

Ontogénèse et différenciation des lymphocytes B à IgE chez le rat

P. MANOUVRIEZ (1), H. BAZIN

*Université catholique de Louvain,
Faculté de Médecine, Unité d'Immunologie expérimentale,
Bte UCL 30.56, Clos Chapelle aux Champs, 30, 1200 Bruxelles, Belgique.*

Summary. *Ontogenesis and differentiation of IgE-bearing B lymphocytes in rat.*

In fetal liver, the stem cells of the B lineage transform into pre-B cells with intracytoplasmic μ -chains and thereafter into mature B cells with IgMc and IgMm. The other immunoglobulin classes appear later. The IgEm B cells appear on the day of birth. They bear IgMm and IgDm. Anti-IgM or anti-IgD suppression, performed from birth, prevents IgE synthesis. IgM and IgD seem to be necessary to IgE lymphocyte differentiation. Neonatal anti-IgE suppression seems to have no influence on IgE lymphocytes, but this result has to be confirmed. IgE immune responses are T-dependent. Neonatally thymectomized animals or rnu/rnu rats are unable to produce IgE immune responses. Axenic rats possess a great number of IgEm-IgAm-bearing cells in Peyer's patches; this is not observed in conventional animals. Nevertheless, the major problems are due to cells with receptors for IgE which must be differentiated from cells with intrinsic IgE. Work is under way to solve these problems.

Introduction.

Le système hématopoïétique a une ontogénèse dont la localisation spatiale varie au cours du temps. Ceci est en particulier vrai pour les lymphocytes B dont les cellules souches apparaissent d'abord dans la membrane vitelline, puis le foie (Moore et Metcalf, 1970; Paige *et al.*, 1979) et finalement la moelle osseuse. Les propriétés de recirculation des lymphocytes B, à un stade ou un autre de leur différenciation, rendent d'autant plus difficile la recherche de leurs progéniteurs, dont les marqueurs de membrane sont mal connus ou inconnus. Des techniques de transfert sur souris immunodéficientes de cellules de souris congéniques possédant une aberration chromosomique, sont les seules à avoir, jusqu'ici, apporté des informations (Micklem *et al.*, 1966). Des cultures de cellules ont aussi été utili-

(1) Boursier IRSIA.

sées avec plus ou moins de succès. D'autres travaux effectués avec des modèles pathologiques peuvent plus ou moins différer des conditions réelles de différenciation des progéniteurs et des cellules pré-B (Gathings *et al.*, 1981).

I. Des cellules souches de la lignée B aux lymphocytes mûrs quietes à IgM de membrane.

Le sac vitellin pourrait, selon un travail (Moore et Metcalf, 1970), être à l'origine des cellules souches pluripotentes de toutes les lignées hématopoïétiques. Ces cellules seraient moins différenciées que les précurseurs spécifiques des lymphocytes B du foie de l'embryon de souris de 12 jours (Paige *et al.*, 1979). Chez l'adulte, les précurseurs des cellules B se rencontrent essentiellement dans la moelle osseuse, ce qui n'est pas le cas chez le fœtus dont le foie est l'organe lymphoïde primaire. Une recombinaison des loci V-D-J-C mu de l'ADN des grandes cellules pré-B a lieu juste avant l'apparition de chaînes lourdes mu (Maki *et al.*, 1980 ; Nottenburg et Weissman, 1981). C'est l'apparition de ces chaînes lourdes mu dans le cytoplasme des grandes cellules pré-B, qui est le premier signe physiologique de la différenciation des cellules de la lignée B au cours de l'ontogenèse. Celles-ci subissent un nombre non déterminé de divisions et deviennent de petits lymphocytes pré-B à chaînes lourdes mu cytoplasmiques. L'insensibilité des cellules pré-B à l'antisérum anti-mu (Raff *et al.*, 1976) apporte un argument contre certaines observations de chaînes lourdes mu de surface, à ce stade (Lafleur *et al.*, 1972 ; Melchers *et al.*, 1976 ; Rosenberg et Parish, 1977). Il est vraisemblable que les chaînes lourdes mu, synthétisées dans le cytoplasme de ces cellules, soient simplement relarguées à l'extérieur (Burrows *et al.*, 1979). C'est au stade de développement de ces cellules, qu'a lieu le réarrangement de l'acide désoxyribonucléique (ADN) des gènes des chaînes légères d'immunoglobulines V-J-C (Levitt et Cooper, 1980 ; Kubagawa *et al.*, 1981). La synthèse des chaînes légères peut dès lors commencer. La cellule pré-B à chaîne mu cytoplasmique se transforme alors en lymphocyte B mûr, quiete à IgM cytoplasmique et à IgM de membrane (IgMc-IgMm).

