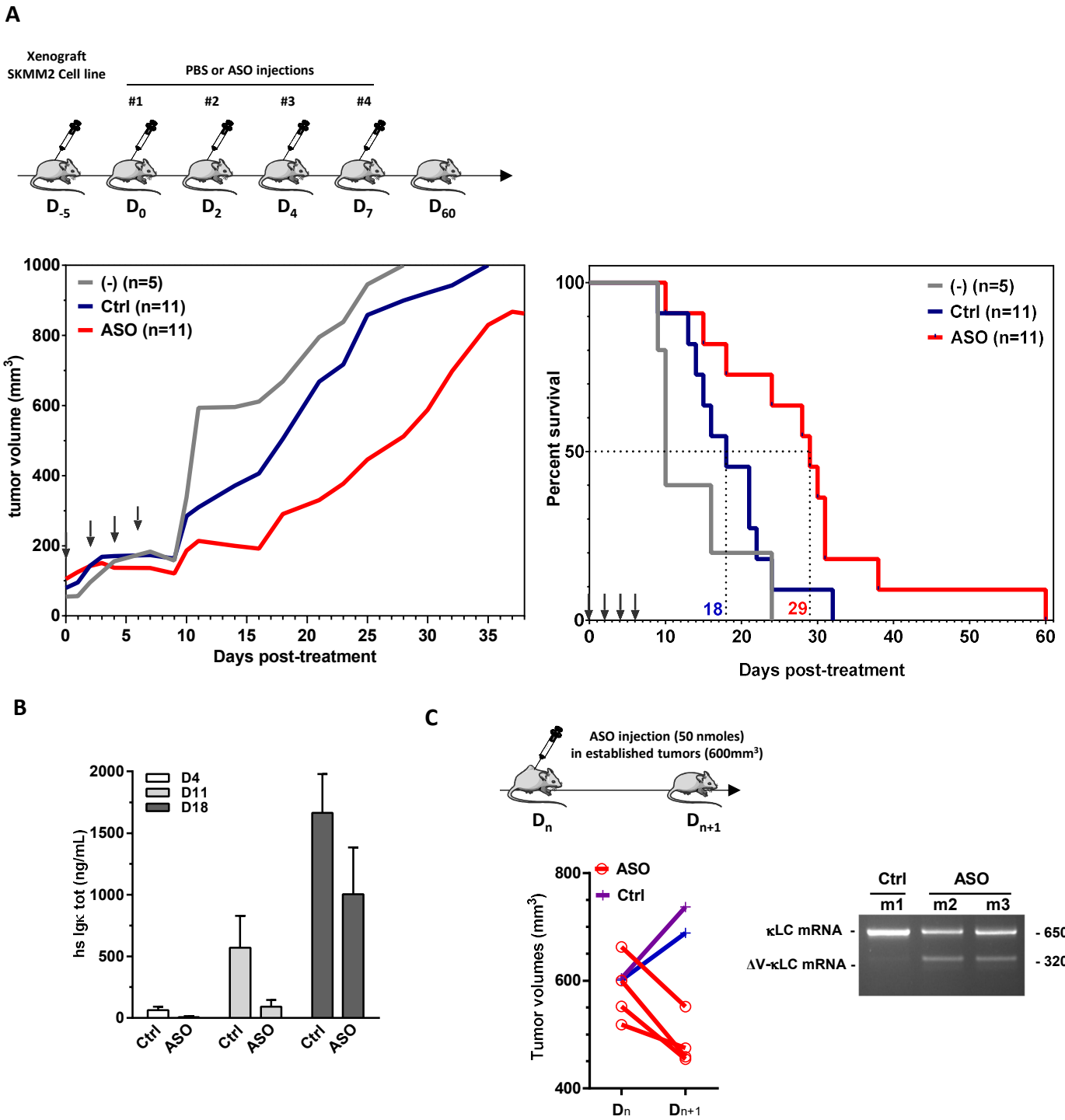


Figure 3

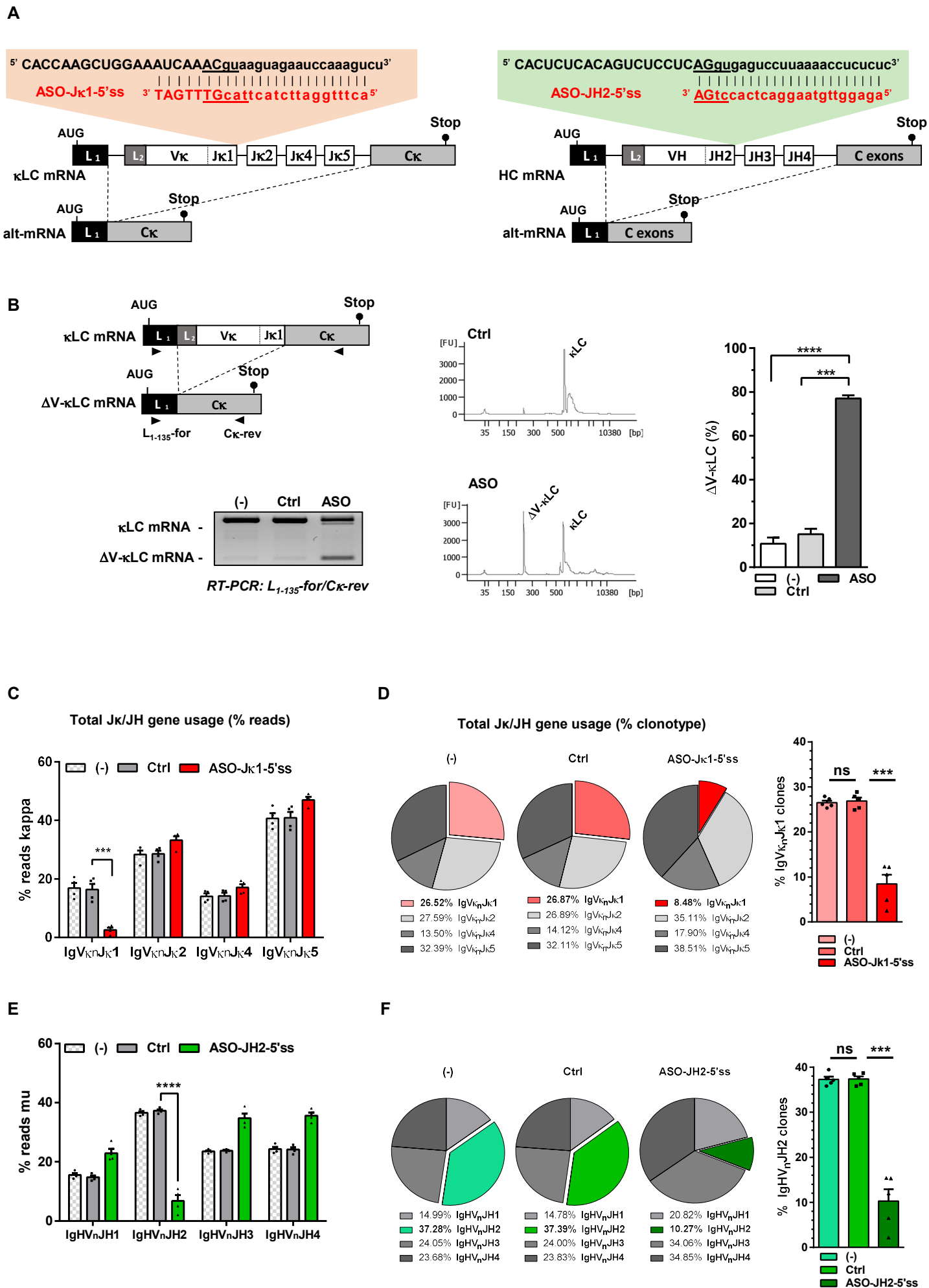


Figure 4

A

```

<-----FR1-IMGT----->-----CDR1-IMGT-----<
cagtctgcctgactcagcctgcctcc...gtgaatgggtctctcctggacagtttgatcataatctcctgcactggaccagcagtgacattggt...gactatcaatataatttcc
IGLV2-14*01-          0,2
IGLJ2*01          0,002
-----FR2-IMGT----->-----CDR2-IMGT-----<
tggtacaacaaccccaggcaaaagcccccaactcataatttatgatgtc.....gataagcggccctcaggggttctt...aatcgcttctctggctccaag
-----FR3-IMGT----->-----CDR3-IMGT-----<
...tctggcaacacggcctccctgaccatctctggcctccaggctgaggacaggtgattactgcagttcataatagagggcagcggccacttccgaggtaggttcggccggagggg

```

```

-----Jλ2-----<-----intron----->
accaaaggtagccgtccttacgtgagtctcttccctctccttcccagctcccagctctgggacatctcttctgttttcttctgttttctccat
TGACCGTCTACGTGAGTCTTCT ASO-Jλ2-5' ss

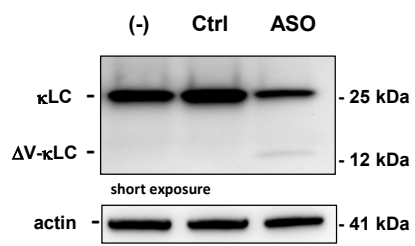
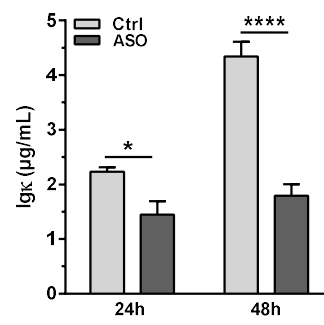
```

B

```

<-----FR1-IMGT----->-----CDR1-IMGT-----<
ttgtctgttttgacgcagccgctca...atgtctgggccccagggcagaggatcacctctcctgcactgggagcagctccaacatcggg.....gcaggttatgatgtccac
IGLV1-40*01-          0,792
IGLJ2*01          0,698
-----FR2-IMGT----->-----CDR2-IMGT-----<
tggtaccagcagttccaggaaacagcccccaactcctcatctttgtaac.....aaaaatcggccctcaggggtccct...gaccgattctctggctccaag
-----FR3-IMGT----->-----CDR3-IMGT-----<
...tctggctcctcagcctccctggccacaagggactcagggctgaggatgaggctgacttactgccagtcctatgacagcagcctgagtggtcccatgtgtatcgggggga
-----Jλ2-----<-----intron----->
gggaccagggtagccgtccttaagtgagtccttccctctccttcccgcctcttgggacatttcttttggttttggtttg
TGACCGTCTACGTGAGTCTTCT ASO-Jλ2-5' ss
*
```

Figure S1

A**B****Figure S2**

REFERENCES

- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., Dynlacht, B.D., 2007. XBP1 Controls Diverse Cell Type- and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks. *Mol. Cell* 27, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011>
- Alamyar, E., Duroux, P., Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., 2012. IMGT(®) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 882, 569–604. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_32
- Ashi, M.O., Srour, N., Lambert, J.-M., Marchalot, A., Martin, O., Le Noir, S., Pinaud, E., Ayala, M.V., Sirac, C., Saulière, J., Moreaux, J., Cogné, M., Delpy, L., 2019. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell. Mol. Immunol.* 16, 810–819. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0160-6>
- Auner, H.W., Cenci, S., 2015. Recent advances and future directions in targeting the secretory apparatus in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 168, 14–25. <https://doi.org/10.1111/bjh.13172>
- Bestas, B., Moreno, P.M.D., Blomberg, K.E.M., Mohammad, D.K., Saleh, A.F., Sutlu, T., Nordin, J.Z., Guterstam, P., Gustafsson, M.O., Kharazi, S., Piątosza, B., Roberts, T.C., Behlke, M.A., Wood, M.J.A., Gait, M.J., Lundin, K.E., El Andaloussi, S., Månsson, R., Berglöf, A., Wengel, J., Smith, C.I.E., 2014. Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J. Clin. Invest.* 124, 4067–4081. <https://doi.org/10.1172/JCI76175>
- Bischof, J., Ibrahim, S.M., 2016. bcRep: R Package for Comprehensive Analysis of B Cell Receptor Repertoire Data. *PLOS ONE* 11, e0161569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161569>

- Boice, M., Salloum, D., Mourcin, F., Sanghvi, V., Amin, R., Oricchio, E., Jiang, M., Mottok, A., Denis-Lagache, N., Ciriello, G., Tam, W., Teruya-Feldstein, J., de Stanchina, E., Chan, W.C., Malek, S.N., Ennishi, D., Brentjens, R.J., Gascoyne, R.D., Cogne, M., Tarte, K., Wendel, H.-G., 2016. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell* 167, 405-418.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.032>
- Cohen, C., Royer, B., Javaugue, V., Szalat, R., El Karoui, K., Caulier, A., Knebelmann, B., Jaccard, A., Chevret, S., Touchard, G., Fermand, J.-P., Arnulf, B., Bridoux, F., 2015. Bortezomib produces high hematological response rates with prolonged renal survival in monoclonal immunoglobulin deposition disease. *Kidney Int.* 88, 1135–1143. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.201>
- Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., Bérout, C., 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37, e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>
- Dewaele, M., Tabaglio, T., Willekens, K., Bezzi, M., Teo, S.X., Low, D.H.P., Koh, C.M., Rambow, F., Fiers, M., Rogiers, A., Radaelli, E., Al-Haddawi, M., Tan, S.Y., Hermans, E., Amant, F., Yan, H., Lakshmanan, M., Koumar, R.C., Lim, S.T., Derheimer, F.A., Campbell, R.M., Bonday, Z., Tergaonkar, V., Shackleton, M., Blattner, C., Marine, J.-C., Guccione, E., 2016. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J. Clin. Invest.* 126, 68–84. <https://doi.org/10.1172/JCI82534>
- Dominski, Z., Kole, R., 1993. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8673–8677. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8673>
- Eyer, K., Doineau, R.C.L., Castrillon, C.E., Briseño-Roa, L., Menrath, V., Mottet, G., England, P., Godina, A., Brient-Litzler, E., Nizak, C., Jensen, A., Griffiths, A.D., Bibette, J., Bruhns, P., Baudry, J., 2017.

- Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring. *Nat. Biotechnol.* 35, 977–982. <https://doi.org/10.1038/nbt.3964>
- Gandolfi, S., Laubach, J.P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., Richardson, P.G., 2017. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev.* 36, 561–584. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9707-8>
- Gass, J.N., Jiang, H.-Y., Wek, R.C., Brewer, J.W., 2008. The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol. Immunol.* 45, 1035–1043. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.07.029>
- Hoy, S.M., 2017. Nusinersen: First Global Approval. *Drugs* 77, 473–479. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0711-7>
- Jaccard, A., Comenzo, R.L., Hari, P., Hawkins, P.N., Roussel, M., Morel, P., Macro, M., Pellegrin, J.-L., Lazaro, E., Mohty, D., Mercie, P., Decaux, O., Gillmore, J., Lavergne, D., Bridoux, F., Wechalekar, A.D., Venner, C.P., 2014. Efficacy of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone in treatment-naïve patients with high-risk cardiac AL amyloidosis (Mayo Clinic stage III). *Haematologica* 99, 1479–1485. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.104109>
- Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., Hiepe, F., 2019. The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00721>
- Lambert, J.-M., Ashi, M.O., Srour, N., Delpy, L., Saulière, J., 2020. Mechanisms and Regulation of Nonsense-Mediated mRNA Decay and Nonsense-Associated Altered Splicing in Lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21041335>
- Lambert, J.-M., Srour, N., Delpy, L., 2019. The Yin and Yang of RNA surveillance in B lymphocytes and antibody-secreting plasma cells. *BMB Rep.* 52, 671–678. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.12.232>

- Li, Q., 2020. Nusinersen as a Therapeutic Agent for Spinal Muscular Atrophy. *Yonsei Med. J.* 61, 273–283. <https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.4.273>
- Li, S., Lefranc, M.-P., Miles, J.J., Alamyar, E., Giudicelli, V., Duroux, P., Freeman, J.D., Corbin, V.D.A., Scheerlinck, J.-P., Frohman, M.A., Cameron, P.U., Plebanski, M., Loveland, B., Burrows, S.R., Papenfuss, A.T., Gowans, E.J., 2013. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat. Commun.* 4, 2333. <https://doi.org/10.1038/ncomms3333>
- Marchalot, A., Ashi, M.O., Lambert, J.-M., Carrion, C., Lecardeur, S., Srour, N., Delpy, L., Le Penneç, 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00780>
- Oliva, L., Orfanelli, U., Resnati, M., Raimondi, A., Orsi, A., Milan, E., Palladini, G., Milani, P., Cerruti, F., Cascio, P., Casarini, S., Rognoni, P., Touvier, T., Marcatti, M., Ciceri, F., Mangiacavalli, S., Corso, A., Merlini, G., Cenci, S., 2017. The amyloidogenic light chain is a stressor that sensitizes plasma cells to proteasome inhibitor toxicity. *Blood* 129, 2132–2142. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-730978>
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., Glimcher, L.H., 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307. <https://doi.org/10.1038/35085509>
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Satake, N., Duong, C., Yoshida, S., Oestergaard, M., Chen, C., Peralta, R., Guo, S., Seth, P.P., Li, Y., Beckett, L., Chung, J., Nolte, J., Nitin, N., Tuscano, J.M., 2016. Novel Targeted Therapy for Precursor B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: anti-CD22 Antibody-MXD3 Antisense

Oligonucleotide Conjugate. *Mol. Med. Camb. Mass* 22, 632–642.
<https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00210>

Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H., Staudt, L.M., 2004. XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. *Immunity* 21, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.010>

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

Todd, D.J., McHeyzer-Williams, L.J., Kowal, C., Lee, A.-H., Volpe, B.T., Diamond, B., McHeyzer-Williams, M.G., Glimcher, L.H., 2009. XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* 206, 2151–2159.
<https://doi.org/10.1084/jem.20090738>

van de Donk, N.W.C.J., Usmani, S.Z., 2018. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front. Immunol.* 9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02134>

Zhu, H., Bhatt, B., Sivaprakasam, S., Cai, Y., Liu, S., Kodeboyina, S.K., Patel, N., Savage, N.M., Sharma, A., Kaufman, R.J., Li, H., Singh, N., 2019. Ufbp1 promotes plasma cell development and ER expansion by modulating distinct branches of UPR. *Nat. Commun.* 10.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08908-5>

Résultats préliminaires.

Modulation de l'expression d'Ig par ciblage des exons constants à l'aide d'ASO

Objectifs :

En parallèle du ciblage de l'exon V qui permettrait une thérapie personnalisée, nous avons testé une stratégie de ciblage des exons CH1 de chaînes lourdes d'Ig, pour forcer la synthèse d'Ig tronquées dépourvues d'un domaine constant. Cette approche antisens ciblant les séquences constantes très conservées présente un caractère générique intéressant, limitant le nombre d'ASO à tester. Cette stratégie permettant de diminuer l'expression de sous-classes particulières d'Ig pourrait permettre de moduler l'expression d'IgG dans les maladies auto-immunes dépendantes des anticorps, d'IgE dans les manifestations allergiques, ou encore de diminuer les dépôts d'IgA au niveau des reins dans la maladie de Berger. Nous présentons ici des résultats préliminaires pouvant conduire à de nouvelles pistes de recherche.

Méthodologie :

Nous avons élaboré un ASO-CH1-5'ss ciblant le dss de l'exon CH1 des chaînes lourdes γ humaines. Cet ASO est homologue avec les séquences des exons CH1 γ_1 et γ_4 , et présente 1 mésappariement en 3' des séquences CH1 γ_3 et γ_2 qui n'empêche pas son hybridation (**Fig.1A**).

Dans un premier temps, nous avons testé le traitement ASO sur des PBMC (« Peripheral Blood Mononuclear Cells ») stimulés *in vitro*. Les PBMC ont été isolés d'un anneau de cytophèrese par gradient de densité sur Ficoll Lympholyte™ dans des tubes SepMate™. Les cellules B ont été triées à l'aide du kit « EasySep Human B Cell Isolation Kit » (StemCell #17954) avec une pureté généralement supérieure à 95 % (CD19⁺CD20⁺). Les cellules B ont ensuite été stimulées par le cocktail suivant : CPG-ODN2006 (1 μ g/ml), BCR Fab'2 IgA+G+M (5ng/mL), rhIL-2 (5ng/mL) et Mega-hCD40L (100ng/mL) durant 4 jours avec un ajout d'hIL10 (5ng/mL) à 48h. À J4, les cellules stimulées ont été soumises à une étape de différenciation plasmocytaire en présence de rhIL-2 (5ng/mL), hIL10 (12ng/mL) et hIL-4 (5ng/mL) durant 3 jours. Les traitements par l'ASO-CH1-5'ss et ASO-Ctrl (2 μ M, 48 à 72h) ont été réalisés durant cette dernière étape. Nous avons également étudié l'effet de l'ASO à l'aide d'une lignée de myélome (LP1) exprimant une IgG1. Les cellules ont été traitées avec l'ASO-CH1-5'ss à 3 μ M pendant 24h à 48h.

Résultats :

Les RT-PCR ont été faites par des amorces situées sur les « Leader part-1 » des principales familles VH (VH1 à VH6) et sur l'exon CH3 γ 1 (**Fig.1B**). De façon intéressante, nous observons une forte diminution des ARNm γ 1 pleine taille après traitement par l'ASO-CH1-5'ss. Ce résultat a été confirmé par qPCR en utilisant des amorces situées sur les exons CH2 et CH3 permettant de quantifier tous les ARNm γ 1. Concernant l'analyse de l'épissage alternatif, les RT-PCR ne nous ont pas permis de mettre en évidence un saut de l'exon CH1, laissant supposer que le traitement ASO provoque plutôt une rétention de séquences introniques. Des expériences sont en cours pour explorer cette hypothèse. Au niveau protéique, le traitement ASO-CH1-5'ss provoque une diminution marquée de la production d'IgG (WB et dosages ELISA) (**Fig.1C et 1D**).

En parallèle, nous avons traité les cellules LP1 par l'ASO-CH1-5'ss (**Fig.1E**). Ces expériences ont confirmé la baisse drastique d'IgG1 au niveau protéique. Nous avons ensuite exploré l'épissage alternatif provoqué par RT-PCR en l'analysant les ARNm γ 1. Le séquençage a révélé un épissage alternatif utilisant un dss cryptique au sein de l'exon VH (au niveau de la partie FR3) et le site ass situé sur l'exon Hinge (H), en aval de de l'exon CH1. Cet événement respecte le cadre de lecture et pourrait permettre la production d'une chaîne γ 1 tronquée, dépourvue de son domaine CH1 et d'une partie de son domaine V. Néanmoins, pour une raison encore inexplicée, l'analyse par WB n'a pas révélé la présence d'une telle chaîne d'Ig tronquée. La mutation créatrice du dss cryptique est vraisemblablement provoquée par SHM puisqu'elle n'est pas présente sur la séquence germinale (LP1 muté : GAG/GT; séquence germinale : GAG/GC) (**Fig.S1**).

Discussion/Conclusion :

Ces résultats préliminaires démontrent l'intérêt de cette approche antisens ciblant les exons constants pour réduire la quantité d'Ig dans le traitement des maladies impliquant des anticorps. En ce qui concerne l'analyse de l'épissage, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence de transcrits alternatifs observée sur les LB stimulés. Par exemple un épissage alternatif entre un dss cryptique proche ou au sein de l'exon CH1 et le site ass de l'Hinge pourrait induire un décalage du cadre de lecture et provoquer la dégradation par NMD du transcrit alternatif. D'autre part, l'intron situé entre les exons CH1 et Hinge possède une taille d'environ 390pb et pourrait être conservé dans l'ARNm. En revanche, nous avons pu observer un épissage alternatif après traitement de la lignée LP1 par l'ASO-CH1-5'ss. Cet

épissage entre un dss cryptique au sein de l'exon V et le site ass de l'Hinge souligne une fois de plus la redondance des dss cryptiques et la difficulté à prédire l'effet des ASO ciblant les dss sur des cellules post-GC (voir aussi « Discussion & Perspectives »). A l'avenir, il serait préférable d'utiliser des ASO ciblant l'ass du CH1 ou d'autres séquences telles que les ESE ou ISE.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Targeting the 5'ss of CH1 exons allows isotype specific modulation of Ig production (preliminary results)

ASO treatments were performed on human B cells and LP1 myeloma cells. **(A)** Sequence of ASO-CH1-5'ss (blue) targeting the donor splice site (dss) of the CH1 γ exon of human IgG1 and IgG4, and also IgG2 and IgG3 with one nucleotide mismatch (yellow). ASO-CH1-5'ss: (ASO: 5'-CTGTGCTGGCCTCTCACCAA-3') and an irrelevant control ASO (Ctrl: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA-3') were synthesized as "vivo-morpholino ASO" (Gene Tools, LLC) for passive administration (uppercase: exon sequence; lowercase: intron sequence). **(B – D)** Purified human B cells (sorted as described in the methodology section) were cultured at 0.75 million cells / mL following a 2-step protocol: a proliferation step from d0 to d4 using CPG-ODN2006 (1 μ g / ml), BCR Fab'2 IgA + G + M (5ng / mL), rhIL-2 (5ng / mL) and Mega-hCD40L (100ng / mL) for 4 days with an addition of hIL10 (5ng / mL), and a plasma cell differentiation step from d4 to d7 using rhIL-2 (5ng / mL), hIL10 (12ng / mL) and hIL-4 (5ng / mL). ASO (2 μ M) were added in culture medium during the plasma cell differentiation step (3 days). **(B)** Representation of the protocol used for cell culture and ASO treatment. Primers are also depicted (arrows). RT-PCR were performed using several forward primers identifying most of the VH families ("IgVHn-for") (**Table S1**) and "CH3 γ 1-rev" primers (**B, right**) PCR products were analyzed on agarose gels. **(B, left)** Bar graph represents γ 1 expression relative to GAPDH mRNA expression, measured by quantitative RT-PCR using "CH2 γ 1-for" and "CH3 γ 1-rev" primers. **(C)** Quantification of IgG tot and IgM in culture supernatants by ELISA, showing a specific decrease of IgG production with similar IgM production in ASO treated plasma

cells. **(D)** Western Blot and quantification of IgG expression after normalization to the intensity of actin bands. **(E)** IgG1-expressing LP1 myeloma cells were cultured (0.5 million cells/mL) in the presence of ASO (3 μ M) for 24 or 48 hours. RT-PCR was performed using “IgVH3-for” and “C γ 1 CH3-rev” primers. **(E, Top)** PCR products were analyzed on agarose gels identifying both full length and alternative mRNAs. **(E, Bottom)** IgG and actin levels were analyzed by Western blot. **(E, right)** Bar graphs represent the quantification of IgG protein levels after 48h ASO treatment. Intracellular IgG amounts were determined after normalization to actin protein expression. The secretion of IgG in culture supernatants was measured by ELISA. Representative data from 2 independent experiments are depicted and bar graphs are expressed as mean \pm SEM.

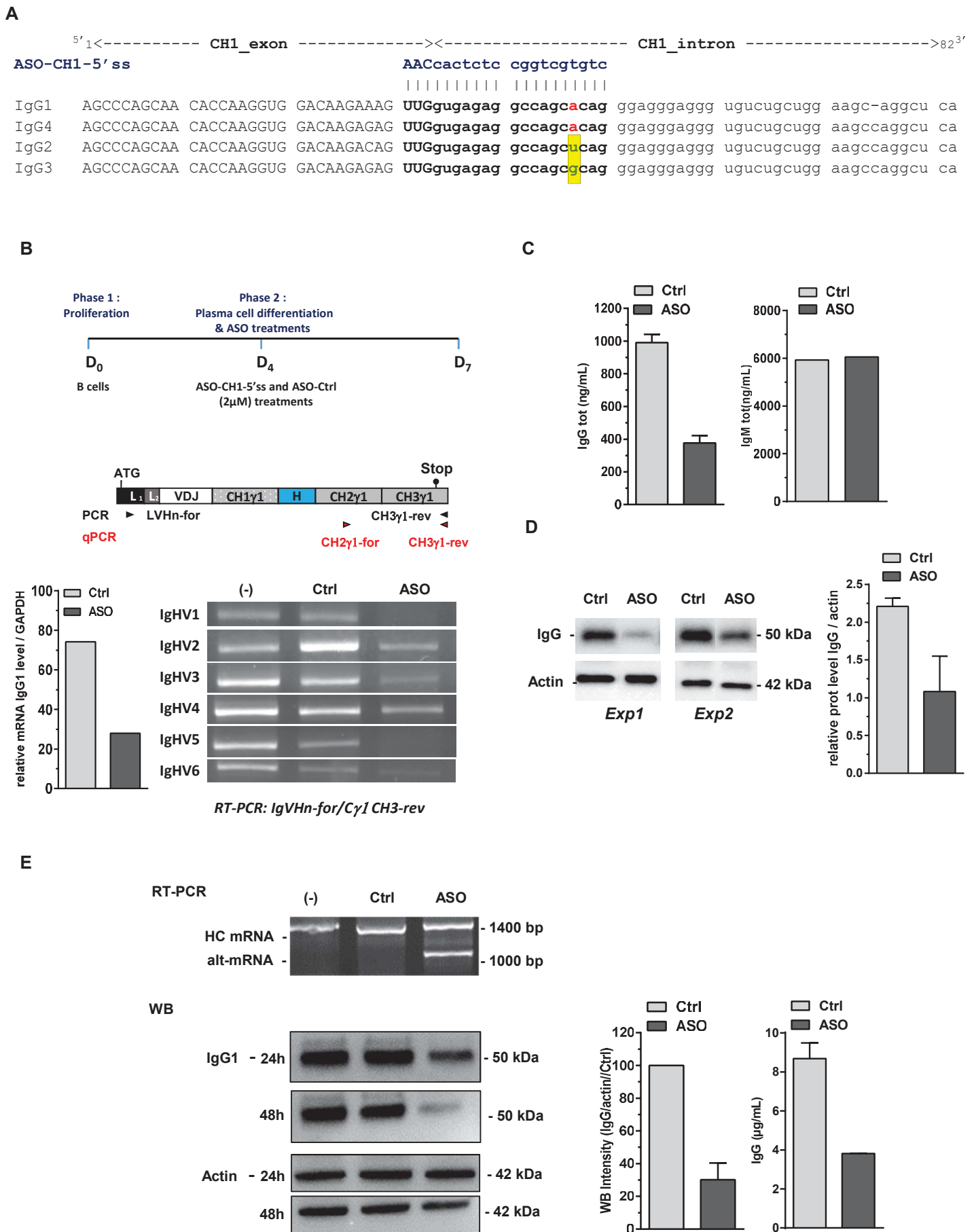


Figure 1

Article 2.

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

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,*}

Front. Immunol., 08 May 2020 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00780>

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

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

**Correspondence: Laurent Delpy, laurent.delpy@unilim.fr; Soazig Le Pennec, soazig.le-pennec@unilim.fr*

Cet article s'intéresse au mécanisme de CSR (« Class switch Recombination ») qui permet de modifier l'isotype d'un anticorps dans les cellules B. La CSR remplace les exons C μ par les exons C γ , C ϵ ou C α , permettant l'expression d'anticorps de différentes classes (IgM, IgG, IgE ou IgA) avec des fonctions effectrices différentes. Elle a lieu entre 2 régions « switch » (S) : la région S μ dite donneuse et une région S x acceptrice en aval. Ces régions S subissent des cassures double brin avec la suppression de l'ADN intermédiaire par formation d'un cercle d'excision. La CSR est un mécanisme dépendant de la transcription et chaque région S présente une « unité transcriptionnelle » composée d'un promoteur I (pI), d'un exon I non-codant, de la région S et des exons CH. Bien que cette transcription germinale des régions S soit nécessaire pour le déroulement de la CSR, elle ne semble pas suffisante. En effet, le remplacement de l'exon I ϵ par un promoteur fort (E μ associé au promoteur pVH) chez la souris entraîne une transcription normale de S ϵ mais ne permet pas une CSR vers IgE efficace (Bottaro et al., 1994). Les expériences menées par les équipes d'Alt et de Radbruch ont rapporté l'importance des sites donneurs d'épissage des exons I durant le processus de CSR (Hein et al., 1998; Lorenz et al., 1995; Seidl et al., 1998) avec un rôle direct de la machinerie d'épissage dans le recrutement d'AID au niveau des régions S (Conticello et al., 2008; Nowak et al., 2011).

Notre équipe a étudié plus précisément le rôle du dss situé sur l'exon I dans la CSR. L'utilisation d'ASO ciblant les dss des exons I μ et I γ 1 sur l'ARN a permis d'agir à un niveau post-transcriptionnel et par conséquent de découpler les étapes intrinsèquement liées de transcription et d'épissage. A l'aide également d'un modèle murin présentant une délétion du dss de l'exon I γ 1, nous avons ainsi pu mettre en évidence que la reconnaissance du dss de l'exon I joue un double rôle lors de la CSR. Au niveau transcriptionnel, nous avons montré que l'absence de I γ 1 dss réduit l'accessibilité de la chromatine et la pause de l'ARN pol II au niveau de la région S γ . En revanche les traitements par les ASO I μ dss et I γ 1 dss n'ont pas d'impact sur la transcription et permettent d'agir au niveau post-transcriptionnel. Ainsi, le traitement par ASO I γ 1 dss diminue spécifiquement la CSR vers IgG1 alors que le ciblage de la région S μ donneuse par l'ASO I μ dss permet de réduire le CSR vers tous les isotypes. En conclusion, nos résultats indiquent que la reconnaissance du dss de l'exon I lors de la transcription stimule les événements précoces de la CSR, en permettant la pause de l'ARN pol II et l'ouverture de la chromatine dans les régions S ciblées. L'épissage étant ensuite nécessaire pour accomplir les étapes tardives de la CSR et notamment le recrutement d'AID. En effet, il a été démontré que le lasso épissé contenant la région S riche en séquences répétées peut, après débranchage par DBR1, servir de guide ARN pour AID et permettre son recrutement au niveau de cette même région S sur l'ADN (Zheng et al., 2015).



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 cytidine 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_H). 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 $I\gamma 1$ 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 $I\gamma 1$ exon dss could influence RNA pol II pausing and chromatin accessibility of the $S\gamma 1$ 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 $I\gamma 1$ 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, *vivo*-morpholino ASOs ($I\gamma 1$ dss ASO: 5'-CCCACTCCCCTGGTCACTTACCG-3'; $I\mu$ dss ASO: 5'-GGCTGCCTCTGGCTTACCATTG-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 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 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 ml of PBS with 1% formaldehyde (Sigma-Aldrich). The reaction was quenched with 0.125 M glycine (Sigma-Aldrich). After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer [0.01% SDS (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 $\gamma 1$ Region Are Altered in Mice Lacking I $\gamma 1$ 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 I $\gamma 1$ exon have been replaced by the LPS-inducible *hMT* promoter and an artificial I_{hMT} exon containing (*s-hMT*) or lacking (*hMT*) I $\gamma 1$ 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 $\gamma 1$ region was higher in LPS-stimulated B cells from *s-hMT* mice than that from *hMT* mice (20), suggesting a role for I $\gamma 1$ exon dss in GL transcription of the $\gamma 1$ 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**).

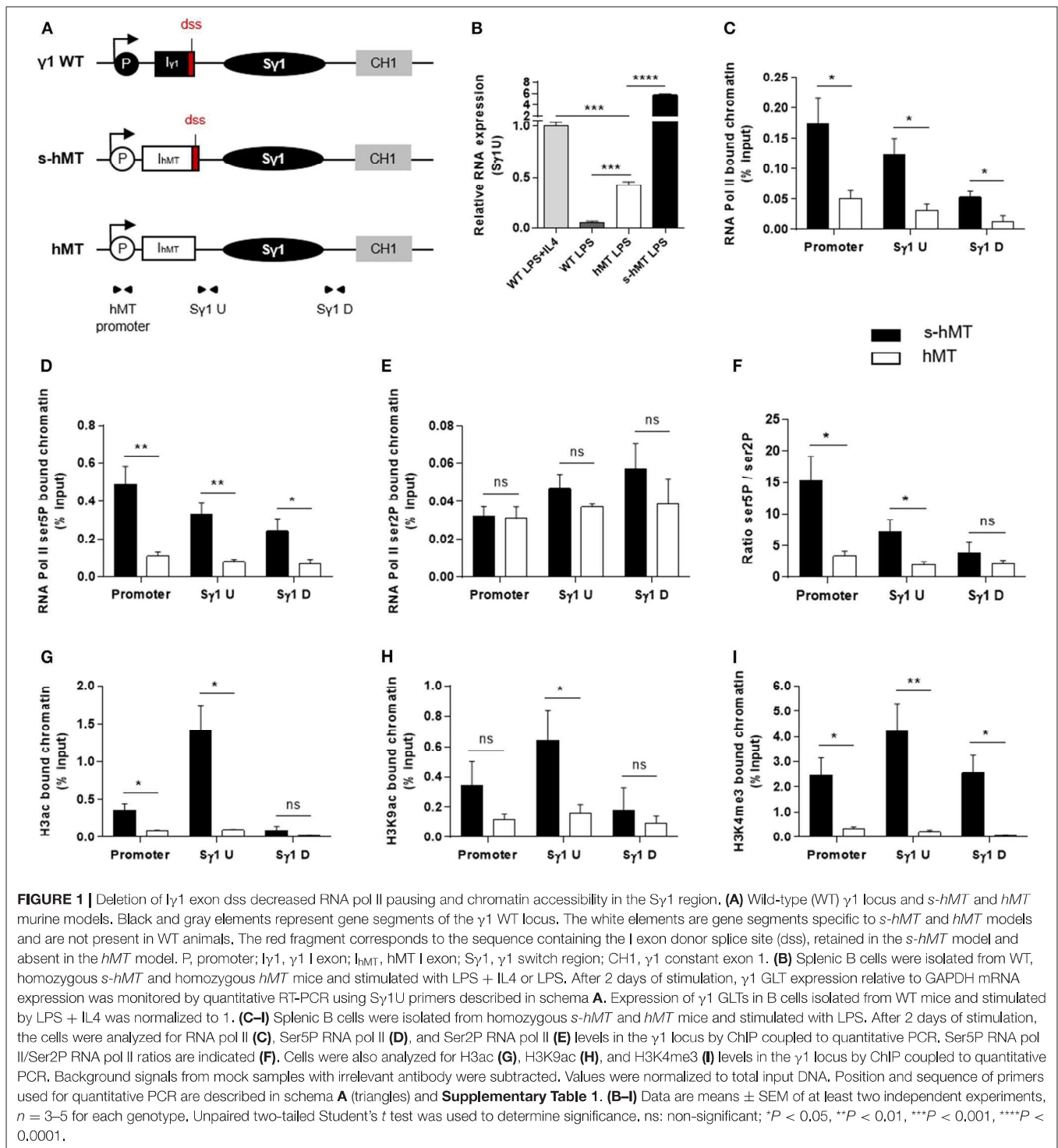
Paused RNA pol II and histone modifications associated with “open” chromatin are involved in AID recruitment to S regions during CSR (10, 12, 13, 15, 16, 18). To study the role of I exon dss in RNA pol II pausing and chromatin remodeling in the $\gamma 1$ region, we performed ChIP experiments in splenic 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 $\gamma 1$ 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- $\gamma 1$ 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 $\gamma 1$ 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 $\gamma 1$ 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- $\gamma 1$ 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 $\gamma 1$ (**Figures 1G–I**). In contrast, this increase was not anymore observed in B cells from *hMT* mice.

Collectively, our data indicate that I $\gamma 1$ exon dss recognition is of key importance for transcriptional activity of the $\gamma 1$ 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 *in vivo*-morpholino ASO targeting the dss sequence of I $\gamma 1$ exon (I $\gamma 1$ 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 I $\gamma 1$ 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 I $\gamma 1$ dss ASO (**Figure 2B**), compared to cells treated with an irrelevant control ASO. This suggested an accumulation of unspliced $\gamma 1$ GLTs due to I $\gamma 1$ dss ASO-induced splicing inhibition. In order to study the consequences of I $\gamma 1$ dss ASO on spliced $\gamma 1$ GLTs, we next performed PCR using the I $\gamma 1$ -C $\gamma 1$ primer pair (I $\gamma 1$ -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 I $\gamma 1$ dss ASO conditions (**Figure 2C**, top). A band corresponding to the constitutively spliced $\gamma 1$ GLT (involving the constitutive I $\gamma 1$ exon dss) was strongly detected in control but slightly detected upon I $\gamma 1$ dss ASO treatment (**Figure 2C**, top, and **Supplementary Figure 3**). Remarkably, in both control and I $\gamma 1$ 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 I $\gamma 1$ 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 I $\gamma 1$ dss ASO almost abolished



the major constitutive GLT and prevented alternative transcript 1 detection (**Figure 2C**, top). Thus, after treatment with I γ 1 dss, transcript isoforms using the constitutive I γ 1 dss (constitutive transcript and alternative transcript 1) represented only 16% of the detected transcripts (vs. 85% in control). Another consequence of I γ 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 γ 1 dss ASO strongly decreased γ 1 GLT constitutive splicing, the ASO strategy is a good tool to study the function of I γ 1 exon splicing on CSR.

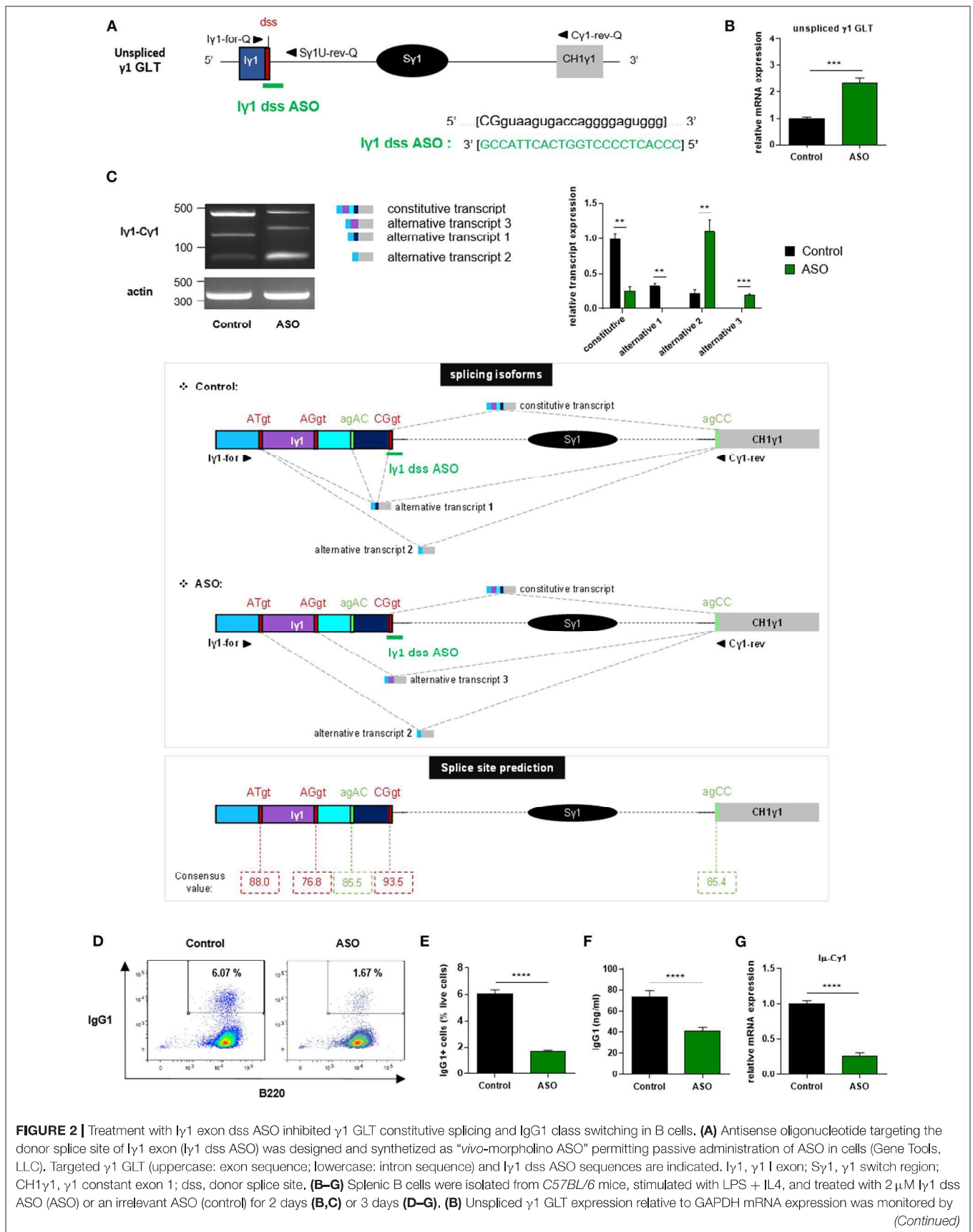


FIGURE 2 | Treatment with Iy1 exon dss ASO inhibited $\gamma 1$ GLT constitutive splicing and IgG1 class switching in B cells. **(A)** Antisense oligonucleotide targeting the donor splice site of Iy1 exon (Iy1 dss ASO) was designed and synthesized as “*vivo*-morpholino ASO” permitting passive administration 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.

