

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Biologie-Santé (ED 524)

Faculté de Médecine

UMR CNRS 6101

Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations  
Equipe « Génétique moléculaire de la cellule B et des syndromes immunoprolifératifs »

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialités : Immunologie – Biologie moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

**Guillaume CHEMIN**

le 13 Décembre 2011

**Etude de la surveillance des ARN  
d'Immunoglobulines au cours du développement  
lymphocytaire B**

Directeur de thèse : Dr. Laurent DELPY

**JURY**

Président :

M. Michel COGNE

Professeur des Universités - Université de Limoges

Rapporteurs :

M. Amine KHAMLICHI

Directeur de Recherche CNRS - Toulouse

M. Bertrand NADEL

Directeur de Recherche INSERM - Marseille

Examineur :

M. Saïd AOUFOUCHI

Directeur de Recherche CNRS - Paris



# Résumé

L'expression des immunoglobulines (Ig) par les lymphocytes B est assurée par des mécanismes particulièrement complexes et précisément régulés. Le processus aléatoire de recombinaisons V(D)J source de diversité du répertoire des lymphocytes B génère dans deux tiers des cas un décalage du cadre de lecture et à l'apparition d'un codon stop prématuré (PTC). Pour empêcher la traduction des transcrits contenant des PTC et, par conséquent la synthèse de protéines tronquées, la cellule utilise différents mécanismes de «contrôle qualité» des ARN. La thématique développée au cours de cette thèse a consisté à étudier ces mécanismes dits de «surveillance des ARN» au cours du développement lymphocytaire B, en utilisant les transcrits d'Ig issus de réarrangements V(D)J hors phase comme modèles.

Parmi les mécanismes de surveillance des ARN, l'inhibition d'épissage permet de limiter l'apparition de transcrits matures (ARNm) contenant des PTC et provoque une accumulation de transcrits primaires (pré-ARNm); le NAS (nonsense-associated altered splicing) permet d'éliminer l'exon contenant un PTC lors de l'épissage : phénomène de «saut d'exon»; et, le NMD (nonsense-mediated mRNA decay) permet de dégrader les ARNm contenant des PTC. Ces processus sont très actifs dans la lignée lymphoïde puisque l'apparition de PTC y est fréquemment observée. Nous avons étudié la surveillance des ARN de chaînes légères d'Igk et quantifié l'efficacité de ces différents mécanismes : NMD, NAS et inhibition d'épissage au cours de la maturation B (Chemin *et al.*, 2010). Cette étude a permis de montrer que la coopération entre ces processus individuellement peu efficaces permettait de diminuer drastiquement le taux d'ARNm Igk contenant des PTCs.

L'étude de la surveillance des ARNs de chaînes lourdes d'Ig a révélé une transcription identique des allèles productifs (VDJ<sup>+</sup>) et non-productifs (VDJ<sup>-</sup>) et, le lien étroit entre l'intensité de transcription, l'épissage et la dégradation par NMD au cours de l'activation B et de la différenciation plasmocytaire (Tinguely *et al.*, 2011).

Nous avons également analysé l'influence des séquences introniques sur le processus de NAS et montré que la présence de sites donneurs d'épissage au sein de l'intron Jk-Ck semble diminuer l'épissage alternatif de type L-Ck et favoriser la rétention de séquences introniques.

Enfin, nous avons mis en évidence l'existence d'une contre-sélection des cellules contenant des allèles Igk non productifs, présentant un PTC au sein de l'exon variable (classe VJ<sup>PTC</sup>), au cours du développement B et de la différenciation plasmocytaire. Cette diminution semble corrélée à une faible dégradation par NMD et à un fort épissage alternatif des transcrits issus des allèles VJ<sup>PTC</sup> (Chemin *et al.*, en préparation). Dans les 2 cas, ces transcrits peuvent conduire à la production d'Ig tronquées, potentiellement néfastes pour les cellules B et plasmocytaires. Bien que d'autres travaux soient nécessaires pour identifier l'impact physiologique des Ig tronquées, des approches thérapeutiques visant à induire la production d'Ig tronquées à l'aide d'inhibiteurs du NMD, pourraient être envisagées dans le traitement du myélome ou d'autres tumeurs lymphoïdes B.

# Abstract

During B cell development, random V(D)J junctions ensure that the diversity of the immunoglobulin (Ig) primary repertoire is adapted to the vast heterogeneity of antigens. In two thirds of cases, recombination between variable segments induces a frameshift in the open reading frame and generates a premature termination codon (PTC). In B cells harbouring bi-allelic V(D)J rearrangements of Ig genes, transcription is known to occur on both the functional and non-functional alleles, generating considerable amounts of PTC-containing transcripts. In this thesis, we analyzed the RNA surveillance of Ig transcripts during B cell development. The molecular machinery of RNA surveillance is now known to include various pathways all controlling the quality of pre-mRNA and mRNA and limiting the translation of truncated proteins. PTC within transcripts may result in: i) splicing inhibition of primary transcripts, ii) alternative splicing and skipping of the PTC-containing exon (nonsense-associated altered splicing: NAS) and, iii) degradation of mature transcripts by nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Since numerous out-of-frame V(D)J junctions can generate abundant nonsense transcripts, RNA surveillance pathways are very active in B cells and efficiently lowers the amount of PTC-containing Ig mRNAs.

We have analyzed the RNA surveillance of non-functional Ig *kappa* (Ig $\kappa$ ) transcripts arising from non-productive VJ rearrangement. We demonstrated that splicing inhibition, NMD and NAS cooperate to diminish the level of non-functional Ig $\kappa$  mRNA. Each process has an individual partial effect that together associate into efficient surveillance machinery. Moreover, we provide evidence that the RNA surveillance efficiency increases throughout B cell development (Chemin *et al.*, 2010).

The study of RNA surveillance of Ig heavy chain transcripts show that productively and nonproductively VDJ-rearranged alleles are transcribed throughout B cell development, carry similar active chromatin marks and even display equivalent RNAPII loading after B cell stimulation. Interestingly, the efficiency of downstream RNA surveillance mechanisms fluctuates according to B cell activation and terminal differentiation: unspliced nonfunctional transcripts accumulate in primary B cells, while B cell activation promotes IgH transcription, RNA splicing and nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Altogether, IgH transcription and RNA splicing rates determine by which RNA surveillance mechanisms, a B cell can get rid of nonproductive IgH mRNAs (Tinguely *et al.*, 2011).

We also analysed the impact of intronic sequences in the NAS pathway. Our data suggest that the presence of donor splice sites in the J $\kappa$ -C $\kappa$  intron decreases the rate of exon-skipping, while increasing the retention of intronic sequences during splicing.

Finally, we show that cells harbouring non-productive VJ $\kappa$  rearrangements, that lead to the appearance of a PTC in the variable exon (VJ<sup>PTC</sup> subclass), strongly disappear during B cell maturation and are nearly absent in plasma cells. Interestingly, this cellular counter-selection correlates with lower NMD degradation and higher alternative splicing of VJ<sup>PTC</sup>, compared to C<sup>PTC</sup> subclass transcripts (Chemin *et al.*, in preparation). In two cases, these transcripts can be translated as truncated Ig, potentially deleterious for B and plasma cells. Although further investigations should be needed to identify the physiological impact of truncated Ig, therapeutic approaches to enforce the production of truncated Ig using NMD inhibitors, could be considered in the treatment of myeloma or other lymphoid tumours.

Durant ces quatre années, nous avons été financé par une bourse de thèse BDI-CNRS région accordée par le Centre National de la Recherche Scientifique et la région Limousin.



Laboratoire de Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations  
UMR CNRS 6101

Equipe « Génétique moléculaire de la cellule B et des syndromes immunoprolifératifs »

Faculté de Médecine

2, rue du Docteur Marcland

87025 LIMOGES Cedex



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Michel COGNE, qui m'a accueilli dans son laboratoire dès mon stage de Master 1. Je vous remercie pour votre accueil au sein de votre laboratoire pendant toutes ces années. Et oui c'est toujours vous qu'on remercie en premier, ça commence à en faire des thèses et autres rapports commençant par ces mots, mais vous savez Michel ? Ce n'est pas juste des formules de politesse mais de vrais remerciement sincères et je vous souhaite qu'il y en ait beaucoup d'autres.

Je suis très reconnaissant envers les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux. Je remercie chaleureusement Amine KHAMLIHI et Bertrand NADEL d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire, ainsi que Saïd AOUFOUCHI d'en être examinateur. Merci de l'intérêt dont vous faites preuve à l'égard de mon travail. Soyez assurés de tout mon respect et de ma profonde reconnaissance.

Je souhaite remercier plus personnellement le Docteur Laurent DELPY, mon directeur de thèse. Merci pour ta présence, ton encadrement, ta qualité scientifique et ton enthousiasme débordant et cela depuis les premières heures de mon Master2.. J'ai énormément appris à tes côtés durant ces cinq années. Et je crois que je me souviendrai toujours le jour où t'es venu m'annoncer que notre premier article a été publié, ce sont des moments comme ça qui donnent envie de continuer dans cette voie.

...

Ça y est, il est 2heures et demi du matin, et je sens que c'est le moment des remerciements, vous savez cette partie de la thèse qu'on prévoit d'écrire en dernier. Le meilleur moment de la rédaction, qui annonce que ça sent la fin. On se dit qu'il ne faut oublier personne, on se rappelle tous les bons moments passés avec chacun (oui les mauvais on les laisse, ça sert à rien). Mais En fait, je ne suis pas sûr que ce soit le meilleur moment, parce qu'effectivement, c'est la fin ; la fin de cinq ans passés dans le laboratoire avec tous ces moments de joie, de tristesse, de doute, et de réussite, enfin comme dans la vraie vie (oui je sais, c'est la vraie vie) !!!

Tout d'abord, je tiens à remercier les premiers qui m'ont accueilli dans le laboratoire, enfin plutôt les premières : Sophie Duchez, ma première chef, tu m'as beaucoup appris au cours de mon stage de M2, et pour commencer, prendre l'habitude de sortir tard le soir du labo.

Ensuite bien sur il ya mes deux grandes sœurs du labo, Rada et Virginie. De collègues, vous êtes devenues mes copines de boulot, puis de vraies amies. Merci pour tous ces coups de main, merci de votre bonne humeur toujours réconfortante (même quand vous traversiez des moments

difficiles). Rada, maintenant que tu es à Rennes, j'espère que tu n'as pas délaissé le Vélodrome pour la route de Lorient (oui c'est du foot, seuls les initiés comprendront). Virginie, je dois te l'avouer, les poubelles quand elles sont pleines, c'est mieux de les vider... Encore merci à toutes les deux, vous me manquez depuis votre départ, mais je sais qu'on est amenés à se revoir.

Tant que je remercie les personnes présentes depuis le début, je tiens à remercier très chaleureusement Claire : t'es juste une fille super, je ne suis pas le seul à le penser, mais je crois qu'on ne te le dit pas assez. Merci pour toute, toute, toute ton aide.

Je continue avec les filles, oui il y en a beaucoup ! Christelle ma coloc de l'« ilot ». Merci pour tous les bons moments passés au labo, mais également ceux passés en dehors. Toi aussi t'es une vraie amie, toujours présente pour me soutenir, et prête à donner un coup de main, mais également pour aller boire une petite mousse, ça compte aussi. Au fait, c'est quand que tu repars au « States », parce qu'après le ballon, il va falloir tout l'équipement du joueur de football américain, même si je n'ai pas trop le physique.

Ensuite, j'aimerais remercier tous les membres de B cell design, avec une première pensée pour Gaël et Cécile, pour les grands moments passés dans la « Stabu », et oui ça date. On se voit moins depuis que vous êtes partis du labo, même si vous n'êtes pas bien loin et qu'en même temps Limoges n'est pas bien grand (n'est-ce pas Cécile). C'est toujours un grand plaisir de passer un moment avec vous. Je n'oublie pas non plus Armelle et Aude et bien sur Marie. Tu sais Marie, avec le temps qu'on a en ce moment je sens que le barbecue c'est pour bientôt.

Bon je vais remercier quelques garçons maintenant, même si j'ai déjà remercié « Mr la directrice Gael » (voir la photo dans mon bureau). Alors, merci à mes deux potes, Aurélien et Fabien, tout d'abord merci pour l'aide dans les manips et d'ailleurs, c'est quand la prochaine série de « Miniprep » ? Ca me manque un peu ... Merci également pour les discussions scientifiques toujours intéressantes et remotivantes, et oui faut les suivre les jeunes ! Et puis un gros merci pour les très très bonnes soirées passées ensemble, il est vrai bien arrosées, je parle bien sur du temps limousin.... Dès que je reviens on remet ça, et pas d'excuses qui tiennent. Bon courage à vous deux pour la fin de la thèse, ça se rapproche, mais je sais que tout se passera bien pour vous

Je voudrais également remercier tous les doctorants anciens et nouveaux avec qui j'ai partagé ces dernières années. Oui c'est mon tour, mais faites « gaffe », ça arrive vite. Alors tout d'abord, un premier mot pour Rémi, on se suit depuis la licence, ça commence à faire ! Merci pour ton aide

au moment de la rédaction et cela même à 1heure du mat, à un jour d'envoyer ma thèse ! Mais qu'est ce que tu faisais encore dans ton labo à cette heure si? Même en Angleterre, on n'a pas d'heures dans la recherche ou à moins que tu sympathises avec une anglaise (ça peut aider pour apprendre la langue)? Merci également à Christelle Vincent, devenue Vincent -Fabert (je reviendrai sur ce dernier nom plus tard), je me rappelle du premier jour de mon DEA avec mes béquilles, ou tu m'as proposé ton bac à glace, c'est peut être pas grand-chose, mais ça m'a marqué et ça montre ta gentillesse, qui s'est confirmé tout au long de ta thèse. Merci également à Brice qui va sûrement tenter un truc, t'as raison c'est comme ça qu'on y arrive. Merci à, Anne-Gaëlle, Véronique, Stéphanie, Aurélie, et aussi Tan, tous docteur maintenant, Une pensée également pour Marie, Pauline, Amandine, Armand, Amélie, Nicolas...vous avez vécu ou on vous allez vivre la même chose, alors bonne route à tous.

Merci également à Krap et Eric, les « tontons », ben oui, vous êtes un peu les frères de labo de Laurent ! Merci pour vos conseils et le partage de vos expériences. Merci à Krap pour les enseignements partagés à la faculté des Sciences.

Merci à tous les autres membres du labo, troisième et second étage réunis, Christian, Nadine, Cendrine (merci pour l'aide avec les souris ces derniers temps), Zélhia (je me rappelle encore quand tu me donnais des cours de microbiologie à la fac, j'avoue que ce n'était pas ma matière préférée, ce qui ne m'a pas empêché de donner ces mêmes cours lors de mon monitorat), Jean, Nathalie, Sébastien, Chantal, Ibtissam, David, Isabelle, Carine, Aurore, Cathy, Makaidi (et son fameux « et comment je fais moi ») et bien sûr tous ce que j'oublie, parce qu'on oublie toujours quelqu'un. En tous cas, ce fut un plaisir de travailler avec vous tous pendant ces années

Merci également aux animalières et à l'équipe du séquenceur (Marie-Claire et Marie-Pierre), je ne sais plus combien ça fait de plaques de Genemapper au final, mais en tous cas mon ordinateur n'en peut plus.

Je voudrais remercier également mes camarades moniteurs, avec lesquels on a passé de très bons moments entre les formations et les réunions atelier projet, sans oublier les « petites vacances à La Rochelle » pour le stage résidentiel (il ne faut pas le dire, mais c'était vraiment une colonie de vacances). Je voudrais plus spécialement remercier Sophie, Nathalie, Julien et Marc (Fabert le revoilà) pour les grandes soirées passées, c'est toujours un plaisir de partager un moment avec vous, malheureusement trop rare (Il faut dire qu'on arrête de mettre trois mois et 50 mails pour juste aller boire un verre)

Merci également à tous les membres de l'équipe pédagogique de la faculté des Sciences avec qui j'ai collaboré. Vous m'avez accueilli avec sympathie et professionnalisme au cours de mon monitorat.

Je vais maintenant passer à ma vie en dehors du labo. Même si la vie au labo m'a pris beaucoup de temps ces dernières années ; les amis et la famille ont toujours été là. Alors je vais vous remercier avec les surnoms, comme ça chacun se reconnaîtra : Merci à Monmon, Georges, Jean-Phi, Goupix, la, ça fait déjà quatre garçons plein d'avenir ; mais aussi, Mouchalau, Monin, Bouc, Réré, Bugue, Taurus, Naunau, Gilou, et aussi, Sandra, Sabine, Alexia, Laura... j'en oublie forcément, mais à tous, merci pour les « grosses » soirées passées jusqu' à pas d'heure, c'est peut être fatigant mais ça fait tellement de bien !

Voilà l'heure de remercier mes parents, il faut que je m'applique, qu'ils se mettent à pleurer quand même ! Non, sans plaisanteries, merci à vous deux pour m'avoir soutenu depuis le début et de m'avoir toujours aidé quelque soit la situation, c'est surtout dans les moments difficiles, qu'on a besoin de nos parents, et vous vous avez toujours été là dans ces moments. Alors tout simplement mais très affectueusement un grand Merci, vous êtes supers ! J'espère que vous êtes fiers de moi ; moi en tout cas je suis fier d'avoir des parents comme vous (et je ne dis pas tous ça pour les cadeaux).

Bien entendu merci à mon frère, je me suis souvent inspiré de toi dans ma vie, ça sert à ça les grand frères ! Et merci tu m'as bien inspiré. Merci également à Céline et à Juliette. Juliette, tu pourras prendre ma thèse pour apprendre à lire, enfin pour le moment ça va plutôt t'aider à t'endormir.

Bon voilà je crois que c'est bon, j'ai remercié tout le monde. Là, je pense que quelqu'un se sent oublié et commence à me détester...C'était fait exprès pour l'embêter et un peu rigoler (il ya des rimes là) !

Non, bien sur que je ne peux pas l'oublier, alors oui merci à toi d'être apparue dans ma vie, maintenant que je te connais, je sais vraiment ce qu'est le bonheur, alors oui quoiqu'il arrive dans notre futur, la vie sera belle !

# Liste des abréviations

+ : expression

- : absence d'expression

**3'RR** : région régulatrice 3' (*3' regulatory region*)

**ψ** : pseudogène

**A** : adénine/adénosine

**A-NHEJ** : voie alternative de NHEJ

**ABC** : cellule B activée *in vitro* (in vitro *activated B cell*)

**ADARS** : *adenosine desaminases acting on RNA*

**ADN** : acide déoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**AICDA** : cytidine déaminase induite après activation (*activation-induced cytidine deaminase*) (autre acronyme, souvent utilisé pour désigner le gène)

**AID** : cytidine déaminase induite après activation (*activation-induced cytidine deaminase*)

**AF** : *Auxilar Factor*

**APE** : endonucléases napuriques-apyrimidiques

**AP-1** : protéine activatrice 1 (*activator protein 1*)

**APOBEC** : *apolipoprotein B editing complex*

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNi** : ARN interférent

**ARNm** : ARN messenger

**ARN pol** : ARN polymérase

**ARNr** : ARN ribosomiaux

**ARNt** : ARN de transfert

**ATM** : *ataxia telangiectasia mutated*

**ATR** : *ataxia-telangiectasia and Rad3-related*

**BCR** : récepteur de cellules B (*B cell receptor*), ou *breakpoint cluster region*, dans le cas du gène du chromosome 9 impliqué dans la translocation Philadelphie

**C** : cytidine/cytosine, se rapportant aux acides nucléiques, ou cystéine, se rapportant aux protéines, ou domaine constant d'Ig

**C-NHEJ** : voie classique de NHEJ

**CBC** : *cap binding complex*

**CBP** : *CREB (cAMP response element)-binding protein*

**CD** : *cluster of differentiation*

**CDK** : kinase dépendant de cycline (*cyclin-dependent kinase*)

**CDR** : région déterminant la complémentarité (*complementarity determining region*)

**CDT1** : *chromatin licensing and DNA replication factor 1*

**CG** : centre germinatif

**CHX** : cycloheximide

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**C<sup>PTC</sup>** : PTC sur l'exon C

**CTCF** : facteur de liaison à CCCTC (*CCCTC-binding factor*)

**CTD** : *Carboxy Terminal Domain*

**d** : dé(s)oxy-

**D** : segment de diversité

**Da** : dalton

**Dcp** : *decapping protein*

**Dcp-bodies** : *decapping bodies*

**DECID** : *Decay inducing complex*

**DNA-PKcs** : sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante

**DNase** : déoxyribonucléase

**DRB** : 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole

**DSIF** : *DRB-sensitivity inducing factor*

**EA** : épissage alternatif

**EBV** : virus d'Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)

**Eμ** : activateur intronique de chaîne lourde

**eRF** : *release factor*

**ESE** : *exonic splicing enhancer*

**ESS** : *exonic splicing silencer*

**EXO1** : exonucléase 1

**FACT** : facilitateur de la transcription de la chromatine (*facilitates chromatin transcription*)

**G** : guanine/guanosine

**GC** : centre germinatif (*germinal center*)

**H** : chaîne lourde (*heavy chain*)

**HAT** : histone acétyl-transférase

**HBH-LZ** : hélice-boucle-hélice-*leucine zipper*

**HDAC** : histone déacétylase

**HDM** : *human double minute*

**HHV** : virus herpès humain (*human herpes virus*)

**high** : forte expression

**hs** : site d'hypersensibilité à la DNase (*DNase hypersensitivity site*)

**HSP** : *heat shock protein*

**I** : promoteur germinatif de gène constant

**IE** : gène à réponse précoce immédiate (*immediate early*)

**Ig** : immunoglobuline

**IgH** : chaîne lourde d'immunoglobuline

**IgL** : chaîne légère d'immunoglobuline

**IKB** : inhibiteur de NF-κB

**INK** : inhibiteur de CDK

**ISE** : *Intronic splicing enhancer*

**ISS** : *Intronic splicing silencer*

**J** : segment de jonction

**kb** : kilobase

**kDa** : kilodalton

**L** : chaîne légère (*light chain*)

**LMP2A** : protéine membranaire de latence 2A (*latent membrane protein 2A*)

**low** : faible expression

**LPS** : lipopolysaccharide

**MALT** : tissu lymphoïde associé aux muqueuses (*mucosa associated lymphoid tissue*)

**miRNA** : micro ARN

**MVM** : Minute Virus of Mice

**NAS** : « Nonsense associated mRNA splicing »

**NELF** : *Negative Elongation Factor Complex*

**neo<sup>R</sup>** : gène de résistance à la néomycine (*neomycin resistance gene*)

**NF-κB** : facteur nucléaire κ B (*nuclear factor κ B*)

**NMUP** : nonsense-mediated upregulation of pre-mRNA

**NHEJ** : jonction des extrémités non homologues (*non homologous end joining*)

**NMD** : " Nonsense Mediated mRNA Decay "

**ORF** : *open reading frame* : cadre de lecture

**p** : phospho-, ou s'appliquant à un chromosome, désigne le bras court

**PAP** : polyA Polymérase

**PABP** : *polyA binding protein*

**PAB** : *Poly(A)-binding protein*

**PAX5** : *paired box gene 5*

**pb** : paire de bases

**P-bodies** : *processing bodies*

**PIN** : *Pit1 N-terminal domain*

**pRb** : protéine du rétinoblastome

**Pré-BCR** : récepteur de cellule pré-B (*pre-B cell receptor*)

**PTB** : *polypyrimidine tract binding protein*

**PTC** : Codon stop prématuré

**P-TEFB** : *Positive transcription elongation factor b*

**pV<sub>H</sub>** : promoteur de région variable

**q** : bras long de chromosome

**R** : purine (A ou G), se rapportant aux acides nucléiques, ou arginine, se rapportant aux protéines

**RAG** : gène activant la recombinaison (*recombination activating gene*)

**Région S** : région de commutation (*switch region*)

**RNP** : ribonucléoprotéique

**rNTP** : ribonucléotides

**SMG** : *suppressor with morphogenetic effect on genitalia*

**snARN** : small nuclear ARN

**snRNP** : *small nuclear ribonucleoproteins*

**SLN** : séquence de localisation nucléaire

**Sp1** : *specificity protein 1*

**SSR** ou **RSS** : séquence signal de recombinaison

**SR** : *serine/arginine-rich*

**SWI-SNF** : *switch/ sucrose non fermentable*

**T** : thymine/thymidine

**TAD** : domaine d'activation transcriptionnelle (*transcription activating domain*)

**TdT** : désoxynucléotidyltransférase terminale (*terminal deoxynucleotidyl-transferase*)

**TFII** : *transcriptional factor II (B,D,E,F,H)*

**TGF-β** : facteur de croissance transformant-bêta (*transforming growth factor-beta*)

**TPI** : *Triose Phosphate Isomérase*

**TRRAP** : *transactivation/ transformation-associated protein*

**U** : uracile/uridine

**UNG** : *uracil-DNA-glycosylase*

**UPF** : *up-frameshift protéine*

**UTR** : *untranslated region*

**V** : segment de variabilité

**VJ<sup>PTC</sup>** : PTC situé sur l'éon VJ

**W** : base azotée à faible liaison (deux liaisons hydrogène, A ou T)

**XLF** : *XRCC4-like factor*

**XRCC4** : *X-ray repair cross-complementing protein 4*

**Y** : pyrimidine (C ou T)

## Liste des figures

Figure 1. Structure de immunoglobulines. ....	3
Figure 2. Représentation schématique de l'organisation des loci des gènes d'immunoglobuline chez la souris. ....	5
Figure 3. Schéma simplifié des principales étapes du développement B précoce. ....	8
Figure 4. Réarrangements des segments variables d'Ig et règle 12/23. ....	9
Figure 5. Mécanismes des recombinaisons VDJ. ....	11
Figure 6. Mécanismes des recombinaisons VDJ. Résolution des coupures double brin induites par les RAG. ....	12
Figure 7. Réarrangements secondaires au locus Kappa. ....	13
Figure 8. Diagramme représentant la commutation de classe (chez la souris). ....	15
Figure 9. Les étapes du développement des lymphocytes B conventionnels. ....	17
Figure 10. Diagramme représentant la commutation de classe vers IgA (chez la souris). ....	19
Figure 11. Modèle de déamination de l'ADN pour la diversification des gènes d'immunoglobuline. ....	20
Figure 12. Caractéristique d'un ARN. ....	22
Figure 13. Étapes de la transcription par l'ARN polymérase II. ....	24
Figure 14: La reconnaissance des signaux d'épissage. ....	27
Figure 15. Régulation de l'épissage des pré-ARNm. ....	29
Figure 16. Différents types d'épissage alternatif des ARN pré-messagers. ....	31
Figure 17. Les principales voies cytoplasmiques de dégradation des ARNm normaux. ....	33
Figure 18. Les différents mécanismes de surveillance des ARN. ....	37
Figure 19. NMD : Mise en place du complexe de surveillance et dégradation des transcrits aberrants. ....	44
Figure 20 . Mécanismes impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des transcrits de chaînes légères d'Ig. ....	55
Figure 21. Description du modèle de "IgH frVκ knock-in" au locus IgH. ....	56
Figure 22. Réalisation des différentes constructions mimant des réarrangements VκJκ. ....	62
Figure 23. Rôle des séquences introniques situées en aval des segments Jκ dans les processus de surveillance des ARN. ....	64
Figure 24 : Impacts des modifications de la séquence intronique IVS2 sur le phénomène de NAS. ....	65
Figure 25. Mise en évidence d'une rétention de séquence intronique dans les ARNm issus des réarrangements VJκ2 hors phase. ....	66
Figure 26. Construction « mini-locus » Igκ et méthode d'analyse par Genemapper. ....	70

Figure 27. Présentation du modèle IgHfrVκ. A. Représentation schématique des allèles IgHwt et IgHfrVκ B. Position des PTC sur les ARNms issus de l'allèle IgHfrVκ réarrangés (article 2).....	71
Figure 28. Epissage alternatif (NAS : « Nonsense-associated Altered Splicing ») des transcrits Igκ PTC+ et traduction d'un domaine Cκ. ....	74
Figure 29. La présence de segments Jκ dans la séquence intronique IVS2 influence-t'elle le NAS ?	76
Figure 30. Vecteur de recombinaison homologue. Modèle « Truncated Ig knock In ».....	77

## Liste des tableaux

Tableau 1. Surveillance des ARNs de chaînes légères kappa en fonction des segments Jκ impliqués dans le réarrangement VJ.. ....	61
---	----

# Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
Introduction Générale.....	2
<b>Chapitre 1 Le Lymphocyte B.....</b>	<b>5</b>
1. Organisation des genes d'immunoglobulines .....	5
1.1. Locus des chaînes Lourdes .....	5
1.2. Locus des chaînes légères <i>Kappa</i> .....	6
1.3. Locus des chaînes légères <i>Lambda</i> .....	6
2. La lymphopoïese B.....	7
2.1. Phase precoce de la lymphopoïese : la naissance de la lignee B .....	7
2.1.1. Les recombinaisons V(D)J.....	8
2.1.1.a Mécanismes mis en jeu.....	8
2.1.1.b Recombinaison au locus <i>Igk</i> .....	11
2.1.1.c Réarrangement V(D)J : un mécanisme ordonné.....	13
2.2. Phase tardive de la lymphopoïese : a la recherche de l'antigene.....	8
2.2.1. La rencontre de l'antigène.....	8
2.2.2. L'hypermutation somatique et la commutation isotypique.....	8
<b>Chapitre 2 La Synthèse d'un ARNm.....</b>	<b>21</b>
1. Généralités sur les ARN .....	21
2. La Transcription.....	23
2.1. L'initiation.....	23
2.2. L'élongation.....	24
2.3. La Terminaison.....	25
3. L'épissage des préARNm .....	26
3.1. Mécanisme d'épissage .....	26
3.2. Epissage alternatif.....	30
4. L' editing des ARNm.....	32
5. Dégradation des ARNm .....	32
5.1. Les acteurs de la dégradation.....	33
5.2. Déadénylation.....	34
5.3. Les voies exonucléasiques $5' \rightarrow 3'$ et $3' \rightarrow 5'$ .....	34
5.4. Coupures endonucléolytiques.....	35
5.5. Sites de dégradation.....	35
<b>Chapitre3 La Surveillance des ARNm .....</b>	<b>36</b>
1. Généralités.....	36
2. L'inhibition d'épissage.....	37
3. Nonsense-associated altered splicing (NAS) .....	38
4. Nonsense Mediated mrRNA decay (NMD) .....	39
4.1. Le mécanisme de NMD .....	39
4.2. Les acteurs majeurs du NMD.....	40
4.2.1. Les protéines UPF.....	40
4.2.2. Les protéines SMG.....	41
4.2.3. Le complexe de jonction exon-exon (EJC) .....	42
4.3. Mise en place du complexe de surveillance.....	43
4.3.1. Premier tour de traduction.....	43
4.3.2. Phosphorylation/Déphosphorylation d'UPF1 et dégradation de l'ARNm aberrant.....	45
4.4. Localisation du NMD dans la cellule .....	46
4.5. La règle des 50-55 nucléotides.....	47
5. Le système immunitaire sous surveillance.....	48
5.1. Transcription des allèles d'Ig non-productifs .....	48
5.2. Surveillance des ARNs dans les lymphocytes B.....	49
5.2.1. Inhibition d'épissage et épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs .....	8
5.2.2. NMD des transcrits d'Ig non-productifs .....	50
5.2.3. Rôles physiologiques de la surveillance des ARN dans les lymphocytes B .....	50

<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>52</b>
<i>Article 1: Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. ....</i>	<i>53</i>
<i>Article 2: Crosstalk between IgH transcription and RNA surveillance during B cell development .....</i>	<i>56</i>
<i>Article 3: Shaping of nonfunctional immunoglobulin kappa repertoire during B cell development .....</i>	<i>58</i>
<i>Partie 4 : Le NAS sous l'influence des séquences introniques situées en aval des segments J<math>\kappa</math> .....</i>	<i>61</i>
<b>DISCUSSION PERSPECTIVES .....</b>	<b>67</b>
1. <b>Coopération des mécanismes de surveillance des ARN de chaînes d'Ig.....</b>	69
1.1. Présentation des stratégies et modèles utilisés.....	69
1.2. Inhibition d'épissage des pré-ARNm d'Ig.....	71
1.3. NMD et gènes d'Ig.....	72
1.4. Epissage alternatif des transcrits d'Ig.....	73
2. <b>Contre-sélection des cellules contenant des allèles Ig<math>\kappa</math>de classe VJ<sup>ptc</sup> .....</b>	74
3. <b>Perspectives.....</b>	75
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>79</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>101</b>
<i>Article : In vivo plasma cell differentiation depends on reduction of B cell receptor signal strength .....</i>	<i>102</i>



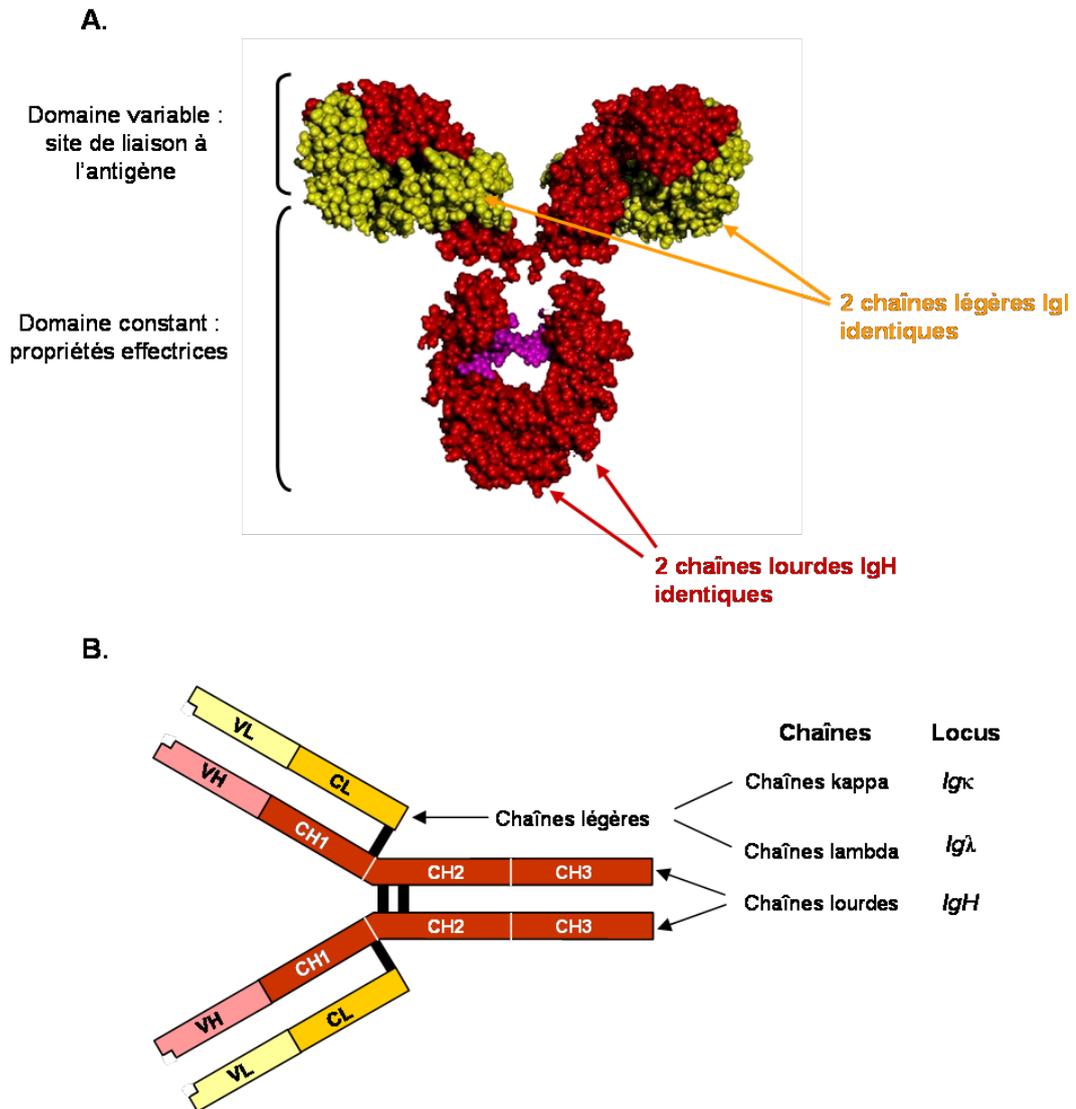
# **Introduction**

# **Bibliographique**

# INTRODUCTION GENERALE

Le système immunitaire assure la défense de l'organisme contre les pathogènes et les tumeurs. Pour cela, il possède des capacités de reconnaissance et de mémoire qui permettent la tolérance des antigènes du soi et l'élimination des antigènes du non soi. Ces derniers sont des molécules essentiellement d'origine bactérienne, virale ou parasitaire.

