

Lymphocytes B : diversité, ontogénèse, différenciation et activation.

*Frédéric Batteux, Olivier Garraud, Lionel Prin,
Yves Renaudineau, Laurent Vallat*

I-Introduction (Figure 12)	2
II-Le récepteur pour l'antigène des lymphocytes B (BCR)	2
II-1.Organisation et expression des gènes d'immunoglobulines (Figure 13)	2
II-2.Génération de la diversité des immunoglobulines (Figure 14).	3
II-3. Exclusion allélique et exclusion isotypique	5
III-Ontogénèse des lymphocytes B. (Figure 15).....	6
III-1-Différents stades du développement B	6
III-1-a.Les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP)	6
III-1-b.Le stade pré-pro B.....	6
III-1-c.Le stade pro-B	7
III-1-d.Le stade pré-B.....	7
III-1-e.Le stade B immature	7
III-2-Régulation de la différenciation lymphocytaire B	8
III-2-a.Rôle des cytokines et des récepteurs de cytokine	8
III-2-b.Rôle des facteurs de transcription	8
IV. Différenciation B dépendante de l'antigène.	8
IV-1. Différenciation post-médullaire des lymphocytes B	8
IV-2- Activation des lymphocytes B	9
IV-2-a.Stimulation par le BCR.....	9
IV-2-b.Molécules accessoires de l'activation lymphocytaire B.....	10
IV-2c. Interaction lymphocyte T / lymphocyte B lors des réponses thymo-dépendantes	10
IV-3-Modifications de structure du BCR après contact antigénique.....	11
IV-3-a.Immunoglobuline membranaire ou sécrétée	11
IV-3-b.Maturation des messagers et sécrétion des IgM	12
IV-3-c.Les hypermutations somatiques	12
IV-3-d.Commutation de classe (Figure 16)	12
IV-4.Le centre germinatif, lieu de l'hypermutation somatique et de la commutation isotypique (Figure 17).....	13
V-Sélection du répertoire des lymphocytes B	14
V-1. Mécanismes de la tolérance B centrale.....	14
V-2. Mécanismes de la tolérance B périphérique.....	15

I-Introduction (Figure 12)

Les lymphocytes B représentent environ 5 à 15% des lymphocytes circulants et sont définis par la présence d'immunoglobulines (Ig) de surface. Ces immunoglobulines, produites par la cellule elle-même, jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène (BCR). Les immunoglobulines sont des hétérodimères protéiques, composées de deux chaînes lourdes H (pour Heavy) identiques et deux chaînes légères L (pour Light) identiques. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène. Le BCR est associé à des molécules responsables de la transduction du signal après contact avec l'antigène : les chaînes $Ig\alpha$ ou CD79a et $Ig\beta$ ou CD79b. D'autres molécules sont présentes à la surface du lymphocyte B, associées aux différentes fonctions de ces cellules. Leur expression varie en fonction de l'état de différenciation des lymphocytes B.

Les lymphocytes B après activation se transforment en plasmocytes qui sécrètent des immunoglobulines (anticorps) de la même spécificité que leur BCR. Différentes chaînes lourdes déterminent des classes d'immunoglobulines ou isotypes. Il existe également des sous-classes. On décrit ainsi cinq types de chaînes lourdes : gamma, alpha, mu, delta et epsilon subdivisées en neuf sous-classes $IgG1$, $IgG2$, $IgG3$, $IgG4$, $IgA1$, $IgA2$, IgM , IgD et IgE . Les chaînes légères sont soit kappa soit lambda.

II-Le récepteur pour l'antigène des lymphocytes B (BCR)

La reconnaissance spécifique de l'antigène est la caractéristique majeure de la réponse immunitaire adaptative. La molécule impliquée dans ce processus au niveau du lymphocyte B est une immunoglobuline exprimée à sa surface.

Le BCR est caractérisé par sa **diversité**, qui résulte de recombinaisons des segments de gènes codant les chaînes lourdes et légères qui le constituent. Le nombre élevé d'antigènes susceptibles d'être rencontrés par l'organisme implique que le génome permette la synthèse d'au moins plusieurs millions de molécules différentes. Cependant, les régions constantes des différentes chaînes lourdes et légères sont invariables alors que les régions variables sont différentes d'une immunoglobuline à l'autre et spécifiques chacune d'un épitope antigénique. Plusieurs segments de gènes participent à la constitution des régions variables.

II-1.Organisation et expression des gènes d'immunoglobulines (Figure 13)

La formation des chaînes lourdes et des chaînes légères des immunoglobulines résulte de l'association de plusieurs segments de gènes qui sont organisés en loci sur des chromosomes différents.

Le locus des gènes des chaînes lourdes (IGH) est situé sur le chromosome 14. Il comprend environ 70 segments regroupés en trois familles de gènes dits de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). Neuf gènes codent les régions constantes (C) des 9 classes et sous-classes d'immunoglobulines. Dans l'ordre, sur le chromosome 14, on trouve les gènes des divers domaines constants des régions C_{μ} , C_{δ} , $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 1}$, $C_{\epsilon 2}$, $C_{\alpha 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 4}$, $C_{\epsilon 1}$, $C_{\alpha 2}$. Le gène $C_{\epsilon 2}$ est un pseudogène.

Il y a deux **loci pour les gènes des chaînes légères (IGL)**. Les gènes des chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 2. Le locus $Ig\kappa$ humain, en configuration germinale, comporte 31 à 35 segments V_{κ} fonctionnels ainsi que 5 segments J_{κ} . Les segments V_{κ} et J_{κ} codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment C_{κ} code pour la partie constante.

Les gènes des chaînes légères λ sont situés sur le chromosome 22. Le locus $Ig\lambda$ humain, en configuration germinale, comporte environ 30 segments V_{λ} ainsi que 4 segments J_{λ} . Il existe au moins 6 gènes C_{λ} différents, chacun étant précédé d'un seul gène J qui lui est propre. La recombinaison se fait au hasard entre l'un des gènes V_{λ} et un gène J_{λ} .

II-2. Génération de la diversité des immunoglobulines (Figure 14).

Deux mécanismes différents assurent la diversité du BCR, respectivement la diversité combinatoire et la diversité jonctionnelle.

La diversité combinatoire est gouvernée par le hasard du choix des segments constituant les régions variables. Les régions variables des chaînes H sont obtenues par l'association, dans un premier temps, d'un segment de jonction J_H avec un segment de diversité D_H , puis le réarrangement de cette association D- J_H avec un segment variable V_H , le tout aboutissant à la formation d'un exon VDJ. Les régions variables des chaînes L sont générées seulement par jonction de segments V_L et J_L pour former un exon VJ. Les régions d'ADN comprises entre les différents segments sont délétées lors de ces réarrangements sous forme d'un ADN circulaire ou épisode. Les segments géniques codant les régions variables des chaînes H et des chaînes L sont ensuite associés aux exons codant la région constante des chaînes correspondantes. Après épissage, les ARN messagers matures sont prêts à être traduits en protéines. Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des immunoglobulines s'effectue par épissage alternatif d'un même transcrit primaire de chaîne lourde. Le grand nombre de segments V, D et J disponibles et les multiples combinaisons possibles entre ces éléments constituent la base de la diversité combinatoire.