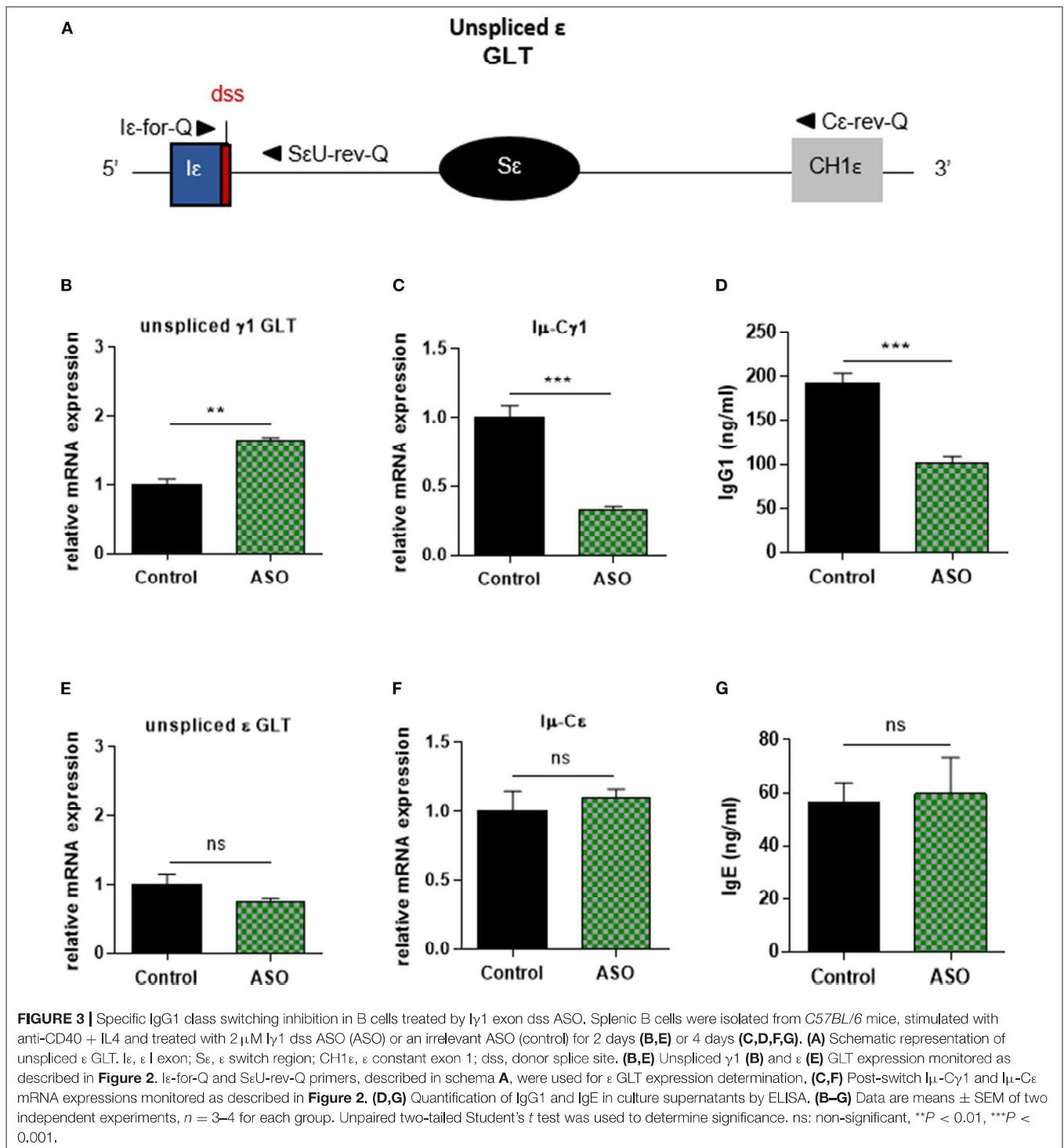
Treatment With an ASO Targeting the Constitutive I Exon dss in the Donor S μ Region Inhibits IgG Class Switching

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 I γ 1 exon dss decreased accumulation of

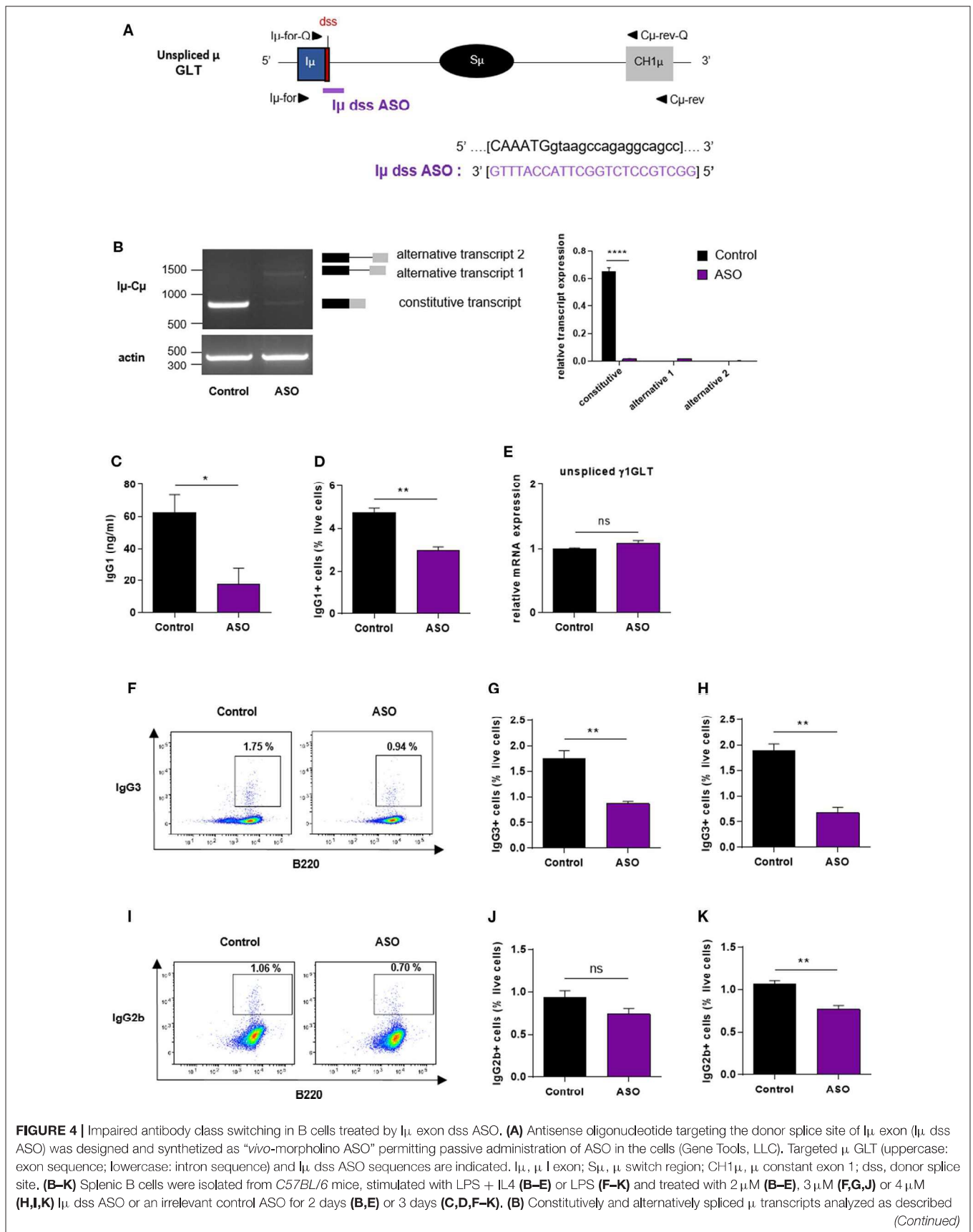


FIGURE 4 | In **Figure 2** using I μ -for and C μ -rev primers, described in schema **A**. One experiment out of three is shown. Relative quantification of amplification products was done using ImageJ software and expressed after normalization to actin band intensity. **(C)** Quantification of IgG1 in 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-S γ 1 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-S γ 1 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-S γ 1 region of stimulated B cells from *hMT* mice, compared to *s-hMT*. The H3K9ac and H3K4me3 enrichment specifically detected upstream the S γ 1 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 S γ 1 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 S γ 1 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 S γ 1 region with I γ 1 dss ASO strongly inhibited CSR to IgG1 despite I γ 1–C γ 1 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 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

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. SP 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

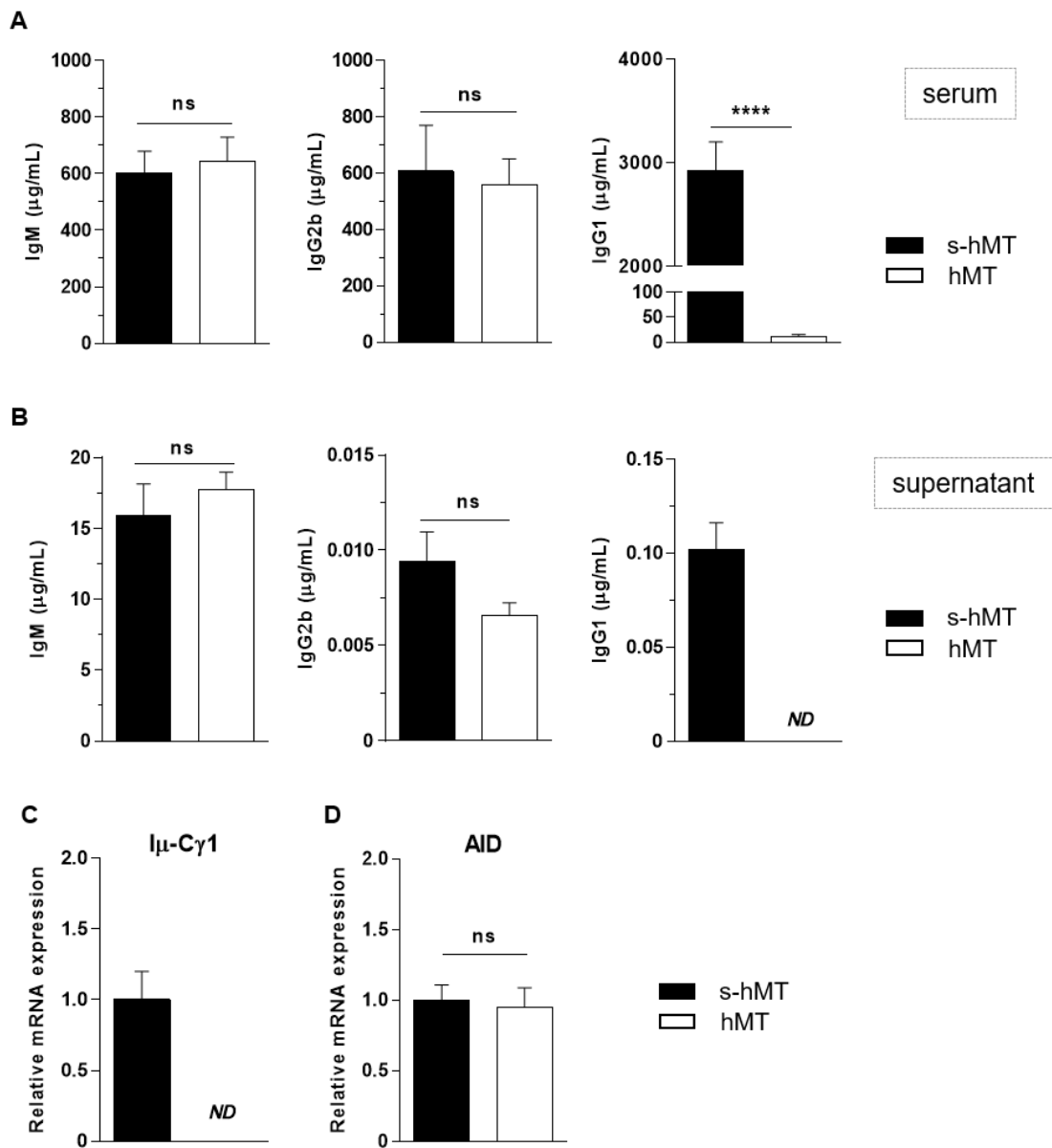
The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00780/full#supplementary-material>

- 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 CTNBL1. *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, Lalande M, Collod-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

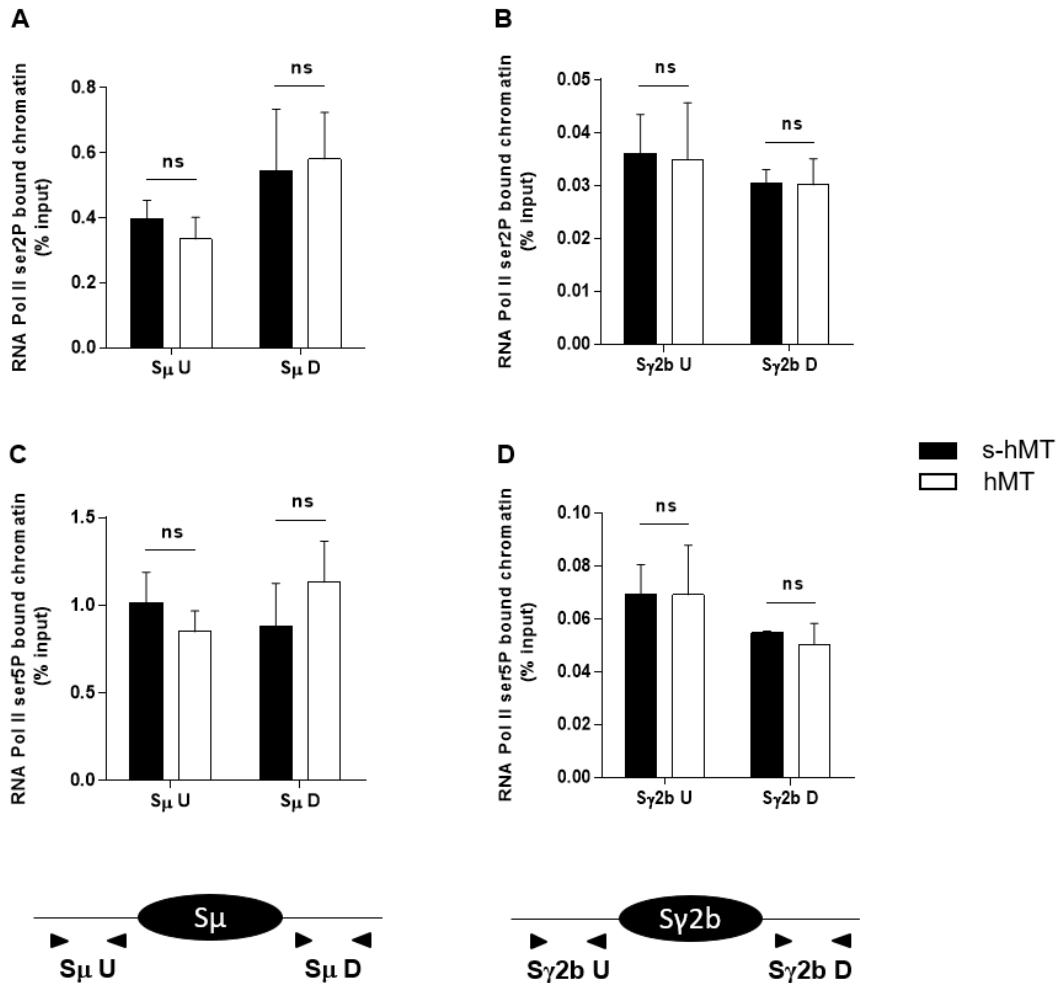
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

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 figure 1. Defect of IgG1 class switching in mice lacking $I\gamma 1$ 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 $I\mu\text{-C}\gamma 1$ (C) and AID (D) mRNA expression relative to GAPDH mRNA expression was monitored by quantitative RT-PCR. Expression of $I\mu\text{-C}\gamma 1$ 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 $I\gamma 1$ exon (bold) and CH1 $\gamma 1$ exon are indicated. Donor (red) and acceptor (green) splice sites are also represented.

Constitutive $\gamma 1$ transcript:

**GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATGTGAGTGGGGTCAGCAGGGAAAGGAGCT
GCAAGAAGAGGCCATACAAACAGCACGCATCTGTGGCCCTTCCAGATCTTTG
AGTCATCCTATCACGGGAGATTGGGAAGGAGTTGACAGACCAGCCCAGGCA
GAGGAAGCCTCTGTGTAAAGAGTAAAGGTGCTTGCCTACAGCCTGGTGTCA
ACTAGGCAGGCCCTGGGGGGCCGGGAAGGGGCCTCCTAGACAAGCACAGGC
ATGTAGAGCTGCACACCCACAGACAAACCTGAGCCCCGAGGATATCATGG
AATATATCGAGAAGCCTGAGGAATGTGTTTGGCATGGACTACAGGTTGAGAG
AACCAAGGAAGCTGAGCCCTGCGCAAACGACACCCCATCTGTCTATCCAC
TGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGT
CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCC
AGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCA
GCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGT
TGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG**

Alternative $\gamma 1$ transcript 1:

**GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATACAAACCTGAGCCCCGAGGATATCATGGA
ATATATCGAGAAGCCTGAGGAATGTGTTTGGCATGGACTACAGGTTGAGAGA
ACCAAGGAAGCTGAGCCCTGCGCAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACT
GGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC
AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCA
GCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG
CTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGTT
GCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG**

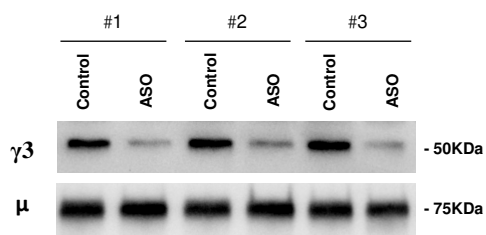
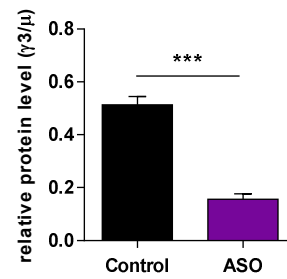
Alternative $\gamma 1$ transcript 2:

**GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATCCAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACT
GGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC
AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCA
GCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG**

CTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGTT
GCCACCCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG

Alternative γ 1 transcript 3:

**GTCAATCATATGATGGAAAGAGGGTAGCATTACCTCTCTGGGACAAAGGCT
GTGACTCTGGGAAAGACAAGAGAAGGGCAGGACCAAACAGGAACAGAGAC
GGCTGCTTTCACAGCTTCCACATGAGTGGGGTCAGCAGGGAAAGGAGCT
GCAAGAAGAGGCCATACAAACAGCACGCATCTGTGGCCCTTCCAGATCTTTG
AGTCATCCTATCACGGGAGATTGGGAAGGAGTTGACAGACCAGCCCAGGCA
GAGGAAGCCTCTGTGTTAAAGAGTAAAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTA
TCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGC
CTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCC
TGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTG
AGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCTGCA
ACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG**

A**B**

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 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 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' GGTTCGCTGGGACTTGGGA 3'	x		
hMT promoter-Probe	5' CTGCTTGCATGTGGAATTGTGAGCG 3'	x		
S γ 1-U-for	5' AGGACACAAGACCTGCAAAAAGAG 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' CAGGCAAACATAACCAGTGGG 3'	x		
S γ 1-D-rev	5' AGGATGTCCACCCTCACCCAGGC 3'	x		
S μ -U-for	5' TCTAAAATGCGCTAAACTGAGG 3'	x		
S μ -U-rev	5' AGCGTAGCATAGCTGAGCTC 3'	x		
S μ -D-for	5' CTGAATGAGTTTCACCAGGCC 3'	x		
S μ -D-rev	5' GGCCTGTCCTGCTTGGCTTC 3'	x		
S γ 2b-U-for	5' AGCTCCAAAAGCTCAGCAGAC 3'	x		
S γ 2b-U-rev	5' AGCCCCAGCTTACAAAAGAGCT 3'	x		
S γ 2b-D-for	5' GGTGGGAATATGAGGGAGAAGTCTTAG 3'	x		
S γ 2b-D-rev	5' TTCCACCTGCCTCAGCTCTCCACAGC 3'	x		
I μ -for	5'-TTGACATTCTGGTCAAAAACGGC		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'-AGATTCACAACGCCTGGGAG			x
C γ 1-rev-Q	5'-ATGGAGTTAGTTGGGCAGCA			x
C ϵ -rev-Q	5'-AATACCAGGTCACAGTCACAGG			x
S γ 1U-rev-Q	5'-AATGCTGGGATTGATCCTGGG			x
S ϵ U-rev-Q	5'-GCAAACCCTTTTGCTCAGGG			x
Gapdh-probe	Mm99999915_g1 (Life Technologies)			x
AID-probe	Mm01184115_m1 (Life Technologies)			x

Article 3.

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

Jean-Marie Lambert¹, Mohamad Omar Ashi¹, Nivine Srouf^{1,2}, Estelle Troadec¹, Faraj Terro¹, and Laurent Delpy^{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

*Correspondence: Laurent Delpy, laurent.delpy@unilim.fr

Objectifs :

Ce travail consiste à déterminer si il existe, dans les cellules sécrétrices d'anticorps, une coopération entre les mécanismes de surveillance des ARN et ceux impliqués dans le contrôle de l'homéostasie protéique intracellulaire. En effet, les plasmocytes sont de véritables usines de production de chaînes d'Ig dont la survie est liée à un contrôle très strict du stress du RE par les mécanismes de « surveillance protéique » comme l'UPR, l'autophagie, l'ERAD ou encore la voie de dégradation par le protéasome. Par ailleurs, de nombreuses études, incluant celles de l'équipe, font état d'une forte dégradation par NMD des transcrits d'Ig nonsens, limitant ainsi la synthèse d'Ig tronquées (Chemin et al., 2010; Lambert et al., 2020, 2019; Tinguely et al., 2012). Ce constat semble en désaccord avec les données obtenues dans d'autres types cellulaires montrant que l'activation de l'UPR en réponse à un stress du RE conduit à une inhibition globale du NMD (Gardner, 2008; Oren et al., 2014; Karam et al., 2015; pour revue Goetz and Wilkinson, 2017). Pour tenter de comprendre les fondements moléculaires de cette exception plasmocytaire, nous avons analysé l'activation de ces mécanismes de surveillance dans les cellules sécrétrices d'anticorps normales et tumorales à l'aide de modèles murins développés au laboratoire et de lignées de myélome.

Méthodologie :

La stimulation *in vitro* des cellules B par du LPS est un modèle classique de différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps nommées plasmablastes (PB). Durant ces étapes, les cellules vont se spécialiser dans la synthèse et la sécrétion massive d'Ig tout en s'adaptant à cette nouvelle fonction en augmentant notamment l'expression des gènes de l'UPR. Ces conditions de culture ont été utilisées pour stimuler des cellules B issues de deux modèles distincts (et de croisements entre ces modèles) : les souris « iTIE » (« inducible-Truncated-Ig Expression ») présentant un fort stress du RE dans les plasmocytes (Srour et al., 2016), et les souris « IgH^{wt/frVκ} » permettant de quantifier aisément l'efficacité du NMD sur les ARNm IgH non-sens (Tinguely et al., 2012).

Dans le modèle hétérozygote IgH^{wt/frVκ} (**Figure 1A**), l'expression de l'allèle *wild-type* permet un développement B normal alors que l'autre allèle (« IgH knock-in ») provoque l'expression de transcrits IgH contenant des PTCs. L'efficacité du NMD est mesurée par RT-qPCR en déterminant le taux d'ARNm IgH^{frVκ} avec ou sans traitement par des inhibiteurs du NMD (4 à 6h) comme le cycloheximide (CHX) ou l'Emétine (Em) (des inhibiteurs de traduction utilisés classiquement pour inhiber le NMD) ou encore la wortmannin (Wort) capable d'inhiber la phosphorylation d'UPF1 via la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) -

related kinase SMG1. L'actinomycine D, un inhibiteur de l'élongation de la transcription, a également été utilisé pour analyser de façon directe la stabilité des ARNm IgH^{frVκ}. L'efficacité de dégradation par NMD des ARNm IgH^{frVκ} a été analysée à différents jours de stimulation des cellules B spléniques par du LPS (1μg/ml). En parallèle, pour permettre d'appréhender d'une façon globale l'activation du NMD, l'expression de variants d'épissage sensibles au NMD a été analysée par RT-PCR.

Résultats:

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité du NMD des ARNm IgH^{frVκ} dans des cellules B spléniques de souris IgH^{wt/frVκ}, stimulées 3 jours avec différents stimuli. Nos résultats confirment que la différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps s'accompagne d'une augmentation d'expression des facteurs impliqués dans la réponse UPR, avec notamment l'augmentation de la protéine chaperonne BIP au cours du temps (**Figure 1B**), et en parallèle d'une dégradation par NMD très efficace (**Figure 1C**). De plus, les variants d'épissage considérés comme des substrats endogènes du NMD tels que *Sat1*, *Rpl3-alt3* ou encore *Zcch6* sont activement dégradés (**Figure 1D**), suggérant une activation globale de ce mécanisme de surveillance des ARNm dans les PB.

Nous avons ensuite étudié ces mêmes paramètres après croisements des souris IgH^{wt/frVκ} avec les souris iTIE, présentant un fort stress protéique et une activation marquée de l'UPR (**Figure S1A**), de la dégradation par le protéasome (**Figure S1B**) et de l'autophagie (**Figure S1C-D**). Après avoir contrôlé que le stress du RE était plus induit dans les cellules B issues du modèle iTIE::IgH^{wt/frVκ}, comparativement aux cellules IgH^{wt/frVκ} par RT-qPCR (**Figure 2A**) et WB (**Figure 2B**), la dégradation par NMD des ARNm IgH^{frVκ} a ensuite été étudiée. Nous avons vérifié au préalable que les taux de pré-ARNm IgH^{frVκ} étaient identiques dans les deux modèles (**Figure 2C**). De façon intéressante, cette dégradation des transcrits IgH non-sens n'est pas inhibée par le stress du RE et semble même plus marquée dans les cellules B issues du modèle iTIE::IgH^{wt/frVκ}, comparativement aux cellules IgH^{wt/frVκ} (**Figure 2D**). Ainsi, ces données soulignent que l'exacerbation du stress du RE dans les PB et l'activation de l'UPR, du protéasome et de l'autophagie ne conduisent pas à une inhibition du NMD. Ces résultats ont été confirmés en étudiant la stabilité et la demi-vie des ARNm IgH^{frVκ}, sur des fonds génétiques présentant un stress du RE variable (iTIE ou wt). En effet, nous avons observé une demi-vie des ARNm IgH^{frVκ} similaire entre les différents modèles (**Figure 2E**), après traitement des cellules B stimulées par l'Actinomycine D (t0 à t120 minutes). Cette absence d'inhibition peut sembler en contradiction avec plusieurs études montrant une corrélation inverse entre la réponse

UPR et l'activité du NMD dans des cellules non lymphoïdes (Gardner, 2008; Oren et al., 2014; Karam et al., 2015; pour revue Goetz and Wilkinson, 2017).

Dans ces cellules non lymphoïdes, l'inhibition du NMD est la conséquence d'une activation de la voie PERK et de la phosphorylation d'eIF2 α pour diminuer globalement la traduction et atténuer ainsi le stress du RE. Le mécanisme de NMD étant dépendant de la traduction, la diminution globale de la synthèse protéique par phosphorylation d'eIF2 α conduit à une inhibition de ce mécanisme de surveillance des ARNm (pour revue Goetz and Wilkinson, 2017). Pour apporter un éclairage sur ces disparités, nous avons étudié la voie PERK de l'UPR en analysant le taux de phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (p-eIF2 α) dans les cellules B spléniques de souris iTIE/iTIE Cre^{pos}, stimulées 3 jours avec du LPS par Western Blot (**Figure 3A**). Nos résultats montrent que le taux d'eIF2 α phosphorylée est équivalent dans les souris iTIE/iTIE Cre^{pos} comparativement aux souris iTIE/iTIE Cre^{neg} (**Figure 3B**). Ces résultats mettent donc en évidence que le stress protéique n'active pas la voie PERK de l'UPR dans les cellules sécrétrices d'anticorps, permettant ainsi de maintenir une production massive d'Ig. En accord avec cette dernière hypothèse, des taux d'Ig identiques sont retrouvés dans les surnageants de culture (**Figure 3C**) et les cellules B stimulées des souris iTIE/iTIE Cre^{pos} et Cre^{neg} (**Figure 3D**). Ainsi, les mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie protéique (UPR, autophagie ...) et la surveillance des ARNm (NMD) coopèrent dans les cellules plasmocytaires, pour limiter le stress du RE et maintenir une activité de synthèse d'anticorps considérable (**Figure 3E**).

Une étude complémentaire a été effectuée sur une lignée de myélome (SK-MM-2) pour analyser cette coopération dans un contexte tumoral. L'efficacité du NMD a été étudiée en quantifiant les ARNm TBL2 précédemment décrits comme substrats endogènes par Viegas et coll (Viegas et al., 2007) après différents traitements par inhibiteurs du NMD ou inducteurs de stress du RE. Nous avons vérifié que les taux de pré-ARNm TBL2 ne varient pas lors des différents traitements (**Figure 4A**). De façon intéressante, un traitement Bz induit un stress du RE important avec une augmentation de *Bip* sans inhiber le NMD (**Figure 4B-C**). En revanche, les traitements MG132 et Tunicamycine qui induisent un fort stress du RE tout en activant la voie PERK, avec une augmentation notable de *Chop* (**Figure 4E**), semblent provoquer une inhibition du NMD. Ces résultats suggèrent que dans les plasmocytes le stress du RE ne conduit pas à une inhibition du NMD, car la voie PERK/Chop est peu active. Ils indiquent également qu'une activation pharmacologique de cette voie semble inhiber la dégradation par NMD dans les plasmocytes.

Conclusion :

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

Figure 1. Increase of both NMD and UPR during plasma cell differentiation.

(A) Schematic representation of wild-type (IgH^{wt}) and recombined (IgH^{frVκ}) IgH alleles in heterozygous IgH^{wt/frVκ} mice. In this model, B cells develop normally through the expression of the IgH^{wt} allele. After VDJ recombination, premature termination codons (PTC) appear on IgH^{frVκ} mRNAs and these nonsense transcripts can be degraded by NMD. (B) Western Blot showing BIP and GAPDH expression in LPS-stimulated (D2 and D3) and resting B-cells (D0) from IgH^{wt/frVκ} mice. (C, left) The degradation of nonproductive IgH^{frVκ} mRNAs (referred as NMD efficiency) was assessed by RT-qPCR every day using primers “frVκ-for” and “CH1μ-rev” after treatment with Cycloheximide (CHX 100μg/ml, grey bars) during the last 4 hours (n=2) and (C, right) in resting (D0) and LPS stimulated B-cells (D3, empty bars) (D3; LPS) after treatment with Wortmannin (Wort 20μg/ml) during the last 4 hours (n=4). NMD efficiency represents the fold change of IgH^{frVκ} mRNA amounts after treatment with NMD inhibitors and normalization to *gapdh* expression. (E) The degradation of nonsense *Sat1*, *Rpl3-Alt3* and *Zcch6* mRNAs was assessed by RT-PCR using appropriate primers on stimulated B cells (D3; LPS) after treatment with Cycloheximide (CHX 100μg/ml). Representative experiment is shown. Bars represent mean expression ± SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. *, P<0.05; **, P<0.01; ****, P<0.0001.

Figure 2. Exacerbation of ER stress does not inhibit the degradation by NMD in stimulated B cells.

(A) Splenic B cells from IgH^{wt/frVκ} (empty bars) and iTIE::IgH^{wt/frVκ} (grey bars) were stimulated with LPS (1μg/ml, 3 days) and relative mRNA levels of ER stress markers (*BiP*, *Herp*, *Xbp1s*) were assessed by qPCR after normalization to *Gapdh* transcripts. Values obtained for IgH^{wt/frVκ} mice were set to 1. (B) The protein levels of BiP, and IRE1α were analyzed by Western blot after normalization to GAPDH. (C) Quantification of IgH^{frVκ} pre-mRNA levels in LPS-stimulated B cells treated with Wortmannin (Wort 20μg/ml for 4h) or DMSO as control. (D) The degradation of nonproductive IgH^{frVκ} mRNAs was assessed by RT-qPCR. The NMD efficiency represents the fold increase of IgH^{frVκ} mRNA levels after drug treatment, after normalization to *Gapdh* transcripts. (E) The stability of IgH^{frVκ} mRNAs was evaluated by RT-qPCR after treatment with Actinomycin D (red) or DMSO (black). The relative IgH^{frVκ} mRNAs levels were represented after normalization to untreated cells (t0) for all samples. Data are representative of at least three independent experiments (n= 6-3/group). Bars represent mean expression ±SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. *, P<0.05; ***, P<0.001; ****, P<0.0001.

Figure 3. Poor activation of the PERK pathway and significant Ig production during prolonged ER stress.

Splenic B cells from iTIE/iTIE-Cre^{neg} and iTIE/iTIE-Cre^{pos} were stimulated with LPS (1µg/ml, 3 days). (A) p-EIF2α and total EIF2α protein levels were analyzed by Western blot. A representative experiment using two pools of 2 mice per genotype is shown. (B) Quantification of p-EIF2α protein levels in Cre^{neg} (empty bars; n=4) and Cre^{pos} (grey bars; n=4) cells after normalization to total EIF2α amounts. (C) ELISA analysis of IgM and IgG3 secretion in 72h culture supernatants (n = 8/group). (D) Igµ protein levels were analyzed by Western blot. (E) Model showing the cooperation of RNA and protein surveillance mechanisms (*i.e.* NMD, autophagy and UPR) to regulate protein homeostasis during plasma cell differentiation. The inhibition of the PERK pathway maintains massive Ig secretion while limiting the apoptosis induced by prolonged ER stress. Data are representative of at least three independent experiments (n= 3-8/group). Bars represent mean expression ±SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed. ns : not significant

Figure 4. Pharmacological induction of the PERK-associated Chop expression inhibits NMD in myeloma cells.

(A) Quantification of TBL2 pre-mRNA levels, by RT-qPCR using specific primers performed on SK-MM-2 cells treated with Wortmannin (Wort 20µg/ml for 4h), Bortezomib (BZ 0.01µM for 8h), MG132 (10nM for 8h) or Tunicamycin (TM 1µg/ml for 8h). (B) NMD efficiency represents the fold change of TBL2 mRNAs, as NMD substrates, after drug treatments. (C-D) Relative mRNA levels of ER stress markers were assessed by qPCR after normalization to *Gapdh* transcripts. (A-D) Quantification was carried out by the ratio between treated against untreated conditions.

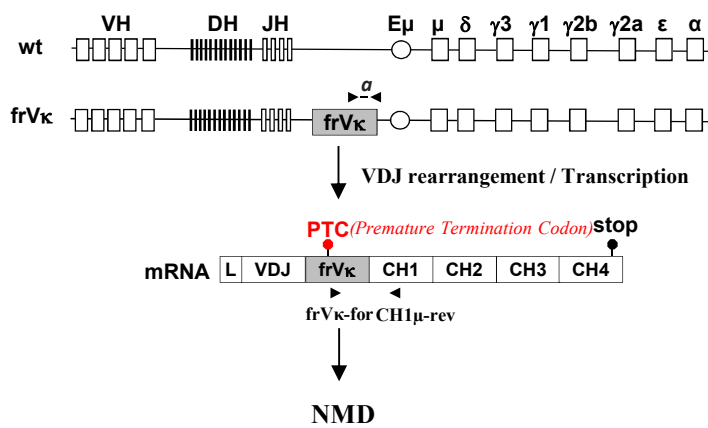
Figure S1. Exacerbated ER stress upon expression of truncated V-domain-less κ light chains

(A) Relative mRNA levels of ER stress markers were assessed on purified splenic B cells from iTIE/iTIE Cre^{pos} and iTIE/iTIE Cre^{neg} (n=5), 3 days after LPS stimulation (1µg/ml). qPCR were normalized to *Gapdh* expression and values obtained for iTIE/iTIE Cre^{neg} were set to 1. (B) The quantification of truncated ΔV-κLCs was performed by Western Blot (WB), in LPS-stimulated B cells (day 2) isolated from spleens Cre^{neg} and Cre^{pos} iTIE/iTIE mice (n=5). Cells were treated or not with Bortezomib (Bz 5nM) during the last 8 hours. A representative experiment using two pools of 2 mice per genotype is shown. (C) The quantification of LC3

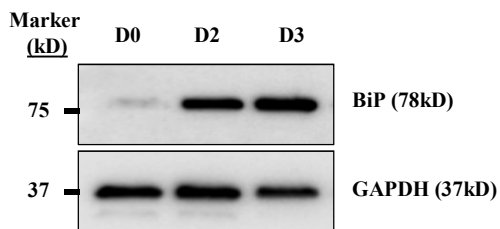
protein levels was performed in LPS-stimulated B cells (day 2) from Cre^{neg} (empty bars; n= 3) and Cre^{pos} (gray bars; n=3) iTIE/iTIE mice, after treatment with Chloroquine (CQ 30 μ M) during the last 8 hours. A representative experiment is shown. (D) The quantification of ATG5/ATG12 protein levels was performed in LPS-stimulated (day 3) B cells from Cre^{neg} (empty bars; n= 4) and Cre^{pos} (gray bars; n=4) iTIE/iTIE mice. ATG5^{fl/fl} CD19Cre^{pos} served as a negative control (ND: not detected). A representative experiment using two mice per genotype is shown. Data are representative of at least three independent experiments (n=3–5). Bars represent mean expression \pm SEM. Unpaired two-tailed Student's *t* test was performed to determine significance. ns : not significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

A

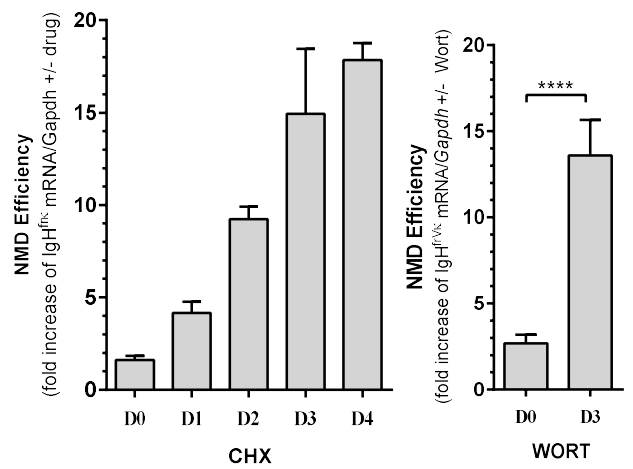
Heterozygous mouse IgH^{wt/frVκ}



B



C



D

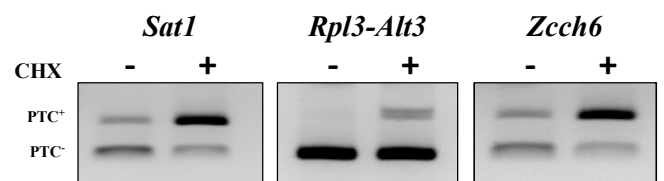
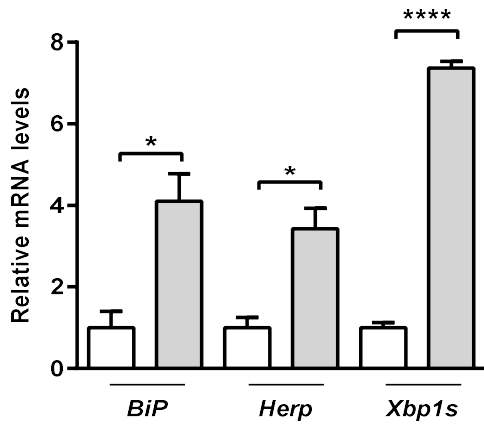
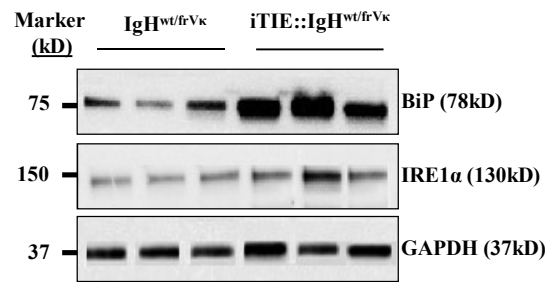


Figure 1

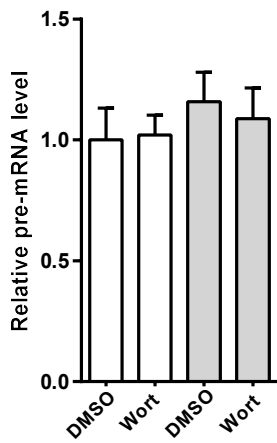
A



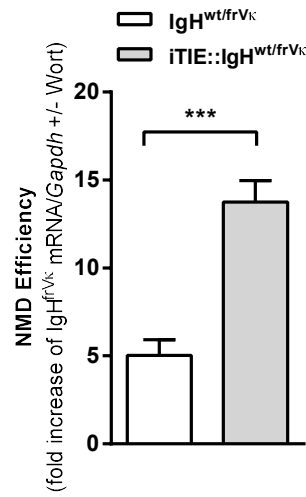
B



C



D



E

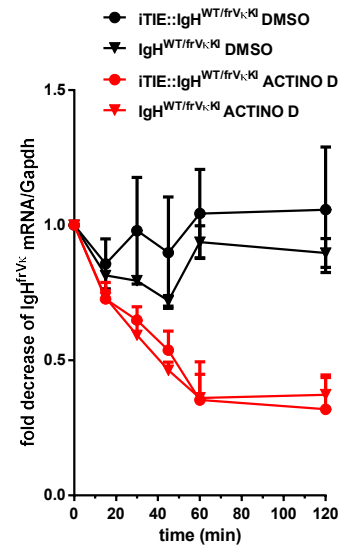


Figure 2

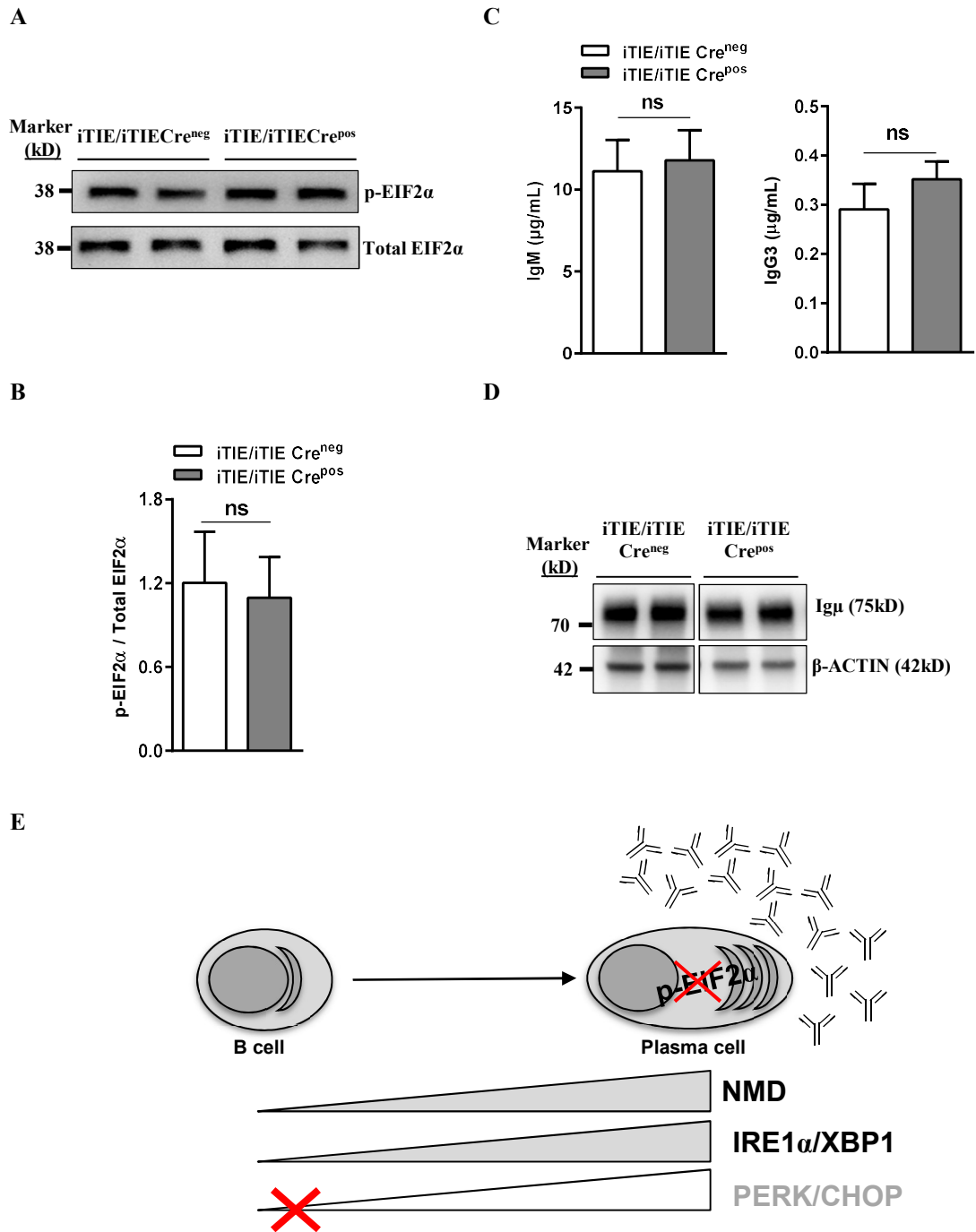


Figure 3

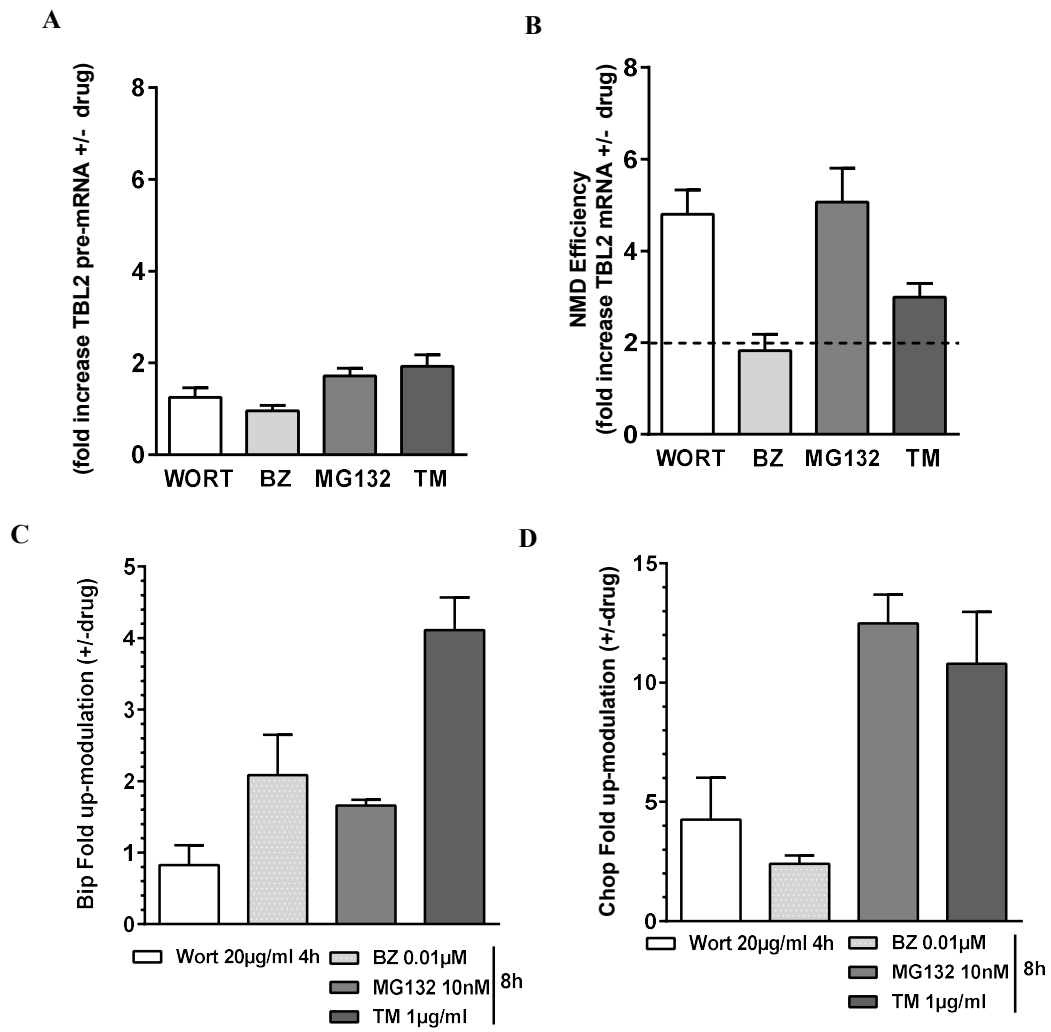


Figure 4

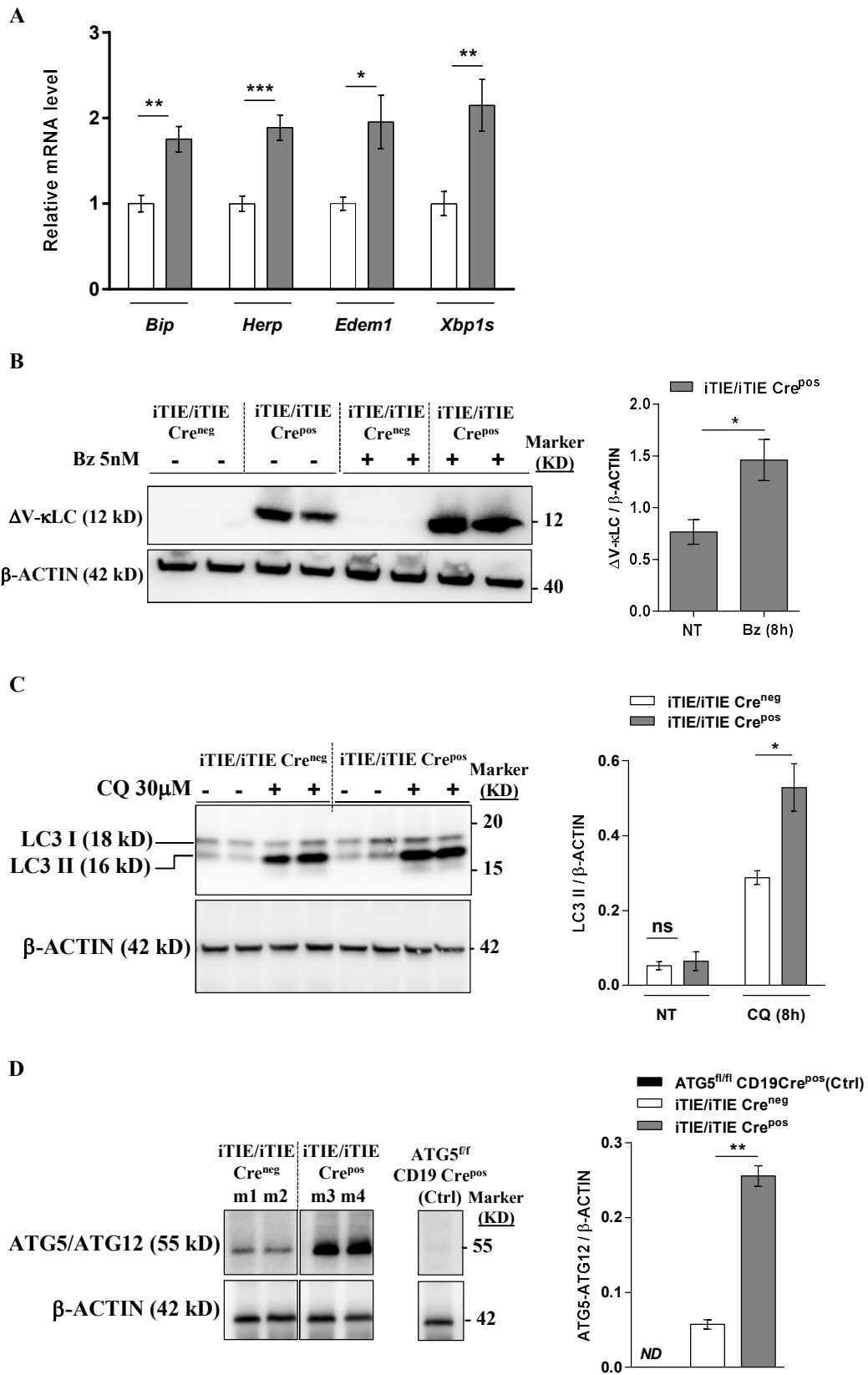


Figure S1

Discussion & perspectives

. Positionnement et historique du projet

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de l'équipe consacrés à l'étude des mécanismes contrôlant l'expression des Ig au cours de la différenciation plasmocytaire. Les processus de recombinaisons V(D)J, d'hypermutations somatiques (SHM) et de commutation isotypique (CSR) sont à l'origine de la diversification du répertoire des Ig, et chaque clone plasmocytaire sécrète une Ig unique (ou Ig monoclonale : Ig-mo), présentant une séquence singulière au niveau des domaines variables (V) qui détermine la spécificité antigénique. La survie des plasmocytes (PC) dépend de leur capacité à surmonter le stress du réticulum endoplasmique (RE) associé à la synthèse massive de l'Ig-mo. En plus de cette Ig fonctionnelle codée par un allèle dit « productif », on trouve souvent la présence de transcrits contenant des codons stop prématurés (PTC) issus d'allèles « non-productifs » ; Ces derniers étant soumis à une forte régulation post-transcriptionnelle par les mécanismes de « nonsense surveillance » tels que le NMD et le NAS (Lambert et al., 2019, 2020). En assurant la dégradation des ARNm contenant des PTC, le NMD limite la synthèse d'Ig tronquées et la surcharge du protéasome impliqué dans l'élimination des protéines aberrantes. A l'inverse, l'activation du NAS pour éliminer le PTC conduit à un épissage alternatif majoritairement par saut d'exon et peut provoquer la synthèse d'Ig tronquées. Au cours de précédents travaux, l'équipe a mis en évidence que l'hypertranscription des allèles d'Ig (productifs et nonproductifs) au cours de la différenciation plasmocytaire favorise le NAS des transcrits d'Ig contenant des PTC et peut provoquer la synthèse d'Ig tronquées (Ashi et al., 2019; Chemin et al., 2010; Srour et al., 2016). Srour et al ont également démontré qu'un saut d'exon lors de l'épissage des transcrits Ig κ non-productifs entraînait une forte production d'Ig sans domaine V et une apoptose des PC associée à une exacerbation du stress du RE (Srour et al., 2016). Cette étude a ainsi révélé l'existence d'un nouveau point de contrôle nommé TIE-checkpoint (pour « Truncated-Ig Exclusion ») permettant d'éliminer les cellules qui expriment des Ig tronquées au cours de la différenciation plasmocytaire. En éliminant les nombreux clones hébergeant des allèles d'Ig non-productifs avec des PTC au sein de l'exon V, ce TIE-checkpoint constitue un processus inédit qui façonne la population plasmocytaire de façon indépendante de la spécificité antigénique. En lien avec ces précédentes observations, les résultats obtenus durant ma thèse ont permis de démontrer l'efficacité d'approches utilisant des oligonucléotides antisens (ASO) pour moduler à façon l'épissage des transcrits d'Ig à des fins thérapeutiques, et de mettre en évidence une coopération entre les mécanismes impliqués dans la surveillance ARN (NMD) et protéique (UPR, autophagie ...) dans les cellules sécrétrices d'anticorps.