Parmi les effecteurs de la réponse immune on distingue les cellules intervenant dans l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée assure une résistance naturelle, avec des barrières physiques jouées par la peau, les muqueuses et les cellules, elle est également assurée par le système du complément, les macrophages et les cellules tueuses naturelles, qui agissent de façon non spécifique vis-à-vis du non-soi. L'immunité adaptative, au contraire, repose sur la capacité des lymphocytes à répondre à une stimulation antigénique. Deux grandes voies complémentaires assurent ce mode d'action : les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale. La réponse immunitaire humorale implique d'abord la forme membranaire des immunoglobulines (Ig) au sein du récepteur des cellules B (BCR) spécifique de l'antigène ; elle repose ensuite sur la sécrétion d'Ig solubles : les anticorps. Les Ig sont des protéines d'environ 150 kDa, exprimées à la surface des cellules B sous forme de récepteurs membranaires ou excrétées par les plasmocytes (pour revue, Schroeder et Cavacini, 2010) (**Figure 1**). Elles sont formées de deux chaînes lourdes (H) identiques et de deux chaînes légères (L) identiques. Les chaînes lourdes sont unies par un ou plusieurs ponts disulfures. Les chaînes légères sont attachées aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité C-terminale. Chaque chaîne comprend une région constante (C) et une région variable (V). La combinaison des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de reconnaissance et de liaison à l'antigène. Le domaine constant des chaînes lourdes confèrent aux Ig leurs propriétés effectrices et définissent leur classe, ou isotype :  $\mu$  (qui définit l'IgM),  $\delta$  (IgD),  $\gamma$  (IgG),  $\epsilon$  (IgE) et  $\alpha$  (IgA). En réponse à un antigène, l'isotype peut être commuté pour modifier les fonctions effectrices d'une Ig tout en conservant la même spécificité antigénique. Les chaînes légères peuvent être de deux types :  $\kappa$  ou  $\lambda$  (Schroeder et Cavacini, 2010). (**Figure 1**).



**Figure 1. Structure des immunoglobulines.**

A. Structure tridimensionnelle d'une Ig de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en rouge, les chaînes légères en jaune. Les glycosylations sont signifiées en violet. B. Structure bidimensionnelle. VH et VL : régions variables des chaînes lourdes et légères. CH et CL : régions constantes des chaînes lourdes et légères. Les traits noirs épais représentent les ponts disulfures.

Au cours du développement lymphocytaire B, les gènes d'Ig subissent des réarrangements V(D)J au niveau des régions variables. Ces réarrangements générateurs de la diversité des Ig provoquent, dans deux tiers des cas, un décalage du cadre de lecture et l'apparition de codons stop prématurés (PTC) pouvant conduire à la synthèse de récepteurs tronqués. Pour empêcher la traduction de telles protéines aberrantes la cellule utilise différents mécanismes de «contrôle qualité» des ARNs. Ces processus dits de «surveillance des ARNs» demeurent très actifs dans la lignée lymphoïde (pour revue Wilkinson 1998).

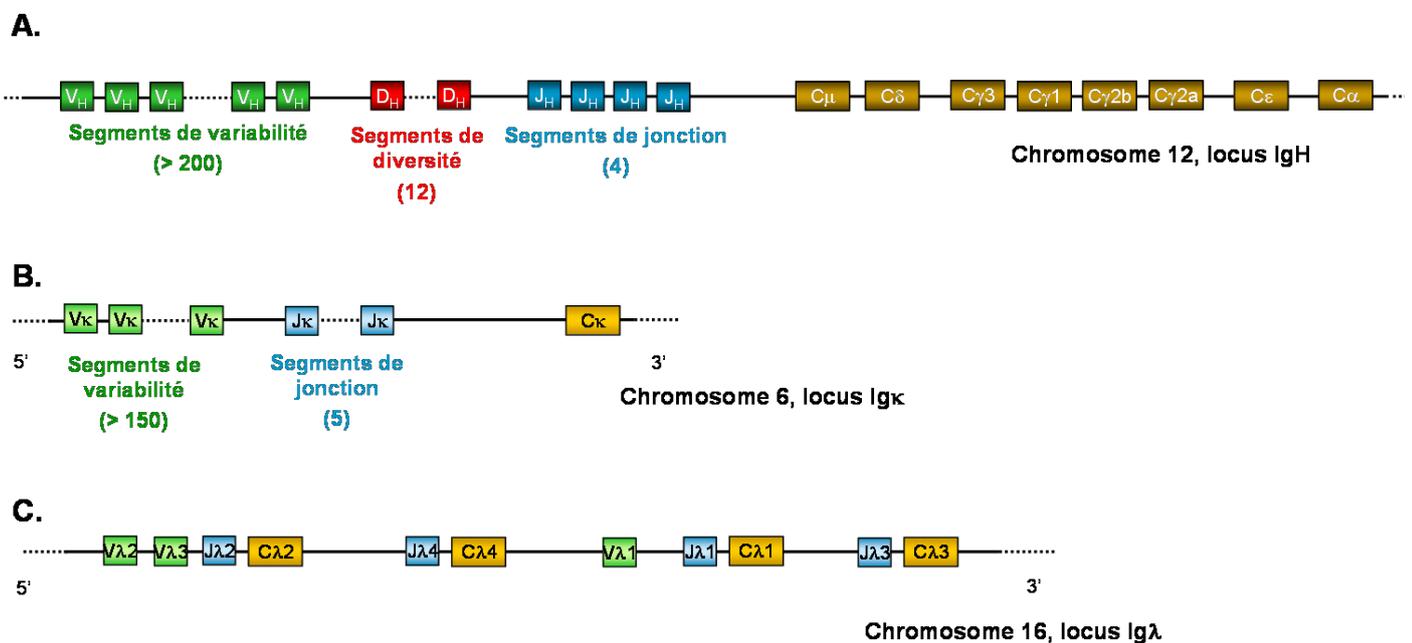
Parmi les processus visant à contrôler la qualité des ARN, le phénomène d'inhibition d'épissage induit une accumulation des ARN pré-messagers (pré-ARNm) porteurs de codon stop prématurés (Premature termination codon : PTC), le NMD (nonsense-mediated mRNA decay) permet de dégrader plus rapidement des ARNm contenant des PTC et, le NAS (nonsense-associated altered splicing) permet d'éliminer l'exon contenant un PTC afin de synthétiser une protéine tronquée, qui dans certains cas peut préserver sa fonction (pour revue Isken et Maquat, 2007).

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le répertoire des gènes d'immunoglobulines en s'intéressant particulièrement au devenir des allèles non-productifs : régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (surveillance des ARNs) et aux impacts potentiels de ces transcrits non-productifs (production d'Ig tronquées ...) au cours du développement B. Ces travaux ont donné lieu à 2 publications originales (Chemin *et al.*, 2010 ; Tinguely *et al.*, sous presse – 2<sup>ème</sup> auteur-) et devraient permettre la rédaction de 2 articles supplémentaires (voir §-Résultats Article3 et Partie 4).

# Chapitre 1 : Le Lymphocyte B

## 1- ORGANISATION DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES

Les gènes codant les différentes chaînes d'Ig occupent 3 loci différents situés sur des chromosomes distincts. Ils sont constitués de multiples segments géniques codant les parties variables et constantes des Ig (*Figure 2*).



**Figure 2. Représentation schématique de l'organisation des loci des gènes d'immunoglobuline chez la souris.**  
**A.** Locus des chaînes lourdes (IgH) **B.** Locus des chaînes légères kappa (Igκ) **C.** Locus des chaînes légères lambda (Igλ). Les loci de chaînes légères ne possèdent pas de segment de diversité (D).

### 1.1 LOCUS DES CHAINES LOURDES (LOCUS IGH)

Chez la souris, le locus IgH est situé sur le chromosome 12. Les segments géniques codant pour le domaine variable sont constitués d'environ 200 segments Variables ( $V_H$ ), regroupés en 15 familles (la famille  $V_{HJ558}$  comprenant la majorité des segments  $V_H$ ) (Brodeur et Riblet, 1984 ; Livant *et al.*, 1986 ; Pennel *et al.*, 1989 ; Kofler *et al.*, 1992 ; Mainville *et al.*, 1996), d'une douzaine de segments de Diversité ( $D_H$ ) divisés en 4 familles : DFL16, DSP2, DST4

et DQ52 (Kurosawa et Tonegawa, 1982 ; Ichihara *et al.*, 1989 ; Feeney et Riblet, 1993), et de 4 segments de jonction ( $J_H$ ). On trouve ensuite 8 gènes codant les régions constantes et déterminant l'isotype des Ig :  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2b$ ,  $\gamma 2a$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$  (**Figure 2A**). Chaque gène constant est composé de plusieurs exons et le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig s'effectue par épissage alternatif des exons situés en 3' (Maki *et al.*, 1981 ; Rogers *et al.*, 1981).

## **1.2 LOCUS DES CHAINES LEGERES KAPPA (LOCUS IG $\kappa$ )**

Les gènes des chaînes légères  $\kappa$  sont situés sur le chromosome 6 de la souris (sur le chromosome 2 chez l'homme). Il existe plus de 140 segments  $V\kappa$  regroupés en 18 familles, 5 segments  $J\kappa$  espacés d'environ 300 paires de bases (pb) les un des autres, et un seul segment codant la partie constante  $C\kappa$  (**Figure 2B**) (Kofler *et al.*, 1989 ; Strohal *et al.*, 1989 ; Kirshbaum *et al.*, 1996 ; Thiebe *et al.*, 1999). Les segments  $V\kappa$  sont positionnés soit dans le même sens, soit en sens inverse par rapport à l'orientation du locus  $J\kappa$ - $C\kappa$  (Lorenz *et al.*, 1988 ; Weishold *et al.*, 1990 ; Thiebe *et al.*, 1999) (voir § 2.1.1b). Lors du réarrangement des gènes des chaînes légères, un segment  $V\kappa$  s'associe au hasard à un des quatre segments  $J\kappa$  fonctionnels. En effet, le segment  $J\kappa 3$  ne possède pas de séquence signal de recombinaison (SSR) correcte et apparaît en effet comme un pseudogène (Nishi *et al.*, 1985). Comme pour les chaînes lourdes, la région variable est réunie à la région constante lors de l'épissage de l'ARN messager (**Figure 2B**).

## **1.3 LOCUS DES CHAINES LEGERES LAMBDA (LOCUS IG $\lambda$ )**

Chez la souris, les chaînes légères  $\lambda$  ne représentent qu'environ 5% des chaînes légères exprimées. Le locus  $Ig\lambda$  est localisé sur le chromosome 16 de la souris et sur le chromosome 22 chez l'homme et présente une architecture moins complexe que les loci  $IgH$  et  $Ig\kappa$ . Il est composé de deux unités de recombinaison organisées de façon ordonnée  $V\lambda$ ,  $J\lambda$  puis  $C\lambda$  (**Figure 2C**) (Carson et Wu, 1989 ; Storb *et al.*, 1989). Le premier groupe comprend deux segments variables  $V\lambda 2$  et  $V\lambda 3$  (**Figure 2C**) , une paire fonctionnelle  $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$  et une paire non fonctionnelle  $\Psi J\lambda 4$ - $\Psi C\lambda 4$  (Blomberg et Tonegawa, 1982 ; Miller *et al.*, 1982). Le deuxième groupe ne comporte qu'un segment variable  $V\lambda 1$  et deux paires fonctionnelles  $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$  et  $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$ . Les segments  $V\lambda 2$  et  $V\lambda 3$  (**Figure 2C**) s'associent préférentiellement à  $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$  (Eisen et

Reilly, 1985 ; Dildrop *et al.*, 1987 ; Sanchez et Cazenave, 1987) et le segment V $\lambda$ 1 à J $\lambda$ 3C $\lambda$ 3 et J $\lambda$ 1C $\lambda$ 1.

## 2- LA LYMPHOPOÏÈSE B

Le développement des lymphocytes B chez les mammifères implique une succession de stades de différenciation qui commencent dans les organes lymphoïdes primaires (foie fœtal et moelle osseuse) et s'effectue indépendamment de la rencontre avec un antigène. La maturation tardive suite à une stimulation antigénique se déroule dans les organes lymphoïdes périphériques ou secondaires (rate, ganglions lymphatiques etc ...). Enfin, la différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes permet la sécrétion d'anticorps.

Les stades de différenciation peuvent être identifiés à partir de l'expression de diverses molécules de surface et de facteurs de transcription intracellulaire, du statut de réarrangement des gènes de chaînes lourdes et légères, et de la nature du récepteur membranaire (pré-BCR, puis BCR) (pour revues : Kurosaki, 2010 ; LeBien et Tedder, 2008 ; Meffre *et al.*, 2000 ; Monson, 2008 ; Samitas *et al.*, 2010). Les voies de différenciation de la lignée B sont semblables chez l'homme (LeBien, 2000) et la souris (Hardy *et al.*, 2007).

### **2.1 PHASE PRECOCE DE LA LYMPHOPOÏÈSE : LA NAISSANCE DE LA LIGNEE B...**

Les cellules souches hématopoïétiques sont hébergées dans la moelle osseuse, au sein d'un réseau complexe et dense de sinus vasculaires qui constitue la « niche de cellules-souches » (Schofield, 1978). Après plusieurs étapes de différenciation, elles donnent naissance au progéniteur lymphoïde commun, qui s'engagera dans la lignée B. Le précurseur B le plus précoce est la cellule pré-pro-B, d'après la nomenclature de Rolink/Melchers (Osmond *et al.*, 1998), qui correspond aux fractions A<sub>1,2</sub> de Hardy (Hardy *et al.*, 1991). Il commence à exprimer le marqueur spécifique de lignée CD45R (aussi appelé B220 chez la souris), mais n'exprime pas encore CD19. Les gènes d'Ig sont en configuration germinale (**Figure 3**). Le développement B précoce se caractérise par le réarrangement ordonné des loci de chaînes lourdes, puis de chaînes légères. La cellule pré-pro-B se différencie en cellule pro-B (B220<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>), précoce (fraction B de Hardy) puis tardive (fraction C). Elle exprime fortement les enzymes de recombinaisons RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Genes) qui sont impliquées dans les mécanismes de recombinaisons V(D)J (**Figure 3 & 9**).

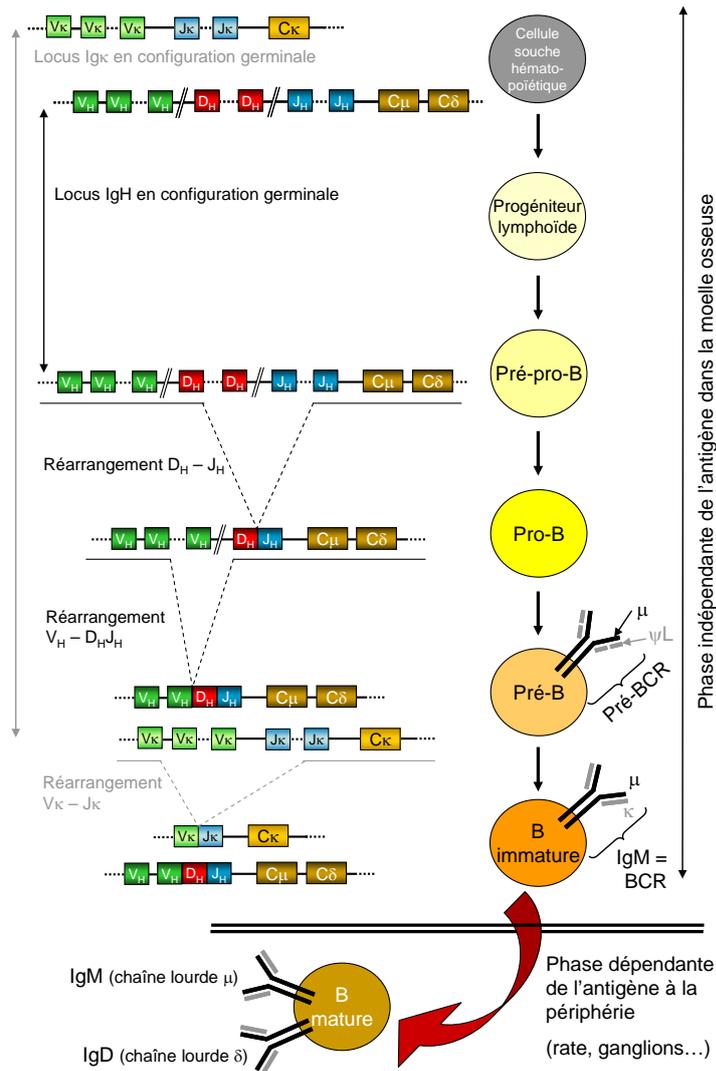


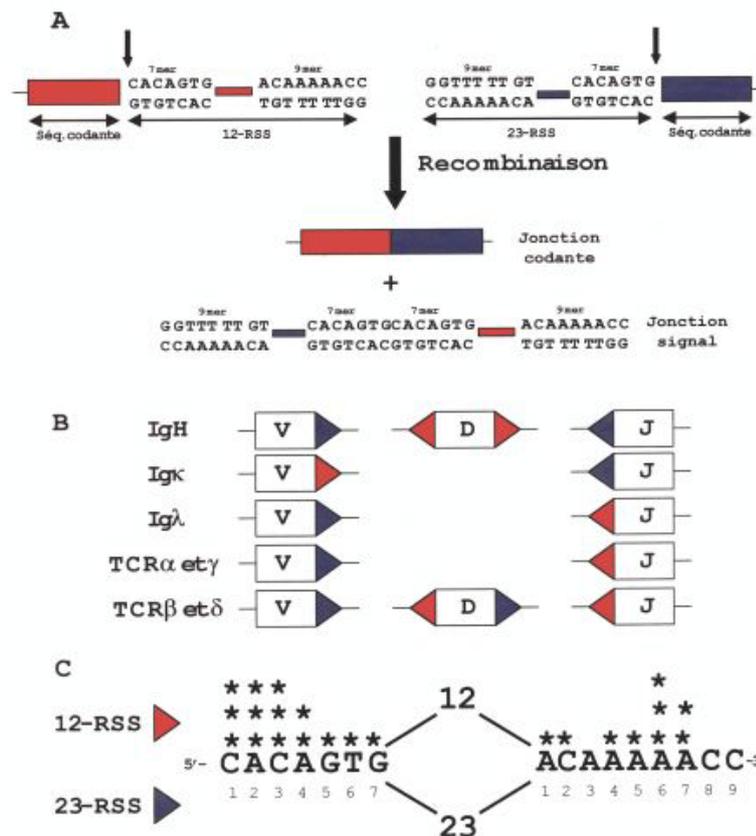
Figure 3. Schéma simplifié des principales étapes du développement B précoce. (D'après Kurosaki *et al.*, 2010)

### 2.1.1 Les recombinaisons V(D)J

Les régions variables d'Ig sont codées par l'association des segments VDJ pour les chaînes lourdes et VJ pour les chaînes légères. Ces recombinaisons V(D)J se font de façon aléatoire et sont à l'origine de l'importante diversité des Ig.

#### 2.1.1.a. Mécanismes mis en jeu

Les segments géniques V, D et J sont flanqués par des séquences spécifiques appelées « séquences signal de recombinaison » SSR (pour revue : Tonegawa, 1993). Une SSR est constituée d'une séquence consensuelle conservée de 7 pb, l'heptamère (5'-CACAGTG-3') et d'une séquence consensuelle conservée de 9 pb, le nonamère (5'-ACAAAACC-3'), séparées par une séquence non conservée de 12 (un tour de l'hélice d'ADN) ou 23 pb (deux



**Figure 4. Réarrangements des segments variables d'Ig et règle 12/23.**

(D'après Lewis *et al.*, 1994) A. Règle 12/23 : la recombinaison V(D)J n'est initiée qu'entre deux segments géniques bordés par des RSS (recombination signal sequence) de longueurs différentes. Une coupure double brin est introduite entre les RSS et les séquences codantes. B. Organisation des deux catégories de RSS aux loci des Ig et du TCR. Le triangle bleu représente une 23-RSS et le rouge une 12-RSS. C. Contribution de chaque nucléotide composant l'heptamère et le nonamère. Les astérisques indiquent leur importance fonctionnelle relative.

tours d'hélice). Les SSR sont présentes en 3' des segments V, de part et d'autre des segments D et en 5' des segments J.

La recombinaison V(D)J est un processus de recombinaison site-spécifique qui ne peut se produire qu'entre deux segments géniques qui contiennent une SSR avec un séparateur de 12 pb pour l'un et une SSR avec un séparateur de 23 pb pour l'autre. Cette « règle 12/23 » permet d'éviter des réarrangements illégitimes comme par exemple des recombinaisons V vers J au locus IgH (**Figure 4**) (Meek *et al.*, 1989 ; Bassing *et al.*, 2002 ; Dudley *et al.*, 2005 ; Jung *et al.*, 2006).

Les recombinaisons V(D)J font appel à un complexe enzymatique constitué par l'association des protéines RAG-1 et RAG-2 (Schatz *et al.*, 1989 ; Oettinger *et al.*, 1990). Les protéines RAG s'associent avec les SSR à 12 pb et 23 pb et aux segments géniques V(D)J associés dans un complexe synaptique.

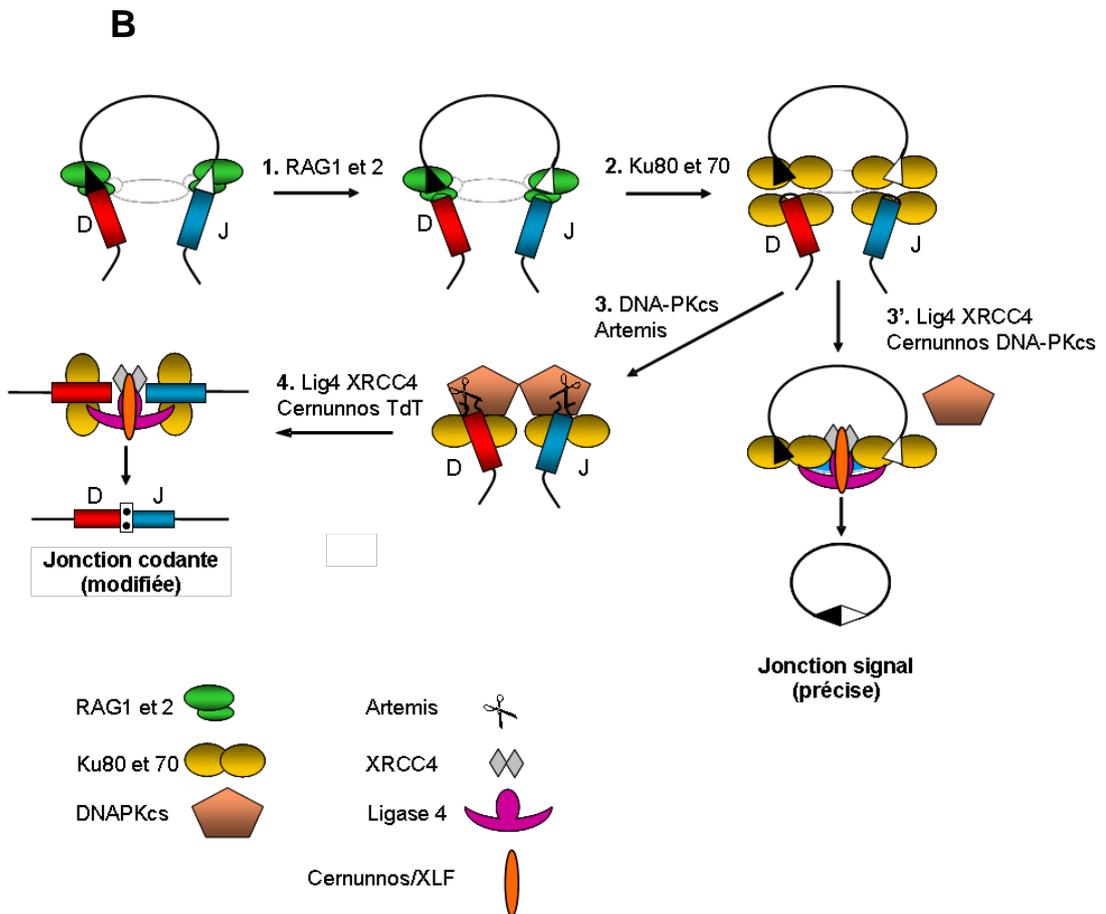
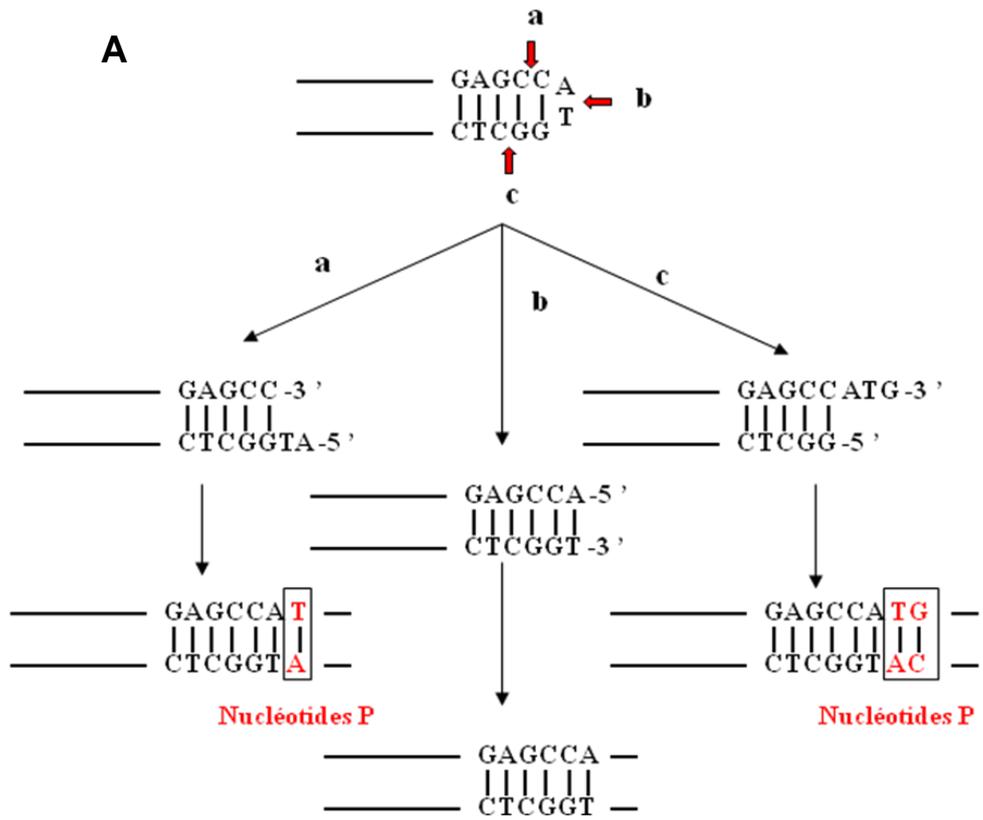
Les RAG créent d'abord une cassure simple brin entre les deux segments géniques (séquences codantes) et ensuite, une réaction de *trans*-estérification au cours de laquelle l'extrémité 3'-OH libre du brin d'ADN des séquences codantes rejoint le brin d'ADN opposé formant ainsi une épingle à cheveux (**Figure 5**). On obtient ainsi deux extrémités « codantes » en épingle à cheveux et deux extrémités « signal » phosphorylées en 5'. Ces dernières sont scellées directement pour former les jonctions signal (**Figure 5A**). La jonction des extrémités codantes est à la base d'une classe particulière d'insertion de nucléotides: les insertions P (pour palindromiques). En général, les nucléotides P sont au nombre de un ou deux et forment un palindrome par rapport à la séquence de l'extrémité intacte du segment codant correspondant (Lafaille *et al.*, 1989 ; McCormack *et al.*, 1989, Lewis, 1994b). Des nucléotides qui ne peuvent être rapportés à aucune des séquences génomiques sont également retrouvés au niveau des jonctions codantes (Sakano *et al.*, 1981 ; Kurosawa et Tonegawa, 1982). Ces régions appelées régions N (pour « Non Germline Element ») sont riches en G/C et ne dépassent que rarement une douzaine de nucléotides (Alt et Baltimore, 1982 ; Roth *et al.*, 1989). Elles sont polymérisées par la terminal désoxynucleotidyl transférase (TdT) (**Figure 5B**). Les insertions N et P, résultant de la réparation imprécise de cassures dans l'ADN double brin, jouent donc un rôle essentiel dans la diversité des jonctions (pour revues : Dudley *et al.*, 2005 ; Jung *et al.*, 2006 ; Schatz, 2004).

La résolution des extrémités implique une voie de réparation des cassures double brin de l'ADN appelée NHEJ (*Non Homologous End Joining*) (pour revue, Lieber *et al.*, 2010). La voie NHEJ fait appel à plusieurs facteurs : Ku70 et Ku80, DNA-PKcs (sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante), Artemis, XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*), DNA Ligase IV, Cernunnos/XLF (*XRCC4-like factor*) (Rooney *et al.*, 2004 ; Dudley *et al.*, 2005, Sekiguchi et Fergusson, 2006) (**Figure 5B**).

#### **Figure 5. Mécanismes des recombinaisons VDJ.**

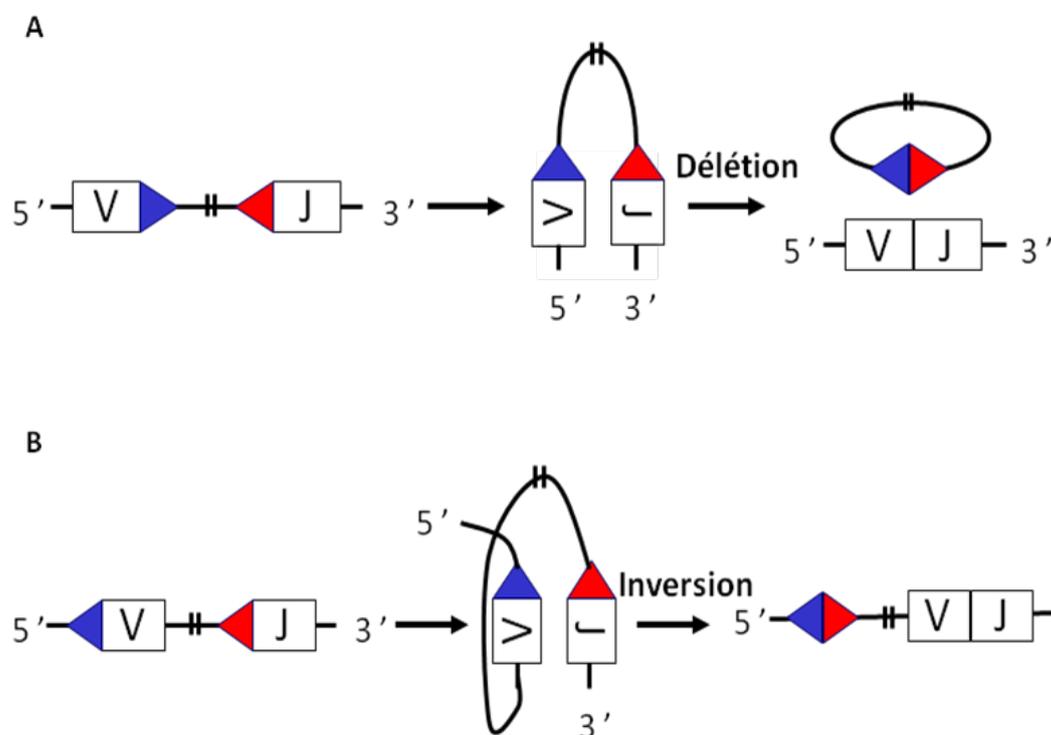
**A.** Mécanismes d'addition de nucléotides P aux jonctions codantes Une seule extrémité codante en épingle à cheveux est représentée. L'ouverture asymétrique de la structure en épingle à cheveux près de l'extrémité (a et c) génère de petites extensions qui, après polymérisation et ligation, seraient à l'origine des nucléotides P. En revanche, l'ouverture symétrique de l'épingle à cheveux (b) ne génère pas de nucléotides P. (*Adapté de Lieber et al.*, 1991).

**B.** Résolution des coupures double brin induites par les protéines RAG. 1. Les coupures sont réalisées par les enzymes RAG au niveau des SSR. 2. Ku70 et Ku80 se lient aux extrémités coupées de l'ADN. 3. DNA-PKcs facilite l'ouverture des structures en épingle à cheveux générées par les RAG. 3' et 4. TdT ajoute des nucléotides au niveau des extrémités codantes. XRCC4, Cernunnos et DNA ligase 4 relient les extrémités franches formées et produisent des jonctions codantes modifiées. (*D'après Dudley et al.*, 2005).



### 2.1.1.b. Recombinaisons au locus $Ig\kappa$

L'orientation relative des RSS définit si le réarrangement a lieu par délétion ou par inversion de la région entre les deux segments réarrangés (**Figure 6**) (Lewis, 1994b). Si les deux RSS sont en orientation opposée, la recombinaison entraîne la délétion du génome de la région intersegmentaire qui est excisée. La plupart des loci des Ig et du TCR présentent ce type d'organisation des RSS. Par contre, si les deux RSS ont la même orientation, ce qui est le cas pour certains réarrangements au locus  $Ig\kappa$ , la région comprise entre les deux segments réarrangés est simplement inversée et maintenue sur le chromosome (Alt et Baltimore, 1982).

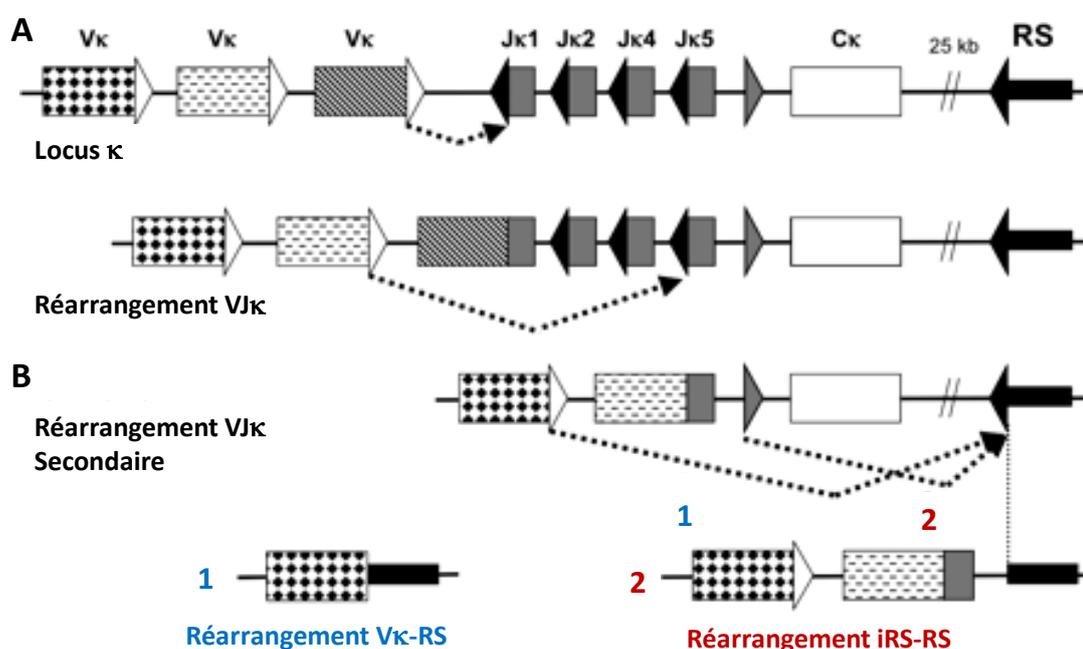


**Figure 6. Recombinaison VJ par délétion (A) ou par inversion (B) en fonction de l'orientation des segments géniques.** Le triangle bleu représente une 23-RSS et le triangle rouge une 12-RSS.

La structure du locus  $Ig\kappa$  favorise également l'apparition de recombinaisons dites secondaires mettant en jeu un segment  $V_{ken}$  en amont du premier réarrangement VJ et un segment  $J_{\kappa}$  en aval de celui-ci. Ces réarrangements successifs permettent d'éliminer des récepteurs non fonctionnels ou autoréactifs pendant la maturation B précoce dans la moelle osseuse (édition du BCR) ou après passage dans le compartiment périphérique (révision du BCR) (Pelandra *et al.*, 1997). Enfin, le locus  $Ig\kappa$  de souris est également caractéristique par la présence de séquences

nommées RSS (Recombining Sequence), séquences homologues aux séquences Kde (*kappa-deleting element*) pour le locus humain.