La première étape de la recombinaison des gènes d'immunoglobuline repose sur la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques adjacentes aux gènes V, D et J, appelées RSS (séquence signal de recombinaison). Chaque RSS est constituée d'un motif consensuel

très conservé de sept nucléotides (heptamère CACAGTG) et d'un autre de neuf nucléotides (nonamère ACAAAAACC). Ces deux motifs sont séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides. Ce type de séquences est présent en 3' des gènes V, en 5' des gènes J et flanque les gènes D. Elles sont complémentaires. Les deux heptamères et les deux nonamères s'associent, ce qui a pour effet de mettre exactement bout à bout les gènes V et J. La ligation des gènes V et J est assurée par des enzymes spécifiques qui reconnaissent ces motifs, les **recombinases**. La recombinaison ne peut s'effectuer qu'entre RSS possédant un séparateur de taille différente (règle 12/23) permettant d'éviter des réarrangements non désirés. Les recombinaisons RAG-1 et RAG-2 sont les seules enzymes lymphoïdes nécessaires à la recombinaison V(D)J. Elles permettent le clivage de la séquence RSS, l'ouverture de la structure en épingle à cheveux et la jonction des segments codants au cours de la recombinaison. L'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 est strictement contrôlée lors du développement lymphocytaire B permettant les réarrangements d'abord au niveau du locus IGH, puis au niveau des gènes de chaînes légères.

La **diversité jonctionnelle** permet d'augmenter encore la diversité créée par les mécanismes de recombinaison. Lors des processus de recombinaison V(D)J, les mécanismes de réparation de l'ADN créent une variabilité dans les zones de jonction entre les gènes associés et la position précise à laquelle les segments génétiques V(D)J se joignent peut légèrement varier. Ce phénomène induit un degré supplémentaire de diversité par délétion ou insertion de nucléotides dans les régions variables des immunoglobulines.

Au niveau des segments codants on trouve deux types d'insertion nucléotidique:

i) **les insertions «non-templated»** où jusqu'à 15 nucléotides (N) sont ajoutés au hasard par la terminal déoxynucléotidyl transférase (TdT). Le terme de «non templated» signifie qu'il n'y a pas d'appariement base à base sur un segment d'ADN. Cette insertion est spécifique du stade précoce du développement du lymphocyte B, pendant lequel la TdT est exprimée et où a lieu la recombinaison V(D)J. La TdT ajoute ces nucléotides sans amorçage, avec une préférence pour des résidus G. Ces régions N sont ainsi riches en G-C.

ii) **les insertions « templated »** où quelques nucléotides sont ajoutés au niveau des joints codants. Ces nucléotides sont appelés P en raison de la structure palindromique des séquences RSS et sont complémentaires de l'extrémité du joint codant à proximité de la séquence RSS.

La recombinaison V(D)J permet donc *in fine* de générer un vaste répertoire d'immunoglobulines à partir d'un nombre restreint de gènes. En effet, grâce à l'utilisation des différents gènes du répertoire, des coupures de l'ADN quelquefois imprécises, ainsi que des diversités N et P, il est possible pour un individu de générer théoriquement jusqu'à 10^9 immunoglobulines différentes.

Cependant, le tribut à payer pour cette variabilité particulièrement importante est la répercussion aléatoire de ces ajouts ou excisions de nucléotides sur le cadre de lecture des protéines à synthétiser. Ainsi, seule une séquence recombinée sur trois peut coder une protéine fonctionnelle.

Le contrôle de la recombinaison VDJ s'exerce d'une part grâce à l'expression des recombinases. Celles-ci sont en effet exprimées uniquement dans les cellules lymphoïdes et à certains stades de différenciation des lymphocytes. La chaîne H est réarrangée avant la chaîne L, la chaîne κ avant la chaîne λ , et tout allèle réarrangé de manière improductive est exclu. Une autre voie de contrôle est assurée par l'accessibilité des séquences RSS. Ces dernières sont bloquées au niveau chromatinien par des protéines se liant aux RSS ou des modifications de l'ADN rendant la séquence RSS inaccessible. Ces séquences doivent être activement ouvertes pour la recombinaison.

II-3. Exclusion allélique et exclusion isotypique

Chaque lymphocyte synthétise des anticorps d'une seule spécificité, correspondant aux réarrangements des régions variables. Ainsi, ces immunoglobulines sont produites à partir d'un seul chromosome 14 et de l'un des deux chromosomes 2 ou 22. Ce phénomène est appelé **exclusion allélique**. Au cours de la différenciation du lymphocyte, une première recombinaison est tentée sur l'un des deux chromosomes 14 pris au hasard. Si la recombinaison est réussie, c'est-à-dire si une chaîne lourde fonctionnelle peut être synthétisée, le réarrangement est dit productif. Le second chromosome n'est alors pas recombiné et ne sera pas exprimé. Si au contraire, la tentative est un échec, et ne conduit pas à la synthèse d'un produit fonctionnel (réarrangement abortif), une nouvelle recombinaison est tentée sur l'autre chromosome. Lorsque le réarrangement productif d'une chaîne lourde est effectif, le même scénario se reproduit avec les chromosomes codant les chaînes légères. Si les échecs se répètent pour tous les gènes possibles, le lymphocyte ne produira jamais d'immunoglobuline.

De plus, une même cellule n'exprime jamais à la fois une chaîne κ et une chaîne λ , c'est l'**exclusion isotypique**. La toute première tentative de recombinaison pour les chaînes légères s'effectue au niveau de l'un des deux gènes κ . En cas d'échec il est fait appel au gène κ de l'autre chromosome 2 ou aux gènes λ .

Le mécanisme de l'exclusion allélique n'est que partiellement élucidé. Il fait appel à des signaux médiés par le Pré-BCR. Le pré BCR est constitué de la chaîne lourde issue du réarrangement productif d'un allèle codant la chaîne lourde μ associé à une pseudo-chaîne légère $V_{preB}/\lambda 5$. Les signaux médiés par ce pré-BCR bloquent l'accessibilité des recombinases RAG sur le deuxième allèle de la chaîne lourde μ non recombinée et les

redirige vers le locus des chaînes légères κ pour initier les premières recombinaisons. La formation d'un BCR complet associant chaîne lourde et chaîne légère bloque les recombinaisons sur les autres allèles de chaîne légère.

III-Ontogénèse des lymphocytes B. (Figure 15)

On peut séparer l'ontogénèse des lymphocytes B en deux phases principales, dépendantes ou non de la présence d'antigène.

