

FICHE SUJET DE THESE

Sujet N° (à remplir par l'ED) :	FINANCEMENT : <input checked="" type="checkbox"/> Demandé <input type="checkbox"/> Acquis	Origine du financement : INSERM/ARED
Titre de la thèse : Traitement des ARNs médié par l'ARN exosome et physiopathologie de la différenciation plasmocytaire		3 mots-clés : ARN exosome, différenciation plasmocytaire, myélome multiple
Unité/équipe encadrante : UMR 1236, équipe Bigres		
Directrice ou Directeur de thèse : Michel Cogné / co-encadrement Brice Laffleur		N° de tél : 0784638988 Mail : michel.cogne@inserm.fr brice.laffleur@inserm.fr

Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes) :

Un nouveau champ de la biologie a récemment été ouvert par la découverte de fonctions régulatrices essentielles pour des molécules longtemps ignorées, les ARN non codants. Ceux-ci agissent notamment dans le maintien de l'intégrité de la structure du génome et la régulation de son expression, et leur catabolisme est donc lui aussi d'importance majeure. L'ARN exosome est un complexe protéique impliqué dans le traitement et la dégradation de différentes classes d'ARNs. Les lymphocytes B sont les acteurs de l'immunité adaptative humorale, avec une différenciation terminale en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (anticorps). Au cours de la maturation lymphocytaire B de nombreux ARNs non-codants sont produits et leur régulation par l'ARN exosome est cruciale. Il a été démontré qu'en l'absence de ce complexe les cellules B avaient un défaut de production d'anticorps, avec des altérations d'affinité pour l'antigène (lors de l'hypermutation somatique ou SHM), et une diminution drastique des recombinaisons de « switch » (recombinaison de classe ou CSR) visant à diversifier les classes d'anticorps pour une réponse immunitaire optimale (Laffleur et al., Nature Genetics, 2021).

Au-delà de ces mécanismes, la capacité de l'ARN exosome à gouverner la différenciation terminale des cellules B en plasmablastes (PBs) et en plasmocytes (PCs) n'a pas été explorée. Les PCs ont un programme de transcription unique, avec une production d'ARN environ 6 fois supérieure à celle des cellules B, ce qui nécessite probablement un traitement et une surveillance rigoureux des ARNs. De plus la sous-unité DIS3 de l'ARN exosome est fréquemment mutée dans le myélome multiple, un cancer agressif et mortel des PCs, mais la contribution de ces mutations à l'initiation et/ou la progression de la pathologie et la résistance aux traitements reste méconnue.

Cette thèse a donc pour but d'explorer les voies de surveillance des ARNs au cours de l'activation des cellules B humaines et de la différenciation plasmocytaire, et dans leur contrepartie pathologique, le myélome multiple.

Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes) :

La contribution de l'ARN exosome à la physiologie humaine est mal établie, alors que des pathologies sont causées par des mutations affectant ses sous-unités (Laffleur et al, Trends in Cell Biology, 2019). La sous-unité catalytique DIS3 est fréquemment mutée dans les hémopathies malignes, et une corrélation a été établie entre les mutations de DIS3 et les translocations des gènes d'immunoglobulines dans le myélome multiple (MM). Le MM est une tumeur maligne très agressive des PCs, de mauvais pronostic, et le deuxième cancer hématologique le plus fréquent. Les cellules myélomateuses sont très hétérogènes au niveau génétique et présentent des aberrations génomiques notables. La contribution des mutations perte de fonction de DIS3 à la pathologie reste inconnue.

Nous émettons l'hypothèse que la surveillance des ARNs est un gardien de la stabilité génomique, et que les mutations du gène DIS3 participent alors à l'initiation et/ou à la progression du MM.

Le rôle de DIS3 dans la différenciation physiologique des PCs et son implication dans le MM seront donc étudiés.

Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes) :

Axe 1. RNA exosome et différenciation plasmocytaire.