Ces séquences présentes notamment dans la partie 3' du locus permettent l'inactivation du locus (*Figure 7*). Ces réarrangements secondaires au locus Ig $\kappa$  sont fréquemment observées chez les cellules B exprimant une chaîne légère lambda, et permettent d'éliminer des réarrangements VJ $\kappa$  non-productifs ou auto-réactifs (Vela *et al.*, 2008 ; Fitzsimmons *et al.*, 2007)



**Figure 7. Réarrangements secondaires au locus Kappa.** (A. Réarrangements classiques. Un segment V est réarrangé à l'segment J donné. B. Réarrangement secondaire. Un segment V $\kappa$ (1 en bleu) ou l'iRS (2 en rouge) se réarrange avec le  $\kappa$ RS inactivant le locus  $\kappa$ . D'après Panigrahi *et al.*, 2007)

### 2.1.1.c. Recombinaisons V(D)J : un processus ordonné

Les recombinaisons V(D)J s'effectue selon un processus ordonné et débute au stade pro-B par des réarrangements DJ au locus IgH. Ces réarrangements ont lieu sur les deux allèles. Un réarrangement V vers DJ se produit ensuite préférentiellement sur un allèle. Comme nous l'avons vu précédemment (§ 2.1.1a), l'imprécision des jonctions codantes provoquée par des délétions et/ou des additions de nucléotides (insertions N et/ou P) est un processus aléatoire générateur de diversité. Ainsi, les réarrangements VDJ productifs présentant une jonction en phase apparaîtront dans un tiers des cas et, à l'inverse, des décalages du cadre de lecture vont se produire dans deux tiers des cas. Si le réarrangement VDJ sur le premier allèle s'avère non-productif, une recombinaison V vers DJ se produit sur l'autre allèle et seules les cellules

présentant un réarrangement VDJ en phase (VDJ+), capables d'exprimer une chaîne lourde  $\mu$ , seront sélectionnées positivement (**Figure 8**).

Au stade pré-B, la forme membranaire de la chaîne  $\mu$  fonctionnelle s'associe à une pseudo chaîne légère ( $\Psi$ LC), codée par les gènes  $\lambda 5$  et  $V_{\text{préB}}$ , chez la souris. Le complexe protéique ainsi formé peut migrer à la surface des cellules pré-B, formant un récepteur immature (pré-BCR) associé aux protéines transmembranaires  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ , qui possèdent des sites de phosphorylation dans la partie cytoplasmique (motifs ITAM : « immuoglobulin tyrosine-based activation motifs ») et assurent la transduction du signal (**Figure 3**). La signalisation en aval du pré-BCR induit l'arrêt des réarrangements au locus  $IgH$  et stimule les réarrangements VJ au locus  $Ig\kappa$  (pour revue Mårtensson *et al.*, 2007). Ainsi, si le premier allèle présente un réarrangement VDJ+, l'autre allèle  $IgH$  sera en configuration DJ et, si le réarrangement sur le premier allèle est non-productif (VDJ-), l'autre allèle sera obligatoirement VDJ+. A partir du stade pré-B, les allèles  $IgH$  présenteront donc des recombinaisons VDJ monalléliques (VDJ+/DJ) ou biallélique (VDJ+/VDJ-). Plusieurs études ont montré que les réarrangements bialléliques sont présents dans environ 40% des cellules B périphériques (pour revue Jung *et al.*, 2006).

Pour maintenir la règle « une cellule – un anticorps », l'exclusion allélique est également imposée au niveau des chaînes légères. Ainsi un des deux allèles de chaîne légère  $\kappa$  est réarrangé en premier, un segment  $V_{\kappa}$  réarrange avec un segment  $J_{\kappa}$  (**Figure 8**), si le réarrangement est fonctionnel, un rétro-contrôle inhibe le réarrangement sur le second allèle. Dans deux tiers des cas le second allèle est réarrangé à son tour après un réarrangement non productif. Enfin dans le cas des chaînes légères, si les deux réarrangements *kappa* sont non productifs, c'est le locus lambda qui est à son tour réarrangé, selon le même principe. Des réarrangements fonctionnels de chaînes légères vont permettre le remplacement de la pseudo chaîne légère par une chaîne  $\kappa$  ou  $\lambda$  et constituer ainsi le BCR (stade B immature).

A propos de l'exclusion allélique observée vis à vis des réarrangements fonctionnels, Mostoslavsky *et al.* (1998) ont mis en évidence une déméthylation monoallélique au locus des chaînes  $\kappa$ . Cette déméthylation asymétrique permettrait à un des deux allèles d'être préférentiellement accessible aux réarrangements  $VJ_{\kappa}$ . Ainsi, l'établissement de l'exclusion allélique précéderait les réarrangements et débiterait par des remaniements asymétriques de la structure de la chromatine. Dans ce sens, des travaux ont montré qu'une répllication asynchrone des loci  $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\lambda$ , dès les premiers stades du développement embryonnaire, contribuerait à l'exclusion de l'allèle répliqué tardivement. Cette régulation, établie de façon aléatoire, permettrait notamment la déméthylation de l'allèle ayant une répllication rapide. Ainsi, les réarrangements s'effectueraient préférentiellement sur cet allèle (Mostoslavsky *et al.*, 2001).

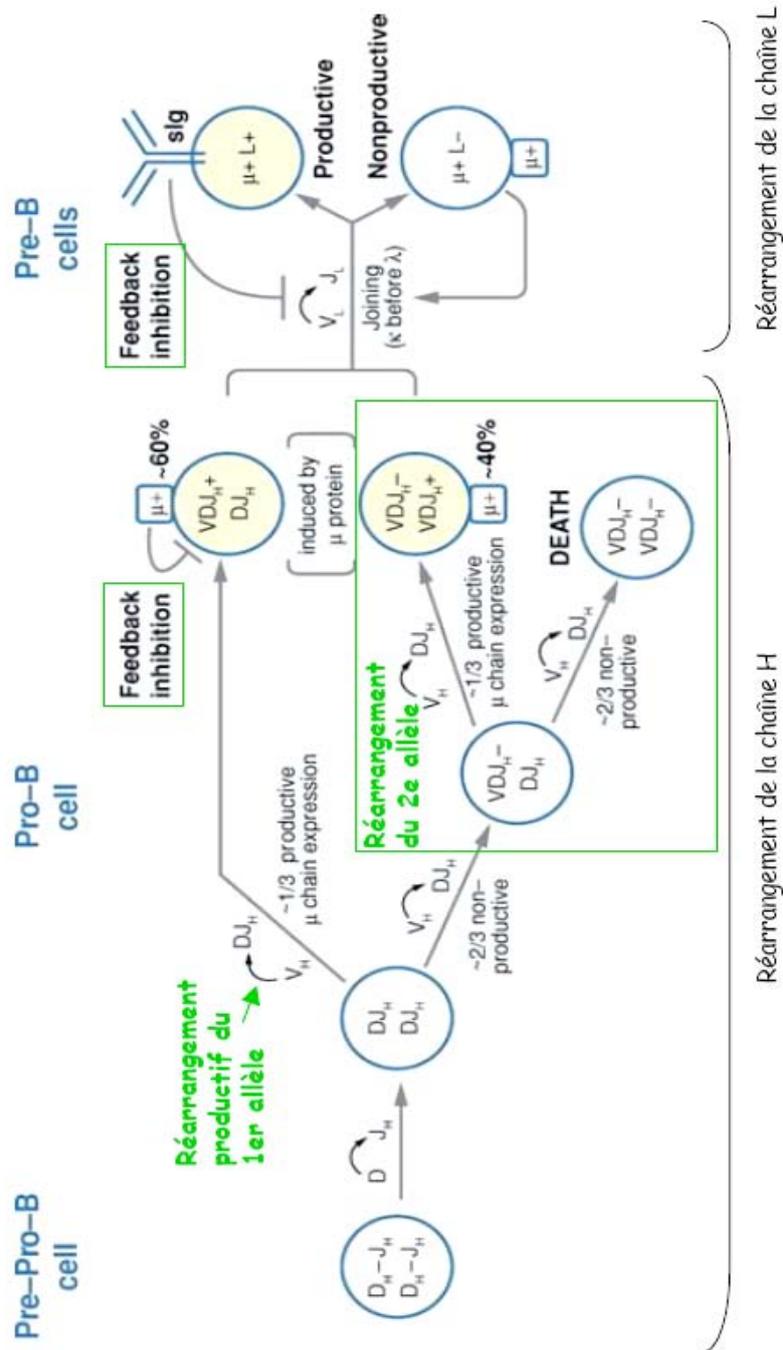


Figure 8. Manifestation de l'exclusion allélique dans les gènes d'Ig (D'après Jung *et al.*, 2006)

## 2.2 PHASE TARDIVE DE LA LYMPHOPOÏÈSE : A LA RECHERCHE DE L'ANTIGÈNE...

### 2.2.1 La rencontre de l'antigène

Avant de quitter la moelle osseuse, les cellules B immatures sont testées pour leur autoréactivité (Goodnow *et al.*, 1990). Les cellules auto-réactives, potentiellement dangereuses

pour l'intégrité de l'organisme, ne peuvent quitter la moelle osseuse en l'état. Selon l'affinité entre le BCR auto-réactif et l'auto-antigène, la cellule auto-réactive peut entrer en apoptose, en anergie, en ignorance immunologique ou corriger son récepteur (*receptor editing*) (Manjarrez-Orduno *et al.*, 2009). Les cellules B immatures non autoréactives, ou exprimant une faible densité de BCR autoréactifs (Gaudin *et al.*, 2004), survivent et gagnent la périphérie (sélection positive). Les cellules B immatures répondent aux antigènes thymo-indépendants, comme les lipopolysaccharides (LPS) : elles déclenchent une réponse anticorps très rapide sans la contribution de cellules T dépendantes de la présentation de l'antigène associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Coutinho et Moller, 1975). Les cellules B immatures doivent également passer par une phase transitionnelle au cours de laquelle une faible signalisation du BCR inhibe l'apoptose, tandis qu'une signalisation excessive induit l'apoptose (Wang *et al.*, 2007). Les cellules B immatures de la rate sont les cellules B transitionnelles, qui commencent à exprimer l'IgD, et sont subdivisées en différents sous-stades de développement (cellules B T1, puis T2) (**Figure 7**). Les cellules T1 (IgM<sup>high</sup> IgD<sup>low</sup> CD21<sup>low</sup>, CD23<sup>-</sup> CD24<sup>high</sup>) sont présentes dans les manchons lymphoïdes péri-artériolaires de la rate. Elles continuent à être évaluées pour leur tolérance du soi : lorsqu'elles survivent à la sélection négative, elles deviennent des cellules T2 (IgM<sup>low</sup> IgD<sup>high</sup> CD21<sup>high</sup>, CD23<sup>+</sup> CD24<sup>low</sup>) et occupent les follicules primaires de la rate (Loder *et al.*, 1999). Une troisième sous-population, les cellules T3, a été définie : ce sont des cellules B transitionnelles auto-réactives maintenues dans un état anergique (Merrell *et al.*, 2006) (pour revue : Rolink *et al.*, 2004).

Les cellules B T2 poursuivent leur maturation et deviennent des cellules B matures naïves (**Figure 9**). Selon la structure histologique qu'elles colonisent, leur phénotype et leur fonction diffèrent : elles peuvent être des cellules B folliculaires, également appelées cellules B2 conventionnelles, des cellules B de la zone marginale ou des cellules B1 (pour revues : LeBien et Tedder, 2008 ; Samitas *et al.*, 2010).

Les cellules B folliculaires, IgM<sup>low</sup> IgD<sup>high</sup> CD5<sup>-</sup> CD23<sup>+</sup>, sont présentes dans les follicules primaires, autour des cellules dendritiques folliculaires, dans la pulpe blanche de la rate ou les ganglions lymphatiques. Elles peuvent alors rencontrer leur antigène spécifique. S'il est thymo-dépendant, les cellules B activées migrent dans la zone extrafolliculaire et interagissent avec des cellules T préalablement activées (par le même antigène). Les cellules B vont alors connaître deux destinées.

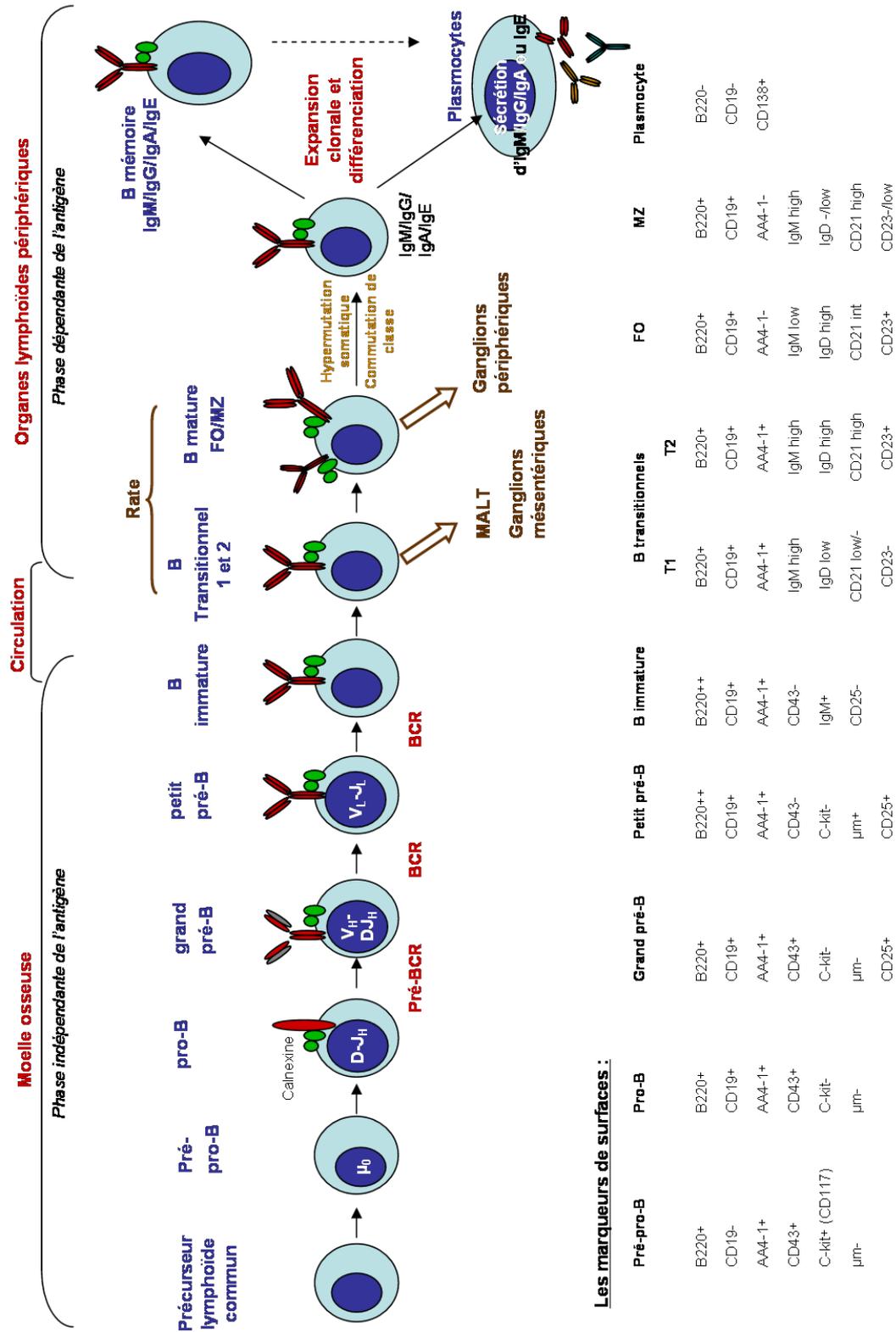
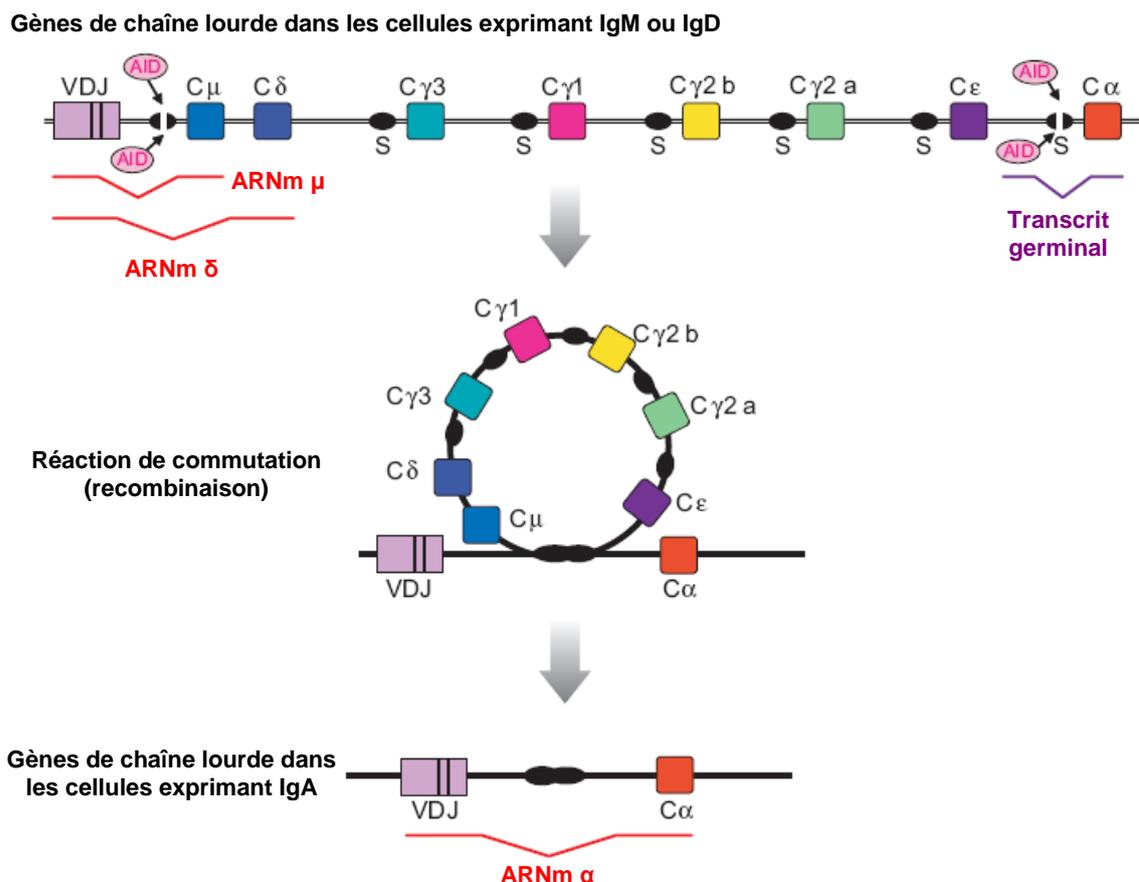


Figure 9. Les étapes du développement des lymphocytes B conventionnels. (D'après Benschop et Cambier, 1999 ; Hardy et Hayakawa, 2001).

D'une part, une partie d'entre elles se différencie en plasmocytes extrafolliculaires à courte durée de vie, qui produisent rapidement des anticorps de type IgM et assurent ainsi la première ligne de défense humorale contre l'antigène. D'autre part, la seconde partie des cellules migre dans le follicule primaire, se différencie en centroblastes et induit la réaction du centre germinatif (pour revues : Allen *et al.*, 2007 ; Klein et Dalla-Favera, 2008). Les cellules B folliculaires naïves sont repoussées à la périphérie du follicule par les centroblastes et définissent alors la zone du manteau. Une fois qu'il a acquis un centre germinatif et un manteau, le follicule primaire devient un follicule secondaire. Les centroblastes subissent une expansion clonale et l'hypermutation somatique avant de se différencier en centrocytes. Les centrocytes sélectionnés positivement activent les cellules T du centre germinatif, sont induites à proliférer et peuvent réaliser la commutation de classe. Enfin, les cellules B du centre germinatif se différencient en plasmocytes, les cellules effectrices de l'immunité humorale (Fairfax *et al.*, 2008 ; Shapiro-Shelef et Calame, 2005), ou en cellules B mémoires (Tangye et Tarlinton, 2009), cellules à longue durée de vie (**Figure 9**). Elles quittent le centre germinatif, peuvent retourner dans la circulation, résider dans les organes lymphoïdes secondaires, ou recoloniser la moelle osseuse (plasmocytes) (pour revues : Allman et Pillai, 2008 ; Casola, 2007 ; Klein et Dalla-Favera, 2008 ; Kurosaki, 2010 ; LeBien et Tedder, 2008 ; Monson, 2008 ; Samitas *et al.*, 2010). Les plasmocytes sont en effet les effecteurs de l'immunité humorale, puisque ces derniers ont la capacité de sécréter une grande quantité d'Ac spécifiques d'un Ag donné.

### **2.2.2 L'hypermutation somatique et la commutation isotypique**

L'hypermutation somatique consiste en l'accumulation de mutations au niveau de la région codante V(D)J et particulièrement au niveaux des sites de liaisons à l'antigène : les CDR (complement determining region). Ainsi quelques jours après la rencontre avec l'antigène, le lymphocyte B produisant des anticorps de faible affinité pour cet antigène peut produire des anticorps de haute affinité.

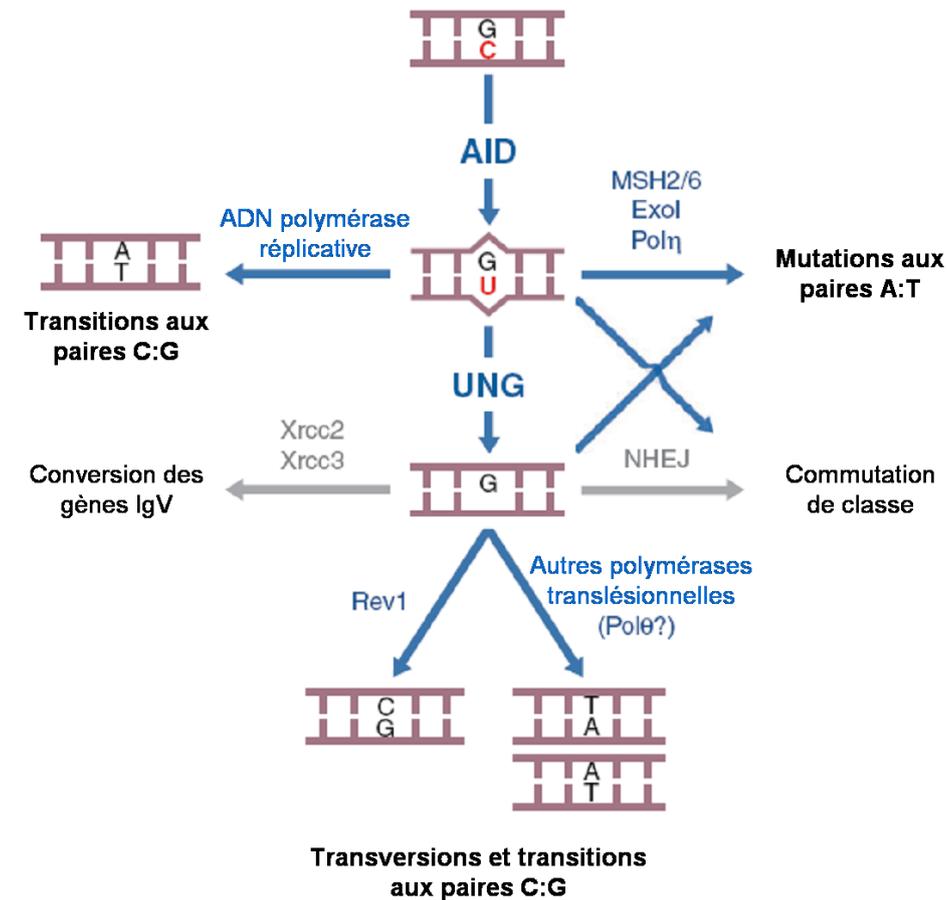


**Figure 10. Diagramme représentant la commutation de classe vers IgA (chez la souris).** Les schémas d'épissage des ARNm  $\mu$  et  $\delta$  et le transcrit germinale  $\alpha$  sont représentés sous le locus, en haut de la figure. Des transcrits germinaux semblables sont induits à partir des gènes  $C\gamma$ ,  $C\epsilon$  et  $C\alpha$  en fonction de la stimulation reçue par la cellule B. (D'après Stavnezer *et al.*, 2008).

La commutation de classe est un phénomène de recombinaison spécifique de régions particulières de l'ADN, les régions *switch* (régions S), qui permet la jonction entre une région S donneuse et une région S accepteuse (pour revues : Chaudhuri et Alt, 2004 ; Dudley *et al.*, 2005 ; Min et Selsing, 2005 ; Stavnezer *et al.*, 2008). (**Figure 10**). L'isotype de l'immunoglobuline est ainsi modifié par remplacement du gène de la région constante de l'IgM ( $C\mu$ ) par un gène  $C_H$  en aval ( $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$ ). Par conséquent, la commutation de classe permet l'expression d'anticorps de même affinité (les gènes de la région variable ne sont pas affectés) mais d'un isotype secondaire (IgG, IgE ou IgA), dotés d'une fonction effectrice différente.

L'hypermutation somatique et la commutation de classe commencent par une déamination des résidus de déoxycytidine (dC). La déamination convertit la déoxycytidine en déoxyuridine et transforme donc une paire C:G en un mésappariement U:G. Cette étape est catalysée par l'enzyme cytidine déaminase induite après activation, AID (*activation-induced cytidine deaminase*) (Muramatsu *et al.*, 1999) (**Figure 11**). Elle agit sur l'ADN simple brin mais

pas sur des substrats d'ADN double brin. La nécessité de la transcription pour l'induction de l'hypermutation somatique et la commutation de classe s'explique par la création d'une matrice d'ADN simple brin pour l'action d'AID au sein de la zone de transcription. AID est indispensable pour l'hypermutation somatique et pour la commutation de classe (Muramatsu *et al.*, 2000 ; Revy *et al.*, 2000).



**Figure 11. Modèle de déamination de l'ADN pour la diversification des gènes d'immunoglobuline.** Cette figure détaille particulièrement l'hypermutation somatique. La déamination de l'ADN permet aussi d'initier la commutation de classe et la conversion des gènes de région variable. (D'après Di Noia et Neuberger, 2007).

# Chapitre 2 : La Synthèse d'un ARNm

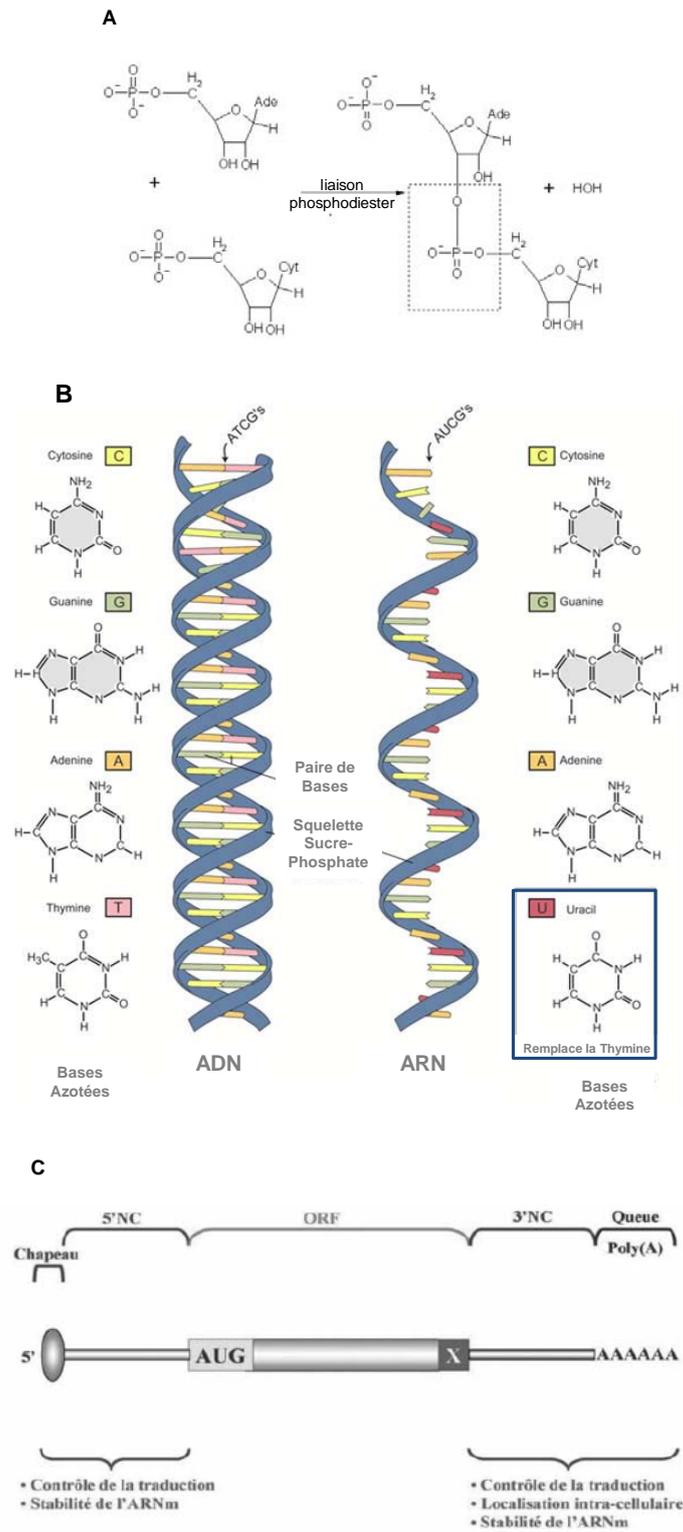
## 1- GENERALITES

En plus des ARN messagers (ARNm), supports de l'information génétique, des ARN ribosomiaux (ARNr) et de transferts (ARNt) intervenant dans la synthèse protéique, il existe de nombreuses classes de petits ARN (20-200 nucléotides) comme par exemple les micro-ARN, ainsi que de grands ARN (> 200 nucléotides) non codants (pour revue Lamoril *et al.*, 2010). Bien qu'ayant des fonctions cellulaires différentes, ces ARN présentent une structure de base similaire.

L'ARN est une macromolécule composée d'une succession de nucléotides reliés entre eux par des liaisons phosphodiester (*Figure 12A et B*). L'ARN diffère de l'ADN par la nature de son sucre, le D-ribose, et d'une base azotée pyrimidique, l'uracile (U) remplaçant la thymine (T). Chez les eucaryotes, la synthèse d'une molécule d'ARN se fait à l'aide de trois ARN polymérase (ARN pol) différentes : l'ARN pol I pour les ARNr (Werner *et al.*, 2009), l'ARN pol II pour ARN pré-messagers (pré-ARNm) (Sims *et al.*, 2004), et l'ARN pol III pour les ARNt et les petits ARN (pour revue, White, 2011).

Seuls les ARNm sont des ARN codants, ils ne représentent que 2,3% du génome (Frith *et al.*, 2005). Ils jouent un rôle intermédiaire dans l'expression de l'information génétique, en assurant le lien entre l'ADN et l'expression protéique. La synthèse des pré-ARNm comporte 3 grandes étapes (initiation, élongation, terminaison) (voir chap2, §2).

Sur le plan structural, un ARNm est constitué d'un chapeau (ou coiffe) en 5' (ajout d'un nucléotide G méthylé en 5' du pré-ARNm), d'une partie 5' non traduite (5'UTR, *untranslated region*), d'une séquence codante appelée « *open reading frame* » (ORF) débutant par un codon initiateur (AUG) et se terminant par un codon stop (UAA, UGA ou UAG), d'une région 3' non traduite (3'UTR) contenant un signal de polyadénylation (AAUAAA) permettant l'ajout d'une queue poly-A (*Figure 12C*) (pour revue Chen *et al.*, 2006).



**Figure 12. Caractéristique d'un ARN**

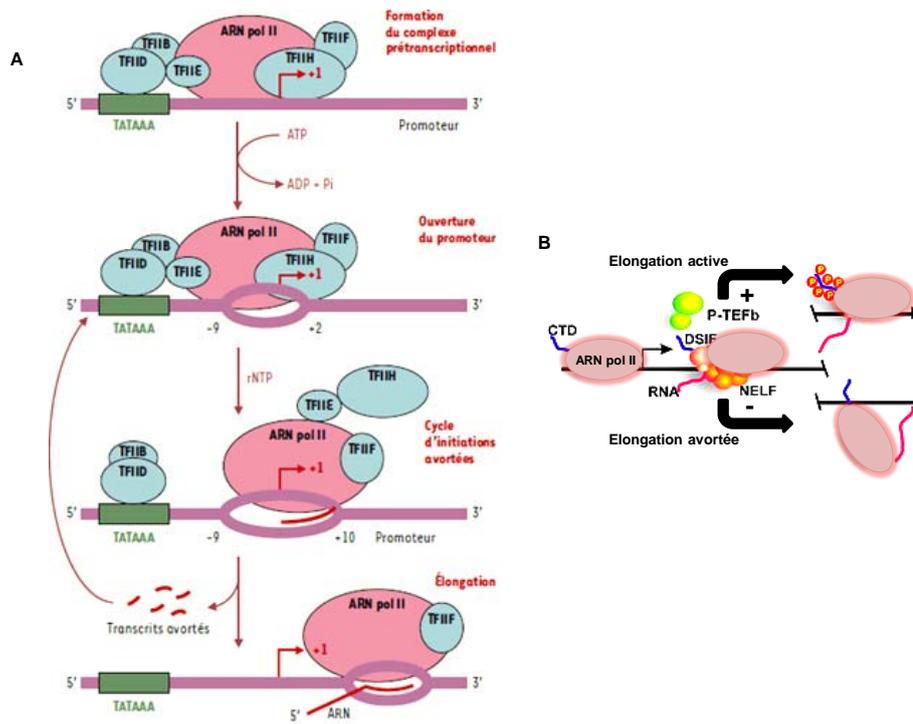
**A.** La liaison phosphodiester. **B.** Différences entre ADN et ARN. **C.** Structure d'un ARNm.

## 2- LA TRANSCRIPTION

### 2.1 L'INITIATION

La transcription des pré-ARNm se déroule le plus fréquemment au sein d'une chromatine décompactée, appelée euchromatine, permettant à la machinerie transcriptionnelle d'accéder à l'ADN. Une séquence d'ADN particulière appelée « boîte TATA », située à environ 30 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (+1), permet la fixation de l'ARN pol II. On trouve également une région dite « Enhancer » qui peut stimuler la transcription en étant très éloignée du site d'initiation de la transcription (**Figure 13A**). A titre d'exemple, la région régulatrice en 3' du locus *IgH* (3'RR) située à plus d'une centaine de kilobases est capable de stimuler la transcription initiée à partir des promoteur VH (pour revue, Khamlichi *et al.*, 2000, Pinaud *et al.*, 2011 ).

L'ARN pol II est une enzyme d'environ 600KDa constitué de 12 sous-unités (pour revue Conaway *et al.*, 2000). Elle se fixe sur la région promotrice en compagnie des facteurs généraux de la transcription TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH (TF pour « *Transcription Factor* ») (Orphanides *et al.*, 1996) (**Figure 13A**). TFIIH présente une activité hélicase et catalyse l'ouverture de la double hélice d'ADN entre les positions -9 et +2 pour former une « bulle transcriptionnelle » (Douziech *et al.*, 2000) qui s'étend en aval au fur et à mesure que la transcription progresse. Ceci rendra possible l'appariement des ribonucléotides (rNTP) libres au brin matrice et donc l'initiation de la transcription. La catalyse nécessite la présence de deux ions Mg<sup>2+</sup> qui se retrouvent au site actif de la polymérase. Au fur et à mesure que la transcription progresse, la bulle s'étend en aval d'une paire de base de plus que la position du dernier rNTP ajouté (Holstege *et al.*, 1997). Après ajout du quatrième rNTP, le complexe pré-transcriptionnel subit un changement de conformation qui conduit à la stabilisation du complexe ouvert. TFIIH n'est alors plus nécessaire au maintien de la bulle de transcription. Jusqu'à l'atteinte de la position +10, l'ARN pol II entre dans un cycle d'initiations avortées (« *abortive initiation* ») puisque la polymérase peut s'arrêter à tout moment, relâcher l'ARNm en formation, reculer sur la matrice d'ADN pour repositionner son centre catalytique au site d'initiation et entreprendre un nouveau cycle (Holstege *et al.*, 1997). Lorsque l'ARN pol II atteint la position +11, la région promotrice située entre -9 et +2 est refermée et cela permet la transition entre l'étape d'initiation et d'élongation de la transcription. Les facteurs généraux de transcription, à l'exception de TFIIIF, sont progressivement relâchés et l'ARN pol II peut alors s'associer aux facteurs d'élongation (pour revue, Conaway *et al.*, 2000) ) (**Figure 13A**).



**Figure 13. Étapes de la transcription par l'ARN polymérase II.**

**A.** L'ARN polymérase II (ARN pol II) et les facteurs généraux de transcription s'assemblent d'abord sur le promoteur, pour former le complexe pré-transcriptionnel. Puis, TFIIH catalyse l'ouverture du promoteur entre -9 et +2 par rapport au site d'initiation pour former la bulle transcriptionnelle, qui s'étend en aval au fur et à mesure que la transcription progresse. Jusqu'à la position +10, l'ARN pol II effectue un cycle d'initiations avortées. A la position +11, le promoteur se referme entre -9 et +2 et le complexe entre alors dans un mode d'élongation productive. La bulle transcriptionnelle reste alors ouverte entre -9 et +2 par rapport à la position du dernier rNTP ajouté. **B.** Phosphorylation de CTD activant l'élongation, p-TEFb agit positivement en hyperphosphorylant. DSIF et NELF inhibe l'élongation en empêchant la phosphorylation de CTD. (D'après Langelier *et al.*, 2002)

## 2.2 LA PHASE D'ÉLONGATION

La phase d'élongation est caractérisée par la phosphorylation du domaine CTD (Carboxy Terminal Domain) de l'ARN pol II. Ce domaine de 220 kDa est riche en résidus sérine et thréonine pouvant être phosphorylés sur leur groupement hydroxyle (David *et al.*, 2011). L'hyperphosphorylation du domaine CTD est réalisée par TFIIF et accompagne le début de l'élongation. Des études, utilisant un inhibiteur de protéine kinase capable d'induire un arrêt de l'élongation : le DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) (Chodosh *et al.*, 1999 ; Marshall et Price, 1992), ont permis de montrer que P-TEFb (« Positive transcription elongation factor b »), une kinase cycline dépendante, assure la phosphorylation du domaine CTD et permet l'élongation (Marshall, *et al.*, 1996 ; pour revue, Conaway *et al.*, 2000). Deux autres facteurs nommés NELF (« Negative Elongation Factor Complex ») et DSIF (« DRB-sensitivity inducing factor ») contrôlent négativement la phase d'élongation en entraînant l'hypophosphorylation du domaine CTD (**Figure 13B**) (pour revue, Conaway *et al.*, 2000).