La première phase de différenciation et de maturation des lymphocytes B est **indépendante de l'antigène**. Elle se déroule dans la moelle osseuse et aboutit à la génération de lymphocytes B immatures exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître un antigène.

La seconde phase, d'activation et de différenciation finale, est **dépendante des antigènes** du soi d'abord puis du non-soi en périphérie, au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Elle aboutit à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques d'un antigène.

Les étapes de différenciation qui conduisent de la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B immature se déroulent dans la moelle osseuse en l'absence de stimulation antigénique.

III-1-Différents stades du développement B

III-1-a.Les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP)

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC pour **H**ematopoietic **S**tem **C**ells) sont à l'origine de toutes les cellules sanguines et donc des lymphocytes (voir chapitre 2). Elles sont caractérisées par leur potentiel de différenciation en de multiples lignées, leur grande capacité d'auto-renouvellement et la présence à leur surface du marqueur CD34. Les précurseurs lymphoïdes communs issus des HSC possèdent la capacité de reconstituer de façon restreinte la lignée lymphoïde (cellules T, B et NK) *in vivo*.

III-1-b.Le stade pré-pro B

Dans la moelle osseuse, les précurseurs B les plus immatures constituent une sous-population de cellules appelées pré-pro-B qui ne sont pas totalement engagées dans la voie B et n'ont pas encore réarrangé les gènes des immunoglobulines. Les cellules pré-pro-B expriment très faiblement les gènes *RAG-1* et *RAG-2*. Par contre, l'expression du gène

codant pour Ig α (CD79a) est détectée dès ce stade sous forme de protéines CD79a intracytoplasmiques.

III-1-c. Le stade pro-B

A ce stade les réarrangements des gènes d'immunoglobulines commencent à se mettre en place, selon une cinétique contrôlée, permettant ainsi de distinguer deux populations. Les réarrangements débutent au locus IGH par la jonction d'un segment D_H avec un segment J_H. Ces événements caractérisent le **stade pro-B précoce**, auquel apparaît le marqueur CD19. Ces premiers réarrangements sont suivis dans les cellules **pro-B tardives** par l'assemblage, sur un seul allèle, d'un segment V_H avec les segments DJ_H réarrangés. Seuls les segments V_HDJ_H en phase de lecture correcte et sans codon stop codent pour une région variable fonctionnelle et permettent la synthèse d'une chaîne lourde μ intracytoplasmique.

III-1-d. Le stade pré-B

Une petite proportion de la chaîne lourde μ est alors exprimée à la surface des cellules, maintenant pré-B, en association avec une pseudo chaîne légère formée de la liaison non covalente des protéines $\lambda 5$ et VpréB. Ce complexe forme le pré-BCR qui permet à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation et d'entrer dans une phase d'expansion clonale. Le pré-BCR joue aussi un rôle critique dans l'exclusion allélique en induisant une diminution transitoire de l'expression des gènes RAG qui arrête la recombinaison des gènes de chaînes lourdes sur l'autre allèle.

Les gènes *RAG* sont alors réexprimés pour réaliser les réarrangements V_LJ_L des gènes des chaînes légères. Ils sont monoalléliques et débutent au locus Ig κ . Si aucun réarrangement productif sur les deux allèles ne s'est produit, ils se poursuivent au locus Ig λ comme indiqué précédemment.

III-1-e. Le stade B immature

Ce stade est caractérisé par la production d'une chaîne légère classique qui remplace la pseudo chaîne légère et donne naissance à une IgM de surface conférant à la cellule sa spécificité de reconnaissance de l'antigène.

Ces cellules produisent par ailleurs un long transcrit d'ARN couvrant les régions constantes des chaînes μ (μ) et delta (δ). Un épissage de cet ARN associe la région variable aux domaines constants de l'un ou l'autre isotype. Ces cellules B immatures ou naïves

coexpriment ainsi les deux types d'immunoglobulines avec la même spécificité. On parle de cellules $\mu\delta$. Les lymphocytes B immatures sont alors sujets à un processus de sélection négative au cours duquel les cellules possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées par des mécanismes détaillés plus loin. Les cellules qui survivent quittent alors la moelle osseuse pour se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront subir les dernières étapes de maturation.

III-2-Régulation de la différenciation lymphocytaire B

III-2-a.Rôle des cytokines et des récepteurs de cytokine

Les premières étapes du développement sont strictement dépendantes du microenvironnement particulier apporté par les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces cellules stromales régulent la croissance, la maturation et la survie des précurseurs par l'intermédiaire de facteurs solubles (IL7, Stem Cell factor ou SCF, SDF-1) et de contacts avec les cellules en développement.

III-2-b.Rôle des facteurs de transcription

Au cours de la différenciation lymphocytaire, les facteurs de transcription, en se fixant sur différents promoteurs et activateurs, sont impliqués dans la quiescence, la survie et la mort des progéniteurs B ainsi que dans les prises de décisions lors de l'engagement des cellules dans une lignée spécifique. Un certain nombre de ces facteurs de transcription apparaissent ainsi fondamentaux : Ikaros, E2A, EBF, Pax5 et LF1.

IV. Différenciation B dépendante de l'antigène.

IV-1. Différenciation post-médullaire des lymphocytes B

Les cellules B immatures qui ont quitté la moelle osseuse passent par un stade intermédiaire, le **stade B transitionnel**. C'est à ce stade qu'a lieu la sélection périphérique. Les lymphocytes B qui survivent à la sélection périphérique expriment une IgM et une IgD de surface et se différencient soit en lymphocytes B folliculaires conventionnels impliqués dans les réponses humorales dépendantes des lymphocytes T soit en lymphocytes B de la zone marginale qui sont impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes.

Les lymphocytes **B folliculaires** représentent 80% des cellules B de la rate adulte et possèdent la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. Après activation par leur rencontre avec l'antigène, les lymphocytes B peuvent soit se différencier rapidement en plasmocytes à IgM à courte durée de vie, soit former les centres germinatifs où ils subissent

les processus d'**hypermutation somatique** et de **commutation isotypique**, avant de se différencier en cellules B mémoires ou en plasmocytes long survivants (voir plus bas).

Les cellules B mémoires constituent un groupe minoritaire de cellules à longue durée de vie, capables de persister à l'état quiescent sans proliférer (de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Elles n'expriment en général plus d'IgD, ont commuté (expriment un autre isotype), et peuvent avoir des localisations préférentielles telles que les muqueuses pour les cellules ayant commuté pour produire des IgA. Les cellules mémoires ont la faculté de répondre très rapidement à des pathogènes. En effet, elles peuvent présenter rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire et se différencier en plasmocytes.

