



Immunologie / Immunology

Un lymphocyte B – un anticorps : le dogme ébranlé

Jacques Couderc

Inserm 131, « Cytokines et Immunorégulations », 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France

Reçu le 31 mars 2005 ; accepté le 17 mai 2005

Disponible sur Internet le 11 juillet 2005

Présenté par Jean Rosa

Résumé

La théorie clonale (1957), dont l'hypothèse majeure propose qu'un lymphocyte B exprime un seul anticorps d'une seule spécificité, a été remise en question récemment par des travaux montrant qu'un lymphocyte exprime deux récepteurs (BCR), dont l'un est auto-réactif, tandis que l'autre présente une spécificité antigénique *non self*. Ce dernier permet au lymphocyte B d'échapper à la sélection négative pendant l'ontogenèse. Cependant, le « dogme » de M.F. Burnet était contesté depuis sa publication. En particulier, Liacopoulos et collaborateurs démontraient qu'un lymphocyte B normal produisait simultanément ou séquentiellement deux anticorps dirigés contre deux haptènes non apparentés. Les « doubles producteurs » ouvrent, d'une part, de nouvelles perspectives en auto-immunité. D'autre part, les résultats anciens obtenus avec des antigènes hétérologues suggèrent que les « doubles » sont un facteur d'amplification du répertoire des lymphocytes B. **Pour citer cet article : J. Couderc, C. R. Biologies 328 (2005).**

© 2005 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

A dogma revisited. The one B cell-one antibody hypothesis proposed by M.F. Burnet (1957) was recently challenged by results showing that one B cell can simultaneously express an auto-reactive BCR, and a BCR directed against non-self antigens. The latter allows this auto-reactive B cell to escape negative selection. Burnet's theory was thus challenged from the beginning. Namely, Liacopoulos et al. demonstrated that normal B cells produce simultaneously or sequentially two antibody molecules against two unrelated haptens. It thus appears that 'double producers' provide new prospects in auto-immunity. Our previous work using heterologous antigens also suggest that 'double producers' provide an amplifying factor for immunoglobulin repertoire. **To cite this article: J. Couderc, C. R. Biologies 328 (2005).**

© 2005 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Théorie clonale ; Doubles producteurs ; Variation intra-clonale ; Inclusion allélique ; Sélection négative

Keywords : Clonal selection theory; Double producers; Intra-clonal variation; Allelic inclusion; Negative selection

Adresse e-mail : jacques.couderc@inserm.ipsc.u-psud.fr (J. Couderc).

Abridged English version

1. Introduction

The clonal selection theory by F.M. Burnet (1957), proposes that one mature B lymphocyte expresses one immunoglobulin receptor of one specificity, prior to any antigenic stimulation. Diversity of the immunoglobulin (Ig) repertoire is then accomplished by the total cells of the immune system. Consequently, B cells that display hostile specificities against self-antigens are eliminated during ontogeny. The theory became a central dogma in immunology. Soon after its releases many experimental protocols were designed to analyse the specificity of antibodies produced by a single B cell. The finding of one-lymphocyte–one antibody was reported in many instances in agreement with Burnet hypothesis. However cells secreting two antibody molecules of different specificities (double cells) were repeatedly observed. Moreover, recent findings obtained in a transgenic model of autoimmunity confirm the existence of ‘double B cells’, a feature that allows autoimmune B cells to escape negative selection during ontogeny.

2. Kinetics of double producers

P. Liacopoulos and colleagues immunized mice with two non cross-reacting red cells, e.g., pigeon red blood cells (PRBC) and sheep red blood cells (SRBC). It was constantly found that 3–4% of B lymphocytes recognized simultaneously both erythrocytes using plaque forming cell (PFC) technique. These ‘double cells’ were restricted to the early stage of the immune response before B cells differentiated to plasmocytes. Further, mice were immunized with two hapten-carrier conjugates, e.g., TNP-KLH and SULF-LYZ. Indicator red cells were a mixture of TNP-SRBC and SULF-PRBC. Again, 3–4% of ‘double cells’ could be detected. By micro manipulating ‘doubles’ in PFC medium supplemented with specific inhibitors, e.g., TNP-BSA or SULF-BSA, it was observed that ‘double cells’ became monospecific when the alternate soluble hapten was present in PFC medium. Thus, ‘bi-specific B cells’ produce indeed two antibodies, of different specificities. They did not produce either one antibody recognizing one epitope shared by the immunizing antigens, or a polyfunctional antibody.