Les lymphocytes mûrs quietes à IgMc-IgMm apparaissent après 16-17 jours de gestation, 1 semaine après les premières cellules pré-B à chaîne mu cytoplasmique (Nossal et Pike, 1973 ; Owen *et al.*, 1974 ; Bruyns *et al.*, 1976 ; Andrew et Owen, 1978 ; Teale et Mandel, 1980). Une partie des lymphocytes à IgMc-IgMm au moins est apte, dès ce stade, à produire des réponses immunes suite à une stimulation antigénique (Paige *et al.*, 1979 ; Johnson *et al.*, 1976).

II. Apparition des autres classes d'immunoglobulines de membrane et leur influence sur les lymphocytes à IgE.

Il est admis que toutes les cellules B acquièrent d'abord de l'IgM de membrane au cours de leur maturation (Kincade *et al.*, 1970). En effet, l'injection d'antisérum anti-mu bloque le développement des lymphocytes B et l'apparition de toutes les classes d'immunoglobulines dans le sérum (Manning, 1975 ; Bazin *et*

al., 1978). Les zones des organes lymphoïdes périphériques (rate et ganglions lymphatiques) dévolues aux lymphocytes B, en demeurent dépourvues (Kumararatne *et al.*, 1981a). Tous les individus ne sont pas entièrement supprimés uniquement par le traitement anti-mu. L'injection simultanée d'anticorps anti-mu et anti-delta prévient l'apparition de tout lymphocyte B durant la suppression (Bazin *et al.*, 1978, 1982). Dès que les injections de sérum anti-mu cessent, le passage du stade de cellules pré-B sans immunoglobulines de surface au stade de lymphocytes mûrs quiets, s'effectue en quelques jours, entre 1 et 2 jours (Bazin, MacLennan and Platteau, manuscrit en préparation). Durant cette maturation, une majorité des cellules acquiert aussi de l'IgD de membrane (Parkhouse et Cooper, 1977 ; Aspinall et Owen, 1983). Chez le rat, presque tous les lymphocytes B ne portent que de l'IgM de membrane à la naissance, toutefois, d'autres isotypes sont déjà détectables (Bazin *et al.*, 1978). Le nombre de cellules à IgD reste très faible durant la première semaine de vie, pour atteindre ensuite les valeurs adultes après 1 ou 2 mois. La très grande majorité de ces cellules porte alors simultanément des immunoglobulines des isotypes IgMm et IgDm (Bazin *et al.*, 1978). Les lymphocytes à IgEm sont détectables dès le jour de la naissance pour atteindre les valeurs adultes après 4 semaines (Ishizaka *et al.*, 1978). Les parties variables des chaînes lourdes et des chaînes légères des différents isotypes d'immunoglobulines synthétisées par une cellule, sont identiques et possèdent donc la même activité anticorps (Fu *et al.*, 1974).

Dans l'hypothèse où toutes les cellules devraient, à un stade de leur développement, porter de l'IgD de membrane, des suppressions avec de l'antisérum anti-IgD ont été réalisées (Bazin *et al.*, 1978 ; Bazin *et al.*, 1982). Les résultats varient d'une classe d'immunoglobulines à l'autre. La synthèse des IgG1, IgG2a et IgG2b est peu modifiée, ainsi que celle des IgM et IgA. Pour ces deux derniers isotypes, le nombre de cellules avec des immunoglobulines M ou A de membrane est toutefois fort réduit. La synthèse des IgG2c est fortement accrue, par contre celle des IgE est supprimée. Dans une autre série d'expériences, Bazin *et al.* (1982) ont observé une grande diminution des cellules B circulantes dans les follicules de la rate, lors de suppressions anti-delta. Par contre, une population normale de cellules à IgMm est observée dans les zones marginales. Cette population sédentaire (Kumararatne *et al.*, 1981a et b) est probablement capable de produire des cellules de tous les isotypes d'immunoglobulines à l'exception de l'IgG2a et probablement de l'IgE. Aucune production de ces 2 isotypes n'a été observée chez les animaux supprimés. Le rôle de l'IgD de membrane semble donc être différent selon les classes d'immunoglobulines. La stimulation des IgDm semble indispensable à la différenciation finale des lymphocytes à IgEm. D'autre part, il a été montré que la stimulation des IgDm des cellules qui en sont pourvues, est indispensable lors des réponses immunes vis-à-vis d'antigènes thymo-dépendants (Marshall-Clarke *et al.*, 1983). Or, les rats athymiques et les rats nude thymodéficients sont incapables de produire des réponses immunes à IgE (Urban *et al.*, 1977 ; Bazin *et al.*, 1980). Ceci semble indiquer que l'activation par les lymphocytes T des lymphocytes B se ferait par l'IgDm de cellules à IgDm et IgEm. Cette hypothèse demande toutefois une confirmation expérimentale. En particulier, l'origine des IgE de membranes qui pourraient être extrinsèques.