Les plasmocytes, exprimant CD38 et CD138, sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale. Ce sont de vraies usines de production et de sécrétion d'anticorps à destination de l'ensemble de l'organisme. La durée de vie de ces cellules sécrétrices peut être courte ou longue selon le type de signaux reçus lors de la stimulation antigénique.

D'autres cellules B périphériques interviennent dans les **réponses immunes T-indépendantes**. Leurs origines restent encore controversées mais leur action est essentielle puisque ce sont ces cellules qui vont constituer la première ligne de défense contre certains micro-organismes comme les bactéries encapsulées : ce sont les **cellules B de la zone marginale** folliculaire (MZ) de la rate et les **cellules B1** présentes notamment dans la cavité péritonéale. Ces cellules B périphériques sont à l'origine d'autoanticorps dits «naturels», polyréactifs, de faible affinité dont les fonctions sont multiples : élimination des débris cellulaires, transport de cytokines ou encore formation des complexes antigènes/anticorps présentés aux cellules B folliculaires par les FDC dans les centres germinatifs.

Enfin des **lymphocytes B régulateurs** sont de découverte plus récente. Ils soulignent l'importance de l'homéostasie B dans le maintien de l'équilibre du système immunitaire. Ces lymphocytes B producteurs d'IL-10 exercent ainsi d'importantes fonctions de régulation de la réponse immune.

IV-2- Activation des lymphocytes B

Certains signaux adressés aux lymphocytes B par leur environnement moléculaire et cellulaire seront pour certains directement **dépendants du BCR** (liaison paratope-épitope), et pour d'autres **non directement dépendants du BCR**.

IV-2-a. Stimulation par le BCR

A la suite du pontage d'au moins deux BCR, facilité par la présence d'épitopes répétés sur l'antigène, les molécules de signalisation CD79a et CD79b sont activées. Cette activation

implique une phosphorylation qui s'effectue sur les résidus tyrosine présents sur les motifs ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based-activation-motif) de la portion intracytoplasmique des molécules CD79 par des **kinases** associées au BCR (Blk, Fyn, Lyn...). Des **phosphatases** (SHP-1, SHIP...) sont chargées de limiter cette signalisation. La phosphorylation permet l'ancrage de protéines adaptatrices et favorise le recrutement en cascade de molécules de signalisation. Celles-ci activent ensuite des facteurs de transcription qui traversent la membrane nucléaire (translocation), et activent les gènes contrôlant le programme fonctionnel des lymphocytes B.

Cette activation dépendante du BCR est **modulée** par des signaux **indépendants du BCR** qui permettent, en fonction du stade de développement du lymphocyte B, de l'orienter soit vers une mort programmée ou apoptose, soit vers la prolifération. L'apoptose concerne la sélection négative au cours de l'ontogénie B ou diminution de la taille du clone (contraction clonale) après activation. La prolifération concerne la sélection positive au cours de l'ontogénie B ou l'expansion clonale après activation B, Ces signaux gouvernent aussi la différenciation et la maturation qui font évoluer les cellules du lymphocyte B naïf au lymphocyte B mature, puis au lymphocyte B mémoire ou au plasmocyte.

IV-2-b. Molécules accessoires de l'activation lymphocytaire B

D'autres signaux membranaires en relation avec l'environnement cellulaire du lymphocyte B (cytokines, complément, molécules d'adhérence...) permettent de contrôler la signalisation du BCR vers la survie, l'apoptose, l'activation, la prolifération ou la différenciation. Ces signaux jouent également un rôle déterminant dans les coopérations cellulaires.

Par exemple, au cours d'une infection, le fragment C3d produit par l'activation du complément enrobe le micro-organisme. La molécule CD21, présente à la surface du lymphocyte B, est capable de reconnaître C3d, quelle que soit la structure qui le porte. CD21 vient compléter la reconnaissance du pathogène par le BCR. Cette double reconnaissance enclenche à la fois l'activation de CD21 via la molécule signal CD19 et l'activation du BCR par ses molécules signal CD79. Dans ce cas, la coopération est positive et aboutit à l'activation et à la prolifération du lymphocyte B.

Dans d'autres cas, un effet négatif sur l'activation du lymphocyte B peut être observé. Par exemple lorsqu'une immunoglobuline, par l'intermédiaire de sa partie constante Fc, lie le Fc γ R-IIb (CD32B), présent sur les lymphocytes B, ceci délivre un signal de frein à l'activation concomitante du lymphocyte B par l'intermédiaire de la liaison de l'antigène sur le BCR.

IV-2c. Interaction lymphocyte T / lymphocyte B lors des réponses thymo-dépendantes

Au sein des organes lymphoïdes secondaires, à l'interface entre la zone corticale-et la zone paracorticale, l'interaction lymphocyte B/lymphocyte T est le plus souvent antigène dépendante et donc spécifique. Le lymphocyte B joue le rôle d'une cellule présentatrice d'antigènes pour le lymphocyte T préalablement activé par une cellule dendritique au sein de la zone T. C'est le cas pour les antigènes protéiques qui sont capturés par le BCR, internalisés dans le lymphocyte B avec ce dernier et apprêtés pour permettre l'exposition membranaire de peptides sélectionnés dans les sillons de présentation des molécules CMH de classe II qu'expriment les lymphocytes B à leur surface. Cette interaction est complétée par l'expression de molécules de co-stimulation. Sur le lymphocyte B l'expression de CD80/CD86 permet la liaison au CD28 des lymphocytes T (second signal qui favorise l'expansion clonale et l'activation T). Sur le lymphocyte T activé, l'expression du ligand du CD40 (CD40L ou CD 154) permet la liaison au CD40 des lymphocytes B. Au cours de cette étroite interaction, le lymphocyte B reçoit de la part du lymphocyte T des signaux nécessaires à sa prolifération et sa maturation, comme de l'IL-2 et de l'IL-4.

IV-3-Modifications de structure du BCR après contact antigénique

Les immunoglobulines de membrane subissent de nouvelles modifications dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette différenciation est dépendante de l'antigène et entraîne une modification de la maturation des ARN messagers des chaînes lourdes, qui se traduit par la disparition des immunoglobulines membranaires et la **sécrétion d'IgM** dans le cas d'une différenciation en plasmocytes à IgM à courte durée de vie.

Lorsque le lymphocyte B passe après activation par la voie du centre germinatif au sein des organes lymphoïdes secondaires, il subit au stade de « centroblaste » une modulation de l'affinité de son immunoglobuline pour l'antigène. Ce phénomène est dû à des **hypermutations somatiques** dans les gènes codant les régions variables des immunoglobulines. Après sélection positive des lymphocytes B portant une immunoglobuline de forte affinité pour l'antigène intervient au stade « centrocyte » la **commutation de classe ou commutation isotypique** encore appelée "**class switching**". Des immunoglobulines circulantes ou portées par des lymphocytes B mémoires d'une nouvelle classe (on parle aussi de nouvel isotype) apparaissent : des IgG ou des IgA ou des IgE. Ceci correspond à un déplacement des gènes VDJ réarrangés dans la moelle osseuse en amont des gènes codant pour les domaines constants, sans changement de la spécificité antigénique.