. Analyse exploratoire d'approches antisens ciblant les transcrits d'Ig

Traitement par ASO ciblant l'exon V de l'Ig monoclonale et impact sur la survie des cellules de myélome : intérêts, limites et perspectives de recherche

Mes premiers travaux ont eu pour base un brevet déposé par l'équipe visant à éliminer sélectivement les PC tumoraux en mimant l'activation du TIE-checkpoint à l'aide d'ASO (WO/2017/089359). Les ASO utilisés ciblent les transcrits de l'Ig-mo au niveau des sites d'épissages de l'exon V pour produire des Ig sans domaine V dans les cellules tumorales afin de les éliminer par apoptose. Cette stratégie pourrait s'inscrire comme une nouvelle thérapie personnalisée dans le traitement des gammopathies monoclonales comme le myélome multiple (MM) ou l'amylose à dépôts de chaînes légères d'Ig (amylose AL).

Lors d'un diagnostic chez le patient, la classe de l'Ig-mo produite en excès est d'abord caractérisée au niveau protéique par électrophorèse et immunofixation sur sérum (IgG, IgA, Igκ ou Igλ), puis une ponction médullaire permet d'évaluer l'infiltration plasmocytaire mais aussi de déterminer la séquence nucléotidique précise de l'Ig-mo exprimée par le clone tumoral. En routine, cette analyse de clonalité repose soit sur un séquençage du CDR3 soit sur une analyse complète de l'exon V, incluant la nature du réarrangement V(D)J et la fréquence de SHM. Pour permettre l'élaboration d'un l'ASO s'hybridant sur un site donneur (dss) ou accepteur (ass) d'épissage, il est en revanche nécessaire de caractériser finement leur séquence au niveau des exons et des introns. Une amélioration des techniques de diagnostic actuellement utilisées présentées ci-dessous, devra être envisagée pour déterminer en routine ces séquences introniques jusqu'ici non prises en compte. Pour identifier les réarrangements V(D)J, le protocole « EuroClonality/BIOMED-2 » consiste en des tests de PCR multiplex standardisés permettant la détection de gènes d'Ig et de récepteurs de cellules T (TCR) sur ADNg. Le taux de détection des réarrangements clonaux à l'aide des jeux d'amorces EuroClonality/BIOMED-2 est élevé et ces tests sont largement utilisés dans la plupart des syndromes lymphoprolifératifs (Sandberg et al., 2005). Récemment, l'équipe « the EuroClonality-NGS Working Group » dirigée par Patricia J. T. A. Groenen a amélioré ce protocole de diagnostic en le couplant au séquençage haut-débit NGS (Scheijen et al., 2019). Au-delà du diagnostic, cette approche permet de suivre au cours du temps l'évolution du clone entre un diagnostic et une rechute par exemple. Une autre technique de diagnostic et de suivi repose sur l'analyse des ARNm isolés après ponction médullaire par RACE-PCR (pour « Rapid amplification of cDNA ends ») ciblée et séquençage haut-débit des réarrangements V(D)J. La quantité considérable d'ARNm d'Ig

dans les PC facilite grandement cette analyse. Cette technique souvent nommée Ig-Rep-Seq (pour « Ig-Repertoire-Sequencing ») a été utilisée pour la première fois en 1997 pour identifier les réarrangements V(D)J de cellules primaires ou de lignées de lymphomes (Doenecke et al., 1997). Aujourd'hui, de nombreuses plateformes comme « IMGT/HighV-QUEST » (<http://www.imgt.org/HighV-QUEST>) ou « Vidjil » (<https://app.vidjil.org>) permettent de traiter et de visualiser les séquences obtenues afin de déterminer facilement la clonalité d'un échantillon (Aouinti et al., 2015; Duez et al., 2016). Cette technique s'est par ailleurs grandement améliorée avec l'introduction des UMI (pour « Unique Molecular Identifiers ») contenant des nucléotides aléatoires insérés dans l'amorce de RT-PCR, afin d'identifier de manière unique chaque molécule d'ARNm. Dans un domaine comme l'analyse du répertoire immunitaire, où les séquences étudiées ne peuvent différer que d'une seule base, faire la distinction entre les erreurs techniques et les différences biologiques s'avère primordial (Rosati et al., 2017). Cette technique d'Ig-Rep-Seq disponible au laboratoire est désormais utilisée pour le diagnostic (Bender et al., 2019). Afin d'identifier les séquences nucléotidiques précises des sites d'épissage sur chaque patient, nous envisageons d'améliorer les protocoles cités précédemment. Pour BIOMED-2, de nouvelles amorces sens situées dans le Leader Part-1 et antisens situées dans l'intron en aval des segments J, utilisées seules ou couplées avec des amorces existantes, pourraient permettre d'identifier rapidement la séquence des sites ass (intron-5' exon V) ou dss (3' exon V-intron) sur ADNg. Les amorces introniques J antisens pourraient également être utilisées lors de la deuxième PCR après l'étape de RACE pour amplifier spécifiquement les pré-ARNm et avoir accès aux séquences introniques. Ces avancées techniques dans le domaine du diagnostic et l'identification complète de la séquence des sites d'épissage de l'exon V devraient permettre la conception rapide d'un ASO personnalisé pour chaque patient.

Nos travaux présentés dans l'Article 1 mettent en évidence la faisabilité d'une telle stratégie dans le traitement du MM. Dans un premier temps, nous avons testé la stratégie sur la lignée RPMI 8226 sécrétant une Ig λ seule présentant un réarrangement IGV λ 2-14-J λ 2. Après séquençage, un ASO a été élaboré pour cibler le site dss au niveau du segment J λ 2. L'ASO a permis de moduler l'épissage des transcrits d'Ig, néanmoins la présence d'un site donneur d'épissage cryptique au niveau du CDR1 n'a permis qu'un saut d'exon partiel. Les RT-PCR réalisées dans les conditions non traitées et contrôle ASO révèlent également que cet épissage alternatif se produit spontanément à un taux basal. De façon intéressante, ce site d'épissage cryptique est absent de la séquence germinale V λ 2-14 et son apparition est due à des événements de SHM au sein du CDR1. L'analyse des sites d'épissage réalisée grâce au logiciel

« Human Splicing Finder - Version 3.1 » révèle aussi l'existence d'autres dss cryptiques dont certains présentent un score prédictif plus fort que celui utilisé au sein du CDR1. Ce type de transcrits alternatifs n'est cependant pas détecté, car l'utilisation de ces dss cryptiques provoque un décalage du cadre de lecture et l'apparition de PTC, entraînant vraisemblablement leur dégradation par NMD.

Après traitement de la lignée XG6 par l'ASO-J λ 2-3'ss, nous avons observé un épissage alternatif similaire utilisant un dss cryptique proche du CDR2, qui une fois encore n'est pas présent sur la séquence germinale et qui semble être provoqué par SHM. Contrairement aux observations faites sur la lignée RPMI 8226, suggérant que la production d'Ig λ tronquées de leur partie FR2 à FR4 est très toxique, la production d'Ig λ tronquées de leur partie FR3 à FR4 n'a pas révélé de toxicité. Cet effet très différent sur la viabilité cellulaire reste à élucider et pourrait dépendre de longueur de la région V éliminée par épissage alternatif. L'équipe a auparavant démontré qu'une production d'Ig totalement dépourvue de son domaine V conduit à une apoptose massive des PC, et nos résultats indiquent qu'une délétion majeure (incluant le CDR1 et la partie FR2 à FR4) provoque un effet similaire. Par conséquent, il serait judicieux d'étudier comparativement la prise en charge des Ig λ tronquées des lignées RPMI 8226 et XG6 produites après traitement ASO par les protéines chaperonnes (BIP...), mais aussi de leur capacité à perturber l'homéostasie du RE. Néanmoins, la présence de nombreux dss cryptiques et la toxicité variable des Ig tronquées codées par ces différents transcrits alternatifs mettent en évidence les limites de cette approche et soulignent l'intérêt d'un ciblage du site ass plus conservé (voir ci-après). Cette dernière approche limitant l'apparition de sites ass cryptiques et permettant un saut complet de l'exon V est désormais privilégiée sur les cellules de myélome et de façon générale sur les cellules B post-GC, ayant subi le SHM. Ces travaux nous ont permis aussi d'émettre l'hypothèse d'une action plus large du TIE-checkpoint qui pourrait permettre une sélection négative des PC hébergeant des SHM induisant l'apparition de dss cryptiques et la production d'Ig aberrantes potentiellement toxiques. Ces mutations pourraient conduire à l'élimination des PC normaux mais être sans effet dans les PC tumoraux dont les événements oncogéniques conduisent fréquemment à une inhibition de l'apoptose. Nous avons récemment entrepris cette étude en commençant par identifier les dss cryptiques dans les séquences V germinales. Ces séquences ont été récupérées sur la base de données IMGT (Leader Part1/Leader part2 + V exon) puis l'analyse a été réalisée en quantifiant le score des sites d'épissage (de 0 à 1) grâce aux logiciels « Human Splicing Finder - Version 3.1 » et « Predoss ». Enfin, seuls les sites avec un score >0,2 et dont l'utilisation respecte le cadre de

lecture en phase ont été sélectionnés. Les résultats montrent que l'on dénombre environ 190 dss cryptiques pour les IgH, Igκ et Igλ confondues. De plus, les familles IgVH3-30 et IgVH5-51 préférentiellement représentées dans les cellules de myélome possèdent des dss cryptiques sur leur séquence germinale avec des scores très élevés (respectivement 0.767, 0.870) (González et al., 2007). Il serait donc intéressant d'analyser le SHM autour de ces dss cryptiques et l'épissage de ces transcrits IGH pour savoir si les cellules de myélome utilisent ces sites ou présentent des SHM pour les atténuer.

Nous disposons de données haut-débit issues de multiples analyses du répertoire des Ig aux stades tardifs du développement B et dans un contexte tumoral. Il sera donc intéressant d'effectuer une étude comparative afin de déterminer le score de l'ensemble des dss cryptiques entraînant potentiellement un épissage alternatif et la production d'Ig tronquées. Les résultats obtenus pourraient ainsi nous éclairer sur l'apparition et/ou l'élimination de dss cryptiques par SHM, et la contre-sélection ou non des PC normaux ou tumoraux exprimant des Ig tronquées à partir de dss cryptiques, par activation du TIE-checkpoint. A titre d'exemple, l'équipe de Christophe Sirac au sein du laboratoire a récemment rapporté le cas d'un patient atteint de HCDD (« Heavy Chain Deposition Disease ») et exprimant une Igλ tronquée suite à l'utilisation d'un dss cryptique au sein du CDR1 (Bender et al., 2018). Cette observation apporte des renseignements sur l'histoire naturelle de cette pathologie et suggère que l'altération de l'Igλ qui, par sa perte partielle de sa partie V n'avait plus la possibilité de s'assembler à la chaîne lourde γ1, serait à l'origine de la délétion de l'exon CH1 sur cette dernière provoquant ainsi son dépôt et l'atteinte rénale. En effet, l'IgG1 non assemblée ne peut être sécrétée efficacement et induit un fort stress du RE alors que la suppression de son exon CH1 de l'IgG1 réduit ce stress et permet la sécrétion de cette chaîne lourde. Selon cette hypothèse, la production des chaînes Igλ tronquées a indirectement favorisé l'émergence de la pathologie HCDD chez ce patient. Les processus génétiques par lesquels la cellule a supprimé l'exon CH1 sur l'ADNg sont en revanche largement incompris. Ainsi, les conséquences de l'utilisation d'un dss cryptique peuvent être néfastes et ce phénomène pourrait être contre-sélectionné au cours du développement B normal.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur le ciblage du site ass, dont la séquence consensus prend en compte le site lui-même mais aussi le tractus polypyrimidine en amont, limitant considérablement l'apparition de sites ass cryptiques. Cette approche a été validée sur la lignée SK-MM-2 exprimant une Igκ avec un réarrangement IGVκ3-15-Jκ4. Le saut complet de l'exon V a permis la production d'une Igκ tronquée hautement toxique pour la cellule. Afin de nous

rapprocher des conditions *in vivo* nous avons mis au point un protocole de xéno greffe (sous-cutanée) en matrigel dans des souris immunodéficientes Rag2^{-/-}γC^{-/-} combiné à traitement ASO par injections intra-tumorales. La régression tumorale observée sur la cohorte ayant reçu des injections d'ASO-Vκ3-3'ss est prometteuse. Néanmoins, d'autres voies d'administration permettant une administration systémique d'ASO doivent être testées après xéno greffes intraveineuses ou orthotopiques de cellules de myélome reproduisant l'infiltration médullaire caractéristique du MM. Nous avons également amorcé une collaboration avec le Dr Elke De Bruyne pour évaluer l'efficacité d'un traitement systémique par ASO sur le modèle 5TM reproduisant assez fidèlement la pathologie du MM chez la souris (Vanderkerken et al., 1997). Actuellement, nous avons séquencé et caractérisé les réarrangements VDJ des lignées 5T2MM et 5T33MM pour permettre le design des différents ASO. L'intérêt de ce modèle reposant sur l'injection de PC tumoraux allogéniques (5T2MM, 5T33MM) dans des souris immunocompétentes (C57BL/KalwRij) et qu'il permet d'évaluer en parallèle l'impact des ASO sur le système immunitaire.

Un aspect de la technologie antisens à prendre en compte dans l'évaluation de la faisabilité de la stratégie est le ciblage des niches médullaires par l'ASO. En effet, nous avons utilisé pour nos expériences, des ASO développés par l'entreprise Genetools[®] de type PMO couplé de façon covalente à un dendrimère d'octa-guanidine. Ces ASO appelés vivo-morpholinos sont capables de pénétrer efficacement dans la membrane plasmique et permettent une diffusion passive aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Mais le ciblage de la moelle osseuse et la toxicité intrinsèque des chimies de l'ASO sont des obstacles majeurs à surmonter pour une thérapie chez le patient. Cependant, comme décrit précédemment dans l'introduction de ce manuscrit, de nombreux progrès et avancées scientifiques dans le cadre de développement de nouveaux médicaments tendront à résoudre ces problèmes à l'avenir. Par exemple, pour cibler les niches de plasmocytes dans la moelle osseuse, des ASO couplés à des anticorps (pour « Antibody-Drug-Conjugates » : ADC-ASO) peuvent être utilisés, tandis que de nouvelles chimies, comme le tricyclo-ADN ou PPMO (peptide conjugué-phosphorodiamidate morpholino oligonucléotides), continuent d'élargir les possibilités d'applications. Récemment, l'équipe de Jonathan Hall a travaillé sur une maladie génétique rare : la Protoporphyrine érythropoïétique (ou « Erythropoietic protoporphyria EPP ») (Halloy et al., 2020). Elle est due à la perte de fonction de la ferrochélatase (FECH), enzyme jouant un rôle dans la voie de biosynthèse de l'hème. Avec plus de 80% de l'hème produit dans les progéniteurs des globules rouges, la moelle osseuse est le site majeur de cette biosynthèse. La plupart des patients présentent une mutation qui favorise l'épissage aberrant de l'ARNm de *Fech* avec la présence d'un site cryptique dans l'intron entre

les exons 3 et 4. Les auteurs, après avoir développé un modèle de souris ont essayé de corriger cet épissage aberrant à l'aide d'ASO. Se confrontant aux mêmes problématiques que nous quant au ciblage de la moelle osseuse, ils ont élaboré des ASO pour un ciblage efficace dans la souris. Des ASO MOE-PS ont été conjugués à plusieurs éléments connus pour favoriser le ciblage dans la moelle osseuse : l'acide stéarique (acide-gras) qui augmente la stabilité *in vivo* dans la circulation sanguine en raison de sa liaison à l'albumine sérique (Wolfrum et al., 2007), un résidu heptapeptide qui favorise le ciblage dans la moelle osseuse et qui se lie préférentiellement aux cellules souches (Nowakowski et al., 2004) et le thiocholestérol qui délivre des oligonucléotides à la moelle osseuse (Osborn and Khvorova, 2018; Schlegel et al., 2012). Leurs résultats montrent qu'un ciblage dans la moelle osseuse est possible. Comparativement aux autres conjugués, l'ASO couplé au résidu heptapeptide (STFTKSP) a été retrouvé en concentration 6 fois supérieure (224 ± 87 contre 35 ± 12 ng/mg de tissu) au niveau de la moelle osseuse. Ces avancées conduiront à faire évoluer la biodistribution des ASO pour résoudre les obstacles de ciblage spécifique avec peut être l'élaboration de peptide spécifique des plasmocytes de la moelle osseuse.

Une autre approche consiste à étudier l'efficacité de cette stratégie antisens sur des cellules primaires de patients MM prélevées au diagnostic et après rechute(s). Pour cela, nous disposons d'un accès facilité à de nombreuses ponctions médullaires à travers plusieurs collaborations (CHU de Limoges, services et laboratoires d'hématologie et d'immunologie, Centre National de Référence amyloses AL ; CHU de Montpellier Département d'hématologie biologique, Dr Moreaux J projets INCa-PLBIO 2015-2019 coordonateur J. Moreaux et ANR-PRC 2017-2020 coordonateur L. Delpy). Une expérience préliminaire a été réalisée sur un patient dont l'Ig-mo présentait une homologie éligible à un traitement par l'ASO-Vκ3-3'ss (l'exon présente 2 mésappariements de base, mais nous n'avons pas pu obtenir l'information sur la séquence intronique). Après mise en culture des cellules de moelle du patient en présence d'ASO, nous avons observé un saut complet de l'exon V qui restait cependant assez faible, vraisemblablement à cause des quelques mésappariements de base de l'ASO. Néanmoins, ce traitement ASO a permis de diminuer la fréquence de cellules tumorales de 37% à 23% ($CD38^{high}CD138^{high}$), sans affecter les cellules non tumorales (précurseurs $CD34^{+}$ ou cellules différenciées $CD38^{high}CD138^{neg}$). Comme cité précédemment, pour tester cette approche sur les cellules de nombreux patients, il faut mettre en place une analyse haut débit fiable et rapide permettant d'identifier la séquence de l'ass. La mise en place d'une technique de RACE PCR permettant avec un séquençage haut débit des pré-ARNm est en cours d'étude.

Pour affirmer le caractère sélectif de cette approche, nous avons étudié l'impact de traitements ASO ciblant un réarrangement V(D)J spécifique sur le répertoire B naïf après différenciation *in vitro* de cellules B en plasmablastes. Notre objectif était de cibler un réarrangement particulier sur les chaînes IgL ou IgH et d'éliminer les cellules ayant ce type de réarrangements. En prenant en compte les résultats précédents obtenus sur les lignées, il semblait pertinent de cibler des sites accepteurs des segments V, nous avons cependant choisi de cibler les sites donneurs des segments JH ou J κ . En effet, la quantité de segments V différents possiblement réarrangés n'offrait pas assez de variation de fréquence au niveau de l'analyse du répertoire. Effectivement, il y a chez la souris 152 gènes IGHV dont 97 fonctionnels mais seulement 4 IGHJ fonctionnels et 174 gènes IGKV dont 96 fonctionnels et 4 IGKJ fonctionnels. Le ciblage des segments J κ 1 nous permet de cibler environ 34% des cellules (Aoki-Ota et al., 2012) et celui de JH2, environ 32,5% (Collins et al., 2015). En considérant cette répartition, même si des sites cryptiques étaient utilisés comme pour XG6 limitant la toxicité, l'effet de l'ASO serait quantifiable sur le reste de la population des cellules B. De plus, le taux de SHM après stimulation LPS de cellules B naïves est quasiment nul. Notre étude a permis de démontrer pour la première fois qu'un traitement ASO contre un segment JH ou J κ permettait de moduler à façon le répertoire d'Ig *in vitro*. L'élimination des populations de cellules ayant des réarrangements VnJ κ 1 est en accord avec la toxicité démontrée des chaînes légères d'Ig sans domaine V. En ce qui concerne l'élimination des populations VnDnJH2, ces résultats suggèrent que l'expression de chaînes lourdes sans domaine V est également toxique dans les cellules sécrétrices d'anticorps, apportant indirectement une preuve que le TIE-checkpoint pourrait intervenir également après épissage alternatif des transcrits IgH. Néanmoins, une analyse précise du mécanisme d'élimination reste à réaliser avec l'étude du stress du RE et de l'activation des voies apoptotiques dans ces cellules.

Traitement par ASO ciblant l'exon constant CH1 sur les transcrits de chaînes lourdes d'Ig

J'ai également testé l'efficacité d'une autre approche décrite dans le brevet initial et permettant le ciblage de sous-classes d'Ig à l'aide d'ASO génériques ciblant un exon constant (CH1 ...) de chaînes lourdes d'Ig, très conservé et non soumis au processus de SHM. De façon analogue aux approches personnalisées, présentées précédemment, le ciblage des exons constants pourrait induire la production de chaînes lourdes tronquées, provoquer un stress du RE et entraîner l'apoptose des PC. Bien que la production d'une chaîne lourde sans CH1 puisse être à l'origine de dépôts d'Ig dans la pathologie HCDD (Bender et al., 2018; Bonaud et al.,

2015), il est important de noter que les PC produisant une IgG sans CH1 sont beaucoup plus sensibles au traitement par le Bortézomib (Bz), un inhibiteur du protéasome utilisé actuellement comme traitement du MM, que leurs homologues sauvages produisant des Ig complètes (Bonaud et al., 2015). En effet, les IgG tronquées sans CH1 sont mal sécrétées par les plasmocytes de par leur défaut d'assemblage ou leur propension à s'agréger, et induisent l'apoptose suite à un stress du RE prolongé. Cette stratégie de ciblage permettrait donc d'étendre le spectre d'action des ASO en utilisant un médicament générique pour un grand nombre de patients. Ainsi, un seul type ASO permettrait de cibler une sous-classe d'Ig comme IgG1 ou IgA fréquemment exprimée par les cellules de myélome voire IgM ou l'IgE dans d'autres pathologies. Les résultats préliminaires présentés dans la partie « Résultats » ont révélé une diminution importante de la production d'IgG dans les PBCM et la lignée de myélome LP1. Néanmoins, l'épissage alternatif induit par le traitement ASO reste à approfondir et nous supposons que l'ASO ciblant le dss de l'exon CH1 γ induit préférentiellement une rétention de séquence intronique plutôt qu'un saut de l'exon CH1. Le traitement par cet ASO-CH1 γ -3'ss de la lignée LP1, mettant une fois de plus en évidence l'utilisation d'un dss cryptique provoqué par SHM, souligne également la complexité du processus d'épissage alternatif. Ainsi, en absence de dss cryptique, il semblerait que la rétention de séquence intronique soit privilégiée alors que la présence d'un tel site dans l'exon V oriente l'épissage en favorisant son utilisation. A noter également, que ce dernier cas de figure se produit après l'épissage de l'exon V sur l'exon CH1 empêchant ainsi l'élimination stricte de l'exon CH1. Bien que les mécanismes sous-jacents restent à élucider et que cette stratégie conduise à une diminution drastique de la production d'IgG complète, nous envisageons d'étudier l'impact d'ASO ciblant les sites ass des exons constants (CH1, CH2 ou CH3) pour poursuivre le développement de cette stratégie antisens « générique ».

. Coopération entre le NMD et l'UPR dans les plasmocytes normaux et tumoraux

Maintien de l'homéostasie protéique dans les plasmocytes normaux

Le but de cette étude est de mieux comprendre la régulation des mécanismes de surveillance intervenant sur le contrôle de l'expression génique au niveau des ARNm et dans le maintien de l'homéostasie protéique intracellulaire (ou « protéostasie »), dans les cellules plasmocytaires. Pour cela, nous avons analysé en parallèle l'efficacité du NMD et l'action des voies de l'UPR dans des modèles murins appropriés. Les souris iTIE avec une production forcée d'Ig tronquées dans les PC, caractérisées par un stress exacerbé du RE et une réponse UPR forte, ont été

croisées avec des souris IgH^{wt/frV_k} , qui permettent l'étude de la dégradation par NMD des transcrits IgH non-sens (Srouf et al., 2016; Tinguely et al., 2012).

De nombreuses études ont déjà montré que la réponse UPR inhibait le mécanisme de NMD dans des cellules non lymphoïdes (Gardner, 2008b; Goetz and Wilkinson, 2017b; Karam et al., 2015b) conduisant à la stabilisation d'un certain nombre de transcrits codant pour des facteurs de l'UPR tels que ATF4, ATF3, CHOP, ATF6, FSD1L, HERP, IRE1 α , PERK, PRDG1, TNRC1 et TRAF2 (Gardner, 2008b; Karam et al., 2015b; Mendell et al., 2004). Le NMD dégrade les ARNm codant pour les composants UPR pour empêcher son activation en réponse à un faible stress. Cependant, en réponse à un fort stress du RE, le NMD est inhibé par l'UPR pour permettre une réponse au stress efficace. La dégradation des ARNm par NMD étant dépendante de la synthèse protéique, l'inhibition de ce mécanisme par l'UPR serait la conséquence d'une atténuation globale de la traduction par activation de la voie PERK et phosphorylation d'eIF2 α . Cette phosphorylation autorise néanmoins la traduction de certains ARNm (Baird et al., 2014). En autorisant la traduction de certains ARNm codant des protéines tronquées, il semble au contraire envisageable qu'une inhibition globale du NMD pourrait amplifier le stress du RE.

Dans les PC, il a été montré que la voie PERK est inhibée (Gass et al., 2008; Ma et al., 2010; Mielke et al., 2011; Zhang et al., 2005). Un fort stress du RE n'induit dès lors que les voies IRE1 α et ATF6 de l'UPR pour permettre la synthèse massive d'Ig sans inhibition de la traduction. Nos données suggèrent que dans les cellules sécrétrices d'anticorps, l'inhibition de la voie PERK autorise l'activation du mécanisme de NMD même lors d'un stress intense du RE. Nous montrons ici qu'il existe une coopération forte entre le mécanisme du NMD et la réponse UPR avec une dégradation par NMD très efficace des transcrits IgH non-productifs dans des cellules B activées subissant un stress. Ce mécanisme apparaît donc comme un moyen d'adaptation efficace limitant la traduction d'Ig tronquées qui pourraient provoquer une apoptose associée à un stress du RE, tout en préservant une synthèse massive d'Ig.

La régulation entre NMD et UPR a été historiquement sujette à controverse. Mais la complexité des mécanismes est importante et ne reste élucidée qu'en partie. Le contexte cellulaire est important, car la régulation suit une cinétique qui permet un équilibre entre des seuils d'inhibition et d'activation. Il a été récemment démontré que la localisation cellulaire du mécanisme du NMD était importante. Le RE est un site majeur de synthèse protéique, avec en particulier, les ARNm codant pour les protéines sécrétées comme les Ig. Le RE et le cytoplasme constituent des environnements différents pour la traduction des protéines et la régulation post-transcriptionnelle des gènes (Reid and Nicchitta, 2015). Actuellement, le NMD cytoplasmique

est largement étudié au niveau de ses mécanismes et de sa régulation. Cependant, les mécanismes de NMD sur les ARNm traduits au RE sont mal connus, car leur localisation empêche leur exposition au NMD cytoplasmique. Récemment, l'équipe de Javier F. Cáceres a décrit une nouvelle voie de NMD localisée au niveau du RE (Longman et al., 2020) : l'ER-NMD (pour « endoplasmic reticulum NMD »). Les auteurs se sont intéressés à une protéine particulière : NBAS (pour « Neuroblastoma-amplified sequence »), une protéine localisée à la membrane du RE, constituée de 2371 acides aminés et composant du complexe Syntaxin18. NBAS est une protéine avec deux fonctions indépendantes dans la sécrétion des protéines et dans le NMD. NBAS recrute le facteur du NMD UPF1 à la membrane du RE au niveau du « translocon » et favorise la dégradation des substrats de NMD qui sont traduits au RE. Il a été montré que NBAS se liait directement à l'ARNm, et contribue à la sélection des cibles NMD, et est préférentiellement associé au complexe SURF de surveillance initial, où UPF1 est hypophosphorylée. De plus, NBAS semble s'associer à d'autres facteurs tels que SMG5, SMG6, SMG7 qui sont nécessaires pour la dégradation de l'ARNm aux dernières étapes du NMD. Il serait donc intéressant de localiser finement le siège de dégradation des transcrits d'Ig non-sens afin de déterminer si ces ARNm sont pris en charge par ER-NMD.

Enfin, il a été montré que le NMD dégrade les ARNm IRE1 α par un mécanisme « EJC-indépendant » reposant sur la structure et la longueur de la 3' UTR. Nous pouvons donc supposer que différents mécanismes de NMD coexistent dans les PC dont le NMD EJC-indépendant et l'ER-NMD. Lors d'un stress accru dû à la forte sécrétion des Ig, il pourrait se produire une inhibition préférentielle du NMD EJC-indépendant cytoplasmique afin d'augmenter la réponse UPR mais le ER-NMD pourrait être activé pour dégrader spécifiquement les ARNm des protéines sécrétées telles que les Ig. Nous avons cependant observé que l'efficacité de prise en charge des transcrits Igk non-sens, par un mécanisme NMD obligatoirement EJC-indépendant compte tenu de la position des PTC, restait faible et assez constante au cours du développement B mais n'était pas inhibée dans les cellules sécrétrices d'Ig (Chemin et al., 2010). Identifier la stabilité des différents substrats de NMD (dépendants ou indépendants de l'EJC, dégradés dans le RE ou dans le cytoplasme...), à l'échelle du transcriptome et en fonction de l'intensité de l'UPR, pourrait aider à comprendre pour quelle raison son activation conduirait à une inhibition du NMD (Karam et al., 2015b) ou autoriserait une coopération entre ces deux mécanismes de surveillance (Article 3).

Le NMD dans les MM

Il serait pertinent d'étudier le mécanisme de NMD dans la pathologie du MM, afin d'envisager un traitement basé sur des inhibiteurs de NMD dans ces cellules sécrétrices très sensibles à des dérégulations de la protéostasie. Ainsi, une inhibition du NMD pourrait entraîner une accumulation d'ARNm contenant des PTC et augmenter la synthèse de protéines tronquées, induisant une surcharge du protéasome et une sensibilité accrue au traitement Bz.

Le développement d'inhibiteurs des différents composants de la voie NMD est en plein essor et est essentiel pour obtenir des informations sur le mécanisme du NMD. Actuellement, des inhibiteurs de NMD existent tels que NMDi14 (Martin et al., 2014), VG1 (Gotham et al., 2016) ou NMDI1 (Durand et al., 2007). Ce dernier stabilise les isoformes hyperphosphorylées de la protéine UPF1 et réduit les interactions entre les protéines UPF1-SMG5. La patéamine A (PatA) inhibe aussi le NMD par interaction directe avec eIF4AIII (Dang et al., 2009) et d'autres composés ont été identifiés comme inhibant l'interaction SMG7-UPF. La curcumine, des dérivés de pyrimidine, la wortmannin et la caféine se sont avérées aussi des inhibiteurs du NMD (Dang et al., 2009; Feng et al., 2015; Gopalsamy et al., 2012; Usuki et al., 2004), tout comme les inhibiteurs de la traduction comme l'émétine (Wang et al., 2011).

Au cours de ma thèse, nous avons étudié le NMD dans des lignées de MM. Nous avons tout d'abord confirmé que le NMD était très actif dans les lignées de myélome en examinant des substrats endogènes de NMD (TBL2, SC35 1,6 et SC35 1,7) après un traitement à l'émétine. En parallèle, nous avons testé des inhibiteurs spécifiques du NMD tels que VG1 ou NMDi14 mais ils n'ont pas permis d'inhiber le NMD sur les cellules de myélome. Pour déterminer si le mécanisme de NMD représente une cible thérapeutique intéressante dans le MM, en utilisation seule ou combinée au traitement Bz, des expériences supplémentaires sont essentielles et notamment l'inhibition du NMD à l'aide de siRNA ou d'ASO « gapmer » (anti-UPF1...).

Une autre approche s'est révélée très intéressante. Nous avons étudié l'efficacité du NMD en présence de différentes drogues induisant un stress du RE. Le traitement des cellules SK-MM-2 avec du Bz entraîne un stress du RE et une augmentation de Bip, mais n'affecte pas la dégradation des ARNm par NMD. De façon intéressante, des traitements avec de la Tunicamycine (TM) et du MG132 (MG) induisant un stress du RE avec une augmentation de Bip provoquent quant à eux, une inhibition du NMD. Nous avons pu corréliser cette observation avec une augmentation importante de CHOP, non observée dans le cas du traitement Bz. Ces résultats sont donc en accord avec le fait que dans les PC, l'absence d'activation de la voie PERK permet le maintien d'une forte dégradation par NMD. Enfin, une étude faisant l'objet d'une communication affichée a récemment souligné la pertinence des inhibiteurs de NMD

dans le traitement du MM. La molécule CC-115 est un inhibiteur connu de la protéine mTOR kinase (TORK) et de l'ADN-PK mais inhibe également des acteurs clés dans l'activation du NMD. Un criblage comparatif de 141 lignées cellulaires cancéreuses a été réalisé avec le CC-115. L'inhibition du NMD a entraîné une diminution de la phosphorylation de UPF1 et une augmentation dose-dépendante des ARNm sensibles au NMD avec l'activation de la voie PERK de l'UPR, corrélée à l'augmentation de l'expression d'ARNm d'*ATF4*, *ATF3* et *CHOP* sans affecter *HSPA5* ou *XBP1s*. Il a été démontré que les lignées de MM étaient en général très sensibles au CC-115. La mort cellulaire s'est produite via la voie mitochondriale de l'apoptose, dépendante de l'activité caspase et de la présence de Bax-Bak (Leeksa et al., 2019). Les études n'ont en revanche pas déterminé si un traitement au CC-115 augmentait la sensibilité des lignées de myélome aux traitements par inhibiteurs du protéasome, comme le Bz.

. Conclusion générale

Les travaux effectués durant ma thèse ont apporté la preuve que des stratégies antisens utilisant des ASO pour cibler les transcrits d'Ig ouvrent de belles perspectives thérapeutiques dans le traitement des gammopathies monoclonales comme le MM. Nous avons montré qu'un traitement ASO pouvait moduler l'épissage des ARN codant l'Ig monoclonale et favoriser un saut d'exon, induisant ainsi la production d'Ig tronquées et l'apoptose des cellules de myélome. Nous espérons que des améliorations en terme de biodistribution des ASO permettront un ciblage efficace des niches plasmocytaires dans la moelle osseuse, afin de proposer cette alternative thérapeutique personnalisée aux patients. Pour limiter les inconvénients liés à l'utilisation d'un ASO pour chaque patient, nous avons exploré l'efficacité d'un ASO générique ciblant une sous-classe d'Ig. Nos résultats préliminaires montrent qu'un traitement par un ASO ciblant l'exon CH1 γ de toutes les IgG provoque une baisse drastique de la production d'IgG, offrant ainsi une thérapie générique, potentiellement applicable chez tous les patients dont le clone tumoral exprime une IgG.

Dans une recherche plus fondamentale, nous avons aussi montré que l'ASO pouvait moduler la commutation de classe (CSR : « Class switch recombination ») des Ig dans les cellules B. Cette stratégie est donc un outil de choix pour orienter ou inhiber l'expression d'isotypes particuliers d'anticorps.

Enfin, nous avons démontré que les mécanismes de surveillance des ARN, comme le NMD (« Nonsense-Mediated mRNA Decay »), et ceux impliqués dans le contrôle de l'homéostasie protéique intracellulaire, comme l'UPR (« Unfolded Protein Response »), coopèrent dans les plasmocytes pour permettre une sécrétion importante d'anticorps Ig tout en maintenant un stress du RE acceptable.

En conclusion, nous espérons avoir participé à la découverte de nouvelles utilisations thérapeutiques des ASO et, sur un plan plus fondamental, que ces travaux apportent un éclairage sur la régulation de l'expression des Ig au cours du développement lymphocytaire B tardif.

Annexes



Annexe 1

Ashi, M.O., Srour, N., Lambert, J.-M., Marchalot, A., Martin, O., Le Noir, S., Pinaud, E., Ayala, M.V., Sirac, C., Saulière, J., Moreaux, J., Cogné, M., Delpy, L., 2019. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell. Mol. Immunol.* 16, 810–819. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0160-6>

Contribution personnelle :

J'ai participé aux expériences présentées en figure 6 et réalisé l'analyse du répertoire des chaînes lourdes d'Ig présentée en figure supplémentaire S1.



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 Moreaux^{1,2}, 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 Igk light chains without V domains (Δ V-kLCs).^{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-kLCs 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 Igk 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 IMGT/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

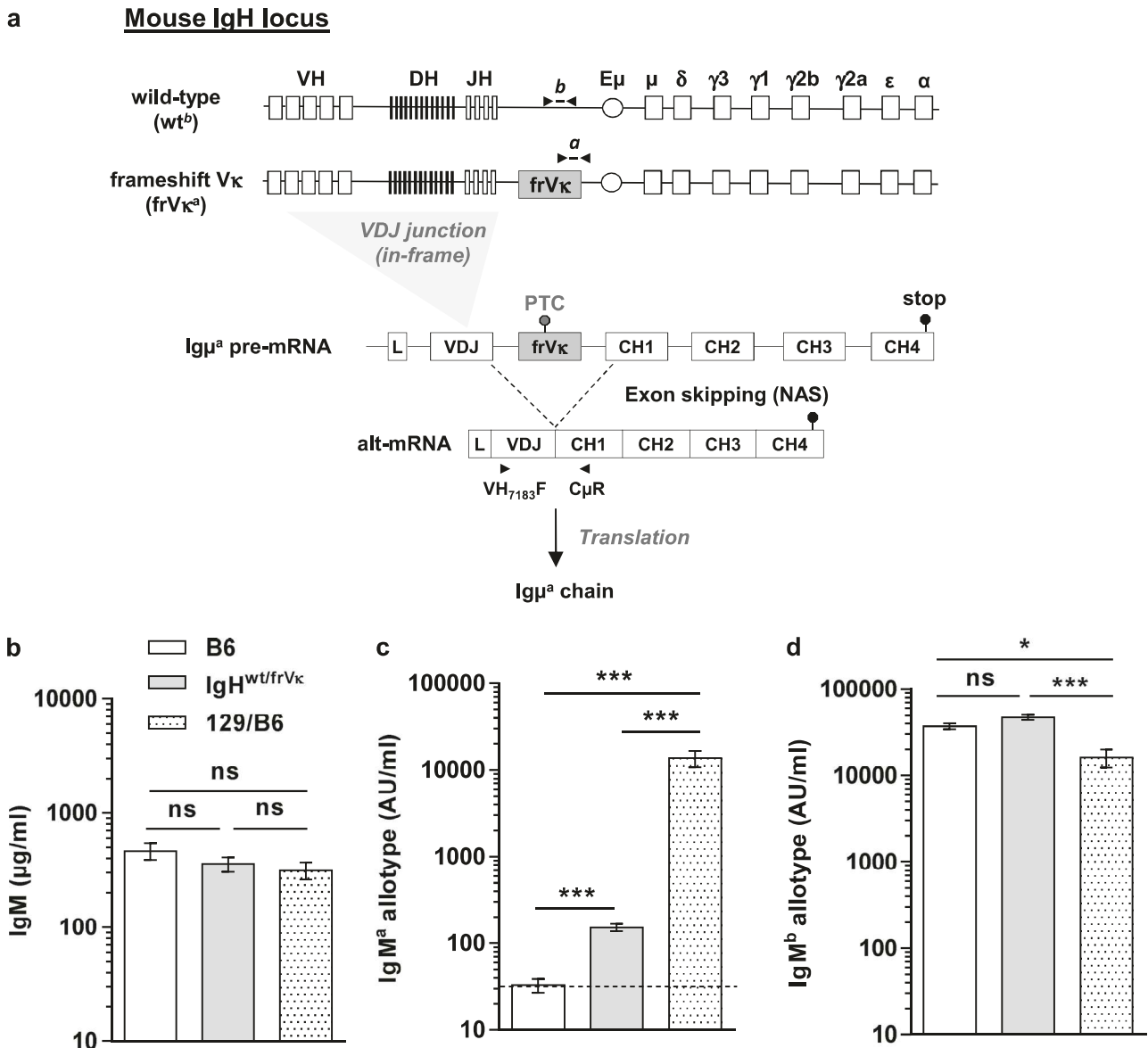


Fig. 1 Assessment of exon skipping of nonproductive VDJ-recombined IgH transcripts in vivo. **a** Map of wild-type (*b* allotype) and targeted (*a* allotype) IgH loci. IgH^{wt/frVκ} knock-in mice were created by insertion of an additional frameshift-inducing Vκ exon (frVκ) between J_H4 and Eμ. Skipping 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^a) 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.