Les travaux d'Ishizaka *et al.* (1978) et d'Urban *et al.* (1980) ont montré de manière indirecte qu'une grande majorité (90 %) de cellules à IgEm présentent également de l'IgMm et de l'IgDm. Ceci peut être trouvé dès la naissance et aussi chez de jeunes adultes, et même chez des animaux infestés avec *Nippostrongylus brasiliensis*, un puissant potentiateur de réponse immune à IgE (Ishizaka *et al.*, 1976). Dans une lignée non consanguine issue du croisement de rats BN, IC, LOU, LOU.Rt-1^k (OKA), souches hautes répondeuses en anticorps réaginique, on n'observe que 60 à 70 % de cellules à IgM + IgE de membrane chez des animaux de 7 mois, stimulés plusieurs mois auparavant (*Cf.* tabl. 1). Chez des rats axéniques, Durkin *et al.* (1981) ont observé 28 % de cellules à IgEm dont 50 % portent également de l'IgAm. L'origine et le devenir de ces cellules sont inexpliqués. Elles n'ont, jusqu'à présent, pas été décrites chez les rats normaux. L'étude des cellules à IgEm est rendue difficile par l'apparition d'un grand nombre de cellules à IgE extrinsèque d'origine sérique, tant chez la souris (Katona *et al.*, 1983) que chez le rat (Manouvriez et Bazin, résultats non publiés). Des travaux sont en cours, qui permettront de discerner les cellules à IgE intrinsèque et à IgE extrinsèque et leurs rôles respectifs.

Le rôle de ces IgE de membrane est encore mal connu. Bazin et Pauwels (1982) ont essayé de les supprimer par injection néonatale de sérum anti-IgE chez des rats. Ils n'ont observé aucune différence dans le nombre de lymphocytes à IgE et dans les réponses immunes à IgE par rapport aux animaux témoins. Ces travaux sont en défaveur d'un rôle majeur des récepteurs membranaires de classe IgE à la surface des lymphocytes B. Ils sont, cependant, toujours sujets à caution, l'interprétation n'étant basée que sur des résultats négatifs.

TABLEAU 1

Cellules à IgEm et IgMm dans les organes lymphoïdes de rats eurorat normaux.

Organes	Nb	IgE	IgE + IgM	IgM	IgM + IgE/IgE	IgM + IgE/IgM
GM	4	9,4 (4)*	5,6 (1,3)	23,7 (2,6)	0,6	0,24
R	5	12,9 (0,9)	8,8 (1,2)	36,6 (6,4)	0,7	0,24
PP	5	2,3 (0,8)	1,3 (0,4)	20,2 (1,7)	0,6	0,16

* Cellules positives exprimée en % des lymphocytes, écart standard entre parenthèses.

III. L'IgE sérique et l'ontogenèse des réponses immunes à IgE.

Le taux sérique d'IgE croît jusqu'à l'âge de 5 mois puis décroît chez le rat (Pauwels *et al.*, 1979). Des observations comparables ont été faites chez l'homme dont le taux sérique en anticorps réaginique croît jusqu'à l'âge de 14 ans (Kjellman, 1976). Binaghi *et al.* (1969) chez le rat, et Prouvost-Danon et Binaghi (1970) chez la souris, ont trouvé de faibles réponses immunes à IgE chez les néonataux. Mais Pauwels *et al.* (1979) n'en ont pas observé de détectable avant l'âge de

2 mois. Récemment, des hybridomes sécrétant de l'IgE furent obtenus après fusion du myélome de rat LOU IR983F avec des cellules spléniques de rat LOU de 6 semaines, 10 jours après immunisation (Xhurdebise *et al.*, résultats non publiés). Ces différences peuvent être expliquées par les conditions expérimentales non identiques. Les réponses immunes déficientes des néonataux pourraient également s'expliquer par une immaturité relative des lymphocytes T, les réponses immunes à IgE sont, en effet, totalement dépendantes de la stimulation par certaines populations de ces lymphocytes (Urban *et al.*, 1977 ; Bazin *et al.*, 1980).

