

La lymphopoïèse B

I. Les gènes des immunoglobulines

Les gènes des immunoglobulines de l'Homme et de la souris sont répartis en loci localisés sur trois chromosomes différents (deux loci qui codent pour les chaînes légères kappa ($Ig\kappa$) et lambda ($Ig\lambda$), et un qui code pour la chaîne lourde (IgH)). Dans leur configuration germinale, ces loci sont formés de successions des segments suivants: du côté 5', on distingue les gènes variables [V], les gènes de diversité [D] (existant uniquement au niveau du locus IgH) et les gènes de jonction [J]. Cette partie V(D)J code, une fois assemblée, la région variable responsable de la reconnaissance d'un antigène donné. Du côté 3' du locus, existent les gènes constants (C) des chaînes d'Ig. Ces trois loci sont contrôlés par différents éléments de régulation transcriptionnelle qui régulent également l'accessibilité aux recombinaisons. Ces éléments incluent de nombreux promoteurs (notamment en amont de chaque segment V, mais aussi à différents niveaux de « transcription germinale » du locus, notamment à proximité des gènes constants), ainsi que des activateurs (« enhancers ») ou encore des silenciers. Les enhancers principaux sont introniques (E_k et E_μ suivant les segments J_k et J_H), ou bien situés en 3' de chacun des trois loci $Ig\kappa$, $Ig\lambda$ et IgH . Pour ce dernier locus, les enhancers 3', multiples, forment un « superenhancer » encore appelé région régulatrice 3' (IgH 3'RR) (Giudicelli et al., 2005; Pinaud et al., 2011).

1. Les loci kappa et lambda

Le locus $Ig\kappa$ est situé sur le chromosome 6 chez la souris et 2 chez l'Homme. La différence entre le locus murin et humain est le nombre de segments formant les gènes V, J et C. Il existe: 174 segments V_k murin dont 94 à 96 sont fonctionnels et 76 V_k humain dont 31 à 35 sont fonctionnels; 4 segments J_k chez la souris et 6 segments chez l'Homme et un seul segment C_k chez la souris et chez l'Homme (**Figure 2A**) (Giudicelli et al., 2005).

Le locus $Ig\lambda$ est situé sur le chromosome 16 chez la souris et 22 chez l'Homme. Les segments de ce locus sont organisés d'une façon différente du locus kappa. Il comporte 3 segments V_λ chez la souris organisés sous cette forme : $V2-V3 -J2-C2-J4-C4$ et $V1-J3-C3- J1-C1$ (**Figure 2B**). Cette organisation est différente chez l'Homme où ce locus est formé de 69 gènes V_λ (dont 31 sont fonctionnels); 4 à 7 segments J_λ ($J\lambda-C\lambda$). Outre des variations alléliques de nombre, les clusters $J-C\lambda1$, $J-C\lambda2$, $J-C\lambda3$, et $J-C\lambda7$ sont fonctionnels alors que les clusters $J-C\lambda4$, $J-C\lambda5$ et $J-C\lambda6$ sont

non fonctionnels (**Figure 2C**) (van der Burg et al., 2001; Giudicelli et al., 2005; Tümkaya et al., 2001; Zou et al., 2003).

A. Locus Ig κ



B. Locus Ig λ murin



C. Locus Ig λ humain



Figure 2: Représentation schématique des loci de chaînes légères kappa et lambda.

A: Représentation du locus Ig κ localisé sur le chromosome 6 chez la souris et 2 chez l'Homme.

B: Représentation du locus Ig λ murin situé sur le chromosome 16.

C : Représentation du locus Ig λ humain localisé sur le chromosome 6.

2. Locus des chaînes lourdes

Le locus IgH est localisé sur le chromosome 12 chez la souris et le chromosome 14 chez l'humain. Il est divisé en plusieurs segments situés tout au long du locus. Du côté 5' (télomérique), est localisé le cluster des gènes variables (VH) (216 segments chez la souris et 164 segments chez l'Homme), de diversités (DH) (9 segments chez la souris et 37 segments chez l'Homme) et de jonctions (JH) (4 segments chez la souris et 6 segments chez l'Homme). Sur ce locus, diverses séquences régulatrices spécifiques de la lignée B agissent de façon concertée pour induire l'accessibilité aux réarrangements successifs qui gouvernent l'expression des immunoglobulines, réarrangements DJ et VDJ aux étapes précoces, puis réarrangements de commutation de classe (switch ou CSR) vers les différentes classes d'Ig. Les activateurs principaux actifs aux différents stades sont: E μ , situé entre la région JH et C μ du côté 5' du cluster des gènes constants, et actif

surtout aux stades précoces, il comprend un certain nombre de sites de liaison pour les facteurs de transcription spécifiques aux cellules B (Bottaro et al., 1998; Ernst and Smale, 1995). Il existe des deux côtés d'E μ des régions d'ancrage à la matrice nucléaire ou MARs (Matrix Associated Region). Ces éléments, en agissant avec E μ , permettent à ce dernier d'agir à distance. Oancea et ses collègues ont montré que la délétion des régions MARs diminue l'expression d'un transgène IgM dans un hybridome (Oancea et al., 1997). D'autres études ont montré que l'absence de l'activateur transcriptionnel E μ et de ses éléments MARs flanquants diminue la commutation de classe (CSR) mais elle n'est pas totalement abolie (Bottaro et al., 1998). Un autre activateur majeur est la région régulatrice 3'RR dans la région 3' flanquante du gène C α , du côté 3' du locus IgH (côté centromère). Cette région 3'RR est composée chez la souris de 4 activateurs transcriptionnels hypersensibles à la DNase I (HS3a, HS1.2, HS3b, HS4) et suivi de régions isolatrices (HS5, HS6 et HS7) qui incluent des sites de liaison pour CTCF (CCCTC-binding factor) et marquent la fin du locus (Garrett et al., 2005). D'autres séquences régulatrices ont été décrites au sein du locus IgH murin, avec 4 sites hs en amont du cluster V (Pawlitzky et al., 2006), et 6 autres dans la région V-D intergénique (Featherstone et al., 2010), auxquels on peut ajouter le « promoteur-enhancer DQ52 » en partie superposé à la séquence codante de ce segment D (Alessandrini and Desiderio, 1991).

L'organisation du locus IgH est différente chez l'Homme. Il existe en effet une duplication ancestrale du locus IgH commune à tous les primates de l'ancien monde, avec un module dupliqué qui inclue un ensemble de gènes γ , ϵ et α suivi des mêmes éléments régulateurs dupliqués en 3' de chaque gène α . Le locus IgH contient donc deux régions régulatrices très homologues: 3'RR1 et 3'RR2 avec au sein de chacune des activateurs HS3, HS1.2 et HS4 (Bébin et al., 2010; D'Addabbo et al., 2011).

Entre la région 5' et 3' se trouve la région des gènes constants qui codent les cinq classes d'Igs. Chaque gène est formé de plusieurs exons qui codent les différents domaines de chaque classe d'anticorps (CH1 à CH3 ou CH4 selon les isotypes) et la région charnière en plus des exons membranaires de chaque immunoglobuline. Chaque région constante est précédée par une région switch constituée de répétitions riches en GC (d'une longueur de 20-50 pb), dont leurs longueurs varient de 1 à 10 kb selon l'isotype d'Ig (à l'exception d'IgD qui est dépourvue d'une vraie région switch) elle-même précédée par un promoteur "I".

De façon intéressante, des régions très répétitives « like switch » (LS) sont aussi présentes dans la région 3'RR chez l'Homme et chez la souris (Chauveau and Cogné, 1996; D'Addabbo et al., 2011;

Giudicelli et al., 2005; Péron et al., 2012), et peuvent être ciblées par des recombinaisons voisines de la commutation de classe mais abrogeant l'expression des gènes constants IgH au lieu de la commuter (Péron et al., 2012).

Les loci IgH murin et humain sont représentés dans la **Figure 3A** et **3B** respectivement.

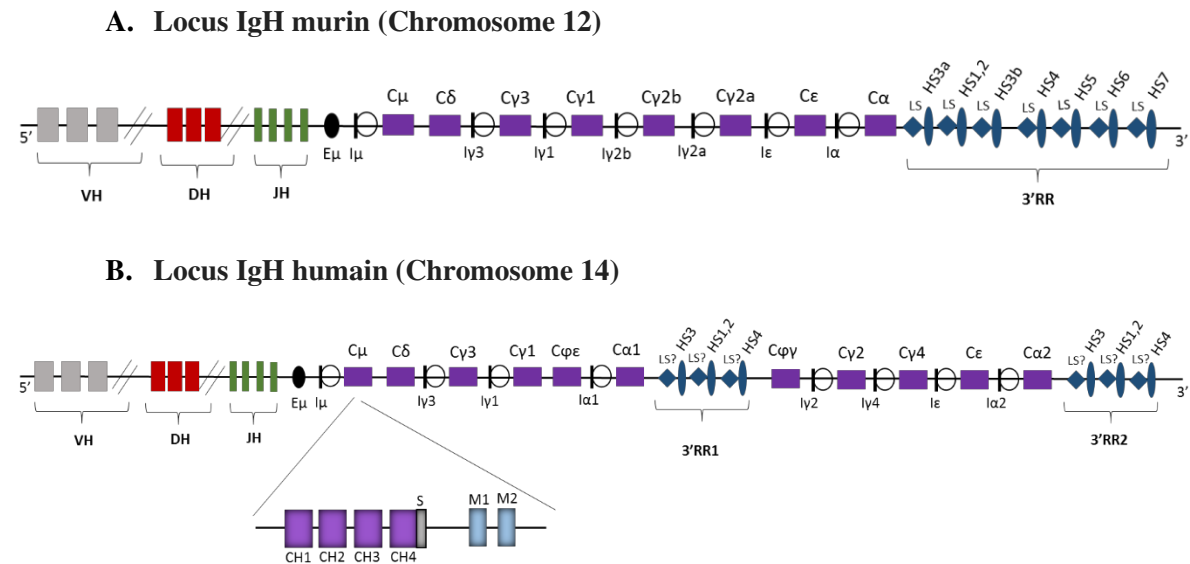


Figure 3: Représentation schématique du locus IgH d'immunoglobuline.

A: Représentation du locus IgH sur le chromosome 12 chez la souris.

B: Représentation du locus IgH sur le chromosome 14 chez l'Homme avec une duplication de la région régulatrice 3'RR (3'RR1 et 3'RR2). Les petits cercles devant les gènes constants représentent les régions switch. La région constante (exemple C μ) montre les quatre exons CH1, CH2 CH3 et CH4 lui-même associé à l'exon sécrétoire (S) et aux exons membranaires (M1 et M2).

3. Les recombinaisons du locus IgH pendant la différenciation des cellules B

3.1) Comment obtenir une immunoglobuline fonctionnelle ?

Dans leurs configurations germinales, les loci κ , λ et IgH non réarrangés ne peuvent pas coder de protéines fonctionnelles. Pour devenir « fonctionnels », ils doivent être remodelés, transcrits et réarrangés au fil d'étapes qui ponctuent le processus de la lymphopoïèse B ou ontogenèse B. Chez les mammifères, les réarrangements V(D)J ont d'abord lieu (dans le foie fœtal chez l'embryon ou la moelle osseuse chez l'adulte) indépendamment de l'antigène (stades précoces pro-B). Ces phases précoces de la lymphogenèse B permettent la formation d'un BCR fonctionnel (ou immunoglobuline fonctionnelle) de type IgM après les réarrangements VJ et VDJ respectivement sur les loci Ig κ ou Ig λ et sur le locus IgH.

Plus tard, les cellules B matures peuvent subir d'autres remaniements dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques ou les plaques de Peyer après la rencontre avec un antigène donné (stade tardif du développement des lymphocytes B) (pour revue: Pieper et al., 2013). Ces phases tardives regroupent les recombinaisons de classe ou CSR qui ont lieu uniquement sur le locus IgH et qui permettent l'obtention d'une immunoglobuline autre que l'IgM, adaptant ainsi les mêmes domaines de reconnaissance de l'Ag à une nouvelle fonction effectrice bien caractérisée d'une Ig non-IgM. Un autre type de remaniement est l'hypermutation somatique ou SHM qui permet, chez la souris et l'Homme, la maturation de l'affinité du BCR et des anticorps *via* l'introduction de mutations au niveau de la région variable du locus IgH augmentant ainsi la spécificité et l'affinité vis-à-vis d'un antigène donné (Sheppard et al., 2018). Dans certaines espèces tels que le poulet, le mouton ou encore le lapin, il semble particulièrement fréquent que ce soit plutôt des phénomènes de conversion génique qui puissent permettre la maturation d'affinité des régions variables.

Le type alternatif de remaniement évoqué plus haut comme abrogeant l'expression du locus IgH repose sur les mêmes enzymes et survient selon un timing voisin de celui de CSR et SHM, mais il aboutit cette fois à la perte d'expression du locus et a donc été surnomé « recombinaison suicide du locus » ou LSR (pour Locus Suicide Recombination) responsable de la mort des lymphocytes B (Péron et al., 2012).

3.1.1) Mécanismes des réarrangements VDJ du locus IgH pendant la phase précoce du développement des B

Les recombinaisons V(D)J ont lieu dans la moelle osseuse. Elles assemblent les gènes V, D et J. Les mécanismes de cette recombinaison VDJ pendant chaque stade de développement précoce des lymphocytes B dans la moelle osseuse sont illustrés dans la **Figure 4**. Les réarrangements VDJ commencent par l'implication du complexe recombinase: RAG1 et RAG2 (Recombination-Activated Gene). Schlissel et ses collègues ont montré qu'aucune recombinaison VDJ n'avait lieu chez des souris déficientes en l'une ou l'autre des protéines RAG, montrant leur importance critique pendant le développement des cellules B dans la moelle osseuse (Schlissel et al., 1993).