Durant la phase d'élongation, la fréquence d'incorporation de nucléotide varie fortement. Des phases actives de transcription et des phases de « pause » transcriptionnelles vont ainsi se succéder en fonction de la conformation du complexe d'élongation (pour revue, Shilatifard *et al.*, 2003). Les facteurs d'élongation, tels que les membres de la famille ELL (Eleven-Nineteen Lysine-Rich Leukemia) peuvent agir directement avec l'ARN pol II et augmenter la vitesse d'élongation en supprimant les pauses. (pour revue, Conaway *et al.*, 2000 ; Shilatifard *et al.*, 2003). En plus des facteurs d'élongation agissant directement sur l'ARN pol II, il existe une collection de protéines qui agissent sur l'élongation du transcrit en modifiant la structure chromatinienne et la rendant plus accessible à la transcription. Parmi ces acteurs, on peut citer le complexe FACT (« facilitates chromatin transcription ») qui interagit avec le nucléosome et les dimères d'histones H2A-H2B, et assure le démantèlement du nucléosome durant la transcription (Orphanides *et al.*, 1998 ; pour revue, Conaway *et al.*, 2000).

### **2.3 LA TERMINAISON**

Il n'existe pas de réelle séquence de terminaison de la transcription, mais il semble que ce soit la reconnaissance du signal de polyadénylation AAUAAA par la machinerie transcriptionnelle qui provoque l'arrêt de la transcription et le décrochage de l'ARN pol II. Une fois la transcription terminée, l'ARN obtenu subit 3 étapes de maturation.

Il subit un clivage en aval du signal de polyadénylation par un complexe protéique et une polymérase spécifique (la polyA Polymérase ou PAP) qui ajoute la queue polyA, composée de 50 à 200 résidus adénine, respectivement chez les levures et les eucaryotes supérieurs. Cette queue polyA est essentielle à la stabilité de l'ARN en permettant le recrutement de protéines spécifiques : les PABP (« polyA binding protein ») qui protègent l'ARNm de l'attaque d'exoribonucléases 3' et permettent avec d'autres acteurs l'export, la traduction et la dégradation de l'ARNm (Shatkin et Manley, 2000, Hocine *et al.*, 2010).

A l'extrémité 5', l'addition d'une coiffe N7-méthylguanosine (m<sup>7</sup> GpppN) est réalisée après le début de la transcription, quand le transcrit compte environ 30 nt (Hocine *et al.*, 2010). Cette coiffe est tout d'abord reconnue dans le noyau par le « cap binding complex » ou CBC, composé de deux protéines CBP80 et CBP20. Ce CBC interagit avec le complexe du pore nucléaire et permet l'export de l'ARNm vers le cytoplasme.

Chez les eucaryotes, la troisième étape de maturation est l'épissage (élimination des introns), c'est une étape très importante au cours de la synthèse d'un ARNm.

### 3- L'ÉPISSAGE DES PRE-ARNm

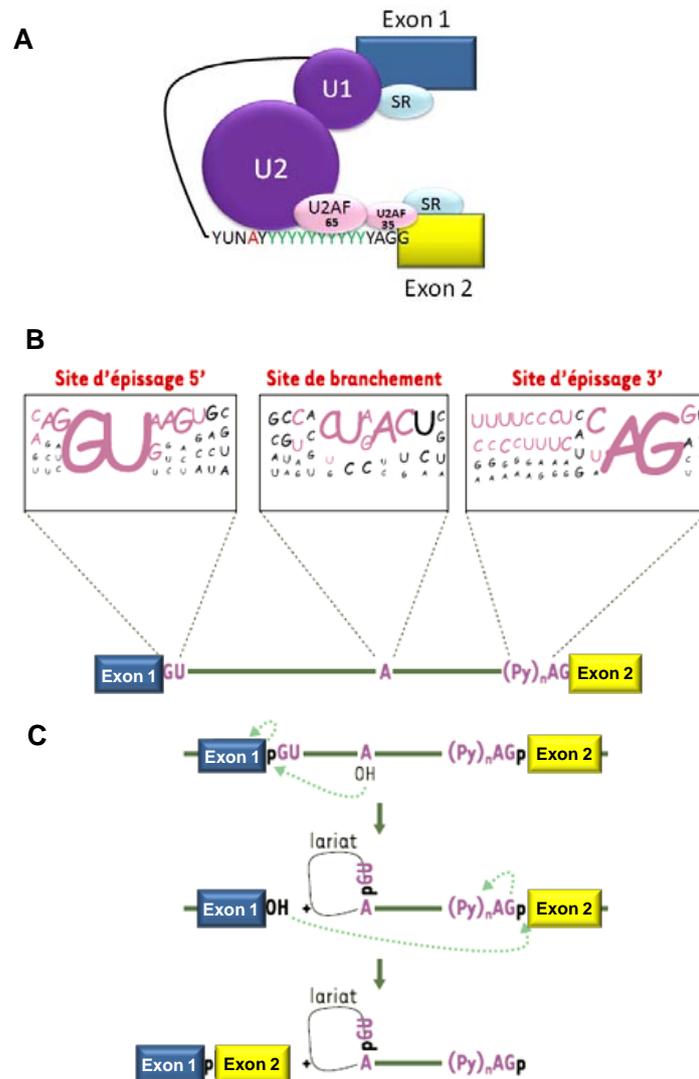
Chez les eucaryotes, l'épissage des pré-ARNm permet d'éliminer les séquences introniques pour réunir entre eux les exons correspondant à la partie codante du gène. Cet épissage est effectué à l'aide d'un complexe ribonucléoprotéique (RNP) : le spliceosome (**Figure 14**). L'épissage des pré-ARNm concerne au moins 95% des transcrits et constitue un préalable à l'exportation des ARNm dans le cytoplasme, siège de la synthèse protéique.

Il est maintenant accepté que pour de nombreux gènes la transcription et l'épissage sont interconnectées ; on parle alors d'épissage co-transcriptionnel. Le lien entre l'épissage et la transcription est assuré par le domaine CTD de l'ARN pol II, qui peut servir de plateforme pour favoriser l'interaction entre les facteurs d'épissage et le transcrit naissant (Bentley *et al.*, 2002 ; Das *et al.*, 2007 Bittencourt *et al.*, 2008).

#### 3.1 MECANISMES D'ÉPISSAGE

Trois déterminants de séquence sont requis (**Figure 14**): les sites d'épissage 5' (site donneur) et 3' (site accepteur) situés aux jonctions exon-intron, respectivement en 5' et 3' de l'intron, et le site de branchement en amont du site 3' accepteur.

Cette réaction a lieu au sein du spliceosome, un complexe dont l'assemblage et le fonctionnement requièrent plus de 150 polypeptides et dont cinq « small nuclear ribonucléoprotéins (snRNP) » (U1, U2, U4, U5 et U6) qui forment le cœur de ce mégacomplexe (Nilsen, 2003). Le spliceosome assure les fonctions de reconnaissance des sites d'épissage et, d'élimination des introns et de ligature des exons.



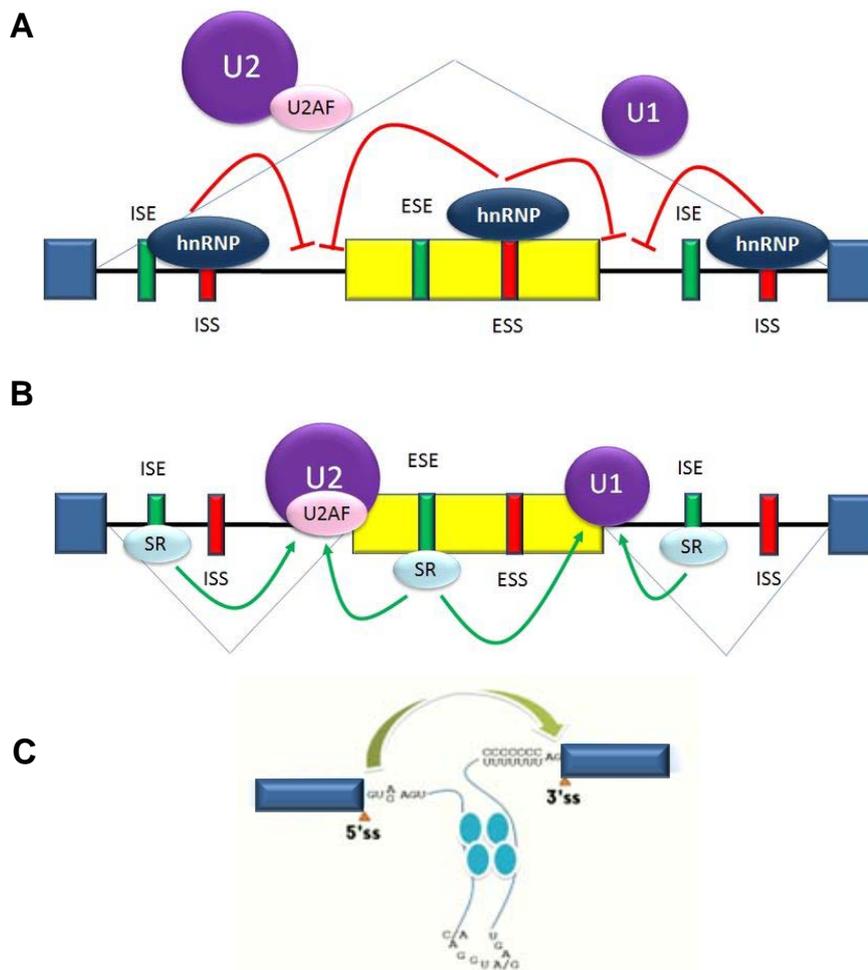
**Figure 14. La reconnaissance des signaux d'épissage.** **A.** La reconnaissance du site d'épissage 5' (5'ss) (A/CAGGUA/GAGU) s'effectue *via* snRNP U1, alors que la reconnaissance du site de branchement de la région riche en pyrimidines et du dinucléotide AG met en jeu respectivement snRNP U2, U2AF65 et U2AF35. La reconnaissance du site d'épissage 3' (3'ss) peut être couplée à la liaison de snRNP U1 en aval, contribuant ainsi à la définition de l'exon. **B.** Profil des séquences consensus au site d'épissage 5', au site de branchement et au site d'épissage 3'. À chaque position, la fréquence des 4 nucléotides A, C, G et T est représentée par la taille des caractères. Les séquences les plus conservées sont les dinucléotides GU et AG, respectivement en 5' et en 3' de l'intron, et le nucléotide A au niveau du site de branchement. (Py)<sub>n</sub> : étendue de polypyrimidines. **C.** Réaction d'excision-épissage d'un pré-ARNm. L'épissage se déroule en deux étapes successives, impliquant chacune une réaction de trans-estérification. Lors de la première étape, le groupement hydroxyle de l'adénosine du site de branchement attaque le phosphate du site d'épissage 5'. Cette réaction engendre un exon 5' libre et un « lasso » (lariat) intermédiaire. Lors de la deuxième étape, le groupement hydroxyle de l'exon 5' attaque le phosphate du site d'épissage 3', produisant ainsi l'ARNm et relargant l'intron sous forme de lasso. (D'après Fisette et al., 2009 & Corcos et al., 2005)

Le site donneur d'épissage (5') est reconnu par un complexe ribonucléoprotéique appelé snRNP U1, le site d'épissage est caractérisé par la présence du dinucléotide GU. La reconnaissance du site accepteur (3'), constitué d'un site de branchement, d'une séquence riche en pyrimidines et du dinucléotide AG, exige la participation de plusieurs facteurs dont le snRNP U2 et l'hétérodimère U2AF65/U2AF35 (U2 Auxiliary Factor) (**Figure 14A et B**) (pour revue Fiset *et al.*, 2009). Une fois les extrémités de l'intron jumelées, l'assemblage complet du spliceosome est réalisé par l'ajout des autres snRNP, ce qui aboutit à deux réactions successives de *trans*-estérification menant à la ligature des exons et à l'excision de l'intron (pour revue Black, 2003) (**Figure 14C**).

Pour faire face à la multiplicité des sites potentiels d'épissage et à leur faible conservation, le spliceosome doit être doué d'une grande flexibilité pour décrypter les différents codes d'épissage (pour revue Tazi *et al.*, 2005). Outre les jonctions intron-exon qui sont insuffisantes pour définir les sites d'épissage, ceux-ci requièrent des éléments supplémentaires de deux types :

(1) des éléments cis qui sont des séquences régulatrices activatrices ou inhibitrices et peuvent être localisées dans les exons aussi bien que dans les introns, d'où quatre catégories : ESE et ESS d'une part (« exonic splicing enhancer » et « exonic splicing silencer »), ISE et ISS (« intronic splicing enhancer » et « intronic splicing silencer ») d'autre part ;

(2) des facteurs trans capables de reconnaître ces séquences et qui seront donc soit des répresseurs, soit des activateurs de l'épissage (Figure 15). Pris dans leur ensemble, ces éléments forment un code qui dicte les profils d'épissage en fonction des conditions cellulaires (Wang *et al.*, 2008.; Barash *et al.*, 2010)



**Figure 15. Régulation de l'épissage des pré-ARNm**

**A.** Des séquences exoniques ESS et introniques ISS où se fixe des protéines répresseurs (majorité de hnRNPs) diminuent la reconnaissance des signaux d'épissage par le spliceosome. **B.** Des séquences exoniques ESE et introniques ISE liées par les protéines SR permettent d'augmenter la reconnaissance des signaux d'épissage par le spliceosome. **C.** L'interaction entre les protéines hnRNP liées à proximité des sites d'épissage permet un rapprochement des extrémités de l'intron et contribue à inhiber l'utilisation de pseudo-sites introniques. (*D'après Black, 2003 ; Fisette et al., 2009*)

Les "Splicing silencers" sont des sites où viennent se lier des protéines réprimant l'épissage, réduisant ainsi la probabilité qu'un site d'épissage proche puisse être utilisé. Ils peuvent être localisés dans l'intron (ISS) ou dans l'exon voisin (ESS). De nombreux acteurs peuvent se fixer à ces séquences en fonction des conditions cellulaires. La majorité des protéines répresseurs sont des hnRNPs (« heterogeneous nuclear ribonucleoproteins ») comme hnRNPA1 ou polypyrimidine tract binding protein (PTB) (Matlin *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008).

Les "Splicing enhancers" sont quand à eux des sites où des protéines activatrices d'épissage se fixent, augmentant ainsi la probabilité d'épissage. Il existe des séquences propres aux introns (ISE) ou aux exons (ESE). La grande majorité des facteurs activateurs sont des

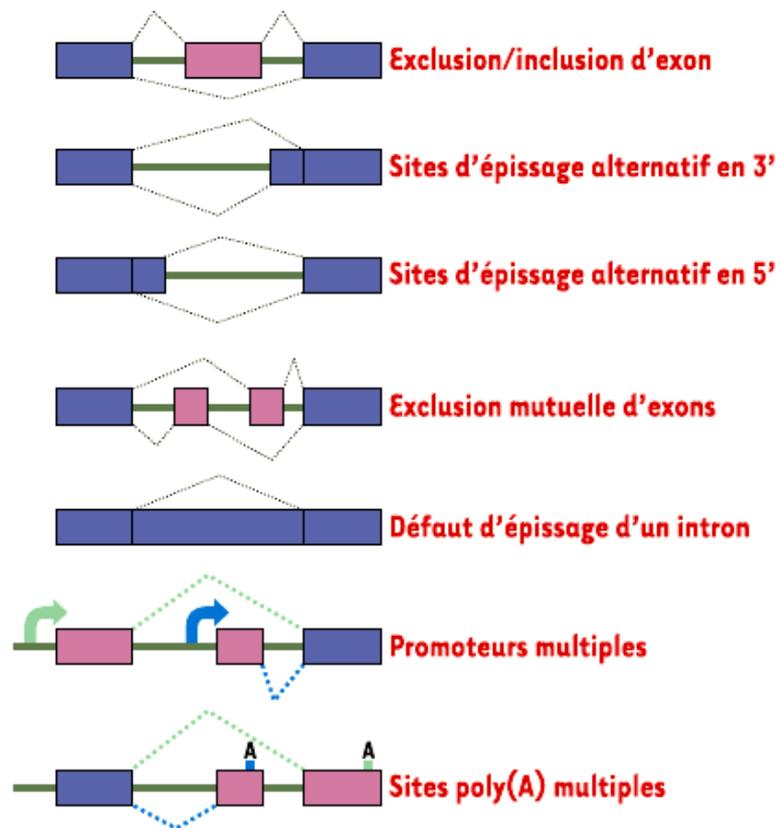
membres de la famille des SR (serine/arginine-rich) protéines, présentant à la fois des motifs reconnaissant l'ARN et des domaines SR (Blencowe, 2000; Wang *et al.*, 2008).

Comment le complexe situé au site d'épissage d'un exon trouve le site auquel il doit s'assembler en aval ? En effet, la taille des introns de mammifères peut atteindre plusieurs milliers de nucléotides (pour revue, Black, 2003), quels mécanismes permettent de jumeler les jonctions d'épissage authentiques tout en évitant l'utilisation de pseudo-sites retrouvés inmanquablement dans les grands introns. Un mécanisme proposé par l'équipe de Chabot et collaborateurs suggère que les protéines hnRNP A1, liées aux séquences introniques près des jonctions d'épissage, pourraient interagir entre elles et favoriser le rapprochement des complexes d'épissage distants, tout en inhibant les sites d'épissage situés entre les séquences de liaison pour A1 (Martinez-Contreras *et al.*, 2007) (**Figure 14**).

### **3.2 EPISSAGE ALTERNATIF**

Chez l'Homme, on estime qu'au moins 95% des transcrits peuvent être soumis à un épissage alternatif (EA) (Black, 2003 ; Modreck *et al.*, 2001). Chez les eucaryotes en général, l'analyse des banques d'EST (*expressed sequence tags*) montre en effet que les pré-ARNm peuvent faire l'objet de six à huit types d'épissages distincts (**Figure 16**). Des phénomènes d'EA peuvent également provenir de l'utilisation de multiples promoteurs ou de différents sites de polyadénylation (Figure 14). Un très bon exemple de ce dernier processus est l'EA des transcrits de chaînes lourdes d'Ig qui permet le passage d'une forme membranaire à une forme sécrétée d'Ig (Early *et al.*, 1980b ; Rogers *et al.*, 1980 ; Maki *et al.*, 1981 ; Rogers *et al.*, 1981).

Les événements d'EA peuvent changer la nature protéique ou aboutir à la production de protéines tronquées suite à l'apparition de codons stop prématurés (Modrek et Lee, 2002). Ces dernières étant cependant rares du fait de l'activation du processus de dégradation des ARNm contenant des codons stop prématurés (« *nonsense-mediated mRNA decay* » : *NMD*) (Nagy et Maquat, 1998). Ce mécanisme sera détaillé dans la suite du manuscrit (voir Chap3 §4).



**Figure 16. Différents types d'épissage alternatif des ARN pré-messagers.** En bleu les exons constitutifs, en violet les exons alternatifs, et en traits pleins les introns. Différentes combinaisons d'assemblage des exons, voire de rétention d'intron sont possibles. En outre, l'utilisation de multiples promoteurs peut dicter les choix d'épissage. Enfin, l'épissage alternatif peut conduire à l'utilisation de signaux de sites de polyadénylation distincts. (D'après Corcos *et al.*, 2005)

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la transcription et l'épissage sont intimement liés (épissage co-transcriptionnelle). La transcription et la vitesse d'élongation vont influencer le phénomène d'EA. Ainsi, un ralentissement de cette vitesse procurerait plus de temps à la machinerie d'épissage pour un assemblage sur des sites d'épissage faibles (De la Mata *et al.*, 2003). Dans ce sens, il a été montré qu'une faible vitesse d'élongation favorisait l'inclusion d'exons alternatifs (pour revue Noguès *et al.*, 2003). Des sites de pause internes pour l'ARN ARN pol II, positionnés de façon adéquate, auraient un effet similaire (Roberts *et al.*, 1998). Enfin, le couplage entre la transcription et l'épissage alternatif s'inscrit fort probablement dans un processus dynamique plus global où entre en jeu la structure de la chromatine. Par exemple, le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) diminuerait la vitesse d'élongation de l'ARN ARN pol II et provoquerait son accumulation au sein d'une unité d'EA (Batsche *et al.*, 2006). Ainsi, à la suite d'une première ronde transcriptionnelle, une série de modifications de la chromatine pourrait modifier la vitesse

d'élongation en jouant sur la phosphorylation de CTD et avoir des conséquences sur les profils d'EA (Kundu *et al.*, 2007).

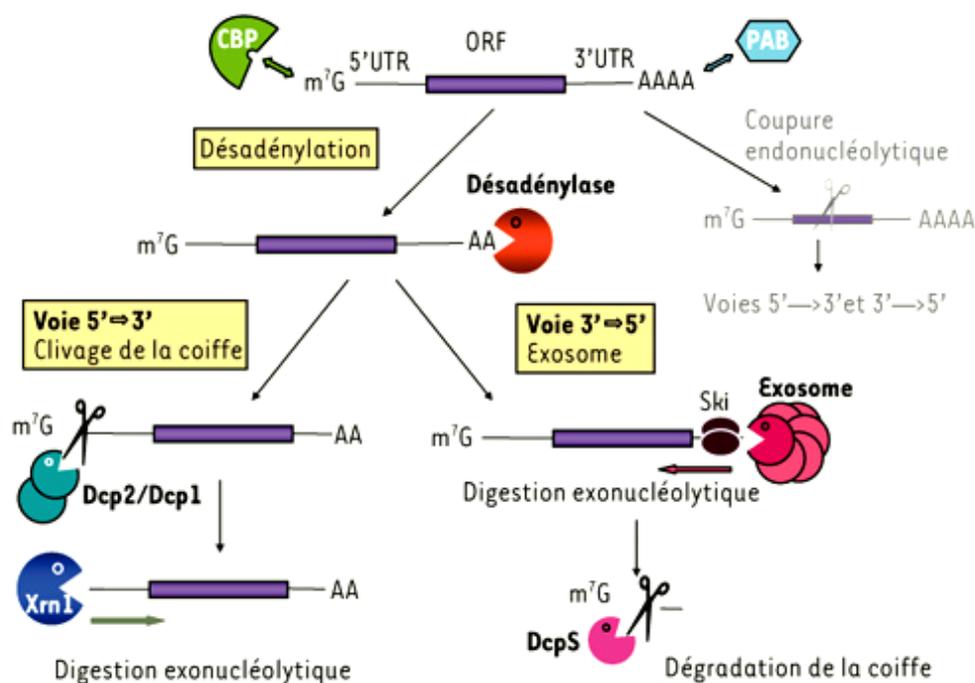
#### 4- L'EDITING DES ARN

Les ARN peuvent également être diversifiés par « *editing* ». L'editing des ARN (codant et non-codant) est une modification post-transcriptionnelle de l'ARN qui provoque des changements subtils (insertion, délétion, conversion enzymatique d'un ou quelques ribonucléotides). La forme la plus commune d'editing est la transformation de l'adénosine en inosine. Il s'agit d'une réaction de désamination de l'adénosine en inosine catalysée par les enzymes « *adenosine desaminases acting on RNA* » : ADARS. L'inosine est ensuite reconnue par le ribosome comme une guanosine (A→G) (Li *et al.*, 2009). L'*editing* peut aussi être réalisé à l'aide d'une famille de cytidine déaminase, les *apolipoprotein B editing complex* (APOBEC), groupe d'enzymes agissant sur l'ADN et/ou l'ARN. Elles catalysent la désamination de la cytosine en uridine (Conticello, 2008). Dans certains cas, l'*editing* permet de diversifier les ARNm en modifiant les sites d'épissage ou les codons stop.

#### 5- DEGRADATION DES ARNm

La dégradation des ARNm a longtemps été considérée comme une simple étape d'élimination des ARNm. Au cours des dernières années, cette vision a été totalement remise en cause. Les temps de demi-vie des ARNm, révélateurs de leur vitesse de dégradation, peuvent varier énormément. Ainsi chez les mammifères, ils varient de 15 minutes (ARNm *c-fos*) à 24 heures (ARNm de la globine), montrant que l'élimination des ARN est un processus spécifique et non un processus par défaut.

La dégradation des ARNm est essentielle, en l'absence d'une dégradation rapide des ARNm, une régulation rapide de la production de protéines par la seule induction transcriptionnelle serait impossible (pour revue Camier et Séraphin, 2007).



**Figure 17. Les principales voies cytoplasmiques de dégradation des ARNm normaux.** L'événement initial le plus fréquent est une désadénylation. Le corps de l'ARNm est ensuite dégradé par une des 2 voies : 5'→3' ou 3'→5'. Dans le cas de la voie 5'→3', la désadénylation est suivie du clivage de la coiffe par l'enzyme Dcp2/Dcp1 puis d'une digestion exonucléolytique par Xrn1. Dans le cas de la voie 3'→5', la désadénylation est suivie du recrutement du complexe Ski et d'une digestion exonucléolytique par l'exosome ; la coiffe est finalement dégradée par l'enzyme DcpS. En gris est représentée une voie plus rare, amorcée par une coupure endonucléolytique de l'ARNm, suivie des voies classiques. (D'après Camier et Séraphin, 2007)

## 5.1 LES ACTEURS DE LA DEGRADATION

Que de précautions pour manipuler les ARNm au laboratoire afin qu'ils ne soient pas immédiatement dégradés par les ribonucléases ! Et pourtant, dans les cellules, la dégradation des ARNm est un processus hautement contrôlé. Dans la cellule, plusieurs facteurs contribuent à la protection des ARNm contre l'action des ribonucléases. Lors de sa synthèse, l'ARNm subit des modifications à ses extrémités 5' et 3' : ajouts d'une coiffe et d'une queue poly(A). Ces marques, liées par des protéines spécifiques, les *cap-binding protein* (CBP) (Hocine *et al.*, 2010) et *Poly(A)-binding protein* (PAB) le protègent de l'action des exoribonucléases (Shatkin et Manley, 2000). L'ARNm est également associé à d'autres protéines au sein de larges particules ribonucléoprotéiques (mRNP) qui notamment le protègent de coupures endonucléolytiques non spécifiques. La dégradation d'un ARNm résulte d'un profond remaniement de la mRNP, déclenché par des signaux spécifiques conduisant au recrutement des enzymes et activateurs de la dégradation (**Figure 17**).

## 5.2 DEADENYLATION

La dégradation cytoplasmique des ARNm chez les eucaryotes débute, le plus souvent, par un raccourcissement de la queue poly(A), on parle de déadénylation. Cette étape est déterminée en grande partie la vitesse de dégradation de l'ARNm. Deux complexes protéiques cytoplasmiques (très conservés chez les eucaryotes) possèdent une activité de déadénylation :

- le complexe Pan2/Pan3, activé par la PAB associée à la queue poly(A). Il semble intervenir lors d'une étape initiale de déadénylation rapide (Brown et Sachs, 1998 ; Yamashita *et al.*, 2005).
- le complexe Ccr4/Not, majoritaire chez les mammifères, la drosophile et la levure, inhibé par la PAB. Il contient 2 exonucléases, Ccr4 et Caf1 (Daugeron *et al.*, 2001; Finoux et Seraphin, 2006; Tucker *et al.*, 2002; Bianchin *et al.*, 2005).

L'étape de déadénylation n'inactive pas définitivement l'ARN, celui-ci peut éventuellement être polyadénylé à nouveau ou, dans certains cas, stabilisé par des protéines spécifiques (chez les métazoaires). Cependant le plus souvent, lorsqu'un certain nombre de résidus A restant sur l'ARNm est atteint, de l'ordre de 10 chez la levure ou 30-60 chez les mammifères, l'ARNm s'engage dans une dégradation rapide et irréversible.

Deux voies sont possibles pour la seconde étape : la voie 5'→3' ou la voie 3'→5', selon le sens de dégradation.

## 5.3 LES VOIES EXONUCLEASIQUES 5'→3' ET 3'→5'

- Dans la voie 5'→3', après déadénylation, la mRNP subit un remodelage conduisant au recrutement et à l'activation de l'enzyme de clivage de la coiffe en 5' (complexe Dcp1/Dcp2 : « *decapping protein* ») (**Figure 17**), c'est une étape irréversible (Cougot *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2006). L'ARN clivé est ensuite dégradé de façon processive par l'exonucléase Xrn1 dans le sens 5'→3'.
- Dans la voie 3'→5', la désadénylation est suivie du recrutement d'un complexe exonucléolytique appelé exosome, via l'association des protéines Ski. L'exosome est un complexe d'une dizaine de sous-unités catalysant une digestion de 3'→5'. Il possède un cœur de neuf exoribonucléases 3'-5' associées à d'autres protéines nécessaires à son activité nucléaire et cytoplasmique (Mitchell *et al.*, 1997; Buttner *et al.*, 2006;

Dziembowski *et al.*, 2007). La voie 3'→5' se termine avec l'hydrolyse de la coiffe par l'enzyme DCP-S. Cette même enzyme hydrolyse également la coiffe libérée lors de la dégradation 5'→3' (Liu *et al.*, 2002; Van Dijk *et al.*, 2003) » (**Figure 17**).

#### **5.4 COUPURES ENDONUCLEOLYTIQUES**

Dans certains cas, la dégradation peut être amorcée par une coupure endonucléolytique, qui donne naissance à 2 fragments d'ARN : un fragment 5' « coiffé », dépourvu de queue poly(A), pris en charge par l'exosome, et un fragment 3' sans coiffe pris en charge par l'exonucléase Xrn1. Les endonucléases impliquées restent mal connues (pour revue Camier et Séraphin, 2007).

#### **5.5 SITES DE DEGRADATION**

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de sites (ou *foci*) d'accumulation de protéines impliquées dans le métabolisme des ARNm dans le cytoplasme (Van Dijk *et al.*, 2003; Cougot *et al.*, 2004; Eulalio *et al.*, 2007, Parker et Sheth, 2007). Ces sites (appelés *P-bodies* : « *processing bodies* », *Dcp-bodies* : « *decapping bodies* » ...) contiennent en particulier des acteurs de la voie de dégradation 5'→3' (Dcp2, Dcp1, Xrn1...). Les enzymes et activateurs de la dégradation ne sont pas uniquement localisés dans ces *foci*, on les trouve également diffus dans le cytoplasme. Certaines enzymes comme l'exosome, ou des désadénylases, semblent être localisées de manière diffuse dans le cytoplasme et absentes des *foci* (Parker et Sheth, 2007). La proportion de dégradation totale s'effectuant dans les *foci* cytoplasmiques et la localisation intracellulaire des autres événements de dégradation restent à déterminer, ce qui pose la question de l'organisation spatiale de la dégradation des ARNm dans les cellules.

# Chapitre 3 : La Surveillance des ARN

## 1- GENERALITES

La surveillance des ARN est un terme utilisé pour décrire l'ensemble des mécanismes visant à contrôler la qualité des ARN en éliminant les ARNm contenant des codons stop prématurés (PTC : « premature termination codon ») (Isken et Maquat, 2007). Les mutations non-sens peuvent être présentes sur l'ADN suite à des erreurs lors de la réplication, à des stress génotoxiques (exposition aux rayonnements UV ...), ou à des événements de recombinaisons tels que les réarrangements des gènes d'Ig (voir chap. 1, §2.1.1). Des erreurs lors de transcription ou des épissage alternatifs peuvent également engendrer des mutations non-sens uniquement présentes sur l'ARN. La dégradation des ARN aberrants implique des voies classiques de dégradation (voir chap. 2, §5) et se déroule dans des compartiments spécialisés tels que les corps de maturation cytoplasmiques (*P-bodies*) (voir chap. 2, §5.5)

La régulation post-transcriptionnelle *via* l'activation des différents mécanismes de surveillance des ARN permet de discriminer les transcrits normaux de ceux contenant des PTC et empêcher la traduction de ces derniers. En effet, des protéines tronquées résultant de la traduction de transcrits non-sens pourraient avoir des effets délétères pour l'organisme.

Au cours de la transcription, les ARN non-sens peuvent être passés sous silence à différents stades. Ainsi, la surveillance des ARN peut agir directement sur les transcrits primaires par un processus d'inhibition d'épissage. Durant l'épissage, un phénomène appelé NAS pour « *nonsense-associated altered splicing* » permet d'éliminer les exons contenant des PTC par épissage alternatif. Les transcrits matures eux sont ciblés par un mécanisme de dégradation des ARNm non-sens ou NMD (« *nonsense mediated mRNA decay* ») (Isken et Maquat, 2007). Ces trois processus (**Figure 18**) sont donc complémentaires et peuvent coexister au sein d'une même cellule pour contrôler efficacement la qualité des ARN.

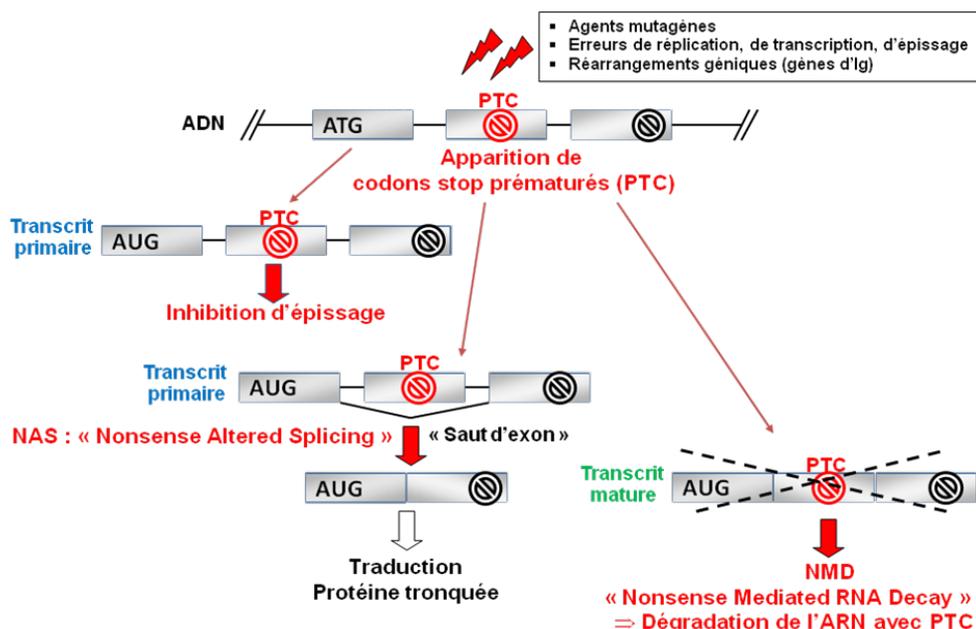


Figure 18. Les différents mécanismes de surveillance des ARN.

## 2- L'INHIBITION D'ÉPISSAGE

Chez les eucaryotes, l'épissage des pré-ARNm est une étape cruciale dans l'expression génique. Les introns doivent être éliminés et les exons liés afin de produire un transcrit mature. Des études, réalisées dans l'équipe de Milstein sur les gènes de chaînes légères *kappa*, ont révélé que l'épissage des pré-ARNm Igk pouvaient être inhibé par la présence de PTC (Lozano *et al.*, 1994 ; Aoufouchi *et al.*, 1996). Ce phénomène d'inhibition d'épissage ne semble pas être dépendant de la synthèse protéique et permet de réduire considérablement le taux d'ARNm Igk non-sens (Lozano *et al.*, 1994 ; Aoufouchi *et al.*, 1996). Par des mécanismes restants à élucider, la cellule semble donc capable d'identifier dans le noyau, des mutations non-sens sur les transcrits primaires. Dans ce sens, il a été montré que les transcrits primaires de chaînes lourdes  $\mu$  contenant un PTC s'accumulent à proximité du site de transcription et, par conséquent, qu'il semble exister des mécanismes de reconnaissance du cadre de lecture au sein même du noyau (Mühlemann *et al.*, 2001). Ce mécanisme d'inhibition d'épissage encore appelé NMUP pour « nonsense-mediated upregulation of pre-mRNA », a également été identifié pour les transcrits non-sens du TCR $\beta$  (Imam *et al.*, 2010), et pour certains transcrits du virus MVM (« Minute Virus of Mice ») (Gersappe *et al.*, 1999 a et b ; Naeger *et al.*, 1992).