9^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Rennes, 4-5 mai 1983.

Références

- ANDREW T. A., OWEN J. J. T., 1978. Studies on the earliest sites of B cell differentiation in the mouse embryo. *Dev. comp. Immunol.*, **2**, 339-346.
- ASPINALL R., OWEN J. T., 1983. Kinetics of sequential appearance of IgM and IgD on B lymphocytes in the bone marrow of the adult mouse. *Immunology*, **48**, 309-313.
- BAZIN H., GRAY D., PLATTEAU B., MacLENNAN I. C. M., 1982. Distinct delta positive and delta negative B-lymphocyte lineages in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **399**, 122-130.
- BAZIN H., PAUWELS R., 1982. IgE and IgG2a isotypes in the rat. *Progr. Allergy*, **52**, 52-104.
- BAZIN H., PLATTEAU B., BECKERS A., PAUWELS R., 1978. Differential effect of neonatal injections of anti-mu or anti-delta antibodies on the synthesis of IgM, IgD, IgE, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, **121**, 2083-2087.
- BAZIN H., PLATTEAU B., PAUWELS R., CAPRON A., 1980. Immunoglobulin production in nude rats with special attention to the IgE isotype. *Ann. Immunol.*, **131c**, 31-37.
- BINAGHI R. A., OTTGEN H. F., BENACERRAF B., 1969. Anaphylactic antibody in young rat. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, **29**, 282.
- BRUYNS C., URBAIN-VANSANTEN G., PLANARD C., de VOS-CLEOTENS C., URBAIN J., 1976. Ontogeny of mouse B lymphocytes and inactivation by antigen of early B lymphocytes. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2462.
- BURROWS P. D., LEJEUNE M., KEARNEY J. F., 1979. Evidence that murine pre-B cells synthesize mu heavy chains but no light chains. *Nature (Lond.)*, **20**, 838.
- DURKIN H. G., BAZIN H., WAKSMAN B. H., 1981. Origin and fate of IgE-bearing lymphocytes. I. Peyer's patches as differentiation site of cells simultaneously bearing IgA and IgE. *J. exp. Med.*, **154**, 640-648.
- FU S. M., WINCHESTER R. J., FEIZI T., WALZER P. D., KUNKEL H. G., 1974. Idiotypic specificity of surface immunoglobulin and the maturation of leukemic bone marrow-derived lymphocytes. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4487.
- GATHINGS W. E., KUBAGAWA H., COOPER M. D., 1981. A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal human. *Immunol. Rev.*, **57**, 107-126.
- ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., OKUDAIRA M., BAZIN H., 1978. Ontogeny of IgE-bearing lymphocytes in the rat. *J. Immunology*, **120**, 655-660.
- ISHIZAKA T., URBAN J. F. Jr, ISHIZAKA K., 1976. IgE formation in the rat following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. I. Purification and differentiation of IgE-bearing cells. *Cell Immunol.*, **22**, 248-261.
- JOHNSON G. R., METCALF D., WILSON J. W., 1976. Development of B-lymphocyte colony-forming cells in foetal mouse. *Immunology*, **30**, 907-914.