IV-3-a.Immunoglobuline membranaire ou sécrétée

L'immunoglobuline de membrane (BCR) est identique à l'immunoglobuline sécrétée (anticorps), à l'exception d'une séquence d'acides aminés située dans la partie C terminale

des chaînes lourdes H. Les immunoglobulines de membrane sont plus longues que leurs homologues sécrétés, et les acides aminés supplémentaires sont nécessaires pour traverser la membrane cellulaire et y ancrer la molécule. A noter que seuls trois acides aminés sont présents dans le cytoplasme d'une IgM de membrane, ce qui ne suffit pas pour transduire un signal.

IV-3-b.Maturation des messagers et sécrétion des IgM

Après stimulation, un lymphocyte B peut sécréter des IgM solubles alors que les IgM et les IgD membranaires disparaissent. Les parties variables et les chaînes légères de ces trois types d'immunoglobulines sont identiques. Ce phénomène résulte d'une modification de la maturation des messagers et peut-être aussi d'une variation du site d'arrêt de la transcription. La partie constante des chaînes mu est codée par 6 exons. Les deux derniers (exons 5 et 6) codent pour la partie transmembranaire de l'IgM de membrane. Après stimulation antigénique, la maturation des messagers se modifie et seuls les messagers de l'immunoglobuline sécrétée, qui ne contiennent que les exons 1 à 4 sont retrouvés dans le cytoplasme. La chaîne synthétisée ne possède plus la séquence peptidique nécessaire à l'ancrage dans la membrane et elle est donc totalement sécrétée.

IV-3-c.Les hypermutations somatiques

Les hypermutations somatiques sont induites à la suite d'une stimulation antigénique, dans la zone sombre des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, à un stade où le lymphocyte B est appelé centroblaste. Ces modifications sont essentiellement ciblées sur la région variable des gènes d'immunoglobuline des cellules B activées. Les mutations introduites permettent la modulation, et donc dans certains cas l'augmentation de l'affinité pour l'antigène. A la suite de ce phénomène, les lymphocytes B appelés centrocytes, qui expriment à leur surface des immunoglobulines de forte affinité pour l'antigène, seront sélectionnés grâce aux cellules folliculaires dendritiques au sein de la zone claire des centres germinatifs. L' AID (**A**ctivation-**I**nduced cytidine **D**eaminase»), une enzyme exclusivement exprimée dans les centres germinatifs *in vivo* est responsable de ces hypermutations somatiques.

IV-3-d.Commutation de classe (Figure 16)

La spécificité antigénique des immunoglobulines est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et légères. Les fonctions effectrices, en revanche, dépendent des

régions constantes (C) des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Les IgM sont majoritairement produites au cours de la réponse primaire, alors que les IgG, IgA ou IgE sont majoritairement produites au cours d'une réponse secondaire ou tertiaire. Au cours du changement d'isotype ou **commutation de classe**, le gène réarrangé VDJ se rapproche d'un nouveau segment constant codant pour les domaines constants d'une classe d'immunoglobulines différente par un processus de recombinaison somatique. Les lymphocytes B matures peuvent alors exprimer et sécréter une des classes d'immunoglobulines (IgG, IgA ou IgE) spécifiques de l'antigène. Ce processus est primordial pour la diversité fonctionnelle des réponses anticorps. La commutation de classe est un mécanisme complexe et hautement régulé. Il cible des "points chauds" de recombinaisons appelés régions «switch» ou S, situées en amont de tous les domaines constants à l'exception de C δ . Les régions «switch» sont des sites de recombinaison de longueur variable. AID est absolument indispensable pour cette commutation de classe.

IV-4. Le centre germinatif, lieu de l'hypermutation somatique et de la commutation isotypique (Figure 17).

Suite à une immunisation avec un antigène qui entraîne une réponse T-dépendante, on observe dans les organes lymphoïdes secondaires la formation de structures particulières appelées **centres germinatifs**. Ces structures apparaissent quelques jours après l'exposition à l'antigène et persistent jusqu'à quelques semaines. Elles sont associées à l'expansion oligoclonale de cellules B spécifiques, sont le site de l'hypermutation somatique, de la commutation isotypique et d'une sélection éliminant les cellules produisant des anticorps de faible affinité.

Dans les centres germinatifs, on distingue deux zones principales dites zone sombre et zone claire. Les centroblastes sont des lymphocytes B en prolifération qui ne fabriquent plus d'immunoglobulines de surface car leurs gènes subissent les hypermutations somatiques. Ils sont localisés dans la zone sombre, dont la forte densité cellulaire est à l'origine de ce nom.

Dans la zone claire, les lymphocytes B sont de plus petite taille, ne prolifèrent plus, et sont enchevêtrés dans un large réseau de cellules folliculaires dendritiques. Ces lymphocytes expriment leur nouvelle immunoglobuline de surface et sont appelés centrocytes.

Les cellules folliculaires dendritiques peuvent retenir l'antigène sous sa forme native à leur surface, sous forme de complexes immuns pendant plusieurs mois, et le rendre ainsi accessible aux centrocytes issus de la prolifération dans la zone sombre. Seuls les centrocytes exprimant un récepteur de haute affinité pour les épitopes présentés par les

cellules folliculaires dendritiques sont sélectionnés efficacement en captant l'antigène. Au contraire, si les mutations ne modifient pas, voire diminuent l'affinité du BCR, ces cellules sont alors éliminées par apoptose. Suite à cette sélection, les centrocytes ayant capté l'antigène l'appâtent et le présentent sous forme de peptides dans leurs molécules du CMH de classe II aux lymphocytes T helper folliculaires, présents spécifiquement au sein de la zone claire. Ces lymphocytes T helper folliculaires donnent alors des signaux de survie et de différenciation aux lymphocytes B, qui peuvent alors subir la commutation de classe. Ils mûrissent ensuite soit en plasmocytes, soit en cellules B mémoire.

V-Sélection du répertoire des lymphocytes B

Le système immunitaire est soumis à deux impératifs sélectifs opposés : produire des lymphocytes B ayant des récepteurs membranaires susceptibles de reconnaître un grand nombre d'antigènes et contrôler les lymphocytes susceptibles de réagir avec le soi. La tolérance au soi du système immunitaire est donc un état physiologique acquis dans lequel le système immunitaire ne réagit pas contre les éléments qui le constituent. Avant leur départ vers la périphérie, les cellules B immatures subissent un processus sélectif qui diminue fortement le nombre de clones B auto-réactifs : **tolérance centrale**. Cependant, malgré l'efficacité de ce processus, certains clones auto-réactifs gagnent la périphérie justifiant la mise en place d'un mécanisme additionnel de tolérance : **tolérance périphérique**.

