

**UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS DESCARTES – SITE NECKER
ECOLE DOCTORALE Gc2iD**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

**Sciences de la vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie**

présentée et soutenue publiquement par

Marc DESCATOIRE

le 19 NOVEMBRE 2013

**Les cellules B de la zone marginale chez l'homme :
un lignage NOTCH 2 dépendant**

JURY

Monsieur le Professeur Frédéric DAVI	Président
Monsieur le Docteur Bertrand NADEL	Rapporteur
Madame le Docteur Rachel GOLUB	Rapporteur
Monsieur le Docteur Eric MEFFRE	Examineur
Monsieur le Professeur Antonio FREITAS	Examineur
Monsieur le Professeur Jean-Claude WEILL	Directeur de thèse

L'homme raisonnable s'adapte au monde ; l'homme déraisonnable s'obstine à essayer d'adapter le monde à lui-même. Tout progrès dépend donc de l'homme déraisonnable.

George Bernard Shaw

Résumé

Les lymphocytes B de la zone marginale (MZB) dérivent d'une voie de différenciation indépendante du centre germinatif chez la souris, mais cette question reste controversée chez l'homme. Chez la souris, la différenciation de ces cellules s'effectue dans la rate en utilisant la voie Notch2. Un précurseur lymphoïde murin a été identifié, et sa différenciation en MZB par des signaux Notch2 a été démontrée *in vitro*. Nous avons cherché un tel précurseur dans le compartiment B IgD⁺ CD27⁻ splénique chez l'homme. Sur la base de sa capacité à acquérir *in vitro* les marqueurs des cellules MZB en réponse à un signal donné par le ligand de Notch, Delta Like One (Dll1), nous avons identifié dans la rate humaine deux populations de cellules B potentiellement précurseurs. La première présente un taux de mutations somatiques se rapprochant du taux des MZB et semble engagée dans une voie de différenciation plus mature qui reste à préciser ; la deuxième très peu mutée paraît être un précurseur très précoce des MZB. *In vitro* cette population acquiert un programme qui la rapproche des MZB, ce qui est confirmé par l'induction de gènes que nous avons identifié comme spécifiquement exprimés par les MZB (comme le facteur de transcription SOX7) comparés aux cellules B mémoires. Cette population est majoritairement présente durant l'enfance puis diminue fortement. Nous avons aussi identifié, dans la rate de jeunes enfants, des cellules non-lymphoïdes exprimant DLL1 à la périphérie de la zone marginale. Pour confirmer ces résultats, nous avons analysés le sang de trois patients présentant une mutation génétique invalidant un des deux allèles du gène NOTCH2 (Syndrome d'Alagille). Contrairement aux contrôles sains, ces patients présentent un taux de cellules MZB dans le sang 2 à 3 fois diminué en comparaison du taux de cellules B mémoires. Ce phénotype rappelle celui des souris haploinsuffisantes pour Notch2, ce qui semble bien confirmer que, chez l'homme comme chez la souris, la population zone marginale représente un lignage cellulaire spécifique dont la mise en place est indépendante du centre germinatif.

Mots clefs : MZB, NOTCH2, MZP, différenciation, Alagille

Abstract

Marginal zone B cell (MZB) is a specific B cell lineage in mice. The existence of such a lineage in human remains controversial. In mice, MZB differentiation takes place in the spleen and is under the control of a Notch2 signal. A marginal zone B cell precursor (MZP) has been identified in mice and its *in vitro* differentiation into MZB cell requires a Notch2 signaling. We have looked for such a precursor among IgD⁺ CD27⁻ splenic B cell compartment in human. Based on its ability to acquire MZB cell markers *in vitro* after a Notch signaling, provided by the Notch ligand Delta Like One (Dll1), we identified in human spleen two B cell subsets that could be putative precursors. One shows a mutational rate close to the rate found in MZB and seems already engaged in an unidentified mature differentiation stage. The second population appears almost unmutated and seems to be a very early precursor for MZB. *In vitro*, this population acquires a transcriptional program resembling the MZB program. This is confirmed by the induction of genes specifically expressed by MZB (like SOX7) compared to B cell memory. Putative MZP is found in a higher proportion in children compared to adults and we also identified in children spleen non-lymphoid cells expressing DLL1 at the marginal zone border. To confirm all these results, we analyzed blood samples of three patients that are mutated in one of the two NOTCH2 alleles and suffering from the Alagille syndrome. Contrarily to healthy controls, the 3 Alagille patients showed a 2 to 3 fold decrease in MZB level compared to memory B cell level. Interestingly this phenotype is similar to mice showing a Notch2 haploinsufficiency, thus confirming that MZB population is, as in mice, a specific B cell lineage in human.

Key word: MZB, NOTCH2, MZP, differentiation, Alagille

A *Francesca*, puisses-tu m'aimer pour toujours.

A mes frères, *Steve* et *Dylan*, puissiez-vous toujours vous donner les moyens de vos ambitions
,quelles qu'elles soient.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier les Docteurs Bertrand Nadel et Rachel Golub d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse. Je remercie également très chaleureusement le Professeur Frédéric Davi d'avoir accepté de présider ce jury et les Docteurs Eric Meffre et Antonio Freitas d'avoir accepté d'apporter leur expertise en y participant.

Jean-Claude et Claude-Agnès, je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir accepté en tant que M2, puis en tant que doctorant dans le laboratoire. Malgré une petite année de flottement en début de thèse avec un projet initial qui n'a jamais démarré, vous m'avez fait confiance lorsque je suis venu vous proposer de mettre en culture des cellules B naïves et transitionnelles sur des OP9-DLL1. Surtout, je vous remercie pour la liberté que vous m'avez accordée durant cette thèse, les horaires, les manips, les idées, etc. Peu de mes amis thésards ont eu cette chance. Cependant, vous avez bien entendu toujours été présents et disponibles pour me guider et me former à la rigueur scientifique aussi bien intellectuelle qu'expérimentale et je vous remercie pour cela. Je suis arrivé étudiant et je finis docteur et je vous le dois.

Sandra, je vais faire sobre car je te sais émotive. Premièrement, merci de m'avoir appris tout ce que tu sais sur les cellules B chez l'homme et en particulier les MZB. Je ne pouvais avoir meilleur formateur expérimental et intellectuel que toi. Toi aussi tu as su me laisser la liberté dont j'ai besoin lorsque j'entreprends des choses, mais toi aussi tu as su être là quand j'en ai eu besoin. J'ai pu compter sur toi durant ces 4 ans et demi et tu ne m'as jamais laissé tomber. Je te remercie pour ce dévouement. Je n'oublie pas non plus ton rôle dans l'écriture de l'article et dans les précieuses données que tu as fournies. On a vécu ensemble des choses formidables à Paris ou ailleurs que je n'oublierai pas. J'espère être devenu ton ami car toi tu es une des miennes.

Sebastien, l'homme qui vaut tellement d'être connu et reconnu. Seb, merci pour les INNOMBRABLES réponses aux questions que je t'ai posées en 4ans. Jamais tu n'as oublié de répondre à une seule d'entre-elles et bien souvent, même occupé, tu as pris le temps pour moi. J'ai aimé partager avec toi mes infos et mes idées les plus loufoques et me rendre compte que quasiment à chaque fois, quelqu'un y avait pensé avant... On a aussi bien rigolé ensemble, avec Sandra et même de Sandra ! C'était vraiment cool. Sandra et toi êtes d'excellents formateurs. Tiens toi prêt, car j'ai la conviction qu'un jour, nous ferons quelques chose ensemble. Merci donc pour ces 4 ans et demi de soutien, d'encouragement, de partage, etc.

Merci Lucie pour toute les rates que tu m'as aidé à traiter, pour les dizaines de milliards de cellules que nous avons congelées ensemble et pour ta bonne humeur générale.

Merci à Marija et Valérie, mes deux collègues doctorantes d'avoir vous aussi galéré, et même plus que moi pendant 4 ans, c'est gentil de m'avoir montré que ça pouvait être bien plus pénible que ça, une thèse ! Vous êtes toutes les deux de grandes bosseuses et tout le monde sait que ça paiera rapidement pour vous. Je vous le souhaite en tout cas.