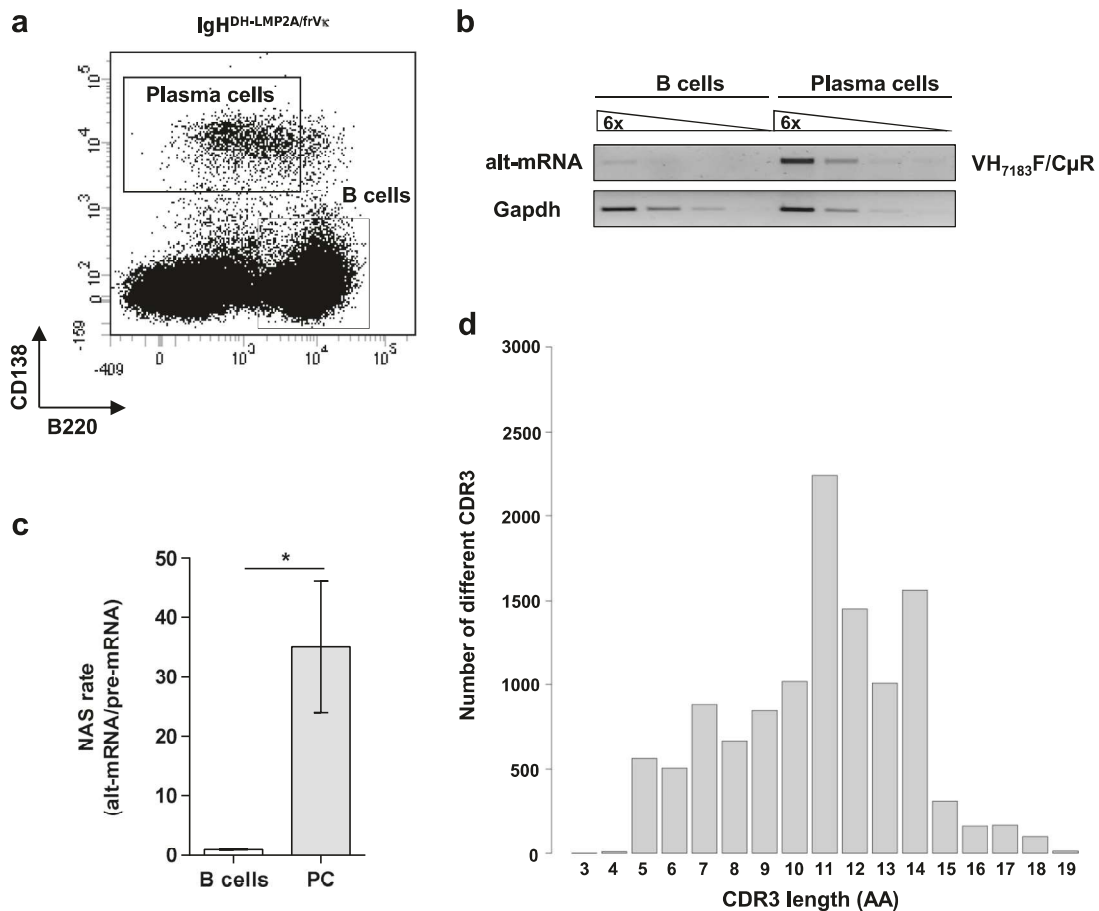


Fig. 2 Comparative analysis of NAS of IgH pre-mRNAs in B cells and PCs. **a** B cells and PCs were isolated from the spleens of IgH^{DH-LMP2A/frV_k} mice after staining with anti-B220 and anti-CD138 mAbs. Representative dot plot and gates used for cell sorting are depicted. The purity of sorted populations was always above 90%. **b** To identify alternatively spliced mRNAs (alt-mRNAs), RT-PCR were performed using VH₇₁₈₃F/C_μR primers. One representative experiment out of three performed is shown. **c** Alt-mRNA and IgH^{frV_k} pre-mRNA levels were assessed by qPCR using VH₇₁₈₃F/C_μR 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^{frV_k} 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

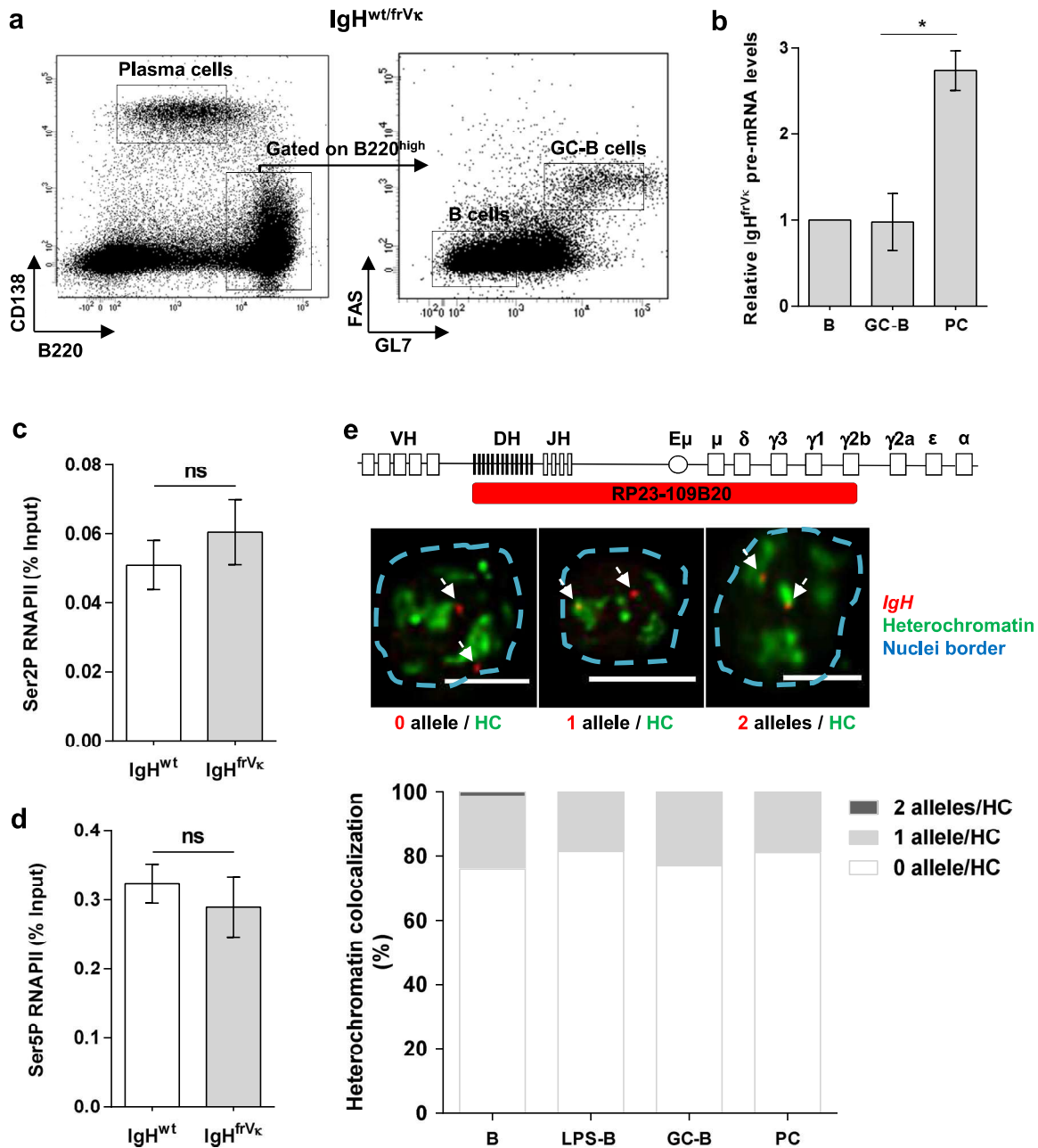


Fig. 3 Biallelic transcription of IgH alleles during PC differentiation. **a** B cells, germinal center (GC-) B cells, and PCs were isolated from the spleens of SRBC-immunized IgH^{wt/frV_k} mice after staining with anti-B220, anti-GL7, anti-FAS, and anti-CD138 mAbs. Representative dot plots and gates used for cell sorting are depicted. The purity of each sorted population was always above 90%. **b** Relative IgH^{frV_k} 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_k} 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_k} 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_k exon compared with the constitutive CH1 μ exon. Altogether, this chromatin profile revealed that the alternative frV_k 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

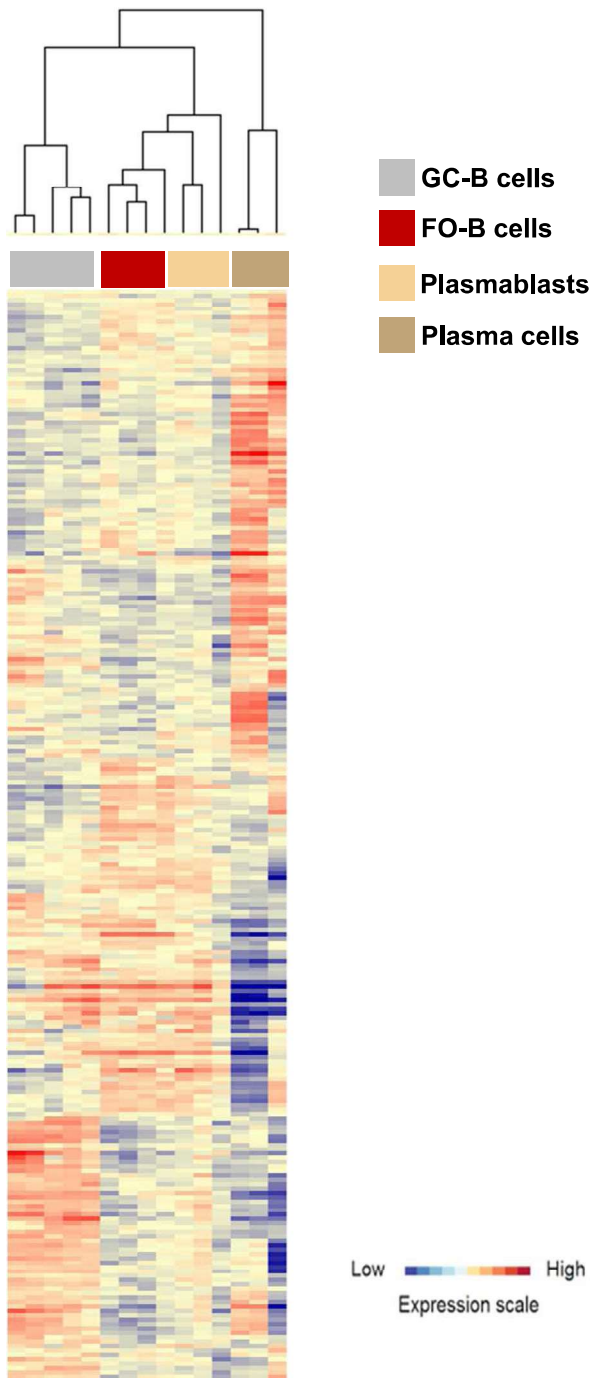


Fig. 4 Analysis of RNA splicing gene expression profiles during PC differentiation. Clustergram of GO RNA splicing gene list significantly differentially expressed between follicular B cells (FO B cells, $n = 3$), germinal center B cells (GC B cells, $n = 5$), plasmablasts (PBs, $n = 4$), and plasma 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} (*a* allotype) alleles. F1 (B6^b/129^a) 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_{ds}: 5'-ATGCTCGAGACT-TACCCGTTTGATT-3') and an irrelevant ASO (ASO-Ctrl: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA-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 (0.8×10⁶ cells/ml) with 1 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) (LPS-EB Ultrapure; Invivo-Gen) 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, 1×10⁷ 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

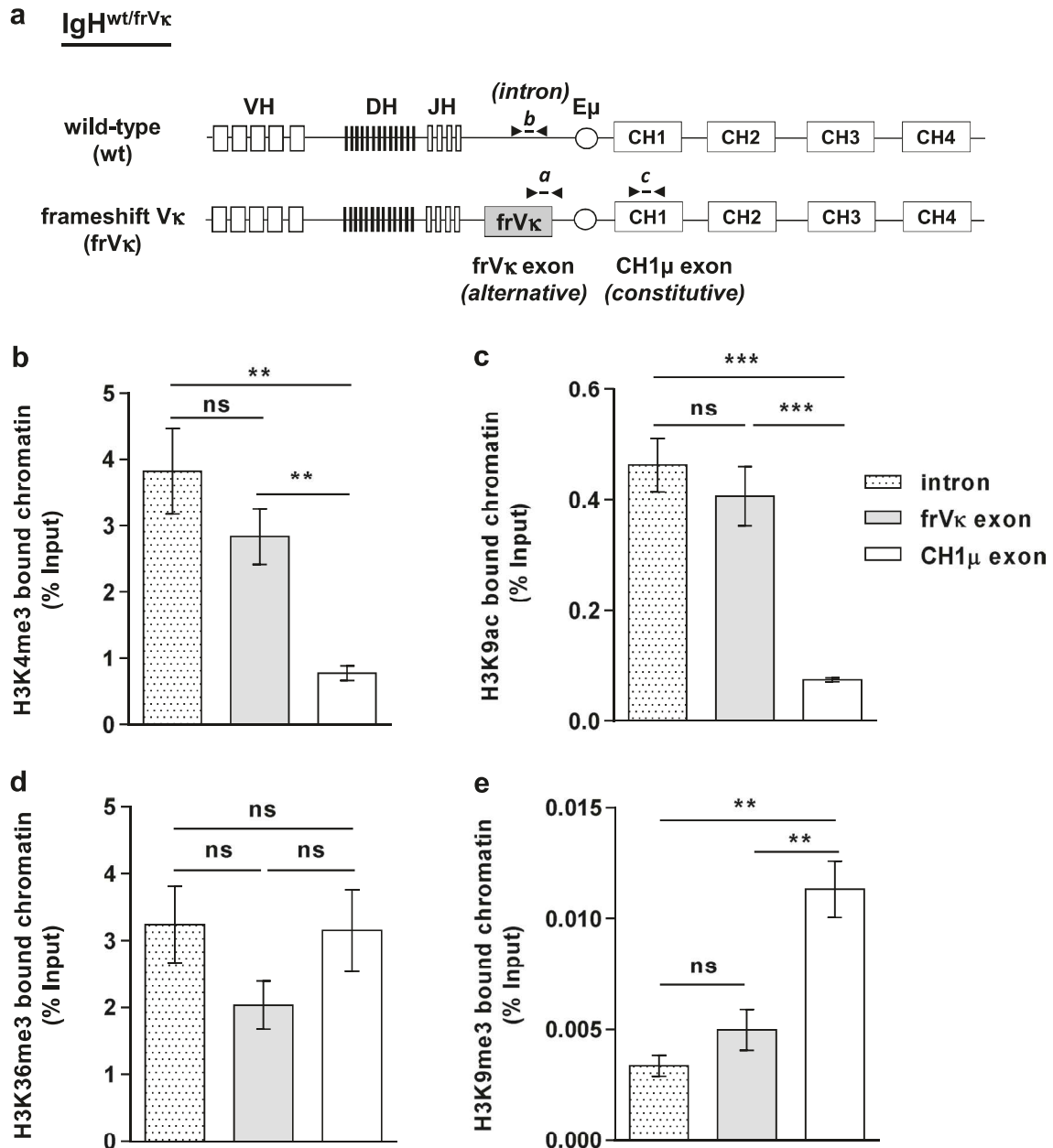


Fig. 5 Analysis of the alternative frVκ exon chromatin profile. **a** Chromatin marks were analyzed comparatively at the JH4-Eμ intron, the alternative frVκ exon, and the constitutive CH1μ exon. Primers and probes used in qPCR are depicted. **b–e** ChIP assays were performed in splenic B cells isolated from IgH^{wt/frVκ} 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), $0.3–0.5 \times 10^6$ cell equivalents were saved as input, and $3–5 \times 10^6$ cell equivalents were incubated overnight with specific or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS, and genomic DNA was obtained after phenol/chloroform extraction.

PCR and RT-PCR

Total RNA 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to *Gapdh* (Mm99999915_g1). Primers and probes used for Q-PCR are listed in Supplementary Table 2.

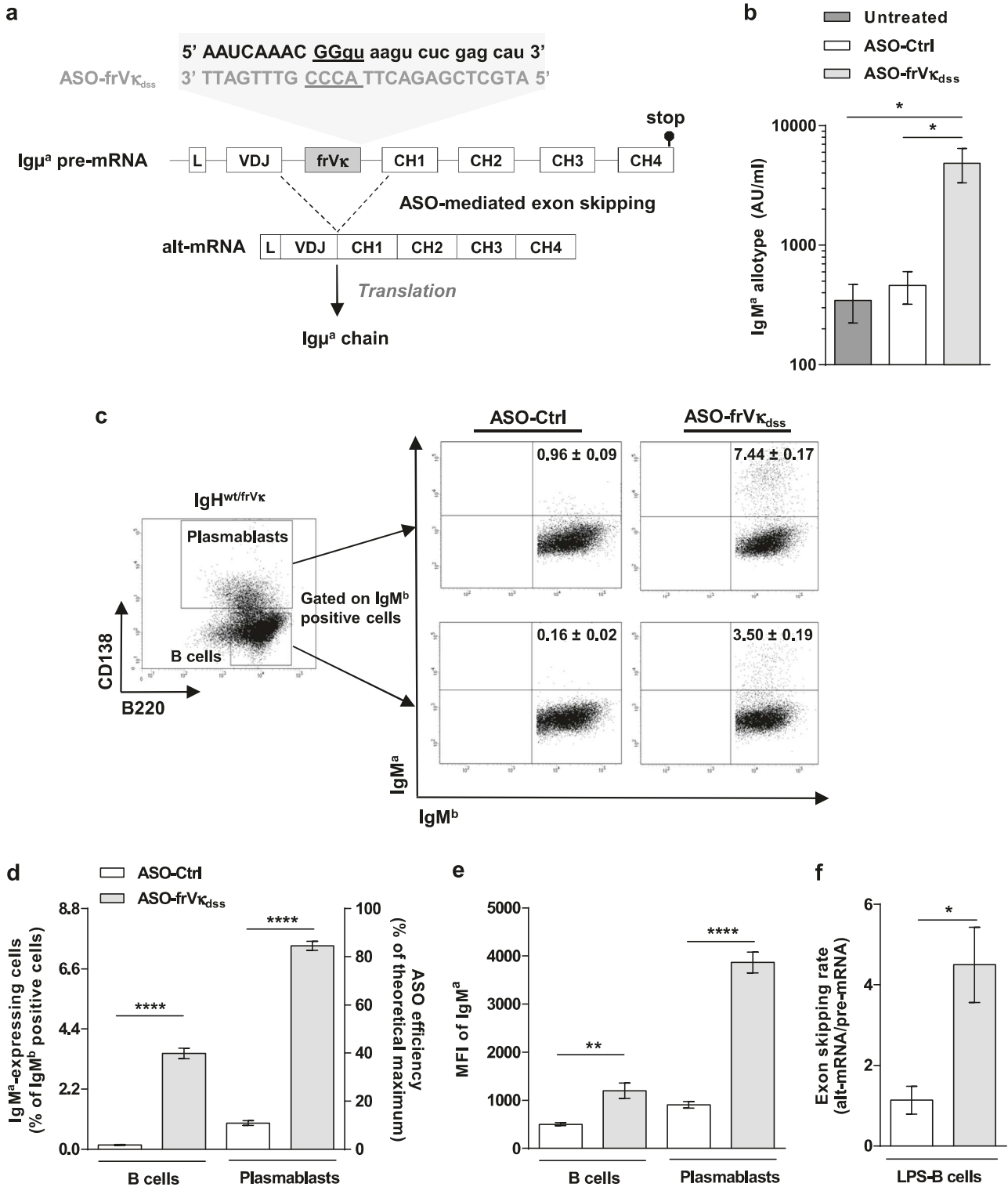


Fig. 6 Significant IgM^a production upon passive administration of ASOs. **a** An ASO sequence targeting the donor splice site of the frV_κ exon (AON-frV_κ_{dss}) was designed and synthesized as “*vivo*-morpholino ASO” (Gene Tools, LLC). **b** Splenic B cells isolated from IgH^{wt/frV_κ} mice were stimulated 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^{DHLMP2A/frV_κ} 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/frV 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. Diallon (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 allelic 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).
- Lechouane, 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/nrneuro.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).

Ashi et al.

Supplementary Information

Supplementary Fig. 1 shows VDJ repertoire analysis of IgH^{frVκ} alt-mRNAs. Supplementary Fig. 2 shows absence of adverse toxic effect following ASO treatment. Supplementary Table 1, a separate excel file, shows SAM Multiclass analysis of genes related to RNA splicing during plasma cell differentiation. Supplementary Table 2 contains list of primers and probes used in CHIP, standard and real time PCR assays.

LEGENDS OF SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Figure 1: VDJ repertoire analysis of IgH^{frVκ} alt-mRNAs

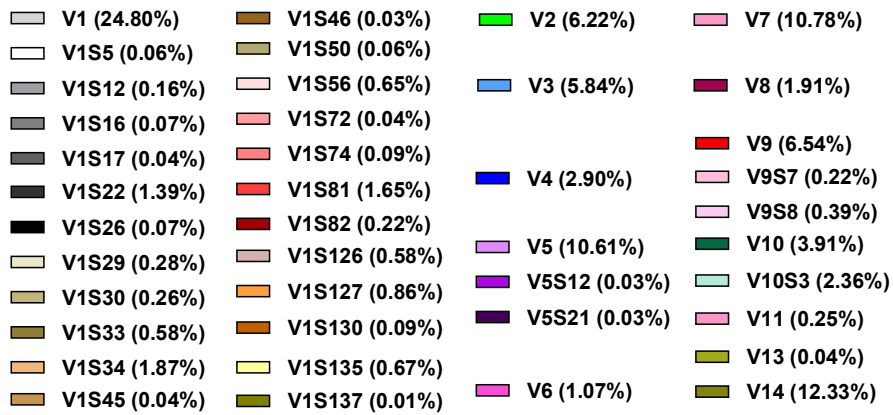
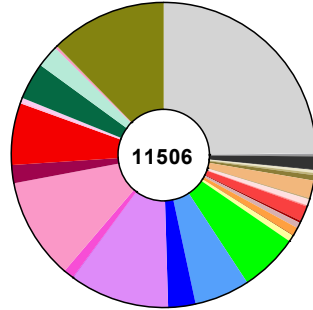
PCs (B220⁻/CD138⁺) were sorted from spleens of IgH^{DH-LMP2A/frVκ} mice and RACE-PCR was performed using a CH1μ reverse primer as described in methods. The VDJ repertoire of IgH^{frVκ} alt-mRNAs was analyzed using IMGT/High-V-Quest (Alamyar et al., 2012). **a, c** Pie charts represent VH and JH₁₋₄ family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

Supplementary Figure 2: Absence of adverse toxic effect following ASO treatment

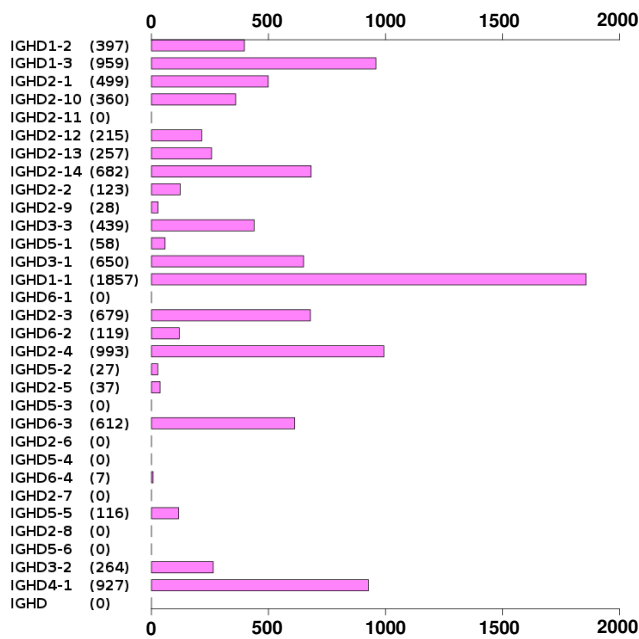
Splenic B cells (n=5) isolated from IgH^{wt/frVκ} mice were stimulated with LPS (1μg/ml) for 4 days and treated or not with AON (1μM) during the last 2 days, as described in methods. **a** The proliferative index was determined by counting viable cells after Trypan blue exclusion. **b** The production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

Supplementary Information

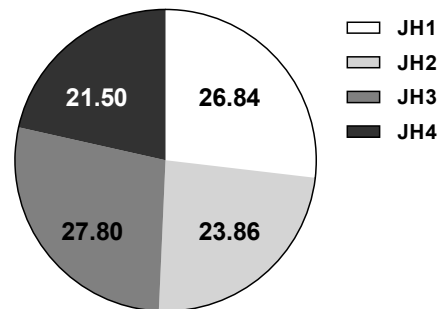
a



b

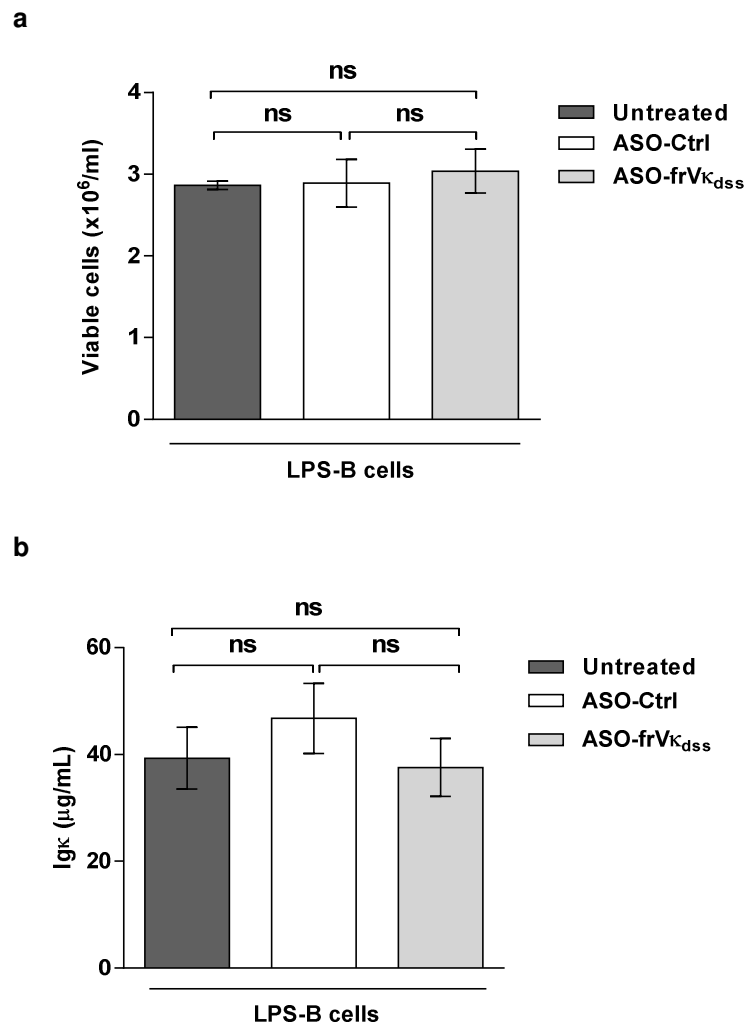


c



Supplementary Figure 1 (Ashi et al.)

Supplementary Information



Supplementary Figure 2 (Ashi et al.)

Supplementary Information

Supplementary Table 2. Primers and probes used in CHIP, standard and real time PCR assays

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

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

Annexe 2

Invited Mini Review

The Yin and Yang of RNA surveillance in B lymphocytes and antibody-secreting plasma cells

Jean-Marie Lambert, Nivine Srour[†] & Laurent Delpy^{*}

UMR CNRS 7276 - INSERM 1268 - Université de Limoges, Centre de Biologie et de Recherche en Santé, 2 rue du Dr Marcland, Limoges F-87025, France

The random V(D)J recombination process ensures the diversity of the primary immunoglobulin (Ig) repertoire. In two thirds of cases, imprecise recombination between variable (V), diversity (D), and joining (J) segments induces a frameshift in the open reading frame that leads to the appearance of premature termination codons (PTCs). Thus, many B lineage cells harbour biallelic V(D)J-rearrangements of Ig heavy or light chain genes, with a productively-recombined allele encoding the functional Ig chain and a nonproductive allele potentially encoding truncated Ig polypeptides. Since the pattern of Ig gene expression is mostly biallelic, transcription initiated from nonproductive Ig alleles generates considerable amounts of primary transcripts with out-of-frame V(D)J junctions. How RNA surveillance pathways cooperate to control the noise from nonproductive Ig genes will be discussed in this review, focusing on the benefits of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) activation during B-cell development and detrimental effects of nonsense-associated altered splicing (NAS) in terminally differentiated plasma cells. [BMB Reports 2019; 52(12): 671-678]

INTRODUCTION

To ensure the fidelity of gene expression and prevent translation of truncated proteins, many cellular RNA surveillance pathways have been developed to distinguish between normal transcripts and those harboring premature termination codons (PTCs). RNA surveillance mechanisms

have been extensively studied in lymphoid cells that naturally acquire PTCs at high frequencies during the error-prone V(D)J recombination process (1). Through the analysis of nonproductive (PTC+) immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) transcripts, it has been demonstrated that transcriptional silencing, splicing inhibition or suppression (SOS), alternative splicing, and mRNA degradation cooperate with each other to limit the amount of potentially deleterious truncated proteins (2-12).

The nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway is very active in lymphoid cells. It ensures rapid degradation of PTC-containing mRNAs (1, 9, 13). The nearly complete absence of PTC+ Ig or TCR mRNAs due to their strong NMD degradation can lead to the assumption that transcription of PTC+ alleles is safe. Accordingly, nonproductive alleles are often considered as passengers in comparison with the driving effects of productively-rearranged Ig or TCR alleles during lymphoid development. Although the benefits of NMD activation are clearly established in lymphoid cells (14, 15), the impact of nonsense-associated altered splicing (NAS) with regard to the production of truncated Ig and TCR polypeptides remains unclear. The objective of this review is to summarize our current knowledge on the opposite effects of NMD and NAS during B cell development. This paradox will be discussed in line with our recent findings showing that NAS events can lead to the production of truncated Ig polypeptides that can blunt plasma cell (PC) differentiation (16). Challenging the classical antigen-driven PC differentiation model, this new PC checkpoint suggests that the expression of PTC+ Ig genes can sometimes be disabling.

THE GENERATION OF ANTIBODY REPERTOIRE: A RISKY DIVERSITY

The error-prone V(D)J recombination process

Ig genes are good candidates to study nonsense RNA surveillance because the generation of primary Ig repertoire in early B-cell development and the process of somatic hypermutations (SHM) in germinal center B cells frequently generate PTCs (1). The V(D)J recombination process of Ig genes takes place in the bone marrow and assembles the variable region from germline variable (V), diversity (D), and joining (J) gene segments. Control of V(D)J recombination

*Corresponding author. Tel: +33-519-564-214; Fax: +33-555-435-897; E-mail: laurent.delpy@unilim.fr.

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

<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.12.232>

Received 23 September 2019

Keywords: Immunoglobulin, Nonsense-associated altered splicing (NAS), Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), Plasma cells, RNA surveillance

occurs at several levels, including cell-type specificity, intra- and inter-locus sequential rearrangements, and allelic exclusion (17). Although DNA rearrangements in the Ig heavy (IgH) and light (*i.e.* Ig κ and Ig λ) loci occur in a precise order, the selection of gene segments within each locus is random. It allows for combinatorial diversity. The mechanism used by lymphoid cells to successfully rearrange their antigen (Ag) receptor genes requires the use of recombinase enzymes RAG1 & RAG2 that are only active in lymphocytes (18, 19). Recombinases act at early stages of lymphoid cell development in order to bring two segments into close proximity, forming a loop of intervening DNA which can then be excised. The ends of these segments are annealed to form a newly rearranged DNA sequence. To increase diversity, joining of V, D, and J segments is imprecise with nucleotide deletions or insertions. Non-template (N) nucleotide additions are introduced by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). Palindromic (P) insertions occur after asymmetric hairpin opening. Random N-additions cannot be attributed to any other genomic sequences. They rarely exceed a dozen nucleotides (20, 21). They are polymerized by TdT which is the third lymphoid-specific protein involved in V(D)J recombination besides RAG1 and RAG2 (22-25). P insertions rarely exceed two nucleotides and form a palindrome with respect to the sequence at the end of the coding strand (26-28). Although nucleotide deletions and insertions greatly enlarge the diversity of the Ig repertoire, only one third of all V(D)J junctions are in-frame, while the other two thirds are out-of-frame due to frameshift mutations that create PTCs.

Frequency of PTC-containing Ig genes in B-lineage cells

Clonal selection implies that each B cell clone expresses a unique receptor. Hence, one of the two inherited Ig alleles is functionally rearranged. This allelic exclusion associates asynchronous V(D)J recombination events at Ig loci with receptor-mediated inhibitory feedback control (29). At the pro-B cell stage, VDJ recombination is initiated by biallelic D to J rearrangements at IgH loci, followed by a monoallelic V to DJ recombination. A productive VDJ junction encodes the variable (V) region of the μ heavy chain that can associate with the surrogate light chain to form pre-BCR (pre-B cell receptor). Regulatory mechanisms mediated by pre-BCR signaling prevent further V to DJ rearrangements on the second IgH allele and initiates VJ recombination at Ig light chain loci lacking D segments. By contrast, when the VDJ junction on the first IgH allele is nonproductive, the lack of the pre-BCR inhibitory signal allows V to DJ recombination on the second allele. If this second attempt is successful, a pre-BCR-mediated proliferation wave will generate abundant B cell clones with biallelic VDJ rearrangements. Roughly half of mature B cells harbor biallelic VDJ-rearrangements with a nonproductively-recombined IgH allele (30-32). If another nonproductive VDJ junction occurs on the second IgH allele, cells are eliminated through apoptosis. As mentioned above, pre-BCR signaling

stimulates recombination of Ig light chain genes. The presence of two Ig κ and Ig λ light chain isotypes permits multiple VJ recombination events. Again, the expression of a functional BCR precludes further recombination in immature B cells. In humans, ~50% of mature B cells express Ig λ . However, in mice, recombination takes place preferentially at the Ig κ locus and only 5% of B cells express Ig λ isotypes (32). Hence, B cells harbor numerous nonproductive VJ-recombined Ig light chain alleles (Fig. 1).

After their exit from the bone marrow, alternative splicing of constant C μ and C δ exons ensures co-expression of IgM and IgD at the surface of naïve B cells (33). Upon antigen encounter, IgD expression is downregulated and activated B cells are subjected to a second wave of Ig gene diversification by SHM in germinal centers (GCs). Frequent nonsense mutations can arise during this affinity maturation process that requires transcription of the target region and enzymatic activity of B-cell-specific activation-induced deaminase AID (34). This process leads to the introduction of multiple nucleotide changes in the V exon (*i.e.*, VDJ or VJ) and a few hundred base pairs in the downstream intron (35). Nucleotide insertions and deletions (indels) have also been observed (36, 37). SHM leads to the expression of a secondary repertoire from which B cells carrying a mutated BCR with improved Ag-binding affinity can be selected (38). We have previously observed that SHM occurs at similar levels on productive and nonproductive VDJ-rearranged IgH alleles (39). If a nonsense codon appears on the productive allele, the lack of Ag-binding activity provokes a rapid elimination of mutated B cell clones within GCs (40-42). The occurrence of SHM on nonproductive Ig alleles can introduce additional nonsense codons, modifying the PTC position within the V exon. Class switch recombination (CSR) also occurs in germinal centers. This second round of IgH intragenic rearrangements replaces the C μ exons with a downstream constant gene (43). GC B cells can differentiate into memory cells or terminally differentiated PCs that secrete substantial amounts of antibody (44). The PC transcriptional program induces major changes including a transcriptional boost of Ig gene transcription and the activation of unfolded protein response (UPR) to ensure proper Ig folding (45). In PCs, the use of secreted polyadenylation signal (PAS) instead of downstream membrane PAS allows alternative IgH pre-mRNA processing to switch from membrane to secreted Ig isoforms (46). Taken together, the vast majority of B-lineage cells harbor PTC+ Ig alleles in their genome with nonsense codons introduced in the V exon or in the adjacent constant exon during the V(D)J recombination process or SHM (Fig. 1).

Transcriptional control of PTC-containing Ig genes

The high frequency of PTC+ V(D)J-rearranged Ig alleles in B-lineage cells needs additional mechanisms to downregulate these nonsense transcripts. A transcriptional silencing of PTC+ Ig genes has been proposed as a primary mechanism preventing their expression. This mechanism is called

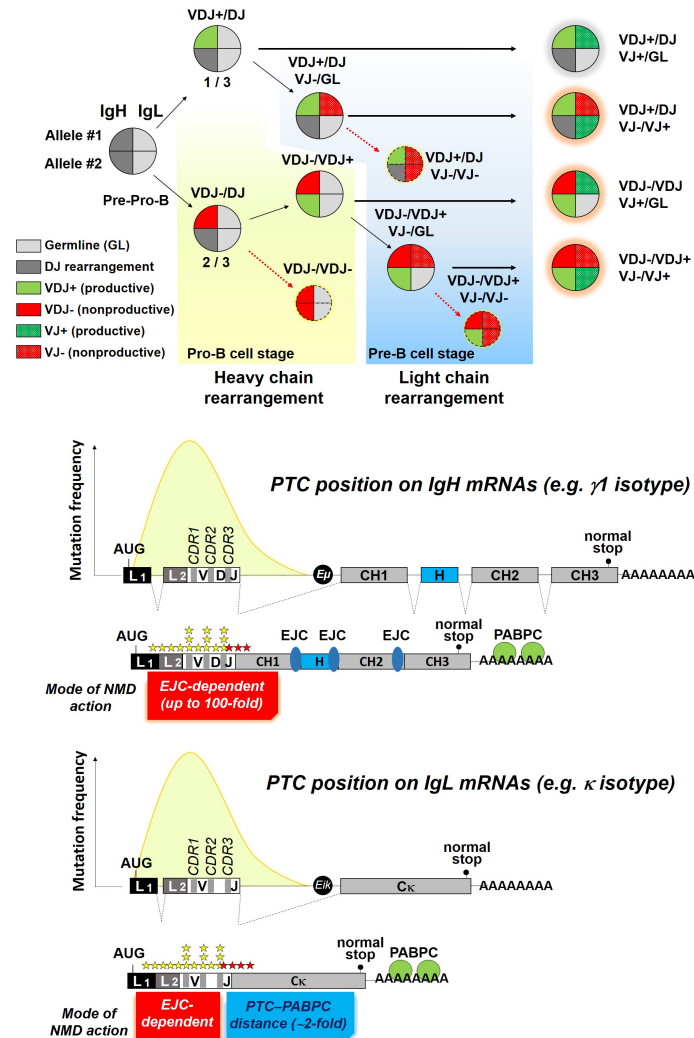


Fig. 1. Abundance of nonproductive V(D) rearrangements in B-lineage cells. (A) Schematic representation of productive and nonproductive V(D)J rearrangements during the generation of primary antibody repertoire. V(D)J recombination is initiated by a monoallelic V to DJ recombination at the IgH locus (biallelic DJ rearrangements are not depicted). If successful, then V to J recombination occurs at Ig light chain (IgL) loci. Successive IgL rearrangements are possible due to the fact that there are two Ig κ and two Ig λ alleles (not depicted). Pre-B cell receptor (pre-BCR) or BCR-mediated feedback signalling upon in-frame rearrangement of one IgH or IgL allele (*i.e.*, VDJ+ or VJ+) prevents V(D)J recombination on the second allele (32). By contrast, a nonproductive V(D)J recombination on one Ig allele (*i.e.* VDJ- or VJ-) induces rearrangement on the second allele. The imprecise nature of V(D)J junctions generates ~1/3 of productive and ~2/3 of nonproductive V(D)J-rearranged alleles. Hence, most B-lineage cells harbour nonproductively-recombined Ig alleles in their genome (red parts in pie charts). If the two attempts on both Ig alleles are unsuccessful, the cell is programmed to die by apoptosis (dashed circles). (B) PTCs introduced during the error-prone V(D)J recombination process (red stars) or by somatic hypermutations (SHM; yellow stars) can activate different modes of NMD degradation. Frameshift V(D)J junctions can lead to the appearance of PTCs in the variable (V) exon or in the downstream adjacent constant exon. SHM can lead to the appearance of PTCs in the first leader exon (L₁: L-part1) or in the V exon, with a greater abundance in the complement-determining regions (CDRs). For IgH mRNAs, PTC introduced by SHM or during V(D)J recombination can elicit exon junction complex (EJC)-dependent NMD. EJCs that remain bound to mRNAs after a pioneer round of translation are depicted (blue ovals). As good NMD candidates, PTC-containing IgH mRNAs are strongly degraded by NMD (up to 100-fold) (1, 9, 59). However, it has been demonstrated that some nonsense codons in the 5'-half of the VDJ exon could not elicit strong NMD degradation (73). Similarly, PTCs close to the initiation codon are NMD resistant in other models likely due to a critical interaction between PABPC1 with the translation initiation complex (74, 75). For nonproductive Ig κ alleles, PTCs are located at the end of the V exon or within the last constant C κ exon. Hence, these PTC-containing IgL mRNAs could not elicit EJC-dependent NMD degradation, although they are likely to be targeted by a PTC-PABPC1 distance-dependent mode of NMD which induces a less efficient degradation (~2-fold) (5).

“nonsense-mediated transcriptional gene silencing” (NMTGS). It involves chromatin remodelling and “heterochromatinization” of the PTC+ DNA sequence. NMTGS can be inhibited by the overexpression of exonuclease. However, the involvement of siRNA like molecules has not been elucidated yet (4). NMTGS is also impaired upon knock-down of the main NMD factor UPF1, suggesting a mechanistic link between NMD and NMTGS (47). Although NMTGS has been demonstrated in HeLa cells transfected with minigene constructs, the occurrence of such a quality control mechanism needs to be determined in B cells. Instead of active silencing, many studies including ours have shown a biallelic transcription pattern for productive and nonproductive Ig alleles in B cells (9, 39, 48-51). To study the transcription and RNA surveillance of PTC+ IgH alleles during B cell development, we introduced a nonsense V exon in the IgH locus to specifically mark each allele in heterozygous mutants. Consistent with previous observations in a pro-B cell line (52), productive and nonproductive IgH alleles exhibited equivalent transcription rates with similar RNAPII loading in LPS-stimulated B cells (9, 48). This also confirms our earlier study in germinal center B cells, demonstrating that the frequency of transcription-dependent SHM is similar for productive and nonproductive VDJ-recombined IgH alleles (39).

RNA SURVEILLANCE IN B-LINEAGE CELLS

The machinery of RNA surveillance is now known to include various pathways controlling the quality of pre-mRNA and mRNA to limit the translation of truncated proteins. The molecular mechanisms involved in the activation of RNA surveillance pathways have been extensively reviewed previously (13, 53, 54).

Accumulation of PTC-containing Ig pre-mRNAs

Despite their active transcription, PTC+ Ig genes can be controlled at pre-mRNA level. Previous studies (2, 6) performed in Milstein's lab have shown an accumulation of PTC+ Igk unspliced or splicing intermediate RNA precursors, supporting the idea that nonsense codons can be recognized in the nucleus by a mechanism independent of protein synthesis. In a simplified model of Igk transcripts containing only three exons, splicing intermediates can eliminate the first intron (IVS1) but retain the intervening sequence between VJ and Ck exons (IVS2). Upon transfection of B cell lines spanning the main developmental stages with PTC+ and PTC-free Igk minigenes, we have observed that the presence of PTC induces a ~2-fold increase for each unspliced and splicing intermediate RNA precursors (5). Again, unspliced and partially spliced Igk RNAs were mainly confined in the nucleus (5). The accumulation of PTC+ precursors was not affected by protein synthesis inhibitors (5). In agreement with these data, RNA-FISH experiments performed in Sp6-derived hybridoma cells further demonstrated that PTC+ Ig- μ pre-mRNAs could accumulate

near the site of transcription (55). Recent findings obtained in *Drosophila* have indicated that UPF1 can bind to nascent RNAs at RNAPII transcription sites to facilitate nuclear processes of gene expression (56). It has been demonstrated that UPF1 is needed for the release of poly(A) mRNAs from chromosomal transcription sites and for their export from the nucleus. It is tempting to speculate that these new nuclear scanning functions of UPF1 could be involved in the nuclear accumulation of nonproductive Ig RNA precursors or in NAS (see below). Interestingly, fluctuations in the steady state level of PTC+ IgH pre-mRNAs occurs during B cell development, with low accumulation in PCs compared to resting B cells (9). These observations indicate that a high level of transcription precludes splicing inhibition and accumulation of PTC+ Ig pre-mRNAs. Thus, efficient processing of PTC+ Ig transcripts in PCs needs additional RNA quality control to prevent the synthesis of truncated Ig polypeptides.

NMD of PTC-containing Ig mRNAs

NMD is tightly coupled to translation. The molecular mechanisms of the two prevailing exon-junction complex (EJC)-dependent and Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 1 (PTC-PABPC1) distance-dependent NMD activation models have been extensively characterized in the past decades (1, 13, 53, 54, 57, 58).

According to the “50-55 nucleotides rule” for EJC-dependent NMD activation, the presence of a PTC more than 50-55 nucleotides upstream from the last exon-exon junction can trigger efficient mRNA degradation by NMD. This mode of NMD activation is elicited to downregulate the level of nonproductively-rearranged IgH mRNA that contains PTCs in the V or in the first constant exon (CH1) and several constant exons downstream. Up to 100-fold accelerated degradation of these NMD candidates has been documented in B cell lines (59-61). Consistent with a previous study using TCR β as gene models (62), we found that the extent of NMD was closely correlated to the splicing rate during B-cell development, with ~2 to 20-fold degradation of PTC+ IgH mRNAs in resting and LPS-stimulated B cells, respectively (9). Interestingly, levels of nonproductive IgH mRNAs remained constantly low in those B cell populations, suggesting compensatory effects between nonsense-mediated splicing inhibition and NMD. Hence, qualitative changes in the RNA surveillance machinery occur during B-cell development. The cooperation between RNA surveillance mechanisms controls the amount of PTC+ IgH mRNAs.

For Igk alleles, the situation is completely different because a frameshift at the VJ junction leads to the appearance of a PTC within the last Ck exon, or less frequently at 3 nucleotides upstream from the last exon-exon junction (50). Thus, the position of PTC on nonproductive Igk mRNAs does not meet the requirements for EJC-dependent NMD. Instead, it belongs to the PTC-PABPC1 distance-dependent NMD activation model. The latter pathway occurs when the 3'UTR of an

mRNA is abnormally long, as in the case of the presence of a PTC (53). NMD is activated when the 3'UTR structure precludes the normal interaction of PABPC1 with release factors (eRF1 and eRF3) involved in translation termination. The spatial rearrangement of 3'UTR controlling the proximity of the termination codon and the poly(A) tail is a critical determinant for NMD (63). Although UPF1 was previously assumed to be the essential player involved in the interaction with release factors (eRFs), *in vitro* translation termination assays recently performed by Neu-Yilik *et al.* (64, 65) indicate that UPF3B (also named UPF3X) directly interacted with both RNA and eRF3. This NMD mechanism is most likely to be involved in the uptake of nonproductive Igκ mRNAs, inducing a modest (~2-fold) NMD degradation in mouse B cells (Fig. 1) (5).

NAS of PTC-containing Ig transcripts and production of deleterious truncated Ig polypeptides in plasma cells

Mutations within the sequence of exonic splicing enhancers (ESEs) and the presence of a PTC have been shown to elicit alternative splicing called class-I and class-II NAS, respectively (8, 11-13, 66, 67). As an additional RNA surveillance pathway, class-II NAS (hereafter called NAS) can prevent the maturation of full-length PTC-containing mRNAs by promoting alternative splicing to skip the offending PTCs. However, NAS can yield internally deleted mRNAs and proteins. Hence, it exhibits opposite effects compared to NMD with regard to the production of truncated proteins. Although NMD and NAS use the common factor UPF1, these processes are mechanistically different. Knockdown of several key NMD factors including UPF2, UPF3A, UPF3B, and SMG1 showed no significant effect on NAS (13). The intrinsic mechanisms responsible for the activation of NAS remain elusive. Conflicting results have been obtained with regard to the sensitivity of NAS to translation inhibition or frameshift mutations (5, 13). Future breakthroughs would indicate whether NAS, nonsense-mediated SOS, or splicing inhibition could be induced as a response to PTC recognition during translation, after nuclear degradation of spliced PTC-containing mRNAs, or by other nuclear-scanning mechanisms.