V-1. Mécanismes de la tolérance B centrale

Quatre mécanismes sont impliqués dans l'acquisition de la tolérance centrale des lymphocytes B : -1) la réédition des récepteurs pour l'antigène, -2) la délétion clonale, -3) l'anergie et -4) l'ignorance clonale. La mise en place de ces mécanismes est intimement liée à l'affinité du BCR pour l'antigène du soi qu'il reconnaît. En cas d'affinité forte ou pour les antigènes induisant une agrégation importante des récepteurs membranaires, les signaux intracellulaires induits favorisent les mécanismes de réédition des récepteurs de l'antigène et de délétion clonale. En dessous d'un certain seuil d'affinité ou si l'antigène agrège moins le BCR (un antigène soluble par exemple), les clones B auto-réactifs seront tolérés par induction d'une anergie. Enfin, si l'antigène n'est pas ou peu présent dans la moelle osseuse, les clones auto-réactifs quittent celle-ci sans subir de mécanisme actif de tolérance selon un processus d'ignorance clonale. Le « receptor editing » est le principal acteur de la tolérance centrale, l'anergie et la délétion jouant un rôle secondaire.

V-2. Mécanismes de la tolérance B périphérique

La tolérance périphérique peut avoir lieu à deux niveaux : dans la rate au stade des lymphocytes B transitionnels et dans les centres germinatifs lors de l'activation des lymphocytes B folliculaires.

Les lymphocytes B transitionnels migrent de la moelle osseuse vers la rate où l'affinité/avidité de leur BCR est testée vis-à-vis des antigènes du soi. Les lymphocytes B ayant un BCR d'affinité faible pour le soi poursuivent leur développement en migrant dans un follicule primaire. Ils constituent le pool des lymphocytes B folliculaires et recirculent entre les organes lymphoïdes secondaires et le sang. Les cellules B ayant un BCR d'affinité forte pour le soi en périphérie sont éliminées. La première phase de cette sélection consiste en l'exclusion folliculaire des lymphocytes B. Dans les zones extra-folliculaires, les lymphocytes B auto-réactifs subissent alors soit une paralysie fonctionnelle par anergie soit une élimination par délétion clonale. Le choix entre ces deux mécanismes de tolérance dépend de l'affinité du BCR pour le soi et/ou de la forme physique de l'antigène : affinité forte et antigène soluble pour l'anergie, affinité très forte et antigène membranaire pour la délétion. Les cellules B anergiques exclues des follicules meurent en quelques jours par apoptose. Un second mécanisme de tolérance est celui mis en place au niveau des centres germinatifs et décrit plus haut.

A retenir

- Les lymphocytes B sont issus de progéniteurs hématopoïétiques et se différencient dans la moelle osseuse
- Le réarrangement aléatoire des gènes codant pour la partie variable des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines s'effectue dans la moelle osseuse et aboutit à la constitution d'un récepteur B pour l'antigène (BCR) spécifique pour chaque lymphocyte B
- L'ensemble des réarrangements productifs des gènes des immunoglobulines constitue le répertoire B, sélectionné pour éliminer les clones auto-réactifs
- Les lymphocytes B naïfs sortent de la moelle osseuse et gagnent les organes lymphoïdes secondaires
- La rencontre avec l'antigène induit l'activation des lymphocytes B, par le BCR et par des molécules accessoires
- Le lymphocyte B qui a reconnu l'antigène peut le présenter à un lymphocyte T
- Après avoir rencontré l'antigène les lymphocytes B activés forment des centres germinatifs dans lesquels ils prolifèrent et se différencient en plasmocytes à longue durée de vie sécrétant d'immunoglobulines de classe IgG, IgA et IgE, ou en cellules B mémoire
- Dans le centre germinatif, les gènes des immunoglobulines subissent des hypermutations somatiques et la commutation de classe
- Les lymphocytes B issus des centres germinatifs sont les plus affins car ils ont été sélectionnés grâce à leur rencontre avec les antigènes portés par les cellules folliculaires dendritiques,

Figure 12. Le BCR, récepteur pour l'antigène des lymphocytes B.

Le BCR est, à la surface du lymphocyte B, un complexe multimoléculaire comportant :

- une immunoglobuline de surface (ici une IgM) avec une partie transmembranaire et quelques acides aminés intracytoplasmiques
- et de part et d'autre, deux hétérodimères CD79a ($Ig\alpha$) et CD79b ($Ig\beta$) dont chaque chaîne comporte un domaine de la superfamille des immunoglobulines extracellulaire et une longue portion intracytoplasmique portant un motif d'activation ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif).