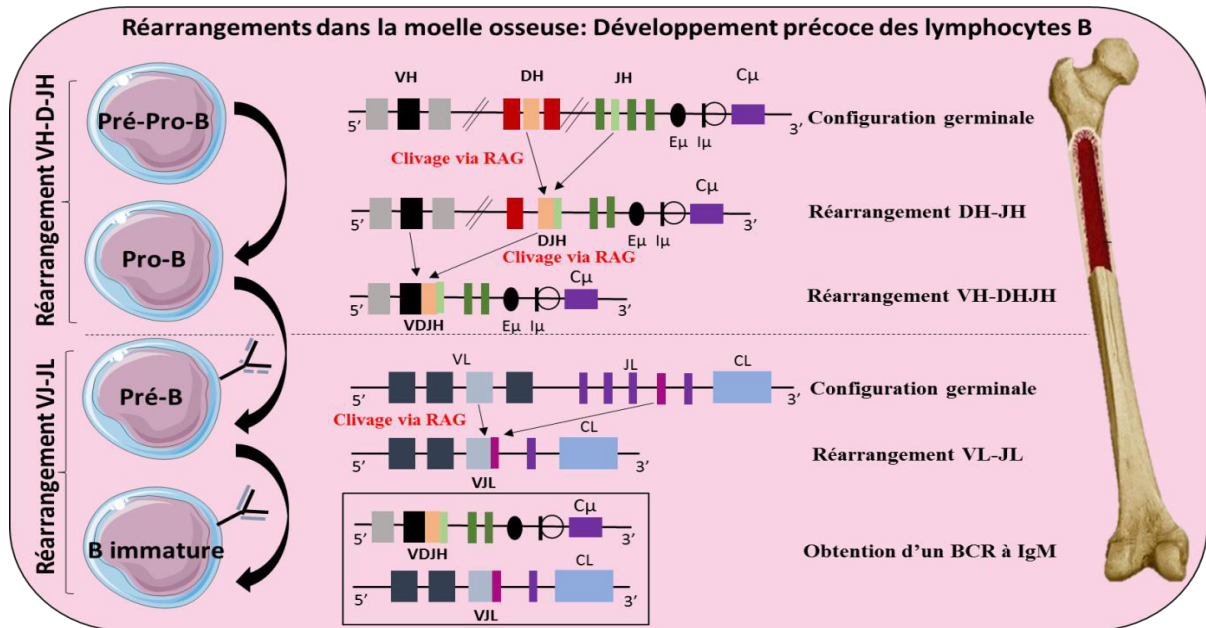


Figure 4 : Représentation schématique de la recombinaison V(D)J dans la moelle osseuse.

La création du répertoire antigénique commence dans la moelle osseuse en absence de tout antigène. La région variable du locus IgH située du côté 5' est dans une configuration germinale dans le stade pré-pro-B du développement des cellules B. Les premières recombinaisons V(D)J commencent durant la phase pro-B par les réarrangements D_H-J_H au premier temps suivi par des réarrangements V_H-DHJ_H . Par contre les premiers réarrangements V_L-J_L commencent pendant le stade pré-B. L'obtention d'un vrai BCR de type IgM n'a lieu que dans les cellules B immatures.

Les recombinaisons VDJ se produisent seulement entre les segments des gènes d'Ig flanqués de séquences conservées de signal de recombinaison ou RSS (Recombination Signal Sequence). Les RSS sont composées d'un heptamère conservé (7 nucléotides: CACAGTG) et d'un nonamère riche en A (9 nucléotides: ACAAAAACC) séparés par des espaceurs de 12 ou 23 pb non conservés. La recombinaison V(D)J se produit uniquement entre deux segments de gènes flanqués, respectivement, par des RSS qui contiennent 11 à 12 bases (RSS-12) et 22 à 23 (RSS-23) suivant alors une règle appelé la règle 12/23 (**Figure 5: gauche**) (Bassing et al., 2002). La règle 12/23 gouverne l'assemblage ordonné et correct des segments des gènes IgH pour donner des V-D-J bien associés, ou V-J dans des locus des chaînes légères d'Ig. Ainsi, la règle 12/23 sert à empêcher l'assemblage de la même classe de segments de gènes (V-V) ou de combinaisons incorrectes (c'est-à-dire VJ dans les locus de gènes contenant des segments D) (pour revue: Rodgers, 2017). Un cas exceptionnel utilisant deux segments D-D superposant ainsi 2 RSS pouvant prêter à des

combinaisons VDDJ est montré in-vivo et associé au développement de certaines maladies auto-immunes (Klonowski and Monestier, 2000; Klonowski et al., 1999; Watson et al., 2006).

Le processus de recombinaison V(D)J est divisé en deux phases: clivage et jonction (**Figure 5: droite**). Dans la réaction de clivage, les protéines RAG1 et RAG2 agissent ensemble comme une endonucléase; deux autres protéines accessoires du groupe à haute mobilité, HMG1 et HMG2, sont aussi impliquées pour aider les RAG dans leurs fonctions. Tout d'abord, les RAG1 et RAG2 se fixent sur les RSS-12 et RSS-23 aux bords des segments des gènes V, D et J. Les cassures double brin (DSB: Double-Strand Break) sont créées à la frontière du segment RSS et du segment codant. RAG1 introduit une coupure sur un simple brin générant ainsi un 3'-OH libre. RAG2 maintient le complexe RSS-RAG1 et attaque une autre séquence RSS donnant alors une structure en forme d'épingle à cheveux. Cette réaction donne, au niveau des RSS, deux extrémités codantes en épingle à cheveux et deux extrémités franches (Akamatsu and Oettinger, 1998; Fugmann, 2001; Pavlicek et al., 2008).

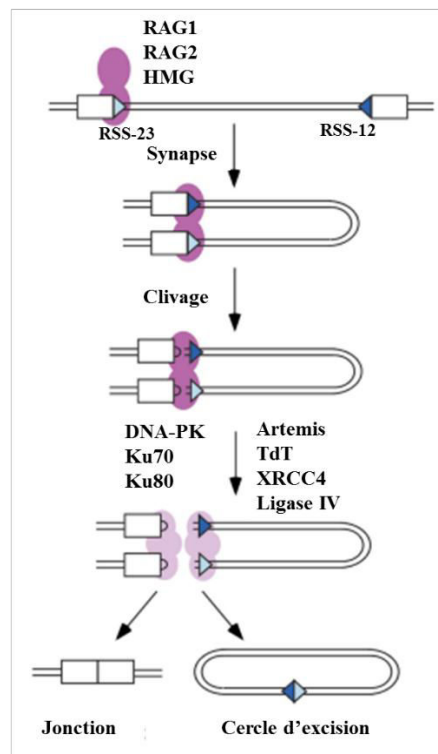
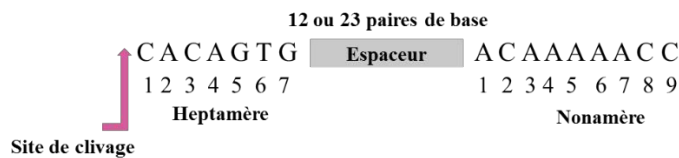


Figure 5 : Mécanistique des recombinaisons V(D)J.

Les segments codants V, D et J sont ciblés par des recombinases RAG1/2 et les HMG qui reconnaissent les séquences RSS comprenant des éléments heptamérique et du nonamérique séparés par des séquences spacers de 12 ou 23 pb. Une recombinaison efficace nécessite une paire RSS-12/RSS-23. Lors de la liaison des protéines RAG, la paire RSS 12/23 est réunie pour former un complexe synaptique. Le clivage de l'ADN s'ensuit formant ainsi des structures en épingles à cheveux (qui seront ensuite ouvertes par Artemis). Ensuite certains facteurs tels que Ku70/80 et DNA-PK sont recrutés à ce niveau. Des nucléotides N sont ensuite ajoutés par la TdT. Les jonctions sont enfin ligaturées par le complexe Cernunnos, XRCC4 et la ligase IV (Adapté de Roth and Roth, 2000 (gauche) et Krangel, 2003 (droite)).

Dans la seconde réaction de jonction et de réparation, les DSB créées au niveau de l'ADN seront refermées. Les réparations sont assurées dans les cellules par l'intermédiaire des enzymes appartenant à la machinerie de réparation des erreurs effectuées au niveau de l'ADN. Ce sont les enzymes de la voie NHEJ (*Non Homologous End Joining*) qui réparent les extrémités non homologues surtout dans les cassures double brin (pour revue: Malu et al., 2012; Sadofsky, 2001). Deux types de réparations sont impliqués: une pour les extrémités franches des RSS et l'autre pour les extrémités en épingle à cheveux des segments codants (V, D, J) (Krangel, 2003; Lewis, 1994).

3.1.2) Les réarrangements tardifs des loci d'immunoglobulines

Les immunoglobulines sont diversifiées par deux processus : SHM et CSR. Ces deux mécanismes nécessitent l'activité d'une enzyme de 24 kDa appelée AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), une enzyme spécifiquement exprimée dans les lymphocytes B activés et qui catalyse la désamination ciblée des résidus de désoxycytidine transformant une paire C:G en une paire U:G (pour revue : Di Noia and Neuberger, 2007). AID chez l'Homme est codée par le gène AICDA. Chez des souris et chez l'Homme déficients en AID, la SHM et la CSR sont bloquées *in vivo*. Ces individus ne présentant aucun phénotype majeur autre que leur syndrome hyper-IgM (avec production d'IgM non mutées et de basse affinité). L'expression de l'AID à un niveau mutagène est limitée aux cellules B du centre germinatif et aux cellules B induites *in vitro* en présence de LPS ou de CD40L soluble, suggérant un rôle de l'AID dans la différenciation terminale des cellules B (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). L'importance physiologique d'une expression à des stades B plus précoces, dans la moelle osseuse, reste l'objet de conjectures (Cantaert et al., 2015). Un certain nombre de travaux démontrent aussi aujourd'hui un rôle d'AID à plus bas niveau que dans la lignée B, dans le maintien de la pluripotence des cellules souches ou dans les choix de lignée hématopoïétiques, via une contribution à la déméthylation des cytosines (Kumar et al., 2013; Kunimoto et al., 2017).

3.1.2.1) Hypermutation somatique ou SHM

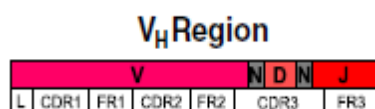
Après une activation antigène-dépendante, les cellules B matures diversifient leur répertoire des anticorps par le processus du SHM qui se produit au niveau du V-D-J dans laquelle plusieurs substitutions de nucléotides uniques sont introduites dans et autour du segment des gènes V (D) J réarrangés de manière productive fournissant alors un substrat structural pour la sélection d'Ig ayant une plus grande affinité pour l'antigène (Ag) (Almejun and Borge, 2017).

Au cours de la SHM, AID désamine les résidus cytidines présents dans les régions variables (IgV) des deux chaînes IgH et IgL. Il convient de noter que ces désaminations ciblent préférentiellement

des points chauds spécifiques ou "hotspots", y compris le motif RGYW / WRCY, où R représente les nucléotides G ou A, Y les nucléotides C ou T et W les nucléotides A ou T (Ameratunga et al., 2013). Par ce processus, AID produit des mésappariements uracile à guanine (U:G) dans les régions IgV. Des corrections sont assurées ensuite par des voies de réparation spécifiques, y compris la réparation d'excision de base et réparation de mésappariement (MMR). L'excision de la déoxyuridine par l'Uracile Glycosylase (UNG « *Uracil DNA-Glycosylase* »), crée un site abasique qui est pris en charge par la voie BER (*Base Excision Repair*) faisant intervenir des polymérases infidèles qui insèrent une des quatre bases à la place de dU (ce type de mutation est la transition ou transversion) (**Figure 6B**) (Bahjat and Guikema, 2017). D'autres glycosylases peuvent se substituer à UNG, la Thymine-DNA glycosylase, et SMUG1 ; par ailleurs on sait aujourd'hui que les voies BER et MMR ne sont pas simplement alternatives, mais éventuellement simultanées et en capacité de collaborer (Girelli Zubani et al., 2017).

Les mutations ponctuelles induites par AID dans les régions IgV génèrent des mutations de façon aléatoire et aveugle, simplement en fonction de la proximité des motifs ciblés ; par contre le processus de sélection cellulaire qui se déroule parallèlement en fonction des qualités de liaison du BCR pour l'antigène (et de sa fonctionnalité) va conserver principalement des remplacements d'acides aminés dans les régions déterminant la complémentarité (CDR : *Complementarity Determining Region*), mais en épargnant au maximum les régions charpentes (FR: *Framework Region*) qui régulent l'organisation structurelle des Ig (**Figure 6A**) (Odegard and Schatz, 2006).

A.



B.