3. Antigen-driven intraclonal variation of normal B lymphocytes

Clonal evolution of individual ‘double cells’ or monospecific B cells was analysed in single-cell short-term cultures. When one ‘double cell’ was cultured together with both haptens, a majority of the daughter cells show monospecificity towards one or the other hapten. Thus, double producers in these experimental conditions are mostly transient. This phenotypic restriction is stochastic provided antigen(s) are present in the culture. Unexpectedly, although 50% of the clonal progeny of initially monospecific B cells gave rise to daughter cells of identical specificity, 50% gave rise to daughter cells that for half displayed the same specificity and for the other half, the other specificity. Consequently, an antigen-dependent clonal variation of specific mature B lymphocytes occurred. Thus, mature B cells express two receptors (BCR), each one able to respond to an antigenic stimulation, then to produce simultaneously or sequentially two different specific antibodies.

4. Multiple rearrangements, receptor editing and ‘double producers’

Tonegawa’s pioneer work on rearrangement of Ig strengthened the concept of allelic exclusion, although no formal proof was brought about. However results indicated that allelic inclusion and multiple cis rearrangements occurred for L or H chains on transformed pre-B, B cell lines, or hybridomas. It thus appeared that a first L or H rearrangement did not impair a second one at a single cell level or during clonal expansion, providing a molecular basis for ‘double producers’. Despite the fact that B lymphocytes that express deleterious autoimmune receptors must be eliminated during ontogeny, some B cells escape apoptosis by operating another productive rearrangement. New L or H chains devoid of auto-reactivity are then expressed and the original chain with anti-self specificity is discarded. However, B cells expressing two BCR one of them being auto reactive have been recently described in models of transgenic mice. Allelic inclusion of the alternate κ L allele occurred without destruction of the original κ L auto-reactive allele. Consequently, two BCR formed with a unique H chain, but two κ chains alleles allow the auto-reactive B lymphocyte to

escape from apoptosis through the non auto-reactive BCR.

5. Conclusion

Receptor editing by allelic inclusion may lead to 'double-producer' B cells with autoimmune functions. Recent data show that rearrangements by allelic inclusion occur frequently during development of normal B cells. In addition, our results showing that about 25% of anti-hapten B cells display an intra-clonal antibody switch over another anti-hapten specificity suggest that, after different productive rearrangements, at least two BCR can be expressed on a same B cell or within a same clone. This phenomenon provides an amplifying factor of the Ig repertoire at the early phase of the immune response. Such undogmatic 'double-producer' B cells have been repeatedly found in secondary lymphoid organs and their existence proven now at a molecular level. Clonal selection theory was a very fruitful hypothesis for the development of modern immunology. Nevertheless, there is no benefit for a theory to be set up as a dogma.

1. Introduction

La théorie de sélection clonale de M.F. Burnet, publiée en 1957 [1] propose qu'un lymphocyte issu de la moelle osseuse, le lymphocyte B, exprime à sa membrane, avant tout contact avec l'antigène, un type de récepteur immunoglobulinique (Ig) et un seul, d'une seule spécificité. La liaison du récepteur avec l'antigène (Ag) déclenche ensuite la prolifération du clone B, de spécificité correspondante, et sa différenciation en cellules productrices d'anticorps. C'est l'ensemble des lymphocytes B du système immunitaire qui rend compte de la diversité du répertoire des Ig capables de reconnaître les déterminants antigéniques (épitopes) présents dans la nature. Un des points importants de la théorie concerne la tolérance immunitaire, c'est-à-dire la faculté naturelle d'un organisme à ne pas déclencher de réponse immune contre ses propres épitopes. Selon Burnet, les lymphocytes auto réactifs délétères passent par une phase de différenciation qui les expose aux auto-antigènes avec pour conséquence une délétion clonale. Cette étape appelée depuis, étape de sélection négative se produit chez l'embryon avant que

le système immunitaire ne puisse développer une réponse contre les antigènes hétérologues. La théorie clonale est devenue, depuis plus de cinquante ans, un des dogmes centraux en immunologie. Très tôt, des preuves expérimentales l'ont étayée, mais très tôt également des travaux montraient qu'un nombre substantiel de lymphocytes B y échappaient et synthétisaient deux types d'anticorps de deux spécificités différentes [2]. Ces résultats étaient considérés au mieux comme marginaux donc négligeables ou bien artéfactuels. Les travaux récents de Gerdes et Wabl [3] dans un modèle de souris transgéniques confirment l'existence des « doubles producteurs ». Ces « doubles » permettent l'échappement de certains lymphocytes B auto-immuns à la sélection négative et apportent vraisemblablement des éléments nouveaux à la compréhension des pathologies auto-immunes.

