

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
<p><u>Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes) :</u></p> <p>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).</p> <p>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.</p> <p>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.</p>		
<p><u>Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes) :</u></p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>Le rôle de DIS3 dans la différenciation physiologique des PCs et son implication dans le MM seront donc étudiés.</p>		
<p><u>Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes) :</u></p> <p>Axe 1. RNA exosome et différenciation plasmocytaire.</p> <p>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).</p> <p>Axe 2. Surveillance des ARNs et instabilité génomique dans le myélome multiple</p> <p>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</p>		

vivo en greffant des lignées cellulaires de myélome à des souris immunodéficientes.
<u>Compétences scientifiques et techniques requises par le/la candidat-e (2 lignes) :</u> - Connaissances solides en immunologie et cancérologie - Compétence en biologie moléculaire, séquençage haut-débit et biologie cellulaire
<u>3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années) :</u> 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
<u>Collaborations nationales et internationales :</u> 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)

MOBIDIC
UMR U1236 UR1 - INSERM - EFS Bretagne
Head : Pr Karin TARTE
Faculté de Médecine
2 Av. Pr Léon Bernard
CS 34317 - 35043 RENNES CEDEX
Phone : +33 223 234 955
U1236-mobidic@univ-rennes1.fr

THESIS TOPIC

Subject N° (to be completed by the ED):	FUNDING: <input checked="" type="checkbox"/> Requested <input type="checkbox"/> Acquired	Funding origin: INSERM/ARED
Thesis title: RNA exosome-mediated processing and pathophysiology of plasma cell differentiation		3 keywords: RNA exosome, Plasma cell differentiation, multiple myeloma
Unit / team: : UMR 1236, équipe Bigres		
Supervisor's name: Michel Cogné / co-directed by Brice Laffleur		Phone number: 0784638988 Email address: michel.cogne@inserm.fr brice.laffleur@inserm.fr
<p>Socio-economic and scientific context (approximately 10 lines):</p> <p>A new field of biology has recently been opened by the discovery of essential regulatory functions for long-ignored molecules, the non-coding RNAs. These act in particular in the maintenance of the integrity of the genome structure and the regulation of its expression, and their catabolism is therefore also of major importance. The RNA exosome is a protein complex involved in the processing and degradation of different RNA classes. B lymphocytes are the actors of humoral adaptive immunity, with a terminal differentiation into immunoglobulin (antibody) secreting plasma cells. During B cell maturation, many non-coding RNAs are produced and their regulation by the RNA exosome is crucial. It has been shown that in the absence of this complex B cells have a defect in antibody production, with alterations in antigen affinity (during somatic hypermutation or SHM), and a drastic decrease in "switch" recombination (class recombination or CSR) aimed at diversifying antibody classes for an optimal immune response (Laffleur et al., Nature Genetics, 2021).</p> <p>Beyond these mechanisms, the ability of the RNA exosome to govern the terminal differentiation of B cells into plasmablasts (PBs) and plasma cells (PCs) has not been explored. PCs have a unique transcriptional program, with approximately 6-fold higher RNA production than B cells, which likely requires careful RNA processing and monitoring. Moreover, the DIS3 subunit of the RNA exosome is frequently mutated in multiple myeloma, an aggressive and lethal cancer of PCs, but the contribution of these mutations to the initiation and/or progression of the pathology and resistance to treatment remains unknown.</p> <p>The aim of this thesis is therefore to explore the pathways of sRNA surveillance during human B cell activation and plasma cell differentiation, and in their pathological counterpart, multiple myeloma.</p>		
<p>Working hypothesis and aims (approximately 8 lines):</p> <p>The contribution of the RNA exosome to human physiology is poorly established, while pathologies are caused by mutations affecting its subunits (Laffleur et al, Trends in Cell Biology, 2019). The DIS3 catalytic subunit is frequently mutated in hematologic malignancies, and a correlation has been established between DIS3 mutations and immunoglobulin gene translocations in multiple myeloma (MM). MM is a highly aggressive malignancy of PCs with a poor prognosis and the second most common hematological cancer. Myeloma cells are highly heterogeneous at the genetic level and show significant genomic aberrations. The contribution of DIS3 loss-of-function mutations to the disease remains unknown.</p> <p>We hypothesize that RNA surveillance is a gatekeeper of genomic stability, and that mutations in the DIS3 gene then participate in the initiation and/or progression of MM.</p> <p>The role of DIS3 in the physiological differentiation of PCs and its involvement in MM will therefore be investigated.</p>		
<p>Main milestones of the thesis (approximately 12 lines):</p> <p>Axis 1. RNA exosome and plasma cell differentiation.</p> <p>The impact of DIS3 on the physiological differentiation of PCs will be studied using CRISPR/Cas9 genome editing and an in vitro differentiation system of PCs from human B cells. The role of DIS3 on differentiation will be assessed by flow cytometry and on the transcriptional program of B/PB/PC cells by qPCR and RNA-seq. This will reveal the coding and non-coding transcriptomes of these populations and potentially identify the co-factors involved in RNA processing/degradation during PC differentiation, and the epitranscriptomic mechanisms involved. The accumulation of chromatin-associated RNAs could modify the accessibility of DNA to DNA-binding transcription factors, this hypothesis will be tested by ChIP (chromatin immunoprecipitation).</p> <p>Axis 2. RNA surveillance and genomic instability in multiple myeloma</p> <p>In order to explore the mechanisms regulating genome stability following the loss of function of DIS3 we will study primary differentiating cells, lymphoma and MM lines where DIS3 is inactivated. The impact of DIS3 on the accumulation of non-coding RNAs and R-loops will be assessed by RT-qPCR, RNA-seq, and DRIP (R-loop immunoprecipitation). Mutagenic agents or AID could access this DNA and induce mutations, which will be evaluated by sequencing. The interaction between non-coding RNA accumulations and chromatin changes related to genomic instability will be tested directly by ChIP. The susceptibility of DIS3 mutant MM cells to undergo translocations will be assessed by LAM-HTGTS. We expect more translocations in DIS3 deficiency, a bias in DNA repair, and the presence of insertions/deletions will be quantified. Genome organization will be studied by 3C-HTGTS, which allows high resolution. Finally, cancer aggressiveness in DIS3 mutants can be assessed directly in vivo by transplanting myeloma cells into immunodeficient mice.</p>		
<p>Scientific and technical skills required by the candidate (2 lines):</p>		

- Solid knowledge in immunology and cancerology
- Competence in molecular biology, high-throughput sequencing and cell biology

3 publications from the team related to the topic (last 5 years):

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**

National and international collaborations:

National: 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)

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

MOBIDIC

UMR U1236 UR1 - INSERM - EFS Bretagne

Head : Pr Karin TARTE

Faculté de Médecine

2 Av. Pr Léon Bérnard

CS 34317 - 35043 RENNES CEDEX

Phone : +33 223 234 955

U1236-mobidic@univ-rennes1.fr