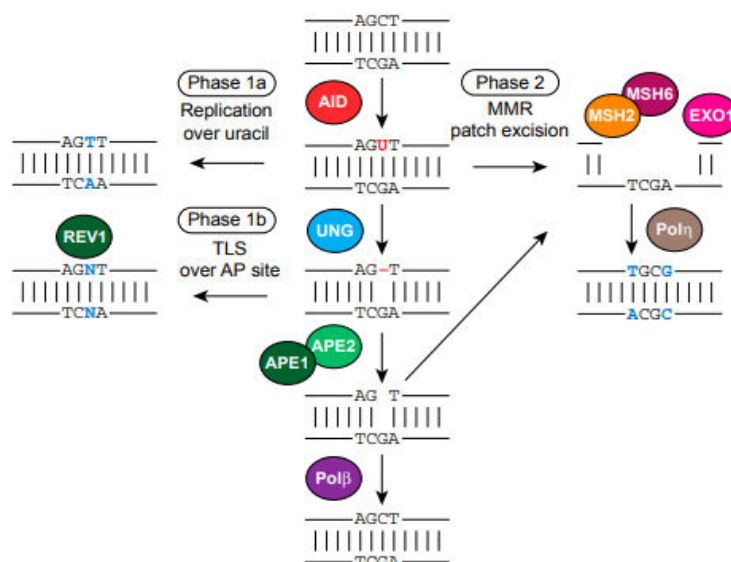


Figure 6: Mécanisme moléculaire de SHM.

A : Schéma de la région V de l'IgH contenant les segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J). Au sein de chaque réarrangement V (D) J, on distingue la région leader conservée (L) et les régions déterminantes complémentaires (CDR) en association avec des zones conservées appelées régions charpentes (FR) (Almejun et Borge, 2017).

B : Mutation induite par AID (représentée en rouge) détermine l'étendue de la SHM (mutations sont représentées en bleu). La réplication de l'ADN entraîne des mutations de transition C-à-T / G-à-A (SHM de phase 1a). Suppression de l'uracile par l'uracil-ADN-glycosylase (UNG : uracil-DNA-glycosylase) suivi par la réplication sur le site abasique (représenté par un trait rouge) par TLS (Translesion Synthesis). Les actions des ADN polymérase telles que REV1 aboutissent à des mutations de transition ou de transversion dans les paires de bases C / G (Phase 1b du SHM). Les mésappariements U:G provoqués par AID sont pris en charge par l'ADN Polβ qui déclenche une réparation fidèle des lésions après l'intervention de l'AP endonucléase 1/2 (APE1 / 2) qui clive les sites AP (apyrimidinique/apurinique, sites abasiques). Ces mésappariements peuvent aussi être prises en charge par les composants de la voie de réparation de mésappariement (MMR) tel que MSH2 et MSH6 (Mut S homolog 2 et 6). Le recrutement de l'ADN exonucléase 1 (EXO1) conduit à l'excision et le recrutement ultérieur de l'ADN polymérase η (Polη) qui, en présence d'erreurs, en particulier à A et T, entraîne des mutations A / T (phase 2 SHM) (Extrait de la revue: Bahjat and Guikema, 2017).

3.1.2.2) Commutation de classe ou CSR

Les régions constantes de différents isotopes d'immunoglobulines sont codées par des groupes distincts d'exons CH, qui sont organisés dans l'ordre Cμ, Cδ, Cγ, Cε et Cα dans le locus IgH. La commutation de classe (CSR) est cruciale pour la maturation de la réponse humorale et nécessite l'implication d'AID. Elle entraîne le remplacement du groupe d'exons Cμ pour IgM par Cγ, Cα ou Cε (dépendant de l'environnement cytokinique) donnant naissance à des IgG, IgA ou IgE dans lesquelles les régions variables sont inchangées (pour revue : Xu et al., 2012). Les cellules B peuvent changer la classe d'immunoglobuline *in vivo* après immunisation ou infection ou lors d'une activation appropriée en culture *in vitro*. Les cytokines sécrétées par les lymphocytes T et

d'autres cellules dirigent le changement d'IgM vers un autre isotype. L'engagement du récepteur CD40 (exprimé par les lymphocytes B) par son ligand CD40L (CD154) (exprimé surtout par les lymphocytes T) ou la liaison du lipopolysaccharide (LPS) sur le récepteur Toll-like 4 (TLR4) exprimé par les cellules B murines fournit une signalisation cruciale favorisant le mécanisme de CSR vers les isotypes IgG2b et IgG3. L'ajout d'interleukine 4 (IL4) au LPS utilisé pour activer les cellules B réoriente la commutation de classe vers les isotypes IgG1 et IgE tandis que l'ajout d'interféron- γ (INF- γ) induit le switch vers IgG2a. L'addition de TGF- β (Transforming Growth Factor) induit la CSR vers IgA ainsi que vers IgG2b (Stavnezer et al., 2008).

La CSR est le plus souvent une recombinaison d'ADN par délétion qui se produit entre les régions switch (S) qui sont situées en amont de tous les gènes constants (CH) à l'exception de C δ . Elle nécessite une transcription qui s'initie au niveau d'un promoteur de la région intermédiaire (I_H) de l'IgH et se poursuit à travers l'exon I_H, la région S et ensuite le groupe d'exons CH; ceci est connu comme la transcription germinale I_H-S-C_H (Xu et al., 2012). Pendant la recombinaison, des cassures doubles brins (DSB) sont générés dans la région donneuse S μ et une région switch acceptrice en aval. Ceci conduit à la juxtaposition de l'ADN de VDJ réarrangé avec un groupe d'exons CH en aval et la délétion de la séquence intermédiaire entre les régions S donneuse et acceptrice sous forme d'un cercle ou épisode (**Figure 7**). Notons que les régions S sont riches en G et possèdent une forte densité de motifs WGCW (A/TGCA/T), la cible préférée pour l'AID, qui initie la CSR en désaminant les cytosines au niveau de la région S, convertissant la désoxycytidine dC à dU. Les DSB sont finalement réparés par la voie classique non-homologue (NHEJ : Non-Homologous End-Joining) ou par la voie alternative A-EJ (pour Alternative End Joining) (processus de réparation de cassure double brin (DSB) qui se produit en l'absence de certains composants de la voie de réparation non homologue NHEJ), générant ainsi une région de microhomologie entre les extrémités de DSB jusqu'au fin de la jonction (DiMenna and Chaudhuri, 2016; Revy et al., 2000; Stavnezer and Schrader, 2014; Xu et al., 2012).

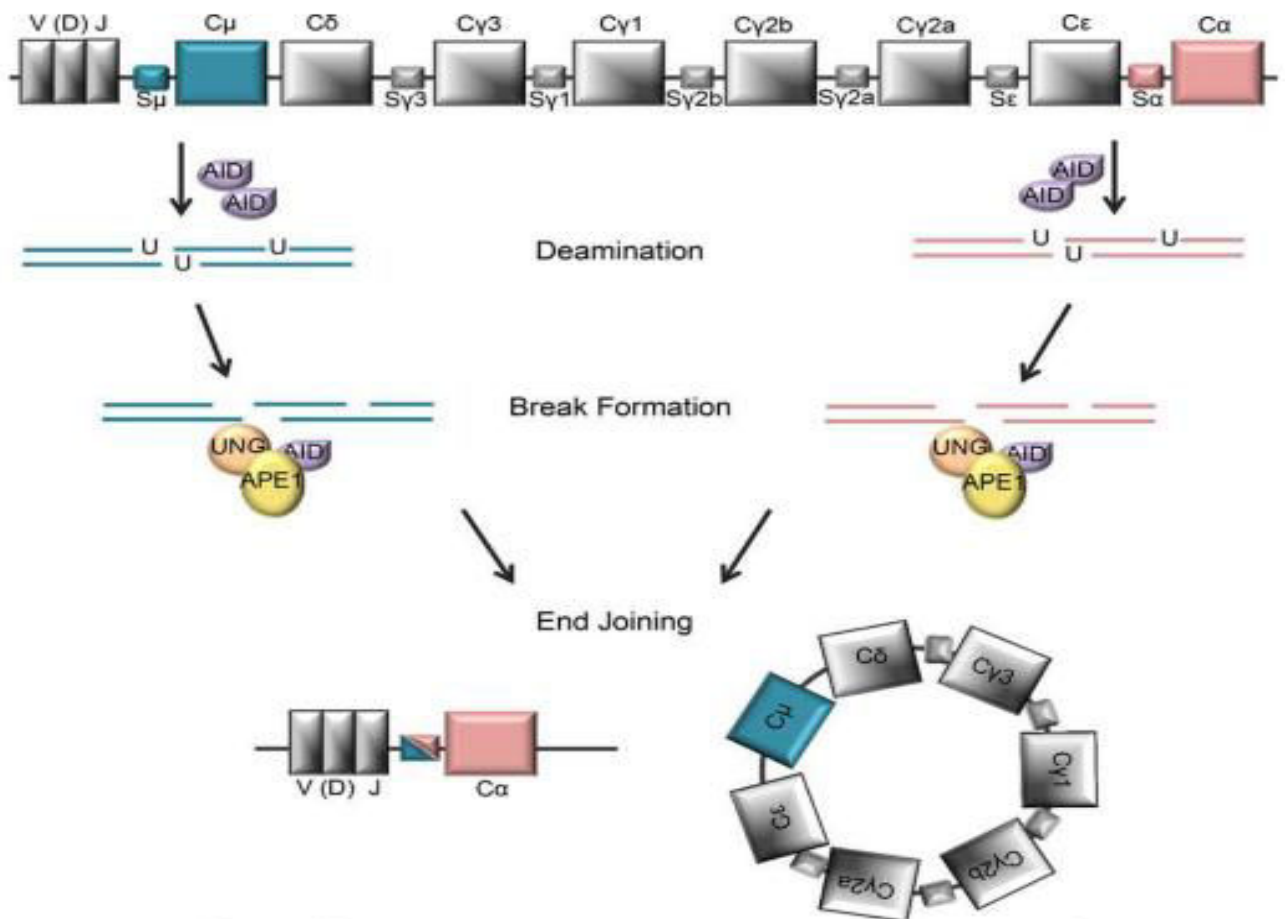


Figure 7 : Mécanisme de la commutation de classe (CSR) vers IgA.

Au cours de la CSR à IgA, AID désamine les régions S_{μ} et S_{α} déclenchant la formation de DSB. Les régions S_{μ} et S_{α} se recombinent permettant l'association du segment VDJ avec le gène C_{α} . La jonction terminale des DSB entre les régions S accepteur et donneur complète la CSR (en bas à gauche), tandis que l'ADN intermédiaire de la région C sera perdu sous forme d'épisme (en bas à droite) (Extrait de la revue: DiMenna and Chaudhuri, 2016).

CSR humaine

Chez l'Homme comme chez la souris, le même mécanisme de CSR décrit plus haut, se produit. Les gènes constants chez l'Homme sont dupliqués avec deux régions régulatrices 3'RR (3'RR1 et 3'RR2), les recombinaisons S_{μ} - S_x peuvent avoir lieu avec n'importe quel gène dupliqué. Contrairement à la souris, l'Homme exprime deux sous-classes d'IgA : IgA1 et IgA2. La CSR chez l'Homme fait intervenir l'équilibre de différences influences cytokiniques. Par exemple, il a été montré que IL4 seule est suffisante pour activer un bas niveau de l'enzyme AID mais que l'interaction CD40-CD40L est requise pour une production optimale de cet enzyme. Les cytokines produites par les différentes populations T (T reg producteurs d'IL10 et de TGF β , Th9 producteurs d'IL9, TH1 producteurs d'IL2 et d'IFN γ , TH2 producteurs d'IL4 et d'IL14, agissent de façon

concertée pour donner une polarisation de la réponse immune qui va profondément influencer le switch en agissant à la fois sur l'expression d'AID et sur l'accessibilité différentielle des différents gènes constants au sein du locus IgH.

Enfin la CSR donne un BCR bien fonctionnel qui a deux rôles principaux : le premier est la transduction du signal contrôlant le devenir des cellules B. Le second est la présentation d'un antigène aux cellules T activant ainsi la fonction effectrice des cellules B (Niiri and Clark, 2002). La liaison de l'antigène sur le BCR permet la transmission du signal au compartiment intracellulaire. Ensuite le signal se propage à l'intérieur des cellules B via des messagers secondaires activés par phosphorylation et l'interaction protéique. Enfin les facteurs de transcription impliqués dans la survie, l'apoptose et la différenciation des cellules B sont transloqués au noyau (pour revue : Dal Porto et al., 2004). Suite à la liaison d'un antigène à un BCR, la protéine kinase SYK et la protéine tyrosine kinase LYN sont tout d'abord activées. Ainsi LYN se retrouve associée au CD79a et CD79b entraînant alors la phosphorylation de ces derniers qui à leurs tours recrutent et activent les protéines BTK et autres qui sont illustrées dans la **Figure 8** (pour revue : Zhang et al., 2018).