Merci à Rémi, l'homme qui commente quasiment tout ce qu'il fait. Premièrement, parce que tu es vraiment un bon camarade et surtout pour toute l'aide précieuse que tu m'as apportée quand j'ai du galérer à faire les figures de l'article. Merci pour ta patience avec moi, m'énervant devant un ordi.

Merci Simon pour l'amitié que nous avons développée. On a bien rigolé au labo et au cours des 3 matchs de foot que tu as réussi à jouer en 2 ans... Fait attention à toi mec, tu vieillis et ton corps te le fait sentir. Heureusement, quoi qu'il arrive en science ou en sport tu pourras toujours compter sur ta petite femme, tes talents de pâtissier et de barman pour t'en sortir.

Merci Barbara pour toute les petites leçons d'Italien, pour ta bonne humeur envers moi et pour toutes les fois où tu m'as bien fait rire en parlant à tes tubes !

Merci à Giulia, alias Rachel Cooper, d'être arrivée au labo tel un rayon de soleil. Tu as illuminé le bureau de ta bonne humeur, à tel point que tu m'as brûlé la rétine droite à force d'être assise à ma droite ! Tu es nulle au ping-pong, il va bien falloir que tu t'en rendes compte un jour par contre !

Merci enfin à tous les autres membres du labo pour tout ce qu'ils ont fait pour moi au cours de la thèse, Damiana, Yi, Fred, Annie, François, Isabelle, Delphine, Matthieu, Davide.

Je remercie également d'autres personnes extérieures au laboratoire, mais qui m'ont donné un coup de main, parfois décisif, quand j'en ai eu besoin.

Le Dr Sabine Irtan pour sa gentillesse et sa collaboration infaillible et donc pour les nombreuses rates de patients qu'elle m'a fourni au cours de ces trois dernières années. L'abondance de ce matériel biologique de choix a été décisive pour ce projet.

Yohan, qui m'a hébergé lorsque je suis arrivé à Paris et Albertine Desruelles qui a fait en sorte de me trouver une place en résidence universitaire durant mes 3 premières années à Paris. Sans elle, je ne serais jamais venu faire mon master et ma thèse ici.

David Nemazze du Research Scripp Institut de San Diego qui m'a gentiment accueilli dans son laboratoire pour mon stage de M1. Je regrette d'avoir fait quasiment n'importe quoi là bas, mais c'est en faisant des erreurs là bas que je ne les ai pas reproduites ici. En tout cas, David m'a toujours encouragé et m'a conseillé de venir dans ce labo et je le remercie pour cela.

Je remercie tout mes anciens profs de science du collège jusqu'au master, avec une mention spéciale à mes professeurs de l'IUT A de Lille, car il n'y en a pas un qui ne m'ait pas donné envie d'en faire plus tard. Je remercie aussi tous mes professeurs de mathématiques, d'anglais et de français qui m'avaient tous assuré que je ne pourrai pas aller plus loin qu'une licence. Heureusement que je suis un garçon qui sait toujours très bien ce qu'il fait, où il va, et de quoi il a besoin pour cela !

Enfin je remercie celle qui me supporte au jour le jour, celle qui a apaisé toutes mes angoisses, Francesca.

Merci à la compagnie créole pour leurs tubes...

Table des matières

Table des matières.....	9
Liste des abréviations	11
Index des Tableaux et des Figures.....	13
INTRODUCTION GENERALE	16
1. Cellules B de la zone marginale chez la souris	17
1.1 Ontogénie du compartiment B périphérique	17
1.1.1 Les cellules transitionnelles	17
1.1.2 Les cellules folliculaires	18
1.1.2.1 Les FO I	19
1.1.2.2 Les FO II	20
1.1.3 Les B1	20
1.1.4 Les cellules B de la zone marginale	21
1.2 Biologie des cellules B de la zone marginale	22
1.2.1 Histologie fonctionnelle de la zone marginale	22
1.2.1.1 Description	22
1.2.1.2 Mécanismes moléculaires de migration et rétention des cellules B dans la zone marginale	24
1.2.2 Les réponses T-indépendantes.....	27
1.2.3 Collaboration aux réponses T-dépendantes.....	28
1.3 Mécanismes de différenciation des cellules B de la zone marginale	30
1.3.1 La voie NOTCH 2- DLL1	31
1.3.2 Rôle du BCR.....	33
1.3.3 Rôle de BAFF et de la voie NF-κB.....	34
1.3.4 Identification d'un précurseur des MZB	36
2. Cellules B de la zone marginale chez l'homme	38
2.1 Le compartiment B périphérique.....	38
2.1.1 Les cellules transitionnelles et naïves	38
2.1.2 Cellules B anergiques et « exhausted ».....	40
2.1.3 Le compartiment CD27+	42
2.2 La population IgD ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ chez l'homme.....	44

2.2.1 Première identification des cellules IgD ⁺ CD27 ⁺ chez l'homme : Des cellules mutées avec des propriétés de cellules mémoires.	44
2.2.2 Remise en question du marqueur CD27	46
2.2.3 Ontogénie et maintenance des cellules IgD ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺	46
2.2.4 Biologie des cellules IgD ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺	49
2.3 Travaux du laboratoire et formulation de l'hypothèse d'un lignage B zone marginale complexifié chez l'homme.....	52
2.3.1 Première observation : Les patients déficients en CD40 ligand.....	52
2.3.2 Les IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ du sang et de la rate représentent une seule population recirculante.....	53
2.3.3 Pré-diversification antigène indépendante des IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ via un programme de développement.....	54
2.3.4 Pré-diversification du répertoire par un mécanisme d'hypermutation somatique : exemple du mouton	55
2.3.5 Proposition du laboratoire.....	56
2.4 Controverses et résultats contradictoires concernant l'hypothèse d'une population MZB chez l'homme.....	57
TRAVAUX ORIGINAUX	61
DISCUSSION	111
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	128
BIBLIOGRAPHIE.....	132
ANNEXES	140

Liste des abréviations

AID : Activation-Induced cytidine Deaminase
An1 : Anergic population 1
BCR: B Cell Receptor
BTK : Bruton's Tyrosine Kinase
capPS : Polysaccharide de la capsule
CDR3: Complementarity Determining Region 3
DC: Dendritic Cell
DICV : Déficit Immunitaire Commun Variable
DLL1: Delta Like One
FDC : Follicular Dendritic Cell
FO I : Cellule B folliculaire de type 1
FO II : Cellule B folliculaire de type 2
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue
GC : Germinal Center
K-O : Knock-out
LPS : lipopolysaccharide
MARCO: Macrophage Receptor with Collagenous Structure
MHC: Major Histocompatibility Complex
MTG: Mitotracker Green
MZB : Marginal Zone B cell
MZM : Macrophage de la Zone Marginale
MZP : Marginal Zone B cell precursor
PCA : Principal Component Analysis
RBP-J : recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
SCID : Severe Combined Immunodeficiency
T1 : Cellule B transitionnelle 1
T2 : Cellule B transitionnelle 2

T3 : Cellule B transitionnelle 3

TI-1 : Antigène T-indépendant de type 1

TI-2 : Antigène T-indépendant de type 2

TLR : Toll Like Receptor

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VHC : Virus de l'Hépatite C

ZM : Zone Marginale

Index des Tableaux et des Figures

1/ FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. **Histologie de la pulpe blanche chez la souris**

Figure 2 **Résumé des différents signaux impliqués dans la rétention des cellules B de la zone marginale chez la souris**

Figure 3. **Illustration du rôle de S1P1 dans la réponse T-dépendante des cellules B de la zone marginale chez la souris**

Figure 4. **Représentation schématique de la voie Notch**

Figure 5. **Schéma de la voie NF- κ B dans les T2 de la souris**

Figure 6. **Voie de différenciation des lymphocytes B périphériques chez la souris**

Figure 7. **Le compartiment IgD⁺CD27⁻ chez l'homme**

Figure 8. **Histologie de la zone marginale chez l'homme**

Figure 9. **Ontogénie des mutations somatiques des populations IgD⁺ CD27⁺ et IgD⁻ CD27⁺ de la rate chez l'homme**