2. Les « doubles producteurs » dans l'Histoire

Dès la mise au point des premières techniques de visualisation des anticorps au niveau cellulaire, des recherches furent entreprises pour vérifier la théorie de sélection clonale. En 1958, Coons [4] immunisait des lapins avec les protéines HGG et OVA et observait en immunofluorescence, méthode qu'il venait de mettre au point, les lymphocytes fixant à leur membrane les Ag (HGG et OVA) marqués respectivement à la rhodamine et à la fluorescéine. Simultanément, Nossal [5], après avoir immunisé des rats avec des extraits de flagelline provenant de deux souches de salmonelles ne présentant pas de réactions croisées (*S. Adelaïde* et *S. Typhi*), micromanipulait des lymphocytes B isolés, puis examinait l'immobilisation ou non des deux types bactériens vivants par les anticorps spécifiques sécrétés par une seule cellule. Une méthode analogue en microgouttes permettait à Mäkelä et Nossal d'étudier la neutralisation de deux bactériophages T2 et T5 [5]. Avec la méthode des plages de lyse (PFC) mise au point par Jerne et Nordin [6], technique précurseur des Elispots, un grand pas était réalisé en immunologie cellulaire. Pour la première fois, un nombre important de cellules individuelles productrices d'anticorps étaient identifiées au microscope et comptées. Après immunisation des animaux avec des globules rouges (GR) hétérologues, la sécrétion d'anticorps par des lymphocytes isolés, spléniques ou ganglionnaires,

était détectée dans un milieu gélatiné comprenant du complément et un tapis d'érythrocytes immunisants. Une hémolyse locale (PFC) permettait la détection d'anticorps spécifiques anti-globules rouges de classe IgM, mais aussi de classe IgG, par une seule cellule B.

Ces techniques cellulaires pionnières, dont la liste n'est pas exhaustive, ont donné lieu à 21 publications rassemblées dans une revue publiée en 1970 par Mäkelä et Cross [2]. Ces publications peuvent être regroupées en trois catégories : (1) une seule spécificité est produite par les cellules B, dirigée contre l'un ou l'autre des antigènes immunisants ; (2) un pourcentage faible de cellules doubles est détecté (0,5 à 1,5% par rapport à l'ensemble des cellules productrices d'anticorps spécifiques ; (3) un pourcentage de cellules bis-spécifiques, supérieur à 10%, est observé. Étant donné la disparité de ces résultats, la question des doubles restait entière. La présence possible de réactions croisées était l'argument majeur avancé par les détracteurs des résultats positifs sur les « doubles ». En effet, des déterminants communs entre le couple de protéines, de bactéries, de phages ou de GR étaient souvent recherchés au niveau sérologique avec des méthodes peu sensibles. Par conséquent, la sécrétion d'un type d'anticorps unique reconnaissant un épitope mineur, commun entre les deux Ag, ne pouvait être totalement écartée au niveau cellulaire.

3. Cinétique des « doubles producteurs »

La méthode des PFC, devenue très sensible grâce à l'utilisation d'un milieu liquide au lieu du milieu gélatiné [7], incita P. Liacopoulos et ses collaborateurs à reprendre la problématique des « doubles ». Une sensibilité élevée permettait en effet de détecter, non plus uniquement des plasmocytes, mais aussi les cellules B productrices d'anticorps en voie de différenciation. En effet, nous avons observé que la plupart des travaux antérieurs analysaient la réponse après hyper immunisation des animaux, quand la différenciation B en plasmocytes est accomplie. Concernant l'antigène GR, la réponse B primaire ou secondaire s'obtient quatre à cinq jours après l'injection en absence d'adjuvant. Nos études se sont donc surtout focalisées sur le début de la réponse « ex vivo » [8], mais aussi « in vitro » [9,10] entre les jours 2 et 6 après immunisation et toujours avec des doses d'antigènes non optimales, afin d'étu-