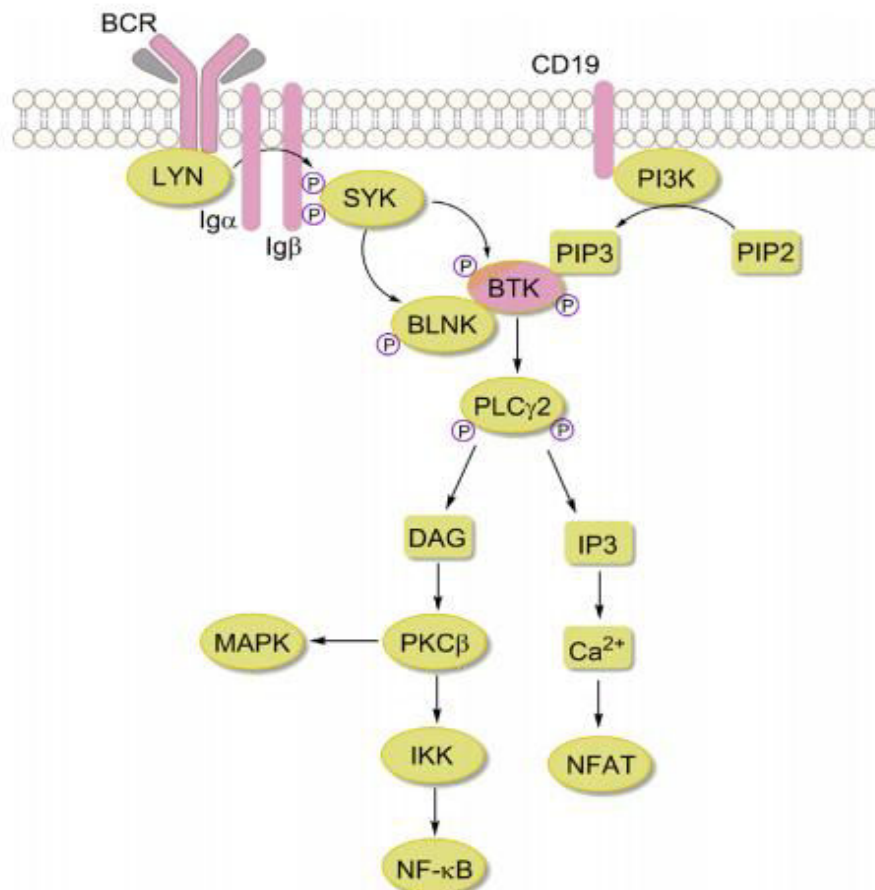


Figure 8: Cascade de transduction de signalisation via le BCR.

La transduction du signal commence suite à la liaison d'un ligand sur le BCR suivie par l'activation des deux sous-unités : Igα et Igβ. Trois protéines kinases sont ensuite activées : LYN, SYK et BTK. Les effecteurs en aval de la signalisation de BCR sont PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) et PLCγ2 (Phospholipase Cγ2). Les adaptateurs de BCR BLNK (B Cell Linker) connectent efficacement les kinases aux effecteurs. L'activation de PLCγ2 entraîne la libération de Ca²⁺ intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC), ces deux facteurs activent ensuite les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) et par la suite l'activation des facteurs de transcriptions comprenant le NF-κB (Nuclear factor-κB) et le NFAT (Nuclear factor of activated T cells) déterminant ainsi le destin des cellules B (Zhang et al., 2018).

3.1.2.2.1) La modulation du switch vers des Igs « rares » chez l'Homme (IgE, IgA2 et Pseudo-IgG)

Il existe un switch fréquent de l'expression d'IgM vers des sous-classes d'Ig majoritaires et « prototypiques » (au premier plan desquelles les IgG1, IgG3 ou IgA1). Notre unité s'intéressant de façon générale à la mécanistique de la CSR, nous avons voulu étudier les modalités d'expression d'Ig pour lesquelles la mise en évidence de cellules commutées est plus rare (IgE, IgA2...), voire précédemment réputée nulle (gène pseudo-gamma).

Les immunoglobulines se présentent sous deux formes principales: les anticorps solubles et les anticorps liés à la membrane (BCR). L'épissage alternatif régule la production d'anticorps sous forme sécrétés ou sous forme de BCR.

L'IgM est la première classe d'Ig apparaissant pendant l'ontogenèse et la seule produite par toutes les espèces de vertébrés (Fellah et al., 1992). Les IgM représentent environ 5-10% des anticorps sériques et sont les premiers anticorps produits lors d'une réponse immunitaire. L'IgM humaine est présent à ~1-2 mg / ml dans le sang avec une demi-vie de ~5 jours. L'IgM sécrétée existe sous forme pentamérique et c'est cette structure multimérique qui confère à l'IgM sa capacité de former des interactions fortes avec plusieurs partenaires (**Figure 9**). L'IgM existe aussi sous forme monomérique sur la membrane des lymphocytes B (pour revue: Ehrenstein and Notley, 2010). Pentamérique, elle semble être une molécule en forme de champignon avec une région protubérante centrale, qui lie le composant du complément C1q, facilitant ainsi l'élimination des cellules apoptotiques (Czajkowsky and Shao, 2009). La région constante est constituée de quatre domaines (CH1 à CH4). Les IgM sont produites par deux populations différentes de lymphocytes B: les cellules B1 synthétisent l'IgM appelée naturelle sans nécessité d'immunisation préalable et avant que les cellules B aient subi une hypermutation somatique, donc avec une faible affinité pour les Ag. Les cellules B de la zone marginale produisent aussi surtout des IgM, notamment affines pour les polysaccharides de capsules d'un certain nombre de germes. Alors que ces cellules B de la zone marginale ont des BCR non mutés chez la souris, ils sont le plus souvent porteurs de mutation chez l'Homme (Reynaud et al., 2012). Chez la souris comme chez l'Homme, la population des B de la zone marginale semble correspondre à une voie de différenciation propre et NOTCH2-dépendante (Descatoire et al., 2014). Les cellules MZ expriment typiquement des niveaux élevés d'IgM, CD21, CD1b, CD9 avec des niveaux faibles à négligeables d'IgD, CD23, CD5 et CD11b qui aident à les distinguer phénotypiquement des cellules B folliculaires (FO) et des B1. Il est probable que les cellules B des zones marginales spléniques sont une source importante d'anticorps spécifiques des lipides (pour revue : Pillai and Cariappa, 2009). De manière similaire aux cellules B1, les cellules MZ peuvent être rapidement recrutées dans les réponses immunitaires précoces d'une manière indépendante de cellules T (Dunn-Walters et al., 1995). Enfin, les lymphocytes conventionnels, B2, produisent des IgM en réaction à des stimuli antigéniques. L'IgM induite par l'immunisation diffère de l'IgM naturelle par l'affinité, le répertoire de spécificité et par la fonction (pour revue: Klimovich, 2011).

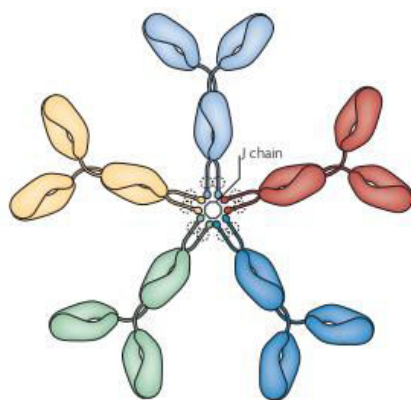


Figure 9: Représentation schématique de la structure pentamérique d'IgM.

La structure pentavale de l'IgM est montrée. La chaîne de jonction (J) favorise la formation du pentamère. La partie centrale du pentamère fait saillie pour maximiser les interactions avec les ligands (Extrait de la revue: Ehrenstein and Notley, 2010).

IgD est une classe d'immunoglobuline fréquemment (et surtout) exprimée à la surface des lymphocytes B. Tout en étant un « BCR fréquent », notamment sur les cellules B matures et naïves, l'IgD se fait beaucoup plus rare sous sa forme sécrétée, qui représente moins de 1% d'immunoglobuline plasmatique totale chez l'Homme. Sa concentration sérique est seulement 30mg/L chez un adulte. A la membrane, elle est généralement co-exprimée avec l'IgM. IgD a la même structure de base qu'une IgG mais avec une région charnière plus étendue qui est sensible à la digestion protéolytique (Ishioka et al., 1987). Après avoir quitté la moelle osseuse pour coloniser les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B acquièrent des IgD de surface de la même spécificité que les IgM par épissage alternatif d'un pré-ARNm (Maki et al., 1981). Au contraire, dans les plasmocytes produisant de l'IgD, qui sont surtout fréquents au niveau des amygdales et de tissus lymphoïdes annexés aux muqueuses, l'IgD semble souvent produite non par épissage alternatif d'un pré-messenger mais, malgré l'absence de région switch vraiment bien caractérisée, par CSR impliquant l'AID (en outre indépendamment du super-enhancer IgH 3'RR) (Rouaud et al., 2014). Ces IgD circulantes interagissent avec les basophiles par l'intermédiaire d'un récepteur calcique induisant ainsi des facteurs antimicrobiens, opsonisants, inflammatoires et immunostimulants tels que la cathélicidine, la pentraxine-3 (PTX3), l'IL-1 et l'IL-4 (Chen et al., 2009).

Dans la suite de cette partie, les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines humaines (IgG: IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4; IgA: IgA1) seront rapidement décrites. Nous consacrerons plus d'attention aux immunoglobulines rares sur lesquelles nous avons travaillé pendant cette thèse (IgE, IgA2 et la recherche d'une pseudo-IgG).

i. IgE comme immunoglobuline rarement exprimée dans l'organisme

L'IgE est une classe d'Ig présente uniquement chez les mammifères et qui a été découverte et caractérisée en 1966 par Kimishige Ishizaka. C'est la dernière classe d'Ig découverte du fait de sa faible quantité dans les fluides corporels et de la rareté des cellules IgE+ *in vivo*. Sa concentration sérique est normalement <1µg/ml, sa demi-vie est généralement très courte (~2 jours) en comparaison avec les autres isotypes.

Chez les proto-mammifères, l'IgE a évolué comme l'IgG à partir d'une molécule « reptilienne » ancestrale, l'IgY, avec une structure d'IgE bien conservée (domaines constants, positions des ponts disulfures et site de N-glycosylation de domaine CH3) ce qui permet sa reconnaissance par son récepteur de haute affinité (FcεRI) (pour revue : Laffleur et al., 2017; Warr et al., 1995). Contrairement aux IgG, les IgE ont quatre domaines de chaîne lourde constants (Cε1-Cε2-Cε3-Cε4), le deuxième domaine CH2 agit comme région charnière (**Figure 10**).

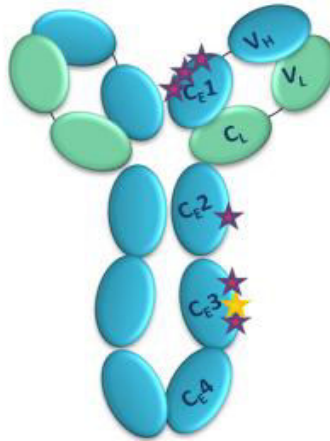


Figure 10: Représentation schématique d'Immunoglobuline E (IgE).

IgE est composé de deux chaînes lourdes identiques comprenant un domaine variable (VH) et quatre domaines constants (Cε1, Cε2, Cε3 et Cε) avec 7 sites de N-glycosylation (Extrait de la revue: Gilgunn et al., 2016).

Le promoteur Iε est impliqué dans la régulation du switch vers l'IgE du fait de la présence des sites de fixation de facteurs de transcription spécifiques. Il permet la fixation d'E2A, AP1, STAT6, PU.1, Pax5 et NF-κB. La transcription Iε-Sε qui précède le switch vers IgE est induite par la phosphorylation et la dimérisation de STAT6 activée par IL4 alors que la fixation de CD40 active de manière synergique NF-κB (Monticelli and Vercelli, 2001). En revanche, plusieurs régulateurs négatifs inhibent la transcription des régions S et par suite le switch. Bcl6, fortement exprimé en centre germinatif, inhibe le switch vers IgE par compétition avec STAT6 sur les mêmes sites de liaison. Id2, en séquestrant E2A et Pax5, inhibe la transcription d'Iε. Le TGF-β, l'IFNγ et l'IL10

contribuent également à ces régulations négatives chez l'Homme par inhibition de la liaison des protéines HoxC4 et Oct-1 sur le promoteur I ϵ (Sugai et al., 2003).

La structure de la région S ϵ contribue elle-même à la régulation et la limitation du switch vers IgE, puisqu'elle est la région la plus courte et la moins répétitive des régions S (2 kb seulement, alors que S γ 1 mesure environ 10 kb). Ainsi, le remplacement de S ϵ par S μ ou l'insertion de C ϵ en aval de S γ 1 accroît la production d'IgE (Lübber et al., 2013; Misaghi et al., 2013).

Le switch vers IgE peut être direct (S μ en S ϵ) ou séquentiel (d'abord S μ à S γ 1 puis à S ϵ) (**Figure 11**) (YOSHIDA et al., 1990). Le switch direct ne semble permettre que la production d'IgE à faible affinité pour l'antigène qui, en saturant les récepteurs Fc ϵ R, pourraient alors jouer plutôt un rôle inhibiteur des réponses immunes spécifiques induites par les IgE de haute affinité (surtout générées par switch séquentiel). Wu et ses collègues ont montré qu'une faible activation induit le switch direct vers IgE tandis qu'un niveau plus élevé favorise le switch vers IgG1, suivi d'un switch secondaire vers IgE (Wu et al., 2017).

Une fois que le switch vers IgE a eu lieu, les lymphocytes B expriment des transcrits des chaînes lourdes membranaires (mIgE), contenant les quatre exons constants (C ϵ 1 à C ϵ 4) et deux exons qui codent un domaine d'ancrage membranaire (M1 et M2) tandis que les cellules plasmocytaires produisent des transcrits sécrétés dépourvus de ces exons membranaires (pour revue : Laffleur et al., 2017; Zhang et al., 1992).