Figure 10. **Schéma des voies de signalisation associées aux TLR**

Figure 11. **Histologie de la zone marginale chez un enfant de 8 mois**

DISCUSSION

Figure 12. **Illustration résumant la nature des relations clonales trouvées par Dunn-Walters et coll. entre les différentes populations B chez l'homme**

ANNEXES

Figure 13. **Analyse par cytométrie en flux des cellules B du sang des patients Hadju-Cheney**

Figure 14. **Contaminants des IgD⁺ CD27⁺ qui influencent la détection de l'AID en qPCR**

2/ TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1. **Phénotype de surface des principales populations B périphériques chez la souris**

Tableau 2. **Phénotype de surface des principales populations B périphériques chez l'homme**

DISCUSSION

Tableau 3. **Nombre de sondes dont l'expression est au moins 2 fois différente entre différentes populations ($p < 0.05$)**

Tableau 4. **Nombre de gènes de la signature NOTCH2 dans les MZP**

ANNEXES

Tableau 5. **Gènes concordants de la signature NOTCH2 dans les MZP**

Tableau 6. **Gènes discordants de la signature NOTCH2 dans les MZP**

Tableau 7. **Mutations somatiques des cellules IgD⁺ CD27⁺ et IgD⁻ CD27⁺ des patients Hadju-Cheney**

INTRODUCTION GENERALE

1. Cellules B de la zone marginale chez la souris

1.1 Ontogénie du compartiment B périphérique

Pour la souris comme chez tous les mammifères, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse durant toute la vie de l'organisme. La différenciation des lymphocytes B à partir du progéniteur lymphoïde commun est sous contrôle du gène maître *Pax5*. Chaque lymphocyte B acquiert une immunoglobuline de surface qui lui confère sa spécificité pour l'antigène et chaque cellule B est alors qualifiée de « clone » puisque sa spécificité est en théorie unique. Lorsque la cellule B sort de la moelle osseuse pour rejoindre la périphérie, elle est appelée cellule B transitionnelle. Les cellules transitionnelles sont immatures et caractérisées par une forte propension à l'apoptose ou à l'anergie lorsque leurs récepteurs à l'antigène (BCR) sont engagés. Ce mécanisme est responsable d'une sélection négative des cellules les plus auto-réactives de sorte que seules les cellules faiblement ou non auto-réactives atteignent le stade cellules B matures appelées naïves ou folliculaires. Sur des critères phénotypiques et fonctionnels, il a été proposé de distinguer les cellules transitionnelles en plusieurs sous-populations.

1.1.1 Les cellules transitionnelles

Initialement Loder et coll. [1] ont défini deux populations de cellules B transitionnelles ; les T1 $\text{IgM}^{\text{fort}} \text{IgD}^{\text{neg}} \text{CD21}^{\text{neg}} \text{CD23}^{\text{neg}}$ et les T2 $\text{IgM}^{\text{fort}} \text{IgD}^{\text{fort}} \text{CD21}^{\text{fort}}$ et CD23 positives. En 2001, Allman et coll. [2] en se servant du marqueur AA4 exprimé uniquement sur les cellules immatures définissent 3 sous-populations de cellules, représentant toutes environ 5-6% des cellules B de la rate et appelées T1 ($\text{IgM}^{\text{fort}} \text{CD23}^{\text{neg}}$) ; T2 ($\text{IgM}^{\text{fort}} \text{CD23}^{\text{+}}$) et T3 ($\text{IgM}^{\text{faible}} \text{CD23}^{\text{+}}$) [3]. Ces populations possèdent des caractéristiques fonctionnelles de cellules transitionnelles avec, entre autre, un fort taux de renouvellement,

une incapacité à répondre après engagement du BCR et plus généralement une immaturité fonctionnelle. Ces caractéristiques sont aussi celles de cellules B anergiques et il a été démontré plus tard que la population T3 n'est en fait pas une population de cellules transitionnelles, mais bien un pool de cellules B anergiques, d'une demi-vie très courte (4 jours) finalement appelée An1 pour « Anergic population 1 » [3].

Bien qu'il soit clair que les T1 ne prolifèrent pas après stimulation de leurs BCR et au contraire subissent la sélection négative via l'apoptose, plusieurs études aboutissent à des résultats contradictoires sur les T2 pour les mêmes signaux [4]. Certaines études suggèrent même que les T2 soient la cible d'une sélection positive à la périphérie [5, 6].

Contrairement à Loder, Allman ne distingue aucune population T2 CD21^{fort}. L'IgD et le CD21 étant graduellement acquis jusqu'aux cellules « T3 » qui restent elles-mêmes IgD et CD21 plus faible que les cellules B matures. Les T1 défini par les deux groupes semblent bien être la même population (IgD^{neg} CD21^{neg} CD23^{neg} et AA4⁺) cependant les T2 diffèrent (IgD^{fort} CD21^{fort} pour Loder et IgD^{faible} CD21^{faible} pour Allman). Les T2 de Loder sont souvent appelées T2 CD21^{fort} et ont été finalement proposées comme étant des cellules précurseurs d'une population B mature, les cellules B de la zone marginale (voir chapitre 1.3.4).

1.1.2 Les cellules folliculaires

Les cellules transitionnelles immatures évoluent en cellules matures appelées cellules folliculaires ou naïves. Chez la souris contrairement à l'homme le terme « folliculaire » est plus employé que le terme « naïve ». Cette dénomination est tirée de la structure histologique que forment ces cellules dans les organes lymphoïdes secondaires : les follicules B, qui forment des concentrations sphériques de milliers de cellules B, disséminées à travers l'organe. En 2001, une équipe est parvenue à distinguer deux types de cellules B folliculaires [7]. Ces deux populations appelées FO I (IgD^{fort} IgM^{faible}) et FO II (IgD^{fort} IgM^{fort}) recirculent

et sont à longue vie. Elles représentent respectivement environ 30% et 8% des lymphocytes B de la rate [7].

1.1.2.1 Les FO I

Initialement, c'est lors d'un travail de Hardy de 1983 [8] que la distinction des deux populations, basée sur le marquage de l'IgM et de l'IgD, est faite. Sans s'intéresser d'avantage aux cellules FO II, ce travail montre que la population FO I ($IgD^{fort} IgM^{faible}$) est très fortement réduite dans une souris mutée pour le gène *Xid* aussi appelé *Btk* (Bruton's tyrosine kinase). La protéine Btk est associée comme régulateur positif dans la transduction du signal provenant du BCR, de sorte que le développement de la population FO I apparait dépendant d'un tel signal. Bien qu'aucune valeur ni aucune image ne soit donnée, l'étude de 2001 semble confirmer l'observation faite par Hardy et suggère qu'une sélection positive est requise pour la différenciation en FO I. Allman et coll ont aussi rapporté un défaut de maturation en cellules « T3/An1 » dans les souris *Xid* (la population « T3/An1 » étant 10 fois réduite). Or ces cellules ont été finalement caractérisées comme étant des cellules anergisées après un fort signal du BCR fourni par un auto-antigène. La transduction du signal perturbée dans les souris *Xid* explique donc l'absence des « T3/An1 » d'Allman. Le phénotype des « T3/An1 » et des FO I semble être très proche (tableau 1). Ainsi, dû à un recouvrement des deux populations lors des marquages de surface au cours de cette étude (le marqueur AA4.1 n'étant pas utilisé pour exclure les cellules transitionnelles et anergiques), il est possible que la diminution drastique des FO I constatée dans l'étude de 2001 soit, au moins en partie, due à une population « T3 » largement réduite.

1.1.2.2 Les FO II

Contrairement aux FO I, il est clair que les FO II se développent de manière Btk-indépendante. Grâce à un modèle de souris transgénique non-lymphopénique codant pour un BCR anti-HEL, les auteurs montrent qu'en absence totale d'antigène HEL, les cellules positives pour le BCR transgénique se développaient en FO II et non en FO I [7]. A l'inverse, les cellules T1 HEL⁺ ou FO II HEL⁺ stimulées *in vitro* avec des faibles concentrations de HEL acquièrent rapidement un phénotype de FO I IgD^{fort} IgM^{faible} [7].