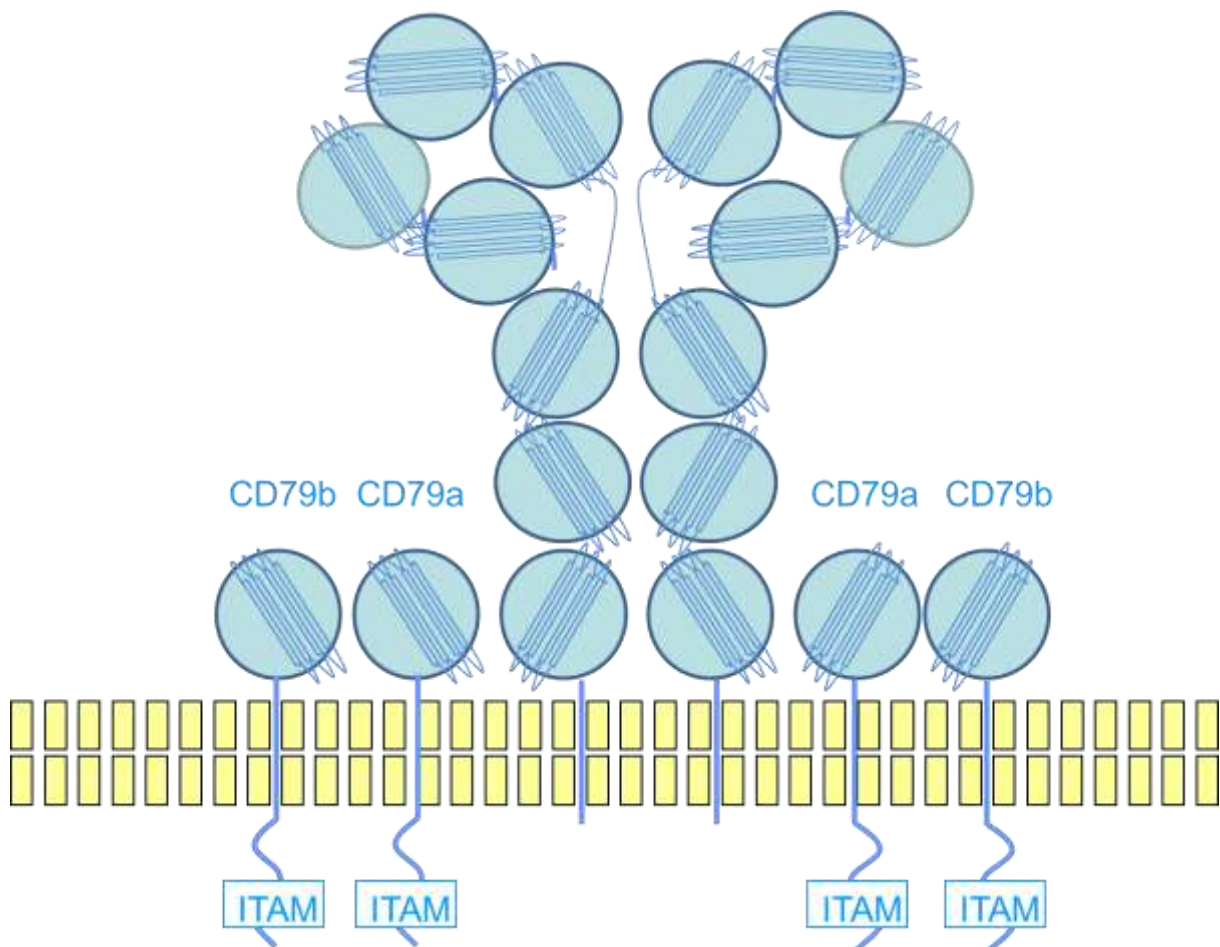


Figure 13. Organisation des gènes d'immunoglobuline.

Ce schéma montre l'organisation des familles de gènes codant pour les chaînes légères lambda sur le chromosome 22, pour les chaînes légères kappa sur le chromosome 2 et pour les chaînes lourdes sur le chromosome 14.

Pour chaque locus, les répertoires de gènes de variabilité (V) apparaissent en vert, les répertoires des gènes de jonction (J) en orange et les gènes des domaines constants (C) en rose.

Sur le chromosome 14, le répertoire des gènes de diversité (D) est figuré en violet.

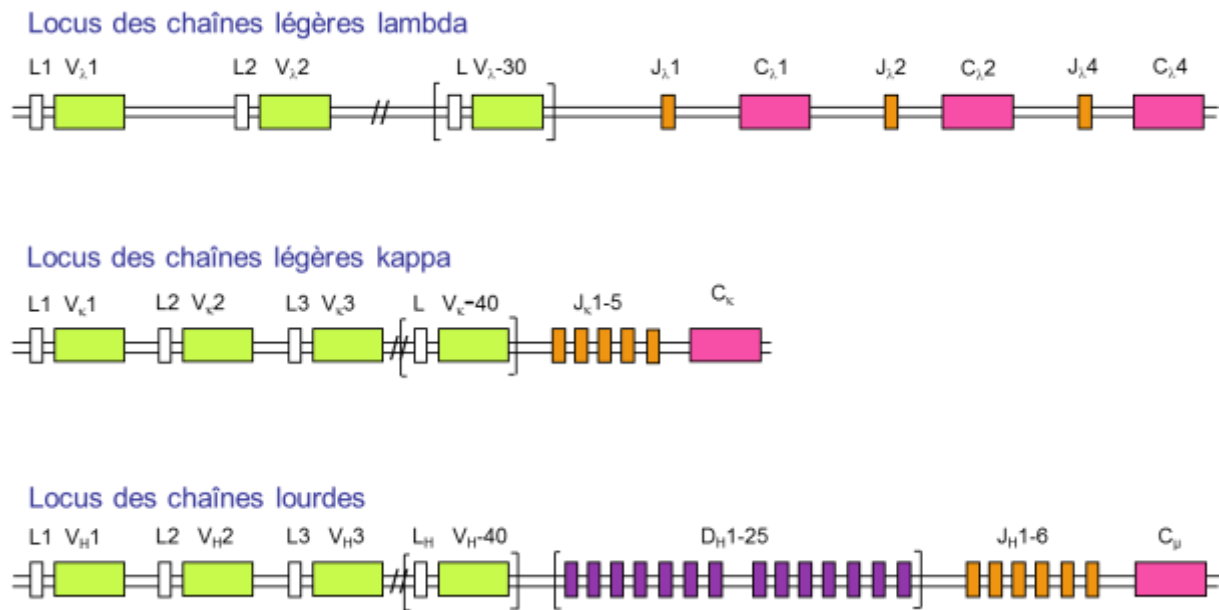


Figure 14. Génération de la diversité des immunoglobulines.

Ce schéma montre les étapes du réarrangement des gènes codant pour un domaine variable de chaîne lourde (VH).

Il se fait en trois étapes :

- choix d'un gène D et d'un gène J dans les répertoires correspondants
- choix d'un gène V dans ce répertoire
- génération d'un ARN à partir de la séquence VDJ-domaine constant ainsi constituée sur le chromosome 14 réarrangé.

La production d'une chaîne lourde mu se fera après épissage de cet ARN.