Contrairement aux autres gènes d'Igs, les exons membranaires qui codent la chaîne lourde des IgE sont dépourvus de sites de polyadénylation AATAAA (polyA) en aval du dernier exon membranaire réduisant alors probablement l'efficacité de maturation des ARNm correspondants, et donc le taux d'expression des mIgE tandis que la forme sécrétoire des transcrits reste ainsi majoritaire (Karnowski et al., 2006).

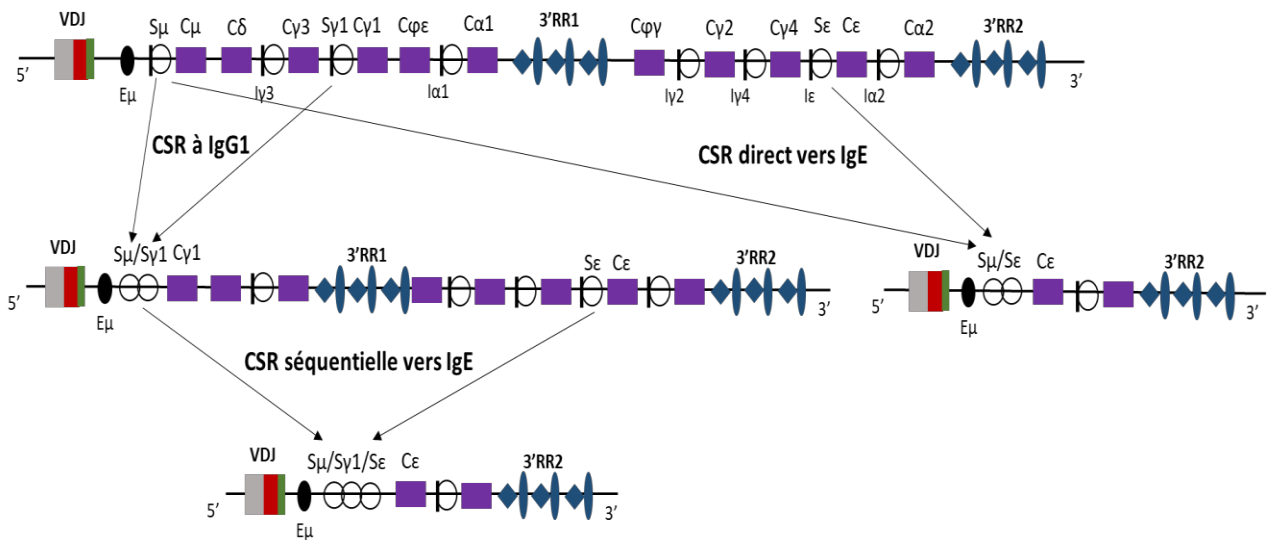


Figure 11 : Mécanismes de CSR vers l'immunoglobuline E (IgE).

En haut : le locus IgH humain avec la VDJ réarrangée. Au milieu : la CSR vers IgG1 montrant les jonctions $S_{\mu}/S_{\gamma 1}$ et la CSR direct vers IgE montrant les jonctions S_{μ}/S_{ϵ} . En bas : La CSR séquentielle vers IgE avec les jonctions $S_{\mu}/S_{\gamma 1}/S_{\epsilon}$. Les régions switch (S) sont représentées par des cercles blancs. Les promoteurs (I) sont représentés par des tirets verticaux noirs précédant les régions S (Adapté de la revue : Laffleur et al., 2017).

Parmi les rôles principaux des IgE, figure la réponse anti-parasitaire et surtout contre les helminthes (larges organismes multicellulaires) tels que *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, and *Fasciola hepatica*. Les réponses IgE contre les helminthes entraînent une polarisation TH2 et une élévation du taux d'IgE accompagnée par une éosinophilie (Capron and Capron, 1994). Ces IgE promeuvent l'ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) permettant ainsi la destruction des parasites. Les IgE ont aussi un rôle majeur dans la protection contre les venis et certaines toxines (Marichal et al., 2013; Palm et al., 2013).

Malheureusement les IgE sont aussi impliquées dans les réactions allergiques immédiates (asthme, allergie alimentaire...) qui peuvent parfois conduire jusqu'au choc anaphylactique. Lors de la phase de sensibilisation des réactions allergiques, certaines interleukines sont synthétisées (IL4, IL5, IL13...). En particulier en présence d'IL-4, les cellules T naïves activées par les cellules présentatrices d'antigènes se différencient en cellules Th2. Les lymphocytes B ayant reconnu l'allergène s'activent ensuite avec l'aide des Th2 spécifiques (aussi en présence d'IL-4) et libèrent d'IgE qui fixent sur leurs récepteurs de haute affinité FcεR1 exprimé par les mastocytes et les basophiles. La ré-exposition à l'allergène active les mastocytes et les basophiles qui produisent des médiateurs biogéniques (histamine, protéases, leucotriènes et les cytokines) responsables des symptômes d'hypersensibilité allergique de type 1. Plus tard, IL-5, la cytokine responsable de

l'activation, de la survie et du recrutement tissulaire des éosinophiles est produite (**Figure 12a**) (pour revue : Kucuksezer et al., 2013). Les traitements actuels ciblent les médiateurs (anti-histamines et anti-leucotriènes et corticostéroïdes) libérés par les mastocytes suite à la liaison des allergènes aux IgE fixées sur le récepteur FcεR1. D'autres stratégies neutralisent les IgE sécrétées (immunothérapie passive, anti-IgE) (Luger et al., 2010). Les traitements de fond reposent sur la désensibilisation visant à inverser la polarité de la réponse immune vers une orientation Th1. Les cellules T de polarisation Th9, qui potentialisent les réponses IgE, constituent aussi une cible thérapeutique (Xiao et al., 2018). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) peuvent également être efficaces pendant le traitement des allergies. Ces cellules sont FoxP3+CD25+ et jouent un rôle inhibiteur des réponses de type IgE. Plusieurs voies de suppression sont décrites. Les cellules Treg suppriment les cellules Th2 et leur production d'interleukine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 qui sont indispensables à la fois pour la différenciation, la survie et l'activité des mastocytes, des basophiles, des éosinophiles et des cellules productrices de mucus. L'IL-10 et le facteur de croissance transformant (TGF-β) suppriment la production d'IgE tout en induisant l'IgG4, qui est un isotype d'immunoglobuline qui n'est pas impliquée dans les réactions inflammatoires (**Figure 12b**) (Ozdemir et al., 2009).

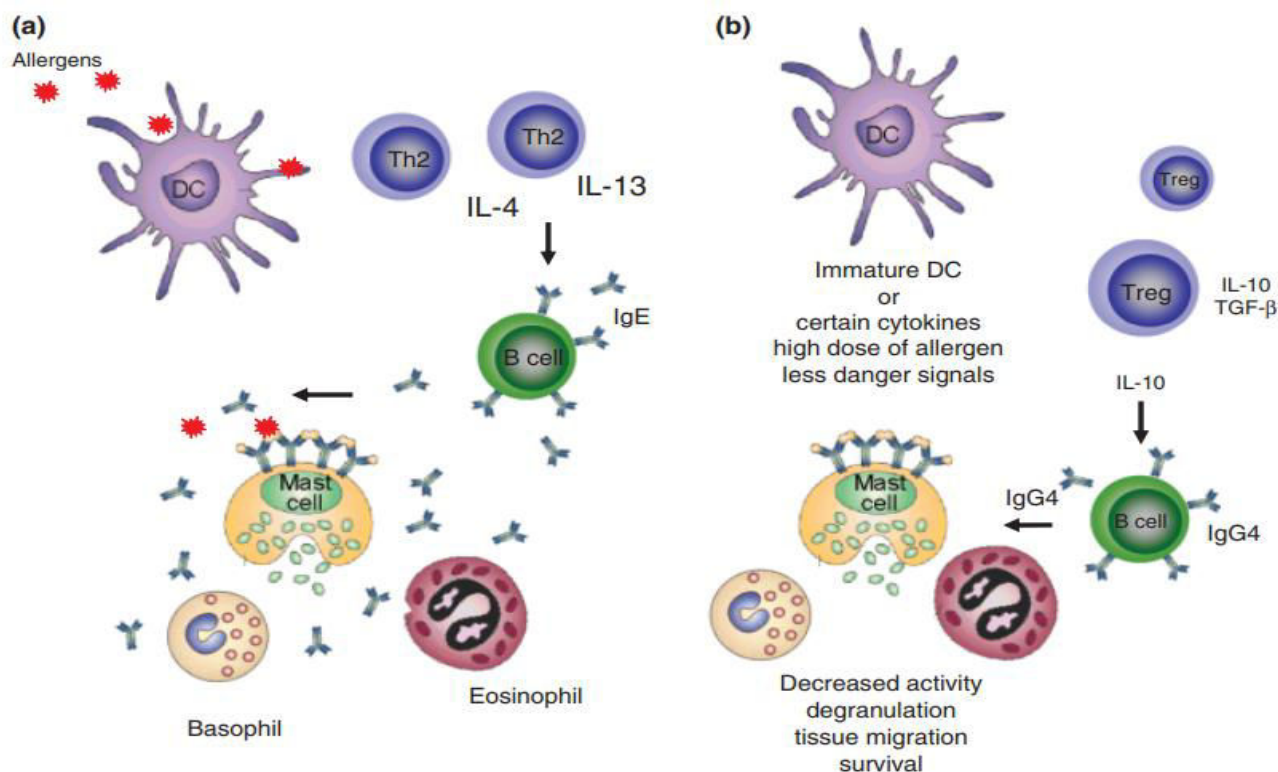


Figure 12 : Mécanismes d'allergie impliquant les cellules Th2.

a) Les cellules Th2 sont induites suite à la présentation d'allergène par les cellules dendritiques (DC). Les cellules Th2 produisent les cytokines IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13. Les cellules B produisent ensuite des IgE qui se lient sur des récepteurs Fcε de haute affinité sur les mastocytes et les basophiles. C'est la sensibilisation.

b) Les réactions allergiques peuvent être régulées par les lymphocytes T régulateurs (Treg). La présentation de l'antigène par des DC partiellement matures induit la formation de cellules Treg qui produisent l'IL-10 et le TGF-β qui suppriment la production d'IgE tout en augmentant simultanément la production d'isotypes IgG4 non-inflammatoires (Extrait de: Ozdemir et al., 2009).

ii. IgA2 : l'IgA la moins abondante du sérum... (l'IgA d'en bas !)

L'IgA est un isotype d'immunoglobuline majoritairement produit au niveau des muqueuses, des intestins et le lait maternel. Elle constitue une première ligne de défense contre les agents infectieux et les toxines qui envahissent l'organisme. Chez l'Homme, il existe deux sous-classes d'IgA : IgA1 et IgA2 qui se distinguent par leur distribution dans l'organisme et par leur structure. En termes de distribution dans l'organisme, les IgA circulantes sont constituées à plus de 85% d'IgA1 (2-3mg/ml) et de seulement 10-15% d'IgA2 (Conley and Koopman, 1983) alors qu'au niveau des muqueuses, les cellules produisant les IgA1 et les IgA2 sont présentes en proportions variées : les cellules IgA1 prédominent au niveau du tractus respiratoire et des muqueuses digestives hautes, les cellules IgA2 sont au contraire abondante au niveau colique (Pabst, 2012). Contrastant avec la domination des IgA1 dans les sérums, les deux sous-classes d'IgA humaines sont ainsi globalement présentes à des taux voisins dans les sécrétions. En termes de structure, la

différence entre ces isotopes se trouve en particulier au niveau de la région charnière qui est plus longue dans l'IgA1 que dans l'IgA2 (délétion de 13 acides aminés dans la région charnière IgA2 par rapport à IgA1) (Woof and Kerr, 2004). Les IgA sériques sont principalement de nature monomère tandis que les IgA dans les sécrétions (IgA sécrétoire ou S-IgA) sont principalement dimériques. Chez l'Homme, l'IgA1 et l'IgA2 sont codées par deux gènes différents. Deux allotypes d'IgA2 sont décrites : IgA2m(1) et IgA2m(2) (m pour monomérique). La différence discrète de séquence entre ces deux allotypes induit un changement des ponts disulfures qui relient les chaînes lourdes et les chaînes légères. Ils sont absents dans la forme IgA2m(1) (dont les interactions entre les deux chaînes lourdes et légères sont assurées par des liaisons non-covalentes) alors qu'ils existent toujours dans la forme IgA2m(2). L'IgA1 et l'IgA2 portent toutes les deux plusieurs sites de glycosylation; la région C-terminale de ces deux Igs comportent 18 acides aminés additionnels par rapport aux Igs qui ne polymérisent pas (cas des IgG) impliquées dans la formation des dimères en s'associant avec la chaîne de jonction (J). Ainsi la dimérisation donne une stabilité et une efficacité plus importantes aux IgA (Woof and Kerr, 2006). Les structures des différentes formes d'IgA sont illustrées dans la **Figure 13**.

La région charnière d'IgA1 contient trois à cinq groupes carbohydrates liés à l'atome oxygène (O-linked carbohydrate) absents dans l'IgA2. En outre, IgA1 a deux sites d'addition de carbohydrates N-liés (lié à l'atome azote N) dans CH2 (Asn₂₆₃) et dans CH3 (Asn₄₅₉). Tous les allotypes d'IgA2 ont deux sites supplémentaires N-glycosylation, dans CH1 (Asn₁₆₆) et dans CH2 (Asn₃₃₇). L'allotype IgA2m (2) a un cinquième site de N-glycosylation dans CH1 (Asn₂₁₁) (**Figure 14**). Les variations de la structure de glycosylation des différentes formes d'IgA peuvent affecter leurs propriétés biologiques. Une clairance plus rapide des IgA2 sériques semble en partie responsable de la plus faible présence de cette sous-classe par rapport aux IgA1 (Rifai et al., 2000). Cette différence de clairance tient surtout à une fixation accrue des IgA2 à des récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP) intra-hépatiques ; les O-glycosylations présentes dans la région charnière d'IgA1 diminuent sans doute aussi sa clairance car la délétion dans cette région montre une élimination plus rapide que celle de l'IgA1 native (Rifai et al., 2000).