De ces résultats, un schéma qui semble aujourd'hui accepté se dégage [9]. Les FO I dériveraient des cellules T2 grâce à une sélection positive par l'antigène et un signal transduit du BCR via Btk. A l'inverse, les FO II se développeraient à partir des cellules transitionnelles qui n'auraient pas rencontré d'antigène du soi et n'auraient reçu aucun signal via le BCR. Les FO II garderaient une plasticité leur permettant de se différencier en FO I selon certains signaux.

1.1.3 Les B1

Les cellules B1, nommées ainsi car se développant avant les autres populations B, ont pour fonction principale la sécrétion spontanée d'IgM polyspécifiques appelées anticorps naturels. Elles ont aussi montré des propriétés auto-réactives, les reliant à certains modèles murins auto-immuns [10]. Sur la base de la présence du CD5, deux populations de cellules B1 sont distinguées : Les B1-a (CD5⁺) et les B1-b (CD5⁻). La localisation principale des B1 est la cavité péritonéale mais elles représentent aussi entre 2 et 3 pourcents des cellules B spléniques [11]. Elles sont mises en place avant la naissance et leur production s'arrête dans les semaines suivant la naissance. Néanmoins, elles sont maintenues tout au long de la vie de l'animal par auto-renouvellement. La souris hétérozygote pour *Notch2* montre une réduction de 2 fois des B1-a et de 1,6 fois des B1-b, impliquant la voie Notch2 dans le maintien des B1

[12]. Les B1 représentent un lignage spécifique chez la souris et des précurseurs dans la moelle osseuse et dans la rate adulte ont été identifiés ces dernières années, au moins en ce qui concerne les B1-b [13, 14]. Les B1 partagent certaines similarités avec une autre population de cellule B, les B de la zone marginale, notamment concernant leur implication dans les réponses T-indépendantes [15].

1.1.4 Les cellules B de la zone marginale

La dernière grande population de cellules B périphériques chez la souris est appelée « cellules B de la zone marginale (MZB) ». Elle tire son nom de sa localisation anatomique dans la rate au niveau de la zone marginale. Elle apparaît aux alentours de 1 mois de vie reflétant une différenciation différente des cellules folliculaires. Ces cellules ne recirculent pas et semblent être à longue vie comme le suggèrent différents travaux [16, 17]. Dans une souris adulte, les MZB représentent aux alentours de 6 à 8% des B matures de la rate soit environ 4-5% des B totaux. Le phénotype de ces cellules ($IgD^{faible} IgM^{fort} CD21^{fort} CD23^{faible}$ et $CD1d^{fort}$) permet de les discriminer des populations décrites précédemment (tableau 1).

Tableau 1. Phénotype de surface des principales populations B périphériques chez la souris.

	AA4.1	IgD	IgM	CD21	CD23	B220 (pan B)
T1	+++	-/faible	+++	-/faible	-/faible	++
T2	+++	+	+++	+	++	++
T3/An1	+++	++	++	++	++	++
T2hi/MZP	+	+++	+++	+++	++	++
FO I	-	+++	++	++	++	++
FO II	-	+++	+++	++	++	++
MZB	-	+	+++	+++	-/faible	++
B1-a (CD5+) ¹	-	+	+++	+	-	+
B1-b (CD5-) ¹	-	+	+++	+	-	+

¹Le marqueur CD43 est aussi largement utilisé pour distinguer les B1 chez la souris des autres sous-populations.

1.2 Biologie des cellules B de la zone marginale

1.2.1 Histologie fonctionnelle de la zone marginale

1.2.1.1 Description

Chez la souris, la zone marginale (ZM) n'est mise en place qu'à partir de 3 à 4 semaines après la naissance. La ZM est la région située entre la pulpe blanche, constituée des follicules lymphoïdes B et T, et la pulpe rouge. Elle est séparée des cellules B folliculaires par le sinus marginal qui est un sinus vasculaire poreux où le sang entrant dans la rate est déversé. Le sang rejoint ensuite la pulpe rouge en traversant la zone marginale pour retourner dans la circulation via les sinus veineux. La zone marginale et les cellules qu'elle contient sont donc continuellement baignées par le sang et sont stratégiquement situées pour détecter et répondre aux différents antigènes apportés par le sang [18] (Figure 1).

La ZM est principalement constituée des cellules B portant le même nom. Elle comporte aussi des cellules stromales, aussi appelées cellules réticulées qui forment un réseau cellulaire dont un des rôles est la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire qui permet d'établir la structure de la région. Au moins deux types de macrophages spécialisés sont détectés dans la zone marginale. Premièrement, les macrophages métallophiliques qui composent la face externe du sinus marginal et qui sont identifiés grâce à l'anticorps MOMA-1. Cette couche de macrophages est spécialisée dans la détoxification des molécules exogènes présentes dans le sang, en particulier des lipopolysaccharide (LPS). Deuxièmement, les macrophages de la zone marginale (MZM) qui sont eux identifiés grâce à la molécule Marco (Macrophage receptor with collagenous structure) appartenant à la famille des « scavenger receptors » et à la molécule Sign-R1 (une lectine de type C). Ils sont disséminés à travers toute la région et participent à la récupération des antigènes ainsi qu'à leur présentation aux cellules B de la zone marginale [19-21]. D'autres types cellulaires, notamment des cellules

dendritiques, des cellules T et des cellules mémoires B et T sont occasionnellement repérées dans la ZM, cependant ces cellules ne semblent pas être des cellules résidentes et ne transitent dans la ZM que sous certaines conditions d'activations.