To study NAS of Igκ transcripts, we transfected several B-cell lines with minigenes harboring frameshift mutations at the VJ junction that could lead to the appearance of PTCs at the end of the V exon (V^{PTC}), or within the last Cκ exon (C^{PTC}) (5, 16). Consistent with a reading frame-dependent NAS activation, the presence of V^{PTC} , but not of C^{PTC} , strongly induced skipping of the V exon. We also confirmed that V exon skipping occurred in mouse B cells during splicing of both nonproductive Igκ and IgH transcripts (5, 16, 48). Interestingly, we found that skipping of the PTC-containing V exon was greatly increased in PCs compared to B cells. This was correlated with a transcriptional boost of Ig genes during PC differentiation (48). Thus, a fast RNAPII elongation rate can enhance the skipping of PTC-containing V exons in PCs, whereas a slow elongation

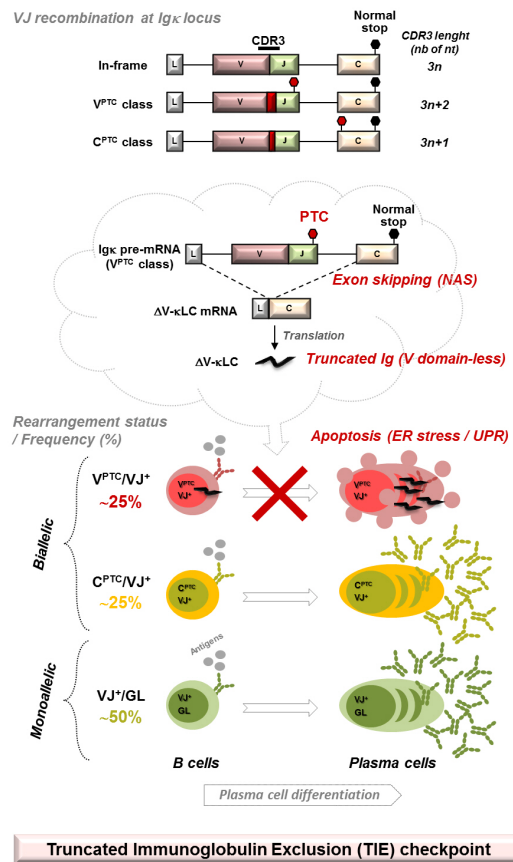


Fig. 2. A Truncated Immunoglobulin Exclusion (TIE) checkpoint during terminal plasma cell differentiation. (Top) Schematic structure of the Igκ locus showing various classes of V-J rearrangements. In-frame and out-of-frame VJ junctions with the position of PTCs from the latter are depicted. Any VJ recombination involving mouse Jκ1 segments can lead to the appearance of PTCs in the last constant exon (Cκ). For other Jκ segments, the addition of 1 nucleotide (nt) (*i.e.*, $3n + 1$ nt) at the VJ junction also leads to the appearance of a PTC in the Cκ exon, whereas the addition of 2 nt (*i.e.* $3n + 2$ nt) creates a PTC at the end of the variable (V) exon, 3nt upstream the exon-exon junction (50). (Middle) Whereas nonsense-associated altered splicing (NAS) is not activated by the presence of a PTC within the Cκ exon (C^{PTC} class), PTCs in the V exon (V^{PTC} class) strongly promote exon skipping and translation of V domain-less κ light chains (ΔV -κLCs) (5, 16). (Bottom) The production of ΔV -κLCs is innocuous in B cells. However, it provokes endoplasmic reticulum (ER) stress-associated apoptosis in plasma cells (PCs), precluding their differentiation as long-lived PCs. Overall, significant numbers of PCs harboring biallelic VJ recombination in a V^{PTC}/VJ^+ configuration at the Igκ locus are eliminated through the activation of a Truncated Immunoglobulin Exclusion (TIE) checkpoint (16). The TIE checkpoint exhibits dual effects on antibody responses. On one hand, its activation blunts the PC repertoire that can emerge from mature B cells, thus limiting the extent of antibody responses. On the other hand, the TIE-checkpoint favors the selection of long-lived PCs with limited basal ER stress that supports further elevation of Ig secretion. GL: germline; VJ⁺: productively-recombined Igκ allele; V^{PTC} : nonproductively-recombined Igκ allele harboring a PTC within the V exon; C^{PTC} : nonproductively-recombined Igκ allele harboring a PTC within the Cκ exon.

rate authorizes their splicing as full-length mRNAs in B cells (or splicing inhibition as mentioned before). These observations are in agreement with the known influence of RNAPII elongation rate on alternative splicing (68), suggesting that PTC-independent and PTC-dependent exon skipping events can be governed by some similar rules.

Until recently, consequences of NAS with regard to the production of truncated Ig chains have been overlooked. Interestingly, we have observed that exon skipping of V^{PTC} Igκ pre-mRNAs encodes V domain-less κ light chains (ΔV-κLCs) that can induce the death of PCs through endoplasmic reticulum (ER) stress-associated apoptosis (16). Revealing a new PC checkpoint referred to as Truncated Immunoglobulin Exclusion (TIE)-checkpoint, the production of ΔV-κLCs can dampen PC differentiation by eliminating cells expressing nonproductively-rearranged V^{PTC} Igκ alleles (Fig. 2). In addition, conditional expression of ΔV-κLC mRNAs in 'inducible-TIE' (iTIE) knock-in mice reproduced physiological TIE checkpoint and affected the survival of long-lived PCs and antibody production (16). Thus, the transcription of nonproductive Ig alleles is not as safe as previously assumed and the activation of NAS can drive the elimination of PC clones harbouring biallelic Igκ rearrangements. Remarkably, the TIE-checkpoint can reduce the magnitude of humoral responses and shape the antibody repertoire independently of classical constraints related to Ag specificity.

Closing remarks

Aberrantly rearranged Ig alleles are abundant in B-lineage cells. The cooperative action of nonsense-mediated splicing inhibition (or SOS) and NMD limits the amount of deleterious truncated Ig polypeptides. However, activation of the NAS pathway exerts opposite effects with exon skipping-mediated production of V domain-less Ig chains. In PCs with biallelic Igκ rearrangements, transcriptional boost of Ig genes can sustain massive Ig synthesis. However, it also promotes NAS activation and exon skipping during splicing of nonproductive transcripts. Because the survival of normal and malignant PCs is tightly controlled by ER stress and proteasome activity (69), high amounts of truncated Ig can provoke PC death as a consequence of a deregulated proteostasis. According to an efficient TIE-checkpoint, alternatively spliced mRNAs encoding structurally abnormal Ig chains are hardly detectable in non-malignant PCs, although they can be observed in some lymphoproliferative disorders, including Multiple Myeloma and Burkitt lymphoma (70-72). Previous findings have indicated that the activation of the TIE checkpoint can eliminate ~20-25% of PCs, *i.e.*, those expressing nonproductive V^{PTC} Igκ alleles (16). If a similar disappearance of PC harboring nonproductive VDJ rearrangements is observed for the IgH repertoire, it could indicate a broad TIE-checkpoint blunting the terminal differentiation of many PCs with biallelic IgH and/or IgL rearrangements. Altogether, this should have major consequences in our classical mindset usually considering

nonproductively V(D)J-rearranged Ig alleles as passengers rather than drivers.

ACKNOWLEDGEMENTS

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, CD23), and Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales (FFRMG). JML was funded by French government and Ligue Contre le Cancer fellowships. NS was funded by Région Limousin and Fondation ARC fellowships.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicting interests.

REFERENCES

1. Li S and Wilkinson MF (1998) Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* 8, 135-141
2. Aoufouchi S, Yélamos J and Milstein C (1996) Nonsense mutations inhibit RNA splicing in a cell-free system: recognition of mutant codon is independent of protein synthesis. *Cell* 85, 415-422
3. Bühler M and Mühlemann O (2005) Alternative splicing induced by nonsense mutations in the immunoglobulin mu VDJ exon is independent of truncation of the open reading frame. *RNA* 11, 139-146
4. Bühler M, Mohn F, Stalder L and Mühlemann O (2005) Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol Cell* 18, 307-317
5. Chemin G, Tinguely A, Sirac C et al (2010) Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J Immunol Baltim Md* 190 184, 5009-5017
6. Lozano F, Maertzdorf B, Pannell R and Milstein C (1994) Low cytoplasmic mRNA levels of immunoglobulin kappa light chain genes containing nonsense codons correlate with inefficient splicing. *EMBO J* 13, 4617-4622
7. Mendell JT, ap Rhys CM and Dietz HC (2002) Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* 298, 419-422
8. Sperling J and Sperling R (2008) Nuclear surveillance of RNA polymerase II transcripts. *RNA Biol* 5, 220-224
9. Tinguely A, Chemin G, Péron S et al (2012) Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol Cell Biol* 32, 107-117
10. Wachtel C, Li B, Sperling J and Sperling R (2004) Stop codon-mediated suppression of splicing is a novel nuclear scanning mechanism not affected by elements of protein synthesis and NMD. *RNA* 10, 1740-1750
11. Wang J, Hamilton JJ, Carter MS, Li S and Wilkinson MF (2002) Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. *Science* 297, 108-110

12. Wang J, Chang YF, Hamilton JI and Wilkinson MF (2002) Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 10, 951-957
13. Hwang J and Kim YK (2013) When a ribosome encounters a premature termination codon. *BMB Rep* 46, 9-16
14. Frischmeyer-Guerrero PA, Montgomery RA, Warren DS et al (2011) Perturbation of thymocyte development in nonsense-mediated decay (NMD)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10638-10643
15. Weischenfeldt J, Damgaard I, Bryder D et al (2008) NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes Dev* 22, 1381-1396
16. Srour N, Chemin G, Tinguely A et al (2016) A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J Exp Med* 213, 109-122
17. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R and Alt FW (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24, 541-570
18. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S and Papaioannou VE (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877
19. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP et al (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867
20. Alt FW and Baltimore D (1982) Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4118-4122
21. Roth DB, Chang XB and Wilson JH (1989) Comparison of filler DNA at immune, nonimmune, and oncogenic rearrangements suggests multiple mechanisms of formation. *Mol Cell Biol* 9, 3049-3057
22. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M et al (1984) Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxyltransferase in B cells. *Nature* 311, 752-755
23. Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C and Mathis D (1993) Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175-1178
24. Kallenbach S, Doyen N, Fanton d'Andon M and Rougeon F (1992) Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2799-2803
25. Komori T, Okada A, Stewart V and Alt FW (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261, 1171-1175
26. Lafaille JJ, DeCloux A, Bonneville M, Takagaki Y and Tonegawa S (1989) Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59, 859-870
27. Lewis SM (1994) P nucleotide insertions and the resolution of hairpin DNA structures in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1332-1336
28. McCormack WT, Tjoelker LW, Carlson LM et al (1989) Chicken IgL gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell* 56, 785-791
29. Outters P, Jaeger S, Zaarour N and Ferrier P (2015) Long-Range Control of V(D)J Recombination & Allelic Exclusion: Modeling Views. *Adv Immunol* 128, 363-413
30. ten Boekel E, Melchers F and Rolink A (1995) The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int Immunol* 7, 1013-1019
31. Ehlich A, Martin V, Müller W and Rajewsky K (1994) Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol CB* 4, 573-583
32. Mostoslavsky R, Alt FW and Rajewsky K (2004) The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 118, 539-544
33. Gutzeit C, Chen K and Cerutti A (2018) The enigmatic function of IgD: some answers at last. *Eur J Immunol* 48, 1101-1113
34. Honjo T, Nagaoka H, Shinkura R and Muramatsu M (2005) AID to overcome the limitations of genomic information. *Nat Immunol* 6, 655-661
35. Pilzecker B and Jacobs H (2019) Mutating for Good: DNA Damage Responses During Somatic Hypermutation. *Front Immunol* 10, 438
36. Goossens T, Klein U and Küppers R (1998) Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2463-2468
37. Yeap LS, Hwang JK, Du Z et al (2015) Sequence-Intrinsic Mechanisms that Target AID Mutational Outcomes on Antibody Genes. *Cell* 163, 1124-1137
38. Manser T, Tumas-Brundage KM, Casson LP et al (1998) The roles of antibody variable region hypermutation and selection in the development of the memory B-cell compartment. *Immunol Rev* 162, 183-196
39. Delpy L, Sirac C, Le Morvan C and Cogné M (2004) Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J Immunol Baltim Md* 173, 1842-1848
40. Allen CD, Okada T and Cyster JG (2007) Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190-202
41. Stewart I, Radtke D, Phillips B, McGowan SJ and Bannard O (2018) Germinal Center B Cells Replace Their Antigen Receptors in Dark Zones and Fail Light Zone Entry when Immunoglobulin Gene Mutations are Damaging. *Immunity* 49, 477-489.e7
42. Victora GD and Nussenzweig MC (2012) Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30, 429-457
43. Manis JP, Tian M and Alt FW (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 23, 31-39
44. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM and Corcoran LM (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15, 160-171
45. Todd DJ, McHeyzer-Williams LJ, Kowal C et al (2009) XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J Exp Med* 206, 2151-2159
46. Takagaki Y, Seipelt RL, Peterson ML and Manley JL (1996)

- The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation. *Cell* 87, 941-952
47. Stalder L and Mühlemann O (2007) Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin micro genes requires translation of its mRNA. *J Biol Chem* 282, 16079-16085
 48. Ashi MO, Srour N, Lambert JM et al (2018) Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell Mol Immunol* 16, 810-819
 49. Daly J, Licence S, Nanou A, Morgan G and Mårtensson IL (2007) Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J* 26, 4273-4282
 50. Delpy L, Sirac C, Magnoux E, Duchez S and Cogné M (2004) RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional kappa alleles and detects premature termination within the last kappa exon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7375-7380
 51. Holwerda SJ, van de Werken HJ, Ribeiro de Almeida C et al (2013) Allelic exclusion of the immunoglobulin heavy chain locus is independent of its nuclear localization in mature B cells. *Nucleic Acids Res* 41, 6905-6916
 52. Eberle AB, Herrmann K, Jäck HM and Mühlemann O (2009) Equal transcription rates of productively and nonproductively rearranged immunoglobulin mu heavy chain alleles in a pro-B cell line. *RNA* 15, 1021-1028
 53. Lejeune F (2017) Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep* 50, 175-185
 54. Lejeune F and Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17, 309-315
 55. Mühlemann O, Mock-Casagrande CS, Wang J et al (2001) Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol Cell* 8, 33-43
 56. Singh AK, Choudhury SR, De S et al (2019) The RNA helicase UPF1 associates with mRNAs co-transcriptionally and is required for the release of mRNAs from gene loci. *ELife* 8, pii: e41444
 57. Chang YF, Imam JS and Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76, 51-74
 58. Karousis ED and Mühlemann O (2019) Nonsense-Mediated mRNA Decay Begins Where Translation Ends. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, pii: a032862
 59. Baumann B, Potash MJ and Köhler G (1985) Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J* 4, 351-359
 60. Connor A, Wiersma E and Shulman MJ (1994) On the linkage between RNA processing and RNA translatability. *J Biol Chem* 269, 25178-25184
 61. Jäck HM, Berg J and Wabl M (1989) Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur J Immunol* 19, 843-847
 62. Gudikote JP, Imam JS, Garcia RF and Wilkinson MF (2005) RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat Struct Mol Biol* 12, 801-809
 63. Eberle AB, Stalder L, Mathys H, Orozco RZ and Mühlemann O (2008) Posttranscriptional Gene Regulation by Spatial Rearrangement of the 3' Untranslated Region. *PLoS Biol* 6, e92
 64. Kim YK and Maquat LE (2019) UPFront and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA N Y N* 25, 407-422
 65. Neu-Yilik G, Raimondeau E, Eliseev B et al (2017) Dual function of UPF3B in early and late translation termination. *EMBO J* 36, 2968-2986
 66. Maquat LE (2002) NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes Dev* 16, 1743-1753
 67. Valentine CR (1998) The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat Res* 411, 87-117
 68. Nogués G, Kadener S, Cramer P et al (2003) Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life* 55, 235-241
 69. Cenci S and Sitia R (2007) Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett* 581, 3652-3657
 70. Cogné M and Guglielmi P (1993) Exon skipping without splice site mutation accounting for abnormal immunoglobulin chains in nonsecretory human myeloma. *Eur J Immunol* 23, 1289-1293
 71. Cogné M, Bakhshi A, Korsmeyer SJ and Guglielmi P (1988) Gene mutations and alternate RNA splicing result in truncated Ig L chains in human gamma H chain disease. *J Immunol Baltim Md* 1950 141, 1738-1744
 72. Cogné M, Silvain C, Khamlichi AA and Preud'homme JL (1992) Structurally abnormal immunoglobulins in human immunoproliferative disorders. *Blood* 79, 2181-2195
 73. Bühler M, Paillusson A and Mühlemann O (2004) Efficient downregulation of immunoglobulin mu mRNA with premature translation-termination codons requires the 5'-half of the VDJ exon. *Nucleic Acids Res* 32, 3304-3315
 74. Inácio A, Silva AL, Pinto J et al (2004) Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem* 279, 32170-32180
 75. Peixeiro I, Inácio Â, Barbosa C, Silva AL, Liebhaber SA and Romão L (2012) Interaction of PABPC1 with the translation initiation complex is critical to the NMD resistance of AUG-proximal nonsense mutations. *Nucleic Acids Res* 40, 1160-1173

Annexe 3



Review

Mechanisms and Regulation of Nonsense-Mediated mRNA Decay and Nonsense-Associated Altered Splicing in Lymphocytes

Jean-Marie Lambert, Mohamad Omar Ashi , Nivine Srour [†], Laurent Delpy ^{*,‡}  and Jérôme Saulière [‡]

Unit CNRS 7276 - INSERM U1262—Limoges University, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France; jean-marie.lambert@unilim.fr (J.-M.L.); mohamad-omar.ashi@unilim.fr (M.O.A.); nivine.sroure@mail.mcgill.ca (N.S.); jerome.sauliere@unilim.fr (J.S.)

* Correspondence: laurent.delpy@unilim.fr; Tel.: +33-519-564-214; Fax: +33-555-435-897

[†] Present address: Segal Cancer Center, Lady Davis Institute for Medical Research and Departments of Oncology and Medicine, McGill University, Montréal, QC H3T 1E2, Canada.

[‡] These authors contributed equally to this work.

Received: 17 January 2020; Accepted: 13 February 2020; Published: 17 February 2020



Abstract: The presence of premature termination codons (PTCs) in transcripts is dangerous for the cell as they encode potentially deleterious truncated proteins that can act with dominant-negative or gain-of-function effects. To avoid the synthesis of these shortened polypeptides, several RNA surveillance systems can be activated to decrease the level of PTC-containing mRNAs. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) ensures an accelerated degradation of mRNAs harboring PTCs by using several key NMD factors such as up-frameshift (UPF) proteins. Another pathway called nonsense-associated altered splicing (NAS) upregulates transcripts that have skipped disturbing PTCs by alternative splicing. Thus, these RNA quality control processes eliminate abnormal PTC-containing mRNAs from the cells by using positive and negative responses. In this review, we describe the general mechanisms of NMD and NAS and their respective involvement in the decay of aberrant immunoglobulin and TCR transcripts in lymphocytes.

Keywords: Immunoglobulin (Ig); nonsense-mediated mRNA decay (NMD); nonsense-associated altered splicing (NAS); B lymphocytes; plasma cells

1. Mechanisms of Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)

The NMD pathway ensures accelerated degradation of premature termination codon (PTC)-containing mRNAs to avoid the synthesis of truncated proteins with potentially deleterious effects for cells [1–3]. PTCs can arise in a variety of ways. For example, the most obvious source is random nonsense and frameshift mutations introduced by errors during DNA replication, RNA transcription, or splicing [4]. Another source of PTCs is programmed DNA rearrangements that occur during lymphocyte development to generate the antigen receptor repertoire. In two thirds of cases, these rearrangements lead to the generation of frameshift mutations and consequent downstream PTCs, which in turn activate NMD [5] (Figure 1). NMD also regulates 5% to 15% of physiological mRNAs that harbor upstream open reading frames (uORF), introns downstream of normal translation termination codons, or mRNAs with selenocysteine codons [4,6–11]. It has been estimated that about 30% of inherited human diseases are due to the presence of PTCs or frameshifts that induce nonsense codons in mRNAs [12,13], and NMD is also involved in human cancers [14,15].

The central NMD factor in human cells is the up-frameshift protein 1 (UPF1), which is an RNA-dependent ATPase and ATP-dependent RNA helicase [16–19]. This protein unwinds RNA in

the 5' to 3' direction, probably to eliminate ribonucleoproteins (RNPs) from the targeted mRNAs and thereby favor their degradation by other NMD factors [20,21]. When a ribosome stalls on a PTC, UPF1 associates with the eukaryotic release factors 1 and 3 (eRF1 and eRF3) and with the suppressor with morphogenic effect on genitalia 1 (SMG1) kinase (a protein kinase related to phosphatidylinositol 3-kinases). This forms the SMG1–UPF1–eRF1–eRF3 (SURF) complex with SMG8 and SMG9, which inhibits the kinase activity of SMG1 [22–24]. UPF1 is activated by its SMG1-dependent phosphorylation upon the dissociation of SMG8 and SMG9 [25]. Recently, it was shown that DExH-box helicase 34 (DHX34) acts as a scaffold for SMG1 and UPF1, facilitating its phosphorylation during NMD and thus allowing the conversion of SURF to the decay-inducing complex (DECID) [26,27]. The exon junction complex (EJC) is a multiprotein complex composed of a core comprising the eukaryotic translation initiation factor 4A3 (eIF4A3), cancer susceptibility candidate 3 (CASC3 or MLN51 standing for metastatic lymph node 51), and the heterodimer composed of RNA-binding motif protein 8A (RBM8A or Y14) and mago nashi homolog (MAGOH or Barentsz in *Drosophila*) [28]. The EJC is loaded 20–24 nucleotides (nt) upstream of roughly 80% of exon–exon junctions [29–32]. During the pioneer (or first) round of translation, all EJCs are displaced from the CBC (cap-binding complex)-bound mRNAs by the ribosomes in absence of PTCs [33–36]. If a ribosome stalls on a PTC >50 nt upstream of the last exonic junction marked by an EJC, NMD is activated (mechanisms detailed below). Despite this pioneer round model, it has also been shown that eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E)-associated mRNAs (i.e., during active translation) can be subjected to NMD as efficiently as those associated with CBC [33,36].

The EJC core is a scaffold platform that loads additional NMD factors including UPF3 in the nucleus and UPF2 in the cytoplasm [37,38]. Two paralogs of UPF3 exist: UPF3A and UPF3B (also known as UPF3X). Recently, it was demonstrated that UPF3A and UPF3B control NMD by acting in an antagonistic manner [39]. Indeed, UPF3B is important for NMD, in contrast to UPF3A which acts as a NMD inhibitor by sequestering UPF2 [39]. UPF3B binding to the EJC results in a direct interaction between UPF2 and UPF1 that in turn activates its helicase activity to allow mRNA unwinding and protein remodeling [16]. It was previously shown in an *in vitro* translation termination system that free UPF3B is also capable of interacting with release factors to delay translation termination at the PTC by sterically blocking stop codon recognition [40,41]. UPF1 phosphorylation leads to the recruitment of three additional NMD factors, SMG5, SMG6, and SMG7 [42–45]. SMG6 protein, which contains an active PIN (PiIT N-terminal) domain, is recruited to the NMD complex, leading to the endonucleolytic cleavage of targeted mRNAs in vicinity of the PTC [46–48]. In contrast, SMG5 and SMG7, which do not possess active PIN domains [47], form a heterodimer on the NMD target that respectively recruits decapping enzymes (DCP2 and DCP1A) and deadenylases (CCR4-NOT) [49–51]. PNRC2 (proline-rich nuclear receptor coactivator 2) can also bind SMG5, the phosphorylated form of UPF1 and DCP1A [49,50,52,53]. This finally leads to removal of the 5' cap and 3' polyA tail to degrade NMD targets by exonucleases in a 5' to 3' direction by XRN1 and in a 3' to 5' direction by the exosome [54,55]. NMD is therefore a very important pathway for the regulation of mRNA levels in cells, but its molecular mechanisms and the components of the NMD machinery are yet not fully characterized. For example, five additional NMD factors (*ngp-1*, *npp-20*, *aex-6*, *pbs-2*, and *noah-2*) were recently identified by genome-wide RNAi screening in nematodes and their molecular functions in this mRNA surveillance process are under investigation [56]. Moreover, NMD can also act as an antiviral process by impeding viral infections and viruses can inflect NMD [57–64]. Indeed, it has been shown that UPF1, SMG5, and SMG7 (all these NMD factors are described in more detail below) restrict SFV (Semliki Forest Virus) replication in human cells [57]. Moreover, Tax protein from T-lymphotrophic virus type 1 inhibits NMD by interacting with UPF1 and INT6 (which is required for efficient NMD) [65,66].

The model described above is a general overview of the NMD pathway in mammalian cells, but several studies performed in yeast and invertebrates have revealed alternative NMD pathways. For example, in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, only the UPF factors and a DEAD-box helicase (called Fal1p), highly homologous to eIF4AIII, are present [67]. The prevailing model of

NMD in yeast is called the “faux 3’UTR”, where ribosomes stalled on the PTC fail to interact with the appropriate 3’UTR-bound proteins [68,69]. Indeed, PABPC1 (PolyA Binding Protein C1), a natural 3’UTR RNA-binding protein, can interact with eukaryotic release factor 3 (eRF3) to ensure efficient translation termination [22,23,68,70,71]. If this interaction is not possible (for example in the case of a long 3’UTR generated by the presence of a PTC), the surveillance complex is assembled leading to mRNA decay [68,72]. Moreover, in mammals, some examples of EJC-independent NMD have been reported for immunoglobulin (Ig) transcripts which acquire PTCs at high frequencies during B lymphocyte development [73,74] (Figure 1). In addition, NMD is mainly EJC-independent in invertebrates such as *Drosophila melanogaster* and the *Caenorhabditis elegans* nematode [75,76]. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, NMD is splicing-dependent but does not require the EJC [77]. Recently, it was also demonstrated that NMD is EJC-independent in the early branching eukaryote protozoan *Tetrahymena thermophila* ciliate [78]. Alternative NMD routes have also been described that can be driven by the EJC with differential EJC co-factor requirements. For example, reduced abundance of the EJC co-factor RNPS1 is correlated with low NMD efficiency [79,80]. Moreover, NMD is inhibited when a PTC is closed to the translation initiation AUG codon in the case of short ORFs (open reading frames) [81]. In conclusion, NMD is a complex cellular process involving different pathways to ensure the efficient degradation of mRNAs harboring PTCs and to regulate the levels of physiological transcripts essential for cellular homeostasis.

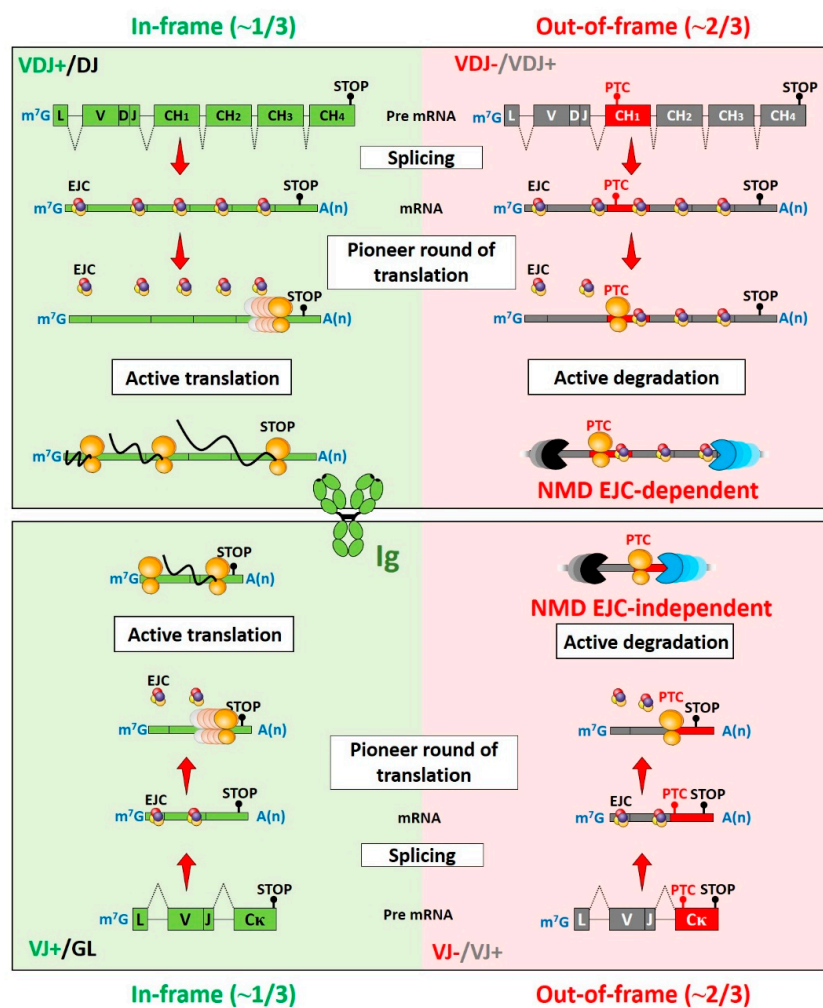


Figure 1. NMD pathways involved in the degradation of nonproductive Ig mRNAs. A multi-protein exon junction complex (EJC) is deposited 20–24 nucleotides upstream of each exon–exon junction during splicing of most transcripts. These EJCs remain associated with mRNAs until the first round

of translation. Complete EJC removal after ribosomal reading serves as a licensing step for active translation. In contrast, the presence of premature termination codons (PTCs) >50 nt upstream of the last exon–exon junction precludes the removal of downstream EJCs and triggers accelerated degradation of PTC-containing mRNAs. Imprecise V(D)J junctions can generate around 1/3 of productive (P) and 2/3 of nonproductive (NP) V(D)J-rearranged immunoglobulin (Ig) alleles [82,83]. NP Ig heavy chain (IgH) mRNAs represent good EJC-dependent NMD substrates because PTCs are located within the VDJ exon or in the first constant exon (CH1). A PTC position within the CH1 exon (red) is depicted for NP IgH transcripts (upper right). By contrast, the appearance of PTCs on NP IgL mRNAs does not respect the canonical position rule for EJC-dependent NMD. Indeed, PTCs that appear after an out-of-frame VJ junction are located either in the last constant exon (lower right), or near the last exon–exon junction (not depicted). The degradation of NP IgL mRNAs involves an EJC-independent NMD pathway that senses abnormally long distances between the PTC and the polyA tail. GL: germline; V(D)J+: productive V(D)J rearrangement; V(D)J–: nonproductive V(D)J rearrangement.

2. Fluctuations of NMD Efficiency during B-Cell Development

The error-prone V(D)J recombination process frequently generates PTCs in lymphocytes [5,84]. NMD has been extensively studied in T cells, in which very efficient degradation of PTC-containing TCR- β mRNAs has been documented [5,85–89]. Accordingly, perturbation of T-cell development has been observed in NMD-deficient mice [90,91].

In recent decades, several laboratories, including ours, have contributed to the understanding of how PTC-containing Ig mRNAs are degraded by NMD [5,73,92–97]. As exemplified for Ig heavy (IgH) and light (IgL) chain genes (Figure 1), the imprecise nature of V(D)J recombination generates ~1/3 of in-frame and ~2/3 of out-of-frame V(D)J junctions. Nonproductive V(D)J junctions can lead to the appearance of PTCs at the end of the variable (V) exon or in the downstream adjacent constant exon. For IgH mRNAs that contain several constant exons, the presence of PTC in the V or CH1 exon elicits EJC-dependent NMD. By contrast, PTC-containing IgL mRNAs do not conform to the –50 nt boundary rule and harbor PTCs close to or within the last constant exon. Therefore, many B-lineage cells express PTC-containing Ig mRNAs that can activate both EJC-dependent and -independent NMD modes [82].

To evaluate the downregulation of PTC-containing IgH mRNAs during B-cell development, we developed a mouse strain in which one IgH allele was rendered nonfunctional by inserting a “frameshift-inducing V exon” (frV) between JH and C μ [97]. After VDJ recombination, the inactivating extra-V exon is spliced between the VDJ and CH1 exons and induces frameshifts at both acceptor and donor splice sites. According to the number of nts inserted at the VDJ junction, PTCs appear either in the VDJ, the frV, or in the constant CH1 exon. Hence, the position of PTCs on “frV knock-in” IgH mRNAs elicits EJC-dependent NMD regardless of the nature of the VDJ junction. In heterozygous IgH^{frV/+} animals, the expression of productive VDJ-rearranged wild-type (wt) IgH alleles drives normal B-cell maturation, while NMD efficiency can be easily assessed by quantifying the amount of PTC-containing “frV knock-in” IgH mRNAs. After treatment with drugs classically used to inhibit NMD, such as cycloheximide (CHX) or Wortmannin (wort), we observed that the NMD efficiency fluctuated during B-cell development (Figure 2). In bone marrow B-lineage cells, including precursors and plasma cells, treatment with NMD inhibitors raised the level of PTC-containing IgH mRNAs ~5-fold, indicating that approximately 80% of nonproductive IgH transcripts were degraded by NMD. By contrast, the extent of downregulation dropped to ~50% in naïve mature B cells. Interestingly, NMD efficiency was greatly increased after B-cell activation, with almost complete NMD degradation (~95%) of PTC-containing IgH mRNAs. Moreover, a positive correlation between RNA splicing and NMD degradation of PTC+ IgH transcripts was observed [97]. This was in agreement with previous findings by Gudikote and colleagues indicating that the strength of splice sites on PTC-containing TCR- β transcripts determines the extent of NMD. Indeed, these authors showed that TCR- β transcripts have strong splice sites and are rich in exonic splicing enhancer (ESE) sequences, which recruits splicing-enhancing factors such as

serine/arginine-rich (SR) proteins. These motifs allow strong PTC-mediated downregulation, probably by EJC deposition modulation [88].

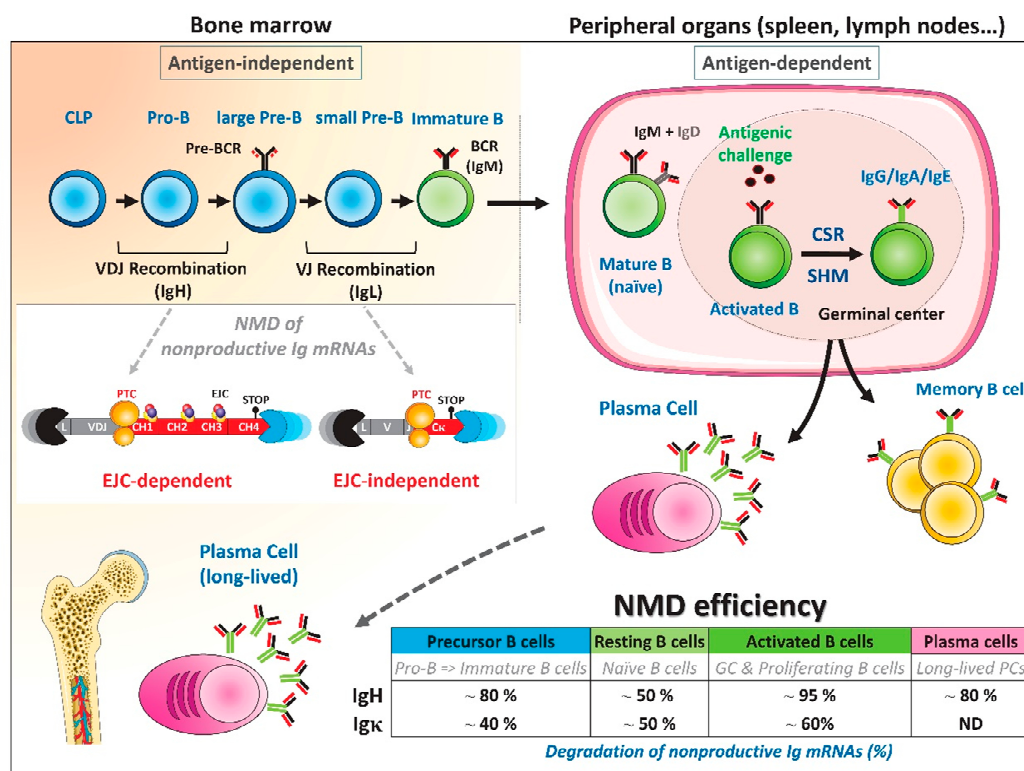


Figure 2. NMD assessment during B-cell development. Early B-cell development takes place in bone marrow through antigen-independent stages. B cell precursors undergo a first round of DNA rearrangements, between VH, DH, and JH segments located in the 5' region of the Ig heavy (IgH) chain locus. V(D)J recombination is initiated by DH to JH rearrangements at the pro-B stage and followed by VH to DJH recombination. At the large pre-B stage, a productive (P) VDJ rearrangement encodes membrane I μ chains that can associate with surrogate light chains to form the pre-B cell receptor (pre-BCR). Provided appropriate pre-BCR signaling, V to J rearrangements will be initiated at Ig light chain loci in small pre-B cells, leading to the expression of a functional BCR at the immature B cell stage. Once positively selected, mature B cells migrate to the periphery. Upon antigen stimulation, B cells proliferate in germinal centers (GCs) and further diversify their Ig repertoire through class switch recombination (CSR) and somatic hypermutations (SHM). Activated B cells can then differentiate into memory B cells or plasma cells (PCs). PCs will return to bone marrow niches in which they can survive for several years. Mouse models have been used to quantify the extent of degradation of nonproductive (NP) Ig mRNAs during B-cell development [94,97]. Fluctuations of NMD efficiency are depicted in the lower right table. A very active EJC-dependent NMD is elicited for NP IgH mRNAs, with almost complete disappearance of PTC-containing IgH mRNAs in activated B cells [97]. In contrast, the magnitude of EJC-independent NMD is far lower for NP IgL mRNAs, with only 60% of degradation in activated B cells [94]. ND: not determined.

IgL transcripts are good models to study the magnitude of EJC-independent NMD because nonproductive VJ junctions cause the appearance of PTCs that do not fulfill the -50 nt boundary rule [82,95]. The downregulation of PTC-containing IgL mRNAs has been assessed during B-cell development using a mouse model that freely accumulates random IgL rearrangements in B cells without any selection for a functional BCR [94]. The "LMP2A" strain has been described previously and harbors the replacement of JH segments by the Epstein–Barr virus LMP2A gene [98]. The signaling cascade induced by LMP2A protein mimics the B-cell receptor (BCR) tonic signal and induces B lymphocytes to differentiate in the absence of a normal BCR. Using this model, we found that

approximately 40% to 60% of PTC-containing Ig κ mRNAs were downregulated by a CHX sensitive NMD mode (Figure 2). Consistent with the degradation of PTC-containing IgH mRNAs, we also observed that B-cell activation promoted NMD of nonproductive Ig κ mRNAs, compared to resting B cells (Figure 2). It was noted that downregulation of nonproductive Ig κ mRNAs was lower than that observed for PTC-containing IgH mRNAs [94,97]. These physiological observations were in agreement with previous data from Mühlemann's laboratory, obtained using minigene constructs [73,93]. Indeed, Bühler and colleagues found that Ig mRNAs harboring a PTC downstream of the -50 nt boundary rule were less efficiently degraded than those with an upstream PTC [93]. Therefore, the presence of EJC can enhance NMD efficacy. These authors also demonstrated that EJC-independent NMD relied more on the 3'UTR length [73]. Accordingly, knock-down of the EJC core protein eIF4AIII did not affect NMD efficiency, but the distance between the termination codon (TC) and the polyA tail was an important feature for EJC-independent NMD [73]. Long 3'UTRs could impair the local interaction between ribosomes stalled to TC and polyA binding protein (PABP) within the mRNP.

In conclusion, B-cell activation is accompanied by strong degradation of nonproductively rearranged Ig mRNAs involving both EJC-dependent and -independent modes of NMD. The reinforcement of NMD controls the amount of truncated Ig, which could impede the efficacy of immune responses.

3. Nonsense-Associated Altered Splicing (NAS)

As another cellular RNA surveillance pathway limiting the amount of PTC-containing mRNAs, NAS can be activated in response to nonsense mutations [99–101]. This mechanism increases the level of alternatively spliced RNA isoforms that have skipped offending PTCs. Thus, NAS is considered a positive post-transcriptional way to eliminate the PTC-containing exons from a transcript. The molecular mechanisms leading to NAS activation are still poorly understood, even if several studies have attempted to provide insights into this process [102–104]. Knockdowns of several key NMD factors including UPF1, UPF2, UPF3a, UPF3b, and SMG1 showed that only UPF1 is necessary for the alternative splicing and decay of PTC-containing mRNAs [100,103,105]. This is the only common feature with NMD where UPF1 is the central effector of this pathway. The RNA helicase eIF4AIII, one the core proteins of the EJC, is not involved in NAS, suggesting that the EJC deposited on exon–exon junctions as a splicing “mark” is not necessary for NAS [103]. Altogether, these findings suggest that NAS and NMD might be mechanistically different, sharing only the key NMD factor UPF1. Because the translation of PTC-free alternatively spliced mRNAs can generate shortened polypeptides with potentially deleterious functions [106], NMD and NAS sometimes display opposite functions with regard to the production of truncated proteins.

Two classes of NAS have been characterized. First, class-I NAS depends on the disruption of *cis*-splicing elements like ESE by all types of nonsense, silent, or missense mutations [103,107,108]. ESE stimulates splicing by acting as a binding site for splicing factors like some SR proteins [109,110]. Consequently, mutations in ESE, as is the case with a PTC, can favor exon skipping of this PTC-containing exon. Second, class-II NAS is triggered by disruption of the reading frame in the transcript. NAS of T-cell receptor β (TCR- β) transcripts is a well-characterized example of such class-II NAS [103]. Indeed, a frame-dependent NAS has been reported by Wilkinson's laboratory in studies of mouse TCR- β minigenes in human cells [101,105]. However, studies done by Mühlemann's laboratory did not reveal any correlation between synthesis of the alternatively spliced mRNA and truncation of the coding region [104]. These conflicting reports have rendered the effects of NAS on PTC-containing exons controversial.

The NAS pathway is activated during splicing of nonproductively rearranged Ig κ transcripts and provokes V exon skipping (Figure 3) [94,106]. Out-of-frame V κ to J κ rearrangements result in nonsense codons affecting either the 3'-end of the V exon (V^{PTC}) or the last C κ exon (C^{PTC}) [95]. At the DNA level, V^{PTC} and C^{PTC} junctions are highly similar and often exhibit a single nt difference within the CDR3 sequences. To distinguish between class-I (ESE disruption) or class-II (disruption of reading frame) NAS for Ig κ transcripts, the levels of alternatively spliced κ light chain mRNAs lacking V exon (Δ V- κ LC) were

measured in B-lymphoid cell lines transfected with minigene constructs mimicking nonproductive $V\kappa J\kappa 5$ junctions from both the V^{PTC} and the C^{PTC} class. This analysis revealed high levels of $\Delta V\text{-}\kappa\text{LC}$ mRNAs in V^{PTC} -expressing cells, whereas such transcripts were extremely rare in C^{PTC} -expressing cells. These data strongly argue for a reading-frame-dependent class-II NAS that relies on PTC recognition within the skipped V exon, but not within the downstream $C\kappa$ exon. Accordingly, bioinformatic analyses performed using RESCUE-ESE Web Server did not reveal any differences in ESE sequence predictions [94]. Therefore, the NAS observed for $Ig\kappa$ transcripts most likely belongs to class-II NAS.

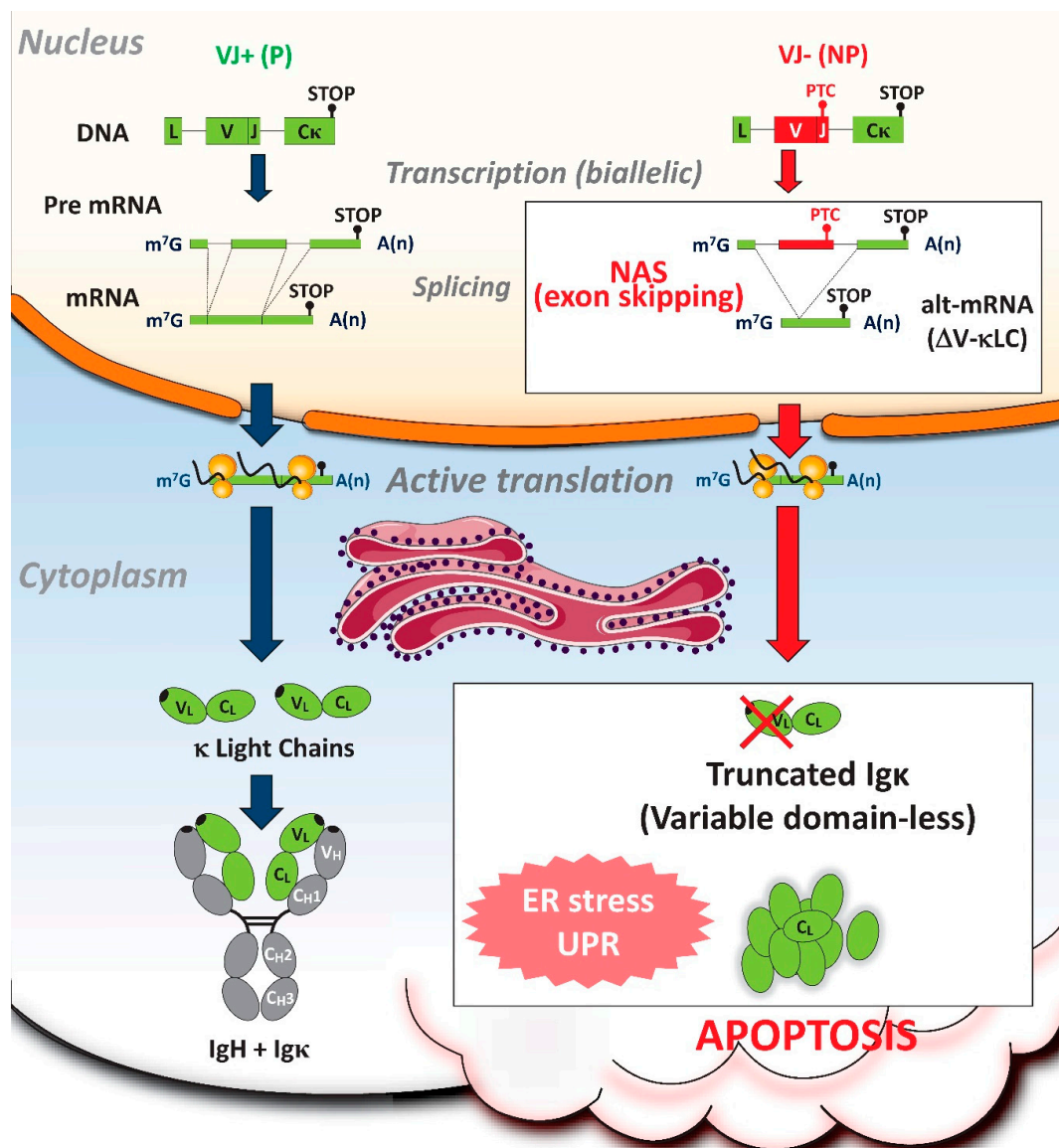


Figure 3. Consequences of NAS on $Ig\kappa$ transcripts in antibody-secreting plasma cells. Because most B-lineage cells harbor nonproductive (NP) Ig gene rearrangements [82,83], the boost of Ig gene transcription accompanying their plasma cell (PC) differentiation generates considerable amounts of nonsense Ig transcripts. In PCs with biallelic (VJ+/VJ-) $Ig\kappa$ rearrangements, the presence of premature termination codons (PTCs) activates NAS with skipping of the variable (V) exon. Remarkably, alternative V-less κ light chain ($\Delta V\text{-}\kappa\text{LC}$) mRNAs encode truncated Ig chains (lacking V-domain) which

induce PC apoptosis through exacerbated ER stress and unfolded protein response (UPR) [106]. By eliminating numerous PC clones with biallelic Ig κ rearrangements, in an antigen-independent mode, this novel truncated Ig exclusion (TIE) checkpoint reveals that NP Ig alleles can sometimes be drivers, rather than passengers. Altogether, the production of harmful truncated Ig provides evidence for deleterious NAS activation, confirming the assumption that this RNA surveillance process is highly risky and purposeless.