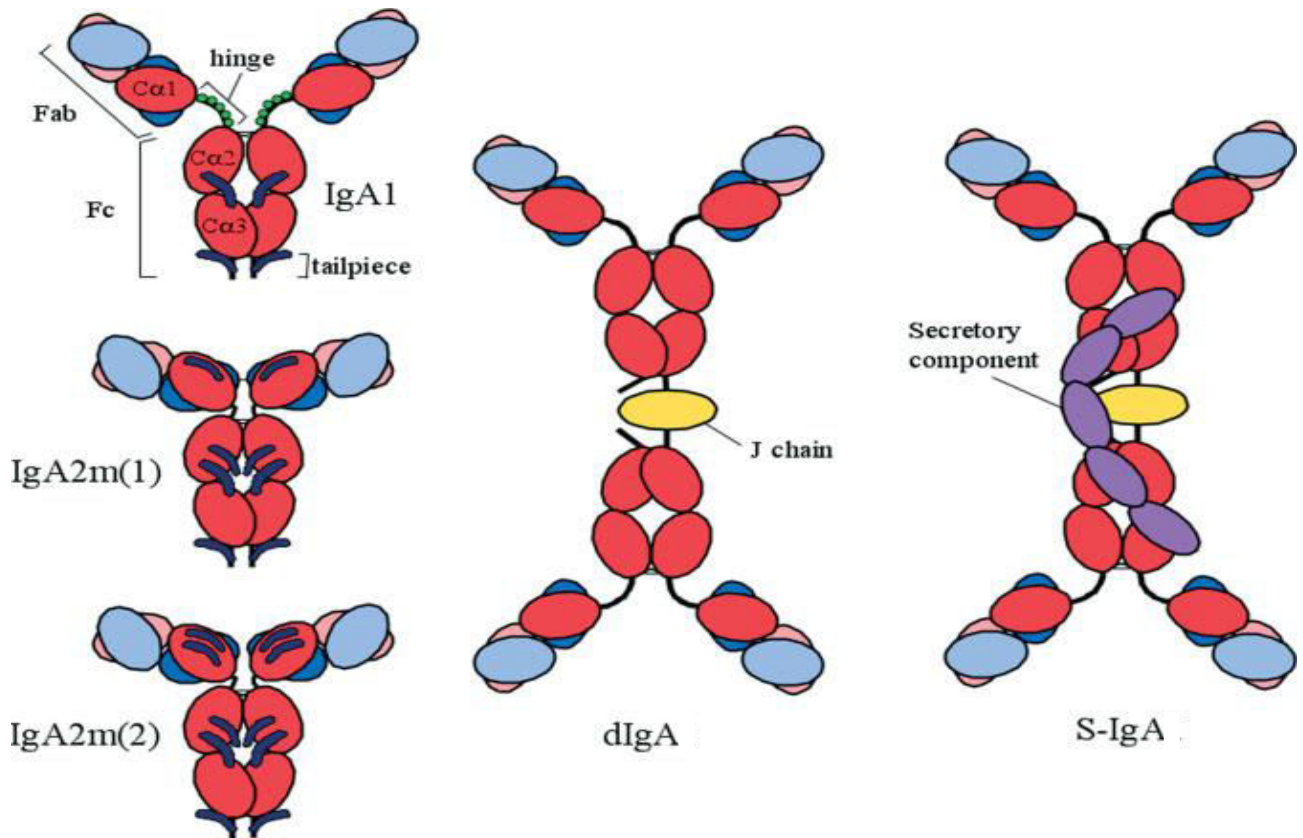


Figure 13: Représentation schématique des différentes formes d'IgA chez l'Homme

Les régions constantes de la chaîne lourde sont représentées en rouge tandis que les régions variables de la chaîne lourde sont en rose. Les régions constantes de la chaîne légères sont indiquées en bleu foncé et les régions variables de la chaîne légères sont en bleu clair. Les chaînes J dans les formes dimériques d'IgA sont en jaune (Woof and Kerr, 2006).

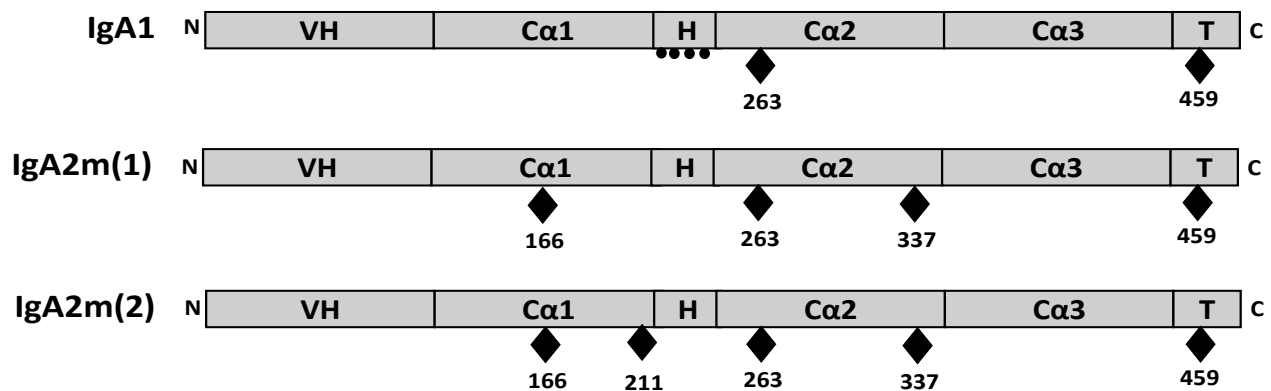


Figure 14 : Sites de glycosylation des chaînes lourdes d'IgA1, IgA2m (1) et IgA2m (2).

Les sites de glycosylations des IgA1, IgA2m(1) et d'IgAm(2) sont représentés par des losanges noirs (Adapté de Woof, 2013).

Dans les plasmocytes muqueux, l'IgA est plutôt produite sous forme dimérique ou polymérique. Cette forme interagit ensuite avec un petit polypeptide dérivé de cellules plasmatiques appelé Jonction (J) pour former les dimères d'IgA (dIgA) circulants (Lycke et al., 1999). Les IgA dimériques ou polymériques une fois sécrétées dans le milieu intérieur peuvent reconnaître au niveau des muqueuses le récepteur d'immunoglobulines polymériques (pIgR), exprimé sur la surface muqueuses basolatérale des cellules épithéliales intestinales. En traversant ces cellules par le processus de transcytose, pIgR facilite la libération d'IgA sécrétoire (SIgA) sur la surface de l'intestin. La SIgA résultante comprend un polypeptide dérivé de pIgR appelé composant sécrétoire (SC) qui augmente la stabilité de SIgA dans la lumière intestinale et ancre le SIgA dans le mucus (pour revue : Gutzeit et al., 2014). De façon intéressante, il existe pour l'IgA2 seulement, un mécanisme de transport inverse pouvant ramener des complexes Antigène-IgA2 depuis le pôle apical des cellules muqueuses jusqu'au milieu intérieur, notamment en impliquant le récepteur Dectin-1 (Rochereau et al., 2013)

Le récepteur ASGP ou ASGP-R (Asialoglycoprotein Receptor), qui est exprimé par les cellules hépatiques, reconnaît les IgA sériques, il les internalise et les dégrade. Ce mécanisme de clairance permet une élimination plus importante et plus rapide des IgA2 sériques par rapport aux IgA1 par des mécanismes mal connus. La moitié de la quantité d'IgA1 est retirée du sang après 35 min de sécrétion. En revanche, la moitié des IgA2m (1) et des IgA2m (2) (décrit ultérieurement) sont éliminée après 5 et 4 min respectivement (Rifai et al., 2000; Tomana et al., 1988).

L'expression d'IgA dans les lymphocytes B est contrôlée à la fois par des cytokines et par des interactions avec les lymphocytes T.

Régulation de la CSR vers IgA : Les cellules épithéliales, positionnées à l'interface entre la lumière intestinale riche en antigène et la lamina propria riche en cellules B, produisent de nombreux médiateurs qui induisent des IgA, y compris l'IL-10 et du TGF β . Chez l'Homme, les colonocytes expriment BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) qui à leur tour régulent aussi l'expression d'IgA. Associé à l'IL-10, APRIL déclenche la CSR vers IgA2 dans les lymphocytes B, suggérant que les cellules épithéliales sont le centre d'intérêt dans l'induction de la production d'IgA2 au niveau des sites muqueux colonisés par un grand microbiote, comme le côlon. Au niveau de ces sites, les IgA2 peuvent être plus efficaces que les IgA1, peut-être parce que ces IgA2 sont plus résistantes que les IgA1 à la digestion enzymatique par les protéases bactériennes (pour revue : Cerutti, 2008).

Le switch vers les isotypes d'IgA peut être direct ou séquentiel. Des études réalisées sur les lymphocytes B humains ont suggéré que l'engagement du CD40 par le ligand CD40L induit la

production de TGF- β endogène et d'IL-10, l'expression des transcrits I α 1-C α 1 et I α 2-C α 2 ainsi que les transcrits VDJ-C α 1 et VDJ-C α 2 et la sécrétion d'IgA. Ces événements sont associés non seulement au switch direct de S μ -S α mais également à la recombinaison séquentielle S μ -S γ /S γ -S α (Zan et al., 1998).

Alors que des différences de structure et de signalisation ont été antérieurement décrites par l'équipe pour les BCR de classe IgA2 et IgA1 (Leduc et al., 1997), un des objectifs posés au début de cette thèse était de rechercher des propriétés spécifiques des lymphocytes B porteurs de ces 2 classes de BCR, en comparant 2 modèles d'animaux knock-in développés par l'équipe et exprimant des BCR chimériques représentatifs des 2 sous-classes.

iii. Pseudo-IgG : une nouvelle sous-classe d'IgG chez l'Homme ?

Les immunoglobulines G ou IgG sont des anticorps de taille d'environ 150 kDa. Chez l'Homme, il existe quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 ; dont la nomenclature suit l'ordre décroissant d'abondance (60 %, 32 %, 4 % et 4 %, respectivement). Même si leur composition en acides aminés est très similaire (environ 90% de similitude), la demi-vie, la liaison à l'antigène, l'activation des cellules effectrices ainsi que le recrutement de complément varient d'une sous-classe d'IgG à une autre. Les chaînes lourdes de toutes les sous-classes sont constituées de trois domaines constants (CH1, CH2, CH3) (**Figure 15**). Les variations sont trouvées plutôt dans la région charnière qui confère la flexibilité de l'anticorps et dans la partie supérieure du domaine CH2 proche de cette région (CH2 est le domaine de fixation du C1q de complément) (pour revue : Vidarsson et al., 2014).

Ces quatre sous-classes d'IgG sont codées par des gènes C γ 1, C γ 2, C γ 3 et C γ 4. Au niveau génétique un cinquième gène ψ G ou pseudo-IgG est localisé directement après la région 3'RR1 chez l'Homme dont l'expression n'a été jamais détectée et a été postulée comme impossible et nulle, du fait de l'absence d'une région switch adéquate précédant le gène ψ G (Bensmana et al., 1988). Son expression ainsi que son rôle font partir de mon sujet de thèse caractérisant les immunoglobulines rares.

Avant d'aborder le pseudo-IgG, les caractéristiques des autres sous-classes d'IgG seront décrites (Tableau 1).

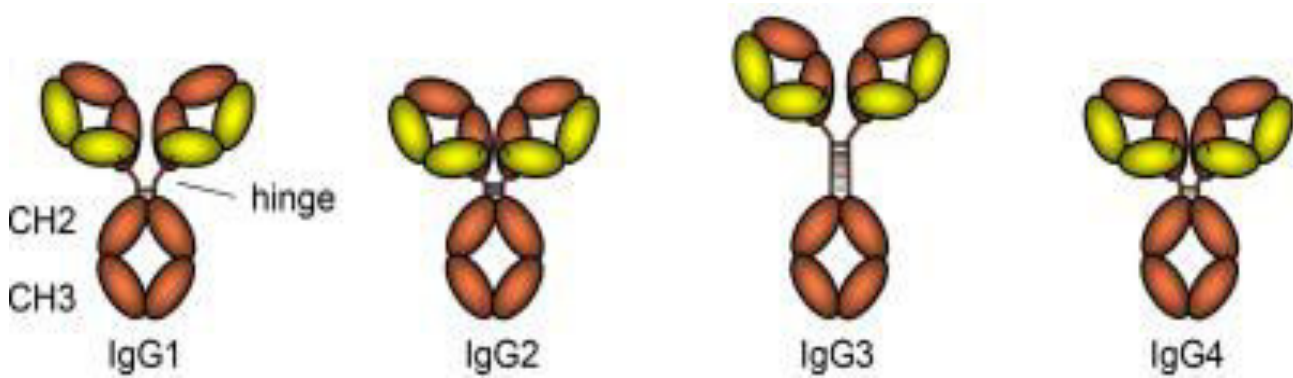


Figure 15: Les différentes sous-classes d'IgG.