dier un maximum de PFC formées d'immunoblastes en voie de différenciation. L'originalité de nos premières études consistait donc à décrire la cinétique de la réponse anticorps après immunisation de souris avec un mélange de globules rouges de mouton (GRM) et de globules rouges de pigeon (GRP), phénotypiquement distincts [11]. D'une façon constante, 2 à 3% de cellules « doubles productrices » étaient observées « ex vivo » au début de la réponse primaire ou de la réponse secondaire, et toujours d'une manière transitoire entre les jours 2 et 4 après immunisation. Dans des expériences de stimulation primaire « in vitro » avec les mêmes érythrocytes, un pourcentage analogue de « doubles producteurs » était détecté dans la phase précoce de la stimulation antigénique [9]. Ces pourcentages confirmaient ce que nous avons publié auparavant « in vivo » avec la technique des rosettes, où nous observions au microscope l'adhérence simple ou double, sur les lymphocytes spléniques immuns, des GRM et des GRP [12]. Afin de résoudre le problème récurrent des déterminants communs entre les deux types érythrocytaires, nous avons immunisé les animaux, dans un premier temps, avec le trinitrophényl couplé aux GRP (TNP-GRP) [13], puis avec différents complexes haptène-protéines [14]. Comme précédemment, des lymphocytes B « doubles producteurs » anti-haptènes étaient présents pendant la phase précoce de la réponse immune. Les Ag étaient aussi différents que le TNP conjugué à l'hémocyanine : TNP-KLH, la *p*-amino-phenyl- β -D-lactoside (Lac) couplés à la KLH : Lac-KLH, ou l'acide sulfanilique (SULF) couplé au lysozyme de poulet (SULF-LZ). Les PFC étaient alors détectées sur un mélange de GRM et GRP conjugués, chacun avec un des deux haptènes immunisants : TNP-GRM et SULF-GRP, par exemple. À nouveau, 3% environ de PFC « doubles » anti-haptènes étaient identifiées « ex vivo » au début de la réponse secondaire dans la rate des souris immunisées. Nous pouvions alors avancer dans l'interprétation des plages « doubles ». Trois hypothèses étaient envisageables : (1) deux types d'anticorps étaient synthétisés par une même cellule ; (2) un seul anticorps était produit, reconnaissant des déterminants communs (réactions croisées) entre les deux composés hapténiques ; (3) les PFC doubles synthétisaient un type d'immunoglobuline avec un site anticorps polyfonctionnel, capable de reconnaître deux épitopes distincts [15]. La micro-manipulation de PFC individuelles nous a permis de

trancher entre ces trois hypothèses. Le principe était d'effectuer des inhibitions compétitives au niveau de PFC individuelles, en ajoutant dans le milieu de détection un ou les deux haptènes sous forme soluble. Les PFC doubles micromanipulées dans le milieu initial ont donc été transférées dans un second milieu contenant le même couple haptène-GR avec, en supplément, un des deux haptènes solubles, puis elles ont été transférées dans un troisième milieu identique au milieu initial (sans inhibiteur). La grande majorité des cellules bi-productrices qui restaient actives dans ces trois milieux successifs lysaient un seul type d'haptène-GR quand elles étaient transférées dans le second milieu, contenant l'haptène soluble alternatif. À nouveau, ces PFC lysaient simultanément les deux types de GR indicateurs quand elles étaient transférées dans le 3^e milieu, dépourvu d'inhibiteur soluble. Par conséquent, l'inhibition des anticorps sécrétés par la « cellule double » n'était pas compétitive, car l'inhibition d'un anticorps n'interférait pas avec la lyse de l'autre type érythrocytaire portant l'haptène non apparenté.

Nous pouvons donc conclure que la double lyse n'était pas due à l'existence d'un déterminant commun entre les deux paires d'antigènes donc à des réactions croisées. D'autre part, ces tests permettaient d'exclure la synthèse d'un anticorps polyfonctionnel car, dans ce cas, l'inhibition avec l'haptène couplé à un *carrier* protéique (haptène polyvalent) inhibe les deux réactivités [16]. Par conséquent, l'absence d'une inhibition compétitive nous permettait de conclure que deux an-

ticorps de spécificités différentes étaient produits par une même cellule B.

4. Variations de spécificités au cours de l'expansion clonale des lymphocytes B normaux

Une méthode permettant la micro-culture d'un seul lymphocyte B, développée par Cunningham et Fordham [17], nous a permis de suivre l'évolution clonale pendant 48 h d'une PFC provenant d'animaux doublement immunisés par deux haptènes. Lorsqu'une cellule « double » était mise en culture, sa descendance se divisait majoritairement en clones de l'une ou l'autre des spécificités immunisantes, montrant le caractère transitoire de la double spécificité. À notre grande surprise, si 50% des PFC monospécifiques ne généraient que des cellules filles de spécificité identique, 50% généraient aussi des PFC monospécifiques, mais de l'une ou l'autre spécificité, opérant ainsi une variation au cours de la division clonale (Fig. 1). Ce changement de spécificité était dépendant des antigènes, puisque l'absence d'un des deux antigènes pendant 48 h conduisait à une disparition du clone de spécificité correspondante. Dans cette série d'expériences, des inhibitions avec les haptènes solubles au niveau des PFC micromanipulées ont permis à nouveau de contrôler la spécificité des anticorps produits. Par la même technique, dans un travail en collaboration avec S. Avrameas, des cellules B individuelles, produisant des Ig, mais sans fonction anticorps détectable, provenant de souris im-