Les études menées par l'équipe de Wilkinson afin de comprendre les fondements moléculaires du NMUP ont permis de montrer qu'une accumulation de transcrits primaires ou

partiellement épissés pouvait avoir lieu en présence de mutations faux-sens n'induisant pas l'apparition de PTC (Iman *et al.*, 2010). Dans cette étude, réalisée à l'aide de constructions chimériques contenant l'exon VDJ du TCR $\beta$  et le gène de la Triose Phosphate Isomérase (TPI), la perturbation du cadre de lecture n'est pas indispensable à l'établissement du NMUP. Ces travaux plaideraient plutôt en faveur d'une accumulation de pré-ARNm induite par une des mutations sur les séquences régulatrices ESE (« exonic splicing enhancer »), qui diminueraient l'épissage. Ces séquences ESE permettent le recrutement de protéines riches en résidus sérine et arginine (rich SR proteins) qui en retour recrutent des éléments du « spliceosome » (voir chap2, §3.1).

Néanmoins, de nombreuses zones d'ombre demeurent car les résultats obtenus au cours de mon doctorat, montrant une inhibition d'épissage des transcrits Ig $\kappa$ , n'ont pas révélé de modifications de séquences ESE (Article 1 : Chemin *et al.*, 2010).

### **3- Nonsense-associated Altered Splicing (NAS)**

La fidélité de l'expression génique peut également être contrôlée durant l'épissage et, la présence de PTC des modifications du patron d'épissage. Ce processus appelé NAS (« Nonsense-associated Altered Splicing ») permet à la cellule d'éliminer par épissage alternatif les exons présentant des PTC par un phénomène de « saut d'exon ». Si le transcrit alternatif conserve la phase ouverte de lecture et si l'exon supprimé n'abolit pas la fonction protéique, le NAS peut conduire à une protéine tronquée qui conserve partiellement ou entièrement sa fonction. Les mécanismes moléculaires responsables du NAS ne sont que partiellement élucidés et il semble que 2 types de NAS peuvent avoir lieu.

Dans un premier modèle : NAS de classe I, le phénomène d'épissage alternatif et de saut d'exon résulte de mutations non-sens au sein des séquences ESE. Comme précédemment décrit pour l'inhibition d'épissage, les séquences ESE peuvent être modifiées, pas seulement par des mutations non sens, mais également par des mutations faux-sens ou des mutations silencieuses (Cartegni *et al.*, 2002). Le NAS de classe I semble indépendant de la synthèse protéique. Il a été décrit pour les transcrits codant pour le TCR $\beta$ , BRCA1, la fibrilline et les gènes d'Ig (Chang *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2001 ; Caputi *et al.*, 2002; Maquat, 2002; Buhler et Muhlemann, 2005). Comme pour l'inhibition d'épissage, ce mécanisme reste partiellement compris car l'identification des séquences ESE reste délicate et les outils bioinformatiques disponibles donnent parfois des résultats contradictoires (Article 1 : Chemin *et al.*, 2010).

Le NAS de classe II se produit en présence de mutations non-sens qui interrompent le cadre de lecture et conduit à l'élimination de l'exon contenant un PTC. Ainsi, il s'agirait d'un NAS capable de reconnaître le cadre lecture et d'éliminer l'exon contenant le PTC (Wang *et al* 2002a,b). Trois points permettent de mettre en évidence ce phénomène : (i) seules les mutations non-sens, et pas les faux-sens à des positions équivalentes, sont capables d'induire l'épissage alternatif. C'est le cas de mutations particulières localisées sur les gènes de la fibrilline et les gènes du T-cell receptor  $\beta$  (TCR $\beta$ ) (Mendell *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002 a et b) ; (ii) la régulation par épissage alternatif des transcrits avec des exons contenant des mutations non-sens est bloquée par l'introduction d'une « tige-boucle » en amont du codon initiateur ou par la mutation du codon de départ AUG ou encore la séquence consensus Kozak (Wang *et al.*, 2002 a et b; Gersappe *et al.*, 1999) ; (iii) l'élimination d'ARNt inhibe le NAS des transcrits TCR $\beta$  non-sens (Wang *et al.*, 2002a). Dans ce modèle, il est proposé que la reconnaissance du PTC peut influencer l'épissage à travers un mécanisme qui nécessite un acteur majeur du NMD : UPF1 et donc serait dépendent de la synthèse protéique. Ce mécanisme cependant différent du NMD puisqu'il ne recuère pas UPF2 (Mendell *et al.*, 2002) (voir chap3. §3.2).

En conclusion, ces différentes études suggèrent que les deux classes de NAS peuvent co-exister (Chang *et al.*,2007).

## 4- « Nonsense Mediated mRNA decay » : NMD

### 4.1 LE MECANISME DE NMD

Le processus de NMD a été mis en évidence il y a une vingtaine d'années, au cours de l'étude de pathologies humaines, comme la  $\beta$ -thalassémie, causées par des mutations non-sens ou créant des décalages du cadre de lecture, toutes deux génératrices de PTC (Baserga et Benz, 1988; Urlaub *et al.*, 1989). Il a été montré que les ARNm contenant un PTC sont rapidement dégradés, empêchant ainsi leur traduction, et protégeant la cellule des effets potentiellement néfastes liés à la production de protéines tronquées (dominant négatif, perte de fonction) (Chang *et al.*, 2007). La reconnaissance d'un codon stop anormal et le déclenchement de la NMD est un processus complexe. Ce mécanisme est néanmoins bien élucidé et repose chez les mammifères, sur des interactions entre des ribonucléoprotéines (RNP), un complexe protéique dit de jonction exon-exon (« exon junction complex » : EJC) et, des protéines de la famille UPF (« up-

frameshift ») spécifiques des non-sens (Silva *et al.*, 2009 ; Rebbapragada et Lykke-Andersen, 2009 ; Bhuvanagiri *et al* 2010).

## **4.2 LES ACTEURS MAJEURS DU NMD**

### **4.2.1 Les protéines UPF**

Chez les eucaryotes, il existe quatre membres de la famille UPF : UPF1, UPF2, UPF3a (ou UPF3) et UPF3b (ou UPF3X). L'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre ces protéines inhibe le NMD (Mendell *et al.* 2002; Gehring *et al.* 2003; Mendell *et al.* 2004; Gehring *et al.* 2005; Wittmann *et al.* 2006), et la fixation artificielle de ces protéines sur la partie 3'UTR d'un ARNm dépourvu de PTC induit sa dégradation par NMD (Lykke-Andersen *et al.* 2000; Gehring *et al.* 2003; Gehring *et al.* 2005; Kunz *et al.* 2006).

UPF1 (également nommée RENT1 chez la souris pour « *regulator of nonsense transcripts 1* ») est un complexe phosphoprotéique de 1118 acides aminés pour un poids moléculaire de 123 kDa (Perlick *et al.* 1996; Applequist *et al.* 1997). UPF1 est le facteur le plus conservé entre les espèces. Il y a 98% d'homologie entre les protéines murine et humaine (Sun *et al.*, 1998), cette dernière possède 48% d'identité avec la levure et 62% avec la drosophile (Culbertson and Leeds 2003). Elle possède une activité ATPase ARN/ADN dépendante et agit également en tant qu'hélicase à ARN 5'-3'. Cette dernière fonction est essentielle et une mutation dans ce domaine (R844C) possède un effet dominant négatif et inhibe le NMD (Sun *et al.* 1998). Son activité ATPase est nécessaire pour le relargage et le recyclage des facteurs du NMD fixés sur l'ARNm (Franks *et al.* 2010). Le domaine C-terminal est composé de quatre résidus sérine/thréonine, arborant 14 à 18 sites potentiels de phosphorylation. La séquence N-terminale (N-ter) est riche en résidus proline/glycine. et permet une interaction avec SMG5 (« *Suppressor with Morphogenetic effect on Genitalia* »), autre acteur du NMD nécessaire à la déphosphorylation d'UPF1 (Ohnishi *et al.*, 2003) (voir Chap.3, §4.3.1). Les cycles de phosphorylation / déphosphorylation d'UPF1 sont indispensables dans le mécanisme de NMD (Yamashita *et al.* 2001). UPF1 est localisée principalement dans le cytoplasme, mais il a été montré qu'elle est capable également de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme suite au traitement avec la leptomycine B (LMB), un inhibiteur spécifique de l'export nucléaire (Mendell *et al.* 2002). L'inactivation du gène *upf1* est létal chez la souris ; les embryons meurent entre 3,5 et 5,5 jours (Medgalchi *et al.*, 2001), révélant ainsi le rôle essentiel de cette protéine dans de nombreuses fonctions biologiques. En effet, en plus de ce rôle dans le NMD, UPF1 joue

un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome et la protection des séquences télomériques (Azzalin *et al.*, 2007).

UPF2 sert d'adaptateur moléculaire faisant le lien entre UPF1 et UPF3, c'est une protéine de 1272 acides aminés avec un poids moléculaire de 148 kDa (Mendell *et al.* 2000; Serin *et al.* 2001). Elle possède au moins trois domaines MIF4G (pour *middle of eIF4G-like*) (Mendell *et al.* 2000) et un domaine NLS (de localisation nucléaire) dans sa partie N-ter. Les domaines MIF4G seraient impliqués dans l'interaction d'UPF2 avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4A et eIF3 (« elongation initiation factor »). La partie C-ter est impliquée dans l'interaction avec UPF1 (Mendell *et al.* 2000).

UPF3 et UPF3X sont localisés respectivement sur les chromosomes 13 et X (Serin *et al.* 2001). Chaque protéine possède deux isoformes issues d'un épissage alternatif. UPF3 présente une forme courte (UPF3S) dans laquelle l'exon 4 est exclu, et une forme longue (UPF3L) contenant l'exon 4. UPF3X présente une forme courte dans laquelle l'exon 8 est exclu et une forme longue contenant cet exon. Les deux protéines interagissent avec UPF2 par leur partie N-ter. Elles présentent toutes deux une localisation majoritairement nucléaire mais peuvent faire la navette vers le cytoplasme (Lykke-Andersen *et al.* 2000; Serin *et al.* 2001). Malgré leurs similarités, leurs effets sur le NMD semblent être différents. En effet, la fixation artificielle d'UPF3X dans la partie 3'UTR d'un ARNm dépourvu de PTC induit fortement sa dégradation, alors que l'effet d'UPF3 est plus faible (Lykke-Andersen *et al.* 2000). De même, l'inhibition d'UPF3X par ARNi bloque le NMD mais pas celle d'UPF3 (Kunz *et al.*, 2006).

#### 4.2.2 Les protéines SMG

Les protéines SMG (« *suppressor with morphogenetic effect on genitalia* ») assurent le cycle de phosphorylation et déphosphorylation des protéines UPF. Au sein de cette famille composée de nombreux membres, 4 protéines jouent un rôle majeur dans le NMD : SMG1, SMG5, SMG6 et SMG7.

SMG1 phosphoryle UPF1 sur ses régions N-ter et C-ter. Elle appartient à la famille des PIKKs (« *phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases* »). La phosphorylation d'UPF1 par SMG1 est une des étapes clef du NMD. En effet, des mutants dépourvus d'activité kinase

inhibe le NMD, alors que des surexpressions de cette protéine augmentent la phosphorylation d'UPF1 et l'efficacité du NMD (Yamashita *et al.* 2001). SMG1 forme un complexe avec deux protéines SMG appelées SMG8 et SMG9 (Yamashita *et al.* 2009). Les travaux de Yamashita *et al.* ont mis en évidence que SMG8 est nécessaire pour le recrutement de SMG1 sur le complexe de surveillance et régule directement l'activité kinase de SMG1 sur UPF1 *in vivo*. SMG9 est quant à elle requise pour l'interaction entre SMG1 et SMG8 (Yamashita *et al.* 2009).

Les protéines SMG5 et SMG7 sont non redondantes et participent à la déphosphorylation d'UPF1. Ce ne sont pas des phosphatases, mais assurent le lien entre la protéine phosphatase 2A (PP2A) et la forme phosphorylée d'UPF1. SMG7 possède une partie N-ter avec un domaine 14-3-3, motif de fixation aux phosphosérines, impliqué dans l'interaction avec UPF1 phosphorylée. Une mutation au sein de ce domaine inhibe son interaction avec UPF1 phosphorylée *in vitro* (Fukuhara *et al.* 2005). Cette séquence 14-3-3, conservée au cours de l'évolution, est également présente chez SMG5 et SMG6. La région C-ter de SMG5 et SMG6 possèdent un domaine « PIN-like » (*Pilt N-terminal domain*) qui est caractéristique des protéines phosphodiesterases avec une activité nucléasique. Le domaine PIN de SMG6 est responsable du clivage endonucléolytique de l'ARNm à proximité du PTC (Gatfield and Izaurralde 2004; Huntzinger *et al.* 2008; Eberle *et al.* 2009).

### **4.2.3 Le complexe de Jonction Exon-Exon (EJC)**

Chez les eucaryotes supérieurs, l'épissage joue un rôle critique dans le mécanisme de reconnaissance d'un PTC et, la présence de PTC sur un ARN monoexonique n'active pas la dégradation par NMD (Maquat et Li, 2001). L'EJC est un complexe protéique déposé lors de l'épissage sur l'ARNm, à 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon (Linde and Kerem ; Le Hir *et al.* 2000a; Le Hir *et al.* 2000b). Le cœur de l'EJC est un hétérotétramère composé de quatre protéines qui reste associé de façon stable : eIF4A3, MLN51, Y14 et Magoh (Ballut *et al.* 2005; Tange *et al.* 2005; Andersen *et al.* 2006). Le cœur de l'EJC sert notamment de plateforme d'ancrage aux facteurs UPF2 et UPF3/UPF3X (Jurica *et al.* 2002; Makarov *et al.* 2002).

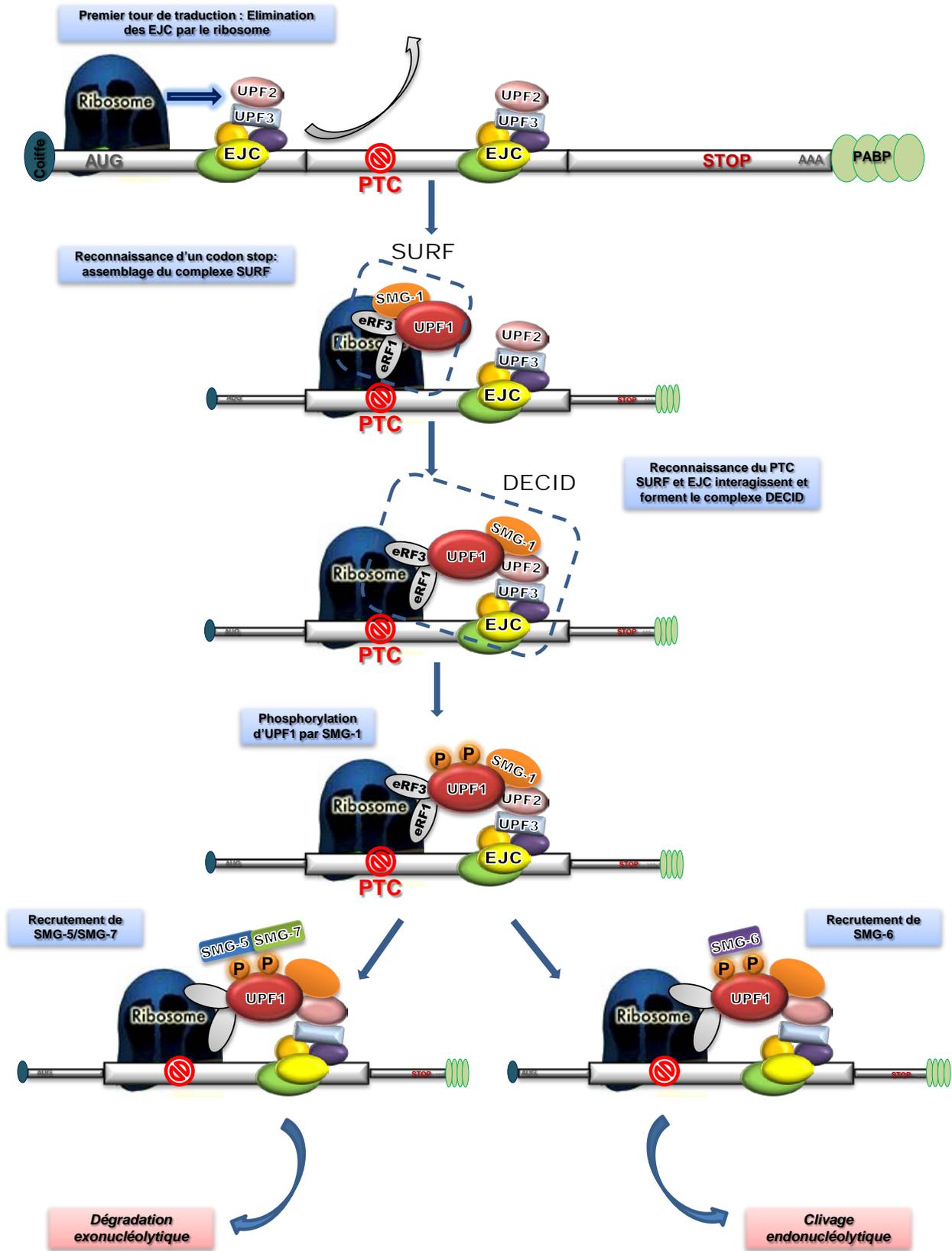
## **4.3 MISE EN PLACE DU COMPLEXE DE SURVEILLANCE**

### 4.3.1 Premier tour de traduction

L'activation du mécanisme de NMD nécessite une étape de traduction. Ainsi, le blocage de la traduction par introduction d'une séquence tige-boucle dans la partie 5'UTR de l'ARNm (Belgrader *et al.* 1993), ou par traitement avec des molécules chimiques tels que la cycloheximide ou la puromycine (Carter *et al.* 1995), inhibe la dégradation des ARNm contenant des PTC par NMD. La reconnaissance des PTC a lieu au cours du premier cycle de traduction (« *pioneer round of translation*») et permet ainsi de limiter la synthèse massive de protéines tronquées (Ishigaki *et al.* 2001; Lejeune *et al.* 2002). La première lecture de l'ARNm par le ribosome permet un décrochage des complexes EJC fixés à chaque jonction exon-exon (Chiu *et al.* 2004) (**Figure 19**). Dans un ARNm normal, le codon de terminaison est présent sur le dernier exon et le premier tour du ribosome élimine tous les EJC sur son « passage ». En présence d'un PTC, l'arrêt du ribosome sur le codon de terminaison ne permet pas le décrochage des EJC situés en aval. Ce décrochage incomplet sert de signal pour la dégradation par NMD. En effet, des interactions protéiques vont pouvoir se faire entre l'EJC toujours présent en aval du PTC et les acteurs de la terminaison de la traduction (eRF1, eRF3 : « release factor ») se posant à proximité de ce dernier.

Une fois le PTC mis en évidence par cette primo-lecture, comment la dégradation de l'ARNm se met en place ?

Au cours de l'assemblage de l'EJC, UPF3 ou UPF3X est recruté dès l'épissage, puis UPF2 serait recrutée dans le noyau et/ou dans la région périnucléaire. UPF1 interagit avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3, suggérant un recrutement après identification du PTC, une fois le ribosome stoppé sur ce dernier (Czaplinski *et al.* 1998). Au niveau du PTC se met alors en place un complexe protéique appelé SURF (**Figure 19**), formé par les protéines UPF1, SMG1, eRF1 et eRF3 (Kashima *et al.* 2006). La présence de SMG1, la kinase qui phosphoryle UPF1 dans le SURF, n'est pas suffisante pour induire la phosphorylation de UPF1 ; une interaction entre SURF et EJC est nécessaire. Le pont moléculaire entre ces deux complexes serait principalement assuré par UPF2, qui est capable d'interagir à la fois avec la région N-ter de UPF1 et avec la région C-ter de SMG1 (Kashima *et al.* 2006). Une fois le lien établi entre les complexes EJC et SURF, ils forment un nouveau complexe appelé DECID (*Decay inducing complex*) (**Figure 19**) et ensuite UPF1 est phosphorylée (Kashima *et al.* 2006).



**Figure 19. NMD : Mise en place du complexe de surveillance et dégradation des transcrits aberrants.** La première lecture de l'ARNm par le ribosome permet de détecter la présence éventuelle de codons stops prématurés et d'induire, soit la dégradation des ARNs contenant des PTC, soit la traduction des transcrits normaux. Une fois un PTC détecté, le complexe de surveillance se met en place et aboutit à la dégradation du transcrits avec PTC. (Adapté de Bhuvanagiri et al., 2010)

### **4.3.2 Phosphorylation/Déphosphorylation d'UPF1 et dégradation de l'ARNm aberrant**

La phosphorylation d'UPF1 entraîne la dégradation d'un ARNm portant un PTC (Kashima *et al.* 2006). A l'heure actuelle le mécanisme exact de dégradation reste partiellement expliqué, il semble que la phosphorylation d'UPF1 entraîne le remodelage du complexe de surveillance et permet de recruter d'autres facteurs permettant sa déphosphorylation et/ou accélérant la dégradation de l'ARNm aberrant. En effet, alors UPF1 phosphorylée présente plus d'affinité avec SMG5-SMG7-PP2A (le complexe responsable de la déphosphorylation) et avec les enzymes de dégradation DCP1a, XRN1 et RRP4 (**Figure 19**). De plus la phosphorylation d'UPF1 permet la répression traductionnelle des ARNm non-sens. En effet, il a été montré qu'UPF1 phosphorylé se fixe au facteur d'initiation de la traduction eIF3 du complexe 40S de pré-initiation et empêche son interaction avec la sous-unité 60S, et par conséquent la formation du complexe d'initiation de la traduction 80S. De cette façon, les ARNm qui sont reconnus comme aberrants lors du premier tour de la traduction deviennent inaptes pour subir d'autres cycles de traduction et sont dégradés (Isken *et al.* 2008).

UPF1 phosphorylé recrute les facteurs nécessaires à sa déphosphorylation (SMG5, SMG7 et aussi SMG6) (**Figure 19**). Ces facteurs recrutent à leur tour la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Chiu *et al.* 2003; Ohnishi *et al.* 2003). La déphosphorylation d'UPF1 semble jouer un rôle crucial dans le NMD puisque l'inhibition de l'interaction SMG5-UPF1, à l'aide d'un mutant de SMG5 ou après traitement avec un inhibiteur du NMD (NMDI1), inhibe la dégradation par NMD (Ohnishi *et al.* 2003; Durand *et al.* 2007). SMG5 et SMG7 forment un hétérodimère où SMG7 assure le lien entre le complexe de surveillance par son domaine N-ter (lien avec SMG5 et UPF1) et la machinerie de dégradation des ARNm *via* sa région C-ter (Unterholzner and Izaurralde 2004). La dégradation des ARNm contenant des PTC fait appel aux mêmes enzymes intervenant dans la dégradation des ARNm normaux (voir chap.2,§ 5), mais utilise des voies spécialisées afin d'assurer une élimination plus rapide des transcrits aberrants. Les ARNm avec PTC subissent une déadénylation accélérée suivie du decapping (Chen and Shyu 2003; Yamashita *et al.* 2005a) ; ils peuvent aussi subir un decapping indépendant de la déadénylation (Couttet and Grange 2004).

SMG6 semble agir de façon plus indépendante (Chiu *et al.* 2003; Ohnishi *et al.* 2003), et il existerait deux voies possibles pour la dégradation des par NMD : (i) UPF1 phosphorylée se lie

à SMG5- SMG7 recrutant ainsi les enzymes de déadénylation, de decapping et les exonucléases ; (ii), UPF1 lié à SMG6 induit un clivage endonucléolytique à proximité du PTC et la dégradation des deux fragments résultants par des exonucléases.

#### **4.4 LOCALISATION DU NMD DANS LA CELLULE**

Dans quel(s) compartiment(s) se déroulent les différentes étapes du NMD au sein de la cellule ?

Les premières études menées chez les mammifères ont montré que la plupart des ARNm non-sens présentaient des taux réduits par rapport à leur équivalents normaux, cela dans les fractions cytoplasmique et nucléaire, ce qui suggérait que le NMD puisse se dérouler dans les deux compartiments cellulaires (Maquat 1995). Cependant, la primo-lecture de l'ARNm permettant le déclenchement du NMD va à l'encontre de l'hypothèse du NMD nucléaire. De plus, ces observations d'un NMD nucléaire et cytoplasmique semblent être propres aux mammifères car, dans les autres espèces étudiées, le NMD se cantonne à la fraction cytoplasmique.

Pour tenter d'expliquer ces résultats deux hypothèses ont été émises :

i) un « scanning nucléaire » reposant sur l'existence d'une traduction nucléaire, où des pseudo-ribosomes nucléaires détecteraient les ARNm non-sens et induiraient un NMD intranucléaire (Wilkinson and Shyu 2002). Cette hypothèse s'appuie sur les travaux d'Iborra *et al.* 2001, montrant que 5 à 10% de la synthèse protéique aurait lieu dans le noyau (Iborra *et al.* 2001). Depuis, il s'est avéré que ce taux de traduction nucléaire était largement surestimée par des contaminations d'origine cytoplasmique inhérentes aux techniques de séparation et ces deux compartiments. Il semblerait plutôt que la traduction nucléaire soit <1% (Nathanson *et al.* 2003) ;

(ii) un « export co-traductionnel » suggérant que le NMD a lieu dans le cytoplasme mais au cours de l'exportation des ARNm (Maquat 1995). Ainsi, les ribosomes cytoplasmiques en contact avec la membrane nucléaire commenceraient la traduction des ARNm en transit à travers le pore nucléaire. Singh *et al.* 2007 ont quand à eux montré que la reconnaissance des PTC avait lieu dans le cytoplasme. Le blocage des interactions entre les protéines UPF par l'expression de peptides ciblant ces molécules a comme conséquence l'inhibition du NMD seulement lorsque ces peptides sont exprimés dans le cytoplasme. De plus, la rétention artificielle de UPF1 dans le noyau (en éliminant UPF1 dans le cytoplasme et en surexprimant une forme d'UPF1 fusionnée à un signal de rétention nucléaire) a pour effet d'inhiber le NMD

(Singh *et al.* 2007). Bien que cette question demeure non résolue, ces derniers résultats plaident plutôt en faveur d'une localisation cytoplasmique du NMD.

#### **4.5 LA REGLE DES 50-55 NUCLEOTIDES**

Au cours du NMD, les interactions du complexe SURF avec un EJC situé en aval suggèrent que des ARNm contenant des PTC au sein du dernier exon ne peuvent pas être dégradés par NMD. Dans ce sens, les premières études sur les ARNm de la triosephosphate isomérase (TPI) ont montré que seuls les PTC situés suffisamment en amont de la dernière jonction exon-exon sont soumis au NMD (Daar and Maquat 1988; Cheng *et al.* 1990). Plus tard, il a été établi que la distance minimale à laquelle un PTC doit être situé en amont du dernier intron pour déclencher la dégradation de l'ARNm de la TPI est de 50 nucléotides minimum (Zhang *et al.* 1998a). Ces résultats ont été reproduits sur un autre gène codant pour la  $\beta$ -globine humaine apportant ainsi un caractère général à ce paramètre de distance (Zhang *et al.* 1998b). Sur la base de ces observations, la « règle des 50 à 55 nucléotides » a été établie et définit qu'un codon stop est reconnu comme PTC s'il est situé à plus de 50-55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon (Nagy and Maquat 1998). Ce postulat explique pourquoi les codons stop physiologiques ne déclenchent pas le NMD (puisqu'ils se situent en général sur le dernier exon), et aussi pourquoi les ARNm monoexoniques y sont insensibles. C'est le cas des gènes qui codent pour le récepteur à la mélanocortine 4, l'histone H4 ou la protéine HSP70 (Maquat and Li 2001; Brocke *et al.* 2002).

Néanmoins certains transcrits enfreignant cette règle de position peuvent être dégradés par un mécanisme apparenté au NMD nécessitant la synthèse protéique. C'est notamment le cas des transcrits Igk issus de réarrangements VJ hors phase, et de certaines mutations non-sens sur les transcrits TCR $\beta$ . Ces transcrits présentent des PTC situés dans le dernier exon ou à une distance inférieure à 50 nt de la jonction exon-exon (Li et Wilkinson, 1998 ; Delpy *et al.*, 2004a, Chemin *et al.*, 2010). Toutefois, la dégradation de ces transcrits non-sens s'avère moins efficace que celle des transcrits contenant des PTC situés à plus de 55 nt en amont de la dernière jonction exon-exon. Dans ce sens, une polarité dans l'efficacité du NMD semble exister et, plus le PTC est localisé en amont de la dernière jonction exon-exon, plus le NMD est efficace (Wang *et al.*, 2002a; Bühler *et al.*, 2004).

## 5- LE SYSTEME IMMUNITAIRE SOUS SURVEILLANCE

### 5.1 TRANSCRIPTION DES ALLELES D'IG NON-PRODUCTIFS

De nombreuses cellules B contiennent des réarrangements V(D)J présentant un décalage du cadre de lecture (voir chap.1, §2). Au locus IgH, ces cellules B VDJ<sup>+</sup>/VDJ<sup>-</sup> représente environ 50% (**Figure 8**). Alors que la fréquence élevée de ces réarrangements non-fonctionnels est avérée au niveau de l'ADN, seuls des transcrits d'Ig fonctionnels (en phase correcte de traduction) sont détectables dans les banques d'ADNc ou par RT-PCR. Il est donc légitime de s'interroger sur le niveau de transcription et/ou la régulation post-transcriptionnelle des transcrits issus d'allèles exclus et réarrangés de façon non fonctionnelle.

Dans une cellule B, il a été démontré qu'un des deux allèles IgH est localisé dans l'hétérochromatine (Skok *et al.*, 2001), permettant une localisation nucléaire asymétrique des deux allèles, aidant ainsi au "silencing" de l'allèle VDJ- (Fisher *et al.*, 2002). Dans des lignées cellulaires, la présence d'un PTC sur des mini-gènes Igu peut induire également un phénomène d'inactivation de la transcription par un mécanisme appelé nonsense-mediated transcriptional gene silencing (NMTGS) (Bulher *et al.*, 2005; Stalder et Mulhemann, 2007). Cependant ce phénomène mis en évidence dans des lignées non B à l'aide de construction mini-locus ne semble pas être observé dans des lignées pro-B, dans lesquelles, les allèles IgH VDJ<sup>+</sup> et VDJ<sup>-</sup> sont transcrits à des taux équivalents (Eberle *et al.*, 2009). En accord, avec cette transcription équivalente, Daly *et al.* ont montré une transcription bi-allélique des allèles productifs et non-productifs dans des cellules B primaires (Daly *et al.*, 2007). De plus, les processus de commutation de classe et d'hypermutation nécessitant la transcription se produit à des taux voisins sur les 2 allèles IgH (Delpy *et al.*, 2003, 2004b). Les travaux récents effectués au laboratoire, nous ont permis de démontrer clairement la transcription bi-allélique des allèles VDJ<sup>+</sup> et VDJ<sup>-</sup> au cours du développement B (Article 2 : Tinguély *et al.*, 2011).

Au locus des chaînes *kappa*, environ 30% des cellules présente un allèle productif et un allèle non fonctionnel (Coleclough *et al.*, 1981 ; Arakawa *et al.*, 1996). De tels réarrangements sont aisément détectables au sein de l'ADN génomique des cellules B de même que parmi les transcrits primaires, indiquant que ces allèles « exclus » bénéficient donc d'un certain degré de transcription. Par contre, le niveau de détection des séquences « hors-phase » est très abaissé parmi les transcrits épissés, au point qu'ils deviennent quasi-indétectables dans les cellules B matures (Delpy *et al.*, 2004a).

Dans les cellules B, l'exclusion allélique des gènes d'Ig permet de prévenir les réarrangements mais ne semble pas avoir lieu au niveau transcriptionnel, une fois les allèles réarrangés. Ainsi, l'activation des mécanismes de surveillance des ARN tels que l'inhibition d'épissage, le NAS et le NMD, permet d'éviter la synthèse d'Ig tronquées (Baumann *et al.*, 1985 ; Connor *et al.*, 1994 ; Lozano *et al.*, 1994, Aoufouchi *et al.*, 1996 ; Jäck *et al.*, 1999 ; Mühlemann *et al.*, 2001 ; Delpy *et al.*, 2004a ; Eberle *et al.*, 2009 ; Chemin *et al.*, 2010 ; Tinguely *et al.*, 2011).

## **5.2 SURVEILLANCE DES ARN DANS LES LYMPHOCYTES B**

### **5.2.1 Inhibition d'épissage et épissage alternatif des transcrits d'Ig non-productifs**

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3 §1, plusieurs études portant sur les gènes d'Ig ont montré que le mécanisme d'inhibition d'épissage constitue un premier point de contrôle permettant de limiter l'apparition d'ARNm issus des allèles non-productifs (Lozano *et al.*, 1994 ; Aoufouchi *et al.*, 1996 ; Mühlemann *et al.*, 2001 ; Chemin *et al.*, 2010 ; Tinguely *et al.*, 2011).

Concernant le mécanisme de NAS, une étude utilisant des constructions « minilocus » Ig- $\mu$  a montré que ce phénomène pouvait être indépendant de la présence de PTC dans le transcrit et donc pas lié directement au décalage du cadre de lecture (Bülher et Mühlemann, 2005). Ces résultats plaideraient donc en faveur d'un NAS dit de classe I (voir chap. 3 §2). Nous avons étudié ce phénomène de NAS au locus Igk dans des lignées B transfectées avec des constructions « minilocus » mimant des réarrangements VJk fonctionnels et non fonctionnels. Les données obtenues montrent l'existence de ce phénomène pour les transcrits Igk contenant des PTC (Article 1 : Chemin *et al.*, 2010). De plus, nos travaux soulignent l'importance de la position du PTC (Article 3 : en préparation), ainsi que l'influence des séquences introniques dans ce phénomène (Résultats : partie 4). Nos travaux (article 1 : étude bioinformatique et article 3 : position du PTC) suggèrent que les transcrits Igk non-sens pourrait activer un phénomène de NAS de classe II, lié à la présence de PTC.

### 5.2.2 NMD des transcrits d'Ig non-productifs

De nombreuses études réalisées dans des lignées cellulaires ont permis de mettre en évidence l'action de la NMD sur les transcrits IgH non-productifs (Baumann *et al.*, 1985; Bülher *et al.*, 2004; Connor *et al.*, 1994; Eberle *et al.*, 2009; Jäck *et al.*, 1999; Wittmann *et al.*, 2006). Certaines études montrent une diminution d'un facteur 100 des transcrits IgH contenant des PTC (pour revue, Li et Wilkinson, 1998), suggérant une NMD très efficace pour les transcrits d'Ig. Dans ce sens, les transcrits d'Ig avec des PTC contenu dans l'exon VDJ subissent une dégradation par NMD beaucoup plus forte que d'autres ARNm de mammifères (Bülher *et al.*, 2004 ; Gudikote et Wilkinson, 2002).

Les transcrits Igk issus de réarrangements hors phase ne respecte pas la règle de position des PTC (voir Chap2 : règle de position). En effet, les PTC sont localisés dans le dernier exon ou à seulement 3nt de la dernière jonction exon-exon (Delpy *et al.*, 2004a). A l'inverse, les transcrits IgH issus de réarrangements VDJ hors phase respectent cette règle ; les PTC étant fréquemment localisés dans l'exon CH1 (Article 2 : Tinguely *et al.*, 2011). En accord avec cette règle, nos résultats suggère que la dégradation par NMD est beaucoup plus marquée pour les transcrits de chaines lourdes que ceux de chaines légères (voir articles 1 et 2).

### 5.2.3 Roles physiologiques de la surveillance des ARN dans les lymphocytes B

Des travaux récents menés dans l'équipe de Jäck ont montré que la présence d'un transcrit Ig $\mu$  non-sens ne pouvant être dégradé par NMD bloque le développement B au stade pro-B (Lutz *et al.*, 2011). Ces auteurs émettent l'hypothèse que la dégradation par NMD pourrait participer au phénomène d'exclusion allélique dans la cellule pro-B, et permettre le réarrangement du second allèle lorsque le premier aboutit à un VDJ non-fonctionnel. En parallèle, une autre étude parue dans le même volume du journal PNAS, a montré que l'inhibition du NMD suite à l'expression d'un dominant négatif d'UPF1 induisait également une accumulation de cellules pro-B (Frischmeyer-Guerrero *et al.*, 2011). L'importance du NMD a également été montrée en générant chez la souris présentant un « knockout » conditionnel d'UPF2. Bien que ces auteurs n'aient pas analysé en détail la lignée B, ils ont constaté que la réponse proliférative des cellules B était considérablement affectée par l'inactivation d'UPF2 alors que les cellules B matures au repos semblaient moins sensibles à l'élimination de cet acteur

majeur du NMD (Weischenfeldt *et al.*, 2008). Ainsi, il semblerait qu'un défaut de surveillance des ARN puisse avoir des conséquences physiologiques importantes au cours du développement B.