Les quatre sous-classes d'IgG: IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4, les différentes chaînes lourdes et légères et la longueur des régions charnières sont représentés (Vidarsson et al., 2014).

- ❖ **IgG1** : Les réponses aux antigènes protéiques solubles et aux protéines membranaires induisent principalement la production d'IgG1 avec des niveaux plus faibles des autres sous-classes. L'IgG1 peut interagir avec tous les récepteurs FcγR (Bruhns et al., 2009) ainsi qu'avec le C1q de complément. Puisque que l'IgG1 est normalement la sous-classe la plus abondante, le manque d'IgG1 peut entraîner une diminution des taux d'IgG totaux (hypogammaglobulinémie) (Ferrante et al., 1990). La région charnière d'IgG1 comprend 15 acides aminés et elle est très flexible. La demi-vie d'IgG1 est de 21 jours (Roux et al., 1997).
- ❖ **IgG2** : Les réponses aux antigènes polysaccharidiques capsulaires bactériens peuvent être presque entièrement restreintes aux IgG2. Cette classe s'associe faiblement aux récepteurs FcγR (IgG2 lie sur FcγRIIA_{H131}, mais aussi avec faible affinité sur FcγRIIA_{R131} et FcγRIIIA_{V1}) (Bruhns et al., 2009) et au complément. IgG2 a une région charnière plus courte que celle d'IgG1, avec 12 résidus d'acides aminés ce qui fait que l'IgG2 possède la charnière la plus courte parmi toutes les sous-classes d'IgG. La demi-vie d'IgG2 est de 21 jours (Roux et al., 1997; Vidarsson et al., 2014).
- ❖ **IgG3** : Les IgG3 sont particulièrement efficaces dans l'induction des fonctions effectrices (Vidarsson et al., 2014). Étant un anticorps pro-inflammatoire puissant, sa demi-vie plus courte que les autres sous-classes (7 jours) est cruciale pour limiter les réponses inflammatoires excessives. Les infections virales sont généralement accompagnées par la production d'IgG1 et d'IgG3 qui apparaissent en premier au cours de l'infection. Cette sous-classe, comme l'IgG1, interagit avec tous les récepteurs FcγR (Bruhns et al., 2009) et avec le complément. L'IgG3 a une région charnière beaucoup plus longue que toutes les

autres sous-classes d'IgG. Environ quatre fois plus longue que la région charnière d'IgG1, elle contient jusqu'à 62 acides aminés. Les fragments Fab d'IgG3 sont relativement loin du fragment Fc, conférant à la molécule une plus grande flexibilité. Cette longue charnière d'IgG3 provient de l'existence de ~ 4 exons charnières répétés en tandem alors que les régions charnières des IgG1, IgG2 et IgG4 sont codées par un seul exon charnière (Roux et al., 1997; Vidarsson et al., 2014).

- ❖ **IgG4** : Les allergènes sont souvent des bons inducteurs des IgG1 et IgG4, en plus des IgE. Les IgG4 sont souvent produites à la suite d'une exposition répétée ou à long terme à un antigène dans un contexte non infectieux. Elle a une affinité intermédiaire concernant la fixation sur le récepteur FcγR (peut lier sur FcγRI, FcγRIIA, IIB et IIC et FcγRIIIA_{V158}) (Bruhns et al., 2009) et elle n'active pas le système de complément. De même, la région charnière de l'IgG4 contient également 12 acides aminés et est donc plus courte que celle de l'IgG1. Sa flexibilité est intermédiaire entre celle d'IgG1 et IgG2. La demi-vie d'IgG4 est de 21 jours (Roux et al., 1997).
- ❖ **Pseudo-IgG** : Chez l'Homme, les cinq classes d'immunoglobulines sont disposées au niveau du locus IgH sur le chromosome 14 dans l'ordre suivant : 5'-C_μ-C_δ-C_{γ3}-C_{γ1}-C_{ψε}-C_{α1}-C_{ψγ}-C_{γ2}-C_{γ4}-C_ε-C_{α2}- 3' (**Figure 3**). En 1982, Takahashi et ses collègues ont pu démontrer, par des méthodes de clonage et de séquençage qu'il existe un cinquième gène gamma localisé entre les gènes C_{α1} et C_{γ2}, directement après la région régulatrice 3'RR1 ; ce gène, dépourvu d'une vraie région switch (S) à l'opposé des autres gènes constants, a donc été appelé pseudo-gamma. Par contre, ils ont trouvé une séquence hautement répétitive dans la région 5' adjacente où la région S devrait être. Ce même groupe a essayé de montrer que le gène γ1 et le pseudogène γ évoluent à partir d'un même ancêtre puisque des délétions dans la région charnière ont été repérées dans le gène γ1 en comparaison avec le pseudogène γ (Takahashi et al., 1982). Ces données suggèrent que la distinction majeure entre le γ1 et le pseudogène γ résident dans la région charnière. En 1988, Bensmana et ses collègues ont décrit qu'il n'y a pas de défaut structural dans le gène pseudo-IgG lui-même, mais ils ont noté seulement qu'il existe une délétion de trois nucléotides qui chevauchent deux codons ce qui entraîne la perte d'un acide aminé en position 15 de l'exon CH3 et le changement de l'acide aminé suivant sans modifier le cadre de lecture ouvert. Les sites d'épissage et de polyadénylation sont conservés; par conséquent, l'absence de la région switch semble être le seul défaut responsable de l'absence d'une protéine codée par le gène IGHGP (Bensmana et al., 1988).

Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe pas des données qui montrent la probabilité de trouver une forme protéique de ce pseudo-IgG. Pour ces raisons et parce que le laboratoire s'intéresse par ailleurs à des cassures du locus IgH survenant en dehors des régions switch (lors des recombinaisons suicides, ou lors du « switch IgD » (Péron et al., 2012; Rouaud et al., 2014)), nous avons essayé pendant ma thèse de traquer l'expression éventuelle du gène ψ G. Nous nous sommes ainsi employés à répondre à la question de la stabilité éventuelle de la « pseudo-IgG » sous forme recombinante et de son existence naturelle tant au niveau des recombinaisons d'ADN et du répertoire des transcrits matures qu'au niveau protéique.

Les récepteurs des différentes classes d'IgG humaines

Les cellules myéloïdes humaines, les cellules NK ainsi que les lymphocytes B sont équipées par une variété de récepteurs appelés FcR qui permet leur interaction avec le domaine Fc des immunoglobulines. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une sous-unité alpha permettant la liaison aux ligands et d'une chaîne γ responsable de la signalisation intracellulaire.

Neuf types de récepteurs pour les IgG (Fc γ R) ont été décrits: Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, FcRn, TRIM21 et FcRL5 qui diffèrent par leur distribution cellulaire et leur affinité (**Figure 16**). Les récepteurs de haute affinité (tel que le Fc γ RI) permet la fixation des IgG monomériques alors que ceux de faible affinité (Fc γ RII et Fc γ RIII) ne fixent que les complexes immuns à IgG ou les agrégats d'immunoglobulines. A l'exception de TRIM21 (une E3-ubiquitine ligase liant le Fc des IgG et des IgM et guidant les complexes immuns vers le protéasome et la dégradation) et de FcRn (récepteur de recyclage ou de transport actif des IgG) lient des IgG internalisées, les autres récepteurs sont dédiés à la fixation des IgG à la surface cellulaire (pour revue : Gillis et al., 2014).

Une distinction majeure peut être faite entre les IgG1 / IgG3 qui interagissent efficacement avec la plupart des Fc γ R et les IgG2 / IgG4, qui présentent une affinité réduite pour un certain nombre de Fc γ R. En outre, l'IgG3 monomère se lie plus efficacement que l'IgG1 monomère au Fc γ RIIA, au Fc γ RIIIA et au Fc γ RIIIB, et l'efficacité de liaison de l'IgG3 à tous les FcRns dépasse celle de l'IgG1.

Les récepteurs Fc γ R participent à de nombreuses fonctions effectrices (ou régulatrices) du système immunitaire, telles que la phagocytose (ADCP), la libération de médiateurs inflammatoires et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (processus permettant la sécrétion des protéases par des cellules effectrices tel que les cellules NK permettant

la destruction des cellules cibles ; généralement ce processus est activée via la l'interaction avec le récepteur FcγRIIIA). Ils peuvent être divisés en récepteurs activateurs ((hFcγRI, hFcγRIIA, hFcγRIIC et hFcγRIIIA) et inhibiteurs ((hFcγRIIB) (Bruhns, 2012). Les récepteurs Fcγ s'associent à la même région de l'anticorps, c'est-à-dire entre la fin de la région charnière et les domaines CH2 (Hanson and Barb, 2015). Le niveau de glycosylation influe aussi sur l'interaction des IgG avec leur récepteur FcγR (Kaneko et al., 2006).

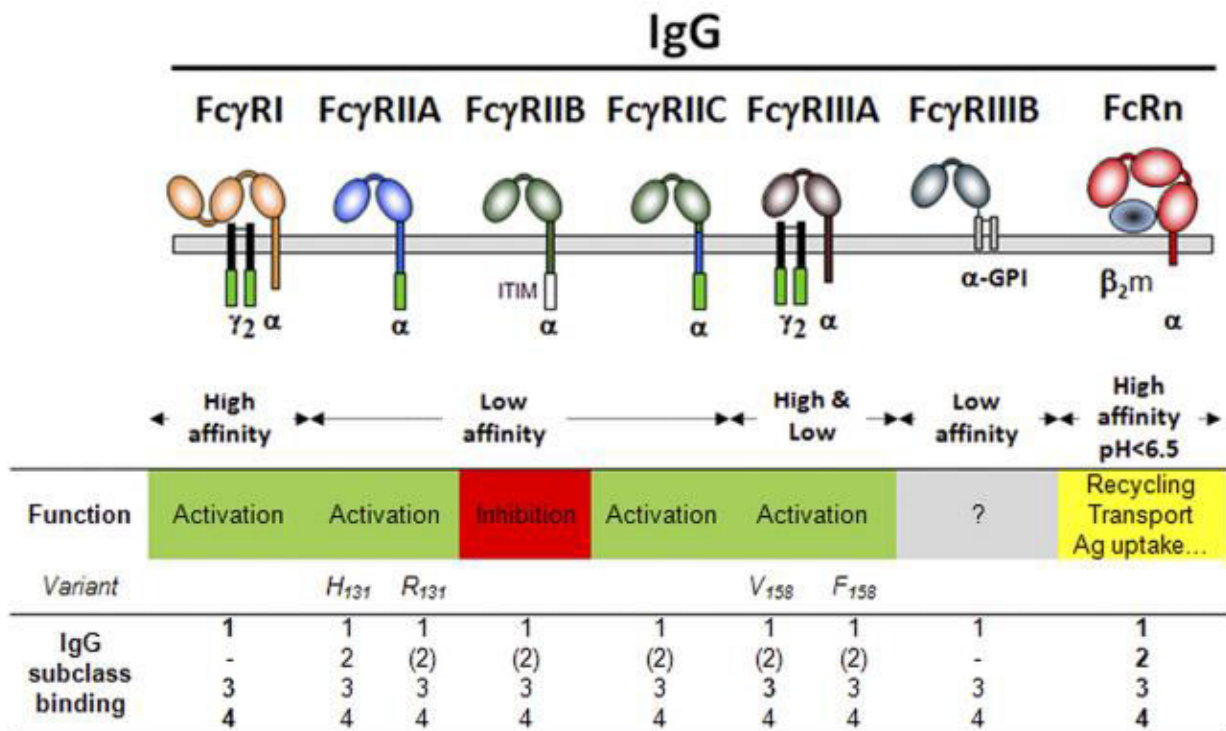


Figure 16 : Les récepteurs d'IgG humaines (FcγR)

Représentation schématique des récepteurs d'IgG humaines à la membrane cellulaire (barre grise) et association ou non à la chaîne γ (noir). La liaison d'une sous-classe d'IgG humaine est indiquée en caractères gras (haute affinité), caractère normal (faible affinité) ou entre parenthèses (très faible affinité). - indique pas de liaison (Bruhns, 2012).

II) Les stades de différenciation des lymphocytes B

- **Dans la moelle osseuse**

La lignée cellulaire B se développe dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) en passant par plusieurs étapes bien caractérisées. Ces CSH se divisent de manière asymétrique en donnant des cellules qui vont se différencier en cellules progénitrices multipotentes (MPP) qui à leur tour se différencient progressivement en LMPP (pour Lymphoid-primed Pluripotent Progenitors) puis en précurseurs lymphoïdes communs CLP (pour Common Lymphoid Precursors) qui, à leur tour s'engagent dans la différenciation vers les lignées T, NK,

cellules dendritiques ou B. Après s'être dirigées vers la lignée B, les cellules passent par les étapes de cellules pro-B, pré-B et enfin en cellules B immatures (pour revue: Ichii et al., 2014).

Pour que les CLP se différencient vers le lignage B, plusieurs facteurs de transcriptions doivent s'exprimer, parmi eux: E2A (*E box protein Binding 2A*), Ikaros, EBF1 (*Early B cell Factor-1*), PU.1 (*Purine box factor-1*) et le Pax5 ou BSAP (*B cell Specific Activator protein*) (Nutt et al., 1997). Pax5 est le facteur principal qui aide à maintenir les progéniteurs dans la lignée B, son action se termine lors de la différenciation des cellules B en plasmocytes (Cobaleda et al., 2007).