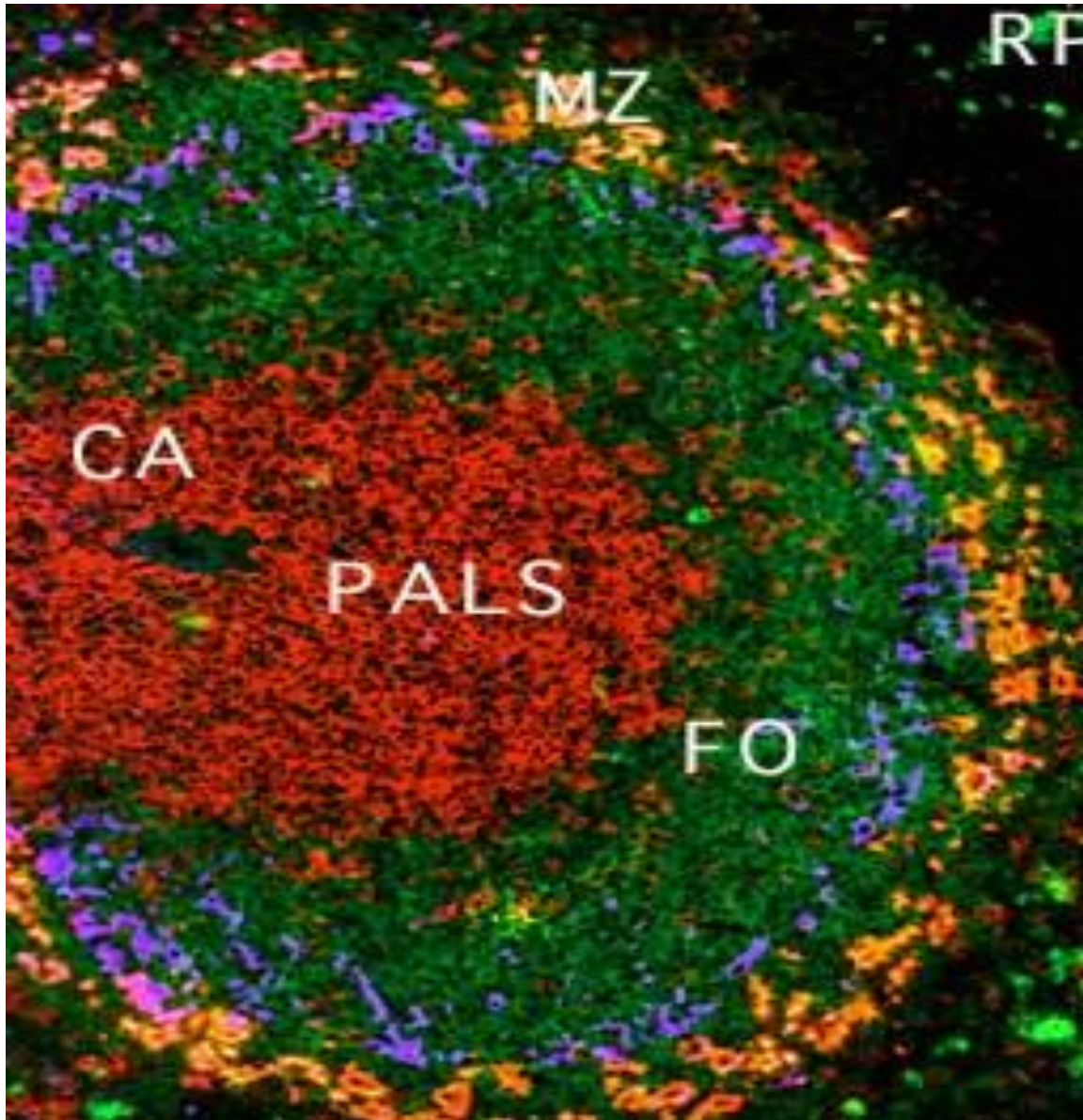


Figure 1 : Histologie de la pulpe blanche dans la rate de souris. En violet, les macrophages métallophiliques qui révèlent le sinus marginal. En rouge, les lymphocytes T. En vert, les lymphocytes B, comprenant des lymphocytes B folliculaires en contact avec les lymphocytes T et séparés des lymphocytes B de la zone marginale par le sinus marginal. En jaune, les macrophages de la zone marginale. CA, Artériole centrale. PALS, Periarteriolar Lymphoid Sheath. FO, lymphocytes B folliculaires. MZ, Zone marginale. RP, Pulpe Rouge. Image provenant du laboratoire de John F Kearney.

1.2.1.2 Mécanismes moléculaires de migration et rétention des cellules B dans la zone marginale

La mise en place des follicules B est dépendante du facteur Cxcl13 sécrété par les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et perçu par les lymphocytes B via leur récepteur de surface Cxcr5. Les cellules migrent donc selon le gradient de Cxcl13 pour se regrouper autour d'un réseau de FDC et former le follicule B. Les MZB sont aussi sensibles que les cellules folliculaires à ce gradient, de sorte que plusieurs mécanismes sont nécessaires aux MZB pour contrebalancer cet effet et assurer leur bonne localisation dans la zone marginale. Le principal mécanisme de migration des cellules vers la ZM est assuré par le récepteur S1p1 (Sphingosine 1 phosphate receptor). S1p1 et le récepteur S1p3 sont impliqués dans la réponse chimiotactique au ligand S1p, fortement concentré dans le sang. La ZM est une zone constamment baignée par celui-ci et les gènes S1p1 et S1p3 sont plus exprimés par les MZB que les FO. La souris knock-out (K-O) pour S1p1 montre une absence complète de la zone marginale mais un taux de MZB normal, les cellules étant toutes localisées au niveau des follicules. La différence d'expression du gène S1p3 en faveur des MZB comparée aux FO est beaucoup plus forte que pour S1p1, de plus, S1p3 semble *in vitro* être beaucoup plus efficace que S1p1 pour faire migrer des cellules B selon un gradient de S1p. Mais curieusement, dans la souris *S1p3*^{-/-} les MZB n'ont aucun défaut de localisation suggérant que le gène n'est pas essentiel pour cela. Cependant, le double mutant *S1p1-Cxcl13* ne montre aucune délocalisation des MZB indiquant que le signal S1p3 restant permet quand même dans un tel cas la localisation des MZB dans la zone marginale [18].

Certaines sous-unités d'intégrines sont plus fortement exprimées par les MZB que par les FO, notamment $\alpha 4$, $\beta 2$ et αL . Il en résulte qu'une plus grande quantité d'intégrines Lfa-1 ($\alpha L\beta 2$) et Vla4 ($\alpha 4\beta 1$) est exprimée par les MZB. Ces deux intégrines ont respectivement pour récepteur Icam-1 et Vcam-1. Or dans la rate ces deux récepteurs sont majoritairement exprimés dans la ZM par les cellules stromales expliquant aussi en partie la localisation des MZB. Ces deux

intégrines ont des rôles redondants de sorte que la souris $\beta 2^{-/-}$ ou $Icam1^{-/-}$ ne montre aucune différence en terme de localisation des MZB comparées aux contrôles sauvages. A l'inverse la souris $\beta 2^{-/-}$ ou $Icam^{-/-}$ traitée avec un anticorps bloquant $\alpha 4$ montre une réduction drastique des MZB localisées dans la ZM [22].

Logiquement, les K-O des différents gènes impliqués dans la transduction du signal au niveau des intégrines et/ou du chimiotactisme tels que *Rac-2*, *Dock2*, *Pyk-2* ont abouti à un défaut de localisation et de rétention des MZB dans la zone marginale [23-25].

L'utilisation de la toxine pertussique qui inhibe de manière non spécifique les protéines G αi couplées à leurs récepteurs membranaires induit une délocalisation des MZB [25]. Une protéine G αi en particulier a été identifiée comme jouant un rôle important dans la localisation des MZB : CB2 (G αi -coupled cannabinoid receptor 2) dont le ligand 2-AG (2-arachidonylglycerol) est produit en abondance dans la zone marginale. L'utilisation prolongée d'un antagoniste du Cb2 induit une délocalisation importante des MZB alors que la sur-expression de Cb2 dans des cellules B induit leur relocalisation dans la zone marginale [26].

Bien que l'ensemble des mécanismes mentionnés précédemment soit intrinsèque aux MZB, il existe au moins un mécanisme de rétention des cellules dans la ZM qui ne dépende pas directement de ces cellules. Les macrophages de la zone marginale (MZM) expriment le récepteur de surface Marco qui, grâce à son domaine SRCR (scavenger receptor cysteine-rich), est capable de lier spécifiquement le CD19 à la surface des lymphocytes B. L'injection par voie intra-veineuse d'un anticorps bloquant Marco induit la délocalisation des MZB au niveau des follicules démontrant l'importance des MZMs dans la rétention des MZB [27].