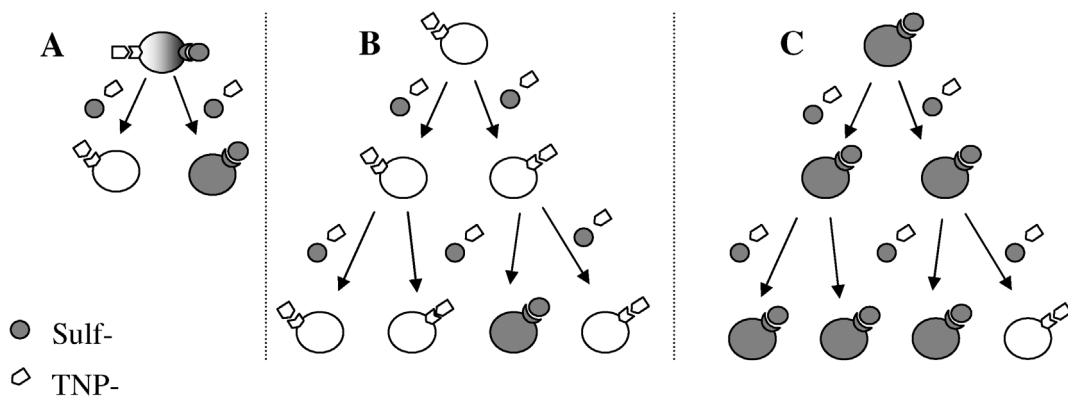


Fig. 1. Variations dépendantes de l'Ag de la spécificité du BCR au cours de l'expansion clonale d'un lymphocytes B provenant d'animaux immunisés avec TNP-KLH et SULF-LZ (A) Cellule « double productrice » anti-TNP et anti-SULF, se divisant en cellules monospécifiques. (B) Lymphocyte anti-TNP dont 25% des cellules filles expriment des BCR anti-SULF. (C) Lymphocyte anti-SULF dont 25% des cellules filles expriment des BCR anti-TNP.

munisées par la peroxydase, généraient en culture des cellules filles anti-peroxydase en présence de l'antigène. Une variation intra clonale s'opérait donc à partir de B Ig non spécifiques vers des B Ig spécifiques, au niveau d'un même clone [18]. Les travaux de Cunningham [17] par la même méthodologie montraient aussi que les cellules filles générées à partir d'une PFC provenant d'une souris immunisée avec un seul antigène présentaient aussi spontanément un degré de variation intra clonale de l'ordre de 2 à 5%. Dans nos travaux, la stimulation antigénique amplifiait cette dérive clonale antigène spécifique. Les lymphocytes B différenciés exprimaient donc deux types de récepteurs B (BCR) capables de répondre à une stimulation antigénique et de produire les anticorps de spécificité correspondante.

5. Mécanismes moléculaires des « doubles producteurs »

En général, un lymphocyte B n'exprime à sa membrane qu'un des deux allèles de la chaîne H et un des deux allèles de la chaîne L pour former le récepteur B. C'est le phénomène de l'exclusion allélique, établi par Pernis et al. au niveau cellulaire pour la chaîne H des Ig [19] après la découverte des marqueurs allotypiques [20]. Il s'agit d'un mécanisme peu fréquent dans les systèmes biologiques. L'exclusion allélique établie pour la chaîne L comme pour la chaîne H devenait alors la clé de voûte de la théorie de Burnet. Elle était affirmée, mais non formellement confirmée expérimentalement, par le travail de S. Tonegawa qui, en 1977, démontrait que les gènes des immunoglobulines sont produits par recombinaison somatique durant l'ontogenèse B [21]. Les gènes V (variables) D (diversité) J (gènes jonctionnels) et C (gène de la partie constante) de la chaîne H sont distants de plusieurs centaines de kilobases sur le même chromosome. Ils deviennent jointifs au stade pré-B, avec délétion de matériel génomique. La chaîne L va subir le même type de réarrangement (sans gène D) et les deux chaînes H et L après transcription vont être traduites et s'exprimer à la membrane pour former le BCR. L'exclusion allélique n'est pas inscrite dans ce processus, mais les réarrangements s'opèrent en cis pour une chaîne donnée la renforçaient. Plusieurs

modèles étaient proposés pour interpréter l'exclusion allélique nécessaire : (1) le modèle stochastique postulant qu'une telle recombinaison VDJ puis VJ ne pouvait être que rare pour un lymphocyte B et donc qu'un second réarrangement était improbable [22]; (2) le modèle régulateur proposant qu'une fois le réarrangement effectué, un processus d'inhibition d'un second réarrangement productif était bloqué [23]; (3) la machinerie enzymatique RAG, qui gouverne les réarrangements, serait épuisée par une première recombinaison et deviendrait donc indisponible pour un second réarrangement.