---

Les mécanismes de surveillance des ARN sont très actifs dans la lignée lymphoïde puisque, dans le contexte des réarrangements aléatoires des gènes d'Ig et du TCR, l'apparition de PTC est fréquemment observée (2/3 des réarrangements VDJ hors phase). Même si l'ensemble des mécanismes avait déjà été mis en évidence dans des lignées, peu d'études avaient été réalisées dans un contexte physiologique.

Dans le but d'analyser comment les différents processus de surveillance agissaient sur les transcrits d'Ig contenant des PTC, nous avons étudié les phénomènes d'inhibition d'épissage, de NAS et de NMD. Dans un premier temps, nous avons quantifié leur contribution respective au cours du développement lymphocytaire B (article 1 et 2). Puis, d'autres études ont consisté à analyser : i) le répertoire I<sub>gk</sub> en se focalisant sur les réarrangements VJ non-fonctionnels au cours du développement B et, ii) l'influence des séquences introniques situées en aval des réarrangements VJ $\kappa$  sur l'activation du phénomène de NAS.

# Résultats

**Le NAS sous l'influence des séquences introniques situées en aval des segments J $\kappa$** ▪ **PROBLEMATIQUES & OBJECTIFS**

Des travaux effectués au sein du laboratoire avaient observé que l'efficacité de surveillance des ARN de chaînes légères  $\kappa$  variait en fonction des segments J $\kappa$  impliqués dans les réarrangements (Delpy *et al.*, 2004a). Ainsi, l'analyse des rapports NF/F sur les ARNm (**Tableau 1**) avait révélé un maximum de surveillance (faible NF/F) pour des jonctions impliquant le segment J $\kappa$ 5 (VJ $\kappa$ 5) alors que l'efficacité était moindre pour des jonctions VJ $\kappa$ 2 (fort NF/F). Ces données suggéraient fortement que les séquences introniques situées en aval des segments J $\kappa$  pouvaient influencer le devenir des transcrits I $\kappa$  non-fonctionnels. Pour appréhender ce phénomène que nous avons décrit sans en comprendre les causes moléculaires, nous avons réalisé des constructions porteuses de mutations ou de délétions de l'intron J $\kappa$ -C $\kappa$  et, nous avons recherché les motifs introniques responsables de cette variabilité de surveillance des ARN.

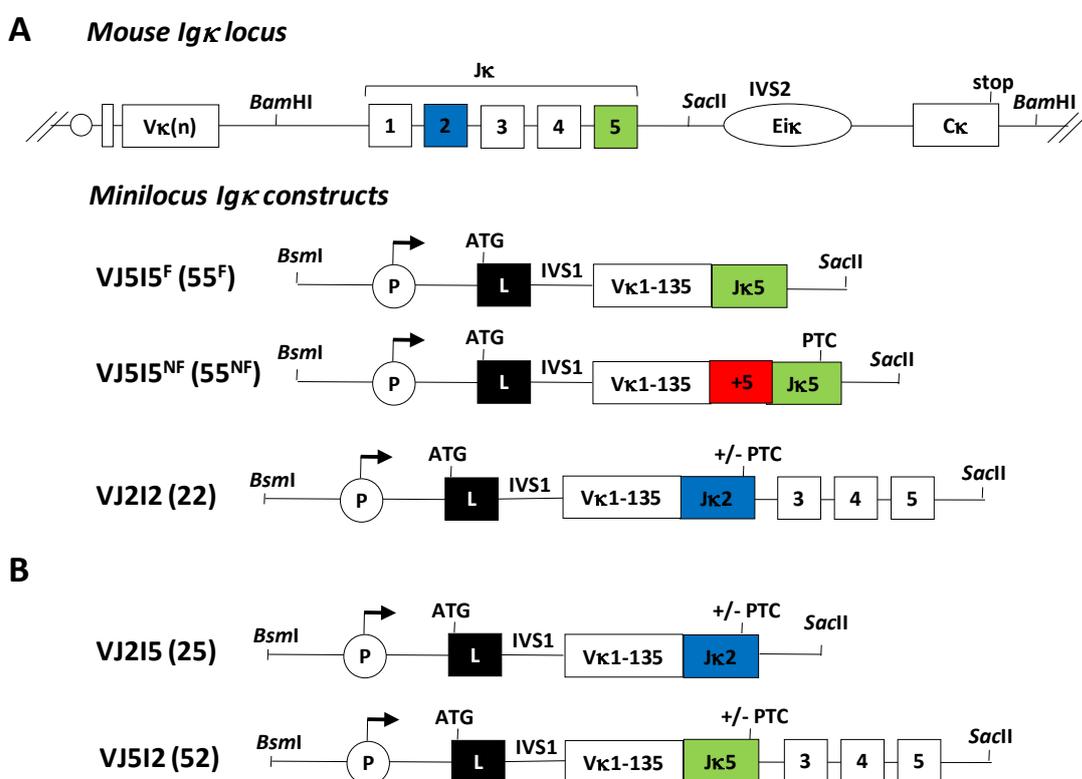
Segments J $\kappa$	Rapport séquences non-fonctionnelles/ fonctionnelles
J $\kappa$ 1	0,38
J $\kappa$ 2	1,1
J $\kappa$ 4	0,58
J $\kappa$ 5	0,18
Total (ARNm)	0,48

**Tableau 1.** Surveillance des ARNs de chaînes légères kappa en fonction des segments J $\kappa$  impliqués dans le réarrangement VJ. (D'après Delpy *et al.*, 2004a)

▪ **METHODOLOGIE**

Les expériences réalisées sont analogues à celles présentées dans l'article 1 et reposent sur l'étude des phénomènes de surveillance des ARN et en particulier du NAS dans des lignées B transfectées avec des constructions « minilocus » mimant des réarrangements VJ $\kappa$ . Après amplification à l'aide d'un oligonucléotide fluorescent et électrophorèse capillaire, nous avons

analysé comparativement les constructions VJ $\kappa$ 5 (VJ5-I5<sup>F</sup> et VJ5-I5<sup>NF</sup>) décrites précédemment (*article 1*) et, de nouvelles constructions mimant des réarrangements VJ $\kappa$ 2 (VJ2-I2<sup>F</sup> et VJ2-I2<sup>NF</sup>) (Figure 22A). Pour contrôler ces expériences et analyser de façon stricte l'influence des séquences introniques, nous avons également généré des constructions « croisées », par inversion des séquences introniques en aval des exons VJ $\kappa$ . Ces constructions récrètent des réarrangements artificiels : VJ $\kappa$ 5 suivi de la séquence intronique située en aval de J $\kappa$ 2 (VJ5-I2<sup>F</sup> et VJ5-I2<sup>NF</sup>) et, VJ $\kappa$ 2 suivi de la séquence intronique en aval de J $\kappa$ 5 (VJ2-I5<sup>F</sup> et VJ2-I5<sup>NF</sup>) (Figure 22B). Pour simplifier la nomenclature, les constructions seront numérotées comme suit : 55, 22, 52, 25 ; le premier chiffre identifiant le segment J $\kappa$  et le second, la séquence intronique.



**Figure 22. Réalisation des différentes constructions mimant des réarrangements V $\kappa$ J $\kappa$ .**

A. Les constructions VJ5I5<sup>F</sup> et VJ5I5<sup>NF</sup> (55) récrétant des réarrangements VJ $\kappa$ 5 suivi de la séquence intronique située en aval de J $\kappa$ 5 ont été décrites dans l'article 1. Les constructions VJ2I2 (22) récrètent des réarrangements VJ $\kappa$ 2 suivi de l'intron J $\kappa$ 2-C $\kappa$ . B. Les constructions VJ2I5 (25) et VJ5I2 (52) récrètent respectivement des réarrangements VJ $\kappa$ 2 suivi de l'intron J $\kappa$ 5-C $\kappa$  et, VJ $\kappa$ 5 suivi de l'intron J $\kappa$ 2-C $\kappa$ .

▪ **RESULTATS**

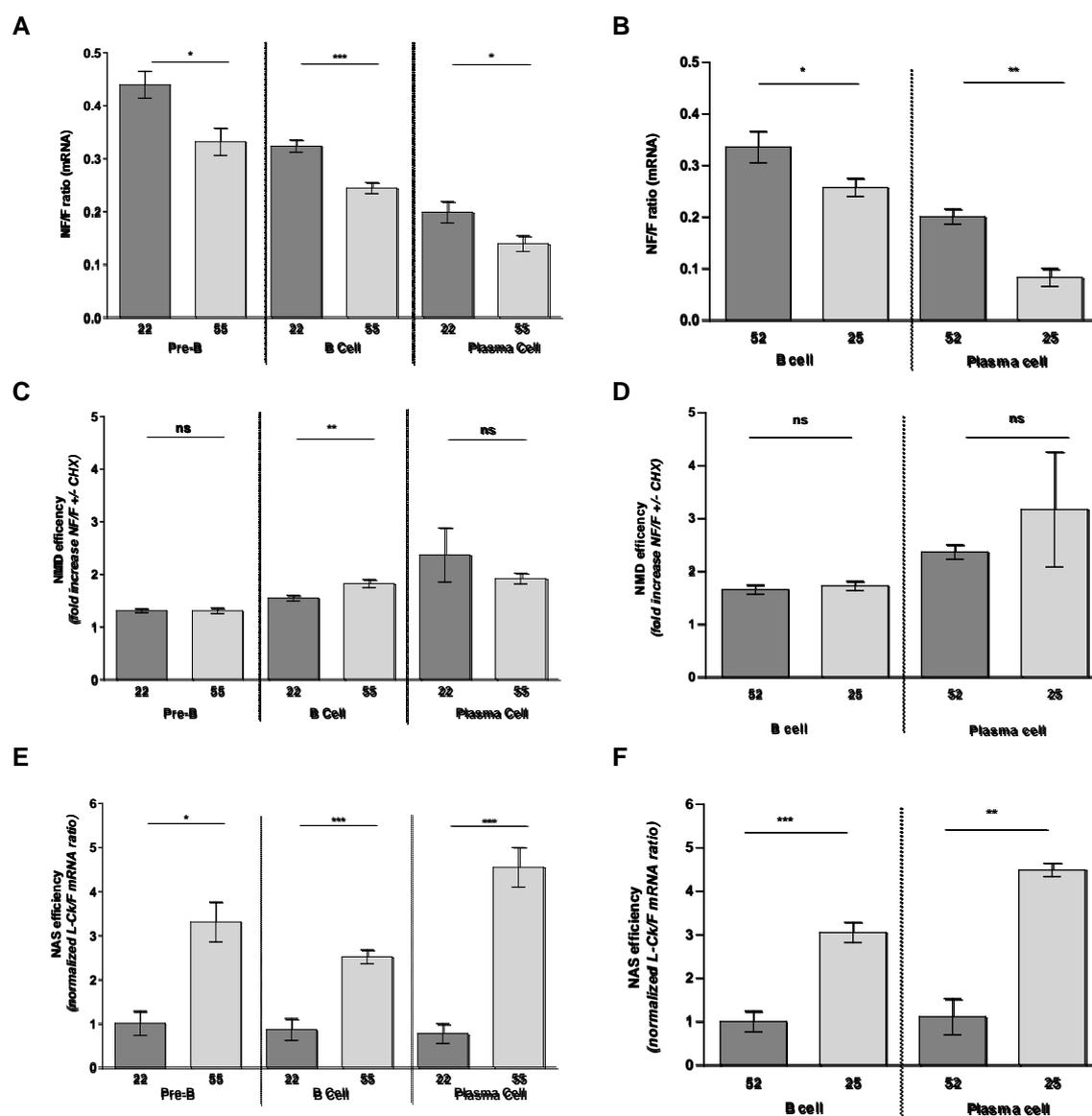
En accord avec les observations réalisées dans des cellules pro-B de souris par Delpy et collaborateurs (*Tableau 1*), les résultats obtenus dans les lignées montrent que la surveillance des ARNm est significativement plus marquée pour les transcrits 55<sup>NF</sup> que 22<sup>NF</sup> (*Figure 23A*).

La nature de la séquence intronique et non celle du segment J $\kappa$  semble être à l'origine de ces variations de surveillance puisque des données similaires, avec un maximum de surveillance pour les transcrits 25<sup>NF</sup>, sont obtenues après analyse comparative des constructions 25 et 52 (*Figure 23B*). Pour identifier quel mécanisme de surveillance est influencé par la séquence de l'intron J $\kappa$ -C $\kappa$ , nous avons étudié les phénomènes de NMD et de NAS dans ces lignées. Bien que l'efficacité du NMD soit plus marquée pour les transcrits 55<sup>NF</sup> que 22<sup>NF</sup> dans les lignées B matures, cette variation reste modeste et n'est pas constatée aux autres stades de la maturation B (*Figure 2C*). De même, les transcrits 25<sup>NF</sup> que 52<sup>NF</sup> présentent une sensibilité au NMD identique (*Figure 23D*).

Ces résultats suggèrent que l'efficacité du NMD n'est pas influencée par les séquences introniques situées en aval des segments J $\kappa$ . En revanche, des modifications importantes du phénomène de NAS ont pu être constatées avec ces constructions. De façon intéressante, les transcrits alternatifs de type « leader-C $\kappa$  » sont plus fréquemment générés (jusqu'à 5 fois) en présence de jonctions 55<sup>NF</sup> et 25<sup>NF</sup>, comparativement aux jonctions 22<sup>NF</sup> et 52<sup>NF</sup> respectivement (*Figure 23E&F*).

Afin d'identifier plus finement les motifs responsables de ces variations de NAS, nous avons analysé dans un premier temps si la longueur de la séquence intronique influençait ce phénomène. Dans le but d'harmoniser les tailles de l'intron J $\kappa$ -C $\kappa$ , nous avons raccourci de 939 nt l'intron J $\kappa$ 2-C $\kappa$  par délétion de la séquence BmgBI/SacII située en aval du segment J $\kappa$ 5 (*Figure 24*). Ainsi, les nouvelles constructions 22<sup>del</sup> possèdent une séquence intronique J $\kappa$ -C $\kappa$  de taille similaire à celle des constructions 55, respectivement de 2507 et 2535 pb. L'analyse comparative du NAS, réalisée dans la lignée A20 (B mature), montre que les transcrits « leader-C $\kappa$  » restent plus abondants avec les constructions 55 que 22<sup>del</sup>. Ainsi, la longueur de la séquence

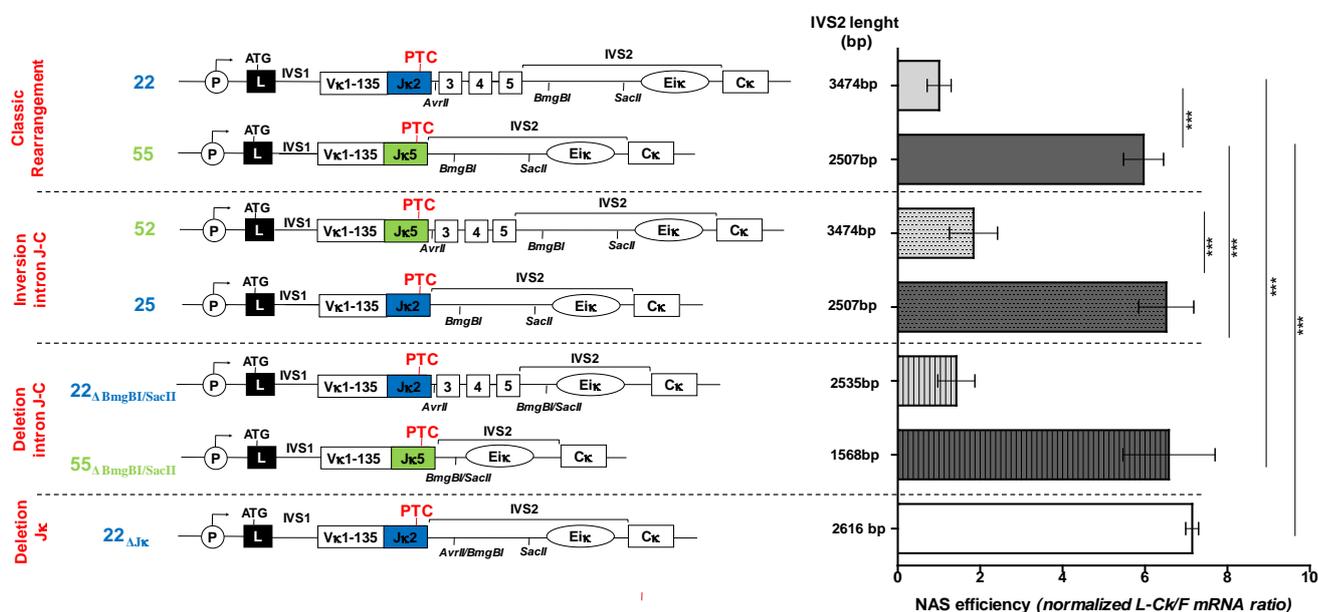
intronique Jκ-Cκ ne semble pas influencer intrinsèquement le phénomène de NAS. En accord avec cette observation, nous n'observons pas de différence de NAS entre les constructions 55 et



**Figure 23. Rôle des séquences introniques situées en aval des segments Jκ dans les processus de surveillance des ARN.** Les quantifications sont réalisées après électrophorèse capillaire des produits d'amplification comme décrit précédemment (article 1) A-B) Surveillance des ARNm mesurée par détermination du rapport NF/F. C-D) Evaluation de l'efficacité du NMD après traitement au cycloheximide (CHX : 4h, 100µg/ml) et détermination des rapports NF/F +/- CHX. E-F) Analyse du phénomène de NAS (comme décrit précédemment : article 1 Figure 4), par détermination du taux de transcrits « leader-Cκ » (L-Cκ). L'analyse des rapports L-Cκ/F a été faite en normalisant à 1 les données obtenues dans les lignées pre-B (E) ou B (F) transfectées avec les constructions 22 (E) ou 52 (F).

des constructions 55<sup>del</sup> servant de contrôle. Nous avons ensuite analysé les effets engendrés par la délétion d'une séquence intronique de 859nt (AvrII/BmgBI), contenant les segments Jκ3, Jκ4

et Jk5 situés en aval de Jk2 (**Figure 24**). Les résultats obtenus avec les constructions  $22^{\text{del Jk3-5}}$  montrent que la délétion effectuée augmente considérablement le taux de transcrits « leader-C $\kappa$  ». Ces données peuvent suggérer que la présence de segments J $\kappa$ , voire de sites donneurs d'épissage, au sein de la séquence intronique Jk2-C $\kappa$  influence négativement le NAS.

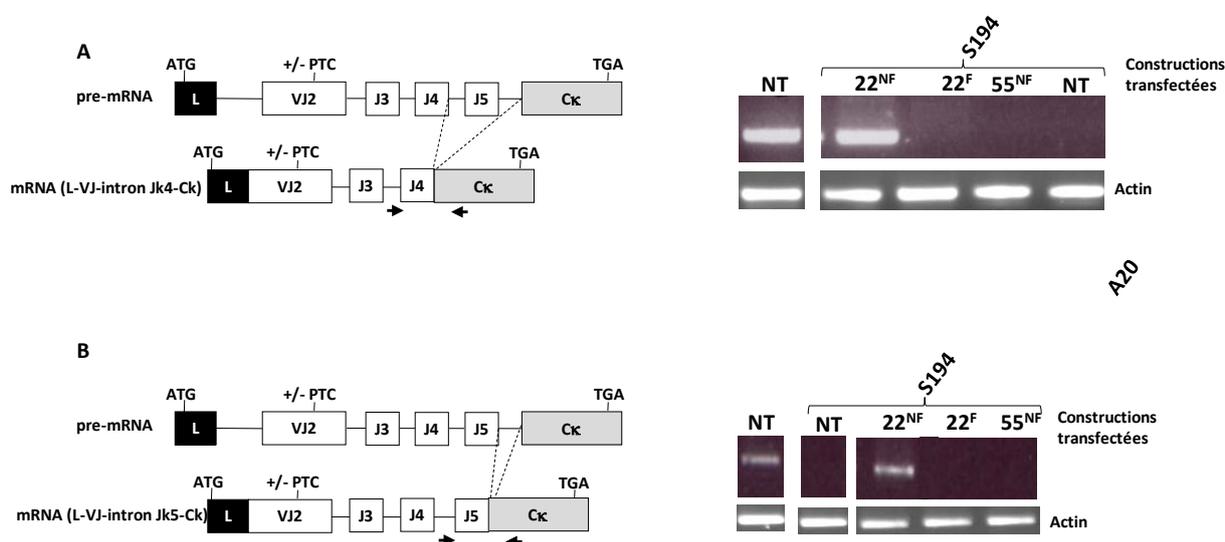


**Figure 24. Impacts des modifications de la séquence intronique IVS2 sur le phénomène de NAS**

A. Obtention des différentes constructions visant à modifier la longueur et la nature de la séquence intronique IVS2. B. Analyse du phénomène de NAS après transfection de cellules A20 avec les différentes constructions (comme décrit précédemment : article 1 Figure 4). La détermination du taux de transcrits « leader-C $\kappa$  » (L-C $\kappa$ ) grâce aux rapports L-C $\kappa$ /F a été faite en normalisant à 1 les données obtenues dans les lignées transfectées avec les constructions 22

Nous avons ensuite analysé si les sites donneurs d'épissage de Jk4 et Jk5 (le site d'épissage de Jk3 n'étant pas fonctionnel) situés dans l'intron en aval d'un VJk2 pouvaient être utilisés au cours de l'épissage, provoquant ainsi la rétention d'une séquence intronique sur l'ARNm. Ce phénomène d'intron rétention a été évalué par PCR sur des ADNc de lignées transfectées avec les différentes constructions (**Figure 24 A et B**). Les résultats obtenus montrent un épissage sur les segments Jk4 et Jk5 avec les constructions  $22^{\text{NF}}$ . Ainsi, le phénomène d'intron rétention pourrait expliquer le faible taux de transcrits alternatifs L-C $\kappa$  obtenus avec les constructions  $22^{\text{NF}}$ , comparativement à celui observé avec  $55^{\text{NF}}$  (Figures 23E et 22). NAS pourrait provenir de NAS observée entre VJ5 et VJ2, peut s'expliquer, en partie par ce phénomène d'intron rétention. Il est à noter que des ARNm contenant la séquence intronique

J $\kappa$ 2-J $\kappa$ 4 ou J $\kappa$ 2-J $\kappa$ 5 sont présents naturellement dans la lignée A20 (non transfectée) (**Figure 25 A et B**). La lignée A20 présente des réarrangements VJ sur les deux allèles Ig $\kappa$ , un fonctionnel VJ $\kappa$ 1 et un non-fonctionnel VJ $\kappa$ 2. Nous pouvons également observer des ARNm contenant vraisemblablement la séquence intronique J $\kappa$ 2-J $\kappa$ 4 ou J $\kappa$ 2-J $\kappa$ 5 dans cette lignée.



**Figure 25.** Mise en évidence d’une rétention de séquence intronique dans les ARNm issus des réarrangements VJ $\kappa$ 2 hors phase. RT-PCR utilisant des amorces sens localisées en amont des segments J $\kappa$ 4 (A) et J $\kappa$ 5 (B) et antisens dans l’exon C $\kappa$ . Ces amplifications permettent de détecter des rétentions de séquence intronique dans les ARNm.

L’ensemble de ces résultats montre que la nature de la séquence intronique influence fortement l’épissage des transcrits Ig $\kappa$  contenant des PTC. De plus, la présence de sites donneurs d’épissage au sein de l’intron J $\kappa$ -C $\kappa$  semble influencer négativement l’épissage alternatif de type L-C $\kappa$  et favoriser la rétention de séquences introniques. Les travaux futurs devraient permettre de comprendre les causes de ces 2 profils d’épissage, diamétralement opposés. L’hypothèse que nous souhaiterions tester serait que la présence de sites donneurs d’épissage dans la séquence intronique (constructions 22<sup>NF</sup>), pourrait provoquer un ralentissement de l’ARN pol II et ainsi favoriser leur usage. A l’inverse, en absence de sites donneurs d’épissage (construction 55<sup>NF</sup>), la vitesse d’élongation serait rapide et favoriserait l’épissage alternatif (voir § perspectives).

# Discussion Perspectives

L'expression des Ig par les cellules de la lignée lymphocytaire B est assurée par des mécanismes particulièrement complexes et précisément régulés. En effet, les gènes d'Ig doivent subir plusieurs réarrangements intra-géniques pour devenir fonctionnels. Ces réarrangements générateurs de la diversité des Ig provoquent, dans deux tiers des cas, un décalage du cadre de lecture et l'apparition de codons stop prématurés (PTC) pouvant conduire à la synthèse de récepteurs tronqués. Pour empêcher la traduction de telles protéines aberrantes la cellule utilise différents mécanismes de «contrôle qualité» des ARNs. La thématique développée au cours de cette thèse a consisté à analyser et quantifier la contribution respective des différents processus mis en jeu au cours de la surveillance des transcrits d'Ig au cours du développement lymphocytaire B. Parmi les processus visant à contrôler la qualité des ARN, le NMD (nonsense-mediated mRNA decay) permet de dégrader plus rapidement des ARNm contenant des codons stop prématurés (PTC) et, le NAS (nonsense-associated altered splicing) permet d'éliminer l'exon contenant un PTC afin de synthétiser une protéine tronquée, qui dans certains cas peut préserver sa fonction. Ces processus sont très actifs dans la lignée lymphoïde puisque l'apparition de PTCs y est fréquemment observée.

Nous avons étudié la surveillance des ARN de chaînes légères d'Ig $\kappa$  et quantifié l'efficacité des différents mécanismes : NMD, NAS et inhibition d'épissage (Chemin *et al.*, 2010). Cette étude a permis de montrer que la coopération entre ces processus individuellement peu efficace permettait de diminuer drastiquement le taux d'ARNm Ig $\kappa$  contenant des PTCs. D'autres études ont mis en évidence : i) l'influence des séquences introniques sur le processus de NAS et, que la présence de sites donneurs d'épissage au sein de l'intron J $\kappa$ -C $\kappa$  semble diminuer l'épissage alternatif de type L-C $\kappa$  et favoriser la rétention de séquences introniques ; ii) pour la première fois l'existence d'une contre-sélection des cellules contenant des allèles Ig $\kappa$  non fonctionnels de classe VJ<sup>PTC</sup> au cours du développement B. Cette diminution semble corrélée à une faible dégradation par NMD des ARNm issus de ces allèles VJ<sup>PTC</sup> et, à un épissage alternatif de ces transcrits qui conduit à la production d'Ig tronquée. Ainsi, il semblerait que la transcription des allèles VJ<sup>PTC</sup> soit délétère pour les cellules B et particulièrement pour les plasmocytes.

L'étude de la surveillance des ARNs de chaînes lourdes d'Ig au cours du développement lymphocytaire B, nous a quand à elle permis de montrer une transcription identique des allèles VDJ<sup>+</sup> et VDJ<sup>-</sup> et une accumulation spécifique des transcrits primaires VDJ<sup>-</sup>. En outre, nous avons mis en évidence le lien étroit entre l'intensité de transcription,

l'épissage et la dégradation par NMD au cours de l'activation et de la différenciation plasmocytaire (Tinguély *et al.*, 2011).

## **1- COOPERATION DES MECANISMES DE SURVEILLANCE DES ARN DE CHAINES D'IG**

### **1.1 PRESENTATION DES STRATEGIES ET MODELES UTILISES**

Afin d'étudier le devenir des transcrits Ig $\kappa$  non-productifs, nous avons utilisé une stratégie « mini-locus » recréant des réarrangements fonctionnels (F) et non fonctionnels (NF). Nous avons pu ainsi générer des outils originaux permettant l'analyse du devenir des transcrits Ig $\kappa$  contenant des PTCs après co-transfection des constructions F et NF, ne différant que de 5 nt (**Figure 26A**), dans des lignées représentatives des différents stades du développement B. Cette analyse est facilitée par la mesure simultanée des transcrits F et NF et la détermination des rapports NF/F. La méthode choisie consiste à utiliser des amorces spécifiques de nos constructions, dont l'une est fluorescente et permet une quantification à l'aide du logiciel Genemapper) (**Figure 26**). Après co-transfection des constructions F et NF, nous vérifions systématiquement leur insertions dans l'ADN de nos lignées (**Figure 26B**). Les résultats obtenus montrent que les transcrits NF sont soumis à une forte surveillance des ARN avec une élimination allant de 60% dans des lignées précurseurs pour aboutir à plus de 90% pour les lignées plasmocytaires (article 1).

Dans cet article, nous avons utilisé le modèle de souris LMP2A, permettant une différenciation lymphocytaire B indépendante de l'expression d'un BCR (Casola *et al.*, 2004) et, une accumulation libre des réarrangements VJ hors phase. Ce modèle s'est révélé d'une grande utilité pour étudier la transcription, la surveillance des ARNs et l'impact des transcrits Ig $\kappa$  non-fonctionnels au cours du développement B (articles 1 et 3). Ainsi, nous avons pu confirmer les résultats obtenus avec les lignées sur les transcrits issus des allèles Ig $\kappa$  endogènes (article 1).

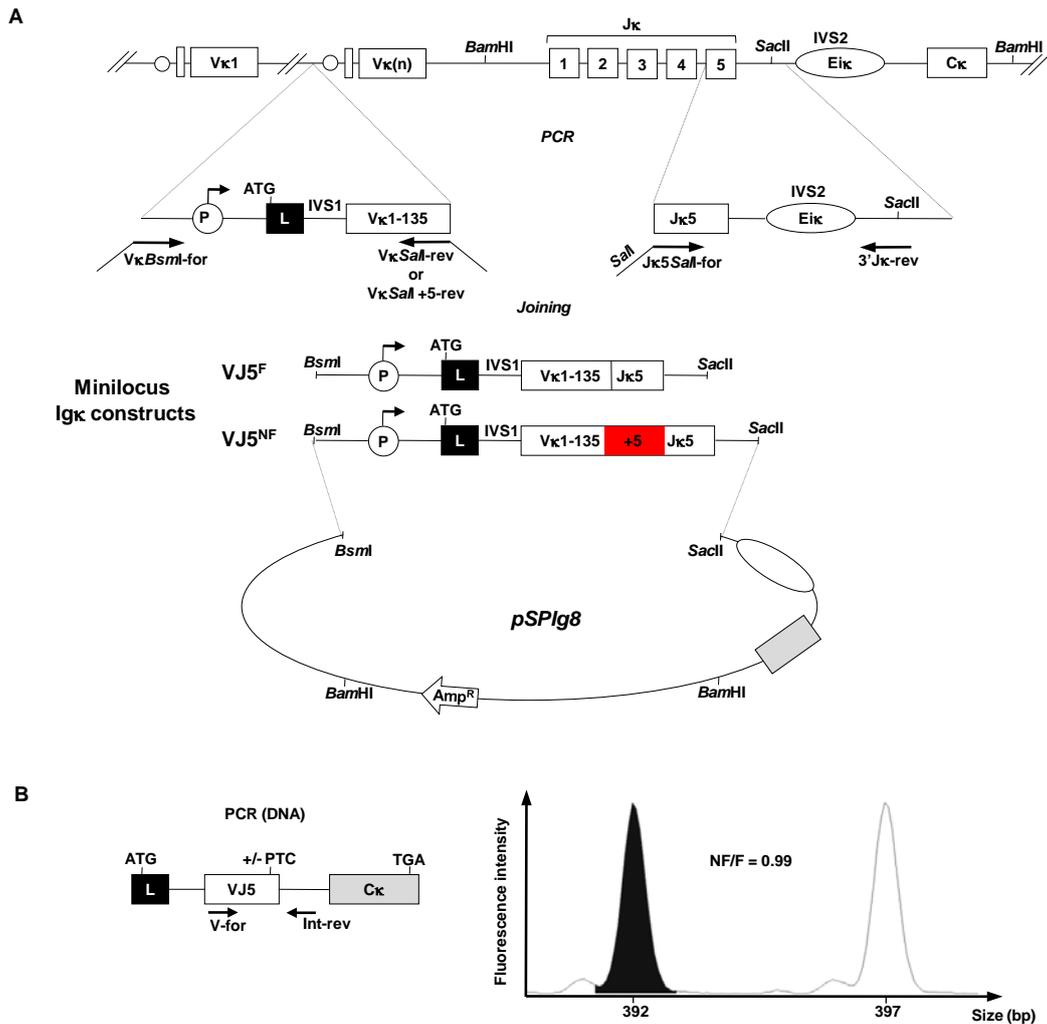
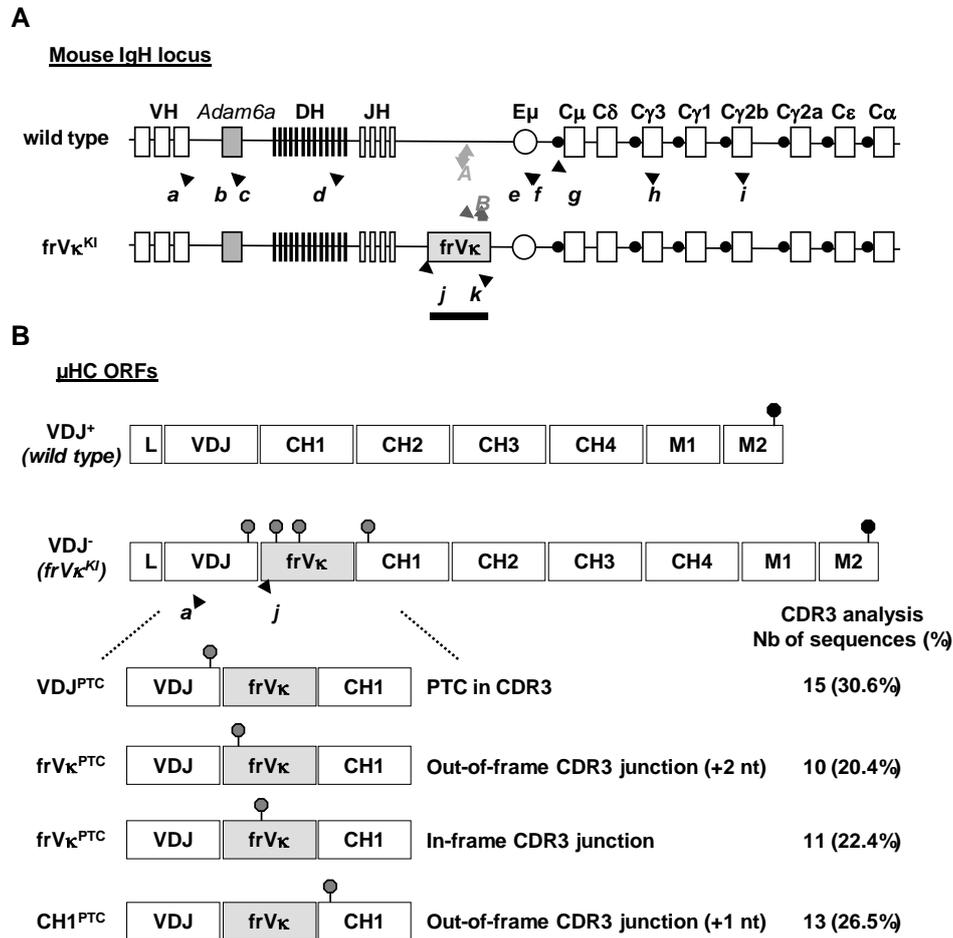


Figure 26. Construction « mini-locus » Igk et méthode d'analyse par Genemapper

Pour compléter ces travaux sur la surveillance des transcrits d'Ig, nous avons réalisé une étude sur les transcrits de chaînes lourdes issus de souris « knock-in » présentant une insertion d'un exon « frameshift » : frV $\kappa$ . Dans ce modèle, des PTC vont apparaître sur les ARNms quelque soit le cadre de lecture du réarrangement VDJ (**Figure 27**) (Delpy *et al*, 2003). Les souris hétérozygotes (IgH<sup>frV $\kappa$ /+</sup>) constituent donc un très bon modèle pour étudier les phénomènes d'exclusion allélique et de surveillance des ARN puisque les allèles fonctionnels et non-fonctionnels sont imposés par la mutation et peuvent être identifiés spécifiquement. En accord avec des travaux réalisés sur des lignées montrant une corrélation entre efficacité d'épissage, NMD et traduction (Stalder *et al*, 2008, Gudikote *et al*, 2005), nous avons montré chez ces animaux qu'une transcription forte du locus IgH est associée à un fort taux d'épissage et, par conséquent, est incompatible avec le processus d'inhibition

d'épissage des transcrits primaires non-productifs. De plus, le taux d'épissage présente une bonne corrélation avec l'efficacité de dégradation par NMD (Tinguély *et al.*, 2011).



**Figure 27. Présentation du modèle  $IgH^{frV\kappa}$ .** A. Représentation schématique des allèles  $IgH^{wt}$  et  $IgH^{frV\kappa}$ . B. Position des PTC sur les ARNm issus de l'allèle  $IgH^{frV\kappa}$  réarrangés (article 2).

## 1.2 INHIBITION D'ÉPISSAGE DES PRE-ARNm D'IG

Au sein du laboratoire, des travaux antérieurs ont montré une transcription active des allèles  $Ig\kappa$  issus de réarrangement VJ hors phase (Delpy *et al.*, 2004a). D'autres études ayant quant à elles montré que les transcrits primaires  $Ig\kappa$  contenant des PTC peuvent subir le phénomène d'inhibition d'épissage (Lozano *et al.*, 1994, Aoufouchi *et al.*, 1996). Notre étude effectuée à différents stades du développement B a montré que le phénomène d'inhibition d'épissage permet une accumulation de pré-ARNm non-productifs et de transcrits présentant un épissage partiel. Ces derniers présentent un épissage du premier intron compris entre les exons Leader et VJ (IVS1), mais possèdent toujours le second intron en aval du VJ (IVS2).