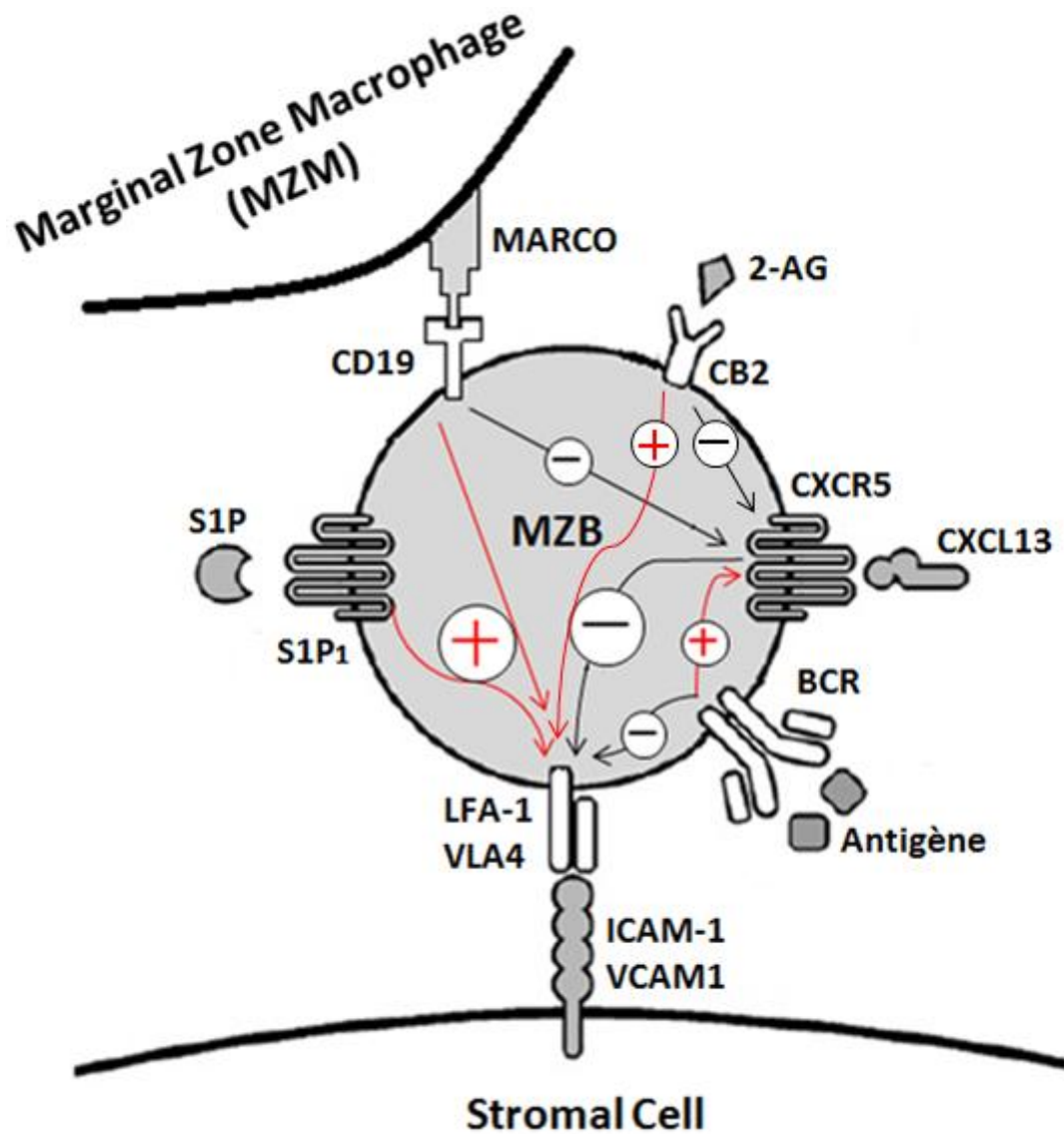


Figure 2 : Résumé des différents signaux impliqués dans la rétention des cellules B de la zone marginale chez la souris, adapté de Georg Kraal and Reina Mebius. *New Insights into the Cell Biology of the Marginal Zone of the Spleen*. *International Review of Cytology*, (2006) Vol. 250 p175-216.

1.2.2 Les réponses T-indépendantes

Les antigènes T-indépendants sont caractérisés par leur capacité à activer les cellules B sans l'aide des cellules T. L'activation des cellules B par ces antigènes est en général peu spécifique. On distingue deux types d'antigènes T-indépendants, les TI-1, comme le LPS (lipopolysaccharide), qui engagent à la surface de la cellule B un corécepteur du BCR, très souvent un TLR (Toll Like Receptor), le TLR 4 en l'occurrence pour les LPS. Les TI-2, comme les polysaccharides ou les capsides virales, sont de grosses molécules ou structures présentant des motifs répétés permettant d'agrèger à la surface de la cellule B son immunoglobuline, ce qui induit un signal d'activation très fort.

L'argument indirect corrélant le développement tardif des MZB (après 2-4 semaines) et dans le même temps l'acquisition tardive des réponses aux antigènes T-indépendants (défectives avant 3-4 semaines), ainsi que le rôle essentiel de la rate pour ces réponses a fait postuler à plusieurs auteurs un rôle majeur des MZB dans celles-ci [28-31]. Grâce à des arguments plus directs, le rôle que jouent les MZB dans la réponse aux antigènes T-indépendants est aujourd'hui largement documenté. Notamment, des souris déficientes en MZB montrent un défaut spécifique d'une réponse TI-2 après immunisation avec du TNP-Ficoll, caractérisée par une diminution drastique de sécrétion d'IgM, IgG3 et IgG2a [25]. En outre, les MZB sont intrinsèquement mieux armées que les cellules folliculaires pour reconnaître et répondre aux antigènes polysaccharidiques activant fortement le complément grâce à leur forte expression des récepteurs au complément CD21/CD35. Contrairement aux réponses T-dépendantes dont la mise en place est relativement longue (une semaine), la réponse aux antigènes T-indépendants est très rapide avec la génération d'un pool maximal de plasmablastes à 3 jours dérivant en grande partie des MZB [32]. Cette réponse rapide est due à un état de « pré-activation » constitutif des MZB. Ces cellules répondent plus rapidement et plus intensément après stimulation de leurs BCR ou des TLRs [33, 34] et expriment un niveau

basal du facteur de transcription plasmablastique BLIMP-1 contrairement aux FO [32]. La capture de l'antigène par les MZB peut être directe via le BCR ou d'autres récepteurs tels les TLRs ou le CD21/CD35, cependant d'autres voies existent pour la capture et la présentation des antigènes aux MZB. Les MZMs et les macrophages métallophiliques sont stratégiquement positionnés pour capturer les antigènes, via divers récepteurs reconnaissant des motifs conservés. La présence des MZB dans la zone marginale est même nécessaire aux MZMs pour la capture des antigènes [35]. Les antigènes peuvent aussi être amenés directement du sang dans la zone marginale par des cellules dendritiques circulantes. Caractérisées par une faible expression du CD11c, elles se distinguent des cellules dendritiques de la rate CD11c^{fort}. Moins d'une heure après avoir injecté par voie intraveineuse dans la souris du Streptocoque fixé par la chaleur, cette population de cellules dendritiques CD11^{faible} a totalement migré dans la rate et se retrouve en contact étroit avec les MZB générant en quelques jours des plasmablastes au site de migration [36]. Une fois l'activation et la différenciation des MZB en plasmablastes engagées, un signal de survie via le récepteur Taci est requis. *In vitro*, ces cellules dendritiques sont capables de fournir ce signal et les auteurs suggèrent donc qu'elles en soient la source endogène. Cependant aucune preuve directe ne permet de réellement conclure à cela, d'autant plus que 24h après immunisation l'ensemble des cellules dendritiques ayant migré dans la rate est retourné dans le sang [36].

1.2.3 Collaboration aux réponses T-dépendantes

Grâce à leur forte expression des récepteurs aux compléments CD21/CD35, les MZB sont capables de fixer des complexes immuns arrivant de la circulation directement dans la zone marginale [37]. Cette spécificité des MZB est alliée à un mécanisme homéostatique de migration continue des MZB dans les follicules. Chaque heure, environ 20% des MZB

migrent de la zone marginale vers le follicule et la même fraction du follicule vers la ZM [38]. Ainsi les MZB ont la possibilité de charger leurs complexes immuns sur les FDC et d'apporter des antigènes permettant d'initier des réponses T-dépendantes [37, 39]. Ce mécanisme de migration ZM-follicule, follicule-ZM, est permis par une régulation cyclique des récepteurs S1p1-S1p3. Lorsque l'expression de S1p1 et S1p3 baisse dans les MZB localisées dans la ZM, elles migrent vers le follicule sous l'effet du gradient Cxcl13. Lorsque les MZB dans le follicule se mettent à ré-exprimer ces récepteurs, elles retournent dans la ZM [18, 39] (et Figure 3).