4. NAS of PTC-containing Ig RNAs during PC Differentiation

Our laboratory recently examined the magnitude of NAS during B-cell development and PC differentiation in vivo using the previously mentioned IgH^{trV κ /+} mice harboring an additional PTC-containing V exon on one IgH allele [111]. This model facilitates the quantification of NAS because Ig heavy chains can be produced after skipping of the PTC-containing extra-V exon. Interestingly, NAS of PTC-containing IgH RNAs was much more pronounced in PCs compared to B cells. The analysis of IgH transcription in different B and PC populations also revealed that the boost of Ig gene transcription accompanying PC differentiation correlated with high levels of NAS [111]. On one hand, alternative splicing is closely correlated to the rate of RNA polymerase II elongation and exon skipping is preferentially observed for highly transcribed genes [112,113]. On the other hand, Ig genes are localized in transcription factories that authorize cooperation with super-enhancers to increase Ig gene transcription in PCs [114]. Thus, the biallelic hyper-transcription of Ig genes in PCs strengthens NAS of nonproductively rearranged Ig RNAs [111].

While NMD ensures efficient degradation of nonproductive Ig mRNAs, activation of NAS can lead to the production of truncated Ig with V-domain deletions (Figure 3). A recent study by Srour and colleagues revealed the impact of truncated Ig chains produced after V exon skipping in PCs. Interestingly, the production of V-domain-less κ light chains induced endoplasmic reticulum (ER)-stress-associated apoptosis in antibody-secreting cells [106]. This novel “truncated-Ig exclusion” (TIE) checkpoint dampens PC differentiation by eliminating cells expressing nonproductive V^{PTC} Ig κ alleles (Figure 3). Therefore, a risky NAS with skipping of PTC-containing V exons can eliminate PCs harboring biallelic Ig gene rearrangements. Remarkably, this TIE checkpoint reduces the magnitude of humoral responses independently of the classical constraints related to antigen specificity.

5. Concluding Remarks

Development of Ig repertoire diversity is achieved by DNA recombination between V, D, and J segments and imprecision at the VDJ junctions. A collateral effect of this random process is the generation of out-of-frame rearrangements associated with PTCs that could produce aberrant truncated Ig proteins with potential deleterious effects. Therefore, mRNA quality control mechanisms are very important processes that diminish the amount of PTC-containing Ig mRNAs. NMD recognizes these abnormal mRNAs as targets and degrades them by several complex mechanisms including EJC-dependent and independent pathways. EJC is the splicing mark deposited by the spliceosome on exon–exon junctions. If an EJC is located downstream of a PTC, NMD is activated by a complex array of interactions between the ribosome, NMD-associated factors, and EJC components. Alternatively, EJC-independent NMD can cause the degradation of aberrant Ig mRNAs by the absence of a physiological mRNP context at the 3′ end of transcripts (i.e. long 3′UTRs). NAS is also involved in the targeting of mRNAs harboring PTCs by the exclusion of offending PTC-containing exons by alternative splicing. Even if to date some features have been characterized in the regulation of PTC-containing Ig mRNA levels, more experiments are still required to determine the molecular mechanisms responsible for NAS activation.

Exon skipping events eliminating the V exon can be induced by nonsense codons (NAS) or by using antisense oligonucleotides (ASO). Recent evidence has suggested that ASO-mediated Ig exon skipping can be easily achieved by targeting 5′ or 3′ splice sites on V exon pre-mRNAs [111]. Provided optimal drug delivery in bone marrow PC niches, the use of ASO to force the production

of toxic truncated Ig chains should represent an attractive therapeutic approach. As a personalized strategy, ASO-mediated V exon skipping should provoke selective killing of PC clones in patients with monoclonal gammopathies (e.g., multiple myeloma, AL-amyloidosis, etc.).

Author Contributions: Writing—original draft preparation, J.-M.L., L.D., J.S.; writing—review and editing, J.-M.L., M.O.A., N.S., L.D., J.S.; supervision, L.D.; project administration, L.D.; funding acquisition, L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Fondation ARC (PJA 20161204724), ANR (2017-CE15-0024-01), Ligue Contre le Cancer (CD87, CD19, CD23) and Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales (FFRMG). JML and MOA were funded by Ligue Contre le Cancer and Société Française d’Hématologie (SFH) fellowships, respectively.

Acknowledgments: We would like to acknowledge all the members of Michel Cogné’s laboratory for helpful discussions and comments and Jeanne Cook-Moreau for proofreading the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kurosaki, T.; Maquat, L.E. Nonsense-Mediated mRNA decay in humans at a glance. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 461–467. [[CrossRef](#)]
2. Chang, J.C.; Temple, G.F.; Trecartin, R.F.; Kan, Y.W. Suppression of the nonsense mutation in homozygous beta 0 thalassaemia. *Nature* **1979**, *281*, 602–603. [[CrossRef](#)]
3. Maquat, L.E.; Kinniburgh, A.J.; Rachmilewitz, E.A.; Ross, J. Unstable beta-Globin mRNA in mRNA-deficient beta 0 thalassemia. *Cell* **1981**, *27*, 543–553. [[CrossRef](#)]
4. Mendell, J.T.; Sharifi, N.A.; Meyers, J.L.; Martinez-Murillo, F.; Dietz, H.C. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 1073–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Li, S.; Wilkinson, M.F. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* **1998**, *8*, 135–141. [[CrossRef](#)]
6. Lykke-Andersen, S.; Jensen, T.H. Nonsense-Mediated mRNA decay: An intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 665–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nicholson, P.; Yepiskoposyan, H.; Metzke, S.; Zamudio Orozco, R.; Kleinschmidt, N.; Mühlemann, O. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: Mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2010**, *67*, 677–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Rebbapragada, I.; Lykke-Andersen, J. Execution of nonsense-Mediated mRNA decay: What defines a substrate? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 394–402. [[CrossRef](#)]
9. Rehwinkel, J.; Raes, J.; Izaurralde, E. Nonsense-Mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 639–646. [[CrossRef](#)]
10. Schweingruber, C.; Rufener, S.C.; Zünd, D.; Yamashita, A.; Mühlemann, O. Nonsense-Mediated mRNA decay-Mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1829*, 612–623. [[CrossRef](#)]
11. Seyedali, A.; Berry, M.J. Nonsense-Mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency. *RNA* **2014**, *20*, 1248–1256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Frischmeyer, P.A.; Dietz, H.C. Nonsense-Mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 1893–1900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Popp, M.W.; Maquat, L.E. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell* **2016**, *165*, 1319–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lindeboom, R.G.H.; Supek, F.; Lehner, B. The rules and impact of nonsense-Mediated mRNA decay in human cancers. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1112–1118. [[CrossRef](#)]
15. Popp, M.W.; Maquat, L.E. Nonsense-Mediated mRNA Decay and Cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2018**, *48*, 44–50. [[CrossRef](#)]
16. Chamieh, H.; Ballut, L.; Bonneau, F.; Le Hir, H. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 85–93. [[CrossRef](#)]
17. Fiorini, F.; Boudvillain, M.; Le Hir, H. Tight intramolecular regulation of the human Upf1 helicase by its N- and C-Terminal domains. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 2404–2415. [[CrossRef](#)]

18. Gupta, P.; Li, Y.-R. Upf proteins: Highly conserved factors involved in nonsense mRNA mediated decay. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 39–55. [[CrossRef](#)]
19. Shigeoka, T.; Kato, S.; Kawaichi, M.; Ishida, Y. Evidence that the Upf1-Related molecular motor scans the 3'-UTR to ensure mRNA integrity. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6887–6897. [[CrossRef](#)]
20. Fiorini, F.; Bagchi, D.; Le Hir, H.; Croquette, V. Human Upf1 is a highly processive RNA helicase and translocase with RNP remodelling activities. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7581. [[CrossRef](#)]
21. Franks, T.M.; Singh, G.; Lykke-Andersen, J. Upf1 ATPase-Dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-Mediated mRNA decay. *Cell* **2010**, *143*, 938–950. [[CrossRef](#)]
22. Ivanov, P.V.; Gehring, N.H.; Kunz, J.B.; Hentze, M.W.; Kulozik, A.E. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* **2008**, *27*, 736–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kashima, I.; Yamashita, A.; Izumi, N.; Kataoka, N.; Morishita, R.; Hoshino, S.; Ohno, M.; Dreyfuss, G.; Ohno, S. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 355–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yamashita, A.; Izumi, N.; Kashima, I.; Ohnishi, T.; Saari, B.; Katsuhata, Y.; Muramatsu, R.; Morita, T.; Iwamatsu, A.; Hachiya, T.; et al. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 1091–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Melero, R.; Uchiyama, A.; Castaño, R.; Kataoka, N.; Kurosawa, H.; Ohno, S.; Yamashita, A.; Llorca, O. Structures of SMG1-UPFs complexes: SMG1 contributes to regulate UPF2-dependent activation of UPF1 in NMD. *Structure* **2014**, *22*, 1105–1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hug, N.; Cáceres, J.F. The RNA helicase DHX34 activates NMD by promoting a transition from the surveillance to the decay-Inducing complex. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 1845–1856. [[CrossRef](#)]
27. Melero, R.; Hug, N.; López-Perrote, A.; Yamashita, A.; Cáceres, J.F.; Llorca, O. The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10585. [[CrossRef](#)]
28. Andersen, C.B.F.; Ballut, L.; Johansen, J.S.; Chamieh, H.; Nielsen, K.H.; Oliveira, C.L.P.; Pedersen, J.S.; Séraphin, B.; Le Hir, H.; Andersen, G.R. Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* **2006**, *313*, 1968–1972. [[CrossRef](#)]
29. Le Hir, H.; Moore, M.J.; Maquat, L.E. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: Evidence for stable association of proteins at exon-Exon junctions. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 1098–1108.
30. Le Hir, H.; Izaurralde, E.; Maquat, L.E.; Moore, M.J. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* **2000**, *19*, 6860–6869. [[CrossRef](#)]
31. Saulière, J.; Murigneux, V.; Wang, Z.; Marquet, E.; Barbosa, I.; Le Tonquèze, O.; Audic, Y.; Paillard, L.; Roest Crolius, H.; Le Hir, H. CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-Wide mapping of the human exon junction complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 1124–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Singh, G.; Kucukural, A.; Cenik, C.; Leszyk, J.D.; Shaffer, S.A.; Weng, Z.; Moore, M.J. The cellular EJC interactome reveals higher-Order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus. *Cell* **2012**, *151*, 750–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Durand, S.; Lykke-Andersen, J. Nonsense-Mediated mRNA decay occurs during eIF4F-Dependent translation in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 702–709. [[CrossRef](#)]
34. Ishigaki, Y.; Li, X.; Serin, G.; Maquat, L.E. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-Mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* **2001**, *106*, 607–617. [[CrossRef](#)]
35. Lejeune, F.; Ishigaki, Y.; Li, X.; Maquat, L.E. The exon junction complex is detected on CBP80-Bound but not eIF4E-Bound mRNA in mammalian cells: Dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* **2002**, *21*, 3536–3545. [[CrossRef](#)]
36. Rufener, S.C.; Mühlemann, O. eIF4E-Bound mRNPs are substrates for nonsense-Mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 710–717. [[CrossRef](#)]
37. Le Hir, H.; Gatfield, D.; Izaurralde, E.; Moore, M.J. The exon-Exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-Mediated mRNA decay. *EMBO J.* **2001**, *20*, 4987–4997. [[CrossRef](#)]

38. Le Hir, H.; Saulière, J.; Wang, Z. The exon junction complex as a node of post-Transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 41–54. [[CrossRef](#)]
39. Shum, E.Y.; Jones, S.H.; Shao, A.; Dumdie, J.; Krause, M.D.; Chan, W.-K.; Lou, C.-H.; Espinoza, J.L.; Song, H.-W.; Phan, M.H.; et al. The Antagonistic Gene Paralogs Upf3a and Upf3b Govern Nonsense-Mediated RNA Decay. *Cell* **2016**, *165*, 382–395. [[CrossRef](#)]
40. Mühlemann, O.; Karousis, E.D. New functions in translation termination uncovered for NMD factor UPF3B. *EMBO J.* **2017**, *36*, 2928–2930. [[CrossRef](#)]
41. Neu-Yilik, G.; Raimondeau, E.; Eliseev, B.; Yeramala, L.; Amthor, B.; Deniaud, A.; Huard, K.; Kerschgens, K.; Hentze, M.W.; Schaffitzel, C.; et al. Dual function of UPF3B in early and late translation termination. *EMBO J.* **2017**, *36*, 2968–2986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Chakrabarti, S.; Bonneau, F.; Schüssler, S.; Eppinger, E.; Conti, E. Phospho-Dependent and phospho-Independent interactions of the helicase UPF1 with the NMD factors SMG5-SMG7 and SMG6. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 9447–9460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Durand, S.; Franks, T.M.; Lykke-Andersen, J. Hyperphosphorylation amplifies UPF1 activity to resolve stalls in nonsense-Mediated mRNA decay. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ohnishi, T.; Yamashita, A.; Kashima, I.; Schell, T.; Anders, K.R.; Grimson, A.; Hachiya, T.; Hentze, M.W.; Anderson, P.; Ohno, S. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1187–1200. [[CrossRef](#)]
45. Okada-Katsuhata, Y.; Yamashita, A.; Kutsuzawa, K.; Izumi, N.; Hirahara, F.; Ohno, S. N- and C-Terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1251–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Eberle, A.B.; Lykke-Andersen, S.; Mühlemann, O.; Jensen, T.H. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 49–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Glavan, F.; Behm-Ansmant, I.; Izaurralde, E.; Conti, E. Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5117–5125. [[CrossRef](#)]
48. Huntzinger, E.; Kashima, I.; Fauser, M.; Saulière, J.; Izaurralde, E. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* **2008**, *14*, 2609–2617. [[CrossRef](#)]
49. Cho, H.; Kim, K.M.; Kim, Y.K. Human proline-Rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. *Mol. Cell* **2009**, *33*, 75–86. [[CrossRef](#)]
50. Cho, H.; Han, S.; Choe, J.; Park, S.G.; Choi, S.S.; Kim, Y.K. SMG5-PNRC2 is functionally dominant compared with SMG5-SMG7 in mammalian nonsense-Mediated mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 1319–1328. [[CrossRef](#)]
51. Loh, B.; Jonas, S.; Izaurralde, E. The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2125–2138. [[CrossRef](#)]
52. Lai, T.; Cho, H.; Liu, Z.; Bowler, M.W.; Piao, S.; Parker, R.; Kim, Y.K.; Song, H. Structural basis of the PNRC2-Mediated link between mrna surveillance and decapping. *Struct. Lond. Engl. 1993* **2012**, *20*, 2025–2037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nicholson, P.; Gkratsou, A.; Josi, C.; Colombo, M.; Mühlemann, O. Dissecting the functions of SMG5, SMG7, and PNRC2 in nonsense-mediated mRNA decay of human cells. *RNA* **2018**, *24*, 557–573. [[PubMed](#)]
54. Gatfield, D.; Izaurralde, E. Nonsense-Mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* **2004**, *429*, 575–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lejeune, F.; Li, X.; Maquat, L.E. Nonsense-Mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 675–687. [[CrossRef](#)]
56. Casadio, A.; Longman, D.; Hug, N.; Delavaine, L.; Vallejos Baier, R.; Alonso, C.R.; Cáceres, J.F. Identification and characterization of novel factors that act in the nonsense-Mediated mRNA decay pathway in nematodes, flies and mammals. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Balistreri, G.; Horvath, P.; Schweingruber, C.; Zünd, D.; McInerney, G.; Merits, A.; Mühlemann, O.; Azzalin, C.; Helenius, A. The host nonsense-Mediated mRNA decay pathway restricts Mammalian RNA virus replication. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 403–411. [[CrossRef](#)]
58. Balistreri, G.; Bognanni, C.; Mühlemann, O. Virus Escape and Manipulation of Cellular Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Viruses* **2017**, *9*, 24. [[CrossRef](#)]

59. Garcia, D.; Garcia, S.; Voinnet, O. Nonsense-Mediated decay serves as a general viral restriction mechanism in plants. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 391–402. [[CrossRef](#)]
60. Lykke-Andersen, J.; Bennett, E.J. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 467–476. [[CrossRef](#)]
61. Mocquet, V.; Durand, S.; Jalinot, P. How Retroviruses Escape the Nonsense-Mediated mRNA Decay. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2015**, *31*, 948–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Moon, S.L.; Wilusz, J. Cytoplasmic viruses: Rage against the (cellular RNA decay) machine. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Nasif, S.; Contu, L.; Mühlemann, O. Beyond quality control: The role of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in regulating gene expression. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *75*, 78–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Rigby, R.E.; Rehwinkel, J. RNA degradation in antiviral immunity and autoimmunity. *Trends Immunol.* **2015**, *36*, 179–188. [[CrossRef](#)]
65. Fiorini, F.; Robin, J.-P.; Kanaan, J.; Borowiak, M.; Croquette, V.; Le Hir, H.; Jalinot, P.; Mocquet, V. HTLV-1 Tax plugs and freezes UPF1 helicase leading to nonsense-Mediated mRNA decay inhibition. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Mocquet, V.; Neusiedler, J.; Rende, F.; Cluet, D.; Robin, J.-P.; Terme, J.-M.; Duc Dodon, M.; Wittmann, J.; Morris, C.; Le Hir, H.; et al. The human T-Lymphotropic virus type 1 tax protein inhibits nonsense-mediated mRNA decay by interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *J. Virol.* **2012**, *86*, 7530–7543. [[CrossRef](#)]
67. Alexandrov, A.; Colognori, D.; Steitz, J.A. Human eIF4AIII interacts with an eIF4G-like partner, NOM1, revealing an evolutionarily conserved function outside the exon junction complex. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1078–1090. [[CrossRef](#)]
68. Amrani, N.; Ganesan, R.; Kervestin, S.; Mangus, D.A.; Ghosh, S.; Jacobson, A. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-Mediated mRNA decay. *Nature* **2004**, *432*, 112–118. [[CrossRef](#)]
69. Kervestin, S.; Jacobson, A. NMD: A multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 700–712. [[CrossRef](#)]
70. Czaplinski, K.; Ruiz-Echevarria, M.J.; Paushkin, S.V.; Han, X.; Weng, Y.; Perlick, H.A.; Dietz, H.C.; Ter-Avanesyan, M.D.; Peltz, S.W. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1665–1677. [[CrossRef](#)]
71. Ivanov, A.; Mikhailova, T.; Eliseev, B.; Yeramala, L.; Sokolova, E.; Susorov, D.; Shuvalov, A.; Schaffitzel, C.; Alkalaeva, E. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7766–7776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Amrani, N.; Dong, S.; He, F.; Ganesan, R.; Ghosh, S.; Kervestin, S.; Li, C.; Mangus, D.A.; Spatrick, P.; Jacobson, A. Aberrant termination triggers nonsense-Mediated mRNA decay. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 39–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Bühler, M.; Steiner, S.; Mohn, F.; Paillusson, A.; Mühlemann, O. EJC-Independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 462–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Metze, S.; Herzog, V.A.; Ruepp, M.-D.; Mühlemann, O. Comparison of EJC-Enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways. *RNA* **2013**, *19*, 1432–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Gatfield, D.; Unterholzner, L.; Ciccarelli, F.D.; Bork, P.; Izaurralde, E. Nonsense-Mediated mRNA decay in Drosophila: At the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J.* **2003**, *22*, 3960–3970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hwang, J.; Maquat, L.E. Nonsense-Mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: To die or not to die, that is the question. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2011**, *21*, 422–430. [[CrossRef](#)]
77. Wen, J.; Brogna, S. Splicing-Dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **2010**, *29*, 1537–1551. [[CrossRef](#)]
78. Tian, M.; Yang, W.; Zhang, J.; Dang, H.; Lu, X.; Fu, C.; Miao, W. Nonsense-Mediated mRNA decay in Tetrahymena is EJC independent and requires a protozoa-specific nuclease. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 6848–6863. [[CrossRef](#)]
79. Gehring, N.H.; Kunz, J.B.; Neu-Yilik, G.; Breit, S.; Viegas, M.H.; Hentze, M.W.; Kulozik, A.E. Exon-Junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol. Cell* **2005**, *20*, 65–75. [[CrossRef](#)]

80. Viegas, M.H.; Gehring, N.H.; Breit, S.; Hentze, M.W.; Kulozik, A.E. The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4542–4551. [[CrossRef](#)]
81. Peixeiro, I.; Inácio, Â.; Barbosa, C.; Silva, A.L.; Liebhaber, S.A.; Romão, L. Interaction of PABPC1 with the translation initiation complex is critical to the NMD resistance of AUG-proximal nonsense mutations. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1160–1173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Lambert, J.-M.; Srour, N.; Delpy, L. The Yin and Yang of RNA surveillance in B lymphocytes and antibody-Secreting plasma cells. *BMB Rep.* **2019**. [[CrossRef](#)]
83. Mostoslavsky, R.; Alt, F.W.; Rajewsky, K. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* **2004**, *118*, 539–544. [[CrossRef](#)]
84. Jung, D.; Giallourakis, C.; Mostoslavsky, R.; Alt, F.W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 541–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Belgrader, P.; Cheng, J.; Zhou, X.; Stephenson, L.S.; Maquat, L.E. Mammalian nonsense codons can be cis effectors of nuclear mRNA half-Life. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 8219–8228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Carter, M.S.; Duskow, J.; Morris, P.; Li, S.; Nhim, R.P.; Sandstedt, S.; Wilkinson, M.F. A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-Cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28995–29003. [[CrossRef](#)]
87. Gudikote, J.P.; Wilkinson, M.F. T-Cell receptor sequences that elicit strong down-Regulation of premature termination codon-Bearing transcripts. *EMBO J.* **2002**, *21*, 125–134. [[CrossRef](#)]
88. Gudikote, J.P.; Imam, J.S.; Garcia, R.F.; Wilkinson, M.F. RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 801–809. [[CrossRef](#)]
89. Wang, J.; Gudikote, J.P.; Olivas, O.R.; Wilkinson, M.F. Boundary-Independent polar nonsense-Mediated decay. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 274–279. [[CrossRef](#)]
90. Frischmeyer-Guerrero, P.A.; Montgomery, R.A.; Warren, D.S.; Cooke, S.K.; Lutz, J.; Sonnenday, C.J.; Guerrero, A.L.; Dietz, H.C. Perturbation of thymocyte development in nonsense-mediated decay (NMD)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10638–10643. [[CrossRef](#)]
91. Weischenfeldt, J.; Damgaard, I.; Bryder, D.; Theilgaard-Mönch, K.; Thoren, L.A.; Nielsen, F.C.; Jacobsen, S.E.; Nerlov, C.; Porse, B. NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1381–1396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Baumann, B.; Potash, M.J.; Köhler, G. Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J.* **1985**, *4*, 351–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Bühler, M.; Paillusson, A.; Mühlemann, O. Efficient downregulation of immunoglobulin mu mRNA with premature translation-Termination codons requires the 5'-half of the VDJ exon. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3304–3315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Chemin, G.; Tinguely, A.; Sirac, C.; Lechouane, F.; Duchez, S.; Cogné, M.; Delpy, L. Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 5009–5017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Delpy, L.; Sirac, C.; Magnoux, E.; Duchez, S.; Cogné, M. RNA surveillance down-Regulates expression of nonfunctional kappa alleles and detects premature termination within the last kappa exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7375–7380. [[CrossRef](#)]
96. Jäck, H.M.; Berg, J.; Wabl, M. Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 843–847. [[CrossRef](#)]
97. Tinguely, A.; Chemin, G.; Péron, S.; Sirac, C.; Reynaud, S.; Cogné, M.; Delpy, L. Cross talk between immunoglobulin heavy-Chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 107–117. [[CrossRef](#)]
98. Casola, S.; Otipoby, K.L.; Alimzhanov, M.; Humme, S.; Uyttersprot, N.; Kutok, J.L.; Carroll, M.C.; Rajewsky, K. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 317–327. [[CrossRef](#)]
99. Hentze, M.W.; Kulozik, A.E. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **1999**, *96*, 307–310. [[CrossRef](#)]
100. Mendell, J.T.; ap Rhys, C.M.J.; Dietz, H.C. Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* **2002**, *298*, 419–422. [[CrossRef](#)]
101. Wang, J.; Hamilton, J.I.; Carter, M.S.; Li, S.; Wilkinson, M.F. Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. *Science* **2002**, *297*, 108–110. [[CrossRef](#)]

102. Bühler, M.; Mohn, F.; Stalder, L.; Mühlemann, O. Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 307–317. [[CrossRef](#)]
103. 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.* **2007**, *282*, 29738–29747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Mohn, F.; Bühler, M.; Mühlemann, O. Nonsense-Associated alternative splicing of T-Cell receptor beta genes: No evidence for frame dependence. *RNA* **2005**, *11*, 147–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Wang, J.; Chang, Y.F.; Hamilton, J.I.; Wilkinson, M.F. Nonsense-Associated altered splicing: A frame-Dependent response distinct from nonsense-Mediated decay. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 951–957. [[CrossRef](#)]
106. Srouf, N.; Chemin, G.; Tinguely, A.; Ashi, M.O.; Oruc, Z.; Péron, S.; Sirac, C.; Cogné, M.; Delpy, L. A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 109–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. 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.* **2002**, *16*, 1743–1753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Valentine, C.R. The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* **1998**, *411*, 87–117. [[CrossRef](#)]
109. Cartegni, L.; Krainer, A.R. Disruption of an SF2/ASF-Dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 377–384. [[CrossRef](#)]
110. Cartegni, L.; Chew, S.L.; Krainer, A.R. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 285–298. [[CrossRef](#)]
111. Ashi, M.O.; Srouf, N.; Lambert, J.-M.; Marchalot, A.; Martin, O.; Le Noir, S.; Pinaud, E.; Ayala, M.V.; Sirac, C.; Saulière, J.; et al. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell. Mol. Immunol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Nogués, G.; Kadener, S.; Cramer, P.; de la Mata, M.; Fededa, J.P.; Blaustein, M.; Srebrow, A.; Kornblihtt, A.R. Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: Faster is not always better. *IUBMB Life* **2003**, *55*, 235–241. [[PubMed](#)]
113. Shukla, S.; Oberdoerffer, S. Co-Transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1819*, 673–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. 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.* **2014**, *28*, 1159–1164. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Références bibliographiques

- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., Dynlacht, B.D., 2007. XBP1 Controls Diverse Cell Type- and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks. *Mol. Cell* 27, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011>
- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K., 2008. ATF6 Is a Transcription Factor Specializing in the Regulation of Quality Control Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *Cell Struct. Funct.* 33, 75–89. <https://doi.org/10.1247/csf.07044>
- Adams, J., 2001. Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. *Semin. Oncol.* 28, 613–619. [https://doi.org/10.1016/s0093-7754\(01\)90034-x](https://doi.org/10.1016/s0093-7754(01)90034-x)
- Agarraberes, F.A., Dice, J.F., 2001. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J. Cell Sci.* 114, 2491–2499.
- Aida, M., Honjo, T., 2013. FACT and H3.3: new markers for the somatic hypermutation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 2923–2924. <https://doi.org/10.4161/cc.26178>
- Aken, B.L., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Bernsdorff, F., Bhai, J., Billis, K., Carvalho-Silva, D., Cummins, C., Clapham, P., Gil, L., Girón, C.G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S.E., Janacek, S.H., Juettemann, T., Keenan, S., Laird, M.R., Lavidas, I., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Murphy, D.N., Nag, R., Newman, V., Nuhn, M., Ong, C.K., Parker, A., Patricio, M., Riat, H.S., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Wilder, S.P., Zadissa, A., Kostadima, M., Martin, F.J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D.M., Trevanion, S.J., Cunningham, F., Yates, A., Zerbino, D.R., Flicek, P., 2017. Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res.* 45, D635–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1104>
- Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W., 2004. Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 2189–2199. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4001-7>
- Alamyar, E., Duroux, P., Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., 2012. IMGT(®) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 882, 569–604. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_32
- Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., Hardy, R.R., 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 6834–6840. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6834>
- Alt, F., Rosenberg, N., Lewis, S., Thomas, E., Baltimore, D., 1981. Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MULV-transformed cells: rearrangement of heavy but not light chain genes. *Cell* 27, 381–390. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90421-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90421-9)

- Alt, F.W., Baltimore, D., 1982. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 4118–4122. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.13.4118>
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., Baltimore, D., 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3, 1209–1219.
- Anderson, S.M., Tomayko, M.M., Ahuja, A., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., 2007. New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J. Exp. Med.* 204, 2103–2114. <https://doi.org/10.1084/jem.20062571>
- Anken, E. van, Orsi, A., Sitia, R., 2014. A RIDDle solved: Why an intact IRE1 α /XBP-1 signaling relay is key for humoral immune responses. *Eur. J. Immunol.* 44, 641–645. <https://doi.org/10.1002/eji.201444461>
- Aoki-Ota, M., Torkamani, A., Ota, T., Schork, N., Nemazee, D., 2012. Skewed Primary Igk Repertoire and V–J Joining in C57BL/6 Mice: Implications for Recombination Accessibility and Receptor Editing. *J. Immunol.* 188, 2305–2315. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103484>
- Aouinti, S., Malouche, D., Giudicelli, V., Kossida, S., Lefranc, M.-P., 2015. IMGT/HighV-QUEST Statistical Significance of IMGT Clonotype (AA) Diversity per Gene for Standardized Comparisons of Next Generation Sequencing Immunoprofiles of Immunoglobulins and T Cell Receptors. *PLOS ONE* 10, e0142353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142353>
- Arbogast, F., Arnold, J., Hammann, P., Kuhn, L., Chicher, J., Murera, D., Weishaar, J., Muller, S., Fauny, J.-D., Gros, F., 2018. ATG5 is required for B cell polarization and presentation of particulate antigens. *Autophagy* 15, 280–294. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1516327>
- Arendt, C.S., Hochstrasser, M., 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7156–7161. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7156>
- Arnold, J., Murera, D., Arbogast, F., Fauny, J.-D., Muller, S., Gros, F., 2016. Autophagy is dispensable for B-cell development but essential for humoral autoimmune responses. *Cell Death Differ.* 23, 853–864. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.149>
- Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., Welch, W.J., 1988. Identity of the 19S “prosome” particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 331, 192–194. <https://doi.org/10.1038/331192a0>
- Ashi, M.O., Srour, N., Lambert, J.-M., Marchalot, A., Martin, O., Le Noir, S., Pinaud, E., Ayala, M.V., Sirac, C., Saulière, J., Moreaux, J., Cogné, M., Delpy, L., 2019. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell. Mol. Immunol.* 16, 810–819. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0160-6>
- Ashton-Beaucage, D., Udell, C.M., Lavoie, H., Baril, C., Lefrançois, M., Chagnon, P., Gendron, P., Caron-Lizotte, O., Bonneil, E., Thibault, P., Therrien, M., 2010. The exon junction complex controls the splicing of MAPK and other long intron-containing transcripts in *Drosophila*. *Cell* 143, 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.014>

Auner, H.W., Cenci, S., 2015. Recent advances and future directions in targeting the secretory apparatus in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 168, 14–25. <https://doi.org/10.1111/bjh.13172>

Aupy, P., Echevarría, L., Relizani, K., Zarrouki, F., Haeberli, A., KomisarSKI, M., Tensorer, T., Jouvion, G., Svinartchouk, F., Garcia, L., Goyenvallé, A., 2020. Identifying and Avoiding tcDNA-ASO Sequence-Specific Toxicity for the Development of DMD Exon 51 Skipping Therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 19, 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.020>

Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., Marit, G., Michaux, L., Voillat, L., Renaud, M., Grosbois, B., GuillerM, G., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., Caillot, D., Stoppa, A.-M., Sotto, J.-J., Wetterwald, M., Dumontet, C., Fuzibet, J.-G., Azais, I., Dorvaux, V., Zandecki, M., Bataille, R., Minvielle, S., Harousseau, J.-L., Facon, T., Mathiot, C., 2007. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 109, 3489–3495. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040410>

Aznarez, I., Nomakuchi, T.T., Tetenbaum-Novatt, J., Rahman, M.A., Fregoso, O., Rees, H., Krainer, A.R., 2018. Mechanism of Nonsense-Mediated mRNA Decay Stimulation by Splicing Factor SRSF1. *Cell Rep.* 23, 2186–2198. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.039>

Bachar-Wikstrom, E., Wikstrom, J.D., Kaiser, N., Cerasi, E., Leibowitz, G., 2013. Improvement of ER stress-induced diabetes by stimulating autophagy. *Autophagy* 9, 626–628. <https://doi.org/10.4161/auto.23642>

Bahjat, M., Guikema, J.E.J., 2017. The Complex Interplay between DNA Injury and Repair in Enzymatically Induced Mutagenesis and DNA Damage in B Lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091876>

Baird, T.D., Cheng, K.C.-C., Chen, Y.-C., Buehler, E., Martin, S.E., Inglese, J., Hogg, J.R., 2018. ICE1 promotes the link between splicing and nonsense-mediated mRNA decay. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.33178>

Baird, T.D., Palam, L.R., Fusakio, M.E., Willy, J.A., Davis, C.M., McClintick, J.N., Anthony, T.G., Wek, R.C., 2014. Selective mRNA translation during eIF2 phosphorylation induces expression of IBTK α . *Mol. Biol. Cell* 25, 1686–1697. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0704>

Baldwin, A.S., 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J. Clin. Invest.* 107, 241–246. <https://doi.org/10.1172/JCI11991>

Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., Le Hir, H., 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 861–869. <https://doi.org/10.1038/nsmb990>

Bao, Y., Pu, Y., Yu, X., Gregory, B.D., Srivastava, R., Howell, S.H., Bassham, D.C., 2018. IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy* 14, 1562–1573. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1462426>

Bartys, N., Kierzek, R., Lisowiec-Wachnicka, J., 2019. The regulation properties of RNA secondary structure in alternative splicing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*,

RNA structure and splicing regulation 1862, 194401.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.07.002>

Bassermann, F., Eichner, R., Pagano, M., 2014. The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.028>

Basso, K., Dalla-Favera, R., 2015. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 172–184. <https://doi.org/10.1038/nri3814>

Batsché, E., Yaniv, M., Muchardt, C., 2006. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 22–29. <https://doi.org/10.1038/nsmb1030>

Baumann, B., Potash, M.J., Köhler, G., 1985. Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO J.* 4, 351–359.

Baumgarth, N., 2016. B-1 Cell Heterogeneity and the Regulation of Natural and Antigen-Induced IgM Production. *Front. Immunol.* 7, 324. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00324>

Baumgarth, N., 2013. Innate-like B cells and their rules of engagement. *Adv. Exp. Med. Biol.* 785, 57–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6217-0_7

B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., Bruhat, A., 2013. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>

Bender, S., Ayala, M.V., Javaugue, V., Bonaud, A., Cogné, M., Touchard, G., Jaccard, A., Bridoux, F., Sirac, C., 2018. Comprehensive molecular characterization of a heavy chain deposition disease case. *Haematologica* 103, e557–e560. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.196113>

Bender, S., Javaugue, V., Saintamand, A., Ayala, M.V., Alizadeh, M., Filloux, M., Pascal, V., Gachard, N., Lavergne, D., Auroy, F., Cogne, M., Bridoux, F., Sirac, C., Jaccard, A., 2019. Full-length immunoglobulin high-throughput sequencing reveals specific novel mutational patterns in POEMS syndrome. *bioRxiv* 824722. <https://doi.org/10.1101/824722>

Benhamron, S., Hadar, R., Iwawaky, T., So, J.-S., Lee, A.-H., Tirosh, B., 2014. Regulated IRE1-dependent decay participates in curtailing immunoglobulin secretion from plasma cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 867–876. <https://doi.org/10.1002/eji.201343953>

Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., Vialet, B., Grinstaff, M.W., Barthélémy, P., 2019. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjug. Chem.* 30, 366–383. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00761>

Ben-Neriah, Y., 2002. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* 3, 20–26. <https://doi.org/10.1038/ni0102-20>

Berchiche, Y.A., Sakmar, T.P., 2016. CXC Chemokine Receptor 3 Alternative Splice Variants Selectively Activate Different Signaling Pathways. *Mol. Pharmacol.* 90, 483–495. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105502>

- Bergsma, A.J., van der Wal, E., Broeders, M., van der Ploeg, A.T., Pim Pijnappel, W.W.M., 2018. Alternative Splicing in Genetic Diseases: Improved Diagnosis and Novel Treatment Options. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 335, 85–141. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.008>
- Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P., 2006. Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. *PLOS Biol.* 4, e423. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040423>
- Bernasconi, R., Molinari, M., 2011. ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell regulation* 23, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.10.002>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Bestas, B., Moreno, P.M.D., Blomberg, K.E.M., Mohammad, D.K., Saleh, A.F., Sutlu, T., Nordin, J.Z., Guterstam, P., Gustafsson, M.O., Kharazi, S., Piątosza, B., Roberts, T.C., Behlke, M.A., Wood, M.J.A., Gait, M.J., Lundin, K.E., El Andaloussi, S., Månsson, R., Berglöf, A., Wengel, J., Smith, C.I.E., 2014. Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J. Clin. Invest.* 124, 4067–4081. <https://doi.org/10.1172/JCI76175>
- Bischof, J., Ibrahim, S.M., 2016. bcRep: R Package for Comprehensive Analysis of B Cell Receptor Repertoire Data. *PLOS ONE* 11, e0161569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161569>
- Boehm, V., Gehring, N.H., 2016. Exon Junction Complexes: Supervising the Gene Expression Assembly Line. *Trends Genet.* 32, 724–735. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.003>
- Boehm, V., Haberman, N., Ottens, F., Ule, J., Gehring, N.H., 2014. 3' UTR Length and Messenger Ribonucleoprotein Composition Determine Endocleavage Efficiencies at Termination Codons. *Cell Rep.* 9, 555–568. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.012>
- Boice, M., Salloum, D., Mourcin, F., Sanghvi, V., Amin, R., Oricchio, E., Jiang, M., Mottok, A., Denis-Lagache, N., Ciriello, G., Tam, W., Teruya-Feldstein, J., de Stanchina, E., Chan, W.C., Malek, S.N., Ennishi, D., Brentjens, R.J., Gascoyne, R.D., Cogne, M., Tarte, K., Wendel, H.-G., 2016. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell* 167, 405–418.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.032>
- Bonaud, A., Bender, S., Touchard, G., Lacombe, C., Srour, N., Delpy, L., Oblet, C., Druilhe, A., Quellard, N., Javaugue, V., Cogné, M., Bridoux, F., Sirac, C., 2015. A mouse model recapitulating human monoclonal heavy chain deposition disease evidences the relevance of proteasome inhibitor therapy. *Blood* 126, 757–765. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-630277>
- Bono, F., Ebert, J., Lorentzen, E., Conti, E., 2006. The Crystal Structure of the Exon Junction Complex Reveals How It Maintains a Stable Grip on mRNA. *Cell* 126, 713–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.006>
- Bonora, G.M., 2002. Polymer-Conjugated Bioactive Oligonucleotides. *J. Bioact. Compat. Polym.* 17, 375–389. <https://doi.org/10.1177/0883911502017005555>

- Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P., Alt, F.W., 1994. S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J.* 13, 665–674.
- Buchner, D.A., Trudeau, M., Meisler, M.H., 2003. SCNM1, a putative RNA splicing factor that modifies disease severity in mice. *Science* 301, 967–969. <https://doi.org/10.1126/science.1086187>
- Buchwald, G., Ebert, J., Basquin, C., Sauliere, J., Jayachandran, U., Bono, F., Hir, H.L., Conti, E., 2010. Insights into the recruitment of the NMD machinery from the crystal structure of a core EJC-UPF3b complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 10050–10055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000993107>
- Bühler, M., Mohn, F., Stalder, L., Mühlemann, O., 2005. Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol. Cell* 18, 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.030>
- Bühler, M., Mühlemann, O., 2005. Alternative splicing induced by nonsense mutations in the immunoglobulin μ VDJ exon is independent of truncation of the open reading frame. *RNA* 11, 139–146. <https://doi.org/10.1261/rna.7183805>
- Bühler, M., Paillusson, A., Mühlemann, O., 2004. Efficient downregulation of immunoglobulin μ mRNA with premature translation-termination codons requires the 5'-half of the VDJ exon. *Nucleic Acids Res.* 32, 3304–3315. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh651>
- Bühler, M., Steiner, S., Mohn, F., Paillusson, A., Mühlemann, O., 2006. EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin- μ mRNA depends on 3' UTR length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 462–464. <https://doi.org/10.1038/nsmb1081>
- Buratti, E., Baralle, F.E., 2011. TDP-43: new aspects of autoregulation mechanisms in RNA binding proteins and their connection with human disease. *FEBS J.* 278, 3530–3538. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08257.x>
- Burnet, S.F.M., 1959. The clonal selection theory of acquired immunity ; the Abraham Flexner lectures of Vanderbilt University. Cambridge University Press.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D., 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Caputi, M., Kendzior, R.J., Beemon, K.L., 2002. A nonsense mutation in the fibrillin-1 gene of a Marfan syndrome patient induces NMD and disrupts an exonic splicing enhancer. *Genes Dev.* 16, 1754–1759. <https://doi.org/10.1101/gad.997502>
- Carrington, E.M., Vikstrom, I.B., Light, A., Sutherland, R.M., Londrigan, S.L., Mason, K.D., Huang, D.C.S., Lew, A.M., Tarlinton, D.M., 2010. BH3 mimetics antagonizing restricted prosurvival Bcl-2 proteins represent another class of selective immune modulatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10967–10971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005256107>
- Cartegni, L., Chew, S.L., Krainer, A.R., 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* 3, 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>

- Cerutti, A., Cols, M., Puga, I., 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 118–132. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Chakrabarti, S., Bonneau, F., Schüssler, S., Eppinger, E., Conti, E., 2014. Phospho-dependent and phospho-independent interactions of the helicase UPF1 with the NMD factors SMG5–SMG7 and SMG6. *Nucleic Acids Res.* 42, 9447–9460. <https://doi.org/10.1093/nar/gku578>
- Chakrabarti, S., Jayachandran, U., Bonneau, F., Fiorini, F., Basquin, C., Domcke, S., Le Hir, H., Conti, E., 2011. Molecular Mechanisms for the RNA-Dependent ATPase Activity of Upf1 and Its Regulation by Upf2. *Mol. Cell* 41, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.010>
- Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F., Le Hir, H., 2008. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 85–93. <https://doi.org/10.1038/nsmb1330>
- Chandrika, B.B., Yang, C., Ou, Y., Feng, X., Muhoza, D., Holmes, A.F., Theus, S., Deshmukh, S., Haun, R.S., Kaushal, G.P., 2015. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Autophagy Provides Cytoprotection from Chemical Hypoxia and Oxidant Injury and Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *PloS One* 10, e0140025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140025>
- Chang, Y.-F., Chan, W.-K., Imam, J.S., Wilkinson, M.F., 2007. Alternatively Spliced T-cell Receptor Transcripts Are Up-regulated in Response to Disruption of Either Splicing Elements or Reading Frame. *J. Biol. Chem.* 282, 29738–29747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704372200>
- Chaudhuri, J., Alt, F.W., 2004. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 541–552. <https://doi.org/10.1038/nri1395>
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., Manis, J., Alt, F.W., 2007. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol.* 94, 157–214. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)94006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)94006-1)
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., Alt, F.W., 2003. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726–730. <https://doi.org/10.1038/nature01574>
- Chaudhury, A., Chander, P., Howe, P.H., 2010. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA N. Y. N* 16, 1449–1462. <https://doi.org/10.1261/rna.2254110>
- Chazal, P.-E., Dagueuet, E., Wendling, C., Ulryck, N., Tomasetto, C., Sargueil, B., Hir, H.L., 2013. EJC core component MLN51 interacts with eIF3 and activates translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5903. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218732110>
- Chemin, G., Tinguely, A., Sirac, C., Lechouane, F., Duchez, S., Cogné, M., Delpy, L., 2010. Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 5009–5017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902949>

- Chen, C., Edelstein, L.C., Gélinas, C., 2000. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell. Biol.* 20, 2687–2695. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.8.2687-2695.2000>
- Chen, K., Cerutti, A., 2011. The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.01.006>
- Chen, M., Hong, M.J., Sun, H., Wang, L., Shi, X., Gilbert, B.E., Corry, D.B., Kheradmand, F., Wang, J., 2014. Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection. *Nat. Med.* 20, 503–510. <https://doi.org/10.1038/nm.3521>
- Chen, M., Kodali, S., Jang, A., Kuai, L., Wang, J., 2015. Requirement for Autophagy in the Long-Term Persistence but not Initial Formation of Memory B cells. *J. Immunol.* 194, 2607–2615. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403001>
- Chen, X., Barton, L.F., Chi, Y., Clurman, B.E., Roberts, J.M., 2007. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol. Cell* 26, 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.022>
- Chen, X., Karnovsky, A., Sans, M.D., Andrews, P.C., Williams, J.A., 2010. Molecular characterization of the endoplasmic reticulum: Insights from proteomic studies. *PROTEOMICS* 10, 4040–4052. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000234>
- Chen, Y., Brandizzi, F., 2013. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.* 23. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.005>
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Maniatis, T., 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 9, 1586–1597. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1586>
- Chester, A., Somasekaram, A., Tzimina, M., Jarmuz, A., Gisbourne, J., O’Keefe, R., Scott, J., Navaratnam, N., 2003. The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay. *EMBO J.* 22, 3971–3982. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg369>
- Chevrier, S., Emslie, D., Shi, W., Kratina, T., Wellard, C., Karnowski, A., Erikci, E., Smyth, G.K., Chowdhury, K., Tarlinton, D., Corcoran, L.M., 2014. The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity. *J. Exp. Med.* 211, 827–840. <https://doi.org/10.1084/jem.20131831>
- Chhabra, S., 2017. Novel Proteasome Inhibitors and Histone Deacetylase Inhibitors: Progress in Myeloma Therapeutics. *Pharm. Basel Switz.* 10. <https://doi.org/10.3390/ph10020040>
- Chung, J.B., Sater, R.A., Fields, M.L., Erikson, J., Monroe, J.G., 2002. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *Int. Immunol.* 14, 157–166. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.2.157>
- Clerici, M., Mourão, A., Gutsche, I., Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A., Kadlec, J., Sattler, M., Cusack, S., 2009. Unusual bipartite mode of interaction between the nonsense-mediated decay factors, UPF1 and UPF2. *EMBO J.* 28, 2293–2306. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.175>

ClinicalTrials.gov, 2020. Search of: antisense oligonucleotide - List Results - ClinicalTrials.gov [WWW Document]. URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=antisense+oligonucleotide> (accessed 6.25.20).

Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M., 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* 8, 463–470. <https://doi.org/10.1038/ni1454>

Coelho, D.S., Domingos, P.M., 2014. Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Front. Genet.* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00076>

Cohen, C., Royer, B., Javaugue, V., Szalat, R., El Karoui, K., Caulier, A., Knebelmann, B., Jaccard, A., Chevret, S., Touchard, G., Femand, J.-P., Arnulf, B., Bridoux, F., 2015. Bortezomib produces high hematological response rates with prolonged renal survival in monoclonal immunoglobulin deposition disease. *Kidney Int.* 88, 1135–1143. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.201>

Collins, A.M., Wang, Y., Roskin, K.M., Marquis, C.P., Jackson, K.J.L., 2015. The mouse antibody heavy chain repertoire is germline-focused and highly variable between inbred strains. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0236>

Conter, L.J., Song, E., Shlomchik, M.J., Tomayko, M.M., 2014. CD73 expression is dynamically regulated in the germinal center and bone marrow plasma cells are diminished in its absence. *PloS One* 9, e92009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092009>

Conticello, S.G., Ganesh, K., Xue, K., Lu, M., Rada, C., Neuberger, M.S., 2008. Interaction between antibody-diversification enzyme AID and spliceosome-associated factor CTNNB1. *Mol. Cell* 31, 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.009>

Conway, K.L., Kuballa, P., Khor, B., Zhang, M., Shi, H.N., Virgin, H.W., Xavier, R.J., 2013. ATG5 regulates plasma cell differentiation. *Autophagy* 9, 528–537. <https://doi.org/10.4161/auto.23484>

Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G.M., Piacentini, M., 2017. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front. Oncol.* 7, 78. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00078>

Corti, D., Lanzavecchia, A., 2014. Efficient Methods To Isolate Human Monoclonal Antibodies from Memory B Cells and Plasma Cells. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0018-2014>

Corti, D., Voss, J., Gamblin, S.J., Codoni, G., Macagno, A., Jarrossay, D., Vachieri, S.G., Pinna, D., Minola, A., Vanzetta, F., Silacci, C., Fernandez-Rodriguez, B.M., Agatic, G., Bianchi, S., Giacchetto-Sasselli, I., Calder, L., Sallusto, F., Collins, P., Haire, L.F., Temperton, N., Langedijk, J.P.M., Skehel, J.J., Lanzavecchia, A., 2011. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850–856. <https://doi.org/10.1126/science.1205669>

Cowan, A.J., Allen, C., Barac, A., Basaleem, H., Bensenor, I., Curado, M.P., Foreman, K., Gupta, R., Harvey, J., Hosgood, H.D., Jakovljevic, M., Khader, Y., Linn, S., Lad, D., Mantovani, L., Nong, V.M., Mokdad, A., Naghavi, M., Postma, M., Roshandel, G., Shackelford, K., Sisay, M., Nguyen, C.T., Tran, T.T., Xuan, B.T., Ukwaja, K.N., Vollset, S.E., Weiderpass, E., Libby, E.N., Fitzmaurice, C., 2018. Global Burden of Multiple Myeloma: A

- Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol.* 4, 1221–1227. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2128>
- Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., Walter, P., 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18773–18784. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509487102>
- Croce, C.M., Shander, M., Martinis, J., Cicurel, L., D’Ancona, G.G., Dolby, T.W., Koprowski, H., 1979. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3416–3419.
- Crooke, S.T., Vickers, T.A., Liang, X., 2020. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 48, 5235–5253. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa299>
- Crotty, S., Johnston, R.J., Schoenberger, S.P., 2010. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* 11, 114–120. <https://doi.org/10.1038/ni.1837>
- Culbertson, M.R., Leeds, P.F., 2003. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 207–214. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00014-5)
- Cybulsky, A.V., 2017. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 681–696. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.129>
- Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S.V., Han, X., Weng, Y., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Ter-Avanesyan, M.D., Peltz, S.W., 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 12, 1665–1677. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1665>
- Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G., Mårtensson, I.-L., 2007. Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26, 4273–4282. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601846>
- Dang, Y., Low, W.-K., Xu, J., Gehring, N.H., Dietz, H.C., Romo, D., Liu, J.O., 2009. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay by the natural product pateamine A through eukaryotic initiation factor 4AIII. *J. Biol. Chem.* 284, 23613–23621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009985>
- Dazert, E., Hall, M.N., 2011. mTOR signaling in disease. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell differentiation, Cell division, growth and death* 23, 744–755. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.09.003>
- De Silva, N.S., Klein, U., 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>
- Delpy, L., Sirac, C., Magnoux, E., Ducheze, S., Cogné, M., 2004. RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional κ alleles and detects premature termination within the last κ exon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7375–7380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305586101>

Delpy, L., Srour, N., Cognè, M., 2017. Use of Antisense Oligonucleotides for Producing Truncated Ig by Exon Skipping for the Treatment of Diseases Involving B Cells. WO/2017/089359.

Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., Bérout, C., 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37, e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>

Dewaele, M., Tabaglio, T., Willekens, K., Bezzi, M., Teo, S.X., Low, D.H.P., Koh, C.M., Rambow, F., Fiers, M., Rogiers, A., Radaelli, E., Al-Haddawi, M., Tan, S.Y., Hermans, E., Amant, F., Yan, H., Lakshmanan, M., Koumar, R.C., Lim, S.T., Derheimer, F.A., Campbell, R.M., Bonday, Z., Tergaonkar, V., Shackleton, M., Blattner, C., Marine, J.-C., Guccione, E., 2016. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J. Clin. Invest.* 126, 68–84. <https://doi.org/10.1172/JCI82534>

Dhillon, S., 2020. Viltolarsen: First Approval. *Drugs.* <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01339-3>

Di Noia, J.M., Neuberger, M.S., 2007. Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740>

Diem, M.D., Chan, C.C., Younis, I., Dreyfuss, G., 2007. PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1173–1179. <https://doi.org/10.1038/nsmb1321>

Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O., 2009. Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 808–813. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1639>

Doenecke, A., Winnacker, E.L., Hallek, M., 1997. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) improves the PCR-based isolation of immunoglobulin variable region genes from murine and human lymphoma cells and cell lines. *Leukemia* 11, 1787–1792. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400781>

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., Weill, J.-C., 2009. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10, 1292–1299. <https://doi.org/10.1038/ni.1814>

Dominski, Z., Kole, R., 1993. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8673–8677. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8673>

Dörner, T., Foster, S.J., Farner, N.L., Lipsky, P.E., 1998. Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: targeting of RGYW motifs on both DNA strands. *Eur. J. Immunol.* 28, 3384–3396. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3384::AID-IMMU3384>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3384::AID-IMMU3384>3.0.CO;2-T)

Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., Alt, Frederick W., 2005. Mechanism and Control of V(D)J Recombination versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences, in: Alt, Frderick W. (Ed.), *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 43–112. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86002-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86002-4)

- Duez, M., Giraud, M., Herbert, R., Rocher, T., Salson, M., Thonier, F., 2016. Vidjil: A Web Platform for Analysis of High-Throughput Repertoire Sequencing. *PLOS ONE* 11, e0166126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166126>
- Dufaud, C.R., McHeyzer-Williams, L.J., McHeyzer-Williams, M.G., 2017. Deconstructing the germinal center, one cell at a time. *Curr. Opin. Immunol.* 45, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.007>
- Dunnick, W., Hertz, G.Z., Scappino, L., Gritzmacher, C., 1993. DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res.* 21, 365–372.
- Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.-H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., Lejeune, F., 2007. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J. Cell Biol.* 178, 1145–1160. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611086>
- Dvinge, H., 2018. Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. *FEBS Lett.* 592, 2987–3006. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13119>
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L., 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981–992. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90089-6)
- Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., Jensen, T.H., 2009. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 49–55. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1530>
- Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z., Mühlemann, O., 2008. Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol.* 6, e92. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060092>
- Edry, E., Melamed, D., 2004. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md* 173, 4265–4271. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4265>
- Ehlich, A., Martin, V., Müller, W., Rajewsky, K., 1994. Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr. Biol. CB* 4, 573–583. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00129-9)
- Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Müller, W., Rajewsky, K., 1993. Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell* 72, 695–704. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90398-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90398-a)
- Eisenbeis, C.F., Singh, H., Storb, U., 1995. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev.* 9, 1377–1387. <https://doi.org/10.1101/gad.9.11.1377>
- Eperon, L.P., Graham, I.R., Griffiths, A.D., Eperon, I.C., 1988. Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of Pre-mRNA: Is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase? *Cell* 54, 393–401. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90202-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90202-4)

- Eyer, K., Doineau, R.C.L., Castrillon, C.E., Briseño-Roa, L., Menrath, V., Mottet, G., England, P., Godina, A., Brient-Litzler, E., Nizak, C., Jensen, A., Griffiths, A.D., Bibette, J., Bruhns, P., Baudry, J., 2017a. Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring. *Nat. Biotechnol.* 35, 977–982. <https://doi.org/10.1038/nbt.3964>
- Eyer, K., Doineau, R.C.L., Castrillon, C.E., Briseño-Roa, L., Menrath, V., Mottet, G., England, P., Godina, A., Brient-Litzler, E., Nizak, C., Jensen, A., Griffiths, A.D., Bibette, J., Bruhns, P., Baudry, J., 2017b. Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring. *Nat. Biotechnol.* 35, 977–982. <https://doi.org/10.1038/nbt.3964>
- Facon, T., Avet-Loiseau, H., Guillermin, G., Moreau, P., Geneviève, F., Zandecki, M., Lai, J.L., Leleu, X., Jouet, J.P., Bauters, F., Harousseau, J.L., Bataille, R., Mary, J.Y., Intergroupe Francophone du Myélome, 2001. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97, 1566–1571. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.6.1566>
- Fatscher, T., Boehm, V., Gehring, N.H., 2015. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4523–4544. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2017-9>
- Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., Holbrook, N.J., 1999. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)–ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* 339, 135–141. <https://doi.org/10.1042/bj3390135>
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., McHeyzer-Williams, M.G., 2009. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* 10, 375–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1704>
- Feng, D., Su, R.-C., Zou, L., Triggs-Raine, B., Huang, S., Xie, J., 2015. Increase of a group of PTC(+) transcripts by curcumin through inhibition of the NMD pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 1104–1115. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.04.002>
- Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K.D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T.J., Bartlett, B.J., Myers, K.M., Birkeland, H.C.G., Lamark, T., Krainc, D., Brech, A., Stenmark, H., Simonsen, A., Yamamoto, A., 2010. The Selective Macroautophagic Degradation of Aggregated Proteins Requires the PI3P-Binding Protein Alfy. *Mol. Cell* 38, 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.007>
- Fiorini, F., Bagchi, D., Le Hir, H., Croquette, V., 2015. Human Upf1 is a highly processive RNA helicase and translocase with RNP remodelling activities. *Nat. Commun.* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8581>
- Fiorini, F., Boudvillain, M., Le Hir, H., 2013. Tight intramolecular regulation of the human Upf1 helicase by its N- and C-terminal domains. *Nucleic Acids Res.* 41, 2404–2415. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1320>
- Fonseca, R., Abouzaid, S., Bonafede, M., Cai, Q., Parikh, K., Cosler, L., Richardson, P., 2017. Trends in overall survival and costs of multiple myeloma, 2000–2014. *Leukemia* 31, 1915–1921. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.380>

Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A.K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., Neri, A., Barlogie, B., Kuehl, W.M., Liebisch, P., Davies, F., Chen-Kiang, S., Durie, B.G.M., Carrasco, R., Sezer, O., Reiman, T., Pilarski, L., Avet-Loiseau, H., International Myeloma Working Group, 2009. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23, 2210–2221. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.174>

Förster, I., Rajewsky, K., 1990. The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4781–4784.

Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., Lou, Z., Bassing, C.H., Manis, J.P., Chen, J., Carpenter, P.B., Alt, F.W., 2006. H2AX Prevents DNA Breaks from Progressing to Chromosome Breaks and Translocations. *Mol. Cell* 21, 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.005>

Franks, T.M., Singh, G., Lykke-Andersen, J., 2010. Upf1 ATPase-Dependent mRNP Disassembly Is Required for Completion of Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Cell* 143, 938–950. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.043>

Franssen, L.E., Mutis, T., Lokhorst, H.M., van de Donk, N.W.C.J., 2019. Immunotherapy in myeloma: how far have we come? *Ther. Adv. Hematol.* 10. <https://doi.org/10.1177/2040620718822660>

Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., Conti, E., 2005. SMG7 Is a 14-3-3-like Adaptor in the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway. *Mol. Cell* 17, 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.01.010>

Gandolfi, S., Laubach, J.P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., Richardson, P.G., 2017. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev.* 36, 561–584. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9707-8>

Gardner, L.B., 2008a. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3729–3741. <https://doi.org/10.1128/MCB.02284-07>

Gardner, L.B., 2008b. Hypoxic Inhibition of Nonsense-Mediated RNA Decay Regulates Gene Expression and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3729–3741. <https://doi.org/10.1128/MCB.02284-07>

Gass, J.N., Gunn, K.E., Sriburi, R., Brewer, J.W., 2004. Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response. *Trends Immunol.* 25, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.11.004>

Gass, J.N., Jiang, H.-Y., Wek, R.C., Brewer, J.W., 2008. The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol. Immunol.* 45, 1035–1043. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.07.029>

Gaudet, P., Michel, P.-A., Zahn-Zabal, M., Britan, A., Cusin, I., Domagalski, M., Duek, P.D., Gateau, A., Gleizes, A., Hinard, V., Rech de Laval, V., Lin, J., Nikitin, F., Schaeffer, M., Teixeira, D., Lane, L., Bairoch, A., 2017. The neXtProt knowledgebase on human proteins: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 45, D177–D182. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1062>

- Gaudette, B.T., Jones, D.D., Bortnick, A., Argon, Y., Allman, D., 2020. mTORC1 coordinates an immediate unfolded protein response-related transcriptome in activated B cells preceding antibody secretion. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14032-1>
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., Weigert, M., 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* 177, 999–1008. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.999>
- Gazeau, N., Manier, S., 2020. The immune microenvironment and immunotherapies in multiple myeloma. *Hématologie* 26, 4–11. <https://doi.org/10.1684/hma.2020.1549>
- Ge, Z., Quek, B.L., Beemon, K.L., Hogg, J.R., 2016. Polypyrimidine tract binding protein 1 protects mRNAs from recognition by the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.11155>
- Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2009. The Hierarchy of Exon-Junction Complex Assembly by the Spliceosome Explains Key Features of Mammalian Nonsense-Mediated mRNA Decay. *PLOS Biol.* 7, e1000120. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000120>
- Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2003. Y14 and hUpf3b Form an NMD-Activating Complex. *Mol. Cell* 11, 939–949. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00142-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00142-4)
- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., Springer, W., 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* 12, 119–131. <https://doi.org/10.1038/ncb2012>
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., Defrance, T., 2007. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7779–7786. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7779>
- Gersappe, A., Burger, L., Pintel, D.J., 1999. A premature termination codon in either exon of minute virus of mice P4 promoter-generated pre-mRNA can inhibit nuclear splicing of the intervening intron in an open reading frame-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 274, 22452–22458. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22452>
- Geuens, T., Bouhy, D., Timmerman, V., 2016. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum. Genet.* 135, 851–867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>
- Ghosh, S., Ganesan, R., Amrani, N., Jacobson, A., 2010. Translational competence of ribosomes released from a premature termination codon is modulated by NMD factors. *RNA* 16, 1832–1847. <https://doi.org/10.1261/rna.1987710>
- Gilbert, W., 1978. Why genes in pieces? *Nature* 271, 501. <https://doi.org/10.1038/271501a0>
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., Conti, E., 2006. Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *EMBO J.* 25, 5117–5125. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601377>

- Goetz, A.E., Wilkinson, M., 2017a. Stress and the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 3509–3531. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2537-6>
- Goetz, A.E., Wilkinson, M., 2017b. Stress and the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 3509–3531. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2537-6>
- González, D., van der Burg, M., García-Sanz, R., Fenton, J.A., Langerak, A.W., González, M., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., Morgan, G.J., 2007. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 110, 3112–3121. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069625>
- Good-Jacobson, K.L., Shlomchik, M.J., 2010. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 3117–3125. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001155>
- Good-Jacobson, K.L., Tarlinton, D.M., 2012. Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.* 24, 403–408. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs050>
- Gopalsamy, A., Bennett, E.M., Shi, M., Zhang, W.-G., Bard, J., Yu, K., 2012. Identification of pyrimidine derivatives as hSMG-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6636–6641. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.107>
- Gorman, J.R., Alt, F.W., 1998. Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Adv. Immunol.* 69, 113–181. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60607-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60607-0)
- Gotham, V.J.B., Hobbs, M.C., Burgin, R., Turton, D., Smythe, C., Coldham, I., 2016. Synthesis and activity of a novel inhibitor of nonsense-mediated mRNA decay †Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedures and spectroscopic data. See DOI: 10.1039/c5ob02482j Click here for additional data file. *Org. Biomol. Chem.* 14, 1559–1563. <https://doi.org/10.1039/c5ob02482j>
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., Andaloussi, S.E., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussonot, R., Ferry, A., Voit, T., Amthor, H., Bühr, C., Schürch, S., Wood, M.J.A., Davies, K.E., Vaillend, C., Leumann, C., Garcia, L., 2015. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 21, 270–275. <https://doi.org/10.1038/nm.3765>
- Grasso, D., Ropolo, A., Ré, A.L., Boggio, V., Molejón, M.I., Iovanna, J.L., Gonzalez, C.D., Urrutia, R., Vaccaro, M.I., 2011. Zymophagy, a Novel Selective Autophagy Pathway Mediated by VMP1-USP9x-p62, Prevents Pancreatic Cell Death. *J. Biol. Chem.* 286, 8308–8324. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197301>
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D., 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/80992>
- Groll, M., Huber, R., 2004. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.025>

- Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R.J., Blumberg, R.S., 2016. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 469–484. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.62>
- Guang, M.H.Z., Kavanagh, E.L., Dunne, L.P., Dowling, P., Zhang, L., Lindsay, S., Bazou, D., Goh, C.Y., Hanley, C., Bianchi, G., Anderson, K.C., O’Gorman, P., McCann, A., 2019. Targeting Proteotoxic Stress in Cancer: A Review of the Role that Protein Quality Control Pathways Play in Oncogenesis. *Cancers* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11010066>
- Gudikote, J.P., Imam, J.S., Garcia, R.F., Wilkinson, M.F., 2005. RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 801–809. <https://doi.org/10.1038/nsmb980>
- Guerriero, C.J., Brodsky, J.L., 2012. The Delicate Balance Between Secreted Protein Folding and Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Human Physiology. *Physiol. Rev.* 92, 537–576. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2011>
- Gunn, K.E., Brewer, J.W., 2006. Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 3791–3798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3791>
- Gupta, P., Li, Y.-R., 2018. Upf proteins: highly conserved factors involved in nonsense mRNA mediated decay. *Mol. Biol. Rep.* 45, 39–55. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4139-7>
- Haas, K.M., 2015. B-1 lymphocytes in mice and nonhuman primates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1362, 98–109. <https://doi.org/10.1111/nyas.12760>
- Halloy, F., Iyer, P.S., Ćwiek, P., Ghidini, A., Barman-Aksözen, J., Wildner-Verhey van Wijk, N., Theocharides, A.P.A., Minder, E.I., Schneider-Yin, X., Schümperli, D., Hall, J., 2020. Delivery of oligonucleotides to bone marrow to modulate ferrochelatase splicing in a mouse model of erythropoietic protoporphyria. *Nucleic Acids Res.* 48, 4658–4671. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa229>
- Han, D., Lerner, A.G., Walle, L.V., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., Papa, F.R., 2009. IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell* 138, 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>
- Han, S.P., Tang, Y.H., Smith, R., 2010. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem. J.* 430, 379–392. <https://doi.org/10.1042/BJ20100396>
- Hao, M., Zhang, L., An, G., Meng, H., Han, Y., Xie, Z., Xu, Y., Li, C., Yu, Z., Chang, H., Qiu, L., 2011. Bone marrow stromal cells protect myeloma cells from bortezomib induced apoptosis by suppressing microRNA-15a expression. *Leuk. Lymphoma* 52, 1787–1794. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.576791>
- Harding, H.P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I., Ron, D., 2002. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 575–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.011402.160624>

- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D., 2000a. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00108-8)
- Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., Ron, D., 2001. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* 7, 1153–1163. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00264-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00264-7)
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., Ron, D., 2000b. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* 5, 897–904. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80330-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80330-5)
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274. <https://doi.org/10.1038/16729>
- Harding, H.P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.-J., Kaufman, R.J., Ron, D., 2009. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α) dephosphorylation in mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1832–1837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809632106>
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.-R., Littman, D.R., Cyster, J.G., 2001. A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements. *J. Exp. Med.* 194, 45–56.
- Hauser, A.E., Debes, G.F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., Manz, R.A., 2002. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 1277–1282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1277>
- Hauser, J., Grundström, C., Kumar, R., Grundström, T., 2016. Regulated localization of an AID complex with E2A, PAX5 and IRF4 at the *Igh* locus. *Mol. Immunol.* 80, 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.10.014>
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999. Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 3787–3799.
- He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., Chen, H., Qi, L., 2018. Emerging Roles for XBP1, a sUPeR Transcription Factor. *Gene Expr.* 15, 13–25.
- He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., Chen, H., Qi, L., 2010. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr.* 15, 13–25. <https://doi.org/10.3727/105221610x12819686555051>
- Hein, K., Lorenz, M.G.O., Siebenkotten, G., Petry, K., Christine, R., Radbruch, A., 1998. Processing of Switch Transcripts Is Required for Targeting of Antibody Class Switch Recombination. *J. Exp. Med.* 188, 2369–2374.

- Hellen, C.U.T., 2018. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a032656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>
- Helmreich, E., Kern, M., Eisen, H.N., 1961. The secretion of antibody by isolated lymph node cells. *J. Biol. Chem.* 236, 464–473.
- Heo, Y.-A., 2020. Golodirsen: First Approval. *Drugs* 80, 329–333. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01267-2>
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., Ciechanover, A., 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258, 8206–8214.
- Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., Korsmeyer, S.J., 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312, 572–576. <https://doi.org/10.1126/science.1123480>
- Hetz, C., Zhang, K., Kaufman, R.J., 2020. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hibi, T., Dosch, H.M., 1986. Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow. *Eur. J. Immunol.* 16, 139–145. <https://doi.org/10.1002/eji.1830160206>
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K.C., 2002. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 277, 16639–16647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200360200>
- Hiller, M., Zhang, Z., Backofen, R., Stamm, S., 2007. Pre-mRNA Secondary Structures Influence Exon Recognition. *PLOS Genet.* 3, e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030204>
- Hir, H.L., Saulière, J., Wang, Z., 2016a. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 41–54. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>
- Hir, H.L., Saulière, J., Wang, Z., 2016b. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 41–54. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S.C., Neuber, O., Sommer, T., 2009. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 458, 453–460. <https://doi.org/10.1038/nature07962>

- Hnilicová, J., Hozeifi, S., Dušková, E., Icha, J., Tománková, T., Staněk, D., 2011. Histone Deacetylase Activity Modulates Alternative Splicing. *PLOS ONE* 6, e16727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016727>
- Hodges, C., Bintu, L., Lubkowska, L., Kashlev, M., Bustamante, C., 2009. Nucleosomal Fluctuations Govern the Transcription Dynamics of RNA Polymerase II. *Science* 325, 626–628. <https://doi.org/10.1126/science.1172926>
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J.S., 2009. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 186, 323–331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903014>
- Hollien, J., Weissman, J.S., 2006. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science* 313, 104–107. <https://doi.org/10.1126/science.1129631>
- Horcher, M., Souabni, A., Busslinger, M., 2001. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779–790. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00153-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00153-4)
- Hough, R., Pratt, G., Rechsteiner, M., 1987. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 262, 8303–8313.
- Hough, R., Pratt, G., Rechsteiner, M., 1986. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 261, 2400–2408.
- Hoy, S.M., 2017. Nusinersen: First Global Approval. *Drugs* 77, 473–479. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0711-7>
- Huang, H., Zhang, J., Harvey, S.E., Hu, X., Cheng, C., 2017. RNA G-quadruplex secondary structure promotes alternative splicing via the RNA-binding protein hnRNPF. *Genes Dev.* 31, 2296–2309. <https://doi.org/10.1101/gad.305862.117>
- Huang, S., Xing, Y., Liu, Y., 2019. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 α in metabolic regulation and disease. *J. Biol. Chem.* 294, 18726–18741. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007036>
- Huang, Y., Gattoni, R., Stévenin, J., Steitz, J.A., 2003. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol. Cell* 11, 837–843. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00089-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00089-3)
- Huang, Y., Yario, T.A., Steitz, J.A., 2004. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9666–9670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403533101>
- Huelga, S.C., Vu, A.Q., Arnold, J.D., Liang, T.Y., Liu, P.P., Yan, B.Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Hoon, S., Brenner, S., Ares, M., Yeo, G.W., 2012. Integrative Genome-wide Analysis Reveals Cooperative Regulation of Alternative Splicing by hnRNP Proteins. *Cell Rep.* 1, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.001>

- Hug, N., Cáceres, J.F., 2014. The RNA Helicase DHX34 Activates NMD by Promoting a Transition from the Surveillance to the Decay-Inducing Complex. *Cell Rep.* 8, 1845–1856. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.020>
- Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Saulière, J., Izaurralde, E., 2008. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* 14, 2609–2617. <https://doi.org/10.1261/rna.1386208>
- Hurt, J.A., Robertson, A.D., Burge, C.B., 2013. Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay. *Genome Res.* 23, 1636–1650. <https://doi.org/10.1101/gr.157354.113>
- Hwang, J., Kim, Y.K., 2013. When a ribosome encounters a premature termination codon. *BMB Rep.* 46, 9–16. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.1.002>
- Hwang, J.K., Alt, F.W., Yeap, L.-S., 2015. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3-0037–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0037-2014>
- Iannitti, T., Morales-Medina, J.C., Palmieri, B., 2014. Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity. *Curr. Drug Targets* 15, 663–673. <https://doi.org/10.2174/1389450115666140321100304>
- Imamachi, N., Salam, K.A., Suzuki, Y., Akimitsu, N., 2017. A GC-rich sequence feature in the 3' UTR directs UPF1-dependent mRNA decay in mammalian cells. *Genome Res.* 27, 407–418. <https://doi.org/10.1101/gr.206060.116>
- Imbert, M., Blandel, F., Leumann, C., Garcia, L., Goyenvalle, A., 2019. Lowering Mutant Huntingtin Using Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides As a Therapeutic Approach for Huntington's Disease. *Nucleic Acid Ther.* 29, 256–265. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0775>
- Inácio, A., Silva, A.L., Pinto, J., Ji, X., Morgado, A., Almeida, F., Faustino, P., Lavinha, J., Liebhaber, S.A., Romão, L., 2004. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 279, 32170–32180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405024200>
- International Myeloma Working Group, 2003. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J. Haematol.* 121, 749–757.
- Ionis, 2020. Antisense Drugs for a Broad Range of Diseases [WWW Document]. Ionis Pharm. Inc. URL <https://www.ionispharma.com/ionis-innovation/pipeline/> (accessed 6.23.20).
- Ise, W., Kurosaki, T., 2019. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol. Rev.* 288, 64–74. <https://doi.org/10.1111/imr.12751>
- Isken, O., Kim, Y.K., Hosoda, N., Mayeur, G.L., Hershey, J.W.B., Maquat, L.E., 2008. Upf1 Phosphorylation Triggers Translational Repression during Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Cell* 133, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.030>
- Iurlaro, R., Muñoz-Pinedo, C., 2016. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 283, 2640–2652. <https://doi.org/10.1111/febs.13598>

- Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2008. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* 27, 736–747. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.17>
- Iwasato, T., Shimizu, A., Honjo, T., Yamagishi, H., 1990. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 62, 143–149. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90248-d](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90248-d)
- Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., Kominami, E., 2006. Excess Peroxisomes Are Degraded by Autophagic Machinery in Mammals. *J. Biol. Chem.* 281, 4035–4041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512283200>
- Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., Kohno, K., 2009. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16657–16662. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903775106>
- Jaccard, A., Comenzo, R.L., Hari, P., Hawkins, P.N., Roussel, M., Morel, P., Macro, M., Pellegrin, J.-L., Lazaro, E., Mohty, D., Mercie, P., Decaux, O., Gillmore, J., Lavergne, D., Bridoux, F., Wechalekar, A.D., Venner, C.P., 2014. Efficacy of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone in treatment-naïve patients with high-risk cardiac AL amyloidosis (Mayo Clinic stage III). *Haematologica* 99, 1479–1485. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.104109>
- Janssens, S., Pulendran, B., Lambrecht, B.N., 2014. Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat. Immunol.* 15, 910–919. <https://doi.org/10.1038/ni.2991>
- Jeong, S., 2017. SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. *Mol. Cells* 40, 1–9. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2319>
- Jia, J., Furlan, A., Gonzalez-Hilarion, S., Leroy, C., Gruenert, D.C., Tulasne, D., Lejeune, F., 2015. Caspases shutdown nonsense-mediated mRNA decay during apoptosis. *Cell Death Differ.* 22, 1754–1763. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.18>
- Jiang, Y., Lu, H., Khine, Y.Y., Dag, A., Stenzel, M.H., 2014. Polyion complex micelle based on albumin-polymer conjugates: multifunctional oligonucleotide transfection vectors for anticancer chemotherapeutics. *Biomacromolecules* 15, 4195–4205. <https://doi.org/10.1021/bm501205x>
- Johnston, C.M., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., 2006. Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4221–4234. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4221>
- Jonas, S., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., 2013. An unusual arrangement of two 14-3-3-like domains in the SMG5–SMG7 heterodimer is required for efficient nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 27, 211–225. <https://doi.org/10.1101/gad.206672.112>
- Jones, D.D., Gaudette, B.T., Wilmore, J.R., Chernova, I., Bortnick, A., Weiss, B.M., Allman, D., 2016. mTOR has distinct functions in generating versus sustaining humoral immunity. *J. Clin. Invest.* 126, 4250–4261. <https://doi.org/10.1172/JCI86504>
- Juliano, R.L., 2016. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 44, 6518–6548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw236>

- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 541–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830>
- Kadlec, J., Izaurralde, E., Cusack, S., 2004. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 330–337. <https://doi.org/10.1038/nsmb741>
- Kale, A.J., Moore, B.S., 2012. Molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance. *J. Med. Chem.* 55, 10317–10327. <https://doi.org/10.1021/jm300434z>
- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Nutt, S.L., 2007. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* 26, 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.007>
- Kanaan, J., Raj, S., Decourty, L., Saveanu, C., Croquette, V., Le Hir, H., 2018. UPF1-like helicase grip on nucleic acids dictates processivity. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06313-y>
- Karam, R., Lou, C.-H., Kroeger, H., Huang, L., Lin, J.H., Wilkinson, M.F., 2015a. The unfolded protein response is shaped by the NMD pathway. *EMBO Rep.* 16, 599–609. <https://doi.org/10.15252/embr.201439696>
- Karam, R., Lou, C.-H., Kroeger, H., Huang, L., Lin, J.H., Wilkinson, M.F., 2015b. The unfolded protein response is shaped by the NMD pathway. *EMBO Rep.* 16, 599–609. <https://doi.org/10.15252/embr.201439696>
- Karousis, E.D., Nasif, S., Mühlemann, O., 2016. Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. *WIREs RNA* 7, 661–682. <https://doi.org/10.1002/wrna.1357>
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., Ohno, S., 2006. Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20, 355–367. <https://doi.org/10.1101/gad.1389006>
- Kastner, B., Will, C.L., Stark, H., Lührmann, R., 2019. Structural Insights into Nuclear pre-mRNA Splicing in Higher Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, a032417. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032417>
- Kawamura, S., Unno, Y., List, A., Mizuno, A., Tanaka, M., Sasaki, T., Arisawa, M., Asai, A., Groll, M., Shuto, S., 2013. Potent proteasome inhibitors derived from the unnatural cis-cyclopropane isomer of Belactosin A: synthesis, biological activity, and mode of action. *J. Med. Chem.* 56, 3689–3700. <https://doi.org/10.1021/jm4002296>
- Kebaara, B.W., Atkin, A.L., 2009. Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 37, 2771–2778. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp146>

- Kfir, N., Lev-Maor, G., Glaich, O., Alajem, A., Datta, A., Sze, S.K., Meshorer, E., Ast, G., 2015. SF3B1 Association with Chromatin Determines Splicing Outcomes. *Cell Rep.* 11, 618–629. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.048>
- Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M., Cogné, M., 2004. Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* 103, 3828–3836. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3470>
- Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., Hiepe, F., 2019. The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00721>
- Kinoshita, K., Honjo, T., 2001. Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 493–503. <https://doi.org/10.1038/35080033>
- Kishor, A., Ge, Z., Hogg, J.R., 2019. hnRNP L-dependent protection of normal mRNAs from NMD subverts quality control in B cell lymphoma. *EMBO J.* 38. <https://doi.org/10.15252/embj.201899128>
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., Okada, T., 2011. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34, 961–972. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.025>
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R., 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 7, 773–782. <https://doi.org/10.1038/ni1357>
- Klein, U., Rajewsky, K., Küppers, R., 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* 188, 1679–1689. <https://doi.org/10.1084/jem.188.9.1679>
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y., 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5, 539–545. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00296-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00296-x)
- Kloetzel, P.-M., 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179–188. <https://doi.org/10.1038/35056572>
- Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L., Finley, D., 2001. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell* 7, 1143–1152. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00274-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00274-x)
- Kole, R., Krainer, A.R., Altman, S., 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 125–140. <https://doi.org/10.1038/nrd3625>
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., 2007. Homeostatic Levels of p62 Control

Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell* 131, 1149–1163. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.035>

Kononenko, A.V., Mitkevich, V.A., Atkinson, G.C., Tenson, T., Dubovaya, V.I., Frolova, L.Y., Makarov, A.A., Hauryliuk, V., 2010. GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. *Nucleic Acids Res.* 38, 548–558. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp908>

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., Peter, M., 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* 10, 602–610. <https://doi.org/10.1038/ncb1723>

Krammer, P.H., 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789–795. <https://doi.org/10.1038/35037728>

Kudo, A., Sakaguchi, N., Melchers, F., 1987. Organization of the murine Ig-related lambda 5 gene transcribed selectively in pre-B lymphocytes. *EMBO J.* 6, 103–107. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb04725.x>

Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L., 2012. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Invest.* 122, 3456–3463. <https://doi.org/10.1172/JCI61188>

Kumar, S.K., Dispenzieri, A., Fraser, R., Mingwei, F., Akpek, G., Cornell, R., Kharfan-Dabaja, M., Freytes, C., Hashmi, S., Hildebrandt, G., Holmberg, L., Kyle, R., Lazarus, H., Lee, C., Mikhael, J., Nishihori, T., Tay, J., Usmani, S., Vesole, D., Vij, R., Wirk, B., Krishnan, A., Gasparetto, C., Mark, T., Nieto, Y., Hari, P., D'Souza, A., 2018. Early Relapse after Autologous Hematopoietic Cell Transplantation remains a Poor Prognostic Factor in Multiple Myeloma but Outcomes Have Improved Over Time. *Leukemia* 32, 986–995. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.331>

Kumar, S.K., Rajkumar, V., Kyle, R.A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Gay, F., Anderson, K.C., 2017. Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>

Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., Gehring, N.H., 2006. Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA N. Y. N* 12, 1015–1022. <https://doi.org/10.1261/rna.12506>

Kurosaki, T., Kometani, K., Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159. <https://doi.org/10.1038/nri3802>

Kurosaki, T., Li, W., Hoque, M., Popp, M.W.-L., Ermolenko, D.N., Tian, B., Maquat, L.E., 2014. A post-translational regulatory switch on UPF1 controls targeted mRNA degradation. *Genes Dev.* 28, 1900–1916. <https://doi.org/10.1101/gad.245506.114>

Kurosaki, T., Miyoshi, K., Myers, J.R., Maquat, L.E., 2018. NMD-degradome sequencing reveals ribosome-bound intermediates with 3'-end non-templated nucleotides. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 940–950. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0132-7>

Kurosaki, T., Popp, M.W., Maquat, L.E., 2019. Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 406–420. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>

- Kyle, R.A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Lust, J.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.E., Therneau, T.M., Greipp, P.R., 2003. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.* 78, 21–33. <https://doi.org/10.4065/78.1.21>
- Lafaille, J.J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., Tonegawa, S., 1989. Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59, 859–870. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90609-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90609-0)
- Lähdesmäki, A., Taylor, A.M.R., Chrzanowska, K.H., Pan-Hammarström, Q., 2004. Delineation of the role of the Mre11 complex in class switch recombination. *J. Biol. Chem.* 279, 16479–16487. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312796200>
- Lambert, J.-M., Ashi, M.O., Srour, N., Delpy, L., Saulière, J., 2020. Mechanisms and Regulation of Nonsense-Mediated mRNA Decay and Nonsense-Associated Altered Splicing in Lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21041335>
- Lambert, J.-M., Srour, N., Delpy, L., 2019. The Yin and Yang of RNA surveillance in B lymphocytes and antibody-secreting plasma cells. *BMB Rep.* 52, 671–678. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.12.232>
- Lanzavecchia, A., 2018. Dissecting human antibody responses: useful, basic and surprising findings. *EMBO Mol. Med.* 10. <https://doi.org/10.15252/emmm.201808879>
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2013. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1713–1719. <https://doi.org/10.1242/jcs.125773>
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., Moore, M.J., 2001. The exon–exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 20, 4987–4997. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4987>
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., Moore, M.J., 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon–exon junctions. *EMBO J.* 19, 6860–6869. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6860>
- Le Hir, H., Saulière, J., Wang, Z., 2016. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 41–54. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>
- LeBlanc, R., Song, K., White, D., Christofides, A., Doucette, S., 2019. Updates from the 2019 American Society of Clinical Oncology and European Hematology Association annual meetings: a Canadian perspective on high-risk cytogenetics in multiple myeloma. *Curr. Oncol.* 26, e581–e594. <https://doi.org/10.3747/co.26.5565>

- Lee, S.R., Pratt, G., Martinez, F., Yeo, G.W., Lykke-Andersen, J., 2015. Target discrimination in nonsense-mediated mRNA decay requires Upf1 ATPase activity. *Mol. Cell* 59, 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.036>
- Leeksa, A., Derks, I., Garrick, B., Jongejan, A., Colombo, M., Bloedjes, T., Trowe, T., Leisten, J., Groza, M., Narla, R.K., Loos, R., Kersten, M.-J., Mortensen, D., Moerland, P., Guikema, J., Kater, A., Eldering, E., Filvaroff, E., 2019. PF576 NONSENSE-MEDIATED MRNA DECAY IS A THERAPEUTIC TARGET IN MULTIPLE MYELOMA. *HemaSphere* 3, 240. <https://doi.org/10.1097/01.HS9.0000560592.99613.ac>
- Lefranc, M.P., 2001. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 18, 100–116. <https://doi.org/10.1159/000049189>
- Lefranc, M.-P., 2001. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 29, 207–209.
- Lejeune, F., 2017. Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep.* 50, 175–185. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.4.015>
- Leu, T.M., Schatz, D.G., 1995. rag-1 and rag-2 are components of a high-molecular-weight complex, and association of rag-2 with this complex is rag-1 dependent. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5657–5670. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.10.5657>
- Lewis, S.M., 1994. P nucleotide insertions and the resolution of hairpin DNA structures in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1332–1336. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1332>
- Li, D.-D., Wang, L.-L., Deng, R., Tang, J., Shen, Y., Guo, J.-F., Wang, Y., Xia, L.-P., Feng, G.-K., Liu, Q.Q., Huang, W.-L., Zeng, Y.-X., Zhu, X.-F., 2009. The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene* 28, 886–898. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.441>
- Li, Q., 2020. Nusinersen as a Therapeutic Agent for Spinal Muscular Atrophy. *Yonsei Med. J.* 61, 273–283. <https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.4.273>
- Li, S., Lefranc, M.-P., Miles, J.J., Alamyar, E., Giudicelli, V., Duroux, P., Freeman, J.D., Corbin, V.D.A., Scheerlinck, J.-P., Frohman, M.A., Cameron, P.U., Plebanski, M., Loveland, B., Burrows, S.R., Papenfuss, A.T., Gowans, E.J., 2013. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat. Commun.* 4, 2333. <https://doi.org/10.1038/ncomms3333>
- Li, S., Wilkinson, M.F., 1998. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* 8, 135–141. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80466-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80466-5)
- Li, S.C., Rothman, P.B., Zhang, J., Chan, C., Hirsh, D., Alt, F.W., 1994. Expression of I mu-C gamma hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int. Immunol.* 6, 491–497. <https://doi.org/10.1093/intimm/6.4.491>
- Li, W., Li, J., Bao, J., 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 1125–1136. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>

- Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., Calame, K., 2002. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4771–4780. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.13.4771-4780.2002>
- Lin, P., Owens, R., Tricot, G., Wilson, C.S., 2004. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 482–488. <https://doi.org/10.1309/74R4-TB90-BUWH-27JX>
- Lin, Y., Wong, K., Calame, K., 1997. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596–599. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.596>
- Little, A.J., Corbett, E., Ortega, F., Schatz, D.G., 2013. Cooperative recruitment of HMGB1 during V(D)J recombination through interactions with RAG1 and DNA. *Nucleic Acids Res.* 41, 3289–3301. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1461>
- Liu, C.-J., Tang, S.-J., Chou, C.-C., Sun, G.-H., Sun, K.-H., 2020. In Vivo Suppression of Autophagy via Lentiviral shRNA Targeting Atg5 Improves Lupus-Like Syndrome. *BioMed Res. Int.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8959726>
- Liu, H.X., Cartegni, L., Zhang, M.Q., Krainer, A.R., 2001. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat. Genet.* 27, 55–58. <https://doi.org/10.1038/83762>
- Liu, J., Wang, Y., Song, L., Zeng, L., Yi, W., Liu, T., Chen, H., Wang, M., Ju, Z., Cong, Y.-S., 2017. A critical role of DDRGK1 in endoplasmic reticulum homeostasis via regulation of IRE1 α stability. *Nat. Commun.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms14186>
- Loh, B., Jonas, S., Izaurralde, E., 2013. The SMG5–SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4–NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes Dev.* 27, 2125–2138. <https://doi.org/10.1101/gad.226951.113>
- Longman, D., Jackson-Jones, K.A., Maslon, M.M., Murphy, L.C., Young, R.S., Stoddart, J.J., Hug, N., Taylor, M.S., Papadopoulos, D.K., Cáceres, J.F., 2020. Identification of a localized nonsense-mediated decay pathway at the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 34, 1075–1088. <https://doi.org/10.1101/gad.338061.120>
- Lorenz, M., Jung, S., Radbruch, A., 1995. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 267, 1825–1828. <https://doi.org/10.1126/science.7892607>
- Losson, R., Lacroute, F., 1979. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5134–5137.
- Lu, P.D., Harding, H.P., Ron, D., 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167, 27–33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>
- Lü, S., Chen, Z., Yang, J., Chen, L., Gong, S., Zhou, H., Guo, L., Wang, J., 2008. Overexpression of the PSMB5 gene contributes to bortezomib resistance in T-lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from Jurkat line. *Exp. Hematol.* 36, 1278–1284. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.04.013>

- Luby, T.M., Schrader, C.E., Stavnezer, J., Selsing, E., 2001. The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 193, 159–168. <https://doi.org/10.1084/jem.193.2.159>
- Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., Misteli, T., 2010. Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. *Science* 327, 996–1000. <https://doi.org/10.1126/science.1184208>
- Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., Thompson, C.B., 2005. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 439–448. <https://doi.org/10.1038/nrm1660>
- Lykke-Andersen, J., 2002. Identification of a Human Decapping Complex Associated with hUpf Proteins in Nonsense-Mediated Decay. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8114–8121. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.23.8114-8121.2002>
- Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., Steitz, J.A., 2001. Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* 293, 1836–1839. <https://doi.org/10.1126/science.1062786>
- Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., Steitz, J.A., 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00214-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00214-2)
- Lykke-Andersen, S., Chen, Y., Ardal, B.R., Lilje, B., Waage, J., Sandelin, A., Jensen, T.H., 2014. Human nonsense-mediated RNA decay initiates widely by endonucleolysis and targets snoRNA host genes. *Genes Dev.* 28, 2498–2517. <https://doi.org/10.1101/gad.246538.114>
- Lykke-Andersen, S., Jensen, T.H., 2015. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 665–677. <https://doi.org/10.1038/nrm4063>
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., Tangye, S.G., 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 209, 1241–1253. <https://doi.org/10.1084/jem.20120994>
- Ma, Yanjun, Brewer, J.W., Alan Diehl, J., Hendershot, L.M., 2002. Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response. *J. Mol. Biol.* 318, 1351–1365. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00234-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00234-6)
- Ma, Y., Hendershot, L.M., 2003. Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 278, 34864–34873. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301107200>
- Ma, Yunmei, Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.R., 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00671-2)
- Ma, Y., Shimizu, Y., Mann, M.J., Jin, Y., Hendershot, L.M., 2010. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch

of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones* 15, 281–293. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0142-9>

Majeski, A.E., Dice, J.F., 2004. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2435–2444. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.013>

Maquat, L.E., 2002. NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes Dev.* 16, 1743–1753. <https://doi.org/10.1101/gad.1014502>

Maquat, L.E., Li, X., 2001. Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA N. Y. N* 7, 445–456. <https://doi.org/10.1017/s1355838201002229>

Marchalot, A., Ashi, M.O., Lambert, J.-M., Carrion, C., Lecardeur, S., Srour, N., Delpy, L., Le Penec, 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00780>

Martin, F., Kearney, J.F., 2002. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323–335. <https://doi.org/10.1038/nri799>

Martin, F., Kearney, J.F., 2001. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 195–201. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00204-1](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00204-1)

Martin, L., Grigoryan, A., Wang, D., Wang, J., Breda, L., Rivella, S., Cardozo, T., Gardner, L.B., 2014. Identification and characterization of small molecules that inhibit nonsense mediated RNA decay and suppress nonsense p53 mutations. *Cancer Res.* 74, 3104–3113. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2235>

Martins, R., Proença, D., Silva, B., Barbosa, C., Silva, A.L., Faustino, P., Romão, L., 2012. Alternative polyadenylation and nonsense-mediated decay coordinately regulate the human HFE mRNA levels. *PloS One* 7, e35461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035461>

Masani, S., Han, L., Yu, K., 2013. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is the essential nuclease during immunoglobulin class switch recombination. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1468–1473. <https://doi.org/10.1128/MCB.00026-13>

Mata, M. de la, Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., Kornblihtt, A.R., 2003. A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo. *Mol. Cell* 12, 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001>

Matsuoka, M., Yoshida, K., Maeda, T., Usuda, S., Sakano, H., 1990. Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 62, 135–142. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90247-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90247-c)

Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J., Chaudhuri, J., 2014. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* 122, 1–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00001-8>

- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., Gerlo, S., 2014. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem. Sci.* 39, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.008>
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., Oettinger, M.A., 1995. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387–395. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90116-7)
- McCloy, G., Banerjee, S., 2018. Cell-Penetrating Peptides to Enhance Delivery of Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Biomedicines* 6. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020051>
- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Carlson, L.M., Petryniak, B., Barth, C.F., Humphries, E.H., Thompson, C.B., 1989. Chicken IgL gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell* 56, 785–791. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90683-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90683-1)
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., McHeyzer-Williams, L., 2011. Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 24–34. <https://doi.org/10.1038/nri3128>
- Meissner, J.M., Toporkiewicz, M., Czogalla, A., Matuszewicz, L., Kuliczowski, K., Sikorski, A.F., 2015. Novel antisense therapeutics delivery systems: In vitro and in vivo studies of liposomes targeted with anti-CD20 antibody. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 220, 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.015>
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., Jäck, H.-M., Voll, R.E., 2007. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* 67, 1783–1792. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2258>
- Mendell, J.T., Medghalchi, S.M., Lake, R.G., Noensie, E.N., Dietz, H.C., 2000. Novel Upf2p orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8944–8957. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.23.8944-8957.2000>
- Mendell, J.T., Rhys, C.M.J. ap, Dietz, H.C., 2002. Separable Roles for rent1/hUpf1 in Altered Splicing and Decay of Nonsense Transcripts. *Science* 298, 419–422. <https://doi.org/10.1126/science.1074428>
- Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., Dietz, H.C., 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* 36, 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/ng1429>
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., Cambier, J.C., 2006. Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 25, 953–962. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.017>
- Mesin, L., Ersching, J., Victora, G.D., 2016. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 45, 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001>