Cependant, dans notre laboratoire, l'analyse d'un myélome humain par immunofluorescence montrait qu'un clone unique était producteur de deux immunoglobulines : une IgG1 κ et d'une IgG1 λ [24], montrant qu'une inclusion isotypique de la chaîne L conduisait à la synthèse simultanée de deux IgG, la spécificité anticorps n'ayant pu être caractérisée. Et, dès 1982, les travaux de Lewis et Baltimore démontraient que des réarrangements productifs en cis de la chaîne légère κ pouvaient se produire au cours des divisions clonales d'une lignée pré-B transformée par un virus murin (AmuLV) [25], alors que le groupe de Rajewsky décrivait un hybridome producteur d'IgD ayant généré des variants idiotypiques au niveau de la chaîne lourde, par recombinaison VDJ subséquente [26]. Wabl dans une lignée murine pré-B décrivait la production simultanée de deux chaînes H par inclusion allélique [27]. Dans l'analyse de A. Caton, des sous-clones d'hybridomes provenant initialement d'une même cellule pré-B présentaient des réarrangements V–J différents de la chaîne légère L. Plus intéressant, ces clones produisaient des anticorps spécifiques anti-influenza (HA) contre des épitopes B différents [28]. De même, l'examen de plusieurs lignées tumorales B montrait que le réarrangement primaire de la chaîne κ était remplacé par un second réarrangement V κ –J κ au cours de la division clonale [29]. Il était déjà évident qu'un réarrangement au niveau de chaîne L mais aussi de la chaîne H n'oblitérait pas de seconds réarrangements productifs. Il s'agit de quelques exemples à partir de lignées transformées ou d'hybridomes, montrant la possibilité de réarrangements multiples, donc d'expression possible de plusieurs spécificités par une seule cellule ou un clone.

6. Receptor editing et doubles producteurs

Ces questions sont revenues au premier plan avec le concept de *receptor editing*, qui permet l'échappement de lymphocytes B auto réactifs à la sélection négative [30]. Au cours de l'ontogenèse, comme pour le récepteur des cellules T (TCR), les lymphocytes B qui expriment de façon aléatoire un récepteur auto immun sont éliminés. Un mécanisme d'échappement peut se produire par un second réarrangement, conduisant à la synthèse d'une seconde chaîne H ou L non auto réactive, qui se substitue à la chaîne initiale [31]. Il ne fait plus de doute que des réarrangements productifs successifs sont possibles au niveau des lymphocytes B normaux et que ces réarrangements constituent une condition importante de la tolérance B. D'après des travaux récents, 2–0% des IgL κ exprimées par les cellules B murines en voie de différenciation sont générés après réarrangements V κ –J κ multiples, et 20% environ de cellules B matures au cours de leur développement réarrangent les deux allèles L [32]. La machinerie enzymatique RAG reste donc fonctionnelle pour des réarrangements successifs, au moins de la chaîne L, que ce soit en cis ou en trans [33]. Une étape importante est donc franchie vers la bipotentialité des cellules B. Cependant, pour que l'*editing* soit fonctionnel dans les modèles auto-immuns, il est important que la chaîne originale anti-*self* ne puisse s'associer à la chaîne H avec expression membranaire du récepteur. Auquel cas, l'existence de deux récepteurs risquerait de perturber la sélection négative par baisse d'affinité pour l'antigène *self*. Or, les travaux de Weigert [34] sur des souris transgéniques, le transgène étant une chaîne H anti-ADN, montrent qu'un certain nombre de cellules B présentent des « doubles producteurs » par *editing* d'une chaîne L κ endogène, qui inhibe la liaison du BCR au DNA. L'autre récepteur, formé par la chaîne H associée à la chaîne L λ endogène, présente toujours une activité anti-ADN. Des « doubles producteurs » sont ainsi formés par inclusion isotypique. Le travail récent de Gerdes et Wabl [3] présente des résultats dans un autre modèle de souris transgénique obtenue par transplantation du noyau entier d'un lymphocyte B différencié [35]. Ces souris montrent d'une façon surprenante un réarrangement productif des deux allèles de la chaîne. En créant ensuite des sous lignées avec différentes combinaisons alléliques, Gerdes et Wable décrivent une activité auto

réactive d'un des allèles κ , avec une fréquence relativement élevée de lymphocytes B auto-réactifs, alors qu'elles auraient dû être éliminées pendant l'ontogenèse par sélection négative. Leurs analyses montrent qu'au cours de l'ontogenèse B s'opère d'abord un réarrangement productif de l'allèle κ , qui va s'associer à une chaîne H μ pour former à la surface un BCR auto-réactif. Il est probable qu'après contact avec un auto-antigène provenant d'une cellule apoptotique, un réarrangement du second allèle κ s'est opéré, conduisant à l'expression d'une seconde chaîne légère. Elle va s'associer à la chaîne H μ pour exprimer un second BCR non auto réactif, et ceci sur une même cellule B. L'*editing* est par conséquent intervenu par inclusion allélique, mais sans la destruction de la chaîne κ « anti-*self* ». Les « doubles », en sauvant des cellules B auto-réactives de la sélection négative leur ont permis de rejoindre le *pool* des cellules B matures. Ces « doubles producteurs » sont peut-être à l'origine des anticorps naturels circulants présentant une activité anti-*self* de faible affinité [36]. Ils permettent aussi de nouvelles perspectives quant à l'origine de certaines pathologies auto-immunes.