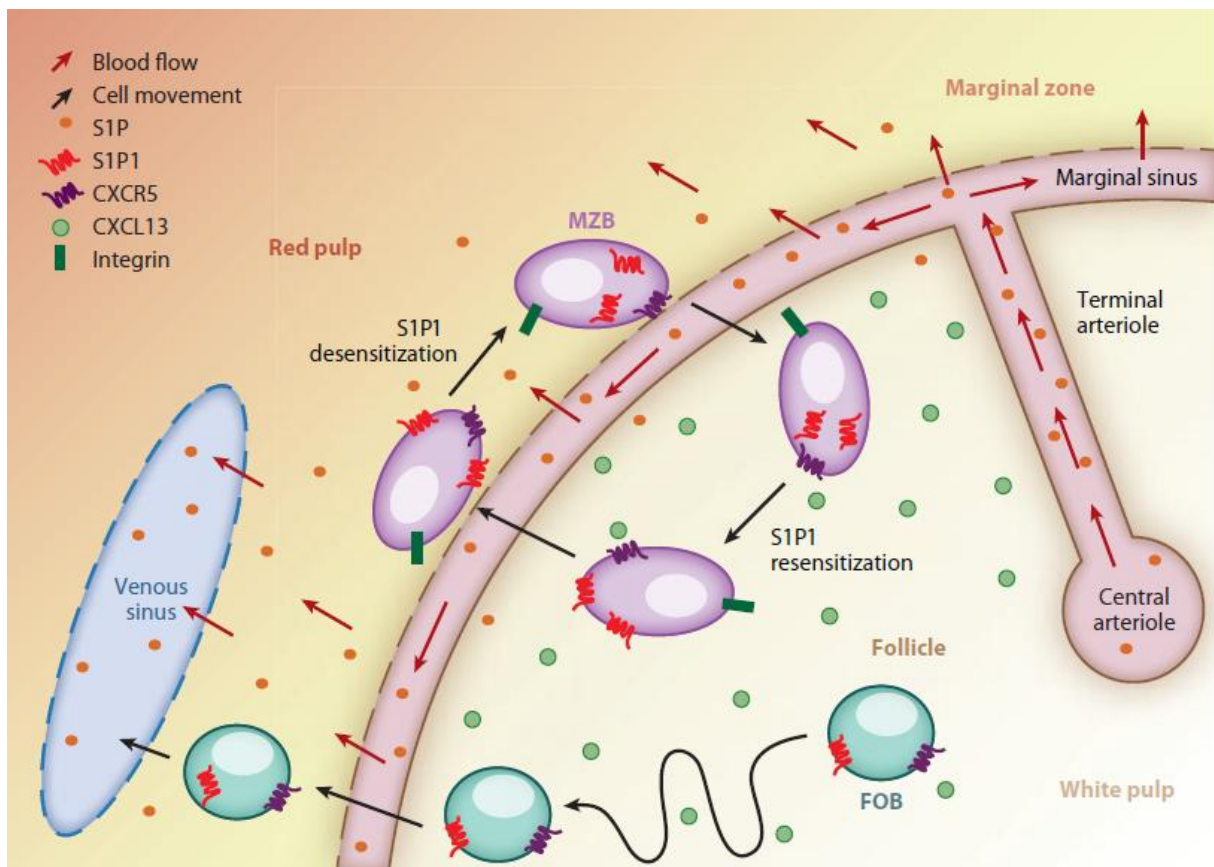


Figure 3 : Illustration du rôle de S1P1 dans la réponse T-dépendante des cellules B de la zone marginale chez la souris d'après [40].

Les MZB sont aussi plus efficaces que les cellules folliculaires pour stimuler spécifiquement des cellules T CD4 naïves. Après avoir capturé l'antigène, les MZB migrent au niveau du follicule T et présentent l'antigène grâce à leur forte expression constitutive des molécules de MHC de classe II, et des marqueurs d'activation B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). Les MZB

semblent être aussi efficaces que des cellules dendritiques pour présenter l'antigène aux T CD4 et une fois la cellule T stimulée, elle subit une expansion clonale et sécrète des cytokines de la voie Th1 [41]. Bien que tous ces résultats démontrent la capacité des MZB d'initier ou de participer à des réponses T-dépendantes, qui seront suivies de l'activation des cellules FO, elles peuvent aussi à elles seules, en présence des cellules T spécifiquement stimulées, élaborer des réponses contre des antigènes T-dépendants qui aboutissent à la formation de centres germinatifs et à la sécrétion d'anticorps IgG mutés. Bien que ce processus prenne plus de temps qu'avec des cellules folliculaires classiques, ce délai est compensé par la capacité unique des MZB de se différencier rapidement en plasmablastes et ainsi monter rapidement une réponse extra-folliculaire IgM et/ou IgG [42-44].

1.3 Mécanismes de différenciation des cellules B de la zone marginale

Contrairement à toutes les autres sous-populations B matures chez la souris, les cellules B de la zone marginale n'apparaissent pas avant 3-4 semaines après la naissance. Durant cette période, des études ont montré que certaines composantes cellulaires de la ZM (Macrophage metallophilique, DC, MZM...) n'étaient pas encore fonctionnelles et organisées de manière optimale. Bien qu'aucune preuve directe n'appuie l'hypothèse qu'une immaturité de la zone marginale serait directement responsable du délai de développement des MZB, celle-ci semble largement acceptée [19, 21]. Des expériences dans des rats NUDE ou axéniques ont montré que le développement des MZB n'était ni T- ni antigènes exogènes-dépendant [45]. Dès lors, les mécanismes précis de la différenciation de ces cellules ont fait l'objet de nombreuses études.

1.3.1 La voie NOTCH 2- DLL1

Le Knock-out (K-O) conditionnel B spécifique de *Rbp-j* aussi appelé *CSL* chez l'homme (voir figure 1), une molécule clé de la voie de signalisation Notch permettant l'interaction du Notch intracellulaire avec l'ADN, montre un défaut total de développement des MZB sans altération notable des autres sous-populations. A l'inverse, l'inactivation de *Spen* aussi appelé *Mint*, un régulateur négatif de la voie Notch, aboutit à une population MZB augmentée, démontrant ainsi le rôle crucial de cette voie dans le développement des MZB [46, 47]. Avec la même approche, le récepteur Notch2 a été précisément ciblé pour être le seul des 4 récepteurs Notch impliqué dans ce processus. Son absence spécifiquement dans les lymphocytes B aboutit au même phénotype que pour le K-O de *Rbp-j* [48]. L'haplo-insuffisance de *Notch2* induit le développement d'une population MZB très réduite [12, 48]. Il a été aussi observé que la population T2 CD21^{fort} (à l'époque, supposée comme étant la population précurseur des MZB) était elle aussi absente dans les souris déficientes pour *Notch2* ou réduite dans les souris hétérozygotes. La réduction de la population T2 CD21^{fort} est cependant moins marquée que pour les MZB, ce qui semble indiquer une moindre dépendance au signal Notch2 pour le développement de ces cellules [48]. Tout comme *Rbp-j*, les protéines Mastermind-like (*Maml*) se lient à la partie intracellulaire de Notch et co-régulent sa liaison à l'ADN au niveau de ses sites de fixation. Il existe 3 protéines *Maml* chez les mammifères, mais seul *Maml-1* a été impliquée dans la différenciation des MZB [49, 50]. Récemment il a été montré qu'en l'absence de signal Notch (K-O conditionnel B spécifique de *Rbp-j*) mais avec une spécificité donnée du BCR, une différenciation en MZB est possible [51]. Cependant l'acquisition des caractéristiques fonctionnelles des MZB reste à prouver.

Quand au ligand impliqué dans la différenciation des MZB, c'est parmi les cinq ligands Notch existant chez les mammifères (*Dll1* ; *Dll3* ; *Dll4* et *Jag1* et 2), la protéine Delta-like 1 (*Dll1*) qui fut identifiée comme essentielle [52]. L'identification du type cellulaire