- Metze, S., Herzog, V.A., Ruepp, M.-D., Mühlemann, O., 2013. Comparison of EJC-enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways. *RNA N. Y. N* 19, 1432–1448. <https://doi.org/10.1261/rna.038893.113>
- Mielke, N., Schwarzer, R., Calkhoven, C.F., Kaufman, R.J., Dörken, B., Leutz, A., Jundt, F., 2011. Eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation is required for B-cell maturation and function in mice. *Haematologica* 96, 1261–1268. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.042853>
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>
- Milan, E., Fabbri, M., Cenci, S., 2016. Autophagy in Plasma Cell Ontogeny and Malignancy. *J. Clin. Immunol.* 36, 18–24. <https://doi.org/10.1007/s10875-016-0254-9>
- Min, E.E., Roy, B., Amrani, N., He, F., Jacobson, A., 2013. Yeast Upf1 CH domain interacts with Rps26 of the 40S ribosomal subunit. *RNA* 19, 1105–1115. <https://doi.org/10.1261/rna.039396.113>
- Mittrücker, H.W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kündig, T.M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P.S., Mak, T.W., 1997. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275, 540–543. <https://doi.org/10.1126/science.275.5299.540>
- Mizushima, N., Komatsu, M., 2011. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147, 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Mizushima, N., Levine, B., 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 12, 823–830. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-823>
- Mohn, F., Bühler, M., Mühlemann, O., 2005. Nonsense-associated alternative splicing of T-cell receptor beta genes: no evidence for frame dependence. *RNA N. Y. N* 11, 147–156. <https://doi.org/10.1261/rna.7182905>
- Moore, K., Hollien, J., 2015. Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Mol. Biol. Cell* 26, 2873–2884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0074>
- Moreau, P., Richardson, P.G., Cavo, M., Orłowski, R.Z., San Miguel, J.F., Palumbo, A., Harousseau, J.-L., 2012. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 120, 947–959. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-403733>
- Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Rajewsky, K., 2004. The Lingering Enigma of the Allelic Exclusion Mechanism. *Cell* 118, 539–544. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.023>
- Müller-McNicoll, M., Botti, V., de Jesus Domingues, A.M., Brandl, H., Schwich, O.D., Steiner, M.C., Curk, T., Poser, I., Zarnack, K., Neugebauer, K.M., 2016. SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export. *Genes Dev.* 30, 553–566. <https://doi.org/10.1101/gad.276477.115>

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00078-7)
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., Honjo, T., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18470>
- Nadanaka, S., Yoshida, H., Kano, F., Murata, M., Mori, K., 2004. Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 15, 2537–2548. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0693>
- Nagy, E., Maquat, L.E., 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* 23, 198–199. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01208-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01208-0)
- Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itoharu, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., Kozutsumi, Y., 2007. Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3008–3022. <https://doi.org/10.1128/MCB.02047-06>
- Needham, P.G., Guerriero, C.J., Brodsky, J.L., 2019. Chaperoning Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) and Protein Conformational Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033928>
- Nelson, S.F., Crosbie, R.H., Miceli, M.C., Spencer, M.J., 2009. Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 22, 532–538. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32832fd487>
- Nemazee, D., 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 281–294. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19>
- Nemazee, D., 1995. Does immunological tolerance explain the waste in the B-lymphocyte immune system? Experiment and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764, 397–401. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb55854.x>
- Neuberger, M.S., Di Noia, J.M., Beale, R.C.L., Williams, G.T., Yang, Z., Rada, C., 2005. Somatic hypermutation at A.T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 171–178. <https://doi.org/10.1038/nri1553>
- Neu-Yilik, G., Raimondeau, E., Eliseev, B., Yeramala, L., Amthor, B., Deniaud, A., Huard, K., Kerschgens, K., Hentze, M.W., Schaffitzel, C., Kulozik, A.E., 2017. Dual function of UPF3B in early and late translation termination. *EMBO J.* 36, 2968–2986. <https://doi.org/10.15252/embj.201797079>
- Nicholson, P., Josi, C., Kurosawa, H., Yamashita, A., Mühlemann, O., 2014. A novel phosphorylation-independent interaction between SMG6 and UPF1 is essential for human NMD. *Nucleic Acids Res.* 42, 9217–9235. <https://doi.org/10.1093/nar/gku645>

- Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M.-J., Littman, D.R., Zou, Y.-R., 2004. The Role of CXCR4 in Maintaining Peripheral B Cell Compartments and Humoral Immunity. *J. Exp. Med.* 200, 1145–1156. <https://doi.org/10.1084/jem.20041185>
- Niirio, H., Clark, E.A., 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956. <https://doi.org/10.1038/nri955>
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H., 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 16, 1345–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.992302>
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A.S., Terzic, J., Dötsch, V., Ney, P.A., Dikic, I., 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 11, 45–51. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.256>
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., Ron, D., 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22, 1180–1187. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg112>
- Novobrantseva, T., Xu, S., Tan, J.E.-L., Maruyama, M., Schwers, S., Pelanda, R., Lam, K.-P., 2005. Stochastic pairing of Ig heavy and light chains frequently generates B cell antigen receptors that are subject to editing in vivo. *Int. Immunol.* 17, 343–350. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh214>
- Nowak, U., Matthews, A.J., Zheng, S., Chaudhuri, J., 2011. The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* 12, 160–166. <https://doi.org/10.1038/ni.1977>
- Nowakowski, G.S., Dooner, M.S., Valinski, H.M., Mihaliak, A.M., Quesenberry, P.J., Becker, P.S., 2004. A Specific Heptapeptide from a Phage Display Peptide Library Homes to Bone Marrow and Binds to Primitive Hematopoietic Stem Cells. *STEM CELLS* 22, 1030–1038. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-6-1030>
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., Busslinger, M., 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556–562. <https://doi.org/10.1038/44076>
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner, A.R., Singh, H., Sciammas, R., 2013. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* 38, 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>
- Oerlemans, R., Franke, N.E., Assaraf, Y.G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C.R., Scheffer, G.L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., van der Heijden, J.W., Ylstra, B., Peters, G.J., Kaspers, G.L., Dijkmans, B.A.C., Scheper, R.J., Jansen, G., 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 112, 2489–2499. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-104950>

- Okata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F., Imaizumi, K., 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell Biol.* 26, 9220–9231. <https://doi.org/10.1128/MCB.01453-06>
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P., Ohno, S., 2003. Phosphorylation of hUPF1 Induces Formation of mRNA Surveillance Complexes Containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* 12, 1187–1200. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00443-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00443-X)
- Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., Iwawaki, T., 2010. Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 α . *Nucleic Acids Res.* 38, 6265–6273. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq452>
- Okada, T., Cyster, J.G., 2006. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.02.005>
- Okada-Katsuhata, Y., Yamashita, A., Kutsuzawa, K., Izumi, N., Hirahara, F., Ohno, S., 2012. N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Res.* 40, 1251–1266. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr791>
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Ohsumi, Y., 2009. Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev. Cell* 17, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>
- Oliva, L., Orfanelli, U., Resnati, M., Raimondi, A., Orsi, A., Milan, E., Palladini, G., Milani, P., Cerruti, F., Cascio, P., Casarini, S., Rognoni, P., Touvier, T., Marcatti, M., Ciceri, F., Mangiacavalli, S., Corso, A., Merlini, G., Cenci, S., 2017. The amyloidogenic light chain is a stressor that sensitizes plasma cells to proteasome inhibitor toxicity. *Blood* 129, 2132–2142. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-730978>
- Oliver, A.M., Martin, F., Gartland, G.L., Carter, R.H., Kearney, J.F., 1997. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* 27, 2366–2374. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270935>
- Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., Tarlinton, D.M., 2010. Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* 237, 140–159. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00940.x>
- Oren, Y.S., McClure, M.L., Rowe, S.M., Sorscher, E.J., Bester, A.C., Manor, M., Kerem, E., Rivlin, J., Zahdeh, F., Mann, M., Geiger, T., Kerem, B., 2014. The unfolded protein response affects readthrough of premature termination codons. *EMBO Mol. Med.* 6, 685–701. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303347>
- Osborn, M.F., Khvorova, A., 2018. Improving siRNA Delivery In Vivo Through Lipid Conjugation. *Nucleic Acid Ther.* 28, 128–136. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0725>
- Ottens, F., Gehring, N.H., 2016. Physiological and pathophysiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Pflugers Arch.* 468, 1013–1028. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1826-5>

- Pabon-Martinez, Y.V., Xu, Y., Villa, A., Lundin, K.E., Geny, S., Nguyen, C.-H., Pedersen, E.B., Jørgensen, P.T., Wengel, J., Nilsson, L., Smith, C.I.E., Zain, R., 2017. LNA effects on DNA binding and conformation: from single strand to duplex and triplex structures. *Sci. Rep.* 7, 11043. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09147-8>
- Pagani, F., Baralle, F.E., 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat. Rev. Genet.* 5, 389–396. <https://doi.org/10.1038/nrg1327>
- Pagani, F., Buratti, E., Stuani, C., Baralle, F.E., 2003. Missense, Nonsense, and Neutral Mutations Define Juxtaposed Regulatory Elements of Splicing in Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Exon 9. *J. Biol. Chem.* 278, 26580–26588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212813200>
- Paik, J., Duggan, S., 2019. Volanesorsen: First Global Approval. *Drugs* 79, 1349–1354. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01168-z>
- Park, S.-K., Xiang, Y., Feng, X., Garrard, W.T., 2014. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 28, 1159–1164. <https://doi.org/10.1101/gad.237479.114>
- Parker, M.J., Licence, S., Erlandsson, L., Galler, G.R., Chakalova, L., Osborne, C.S., Morgan, G., Fraser, P., Jumaa, H., Winkler, T.H., Skok, J., Mårtensson, I.-L., 2005. The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *EMBO J.* 24, 3895–3905. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600850>
- Paschalis, A., Sharp, A., Welti, J.C., Neeb, A., Raj, G.V., Luo, J., Plymate, S.R., de Bono, J.S., 2018. Alternative splicing in prostate cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 663–675. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0085-0>
- Patel, S.B., Bellini, M., 2008. The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res.* 36, 6482–6493. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn658>
- Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V., Nieland, T.J., Root, D.E., Casellas, R., Nussenzweig, M.C., 2010. Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 143, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.017>
- Peixeiro, I., Inácio, Â., Barbosa, C., Silva, A.L., Liebhaber, S.A., Romão, L., 2012. Interaction of PABPC1 with the translation initiation complex is critical to the NMD resistance of AUG-proximal nonsense mutations. *Nucleic Acids Res.* 40, 1160–1173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr820>
- Peled, D., Daube, S.S., Naaman, R., 2008. Selective Enzymatic Labeling To Detect Packing-Induced Denaturation of Double-Stranded DNA at Interfaces. *Langmuir* 24, 11842–11846. <https://doi.org/10.1021/la801437n>
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., Scharff, M.D., 2008. The Biochemistry of Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 481–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090236>

- Pengo, N., Scolari, M., Oliva, L., Milan, E., Mainoldi, F., Raimondi, A., Fagioli, C., Merlini, A., Mariani, E., Pasqualetto, E., Orfanelli, U., Ponzoni, M., Sitia, R., Casola, S., Cenci, S., 2013. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat. Immunol.* 14, 298–305. <https://doi.org/10.1038/ni.2524>
- Peperzak, V., Vikström, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., 2013. Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat. Immunol.* 14, 290–297. <https://doi.org/10.1038/ni.2527>
- Pérez-Durán, P., Belver, L., de Yébenes, V.G., Delgado, P., Pisano, D.G., Ramiro, A.R., 2012. UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 209, 1379–1389. <https://doi.org/10.1084/jem.20112253>
- Peters, J.-M., 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931–943. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00540-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00540-3)
- Ph, G., K, S., Fw, A., 2008. Sgamma3 switch sequences function in place of endogenous Sgamma1 to mediate antibody class switching. *J. Exp. Med.* 205, 1567–1572. <https://doi.org/10.1084/jem.20080451>
- Pillai, S., Cariappa, A., 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777. <https://doi.org/10.1038/nri2656>
- Pillai, S., Cariappa, A., Moran, S.T., 2005. Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 161–196. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728>
- Pincus, D., Chevalier, M.W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S.E., El-Samad, H., Walter, P., 2010. BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response. *PLoS Biol.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000415>
- Pongubala, J.M., Beveren, C.V., Nagulapalli, S., Klemsz, M.J., McKercher, Maki, R.A., Atchison, M.L., 1993. Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science* 259, 1622–1625. <https://doi.org/10.1126/science.8456286>
- Pongubala, J.M., Nagulapalli, S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A., Atchison, M.L., 1992. PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin kappa 3' enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* 12, 368–378. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.1.368>
- Popp, M.W., Maquat, L.E., 2016. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell* 165, 1319–1322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.053>
- Pradeepa, M.M., Sutherland, H.G., Ule, J., Grimes, G.R., Bickmore, W.A., 2012. Psip1/Ledgf p52 Binds Methylated Histone H3K36 and Splicing Factors and Contributes to the Regulation of Alternative Splicing. *PLOS Genet.* 8, e1002717. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002717>
- Prak, E.L., Weigert, M., 1995. Light chain replacement: a new model for antibody gene rearrangement. *J. Exp. Med.* 182, 541–548. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.541>
- Prakash, T.P., 2011. An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics. *Chem. Biodivers.* 8, 1616–1641. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100081>

Prakash, T.P., Siwkowski, A., Allerson, C.R., Migawa, M.T., Lee, S., Gaus, H.J., Black, C., Seth, P.P., Swayze, E.E., Bhat, B., 2010. Antisense Oligonucleotides Containing Conformationally Constrained 2',4'-(N-Methoxy)aminomethylene and 2',4'-Aminooxymethylene and 2'-O,4'-C-Aminomethylene Bridged Nucleoside Analogues Show Improved Potency in Animal Models. *J. Med. Chem.* 53, 1636–1650. <https://doi.org/10.1021/jm9013295>

Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., Strasser, A., 2007. ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>

Qi, H., 2016. T follicular helper cells in space-time. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 612–625. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.94>

Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., Germain, R.N., 2008. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769. <https://doi.org/10.1038/nature07345>

Rada, C., Ehrenstein, M.R., Neuberger, M.S., Milstein, C., 1998. Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting. *Immunity* 9, 135–141. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80595-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80595-6)

Rada, C., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., Neuberger, M.S., 2002. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol.* CB 12, 1748–1755. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01215-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01215-0)

Radic, M.Z., Erikson, J., Litwin, S., Weigert, M., 1993. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp. Med.* 177, 1165–1173. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.1165>

Rahhal, R., Seto, E., 2019. Emerging roles of histone modifications and HDACs in RNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 47, 4911–4926. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz292>

Rajewsky, K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751–758. <https://doi.org/10.1038/381751a0>

Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol. Lett.* 148, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>

Recaldin, T., Fear, D.J., 2016. Transcription factors regulating B cell fate in the germinal centre. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 65–75. <https://doi.org/10.1111/cei.12702>

Reid, D.W., Nicchitta, C.V., 2015. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 221–231. <https://doi.org/10.1038/nrm3958>

Reimold, A., Ponath, P., Li, Y., Hardy, R., David, C., Strominger, J., Glimcher, L., 1996. Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J. Exp. Med.* 183, 393–401. <https://doi.org/DOI:10.1084/jem.183.2.393>

- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., Glimcher, L.H., 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307. <https://doi.org/10.1038/35085509>
- Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2004. ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J. Exp. Med.* 200, 1103–1110. <https://doi.org/10.1084/jem.20041162>
- Reina-San-Martin, B., Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R.F., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2003. H2AX Is Required for Recombination Between Immunoglobulin Switch Regions but Not for Intra-Switch Region Recombination or Somatic Hypermutation. *J. Exp. Med.* 197, 1767–1778. <https://doi.org/10.1084/jem.20030569>
- Reth, M., Nielsen, P., 2014. Signaling circuits in early B-cell development. *Adv. Immunol.* 122, 129–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00004-3>
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeau, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., Durandy, A., 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00079-9)
- Rinaldi, C., Wood, M.J.A., 2018. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.148>
- Rissland, O.S., 2017. The organization and regulation of mRNA–protein complexes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 8. <https://doi.org/10.1002/wrna.1369>
- Robin, V., Griffith, G., Carter, J.-P.L., Leumann, C.J., Garcia, L., Goyenvallé, A., 2017. Efficient SMN Rescue following Subcutaneous Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotide Treatment. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 7, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.02.009>
- Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739–779. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.739>
- Roignant, J.-Y., Treisman, J.E., 2010. Exon junction complex subunits are required to splice *Drosophila* MAP kinase, a large heterochromatic gene. *Cell* 143, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.036>
- Röllig, C., Knop, S., Bornhäuser, M., 2015. Multiple myeloma. *Lancet Lond. Engl.* 385, 2197–2208. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60493-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60493-1)
- Ron, D., Habener, J.F., 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6, 439–453. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.439>
- Ron, D., Walter, P., 2007a. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>

- Ron, D., Walter, P., 2007b. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Rosati, E., Dowds, C.M., Liaskou, E., Henriksen, E.K.K., Karlsen, T.H., Franke, A., 2017. Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. *BMC Biotechnol.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0379-9>
- Roth, D.B., 2014. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014>
- Roth, D.B., Chang, X.B., Wilson, J.H., 1989. Comparison of filler DNA at immune, nonimmune, and oncogenic rearrangements suggests multiple mechanisms of formation. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3049–3057. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.7.3049>
- Roy, D., Yu, K., Lieber, M.R., 2008. Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences. *Mol. Cell. Biol.* 28, 50–60. <https://doi.org/10.1128/MCB.01251-07>
- Rubtsov, A.V., Swanson, C.L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R., Torres, R.M., 2008. TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 3882–3888. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3882>
- Saarbach, J., Sabale, P.M., Winssinger, N., 2019. Peptide nucleic acid (PNA) and its applications in chemical biology, diagnostics, and therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol., Synthetic Biology • Synthetic Biomolecules* 52, 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.06.006>
- Sandberg, Y., Gastel-Mol, E.J. van, Verhaaf, B., Lam, K.H., Dongen, J.J.M. van, Langerak, A.W., 2005. BIOMED-2 Multiplex Immunoglobulin/T-Cell Receptor Polymerase Chain Reaction Protocols Can Reliably Replace Southern Blot Analysis in Routine Clonality Diagnostics. *J. Mol. Diagn.* 7, 495–503. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60580-6](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60580-6)
- Sano, R., Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1833. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Satake, N., Duong, C., Yoshida, S., Oestergaard, M., Chen, C., Peralta, R., Guo, S., Seth, P.P., Li, Y., Beckett, L., Chung, J., Nolte, J., Nitin, N., Tuscano, J.M., 2016. Novel Targeted Therapy for Precursor B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: anti-CD22 Antibody-MXD3 Antisense Oligonucleotide Conjugate. *Mol. Med. Camb. Mass* 22, 632–642. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00210>
- Sato, H., Hosoda, N., Maquat, L.E., 2008. Efficiency of the pioneer round of translation affects the cellular site of nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell* 29, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.009>
- Sato, H., Maquat, L.E., 2009. Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev.* 23, 2537–2550. <https://doi.org/10.1101/gad.1817109>
- Saulière, J., Murigneux, V., Wang, Z., Marquet, E., Barbosa, I., Le Tonquèze, O., Audic, Y., Paillard, L., Crollius, H.R., Le Hir, H., 2012. CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1124–1131. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2420>

- Schatz, D.G., Ji, Y., 2011. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263. <https://doi.org/10.1038/nri2941>
- Schatz, D.G., Spanopoulou, E., 2005. Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 290, 49–85. https://doi.org/10.1007/3-540-26363-2_4
- Scheijen, B., Meijers, R.W.J., Rijntjes, J., van der Klift, M.Y., Möbs, M., Steinhilber, J., Reigl, T., van den Brand, M., Kotrová, M., Ritter, J.-M., Catherwood, M.A., Stamatopoulos, K., Brüggemann, M., Davi, F., Darzentas, N., Pott, C., Fend, F., Hummel, M., Langerak, A.W., Groenen, P.J.T.A., 2019. Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia* 33, 2227–2240. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0508-7>
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T., Ballard, D.W., 1995. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11259–11263. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11259>
- Schlegel, A., Buhler, C., Devun, F., Agrario, C., Urien, S., Lokiec, F., Sun, J.-S., Dutreix, M., 2012. Pharmacokinetics and Toxicity in Rats and Monkeys of coDbait: A Therapeutic Double-stranded DNA Oligonucleotide Conjugated to Cholesterol. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 1, e33. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.27>
- Schlissel, M.S., 2002. Does artemis end the hunt for the hairpin-opening activity in V(D)J recombination? *Cell* 109, 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00694-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00694-3)
- Schmidt, S.A., Foley, P.L., Jeong, D.-H., Rymarquis, L.A., Doyle, F., Tenenbaum, S.A., Belasco, J.G., Green, P.J., 2015. Identification of SMG6 cleavage sites and a preferred RNA cleavage motif by global analysis of endogenous NMD targets in human cells. *Nucleic Acids Res.* 43, 309–323. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1258>
- Schmidt, U., Richter, K., Berger, A.B., Lichter, P., 2006. In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *J. Cell Biol.* 172, 373–381. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503061>
- Schoenberg, D.R., Maquat, L.E., 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 13, 246–259. <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- Schwartz, S., Meshorer, E., Ast, G., 2009. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 990–995. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1659>
- Schweingruber, C., Rufener, S.C., Zünd, D., Yamashita, A., Mühlemann, O., 2013. Nonsense-mediated mRNA decay — Mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech., RNA Decay Mechanisms* 1829, 612–623. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.02.005>
- Sciammas, R., Li, Y., Warmflash, A., Song, Y., Dinner, A.R., Singh, H., 2011. An incoherent regulatory network architecture that orchestrates B cell diversification in response to antigen signaling. *Mol. Syst. Biol.* 7, 495. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.25>
- Seidl, K.J., Bottaro, A., Vo, A., Zhang, J., Davidson, L., Alt, F.W., 1998. An expressed neo(r) cassette provides required functions of the Igamma2b exon for class switching. *Int. Immunol.* 10, 1683–1692. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.11.1683>

- Seki, M., Gearhart, P.J., Wood, R.D., 2005. DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Rep.* 6, 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400582>
- Serin, G., Gersappe, A., Black, J.D., Aronoff, R., Maquat, L.E., 2001. Identification and Characterization of Human Orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 Protein and Upf3 Protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.* 21, 209–223. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.209-223.2001>
- Seth, P.P., Siwkowski, A., Allerson, C.R., Vasquez, G., Lee, S., Prakash, T.P., Wancewicz, E.V., Witchell, D., Swayze, E.E., 2009. Short Antisense Oligonucleotides with Novel 2'–4' Conformationally Restricted Nucleoside Analogues Show Improved Potency without Increased Toxicity in Animals. *J. Med. Chem.* 52, 10–13. <https://doi.org/10.1021/jm801294h>
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltneane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., Staudt, L.M., 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00335-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00335-7)
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H., Staudt, L.M., 2004. XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. *Immunity* 21, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.010>
- Shamu, C.E., Walter, P., 1996. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* 15, 3028–3039.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R., 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00203-4)
- Shen, X., Corey, D.R., 2018. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, 1584–1600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239>
- Shenasa, H., Hertel, K.J., 2019. Combinatorial regulation of alternative splicing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*, RNA structure and splicing regulation 1862, 194392. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.06.003>
- Sheppard, E.C., Morrish, R.B., Dillon, M.J., Leyland, R., Chahwan, R., 2018. Epigenomic Modifications Mediating Antibody Maturation. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00355>
- Shigeoka, T., Kato, S., Kawaichi, M., Ishida, Y., 2012. Evidence that the Upf1-related molecular motor scans the 3'-UTR to ensure mRNA integrity. *Nucleic Acids Res.* 40, 6887–6897. <https://doi.org/10.1093/nar/gks344>
- Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., 2003. The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* 4, 435–441. <https://doi.org/10.1038/ni918>

- Shlomchik, M.J., Weisel, F., 2012. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* 247, 52–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01124.x>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2019. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Silva, A.L., Ribeiro, P., Inácio, A., Liebhaber, S.A., Romão, L., 2008. Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA N. Y. N* 14, 563–576. <https://doi.org/10.1261/rna.815108>
- Sims, R.J., Millhouse, S., Chen, C.-F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., Reinberg, D., 2007. Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell* 28, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.010>
- Singh, G., Rebbapragada, I., Lykke-Andersen, J., 2008. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 6, e111. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060111>
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Smith, A.J., Dai, H., Correia, C., Takahashi, R., Lee, S.-H., Schmitz, I., Kaufmann, S.H., 2011. Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 286, 17682–17692. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189092>
- Smith, C.I.E., Zain, R., 2019. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 59, 605–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021050>
- Smith, K.G.C., Hewitson, T.D., Nossal, G.J.V., Tarlinton, D.M., 1996. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur. J. Immunol.* 26, 444–448. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260226>
- So, J.-S., Cho, S., Min, S.-H., Kimball, S.R., Lee, A.-H., 2015. IRE1 α -Dependent Decay of CReP/Ppp1r15b mRNA Increases Eukaryotic Initiation Factor 2 α Phosphorylation and Suppresses Protein Synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2761–2770. <https://doi.org/10.1128/MCB.00215-15>
- Soergel, D.A.W., Lareau, L.F., Brenner, S.E., 2013. Regulation of Gene Expression by Coupling of Alternative Splicing and NMD, *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience.
- Spencer, E., Jiang, J., Chen, Z.J., 1999. Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP. *Genes Dev.* 13, 284–294. <https://doi.org/10.1101/gad.13.3.284>
- Srivastava, B., Quinn, W.J., Hazard, K., Erikson, J., Allman, D., 2005. Characterization of marginal zone B cell precursors. *J. Exp. Med.* 202, 1225–1234. <https://doi.org/10.1084/jem.20051038>

- Srouf, N., Chemin, G., Tinguely, A., Ashi, M.O., Oruc, Z., Péron, S., Sirac, C., Cogné, M., Delpy, L., 2016. A plasma cell differentiation quality control ablates B cell clones with biallelic Ig rearrangements and truncated Ig production. *J. Exp. Med.* 213, 109–122. <https://doi.org/10.1084/jem.20131511>
- Stanlie, A., Aida, M., Muramatsu, M., Honjo, T., Begum, N.A., 2010. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22190–22195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016923108>
- Stavnezer, J., Schrader, C.E., 2014. IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 5370–5378. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401849>
- Steckelberg, A.-L., Altmueller, J., Dieterich, C., Gehring, N.H., 2015. CWC22-dependent pre-mRNA splicing and eIF4A3 binding enables global deposition of exon junction complexes. *Nucleic Acids Res.* 43, 4687–4700. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv320>
- Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D.L., Bath, M.L., Adams, J.M., Cory, S., Harris, A.W., 1991. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8661–8665. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8661>
- Su, T.T., Guo, B., Wei, B., Braun, J., Rawlings, D.J., 2004. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol. Rev.* 197, 161–178. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0102.x>
- Sun, H., Chasin, L.A., 2000. Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6414–6425. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.17.6414-6425.2000>
- Sun, X., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Maquat, L.E., 1998. A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10009–10014. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10009>
- Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stévenin, J., Soret, J., 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J.* 20, 1785–1796. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1785>
- Syed, Y.Y., 2016. Eteplirsen: First Global Approval. *Drugs* 76, 1699–1704. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0657-1>
- Szeto, J., Kaniuk, N.A., Canadien, V., Nisman, R., Mizushima, N., Yoshimori, T., Bazett-Jones, D.P., Brumell, J.H., 2006. ALIS are Stress-Induced Protein Storage Compartments for Substrates of the Proteasome and Autophagy. *Autophagy* 2, 189–199. <https://doi.org/10.4161/auto.2731>
- Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
- Tanaka, K., 1994. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J. Leukoc. Biol.* 56, 571–575. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.5.571>

- Tang, C.-H.A., Chang, S., Paton, A.W., Paton, J.C., Gabrilovich, D.I., Ploegh, H.L., Del Valle, J.R., Hu, C.-C.A., 2018. Phosphorylation of IRE1 at S729 regulates RIDD in B cells and antibody production after immunization. *J. Cell Biol.* 217, 1739–1755. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709137>
- Tange, T.Ø., Shibuya, T., Jurica, M.S., Moore, M.J., 2005. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* 11, 1869–1883. <https://doi.org/10.1261/rna.2155905>
- Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., de Vries, J.E., 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188, 1691–1703. <https://doi.org/10.1084/jem.188.9.1691>
- Tani, H., Imamachi, N., Salam, K.A., Mizutani, R., Ijiri, K., Irie, T., Yada, T., Suzuki, Y., Akimitsu, N., 2012. Identification of hundreds of novel UPF1 target transcripts by direct determination of whole transcriptome stability. *RNA Biol.* 9, 1370–1379. <https://doi.org/10.4161/rna.22360>
- Taubenheim, N., Tarlinton, D.M., Crawford, S., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Nutt, S.L., 2012. High Rate of Antibody Secretion Is not Integral to Plasma Cell Differentiation as Revealed by XBP-1 Deficiency. *J. Immunol.* 189, 3328–3338. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201042>
- Tellier, J., Nutt, S.L., 2019. Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. *Eur. J. Immunol.* 49, 30–37. <https://doi.org/10.1002/eji.201847517>
- Tellier, J., Shi, W., Minnich, M., Liao, Y., Crawford, S., Smyth, G.K., Kallies, A., Busslinger, M., Nutt, S.L., 2016. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* 17, 323–330. <https://doi.org/10.1038/ni.3348>
- ten Boekel, E., Melchers, F., Rolink, A., 1995. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int. Immunol.* 7, 1013–1019. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.6.1013>
- Teng, G., Schatz, D.G., 2015. Chapter One - Regulation and Evolution of the RAG Recombinase, in: Murre, C. (Ed.), *Advances in Immunology, Molecular Mechanisms That Orchestrate the Assembly of Antigen Receptor Loci*. Academic Press, pp. 1–39. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.07.002>
- Thomson, A.W., Turnquist, H.R., Raimondi, G., 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 324–337. <https://doi.org/10.1038/nri2546>
- Thwaites, D.T., Carter, C., Lawless, D., Savic, S., Boyes, J.M., 2019. A novel RAG1 mutation reveals a critical in vivo role for HMGB1/2 during V(D)J recombination. *Blood* 133, 820–829. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-866939>
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., Nemazee, D., 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* 177, 1009–1020. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.1009>

Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., Delpy, L., 2012. Cross Talk between Immunoglobulin Heavy-Chain Transcription and RNA Surveillance during B Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* 32, 107–117. <https://doi.org/10.1128/MCB.06138-11>

Tirasophon, W., Welihinda, A.A., Kaufman, R.J., 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12, 1812–1824. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1812>

Todd, D.J., McHeyzer-Williams, L.J., Kowal, C., Lee, A.-H., Volpe, B.T., Diamond, B., McHeyzer-Williams, M.G., Glimcher, L.H., 2009. XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* 206, 2151–2159. <https://doi.org/10.1084/jem.20090738>

Toma, K.G., Rebbapragada, I., Durand, S., Lykke-Andersen, J., 2015. Identification of elements in human long 3' UTRs that inhibit nonsense-mediated decay. *RNA N. Y. N* 21, 887–897. <https://doi.org/10.1261/rna.048637.114>

Tomayko, M.M., Steinel, N.C., Anderson, S.M., Shlomchik, M.J., 2010. Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 7146–7150. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002163>

Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581. <https://doi.org/10.1038/302575a0>

Tsuru, A., Fujimoto, N., Takahashi, S., Saito, M., Nakamura, D., Iwano, M., Iwawaki, T., Kadokura, H., Ron, D., Kohno, K., 2013. Negative feedback by IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2864–2869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212484110>

The UniProt Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>

Unterholzner, L., Izaurralde, E., 2004. SMG7 Acts as a Molecular Link between mRNA Surveillance and mRNA Decay. *Mol. Cell* 16, 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.013>

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>

Urrea, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Hetz, C., 2013. When ER stress reaches a dead end. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3507–3517. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.024>

Usuki, F., Yamashita, A., Higuchi, I., Ohnishi, T., Shiraishi, T., Osame, M., Ohno, S., 2004. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann. Neurol.* 55, 740–744. <https://doi.org/10.1002/ana.20107>

Vaidyanathan, B., Yen, W.-F., Pucella, J.N., Chaudhuri, J., 2014. AIDing Chromatin and Transcription-Coupled Orchestration of Immunoglobulin Class-Switch Recombination. *Front. Immunol.* 5, 120. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00120>

- Valentine, C.R., 1998. The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat. Res.* 411, 87–117. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(98\)00010-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(98)00010-6)
- van de Donk, N.W.C.J., Usmani, S.Z., 2018. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02134>
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Doherty, P.C., Tonegawa, S., 1994. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1, 533–541. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90043-4)
- Vanderkerken, K., De Raeve, H., Goes, E., Van Meirvenne, S., Radl, J., Van Riet, I., Thielemans, K., Van Camp, B., 1997. Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse. *Br. J. Cancer* 76, 451–460. <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.409>
- Venkatesh, S., Workman, J.L., 2015. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 178–189. <https://doi.org/10.1038/nrm3941>
- Vickers, T.A., Crooke, S.T., 2015. The rates of the major steps in the molecular mechanism of RNase H1-dependent antisense oligonucleotide induced degradation of RNA. *Nucleic Acids Res.* 43, 8955–8963. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv920>
- Victora, G.D., Nussenzweig, M.C., 2012. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
- Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., 2010. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032>
- Viegas, M.H., Gehring, N.H., Breit, S., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2007. The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway. *Nucleic Acids Res.* 35, 4542–4551. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm461>
- Vihinen, M., Kwan, S.-P., Lester, T., Ochs, H.D., Resnick, I., Väliäho, J., Conley, M.E., Smith, C.I.E., 1999. Mutations of the human BTK gene coding for bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. *Hum. Mutat.* 13, 280–285. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)13:4<280::AID-HUMU3>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:4<280::AID-HUMU3>3.0.CO;2-L)
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., MacLennan, I.C.M., 2016. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 335–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055605>
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015–1068. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.1015>
- von Schwedler, U., Jäck, H.M., Wabl, M., 1990. Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* 345, 452–456. <https://doi.org/10.1038/345452a0>

- Wajant, H., 2002. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science* 296, 1635–1636. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>
- Walker, B.A., Wardell, C.P., Johnson, D.C., Kaiser, M.F., Begum, D.B., Dahir, N.B., Ross, F.M., Davies, F.E., Gonzalez, D., Morgan, G.J., 2013. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood* 121, 3413–3419. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-471888>
- Wallin, J.J., Gackstetter, E.R., Koshland, M.E., 1998. Dependence of BSAP repressor and activator functions on BSAP concentration. *Science* 279, 1961–1964. <https://doi.org/10.1126/science.279.5358.1961>
- Wallin, J.J., Rinkenberger, J.L., Rao, S., Gackstetter, E.R., Koshland, M.E., Zwollo, P., 1999. B cell-specific activator protein prevents two activator factors from binding to the immunoglobulin J chain promoter until the antigen-driven stages of B cell development. *J. Biol. Chem.* 274, 15959–15965. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15959>
- Walter, P., Ron, D., 2011. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334, 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>
- Wang, B.-D., Lee, N.H., 2018. Aberrant RNA Splicing in Cancer and Drug Resistance. *Cancers* 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10110458>
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S., 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680–1683. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1680>
- Wang, D., Wengrod, J., Gardner, L.B., 2011. Overexpression of the c-myc oncogene inhibits nonsense-mediated RNA decay in B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 40038–40043. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266361>
- Wang, J., Chang, Y.-F., Hamilton, J.I., Wilkinson, M.F., 2002a. Nonsense-Associated Altered Splicing: A Frame-Dependent Response Distinct from Nonsense-Mediated Decay. *Mol. Cell* 10, 951–957. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00635-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00635-4)
- Wang, J., Hamilton, J.I., Carter, M.S., Li, S., Wilkinson, M.F., 2002b. Alternatively Spliced TCR mRNA Induced by Disruption of Reading Frame. *Science* 297, 108–110. <https://doi.org/10.1126/science.1069757>
- Wang, W., Czaplinski, K., Rao, Y., Peltz, S.W., 2001. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO J.* 20, 880–890. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.880>
- Wang, X., Fan, M., Kalis, S., Wei, L., Scharff, M.D., 2014. A source of the single-stranded DNA substrate for activation-induced deaminase during somatic hypermutation. *Nat. Commun.* 5, 4137. <https://doi.org/10.1038/ncomms5137>
- Wang, Y., Bhattacharya, D., 2014. Adjuvant-specific regulation of long-term antibody responses by ZBTB20. *J. Exp. Med.* 211, 841–856. <https://doi.org/10.1084/jem.20131821>

- Wang, Z., Murigneux, V., Le Hir, H., 2014. Transcriptome-wide modulation of splicing by the exon junction complex. *Genome Biol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0551-7>
- Wasungu, L., Hoekstra, D., 2006. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 116, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.024>
- Weng, Y., Czaplinski, K., Peltz, S.W., 1998. ATP is a cofactor of the Upf1 protein that modulates its translation termination and RNA binding activities. *RNA* 4, 205–214.
- Weng, Y., Czaplinski, K., Peltz, S.W., 1996a. Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5477–5490. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5477>
- Weng, Y., Czaplinski, K., Peltz, S.W., 1996b. Identification and characterization of mutations in the UPF1 gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5491–5506. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5491>
- Weterings, E., Chen, D.J., 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* 18, 114–124. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.3>
- Wierzbicki, A.T., Ream, T., Haag, J.R., Pikaard, C.S., 2009. RNA Polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* 41, 630–634. <https://doi.org/10.1038/ng.365>
- Wilk, S., Orlowski, M., 1980. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J. Neurochem.* 35, 1172–1182. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb07873.x>
- Wilkinson, M.E., Charenton, C., Nagai, K., 2019. RNA Splicing by the Spliceosome. *Annu. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>
- Winkler, T.H., Mårtensson, I.-L., 2018. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02423>
- Winston, J.T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C.Y., Elledge, S.J., Harper, J.W., 1999. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* 13, 270–283. <https://doi.org/10.1101/gad.13.3.270>
- Witztum, J.L., Gaudet, D., Freedman, S.D., Alexander, V.J., Digenio, A., Williams, K.R., Yang, Q., Hughes, S.G., Geary, R.S., Arca, M., Stroes, E.S.G., Bergeron, J., Soran, H., Civeira, F., Hemphill, L., Tsimikas, S., Blom, D.J., O’Dea, L., Bruckert, E., 2019. Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 381, 531–542. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715944>
- Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E.M., Zimmermann, T., Koteliensky, V., Manoharan, M., Stoffel, M., 2007. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 25, 1149–1157. <https://doi.org/10.1038/nbt1339>

- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Sun, H.-Y., Li, A., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., Wang, X., Ma, H.-L., Huang, C.-M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G.-B., Wang, H.-L., Zhou, Q., Wang, X.-J., Zhao, Y.-L., Yang, Y.-G., 2016. Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol. Cell* 61, 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., Casali, P., 2012. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531. <https://doi.org/10.1038/nri3216>
- Xue, Y., Zhou, Y., Wu, T., Zhu, T., Ji, X., Kwon, Y.-S., Zhang, C., Yeo, G., Black, D.L., Sun, H., Fu, X.-D., Zhang, Y., 2009. Genome-wide Analysis of PTB-RNA Interactions Reveals a Strategy Used by the General Splicing Repressor to Modulate Exon Inclusion or Skipping. *Mol. Cell* 36, 996–1006. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.003>
- Yamaguchi, H., Wang, H.-G., 2004. CHOP Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis by Enhancing DR5 Expression in Human Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 45495–45502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406933200>
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., Mori, K., 2004. Differential Contributions of ATF6 and XBP1 to the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive cis-Acting Elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 343–350. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh122>
- Yamashita, A., 2013. Role of SMG-1-mediated Upf1 phosphorylation in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Cells* 18, 161–175. <https://doi.org/10.1111/gtc.12033>
- Yan, M.-M., Ni, J.-D., Song, D., Ding, M., Huang, J., 2015. Interplay between unfolded protein response and autophagy promotes tumor drug resistance (Review). *Oncol. Lett.* 10, 1959–1969. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3508>
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2000. ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00133-7)
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* 107, 881–891. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0)
- Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L., 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 280–284.
- Zarrin, A.A., Tian, M., Wang, J., Borjeson, T., Alt, F.W., 2005. Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 2466–2470. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409847102>
- Zhang, K., Wong, H.N., Song, B., Miller, C.N., Scheuner, D., Kaufman, R.J., 2005. The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J. Clin. Invest.* 115, 268–281. <https://doi.org/10.1172/JCI200521848>
- Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K., Cavener, D.R., 2002. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase

is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3864–3874. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.11.3864-3874.2002>

Zhang, W., Feng, D., Li, Y., Iida, K., McGrath, B., Cavener, D.R., 2006. PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab.* 4, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.002>

Zhang, Z., Krainer, A.R., 2004. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol. Cell* 16, 597–607. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.031>

Zheng, S., Vuong, B.Q., Vaidyanathan, B., Lin, J.-Y., Huang, F.-T., Chaudhuri, J., 2015. Non-coding RNA generated following lariat-debranching mediates targeting of AID to DNA. *Cell* 161, 762–773. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.020>

Zhou, J., Liu, C.Y., Back, S.H., Clark, R.L., Peisach, D., Xu, Z., Kaufman, R.J., 2006. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14343–14348. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606480103>

Zhou, P., Ma, X., Iyer, L., Chaulagain, C., Comenzo, R.L., 2014. One siRNA pool targeting the λ constant region stops λ light-chain production and causes terminal endoplasmic reticulum stress. *Blood* 123, 3440–3451. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535187>

Zhou, Z., Fu, X.-D., 2013. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* 122, 191–207. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0407-z>

Zhu, H., Bhatt, B., Sivaprakasam, S., Cai, Y., Liu, S., Kodeboyina, S.K., Patel, N., Savage, N.M., Sharma, A., Kaufman, R.J., Li, H., Singh, N., 2019. Ufbp1 promotes plasma cell development and ER expansion by modulating distinct branches of UPR. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08908-5>

Zhu, Y.X., Tiedemann, R., Shi, C.-X., Yin, H., Schmidt, J.E., Bruins, L.A., Keats, J.J., Braggio, E., Sereduk, C., Mousses, S., Stewart, A.K., 2011. RNAi screen of the druggable genome identifies modulators of proteasome inhibitor sensitivity in myeloma including CDK5. *Blood* 117, 3847–3857. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304022>

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D., 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12, 982–995.

Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J., Gélinas, C., 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13, 382–387. <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.382>

Zuccarino-Catania, G.V., Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., Shlomchik, M.J., 2014. CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat. Immunol.* 15, 631–637. <https://doi.org/10.1038/ni.2914>

Impact des immunoglobulines tronquées produites par saut d'exon dans les plasmocytes : vers des approches thérapeutiques utilisant des oligonucléotides antisens

Les projets développés au cours de cette thèse ont pour objectif d'explorer l'intérêt thérapeutique d'approches antisens ciblant les transcrits d'immunoglobulines (Ig) dans le traitement du myélome multiple (MM) et d'autres gammopathies monoclonales. Cette stratégie consiste à provoquer un saut d'exon à l'aide d'oligonucléotides antisens (ASO) pour induire la synthèse d'Ig tronquées et l'apoptose des plasmocytes tumoraux (Brevet WO 2017/089359). L'effet toxique des Ig sans domaine V résulte d'une amplification incontrôlée du stress du RE et de la réponse UPR (« Unfolded Protein Response »). Nous avons montré que des traitements à l'aide d'ASO dirigés contre les ARN pré-messagers de l'Ig monoclonale induisaient une forte toxicité dans des lignées de myélome et une régression tumorale dans un modèle de xéno greffe avec des injections intratumorales d'ASO. Bien que des améliorations en terme de biodistribution in vivo de ces ASO soient nécessaires, cette approche capable de cibler spécifiquement le clone tumoral en épargnant les plasmocytes sains pourrait permettre un traitement personnalisé des patients atteints de MM. De surcroît, nous avons également observé une diminution drastique de la production d'Ig à la suite d'un traitement par un ASO générique ciblant l'exon CH1 γ , aussi bien dans les LB humains stimulés ou dans des lignées de myélome; cet ASO pouvant être utilisé chez tous les patients exprimant une IgG. En parallèle, nous avons exploré les liens entre stress protéique et surveillance des ARN dans les plasmocytes. Contrairement aux données de la littérature concernant des cellules non-lymphoïdes, nous avons mis en évidence une coopération entre le mécanisme de NMD (« Nonsense-Mediated mRNA Decay ») et l'UPR (« Unfolded Protein Response ») dans les plasmocytes, qui est rendue possible grâce par une faible activation de la voie PERK de l'UPR. Cette thèse a pour but de mieux comprendre l'impact des Ig tronquées dans les cellules sécrétrices d'anticorps et le lien étroit entre survie des plasmocytes et stress protéique associé à la synthèse massive d'Ig.

Mots-clés : Immunoglobulines (Ig), Plasmocytes, Saut d'exon, Oligonucléotides antisens, NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay), UPR (Unfolded Protein Response)

Impact of truncated immunoglobulins produced by exon skipping in plasma cells: towards therapeutic approaches using antisense oligonucleotides

The thesis projects aimed to explore the therapeutic value of antisense approaches targeting immunoglobulin (Ig) transcripts in the treatment of multiple myeloma (MM) and other monoclonal gammopathies. This strategy consists in inducing an exon skipping using antisense oligonucleotides (ASO) to provoke the synthesis of truncated Ig and apoptosis of tumor plasma cells (Patent WO 2017/089359). The toxic effect V domain-less Ig is the consequence of an uncontrolled amplification of ER stress and the UPR (Unfolded Protein Response). We have shown that treatments with ASO directed against monoclonal Ig (mo-Ig) pre-mRNAs induced strong toxicity on myeloma cell lines and regression of tumor xenografts after intratumoral ASO injections. Although improvements in terms of in vivo biodistribution of ASOs are necessary, this approach capable of specifically destroying the tumor clone could allow a personalized treatment of MM patients and spare healthy plasma cells. We have also observed a drastic decrease in Ig production after treatment of stimulated human B cells or myeloma cells with a generic ASO targeting the exon CH1 γ that can be used in all patients expressing IgG. In parallel, we explored the relationship between protein stress and RNA surveillance in plasma cells. In contrast with previously published data from non-lymphoid cells, we have demonstrated a cooperation between the mechanism of NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay) and UPR in plasma cells, favored by the low activation of the PERK pathway of the UPR. Therefore, these works have shed new light on the impact of truncated Ig in antibody-secreting cells and, on the close link between the proteic stress associated with massive Ig synthesis and plasma cell survival.

Keywords : Immunoglobulin (Ig), Plasma cells, Exon skipping, antisense oligonucleotides, NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay), UPR (unfolded protein response)