Stade pré-pro B : Pendant ce stade, les premiers précurseurs B prennent naissance à partir des cellules CLP. Seule l'expression de certains marqueurs de surface et de facteurs de transcription permet de les distinguer des autres précurseurs hématopoïétiques. Parmi les marqueurs de surface exprimés à ce stade figurent B220 (CD45R), CD43 (S7) et c-Kit (CD117) alors que le CD19 est absent à ce stade (Hardy et al., 2007). Les loci d'Igs à ce stade sont dans une configuration germinale non réarrangée donc non encore fonctionnelle, mais subissant déjà un remodelage chromatinien et une transcription germinale.

Stade pro-B : Dans ce stade commence les premiers réarrangements VDJ sur le locus IgH. Dans les cellules pro-B, les réarrangements D_H à J_H sont initiés d'abord, suivis par des réarrangements de V_H à D_HJ_H. Il est maintenant clair que dans presque toutes les cellules pro-B le réarrangement D_H à J_H se produit sur les deux allèles suggérant que les deux sont accessibles pour les réarrangements V_H à D_HJ_H (Zhang et al., 2004). Les molécules CD79a (Igα) et CD79b (Igβ) ainsi que le cluster de différenciation CD19 sont exprimés à la surface des cellules pro-B (Pelayo et al., 2012).

Stade pré-B : C'est le stade des réarrangements qui touchent les loci des chaînes légères d'immunoglobulines. A ce stade, les cellules n'expriment plus le CD43 à leur surface cellulaire. Ainsi, l'expression du pré-BCR à ce stade est nécessaire pour la progression du développement des précurseurs de cellules B. Le pré-BCR est composé d'une chaîne μH fonctionnelle qui, une fois produite dans les cellules, sera transportée vers la surface des cellules pré-B (sous forme d'un récepteur immature). La chaîne μH sera ensuite associée à une pseudo chaîne légère appelée SLC (Surrogate Light Chain) codée sous forme de deux peptides disjoints par les deux gènes: VpréB et λ5, et à l'hétérodimère Iga/ Igβ (Karasuyama et al., 1993; Otero and Rickert, 2003). Une fois que le pré-BCR est exprimé sur la surface cellulaire, la signalisation pré-BCR induit la prolifération des cellules pré-B servant à augmenter le nombre de cellules qui ont un gène IgH recombiné avec succès. Ainsi il exerce un rétrocontrôle négatif sur les gènes VpréB et λ5 et

l'induction des réarrangements des gènes VJ des loci des chaînes légères (Herzog et al., 2009). Tous ces événements permettent aux cellules pré-B de passer au stade des cellules B immatures.

Stade de B immature : A ce stade les cellules B expriment un BCR fonctionnel à leur membrane. Ces cellules sont capables de quitter la moelle osseuse pour envahir les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques...). Avant de passer en périphérie, certains contrôles sont mis en place pour éliminer des cellules B ayant des BCR auto-réactifs (reconnaissant les antigènes du soi). Ainsi, elles sont éliminées par une sélection des cellules exprimant un BCR auto-réactif, et ceci par apoptose: c'est le mécanisme de tolérance exercé par les cellules B (Russell et al., 1991). Les cellules B auto-réactives peuvent échapper à l'apoptose grâce à un phénomène de re-édition du BCR dans lequel plusieurs tours de réarrangements touchent les régions variables des chaînes légères permettant de remplacer le BCR auto-réactif. Mais si toutefois la cellule garde son auto-réactivité, elle deviendra anergique (diminution d'expression de BCR et de la prolifération cellulaire) (Luning Prak et al., 2011). Alors, seules les cellules B de bonne qualité quitteront la moelle osseuse pour migrer vers les organes lymphoïdes périphériques.

- **A l'extérieur de la moelle osseuse**

Les lymphocytes B immatures vont enfin quitter la moelle osseuse et rejoindre la circulation sanguine en stade B transitionnels pour arriver aux organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques périphériques, plaques de Peyer) où ils continuent leur maturation et rencontrent l'antigène. Plusieurs types de cellules caractérisent cette phase tardive du développement des cellules B.

Les lymphocytes B transitionnels :

Loder et ses collègues ont proposé la partition des cellules B transitoires en deux sous-populations distinctes, appelées cellules B transitionnelles 1 (T1) et transitionnelles 2 (T2), en fonction de leur phénotype de surface et de leurs caractéristiques fonctionnelles (Loder et al., 1999). Ensuite une troisième sous-population a été aussi proposée appelé cellules B transitionnelles 3 (T3) ; mais il semblerait que ces cellules T3 sont auto-réactives et donc font partie des cellules anergiques (Merrell et al., 2006).

Les lymphocytes B matures : Les lymphocytes B matures sont caractérisés par une double expression d'une IgM et d'une IgD sur la membrane cellulaire. Ils peuvent être divisés en deux catégories : cellules B1 et cellules B2. Les premières (B1) sont impliquées dans les réactions immunitaires naturelles, elles sont indépendantes de cellules T. Les secondes (B2) appelées aussi cellules B conventionnelles sont impliquées dans les réponses spécifiques à un antigène donné.

Les cellules B1 sont d'abord produites dans le foie fœtal avant la naissance. Après elles sont trouvées dans les cavités péritonéales et pleurales. Cette population cellulaire peut être divisée en deux sous-populations selon l'expression de CD5 sur leur surface : B1a (CD5⁺) et B1b (CD5⁻) (Martin and Kearney, 2001). Les progéniteurs B-1a se trouvent principalement dans le foie fœtal, la rate néonatale et la moelle osseuse néonatale, alors que les progéniteurs B-1b se trouvent principalement dans la moelle osseuse adulte. Les cellules B1a sont définies comme étant IgM^{high}, IgD^{faible}, CD11b⁺, CD5⁺, B220^{faible/+} tandis que les cellules B1b sont IgM^{fort}, IgD^{faible}, CD11b⁺, CD5⁻, B220^{faible/+} (Esplin et al., 2009; Stall et al., 1992).

Les lymphocytes B2 sont regroupés en deux sous-ensembles : les cellules B de la zone marginale (MZ) et celles de la zone folliculaire (FO). (Les caractéristiques des cellules MZ ont été décrites plus haut). La majorité des cellules B dans la rate est représentée par les lymphocytes B folliculaires (FO). Ces cellules B expriment des taux élevés d'IgM, d'IgD et de CD23; des niveaux faibles de CD21; et pas de CD1 ni de CD5. Elles s'organisent en follicules primaires dans les pulpes blanches des organes lymphoïdes périphériques tels que la rate et les ganglions lymphatiques. Elles sont impliquées dans les réponses dépendantes des lymphocytes T dans les follicules (pour revue : Pillai and Cariappa, 2009). Suite au contact avec un antigène, l'interaction entre les lymphocytes B folliculaires et les lymphocytes T dans la zone interfolliculaire induit la formation d'un centre germinatif ou GC (pour Germinal Center) qui est organisé en deux zones principales: les zones sombres (ou DZ pour Dark Zone) et claires (ou LZ pour Light Zone) (**Figure 17**). C'est dans les GC que les cellules B matures prolifèrent, différencient et diversifient le

répertoire des anticorps par hypermutation somatique et par commutation de classe (Klein and Dalla-Favera, 2008).

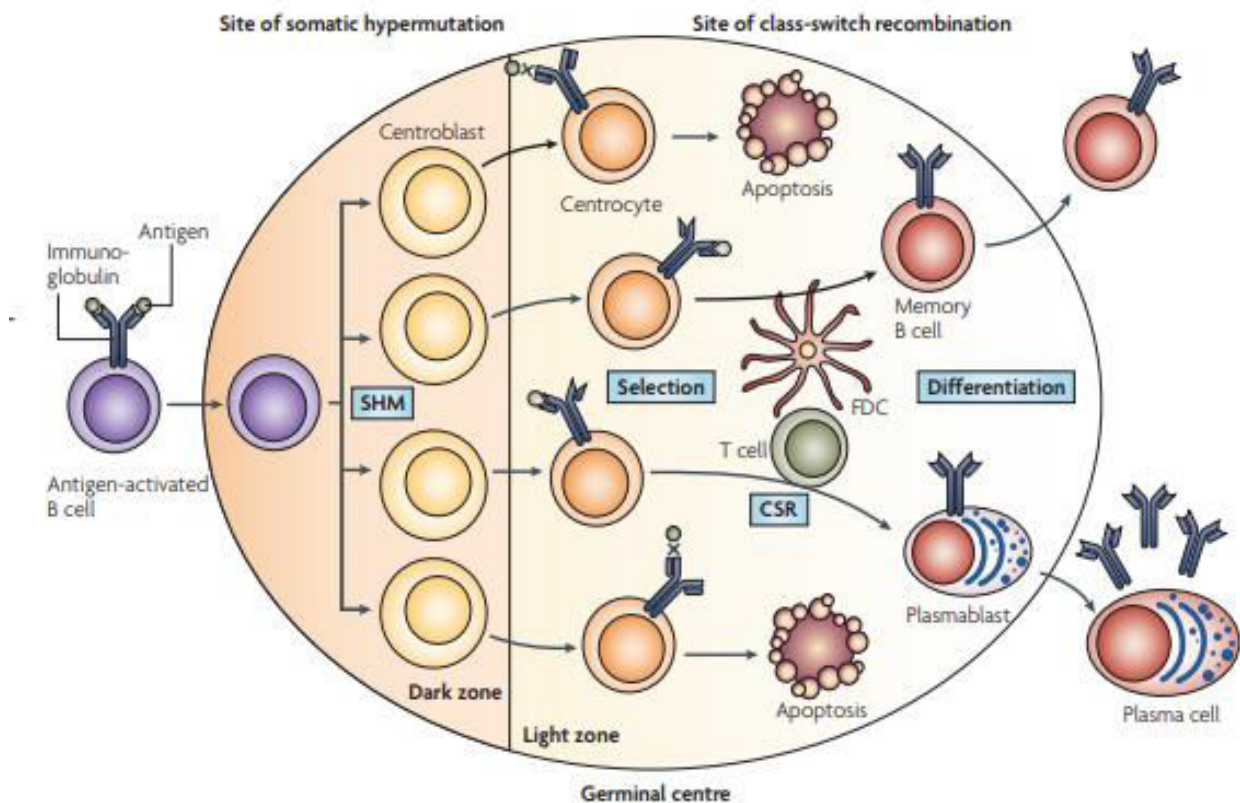


Figure 17: Le microenvironnement du centre germinatif.

Les cellules B activées par l'antigène se différencient en centroblastes subissant ainsi une expansion clonale et la SHM dans la zone sombre du centre germinatif. Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes et se déplacent vers la zone claire, où le récepteur antigénique modifié par SHM ou hypermutation somatique, avec l'aide de cellules immunitaires comprenant des cellules T et des cellules dendritiques folliculaires (FDC), est sélectionné pour une meilleure liaison à un antigène donné. Un sous-ensemble de centrocytes subit une commutation de classe ou CSR. Les centrocytes spécifiques pour un antigène se différencient finalement en cellules B mémoire ou en plasmocytes (Extrait de la revue: Klein and Dalla-Favera, 2008).

Stade des plasmocytes : L'anticorps est produit durant la phase terminale de différenciation des cellules B appelées plasmablastes et plasmocytes. Leur formation est associée à des altérations marquées de la morphologie, du profil d'expression génique et de la durée de vie des cellules sécrétrices d'anticorps ou ASC (pour Antibody-Secreting Cells) par rapport aux cellules B dont elles sont issues. Récemment il était décrit la construction d'une souche de souris dans laquelle le gène codant pour la GFP (Green Fluorescent protein) a été ciblé dans le locus *Blimp1*, cette protéine Blimp1 est souvent décrite comme "le régulateur principal" de la différenciation

cellulaire plasmique. La première réaction d'anticorps à certains agents pathogènes est fournie par des anticorps «naturels» préexistants sécrétés par les cellules B1 (Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Les premières cellules B à répondre à un antigène étranger en se différenciant en plasmocytes sont les cellules B de la zone marginale (Lopes-Carvalho and Kearney, 2004). Les plasmocytes formées à partir des cellules B marginales durant une réponse précoce ne possédant pas des gènes d'immunoglobulines somatiquement mutées, elles sont de courte durée vie et subissent une apoptose in situ (Smith et al., 1996). Cependant, ces cellules fournissent une réponse initiale rapide aux pathogènes. Les cellules plasmatiques sont caractérisées par l'expression de CD138, CD45 et le récepteur d'IL6 (Interleukine 6) à leurs surfaces cellulaires. Chez l'Homme, le CD27 est un bon marqueur pour les cellules plasmatiques. Le marqueur de surface CD138 (syndécan-1) est aussi exprimé à des niveaux élevés (Liu et al., 2012).

Stade des cellules B mémoires : Les cellules B mémoires sont un sous-type de cellules B qui se forment dans les centres germinaux suite à une infection primaire et sont importantes pour générer une réponse immunitaire accélérée et plus robuste à médiation humorale en cas de réinfection (également appelée réponse immunitaire secondaire). Les anticorps produits ont une affinité plus importante que ceux produits pendant la réaction immunitaire primaire. Les cellules B mémoires murines (réactions T-dépendantes) sont caractérisées par les marqueurs CD38 et B220 sur leurs membranes cellulaires. Les cellules mémoire B1b récemment décrites chez la souris (réponse T-indépendantes) expriment des grandes quantités d'IgM et de CD19 mais peu de B220 et d'IgD (pour revue : Tarlinton, 2006).