7. Conclusion

La notion d'*editing*, qui autorise dans certains cas la synthèse de deux types de BCR par une même cellule grâce à l'inclusion allélique, est donc essentiellement restreinte aux processus auto immuns. En ce qui concerne la chaîne L κ , nous avons déjà vu que chez la souris normale, un nombre important de B matures opèrent des réarrangements multiples V–J sur le même allèle et aussi opèrent des réarrangements L κ par inclusion allélique [32]. En prenant en compte un réarrangement multiple possible des chaînes lourdes [31], l'hypothèse selon laquelle le réarrangement en cis ou l'*editing* constitueraient des facteurs d'amplification importante du répertoire global des Ig est envisageable. Nos travaux sur la variation clonale « in vitro » [14], dans lesquels environ 25% des clones anti-haptènes changent de spécificité, suggèrent fortement que ces réarrangements multiples trouvent une expression membranaire à certains stades de la différenciation B. Dès nos premiers travaux, nous observions que les « doubles » ne concernaient « in vivo » que l'étape précoce de la réponse immune, quand les cellules B

matures sont en voie de différenciation. C'est probablement à ce stade que les réarrangements multiples sont productifs et deviennent un facteur d'amplification du répertoire [37].

La théorie clonale a été un outil fructueux pour la compréhension de la diversité des Ig et la compréhension du système immunitaire en général. La tolérance dans sa formulation préfigurait notamment la notion de sélection négative T et B. Cependant, figer la théorie dans ses concepts initiaux ne pouvait que l'appauvrir. L'existence des « doubles producteurs » est maintenant prouvée, grâce aux outils de biologie moléculaire. Les travaux obtenus avec des antigènes hétérologues suggèrent que les « double producteurs » sont probablement un élément d'amplification de la diversité du répertoire des immunoglobulines. Dans une revue intitulée *Death of a dogma ?* [38], Melchers, commentant les travaux de Gerdes et Wabl, écrit : « *Identification of a true functionally double-immunoglobulin producing cell indicate these 'undogmatic' B cells in the immune system should be sought at sites not yet searched.* » En fait, ces cellules *undogmatic* avaient déjà été recherchées et trouvées dans les organes lymphoïdes secondaires de la souris. Plus intéressante, cette histoire montre une fois de plus qu'une théorie, aussi fructueuse soit-elle, ne gagne en rien à être érigée en dogme.

Remerciements

Nous remercions le Dr A. Dalloul pour son examen critique du manuscrit.