Comme dans les études de Lozano et Aoufouchi, ce mécanisme d'inhibition partielle ou totale est indépendant de la synthèse protéique. De même, le phénomène de NMUP (“nonsense-mediated upregulation of pre-mRNA”) décrits pour les transcrits du TCR $\beta$  se déroule dans le noyau, de façon indépendante de la traduction (Imam *et al.*, 2010). Ces mécanismes appelés inhibition d'épissage ou NMUP selon les auteurs s'effectueraient par accumulation des transcrits nonsens proche du site de la transcription (Muhlemann *et al.*, 2001)...

Nos résultats récents, présentés dans l'article 2, montrent que les transcrits primaires contenant des PTC s'accumulent fortement dans les cellules B au repos, présentant une faible transcription des allèles IgH, alors que ces pré-mRNA ne s'accumulent quasiment pas dans les cellules B stimulées au LPS et les plasmocytes, qui elles subissent une forte transcription du locus IgH. Ainsi, l'efficacité du NMUP est inversement corrélée avec le taux de transcription du locus IgH.

### **1.3 NMD & GÈNES D'IG**

Afin d'analyser de façon stricte l'efficacité de la surveillance des ARN, Delpy et collaborateurs ont étudié la fréquence des transcrits *kappa* présentant ou non un décalage du décalage du cadre de lecture dans des cellules pro-B issues de souris inactivées au locus IgH (Delpy *et al.*, 2002). L'intérêt d'un tel modèle est de s'affranchir des processus de sélection cellulaire privilégiant les cellules exprimant des Ig fonctionnelles. Les cellules pro-B issues des souris de ce modèle effectuent des réarrangements VJ au locus *kappa*. L'utilisation du cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique classiquement utilisé pour inhiber le NMD (Carter *et al.*, 1995), a révélé que les transcrits  $\kappa$  hors phase subissent une dégradation par NMD. Bien que la position des PTCs ne respecte la règle « 50-55nt » (Delpy *et al.*, 2004b). Nous avons confirmé ces données au cours de la différenciation B en utilisant le modèle VH-LMP2A (Chemin *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats ainsi que ceux obtenus avec nos lignées co-transfectées montre que les ARNm Ig $\kappa$  hors phase sont de faibles substrats de NMD, avec seulement une augmentation d'un facteur 2 après un traitement au CHX. Ainsi, en absence de prédisposition (règle « 50-55nt »), la dégradation par NMD permet d'éliminer seulement 50% des transcrits matures  $\kappa$  hors phase. Ces données sont en accord avec les travaux de Bühler et collaborateurs, utilisant des constructions Ig $\mu$  artificielles porteuses de PTC sur le dernier exon (Bühler *et al.*, 2006). L'analyse du NMD dans les lignées transfectées avec nos constructions montrent également une corrélation entre la surveillance générale

(diminution du taux d'ARNm contenant des PTC) et l'efficacité de NMD (Chemin *et al.*, 2010).

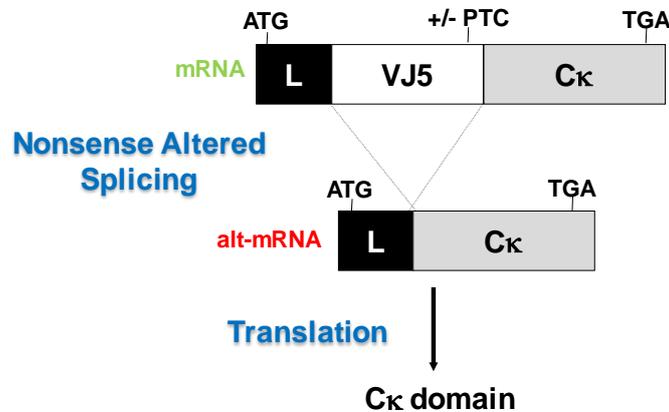
Nous avons également analysé la dégradation par NMD des transcrits IgH non-productifs, en utilisant le modèle IgH<sup>frVκ</sup> précédemment décrit. Nous avons observé une dégradation par NMD très marquée, aboutissant à une disparition quasi complète des ARNm issus des allèles VDJ. De plus, la dégradation par NMD est corrélée avec le taux d'épissage. Ainsi, la dégradation est très forte dans des cellules B stimulées (~95%) et dans les plasmocytes (>80%), comparativement à celle observée dans les cellules B au repos (~50%). Ces données sont en accord avec celle obtenues par l'équipe de Wilkinson en modifiant l'efficacité des sites d'épissage dans des cellules HeLa (Gudikote *et al.*, 2005). Il est désormais admis que la transcription et l'épissage peuvent être concomitants et sont influencés par la vitesse d'elongation de l'ARN pol II (Das *et al.*, 2006, Pal *et al.*, Schwartz *et al.*, 2011; Nogués *et al.*, 2003). Nous supposons donc que l'épissage co-transcriptionnelle a lieu pour des gènes d'IgH fortement transcrits et prévient le phénomène de NMUP dans les cellules B activées au LPS et les plasmocytes. Cependant, notre étude a analysé uniquement l'épissage de l'exon frVκ et il serait intéressant d'étudier les taux d'épissage sur tous les exons des transcrits IgH pour révéler des sites potentiels de « pause transcriptionnelle ».

#### **1.4 EPISSAGE ALTERNATIF DES TRANSCRITS D'IG**

L'élimination de l'exon VJ contenant le PTC par épissage alternatif (NAS) est plus marquée dans les lignées plasmocytaires que dans les lignées B matures (voir article 1). Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, le NAS peut être imputé à deux types de mutations : mutations touchant les séquences régulatrices de l'épissage (classe I) ou induisant un décalage du cadre de lecture (classe II) (Wang *et al.*, 2002). Bien qu'il semble difficile de conclure définitivement entre le NAS de classe I ou II, nos données montrant des différences de NAS en fonction de la position du PTC plaideraient plutôt en faveur d'un NAS dépendant du cadre de lecture (classe II).

Dans notre cas, l'élimination de l'exon VJ<sup>PTC</sup> ne semble pas permettre la production d'une protéine ayant un effet bénéfique. Au contraire, ces Igκ tronquées pourraient exercer un rôle néfaste au cours du développement B (article 3). Ainsi, il ne semble pas y avoir de but pour la cellule d'éliminer cet exon et aboutir à la traduction d'un domaine Cκ (**Figure 28**) et

le phénomène de NAS pour les transcrits I $\kappa$ k hors phase serait plutôt un mécanisme par défaut.



**Figure 28.** Epissage alternatif (NAS : « Nonsense-associated Altered Splicing ») des transcrits I $\kappa$ k PTC<sup>+</sup> et traduction d'un domaine C $\kappa$

Enfin, les études menées au cours de mon doctorat ont permis de montrer l'influence des séquences introniques en aval du réarrangement VJ dans le phénomène de NAS (voir résultats, partie 4). Ainsi, l'épissage alternatif L-C $\kappa$  est très marqué dans le cas d'un réarrangement hors phase VJ $\kappa$ 5 et s'avère quasi inexistant pour un réarrangement VJ $\kappa$ 2. Cette différence semble due à la présence des sites donneurs d'épissage J $\kappa$ 4 et J $\kappa$ 5, situés dans l'intron en aval de J $\kappa$ 2, qui diminuerait le NAS et favoriserait la rétention de séquences introniques. Ces résultats soulèvent de nombreuses questions qui ont amenée de nouvelles expérimentations en cours. Notamment, est-ce que les sites d'épissage situés dans l'intron peuvent agir comme un frein et diminuer la vitesse d'élongation de l'ARN pol II, favorisant ainsi la rétention d'intron plutôt que le saut d'exon. Ce rôle éventuel et les résultats préliminaires obtenus seront détaillés dans la partie « perspectives » de ce manuscrit.

## 2- CONTRE-SELECTION DES CELLULES CONTENANT DES ALLELES I $\kappa$ K DE CLASSE VJ<sup>PTC</sup>

Une autre partie de mes travaux de thèse, a consisté en l'étude des des réarrangements VJ $\kappa$  productifs et non-productifs dans des cellules B et des plasmocytes isolés de souris sauvages et DH-LMP2A (Casola *et al.*, 2004). Les réarrangements hors phase ont été analysés en fonction de la position du PTC (VJ<sup>PTC</sup> ou C<sup>PTC</sup>) et cette étude a montré que la sous-classe

VJ<sup>PTC</sup> disparaît fortement au cours de la maturation B (Article 3). Cela en deux étapes, la première diminution des allèles VJ<sup>PTC</sup> étant observé entre le stade pré-B et le stade B immature, soit après l'expression d'un BCR et, la seconde au cours de la différenciation plasmocytaire. Nos résultats suggèrent que la présence des allèles Igκ de classes VJ<sup>PTC</sup> influence la différenciation ou la survie des cellules B et plasmocytaires.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène innattendu, nous avons analysé le devenir des transcrits issus des allèles VJ<sup>PTC</sup> ou C<sup>PTC</sup>. Nous avons mis en évidence une dégradation par NMD plus faible des transcrits VJ<sup>PTC</sup>, comparativement au C<sup>PTC</sup> (~2 fois moins). A cela s'ajoute une différence dans le mécanisme de NAS car l'épissage alternatif de type L-Cκ est beaucoup plus marqué avec les transcrits VJ<sup>PTC</sup> (~7 fois).

Nous avons également mis en évidence une rétention d'une protéine Igκ tronquée, ne possédant qu'un domaine Cκ et cela seulement pour des lignées cellulaires transfectées avec une construction VJ<sup>PTC</sup>. Ainsi, l'élimination de cette sous-classe pourrait être due à une accumulation de domaines Cκ dans la cellule qui pourrait avoir un effet délétère sur la survie cellulaire ou la différenciation. Ceci peut faire écho dans les plasmocytes qui constituent de véritables machines à produire des anticorps

Cependant de nombreuses questions restent en suspens concernant cette contre-sélection des cellules Igκ VJ<sup>PTC</sup> et seront présentées dans la partie « perspectives ».

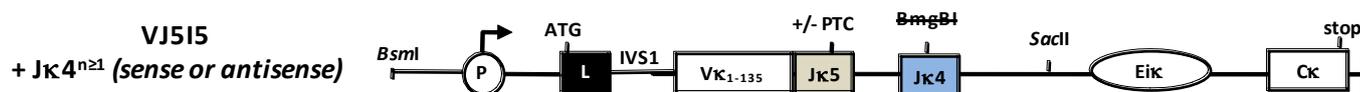
### 3- PERSPECTIVES

Bien qu'initiée par une étude publiée en 2004 (Delpy et al, 2004b), les travaux sur la thématique surveillance des ARN avaient été interrompus durant de nos nombreuses années. Aussi, à mon arrivée en thèse, nous avons reinitié ces projets. Les premiers résultats ont donné deux publications originales et deux autres études sont en cours de finalisation. Cependant, de nombreuses questions posées dès le début de ces recherches et celles apparues en cours d'analyse restent à étudier.

Pour répondre à ces questions, les travaux futurs concernant l'influence des séquences introniques en aval des réarrangements Jκ devraient permettre de comprendre les causes des 2 profils d'épissage diamétralement opposés (saut d'exon vs rétention de séquence intronique : voir résultats partie 4). L'hypothèse que nous souhaiterions tester serait que la présence de sites donneurs d'épissage de Jκ4 et Jκ5 dans la séquence intronique située en aval du réarrangement VJκ2 (constructions 22<sup>NF</sup>), pourrait provoquer un ralentissement de l'ARN pol

II favorisant ainsi leur usage et la rétention d'intron. A l'inverse, en absence de sites donneurs d'épissage (construction 55<sup>NF</sup>), la vitesse d'élongation serait rapide et favoriserait l'épissage alternatif. Pour cela des expériences préliminaires ont été réalisées en tentant de réduire la vitesse d'élongation de l'ARN pol II afin de diminuer l'épissage alternatif L-Cκ. Pour cela nous avons traité les cellules A20 co-transfectées avec des constructions 55 (F et VJ<sup>PTC</sup>) par des inhibiteurs de l'élongation de l'ARN Pol II tels que le DRB. Cet inhibiteur est utilisé pour favoriser l'inclusion de certains exons (Ip *et al.*, 2011). Néanmoins, les résultats préliminaires semblent montrer au contraire une accumulation de transcrits épissés L-Cκ, après traitement au DRB. Cette augmentation d'ARNm L-Cκ est accompagné également d'une diminution des ARNm VJ<sup>PTC</sup> de pleine taille. Nous supposons que le traitement au DRB à bloquer complètement la transcription puisque des effets similaires ont été observés après traitement à l'actinomycine D. Ainsi, nos résultats reflèteraient plus la demie-vie de ces transcrits, le L-Cκ traduit serait plus stable que le transcrit de pleine longueur dégradé par NMD. Nous souhaitons donc réaliser des titrations du DRB mais surtout, nous envisageons d'analyser d'éventuelles « pauses transcriptionnelles » sur les sites d'épissage introniques, à l'aide de ChIP dirigée contre l'ARN pol II. Nous pourrions également diminuer la vitesse d'élongation de l'ARN pol II en utilisant l'ARN pol II muté « C4 » (Coulter et Greenleaf, 1985 ; Ip *et al.*, 2011) connue pour avoir une vitesse d'élongation plus lente. Cette diminution de vitesse dans le cas des transcrits 55 VJ<sup>PTC</sup> pourrait s'accompagner d'une diminution de l'épissage alternatif. Une autre solution vise à accélérer la vitesse d'élongation de l'ARN pol II pour des transcrits 22NF et ainsi voir si l'efficacité du NAS augmente et la rétention d'intron diminue rétention suit la vitesse d'élongation.

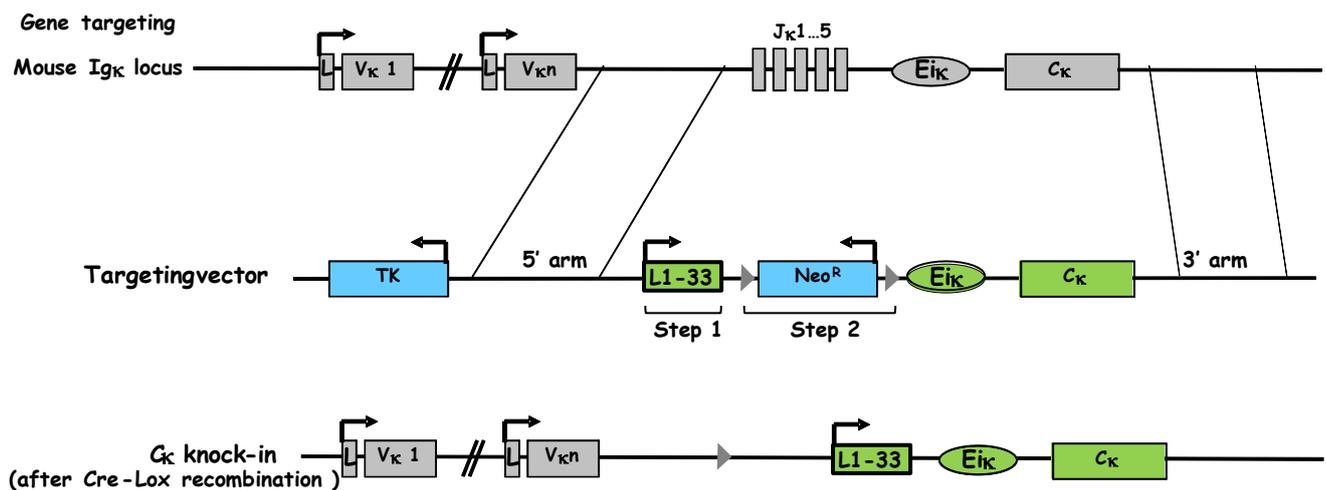
Enfin, nous tenterons d'appréhender les causes moléculaires de ces variations en analysant les effets liés uniquement à la présence de sites d'épissage. Pour tester cette hypothèse, nous avons modifié la construction 55 en ajoutant un ou plusieurs segments Jκ, en orientation sens ou antisens, au sein de la séquence intronique IVS2 (**Figure 29**).



**Figure 29.** La présence de segments Jκ dans la séquence intronique IVS2 influence-t-elle le NAS ? Obtention de nouvelles constructions dédiées à l'analyse du NAS et permettant d'explorer le rôle strict des segments Jκ (et par conséquent des sites donneurs d'épissage) au sein de l'intron IVS2.

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses questions concernant la compréhension des mécanismes conduisant à une réduction du nombre de cellules porteuses d'allèles  $Ig\kappa$  de classe  $VJ^{PTC}$ . Serait-ce lié à la synthèse d'Ig tronquée qui aurait un effet néfaste pour la cellule ? Si oui, quels seraient les domaines les plus toxiques : les domaines  $V\kappa$  (issus de la faible dégradation des ARNm pleine taille) ou les domaines  $C\kappa$  (codés par les produits d'épissage alternatifs L- $C\kappa$ ) ?

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé des constructions afin de réaliser des modèles permettant de produire ces Ig tronquées de façon inductible. Dans un premier temps nous avons créé un modèle consistant à induire la production d'un domaine  $C\kappa$  (**Figure 30**). Les travaux concernant ce modèle ont déjà commencé et nous possédons pour l'heure, cinq clones de cellules souches embryonnaires ayant intégré la construction ; les injections de ces cellules dans des blastocystes seront réalisées prochainement. D'autres travaux sont en cours pour remplacer l'exon  $C\kappa$  par un exon VJ dans le vecteur de recombinaison homologue. Chez ces animaux, le développement B sera analysé après croisement avec des souris exprimant la recombinaison Cre (par exemple : Cre inductible par le Tamoxifen ...). En effet, la délétion du gène Néo devrait permettre la transcription et l'épissage de l'exon Leader sur l'exon  $C\kappa$  et/ou VJ.



**Figure 30.** Vecteur de recombinaison homologue. Modèle « Truncated Ig knock In »

D'autres aspects sont envisagés pour approfondir cette thématique. Ainsi, nous allons tester si l'utilisation d'inhibiteurs du NMD pourrait permettre la production d'Ig tronquées à partir des transcrits VDJ, normalement dégradés efficacement par NMD (article 2). Des collaborations sont en cours pour développer de nouveaux inhibiteurs spécifiques du NMD comme NMDI-1 (NMD-Inhibitor 1) (Durand *et al.*, 2007). Dans l'hypothèse d'une toxicité induite par la production d'Ig tronquées, de tels traitements pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques chez les patients présentant des réarrangements bi-alléliques VDJ+/VDJ- (environ 50% des cellules B chez les individus sains). L'utilisation d'inhibiteurs du NMD, seuls ou en combinaison avec le bortezomib (dans l'hypothèse d'une toxicité liée à un engorgement de la cellule), pourraient ainsi être envisagée dans de nombreuses tumeurs lymphoïdes (myélome, lymphome, leucémie) et certaines maladies auto-immunes (lupus).

Sur un plan personnel, cette thèse m'a permis d'étudier deux disciplines qui me semblé bien éloignées il ya cinq ans. L'immunologie, plus particulièrement le lymphocyte B, et ses gènes d'Ig et la surveillance des ARN, deux mondes qui sont finalement très proches après les avoir étudiés et au vue des résultats que nous avons obtenus. Cette thématique entreprise il y a quelques années au sein du laboratoire, a redémarré avec le retour de Laurent DELPY qui m'a encadré dès mon Master2, puis lors de mon doctorat,. J'espère que le sujet qui fait maintenant parti des thématiques du laboratoire, aura de beaux jours devant lui avec l'ensemble des projets à venir et ceux déjà initiés.

# Références bibliographiques

Allen, D., M. P. Lunn, J. Niermeijer, and E. Nobile-Orazio (2007), "Treatment for IgG and IgA paraproteinaemic neuropathy", *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD005376.

Allman, D., and S. Pillai (2008), "Peripheral B cell subsets", *Curr Opin Immunol* 20 (2):149-157.

Andersen, C. B., L. Ballut, J. S. Johansen, H. Chamieh, K. H. Nielsen, C. L. Oliveira, J. S. Pedersen, B. Seraphin, H. Le Hir, and G. R. Andersen (2006), "Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA", *Science* 313 (5795):1968-1972.

Aoufouchi, S., J. Yelamos, and C. Milstein (1996), "Nonsense mutations inhibit RNA splicing in a cell-free system: recognition of mutant codon is independent of protein synthesis", *Cell* 85 (3):415-422.

Applequist, S. E., M. Selg, C. Raman, and H. M. Jack (1997), "Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing UPF1 protein", *Nucleic Acids Res* 25 (4):814-821.

Arakawa, H., T. Shimizu, and S. Takeda (1996), "Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci", *Int Immunol* 8 (1):91-99.

Arrhenius, G., and A. Lepland (2000), "Accretion of Moon and Earth and the emergence of life", *Chem Geol* 169 (1-2):69-82.

Aydar, Y., S. Sukumar, A. K. Szakal, and J. G. Tew (2005), "The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching, and production of high affinity IgG", *J Immunol* 174 (9):5358-5366.

Azzalin, C. M., P. Reichenbach, L. Khoriantuli, E. Giulotto, and J. Lingner (2007), "Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends", *Science* 318 (5851):798-801.

Ballut, L., B. Marchadier, A. Baguet, C. Tomasetto, B. Seraphin, and H. Le Hir (2005), "The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity", *Nat Struct Mol Biol* 12 (10):861-869.

Baserga, S. J., and E. J. Benz, Jr. (1988), "Nonsense mutations in the human beta-globin gene affect mRNA metabolism", *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (7):2056-2060.

Bassing, C. H., W. Swat, and F. W. Alt (2002), "The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination", *Cell* 109 Suppl:S45-55.

Batsche, E., M. Yaniv, and C. Muchardt (2006), "The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing", *Nat Struct Mol Biol* 13 (1):22-29.

Baumann, B., M. J. Potash, and G. Kohler (1985), "Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse", *Embo J* 4 (2):351-359.

Baumann, M., J. Pontiller, and W. Ernst "Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview", *Mol Biotechnol* 45 (3):241-247.

- Belgrader, P., J. Cheng, and L. E. Maquat (1993), "Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA", *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (2):482-486.
- Benschop, R. J., and J. C. Cambier (1999), "B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates", *Curr Opin Immunol* 11 (2):143-151.
- Bentley, D. (2002), "The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory", *Curr Opin Cell Biol* 14 (3):336-342.
- Bhuvanagiri, M., A. M. Schlitter, M. W. Hentze, and A. E. Kulozik "NMD: RNA biology meets human genetic medicine", *Biochem J* 430 (3):365-377.
- Bianchin, C., F. Mauxion, S. Sentis, B. Seraphin, and L. Corbo (2005), "Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human", *Rna* 11 (4):487-494.
- Bittencourt, D., M. Dutertre, G. Sanchez, J. Barbier, L. Gratadou, and D. Auboeuf (2008), "Cotranscriptional splicing potentiates the mRNA production from a subset of estradiol-stimulated genes", *Mol Cell Biol* 28 (18):5811-5824.
- Black, D. L. (2003), "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing", *Annu Rev Biochem* 72:291-336.
- Blomberg, B., and S. Tonegawa (1982), "DNA sequences of the joining regions of mouse lambda light chain immunoglobulin genes", *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (2):530-533.
- Brodeur, P. H., and R. Riblet (1984), "The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes", *Eur J Immunol* 14 (10):922-930.
- Brown, C. E., and A. B. Sachs (1998), "Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation", *Mol Cell Biol* 18 (11):6548-6559.
- Buchwald, G., J. Ebert, C. Basquin, J. Sauliere, U. Jayachandran, F. Bono, H. Le Hir, and E. Conti "Insights into the recruitment of the NMD machinery from the crystal structure of a core EJC-UPF3b complex", *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (22):10050-10055.
- Buhler, M., F. Mohn, L. Stalder, and O. Muhlemann (2005), "Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes", *Mol Cell* 18 (3):307-317.
- Buhler, M., A. Paillusson, and O. Muhlemann (2004), "Efficient downregulation of immunoglobulin mu mRNA with premature translation-termination codons requires the 5'-half of the VDJ exon", *Nucleic Acids Res* 32 (11):3304-3315.
- Butler, J. E., and J. T. Kadonaga (2002), "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression", *Genes Dev* 16 (20):2583-2592.
- Buttner, K., K. Wenig, and K. P. Hopfner (2006), "The exosome: a macromolecular cage for controlled RNA degradation", *Mol Microbiol* 61 (6):1372-1379.

- Caceres, J. F., and A. R. Kornblihtt (2002), "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease", *Trends Genet* 18 (4):186-193.
- Calvo, S. E., D. J. Pagliarini, and V. K. Mootha (2009), "Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans", *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (18):7507-7512.
- Camier, S., and B. Seraphin (2007), "[Destroy this (RNA) message after reading it!]", *Med Sci (Paris)* 23 (10):850-856.
- Caputi, M., R. J. Kendzior, Jr., and K. L. Beemon (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 (14):1754-1759.
- Carson, S., and G. E. Wu (1989), "A linkage map of the mouse immunoglobulin lambda light chain locus", *Immunogenetics* 29 (3):173-179.
- Cartegni, L., S. L. Chew, and A. R. Krainer (2002), "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing", *Nat Rev Genet* 3 (4):285-298.
- Carter, M. S., J. Doskow, P. Morris, S. Li, R. P. Nhim, S. Sandstedt, and M. F. Wilkinson (1995), "A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro", *J Biol Chem* 270 (48):28995-29003.
- Carter, M. S., S. Li, and M. F. Wilkinson (1996), "A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals", *Embo J* 15 (21):5965-5975.
- Casola, S. (2007), "Control of peripheral B-cell development", *Curr Opin Immunol* 19 (2):143-149.
- Casola, S., K. L. Otipoby, M. Alimzhanov, S. Humme, N. Uyttersprot, J. L. Kutok, M. C. Carroll, and K. Rajewsky (2004), "B cell receptor signal strength determines B cell fate", *Nat Immunol* 5 (3):317-327.
- Chan, C. C., J. Dostie, M. D. Diem, W. Feng, M. Mann, J. Rappsilber, and G. Dreyfuss (2004), "eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex", *Rna* 10 (2):200-209.
- Chang, Y. F., W. K. Chan, J. S. Imam, and M. F. Wilkinson (2007)a, "Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame", *J Biol Chem* 282 (41):29738-29747.
- Chang, Y. F., J. S. Imam, and M. F. Wilkinson (2007)b, "The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway", *Annu Rev Biochem* 76:51-74.
- Chaudhuri, J., and F. W. Alt (2004), "Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair", *Nat Rev Immunol* 4 (7):541-552.
- Chemin, G., A. Tinguely, C. Sirac, F. Lechouane, S. Duchez, M. Cogne, and L. Delpy (2010), "Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts", *J Immunol* 184 (9):5009-5017.

- Chen, C. Y., and A. B. Shyu (2003), "Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway", *Mol Cell Biol* 23 (14):4805-4813.
- Chen, J. M., C. Ferec, and D. N. Cooper (2006), "A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview", *Hum Genet* 120 (1):1-21.
- Chen, J., M. Trounstein, C. Kurahara, F. Young, C. C. Kuo, Y. Xu, J. F. Loring, F. W. Alt, and D. Huszar (1993)a, "B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin kappa light chain genes", *Embo J* 12 (3):821-830.
- Chen, Y., A. Mestek, J. Liu, and L. Yu (1993)b, "Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors", *Biochem J* 295 (Pt 3):625-628.
- Cheng, J., P. Belgrader, X. Zhou, and L. E. Maquat (1994), "Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance", *Mol Cell Biol* 14 (9):6317-6325.
- Chiu, S. Y., F. Lejeune, A. C. Ranganathan, and L. E. Maquat (2004), "The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex", *Genes Dev* 18 (7):745-754.
- Chiu, S. Y., G. Serin, O. Ohara, and L. E. Maquat (2003), "Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1", *Rna* 9 (1):77-87.
- Coleclough, C., R. P. Perry, K. Karjalainen, and M. Weigert (1981), "Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression", *Nature* 290 (5805):372-378.
- Conaway, J. W., A. Shilatifard, A. Dvir, and R. C. Conaway (2000), "Control of elongation by RNA polymerase II", *Trends Biochem Sci* 25 (8):375-380.
- Connor, A., E. Wiersma, and M. J. Shulman (1994), "On the linkage between RNA processing and RNA translatability", *J Biol Chem* 269 (40):25178-25184.
- Conticello, S. G. (2008), "The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators", *Genome Biol* 9 (6):229.
- Corcoran, A. E. (2005), "Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion", *Semin Immunol* 17 (2):141-154.
- Corcos, L., and S. Solier (2005), "[Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]", *Med Sci (Paris)* 21 (3):253-260.
- Cougot, N., E. van Dijk, S. Babajko, and B. Seraphin (2004), "'Cap-tabolism'", *Trends Biochem Sci* 29 (8):436-444.
- Coulter, D. E., and A. L. Greenleaf (1985), "A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro", *J Biol Chem* 260 (24):13190-13198.
- Coutinho, A., and G. Moller (1975), "The self-nonsel self discrimination: A one-signal mechanism", *Scand J Immunol* 4 (2):99-102.

Couttet, P., and T. Grange (2004), "Premature termination codons enhance mRNA decapping in human cells", *Nucleic Acids Res* 32 (2):488-494.

Crick, F. H. (1958), "On protein synthesis", *Symp Soc Exp Biol* 12:138-163.

Cui, Y., K. W. Hagan, S. Zhang, and S. W. Peltz (1995), "Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon", *Genes Dev* 9 (4):423-436.

Culbertson, M. R., and P. F. Leeds (2003), "Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution", *Curr Opin Genet Dev* 13 (2):207-214.

Czaplinski, K., M. J. Ruiz-Echevarria, S. V. Paushkin, X. Han, Y. Weng, H. A. Perlick, H. C. Dietz, M. D. Ter-Avanesyan, and S. W. Peltz (1998), "The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs", *Genes Dev* 12 (11):1665-1677.

Daly, J., S. Licence, A. Nanou, G. Morgan, and I. L. Martensson (2007), "Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion", *Embo J* 26 (19):4273-4282.

Das, D., T. A. Clark, A. Schweitzer, M. Yamamoto, H. Marr, J. Arribere, S. Minovitsky, A. Poliakov, I. Dubchak, J. E. Blume, and J. G. Conboy (2007), "A correlation with exon expression approach to identify cis-regulatory elements for tissue-specific alternative splicing", *Nucleic Acids Res* 35 (14):4845-4857.

Daugeron, M. C., D. Kressler, and P. Linder (2001), "Dbp9p, a putative ATP-dependent RNA helicase involved in 60S-ribosomal-subunit biogenesis, functionally interacts with Dbp6p", *Rna* 7 (9):1317-1334.

David, C. J., A. R. Boyne, S. R. Millhouse, and J. L. Manley "The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65-Prp19 complex", *Genes Dev* 25 (9):972-983.

de la Mata, M., C. R. Alonso, S. Kadener, J. P. Fededa, M. Blaustein, F. Pelisch, P. Cramer, D. Bentley, and A. R. Kornblihtt (2003), "A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo", *Mol Cell* 12 (2):525-532.

de la Mata, M., and A. R. Kornblihtt (2006), "RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20", *Nat Struct Mol Biol* 13 (11):973-980.

Delpy, L., M. Le Bert, M. Cogne, and A. A. Khamlichi (2003), "Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes", *Eur J Immunol* 33 (8):2108-2113.

Delpy, L., C. Sirac, E. Magnoux, S. Duchez, and M. Cogne (2004)a, "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 (19):7375-7380.

Delpy, L., C. Sirac, C. Le Morvan, and M. Cogne (2004)b, "Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles", *J Immunol* 173 (3):1842-1848.

Di Noia, J. M., and M. S. Neuberger (2007), "Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation", *Annu Rev Biochem* 76:1-22.

- Dildrop, R., A. Gause, W. Muller, and K. Rajewsky (1987), "A new V gene expressed in lambda-2 light chains of the mouse", *Eur J Immunol* 17 (5):731-734.
- Douziech, M., F. Coin, J. M. Chipoulet, Y. Arai, Y. Ohkuma, J. M. Egly, and B. Coulombe (2000), "Mechanism of promoter melting by the xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking", *Mol Cell Biol* 20 (21):8168-8177.
- Dudley, D. D., J. Chaudhuri, C. H. Bassing, and F. W. Alt (2005), "Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences", *Adv Immunol* 86:43-112.
- Durand, S., N. Cougot, F. Mahuteau-Betzer, C. H. Nguyen, D. S. Grierson, E. Bertrand, J. Tazi, and F. Lejeune (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 (7):1145-1160.
- Dziembowski, A., E. Lorentzen, E. Conti, and B. Seraphin (2007), "A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity", *Nat Struct Mol Biol* 14 (1):15-22.
- Early, P., H. Huang, M. Davis, K. Calame, and L. Hood (1980), "An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH", *Cell* 19 (4):981-992.
- Early, P., J. Rogers, M. Davis, K. Calame, M. Bond, R. Wall, and L. Hood (1980), "Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways", *Cell* 20 (2):313-319.
- Eberle, A. B., K. Herrmann, H. M. Jack, and O. Muhlemann (2009), "Equal transcription rates of productively and nonproductively rearranged immunoglobulin mu heavy chain alleles in a pro-B cell line", *Rna* 15 (6):1021-1028.
- Eccleston, J., C. E. Schrader, K. Yuan, J. Stavnezer, and E. Selsing (2009), "Class switch recombination efficiency and junction microhomology patterns in Msh2-, Mlh1-, and Exo1-deficient mice depend on the presence of mu switch region tandem repeats", *J Immunol* 183 (2):1222-1228.
- Ehlich, A., S. Schaal, H. Gu, D. Kitamura, W. Muller, and K. Rajewsky (1993), "Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development", *Cell* 72 (5):695-704.
- Eisen, H. N., and E. B. Reilly (1985), "Lambda chains and genes in inbred mice", *Annu Rev Immunol* 3:337-365.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, D. Schweizer, and E. Izaurralde (2007), "P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing", *Mol Cell Biol* 27 (11):3970-3981.
- Fairfax, K. A., A. Kallies, S. L. Nutt, and D. M. Tarlinton (2008), "Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches", *Semin Immunol* 20 (1):49-58.
- Faustino, N. A., and T. A. Cooper (2003), "Pre-mRNA splicing and human disease", *Genes Dev* 17 (4):419-437.
- Feeney, A. J., and R. Riblet (1993), "DST4: a new, and probably the last, functional DH gene in the BALB/c mouse", *Immunogenetics* 37 (3):217-221.

- Ferraiuolo, M. A., C. S. Lee, L. W. Ler, J. L. Hsu, M. Costa-Mattioli, M. J. Luo, R. Reed, and N. Sonenberg (2004), "A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay", *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (12):4118-4123.
- Finoux, A. L., and B. Seraphin (2006), "In vivo targeting of the yeast Pop2 deadenylase subunit to reporter transcripts induces their rapid degradation and generates new decay intermediates", *J Biol Chem* 281 (36):25940-25947.
- Fisette, J. F., L. Michelle, T. Revil, and B. Chabot (2009), "[Guiding and integrating to control and diversify splicing]", *Med Sci (Paris)* 25 (2):175-180.
- Fisher, A. G., and M. Merckenschlager (2002), "Gene silencing, cell fate and nuclear organisation", *Curr Opin Genet Dev* 12 (2):193-197.
- Franks, T. M., G. Singh, and J. Lykke-Andersen "Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay", *Cell* 143 (6):938-950.
- Fribourg, S., D. Gatfield, E. Izaurralde, and E. Conti (2003), "A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex", *Nat Struct Biol* 10 (6):433-439.
- Frischmeyer-Guerrero, P. A., R. A. Montgomery, D. S. Warren, S. K. Cooke, J. Lutz, C. J. Sonnenday, A. L. Guerrero, and H. C. Dietz (2011), "Perturbation of thymocyte development in nonsense-mediated decay (NMD)-deficient mice", *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (26):10638-10643.
- Frith, M. C., M. Pheasant, and J. S. Mattick (2005), "The amazing complexity of the human transcriptome", *Eur J Hum Genet* 13 (8):894-897.
- Fukuhara, N., J. Ebert, L. Unterholzner, D. Lindner, E. Izaurralde, and E. Conti (2005), "SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway", *Mol Cell* 17 (4):537-547.
- Gatfield, D., and E. Izaurralde (2004), "Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*", *Nature* 429 (6991):575-578.
- Gaudin, E., M. Rosado, F. Agenes, A. McLean, and A. A. Freitas (2004), "B-cell homeostasis, competition, resources, and positive selection by self-antigens", *Immunol Rev* 197:102-115.
- Gehring, N. H., J. B. Kunz, G. Neu-Yilik, S. Breit, M. H. Viegas, M. W. Hentze, and A. E. Kulozik (2005), "Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements", *Mol Cell* 20 (1):65-75.
- Gehring, N. H., S. Lamprinaki, M. W. Hentze, and A. E. Kulozik (2009), "The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay", *PLoS Biol* 7 (5):e1000120.
- Gehring, N. H., G. Neu-Yilik, T. Schell, M. W. Hentze, and A. E. Kulozik (2003), "Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex", *Mol Cell* 11 (4):939-949.
- Gersappe, A., and D. J. Pintel (1999), "A premature termination codon interferes with the nuclear function of an exon splicing enhancer in an open reading frame-dependent manner", *Mol Cell Biol* 19 (3):1640-1650.