- KATONA I. M., URBAN J. F., SCHER I. S., KANELLOPOULOS-LANGEVIN C., FINKELMAN F. D., 1983. Induction of an IgE response in mice by *Nippostrongylus brasiliensis* : characterization of lymphoid cells with intracytoplasmic or surface IgE. *J. Immunol.*, **130**, 350-356.
- KINCADE P. W., LAWTON A. R., BOCKMAN D. E., COOPER M. D., 1970. Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody-mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1918.
- KJELLMAN N. I. M., 1976. *Immunoglobulin E and atopic allergy in childhood*. Unköping Univ. med. Diss., nr. 36, Unköping.
- KUBAGAWA H., GATHINGS W. E., LEVITT D., COOPER M. D., 1981. Immunoglobulin light chain expression by human pre-B cells : asynchronous onset of mu and light-chain synthesis by pre-B cells. *Pediat. Res.*, **15**, 599.
- KUMARARATNE D. S., BAZIN H., MacLENNAN I. C. M., 1981a. Marginal zones : the major B cell compartment of rat spleens. *Eur. J. Immunol.*, **11**, 858-864.
- KUMARARATNE D. S., BAZIN H., MacLENNAN I. C. M., 1981b. Marginal zones : the largest B cell compartment of rat spleen. In *Proc. 7th int. Conf. on Lymphatic tissues and germinal clusters in immune reactions*. M. G. MANNA, P. NIEUWENHUIS & VAN DEN BROECK, Plenum Press.
- LAFLEUR L., MILLER R. G., PHILIPS R. A., 1972. A quantitative assay for the progenitors of bone marrow-associated lymphocytes. *J. exp. Med.*, **135**, 1363-1374.
- LEVITT D., COOPER M. D., 1980. Mouse pre-B cells synthesize and secrete mu heavy chains but not light chains. *Cell*, **19**, 617-625.
- MAKI R., KEARNEY J., PAIGE C., TONEGAWA S., 1980. Immunoglobulin gene rearrangement in immature B cells. *Science*, **209**, 1366-1369.
- MANNING D. D., 1975. Heavy chain isotype suppression : a review of the immunosuppression effects of heterologous anti-Ig heavy-chain antisera. *J. reticuloendothelial Soc.*, **18**, 63-86.
- MARSHALL-CLARKE S., KEELER K. D., PARKHOUSE R. M. E., 1983. The suppression of surface IgD on B cells responsive to thymus-independent and thymus-dependent antigens and its requirements for B-cell triggering. *Immunology*, **48**, 393-400.
- MELCHERS F., ANDERSON J., PHILLIPS R. A., 1976. Ontogeny of murine B lymphocytes : development of Ig synthesis and of reactivities to mitogens and to anti-Ig-antibodies. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **41**, 147.
- MICKLEM H. S., FORD C. E., EVANS E. P., GRAY J., 1966. Interrelationships of myeloid and lymphoid cells : studies with chromosome-marked cells transfused into lethally irradiated mice. *Proc. roy. Soc. London, Ser. B*, **165**, 78-102.
- MOORE M. A. S., METCALF D., 1970. Ontogeny of the haemopoietic system : yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.*, **18**, 279-296.
- NOSSAL G. J. V., PIKE B. L., 1973. Studies on the differentiation of B lymphocytes in the mouse. *Immunology*, **25**, 33-45.
- NOTTENBURG C., WEISSMAN I. L., 1981. C mu gene rearrangement of mouse immunoglobulin genes in normal B cells occurs on both the expressed and non-expressed chromosome. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 484-488.
- OWEN J. J. T., COOPER M. D., RAFF M. C., 1974. *In vitro* generation of B lymphocytes in mouse foetal liver, a mammalian « bursa equivalent », *Nature*, **249**, 361-363.
- PARKHOUSE R. M. E., COOPER M. D., 1977. A model for the differentiation of B lymphocytes with implications for the biological role of IgD. *Immunological Rev.*, **37**, 105-126.
- PAIGE C. J., KINCADE P. W., MOORE M. A. S., LEE G., 1979. The fate of fetal and adult B-cell progenitors grafted into immunodeficient CBA/N mice. *J. exp. Med.*, **150**, 548-563.
- PAUWELS R., BAZIN H., PLATEAU B., VAN DER STRAETEN M., 1979. The effect of age on IgE production in rats. *Immunology*, **36**, 145-149.
- PROUVOST-DANON A., BINAGHI R., 1970. Reaginic antibody in adult and young mice. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, **38**, 148.
- RAFF M. C., MEGSON M., OWEN J. J. T., COOPER M. D., 1976. Early production of intracellular IgM by B-lymphocyte precursors in mice. *Nature*, **259**, 224-226.

- ROSENBERG Y. J., PARISH C. R., 1977. Ontogeny of the antibody-forming cell line in mice. IV. Appearance of cells bearing Fc receptors, complement receptors, and surface immunoglobulin. *J. Immunol.*, **118**, 612-617.
- TEALE J. M., MANDEL T. E., 1980. Ontogenic development of B-lymphocyte function and tolerance susceptibility *in vivo* and in an *in vitro* fetal organ culture system. *J. exp. Med.*, **151**, 429-445.
- URBAN J. F., ISHIZAKA K., BAZIN H., 1977. IgE formation in the rat after infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. II. Proliferation of IgE-bearing cells in neonatally thymectomized rats. *J. Immunol.*, **118**, 1982-1986.
- URBAN J. F., ISHIZAKA K. Jr, BAZIN H., 1980. IgE-B cell generating factor from lymph node cells of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.*, **124**, 527-532.
-