L'impact de DIS3 sur la différenciation physiologique des PCs sera étudié grâce à l'édition CRISPR/Cas9 du génome et un système de différenciation in vitro des PCs à partir de cellules B humaines. Le rôle de DIS3 sur la différenciation sera évalué par cytométrie en flux et sur le programme transcriptionnel des cellules B/PB/PC par qPCR et RNA-seq. Cela révélera les transcriptomes codants et non codants de ces populations et identifiera potentiellement les co-facteurs impliqués dans le traitement/dégradation des ARNs pendant la différenciation des PCs, et les mécanismes épitranscriptomiques impliqués. L'accumulation d'ARNs associés à la chromatine pourrait modifier l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription se liant à l'ADN, cette hypothèse sera testée par ChIP (immunoprécipitation de la chromatine).

Axe 2. Surveillance des ARNs et instabilité génomique dans le myélome multiple

Afin d'explorer les mécanismes régulant la stabilité du génome suite à la perte de fonction de DIS3 nous étudierons des cellules primaires en cours de différenciation, des lignées de lymphomes et de MM où DIS3 est inactivé. L'impact de DIS3 sur l'accumulation des ARNs non-codants et des R-loops sera évalué par RT-qPCR, RNA-seq, et DRIP (immunoprécipitation des R-loops). Les agents mutagènes ou AID pourraient accéder à cet ADN et induire des mutations, ce qui sera évalué par séquençage. L'interaction entre les accumulations d'ARNs non-codants et les modifications de la chromatine liées à l'instabilité génomique sera testée directement par ChIP. La prédisposition des cellules de MM mutantes DIS3 à subir des translocations sera évaluée par LAM-HTGTS. Nous nous attendons à davantage de translocations dans le cas d'une déficience en DIS3, un biais dans la réparation de l'ADN, et la présence d'insertions/délétions sera quantifiée. L'organisation du génome sera étudiée par 3C-HTGTS, ce qui permet d'obtenir une haute résolution. Enfin, l'agressivité du cancer dans les mutants DIS3 peut être évaluée directement in

vivo en greffant des lignées cellulaires de myélome à des souris immunodéficientes.

Compétences scientifiques et techniques requises par le-la candidat-e (2 lignes) :

- Connaissances solides en immunologie et cancérologie
- Compétence en biologie moléculaire, séquençage haut-débit et biologie cellulaire

3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années) :

Laffleur B, Lim J, Zhang W, Chen Y, Pefanis E, Bizarro J, Batista CR, Wu L, Economides AN, Wang J, Basu U. "Noncoding RNA processing by DIS3 regulates chromosomal architecture and somatic hypermutation in B cells." 2021, **Nature Genetics**

Nair L*, Zhang W*, **Laffleur B***, Jha MK*, Lim J, Lee H, Wu L, Alvarez NS, Liu ZP, Munteanu EL, Swayne T, Hanna JH, Ding L, Rothschild G, Basu U., "Mechanism of noncoding RNA-associated N6-methyladenosine recognition by an RNA processing complex during IgH DNA recombination." 2021, **Molecular Cell**

Lim J, Giri PK, Kazadi D, **Laffleur B**, Zhang W, Grinstein V, Pefanis E, Brown LM, Ladewig E, Martin O, Chen Y, Rabadan R, Boyer F, Rothschild G, Cogné M, Pinaud E, Deng H, Basu U. 2017, **Cell**

Collaborations nationales et internationales :

Nationales : Jérôme Moreaux (IGH, Montpellier), Laurent Delpy et Sandrine Le Noir (Université de Limoges), Charles Dumontet (CRCL, Lyon), Hervé Avet-Loiseau (IUCT-Oncopole, Toulouse), Bertrand Séraphin (IGBMC, Strasbourg), Amin Khamlichi (IPBS, Toulouse)

Internationales : Uttiya Basu (Columbia University, New York), Junghyun Lim (Jeonbuk National University, Korea)