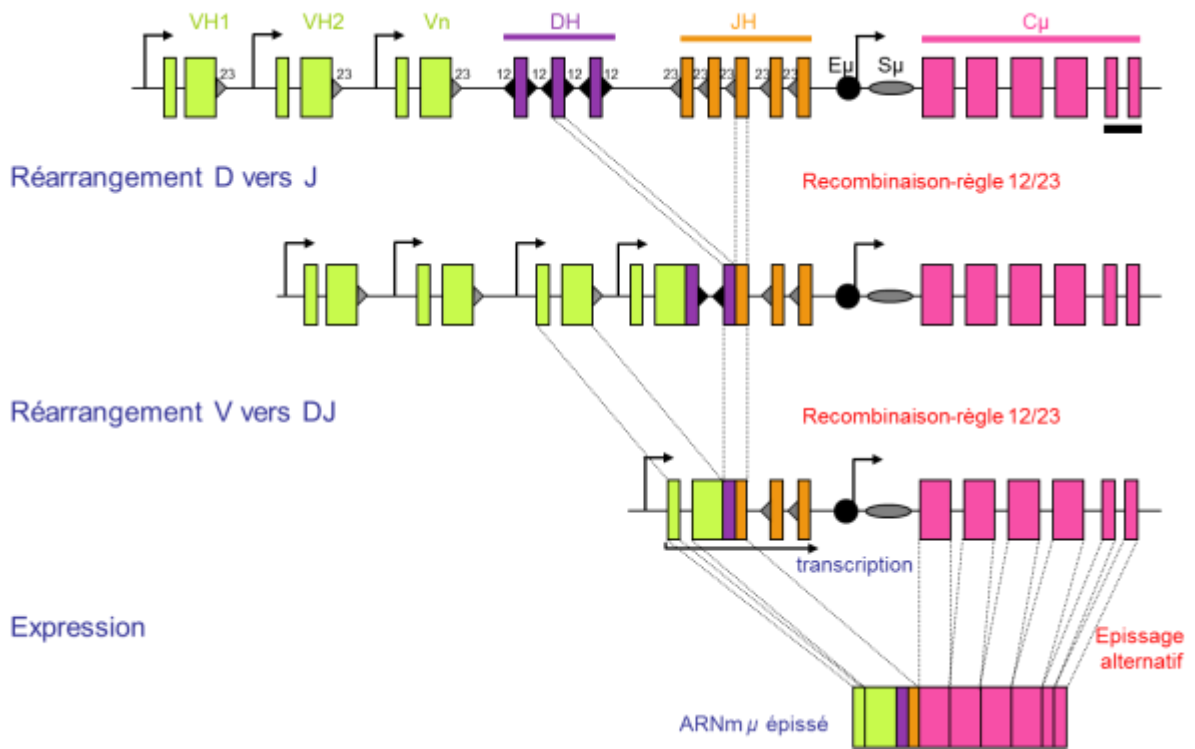


Figure 15. Ontogénèse des lymphocytes B.

Ce schéma décrit les principales étapes de maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique. Ces étapes se caractérisent par l'expression séquentielle d'antigènes de différenciation (CD, **C**luster of **D**ifferentiation) et l'implication, également séquentielle des gènes Pax et Rag (voir le texte).

Les cellules matures gagnent les organes lymphoïdes secondaires ou elles se différencieront potentiellement en plasmocytes après activation antigénique.

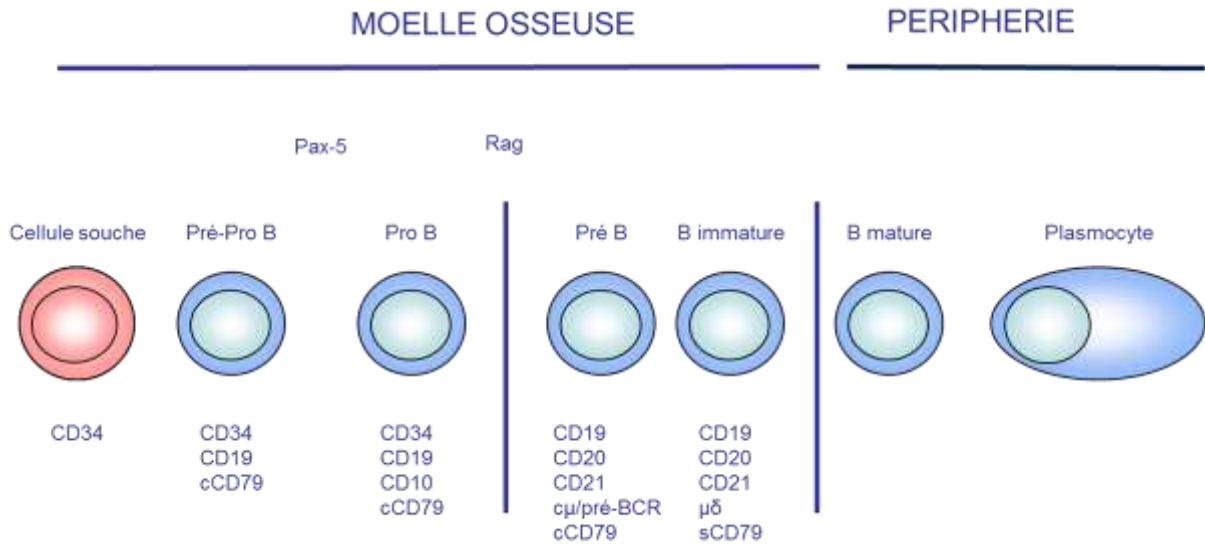


Figure 16. Commutation de classe ou switch des gènes des immunoglobulines.

Ce schéma montre comment le segment VDJ réarrangé dans la moelle osseuse, est déplacé au cours de l'activation lymphocytaire B vers les gènes codant pour un autre domaine constant (ici epsilon pour fabriquer des IgE de même spécificité que l'IgM initiale).

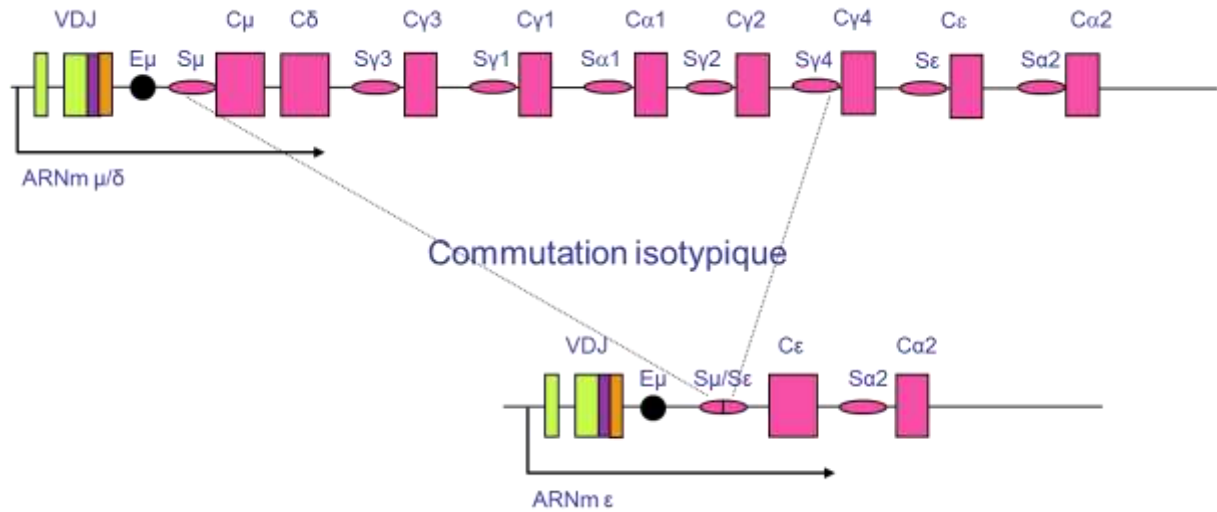


Figure 17. Activation B dans le centre germinatif.

L'activation d'un lymphocyte B naïf se déroule dans le centre germinatif après reconnaissance de l'antigène et aide d'un lymphocyte T helper. La prolifération clonale s'effectue dans la zone sombre. La zone claire est le siège de la sélection des lymphocytes B nouvellement formés gardant les cellules présentant la meilleure affinité (les autres meurent par apoptose), ainsi que de la commutation de classe. Ces étapes dépendent de contacts avec les cellules dendritiques folliculaires et avec des lymphocytes T helper. Les cellules sélectionnées positivement quittent le centre germinatif sous forme de plasmocytes producteurs d'immunoglobulines ou de lymphocytes B mémoire.