Références

- [1] F.M. Burnet, The clonal selection theory of acquired immunity, *Aust. J. Sci.* 20 (1957) 67–99.
- [2] O. Makela, A.M. Cross, The diversity and specialization of immunocytes, *Prog. Allergy* 14 (1970) 145–207.
- [3] T. Gerdes, M. Wabl, Autoreactivity and allelic inclusion in a B cell nuclear transfer mouse, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 128.
- [4] A.H. Coons, The cytology of antibody formation, *J. Cell. Physiol.* 52 (Suppl. 1) (1958) 55–60.
- [5] G.J. Nossal, Antibody production by single cells, *Br. J. Exp. Pathol.* 39 (1958) 544–551.
- [6] N.K. Jerne, A.A. Nordin, Plaque formation in agar by single antibody-producing cells, *Science* 140 (1963) 405.
- [7] A.J. Cunningham, A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells, *Nature* 207 (1965) 1106–1107.
- [8] J. Couderc, J.-L. Birrien, R. Oriol, C. Bleux, P. Liacopoulos, Bispecific cells among IgM and IgG producers during the early phase of primary and secondary responses, *Eur. J. Immunol.* 5 (1975) 140–147.
- [9] J. Couderc, C. Bleux, J.-L. Birrien, P. Liacopoulos, The potentiality of antibody-producing cells. I. Bispecific cell occurrence in double stimulated cultures of syngeneic or allogeneic spleen cells of the mouse, *Immunology* 29 (1975) 653–664.
- [10] C. Bleux, C. Desaynard, J. Couderc, P. Liacopoulos, Immunity and tolerance induced by two antigens in individual B cells, *Ann. Immunol. (Paris)* 131D (1980) 173–185.
- [11] P. Liacopoulos, H. Amstutz, F. Gille, Early antibody-forming cells of double specificity, *Immunology* 20 (1971) 57–66.
- [12] P. Liacopoulos, J. Couderc, C. Bleux, J.-L. Birrien, J.-F. Bach, Rosette-forming cell and cytophilic antibody, *Eur. J. Immunol.* 3 (1973) 310–313.
- [13] J. Couderc, C. Bleux, J.-L. Birrien, P. Liacopoulos, Transient appearance of cells secreting antibody of different specificities after immunization of mice with trinitrophenylated erythrocytes, *J. Immunol.* 111 (1973) 1155–1163.
- [14] J. Couderc, C. Bleux, M. Ventura, P. Liacopoulos, Single mouse cells producing two antibody molecules and giving rise to antigen-driven intraclonal variation after immunization with two unrelated antigens, *J. Immunol.* 123 (1979) 173–181.
- [15] F.F. Richards, W.H. Konigsberg, R.W. Rosenstein, J.M. Varga, On the specificity of antibodies, *Science* 187 (1975) 130–137.
- [16] J.M. Varga, W.H. Konigsberg, F.F. Richards, Antibodies with multiple binding functions. Induction of single immunoglobulin species by structurally dissimilar haptens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 3269–3274.
- [17] A.J. Cunningham, S.A. Fordham, Antibody cell daughters can produce antibody of different specificities, *Nature* 250 (1974) 669–671.
- [18] J.-C. Antoine, C. Bleux, S. Avrameas, P. Liacopoulos, Specific antibody-secreting cells generated from cells producing immunoglobulins without detected antibody function, *Nature* 277 (1979) 218–219.
- [19] B. Pernis, G. Chiappino, A.S. Kelus, P.G. Gell, Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues, *J. Exp. Med.* 122 (1965) 853–876.
- [20] J. Oudin, [Allotypy.], *Rev. Fr. Étud. Clin. Biol.* 7 (1962) 131–133.
- [21] S. Tonegawa, Somatic generation of antibody diversity, *Nature* 302 (1983) 57–61.
- [22] C. Coleclough, R.P. Perry, K. Karjalainen, M. Weigert, Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression, *Nature* 290 (1981) 372–378.
- [23] F.W. Alt, V. Enea, A.L. Bothwell, D. Baltimore, Activity of multiple light chain genes in murine myeloma cells producing a single, functional light chain, *Cell* 21 (1980) 1–12.
- [24] J.P. Bouvet, D. Buffe, R. Oriol, P. Liacopoulos, Two myeloma globulins IgG1-kappa and IgG1-lambda, from a single patient (Im). II. Their common cellular origin as revealed by immunofluorescence studies, *Immunology* 27 (1974) 1095–1101.

- [25] S. Lewis, N. Rosenberg, F. Alt, D. Baltimore, Continuing kappa-gene rearrangement in a cell line transformed by Abelson murine leukemia virus, *Cell* 30 (1982) 807–816.
- [26] R. Dildrop, M. Bruggemann, A. Radbruch, K. Rajewsky, K. Beyreuther, Immunoglobulin V region variants in hybridoma cells. II. Recombination between V genes, *Embo J.* 1 (1982) 635–640.
- [27] P.D. Burrows, G.B. Beck-Engeser, M.R. Wabl, Immunoglobulin heavy-chain class switching in a pre-B cell line is accompanied by DNA rearrangement, *Nature* 306 (1983) 243–246.
- [28] A.J. Caton, A single pre-B cell can give rise to antigen-specific B cells that utilize distinct immunoglobulin gene rearrangements, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 815–825.
- [29] K. Harada, H. Yamagishi, Lack of feedback inhibition of V kappa gene rearrangement by productively rearranged alleles, *J. Exp. Med.* 173 (1991) 409–415.
- [30] D. Gay, T. Saunders, S. Camper, M. Weigert, Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 999–1008.
- [31] C. Chen, Z. Nagy, E.L. Prak, M. Weigert, Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing, *Immunity* 3 (1995) 747–755.
- [32] T. Yamagami, E. ten Boekel, J. Andersson, A. Rolink, F. Melchers, Frequencies of multiple IgL chain gene rearrangements in single normal or kappaL chain-deficient B lineage cells, *Immunity* 11 (1999) 317–327.
- [33] P.J. Fink, C.J. McMahan, Lymphocytes rearrange, edit and revise their antigen receptors to be useful yet safe, *Immunol. Today* 21 (2000) 561–566.
- [34] Y. Li, H. Li, M. Weigert, Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 181–188.
- [35] K. Hochedlinger, R. Jaenisch, Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells, *Nature* 415 (2002) 1035–1038.
- [36] G. Dighiero, B. Guilbert, S. Avrameas, Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies, *J. Immunol.* 128 (1982) 2788–2792.
- [37] P. Liacopoulos, Single cells responding to two unrelated antigens, in: E.E. Sercarz, A.J. Cunningham (Eds.), *Strategies of Immune Regulation*, Academic Press, 1980, pp. 457–463.
- [38] F. Melchers, The death of a dogma?, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 1199–1201.