- Glavan, F., I. Behm-Ansmant, E. Izaurralde, and E. Conti (2006), "Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex", *Embo J* 25 (21):5117-5125.
- Goodnow, C. C., S. Adelstein, and A. Basten (1990), "The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire", *Science* 248 (4961):1373-1379.
- Gudikote, J. P., J. S. Imam, R. F. Garcia, and M. F. Wilkinson (2005), "RNA splicing promotes translation and RNA surveillance", *Nat Struct Mol Biol* 12 (9):801-809.
- Gudikote, J. P., and M. F. Wilkinson (2002), "T-cell receptor sequences that elicit strong down-regulation of premature termination codon-bearing transcripts", *Embo J* 21 (1-2):125-134.
- Guikema, J. E., E. K. Linehan, D. Tsuchimoto, Y. Nakabeppu, P. R. Strauss, J. Stavnezer, and C. E. Schrader (2007), "APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination", *J Exp Med* 204 (12):3017-3026.
- Gustincich, S., A. Sandelin, C. Plessy, S. Katayama, R. Simone, D. Lazarevic, Y. Hayashizaki, and P. Carninci (2006), "The complexity of the mammalian transcriptome", *J Physiol* 575 (Pt 2):321-332.
- Haas, K. M., J. C. Poe, D. A. Steeber, and T. F. Tedder (2005), "B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*", *Immunity* 23 (1):7-18.
- Hanke, J., D. Brett, I. Zastrow, A. Aydin, S. Delbruck, G. Lehmann, F. Luft, J. Reich, and P. Bork (1999), "Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception?" *Trends Genet* 15 (10):389-390.
- Hardy, R. R., and K. Hayakawa (1991), "A developmental switch in B lymphopoiesis", *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (24):11550-11554.
- (2001), "B cell development pathways", *Annu Rev Immunol* 19:595-621.
- Hardy, R. R., P. W. Kincade, and K. Dorshkind (2007), "The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage", *Immunity* 26 (6):703-714.
- Hentze, M. W., and A. E. Kulozik (1999), "A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay", *Cell* 96 (3):307-310.
- Herzog, S., M. Reth, and H. Jumaa (2009), "Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling", *Nat Rev Immunol* 9 (3):195-205.
- Hocine, S., R. H. Singer, and D. Grunwald (2010), "RNA processing and export", *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (12):a000752.
- Holstege, F. C., and H. T. Timmers (1997), "Analysis of open complex formation during RNA polymerase II transcription initiation using heteroduplex templates and potassium permanganate probing", *Methods* 12 (3):203-211.
- Houseley, J., and D. Tollervey (2009), "The many pathways of RNA degradation", *Cell* 136 (4):763-776.
- Huntzinger, E., I. Kashima, M. Fauser, J. Sauliere, and E. Izaurralde (2008), "SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan", *Rna* 14 (12):2609-2617.

Ichihara, Y., H. Hayashida, S. Miyazawa, and Y. Kurosawa (1989), "Only DFL16, DSP2, and DQ52 gene families exist in mouse immunoglobulin heavy chain diversity gene loci, of which DFL16 and DSP2 originate from the same primordial DH gene", *Eur J Immunol* 19 (10):1849-1854.

Imai, K., G. Slupphaug, W. I. Lee, P. Revy, S. Nonoyama, N. Catalan, L. Yel, M. Forveille, B. Kavli, H. E. Krokan, H. D. Ochs, A. Fischer, and A. Durandy (2003), "Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination", *Nat Immunol* 4 (10):1023-1028.

Ip, J. Y., D. Schmidt, Q. Pan, A. K. Ramani, A. G. Fraser, D. T. Odom, and B. J. Blencowe (2011), "Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation", *Genome Res* 21 (3):390-401.

Ishigaki, Y., X. Li, G. Serin, and L. E. Maquat (2001), "Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20", *Cell* 106 (5):607-617.

Isken, O., and L. E. Maquat (2007), "Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function", *Genes Dev* 21 (15):1833-1856.

——— (2008), "The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation", *Nat Rev Genet* 9 (9):699-712.

Ivanov, M. S., Alu Aksenova, V. Burdaeva Ia, E. A. Radchenko, and L. N. Mironova (2008), "[Overexpression of gene PPZ1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affects the efficiency of nonsense suppression]", *Genetika* 44 (2):177-184.

Izban, M. G., and D. S. Luse (1992), "The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII", *Genes Dev* 6 (7):1342-1356.

Jack, H. M., J. Berg, and M. Wabl (1989), "Translation affects immunoglobulin mRNA stability", *Eur J Immunol* 19 (5):843-847.

Jepson, J. E., and R. A. Reenan (2008), "RNA editing in regulating gene expression in the brain", *Biochim Biophys Acta* 1779 (8):459-470.

Joyce, G. F. (1991), "The rise and fall of the RNA world", *New Biol* 3 (4):399-407.

Jung, D., C. Giallourakis, R. Mostoslavsky, and F. W. Alt (2006), "Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus", *Annu Rev Immunol* 24:541-570.

Jurica, M. S., and M. J. Moore (2002), "Capturing splicing complexes to study structure and mechanism", *Methods* 28 (3):336-345.

Kantor, A. B. (1991), "The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells)", *Immunol Today* 12 (11):389-391.

Karasuyama, H., A. Rolink, and F. Melchers (1996), "Surrogate light chain in B cell development", *Adv Immunol* 63:1-41.

- Kashima, I., S. Jonas, U. Jayachandran, G. Buchwald, E. Conti, A. N. Lupas, and E. Izaurralde "SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay", *Genes Dev* 24 (21):2440-2450.
- Kashima, I., A. Yamashita, N. Izumi, N. Kataoka, R. Morishita, S. Hoshino, M. Ohno, G. Dreyfuss, and S. Ohno (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 (3):355-367.
- Kataoka, N., M. D. Diem, V. N. Kim, J. Yong, and G. Dreyfuss (2001), "Magoh, a human homolog of *Drosophila mago nashi* protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex", *Embo J* 20 (22):6424-6433.
- Kawaji, H., and Y. Hayashizaki (2008), "Exploration of small RNAs", *PLoS Genet* 4 (1):e22.
- Keller, and (1999), *In the Beginning, There Was RNA*The RNA World 2nd ed. Raymond F. Gesteland, Thomas R. Cech, and John F. Atkins, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999. 735 pp. \$129. ISBN 0-87969-561-7.
- Khamlichi, A. A., E. Pinaud, C. Decourt, C. Chauveau, and M. Cogne (2000), "The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function", *Adv Immunol* 75:317-345.
- Kim, V. N., N. Kataoka, and G. Dreyfuss (2001), "Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex", *Science* 293 (5536):1832-1836.
- Kirshbaum, M. (1996), "Using massage in the relief of lymphoedema", *Prof Nurse* 11 (4):230-232.
- Klein, U., and R. Dalla-Favera (2008), "Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy", *Nat Rev Immunol* 8 (1):22-33.
- Kofler, R., M. A. Duchosal, and F. J. Dixon (1989), "Complexity, polymorphism, and connectivity of mouse V<sub>k</sub> gene families", *Immunogenetics* 29 (2):65-74.
- Kofler, R., S. Geley, H. Kofler, and A. Helmborg (1992), "Mouse variable-region gene families: complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses", *Immunol Rev* 128:5-21.
- Krishnamurthy, R. V., S. Epstein, J. R. Cronin, S. Pizzarello, and G. U. Yuen (1992), "Isotopic and molecular analyses of hydrocarbons and monocarboxylic acids of the Murchison meteorite", *Geochim Cosmochim Acta* 56:4045-4058.
- Kumararatne, D. S., and I. C. MacLennan (1982), "The origin of marginal-zone cells", *Adv Exp Med Biol* 149:83-90.
- Kundu, S., P. J. Horn, and C. L. Peterson (2007), "SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster", *Genes Dev* 21 (8):997-1004.
- Kunz, J. B., G. Neu-Yilik, M. W. Hentze, A. E. Kulozik, and N. H. Gehring (2006), "Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation", *Rna* 12 (6):1015-1022.
- Kurosaki, T. (2010), "Regulation of BCR signaling", *Mol Immunol* 48 (11):1287-1291.
- Kurosawa, Y., and S. Tonegawa (1982), "Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments", *J Exp Med* 155 (1):201-218.

- Lam, K. P., R. Kuhn, and K. Rajewsky (1997), "In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death", *Cell* 90 (6):1073-1083.
- Le Hir, H., D. Gatfield, I. C. Braun, D. Forler, and E. Izaurralde (2001), "The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization", *EMBO Rep* 2 (12):1119-1124.
- Le Hir, H., D. Gatfield, E. Izaurralde, and M. J. Moore (2001), "The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay", *Embo J* 20 (17):4987-4997.
- Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore (2000), "The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions", *Embo J* 19 (24):6860-6869.
- Le Hir, H., M. J. Moore, and L. E. Maquat (2000), "Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions", *Genes Dev* 14 (9):1098-1108.
- LeBien, T. W. (2000), "Fates of human B-cell precursors", *Blood* 96 (1):9-23.
- LeBien, T. W., and T. F. Tedder (2008), "B lymphocytes: how they develop and function", *Blood* 112 (5):1570-1580.
- Lecuyer, E., H. Yoshida, and H. M. Krause (2009), "Global implications of mRNA localization pathways in cellular organization", *Curr Opin Cell Biol* 21 (3):409-415.
- Lejeune, F., Y. Ishigaki, X. Li, and L. E. Maquat (2002), "The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling", *Embo J* 21 (13):3536-3545.
- Lejeune, F., A. C. Ranganathan, and L. E. Maquat (2004), "eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells", *Nat Struct Mol Biol* 11 (10):992-1000.
- Li, J. B., E. Y. Levanon, J. K. Yoon, J. Aach, B. Xie, E. Leproust, K. Zhang, Y. Gao, and G. M. Church (2009), "Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing", *Science* 324 (5931):1210-1213.
- Li, S., and M. F. Wilkinson (1998), "Nonsense surveillance in lymphocytes?" *Immunity* 8 (2):135-141.
- Lieber, M. R. (2010), "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway", *Annu Rev Biochem* 79:181-211.
- Linde, L., and B. Kerem "Nonsense-mediated mRNA decay and cystic fibrosis", *Methods Mol Biol* 741:137-154.
- Liu, H., N. D. Rodgers, X. Jiao, and M. Kiledjian (2002), "The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases", *Embo J* 21 (17):4699-4708.
- Liu, H. X., L. Cartegni, M. Q. Zhang, and A. R. Krainer (2001), "A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes", *Nat Genet* 27 (1):55-58.
- Livant, D., C. Blatt, and L. Hood (1986), "One heavy chain variable region gene segment subfamily in the BALB/c mouse contains 500-1000 or more members", *Cell* 47 (3):461-470.

- Loder, F., B. Mutschler, R. J. Ray, C. J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M. C. Lamers, and R. Carsetti (1999), "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals", *J Exp Med* 190 (1):75-89.
- Logette, E., A. Wotawa, S. Solier, L. Desoche, E. Solary, and L. Corcos (2003), "The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression", *Oncogene* 22 (6):935-946.
- Lopes-Carvalho, T., and J. F. Kearney (2004), "Development and selection of marginal zone B cells", *Immunol Rev* 197:192-205.
- Lorenz, W., K. F. Schable, R. Thiebe, J. Stavnezer, and H. G. Zachau (1988), "The J kappa proximal region of the human K locus contains three uncommon V kappa genes which are arranged in opposite transcriptional polarities", *Mol Immunol* 25 (5):479-484.
- Lutz, J., M. R. Heideman, E. Roth, P. van den Berk, W. Muller, C. Raman, M. Wabl, H. Jacobs, and H. M. Jack (2011), "Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production", *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (26):10644-10649.
- Lykke-Andersen, J., M. D. Shu, and J. A. Steitz (2000), "Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon", *Cell* 103 (7):1121-1131.
- Mainville, C. A., K. M. Sheehan, L. D. Klamann, C. A. Giorgetti, J. L. Press, and P. H. Brodeur (1996), "Deletional mapping of fifteen mouse VH gene families reveals a common organization for three Igh haplotypes", *J Immunol* 156 (3):1038-1046.
- Makarov, E. M., O. V. Makarova, H. Urlaub, M. Gentzel, C. L. Will, M. Wilm, and R. Luhrmann (2002), "Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome", *Science* 298 (5601):2205-2208.
- Maki, R., W. Roeder, A. Traunecker, C. Sidman, M. Wabl, W. Raschke, and S. Tonegawa (1981), "The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes", *Cell* 24 (2):353-365.
- Manjarrez-Orduno, N., T. D. Quach, and I. Sanz (2009), "B cells and immunological tolerance", *J Invest Dermatol* 129 (2):278-288.
- Maquat, L. E. (1995), "When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells", *Rna* 1 (5):453-465.
- — — (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 (14):1743-1753.
- Marshall, N. F., J. Peng, Z. Xie, and D. H. Price (1996), "Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase", *J Biol Chem* 271 (43):27176-27183.
- Marshall, N. F., and D. H. Price (1992), "Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes", *Mol Cell Biol* 12 (5):2078-2090.
- Martensson, I. L., A. Rolink, F. Melchers, C. Mundt, S. Licence, and T. Shimizu (2002), "The pre-B cell receptor and its role in proliferation and Ig heavy chain allelic exclusion", *Semin Immunol* 14 (5):335-342.

- Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, L. Shkreta, J. F. Fiset, T. Revil, and B. Chabot (2007), "hnRNP proteins and splicing control", *Adv Exp Med Biol* 623:123-147.
- Mattick, J. S. (2005), "The functional genomics of noncoding RNA", *Science* 309 (5740):1527-1528.
- Maul, R. W., and P. J. Gearhart (2010), "AID and somatic hypermutation", *Adv Immunol* 105:159-191.
- Maul, R. W., H. Saribasak, S. A. Martomo, R. L. McClure, W. Yang, A. Vaisman, H. S. Gramlich, D. G. Schatz, R. Woodgate, D. M. Wilson, 3rd, and P. J. Gearhart (2010), "Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions", *Nat Immunol* 12 (1):70-76.
- Mebius, R. E., and G. Kraal (2005), "Structure and function of the spleen", *Nat Rev Immunol* 5 (8):606-616.
- Medghalchi, S. M., P. A. Frischmeyer, J. T. Mendell, A. G. Kelly, A. M. Lawler, and H. C. Dietz (2001), "Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability", *Hum Mol Genet* 10 (2):99-105.
- Meek, K. D., C. A. Hasemann, and J. D. Capra (1989), "Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. Inversions and fusions add to IgH somatic diversity", *J Exp Med* 170 (1):39-57.
- Meffre, E., R. Casellas, and M. C. Nussenzweig (2000), "Antibody regulation of B cell development", *Nat Immunol* 1 (5):379-385.
- Melchers, F., H. Karasuyama, D. Haasner, S. Bauer, A. Kudo, N. Sakaguchi, B. Jameson, and A. Rolink (1993), "The surrogate light chain in B-cell development", *Immunol Today* 14 (2):60-68.
- Mendell, J. T., C. M. ap Rhys, and H. C. Dietz (2002), "Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts", *Science* 298 (5592):419-422.
- Mendell, J. T., S. M. Medghalchi, R. G. Lake, E. N. Noensie, and H. C. Dietz (2000), "Novel Upf2p orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes", *Mol Cell Biol* 20 (23):8944-8957.
- Mendell, J. T., N. A. Sharifi, J. L. Meyers, F. Martinez-Murillo, and H. C. Dietz (2004), "Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutates genomic noise", *Nat Genet* 36 (10):1073-1078.
- Merrell, K. T., R. J. Benschop, S. B. Gauld, K. Aviszus, D. Decote-Ricardo, L. J. Wysocki, and J. C. Cambier (2006), "Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire", *Immunity* 25 (6):953-962.
- Merrick, W. C. (2004), "Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems", *Gene* 332:1-11.
- Miller, J., E. Selsing, and U. Storb (1982), "Structural alterations in J regions of mouse immunoglobulin lambda genes are associated with differential gene expression", *Nature* 295 (5848):428-430.
- Millhouse, S., and J. L. Manley (2005), "The C-terminal domain of RNA polymerase II functions as a phosphorylation-dependent splicing activator in a heterologous protein", *Mol Cell Biol* 25 (2):533-544.
- Min, I. M., and E. Selsing (2005), "Antibody class switch recombination: roles for switch sequences and mismatch repair proteins", *Adv Immunol* 87:297-328.

- Minegishi, Y., L. M. Hendershot, and M. E. Conley (1999), "Novel mechanisms control the folding and assembly of lambda5/14.1 and VpreB to produce an intact surrogate light chain", *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (6):3041-3046.
- Mitchell, P., E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann, and D. Tollervey (1997), "The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases", *Cell* 91 (4):457-466.
- Modrek, B., and C. Lee (2002), "A genomic view of alternative splicing", *Nat Genet* 30 (1):13-19.
- Modrek, B., A. Resch, C. Grasso, and C. Lee (2001), "Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes", *Nucleic Acids Res* 29 (13):2850-2859.
- Mojzsis, S. J. (2003), "Global change: probing early atmospheres", *Nature* 425 (6955):249-250.
- Monson, N. L. (2008), "The natural history of B cells", *Curr Opin Neurol* 21 Suppl 1:S3-8.
- Moore, M. J., and N. J. Proudfoot (2009), "Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation", *Cell* 136 (4):688-700.
- Mostoslavsky, R., F. W. Alt, and K. Rajewsky (2004), "The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism", *Cell* 118 (5):539-544.
- Mostoslavsky, R., N. Singh, A. Kirillov, R. Pelanda, H. Cedar, A. Chess, and Y. Bergman (1998), "Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion", *Genes Dev* 12 (12):1801-1811.
- Mostoslavsky, R., N. Singh, T. Tenzen, M. Goldmit, C. Gabay, S. Elizur, P. Qi, B. E. Reubinoff, A. Chess, H. Cedar, and Y. Bergman (2001), "Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system", *Nature* 414 (6860):221-225.
- Muhlemann, O., C. S. Mock-Casagrande, J. Wang, S. Li, N. Custodio, M. Carmo-Fonseca, M. F. Wilkinson, and M. J. Moore (2001), "Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription", *Mol Cell* 8 (1):33-43.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo (2000), "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme", *Cell* 102 (5):553-563.
- Muramatsu, M., V. S. Sankaranand, S. Anant, M. Sugai, K. Kinoshita, N. O. Davidson, and T. Honjo (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 (26):18470-18476.
- Nagy, E., and L. E. Maquat (1998), "A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance", *Trends Biochem Sci* 23 (6):198-199.
- Nambu, Y., M. Sugai, H. Gonda, C. G. Lee, T. Katakai, Y. Agata, Y. Yokota, and A. Shimizu (2003), "Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin", *Science* 302 (5653):2137-2140.
- Nathanson, L., T. Xia, and M. P. Deutscher (2003), "Nuclear protein synthesis: a re-evaluation", *Rna* 9 (1):9-13.

- 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.
- Nilsen, T. W. (2003), "The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?" *Bioessays* 25 (12):1147-1149.
- Nishi, M., T. Kataoka, and T. Honjo (1985), "Preferential rearrangement of the immunoglobulin kappa chain joining region J kappa 1 and J kappa 2 segments in mouse spleen DNA", *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (19):6399-6403.
- Nissim-Rafinia, M., and B. Kerem (2002), "Splicing regulation as a potential genetic modifier", *Trends Genet* 18 (3):123-127.
- Novobrantseva, T. I., V. M. Martin, R. Pelanda, W. Muller, K. Rajewsky, and A. Ehlich (1999), "Rearrangement and expression of immunoglobulin light chain genes can precede heavy chain expression during normal B cell development in mice", *J Exp Med* 189 (1):75-88.
- Nussenzweig, M. C., A. C. Shaw, E. Sinn, D. B. Danner, K. L. Holmes, H. C. Morse, 3rd, and P. Leder (1987), "Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu", *Science* 236 (4803):816-819.
- Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore (1990), "RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination", *Science* 248 (4962):1517-1523.
- Ohnishi, T., A. Yamashita, I. Kashima, T. Schell, K. R. Anders, A. Grimson, T. Hachiya, M. W. Hentze, P. Anderson, and S. Ohno (2003), "Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7", *Mol Cell* 12 (5):1187-1200.
- Oliver, A. M., F. Martin, and J. F. Kearney (1999), "IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells", *J Immunol* 162 (12):7198-7207.
- Orgel, L. E., and F. H. Crick (1993), "Anticipating an RNA world. Some past speculations on the origin of life: where are they today?" *Faseb J* 7 (1):238-239.
- Orphanides, G., T. Lagrange, and D. Reinberg (1996), "The general transcription factors of RNA polymerase II", *Genes Dev* 10 (21):2657-2683.
- Orphanides, G., G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse, and D. Reinberg (1998), "FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes", *Cell* 92 (1):105-116.
- Osmond, D. G., A. Rolink, and F. Melchers (1998), "Murine B lymphopoiesis: towards a unified model", *Immunol Today* 19 (2):65-68.
- Palacios, I. M., D. Gatfield, D. St Johnston, and E. Izaurralde (2004), "An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay", *Nature* 427 (6976):753-757.
- Parker, R., and U. Sheth (2007), "P bodies and the control of mRNA translation and degradation", *Mol Cell* 25 (5):635-646.

- Pelanda, R., S. Schwers, E. Sonoda, R. M. Torres, D. Nemazee, and K. Rajewsky (1997), "Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification", *Immunity* 7 (6):765-775.
- Peled, J. U., F. L. Kuang, M. D. Iglesias-Ussel, S. Roa, S. L. Kalis, M. F. Goodman, and M. D. Scharff (2008), "The biochemistry of somatic hypermutation", *Annu Rev Immunol* 26:481-511.
- Pennell, C. A., T. J. Mercolino, T. A. Grdina, L. W. Arnold, G. Haughton, and S. H. Clarke (1989), "Biased immunoglobulin variable region gene expression by Ly-1 B cells due to clonal selection", *Eur J Immunol* 19 (7):1289-1295.
- Pennell, C. A., and D. W. Scott (1986), "Lymphoma models for B cell activation and tolerance. IV. Growth inhibition by anti-Ig of CH31 and CH33 B lymphoma cells", *Eur J Immunol* 16 (12):1577-1581.
- Perlick, H. A., S. M. Medghalchi, F. A. Spencer, R. J. Kendzior, Jr., and H. C. Dietz (1996), "Mammalian orthologues of a yeast regulator of nonsense transcript stability", *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20):10928-10932.
- Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Peron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogne "The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind", *Adv Immunol* 110:27-70.
- Proudfoot, N. (2000), "Connecting transcription to messenger RNA processing", *Trends Biochem Sci* 25 (6):290-293.
- Rada, C., G. T. Williams, H. Nilsen, D. E. Barnes, T. Lindahl, and M. S. Neuberger (2002), "Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice", *Curr Biol* 12 (20):1748-1755.
- Rebbapragada, I., and J. Lykke-Andersen (2009), "Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate?" *Curr Opin Cell Biol* 21 (3):394-402.
- Reed, R. (2003), "Coupling transcription, splicing and mRNA export", *Curr Opin Cell Biol* 15 (3):326-331.
- Reines, D. (1992), "Elongation factor-dependent transcript shortening by template-engaged RNA polymerase II", *J Biol Chem* 267 (6):3795-3800.
- Reines, D., P. Ghanouni, Q. Q. Li, and J. Mote, Jr. (1992), "The RNA polymerase II elongation complex. Factor-dependent transcription elongation involves nascent RNA cleavage", *J Biol Chem* 267 (22):15516-15522.
- Revy, P., T. Muto, Y. Levy, F. Geissmann, A. Plebani, O. Sanal, N. Catalan, M. Forveille, R. Dufourcq-Labelouse, A. Gennery, I. Tezcan, F. Ersoy, H. Kayserili, A. G. Ugazio, N. Brousse, M. Muramatsu, L. D. Notarangelo, K. Kinoshita, T. Honjo, A. Fischer, and A. Durandy (2000), "Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)", *Cell* 102 (5):565-575.
- Reynaud, S., L. Delpy, L. Fleury, H. L. Dougier, C. Sirac, and M. Cogne (2005), "Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells", *J Immunol* 174 (10):6176-6183.
- Roberts, G. C., C. Gooding, H. Y. Mak, N. J. Proudfoot, and C. W. Smith (1998), "Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection", *Nucleic Acids Res* 26 (24):5568-5572.

- Rogers, J., P. Early, C. Carter, K. Calame, M. Bond, L. Hood, and R. Wall (1980), "Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain", *Cell* 20 (2):303-312.
- Rogers, J., and R. Wall (1981), "Immunoglobulin heavy chain genes: demethylation accompanies class switching", *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (12):7497-7501.
- Rolink, A. G. (2004), "B-cell development and pre-B-1 cell plasticity in vitro", *Methods Mol Biol* 271:271-281.
- Rooney, S., J. Sekiguchi, S. Whitlow, M. Eckersdorff, J. P. Manis, C. Lee, D. O. Ferguson, and F. W. Alt (2004), "Artemis and p53 cooperate to suppress oncogenic N-myc amplification in progenitor B cells", *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (8):2410-2415.
- Rudd, M. D., M. G. Izban, and D. S. Luse (1994), "The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes", *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (17):8057-8061.
- Samitas, K., J. Lotvall, and A. Bossios (2010), "B cells: from early development to regulating allergic diseases", *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58 (3):209-225.
- Sanchez, P., and P. A. Cazenave (1987), "A new variable region in mouse immunoglobulin lambda light chains", *J Exp Med* 166 (1):265-270.
- Schatz, D. G. (2004), "V(D)J recombination", *Immunol Rev* 200:5-11.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and D. Baltimore (1989), "The V(D)J recombination activating gene, RAG-1", *Cell* 59 (6):1035-1048.
- Schofield, J. D., and B. Weightman (1978), "New knowledge of connective tissue ageing", *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 12:174-190.
- Schrader, C. E., W. Edelmann, R. Kucherlapati, and J. Stavnezer (1999), "Reduced isotype switching in splenic B cells from mice deficient in mismatch repair enzymes", *J Exp Med* 190 (3):323-330.
- Schrader, C. E., J. E. Guikema, E. K. Linehan, E. Selsing, and J. Stavnezer (2007), "Activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA breaks in class switch recombination occur during G1 phase of the cell cycle and depend upon mismatch repair", *J Immunol* 179 (9):6064-6071.
- Schroeder, H. W., Jr., and L. Cavacini "Structure and function of immunoglobulins", *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2):S41-52.
- Sekiguchi, J. M., and D. O. Ferguson (2006), "DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey", *Cell* 124 (2):260-262.
- Serin, G., A. Gersappe, J. D. Black, R. Aronoff, and L. E. Maquat (2001), "Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4)", *Mol Cell Biol* 21 (1):209-223.
- Shapiro-Shelef, M., and K. Calame (2005), "Regulation of plasma-cell development", *Nat Rev Immunol* 5 (3):230-242.

- Shatkin, A. J., and J. L. Manley (2000), "The ends of the affair: capping and polyadenylation", *Nat Struct Biol* 7 (10):838-842.
- Shaw, A. C., W. Swat, L. Davidson, and F. W. Alt (1999), "Induction of Ig light chain gene rearrangement in heavy chain-deficient B cells by activated Ras", *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (5):2239-2243.
- Sheth, U., and R. Parker (2006), "Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies", *Cell* 125 (6):1095-1109.
- Shibuya, T., T. O. Tange, N. Sonenberg, and M. J. Moore (2004), "eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay", *Nat Struct Mol Biol* 11 (4):346-351.
- Shilatifard, A., R. C. Conaway, and J. W. Conaway (2003), "The RNA polymerase II elongation complex", *Annu Rev Biochem* 72:693-715.
- Silva, A. L., and L. Romao (2009), "The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision?" *FEBS Lett* 583 (3):499-505.
- Simon, E., S. Camier, and B. Seraphin (2006), "New insights into the control of mRNA decapping", *Trends Biochem Sci* 31 (5):241-243.
- Sims, R. J., 3rd, S. S. Mandal, and D. Reinberg (2004), "Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription", *Curr Opin Cell Biol* 16 (3):263-271.
- Singh, G., S. Jakob, M. G. Kleedehn, and J. Lykke-Andersen (2007), "Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm", *Mol Cell* 27 (5):780-792.
- Skok, J. A., K. E. Brown, V. Azuara, M. L. Caparros, J. Baxter, K. Takacs, N. Dillon, D. Gray, R. P. Perry, M. Merckenschlager, and A. G. Fisher (2001), "Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes", *Nat Immunol* 2 (9):848-854.
- Sonoda, E., Y. Pewzner-Jung, S. Schwerts, S. Taki, S. Jung, D. Eilat, and K. Rajewsky (1997), "B cell development under the condition of allelic inclusion", *Immunity* 6 (3):225-233.
- Stalder, L., and O. Muhlemann (2007), "Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin micro genes requires translation of its mRNA", *J Biol Chem* 282 (22):16079-16085.
- (2009), "Processing bodies are not required for mammalian nonsense-mediated mRNA decay", *Rna* 15 (7):1265-1273.
- Stall, A. M., S. Adams, L. A. Herzenberg, and A. B. Kantor (1992), "Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population", *Ann N Y Acad Sci* 651:33-43.
- Stavnezer, J., J. E. Guikema, and C. E. Schrader (2008), "Mechanism and regulation of class switch recombination", *Annu Rev Immunol* 26:261-292.
- Storb, U., D. Haasch, B. Arp, P. Sanchez, P. A. Cazenave, and J. Miller (1989), "Physical linkage of mouse lambda genes by pulsed-field gel electrophoresis suggests that the rearrangement process favors proximate target sequences", *Mol Cell Biol* 9 (2):711-718.

- Strohal, R., A. Helmberg, G. Kroemer, and R. Kofler (1989), "Mouse Vk gene classification by nucleic acid sequence similarity", *Immunogenetics* 30 (6):475-493.
- Struhl, K. (1987), "Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast", *Cell* 49 (3):295-297.
- Sun, X., H. A. Perlick, H. C. Dietz, and L. E. Maquat (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 (17):10009-10014.
- Tange, T. O., T. Shibuya, M. S. Jurica, and M. J. Moore (2005), "Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core", *Rna* 11 (12):1869-1883.
- Tangye, S. G., and D. M. Tarlinton (2009), "Memory B cells: effectors of long-lived immune responses", *Eur J Immunol* 39 (8):2065-2075.
- Tazi, J., S. Durand, and P. Jeanteur (2005), "The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy", *Trends Biochem Sci* 30 (8):469-478.
- ten Boekel, E., F. Melchers, and A. Rolink (1995), "The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development", *Int Immunol* 7 (6):1013-1019.
- ten Boekel, E., F. Melchers, and A. G. Rolink (1998), "Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression", *Immunity* 8 (2):199-207.
- Teng, G., and F. N. Papavasiliou (2007), "Immunoglobulin somatic hypermutation", *Annu Rev Genet* 41:107-120.
- Thiebe, R., K. F. Schable, A. Bensch, J. Brensing-Kuppers, V. Heim, T. Kirschbaum, H. Mitlohner, M. Ohnrich, S. Pourrajabi, F. Roschenthaler, J. Schwendinger, D. Wichelhaus, I. Zocher, and H. G. Zachau (1999), "The variable genes and gene families of the mouse immunoglobulin kappa locus", *Eur J Immunol* 29 (7):2072-2081.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell, and D. Nemazee (1993), "Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells", *J Exp Med* 177 (4):1009-1020.
- Tinguely, A., G. Chemin, S. Peron, C. Sirac, S. Reynaud, M. Cogne, and L. Delpy (2011), "Crosstalk between IgH transcription and RNA surveillance during B cell development", *Mol Cell Biol*.
- Tonegawa, S. (1993), "The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1987. Somatic generation of immune diversity", *Scand J Immunol* 38 (4):303-319.
- Tucker, M., R. R. Staples, M. A. Valencia-Sanchez, D. Muhlrud, and R. Parker (2002), "Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*", *Embo J* 21 (6):1427-1436.
- Unterholzner, L., and E. Izaurralde (2004), "SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay", *Mol Cell* 16 (4):587-596.
- Urlaub, G., P. J. Mitchell, C. J. Ciudad, and L. A. Chasin (1989), "Nonsense mutations in the dihydrofolate reductase gene affect RNA processing", *Mol Cell Biol* 9 (7):2868-2880.

- van Dijk, E., H. Le Hir, and B. Seraphin (2003), "DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway", *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (21):12081-12086.
- Vettermann, C., and M. S. Schlissel "Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms", *Immunol Rev* 237 (1):22-42.
- Wabl, M. R., and M. Tenkhoff (1982), "Allelic exclusion of immunoglobulin expression is not caused by somatic segregation", *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (2):606-607.
- Wada, T., T. Takagi, Y. Yamaguchi, D. Watanabe, and H. Handa (1998), "Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro", *Embo J* 17 (24):7395-7403.
- Wang, D., and D. K. Hawley (1993), "Identification of a 3'→5' exonuclease activity associated with human RNA polymerase II", *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (3):843-847.
- Wang, H., and S. H. Clarke (2007), "Association of the pre-B cell receptor (BCR) expression level with the quality of pre-BII cell differentiation reveals hierarchical pre-BCR function", *Mol Immunol* 44 (7):1765-1774.
- Wang, J., Y. F. Chang, J. I. Hamilton, and M. F. Wilkinson (2002)a, "Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay", *Mol Cell* 10 (4):951-957.
- Wang, J., J. I. Hamilton, M. S. Carter, S. Li, and M. F. Wilkinson (2002)b, "Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame", *Science* 297 (5578):108-110.
- Weill, J. C., S. Weller, and C. A. Reynaud (2009), "Human marginal zone B cells", *Annu Rev Immunol* 27:267-285.
- Weischenfeldt, J., I. Damgaard, D. Bryder, K. Theilgaard-Monch, L. A. Thoren, F. C. Nielsen, S. E. Jacobsen, C. Nerlov, and B. T. Porse (2008), "NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements", *Genes Dev* 22 (10):1381-1396.
- Werner, M., P. Thuriaux, and J. Soutourina (2009), "Structure-function analysis of RNA polymerases I and III", *Curr Opin Struct Biol* 19 (6):740-745.
- White, R. J. "Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought", *Nat Rev Genet* 12 (7):459-463.
- Wilkinson, M. F., and A. B. Shyu (2002), "RNA surveillance by nuclear scanning?" *Nat Cell Biol* 4 (6):E144-147.
- Wilusz, J. E., H. Sunwoo, and D. L. Spector (2009), "Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world", *Genes Dev* 23 (13):1494-1504.
- Wittmann, J., E. M. Hol, and H. M. Jack (2006), "hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay", *Mol Cell Biol* 26 (4):1272-1287.

Xue, K., C. Rada, and M. S. Neuberger (2006), "The in vivo pattern of AID targeting to immunoglobulin switch regions deduced from mutation spectra in *msh2*<sup>-/-</sup> *ung*<sup>-/-</sup> mice", *J Exp Med* 203 (9):2085-2094.

Yamashita, A., N. Izumi, I. Kashima, T. Ohnishi, B. Saari, Y. Katsuhata, R. Muramatsu, T. Morita, A. Iwamatsu, T. Hachiya, R. Kurata, H. Hirano, P. Anderson, and S. Ohno (2009), "SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay", *Genes Dev* 23 (9):1091-1105.

Yamashita, A., I. Kashima, and S. Ohno (2005), "The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay", *Biochim Biophys Acta* 1754 (1-2):305-315.

Yamashita, A., T. Ohnishi, I. Kashima, Y. Taya, and S. Ohno (2001), "Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay", *Genes Dev* 15 (17):2215-2228.

Zandvoort, A., and W. Timens (2002), "The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens", *Clin Exp Immunol* 130 (1):4-11.

Zhang, J., X. Sun, Y. Qian, J. P. LaDuca, and L. E. Maquat (1998), "At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation", *Mol Cell Biol* 18 (9):5272-5283.

# Annexes

***In vivo* plasma cell differentiation depends on reduction of B cell receptor signal strength**

Fabien Lechouane<sup>a</sup>, Amélie Bonaud<sup>a</sup>, Laurent Delpy<sup>a</sup>, Zeliha Oruc<sup>a</sup>, **Guillaume Chemin**<sup>a</sup>, Stefano Casola<sup>b</sup>, Michel Cogné<sup>a</sup> and Christophe Sirac<sup>a\*</sup>.

*Article soumis à PNAS*

*Les résultats obtenus dans cette article font l'objet des travaux de thèse de Fabien Lechouane, ma participation dans cette étude a été une participation aux manipulations et un partage de techniques, animaux et matériels communs aux études sur souris issues des modèles LMP2A.*