fournissant le signal Dll1 fut plus tardif. Clairement, ce signal était splénique mais ne provenait pas de cellules hématopoïétiques [53]. Deux hypothèses non exclusives suggéraient que le signal Dll1 était fourni soit par l'endothélium des vaisseaux sanguins spléniques, soit par des cellules stromales accolées à ces vaisseaux, ou les deux. Finalement Dll1 a été identifié comme étant exprimé par l'endothélium de petits vaisseaux dans la zone marginale et la pulpe rouge [54]. A l'âge adulte, l'inhibition de l'interaction de la cellule B avec le ligand Dll1 induit une diminution drastique du taux de MZB [55]. Aucune donnée ne permet clairement d'expliquer ce phénomène, il peut-être dû soit au non-remplacement des cellules, soit au fait que les cellules puissent être dépendantes d'une signalisation chronique via Dll1 pour leur maintenance ou les deux. Curieusement, dans un modèle de souris dont le fond génétique induit une maladie auto-immune, le lupus, Dll1 ne semble plus nécessaire au développement et/ou à la maintenance des MZB [55]. Comme pour Notch2, l'haplo-insuffisance de Dll1 induit le développement d'une population zone marginale réduite, suggérant que l'interaction entre Notch2 et Dll1 est très faible in vivo. Deux N-acetylglucosaminyltransferases, Lunatic et Manic Fringe qui modifient de manière post-traductionnelle la partie extracellulaire de Notch2, permettent de renforcer l'interaction Notch2-Dll1. Leur absence combinée réduit drastiquement la différenciation en MZB [54]. Lorsque le ligand et le récepteur Notch interagissent, la partie extracellulaire de Notch est clivée, permettant à la partie intracellulaire d'être aussi clivée et ainsi de se retrouver libre de migrer jusqu'au noyau pour réguler ses gènes cibles. Dans le même temps la cellule signal (exprimant le ligand Notch) internalise son ligand grâce, en partie, à une E3 ubiquitine ligase Mindbomb 1. De manière très surprenante et sans que l'on sache vraiment pourquoi, l'internalisation du ligand est critique pour la différenciation des MZB (et en général pour la signalisation Notch) comme l'indique l'absence de MZB chez la souris déficiente pour Mindbomb 1 [56]. Une vue générale de la signalisation Notch est représentée sur la figure 4.

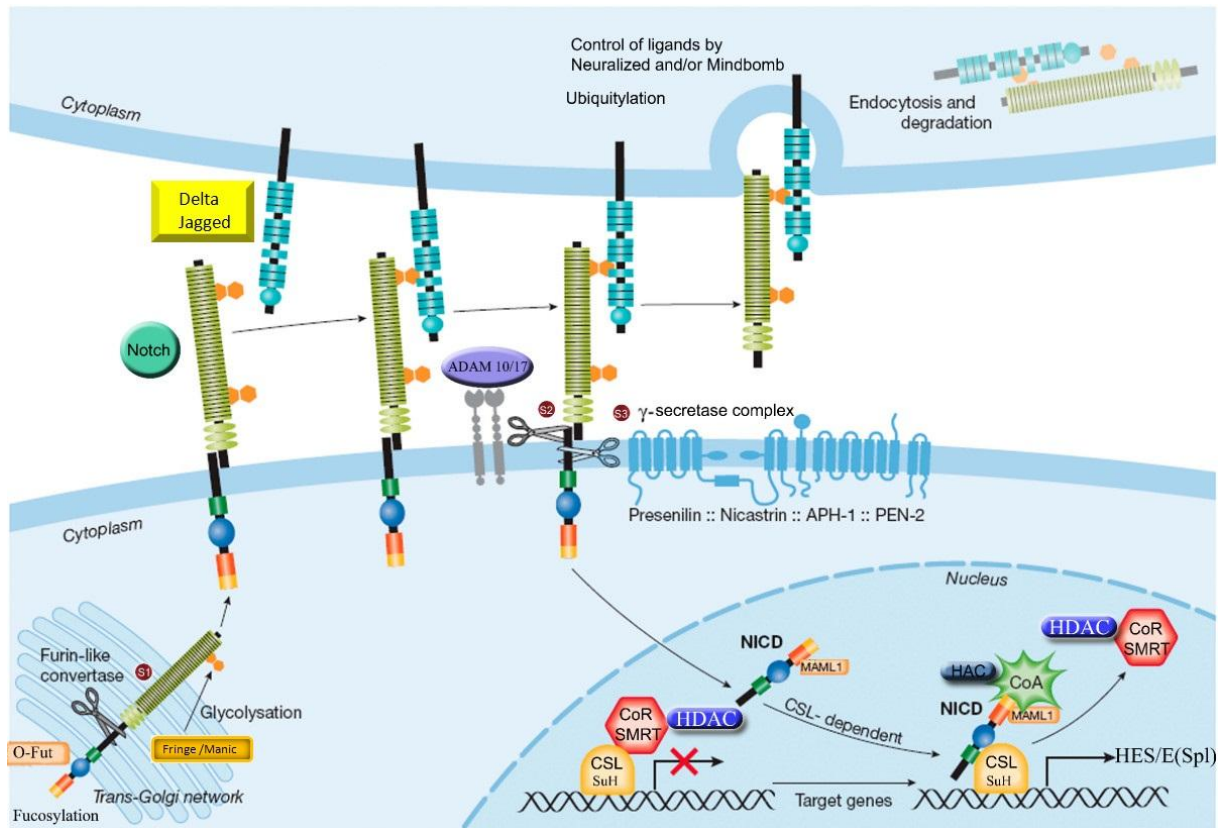


Figure 4 : Représentation schématique de la voie Notch. Adapté de Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch 'gospel'. EMBO Rep. 2005 Dec;6(12):1120-5.

1.3.2 Rôle du BCR

L'absence de la molécule Btk dans la cellule B induit une signalisation du BCR totalement déficiente. Il est connu depuis longtemps que l'absence d'un signal provenant du BCR aboutit à une absence des cellules FO I [7, 8] alors que les populations FO II et B de la zone marginale sont préservées [57-59]. Cependant il est aussi connu que certains clones B se différencient préférentiellement en MZB plutôt qu'en cellule folliculaire et que cette sélection est dépendante de Btk [60, 61]. Ces résultats suggèrent que la population zone marginale est capable de se mettre en place en absence de sélection, mais que pour qu'elle soit totalement diversifiée, une certaine sélection positive (Btk dépendante) doit opérer. Une telle sélection a été mise en évidence dans un modèle de souris exprimant un BCR monoclonal reconnaissant l'auto-antigène Thy-1 [62]. Cette étude démontre qu'en présence de Thy-1 fortement exprimé

ou totalement absent dans la souris, le clone B se différencie en cellule folliculaire, sûrement FO I en présence de l'antigène, et FO II en son absence. A l'inverse, lorsque l'expression de l'antigène est drastiquement réduite mais non nulle, le clone se différencie en MZB. Cette sélection positive agirait sur les cellules B au stade immature. Élégamment, les auteurs montrent que le signal du BCR seul ne suffit pas pour faire différencier *in vitro* leur clone en MZB mais nécessite en plus un signal Notch2 et BAFF. Comme le suggère cette étude, le signal provenant du BCR lors de cette sélection positive doit être faible (faible dose d'antigène), alors qu'un signal fort orienterait la cellule vers le pool folliculaire I. Cette hypothèse connue sous le nom de « signal strength » ou « force du signal » a été amplement exprimée et développée dans différentes revues [9, 21]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que différents mutants de la voie de régulation du BCR aboutissent à une zone marginale absente ou fortement réduite ou surdéveloppée en fonction du rôle positif ou négatif de la molécule ciblée dans la voie de signalisation du BCR. En général, le K-O d'un gène codant un régulateur positif de la voie du BCR (tel que Btk) entraîne une absence des cellules FO I, mais préserve les MZB. A l'inverse, l'absence de régulateur négatif (aboutissant à un signal du BCR augmenté) aboutit à l'absence ou la réduction des MZB. Un des meilleurs exemples illustrant ce modèle est fourni par le K-O du gène *Aiolos*. Cette molécule est un régulateur négatif de Btk et son absence aboutit à une perte totale des MZB alors que le phénotype est complètement inversé chez le double mutant *Aiolos^{-/-} Btk^{-/-}*. Les KO d'autres régulateurs négatifs du signal du BCR tels que *CD22*, ou régulateurs positifs tels que *CD45*, *Plcγ2* entraînent eux aussi des phénotypes prédits par ce modèle [9, 21].

1.3.3 Rôle de BAFF et de la voie NF-κB

La perturbation de BAFF ou de son récepteur BAFFR aboutit à une population MZB drastiquement réduite [63, 64]. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce

résultat. Vu le rôle essentiel de BAFF pour la survie des cellules immatures, la réduction du pool des cellules immatures entrainerait celle du pool MZB. La deuxième hypothèse, non exclusive, serait un rôle de BAFF dans la différenciation de la plus grande partie des MZB. La signalisation du BAFF-R entraîne l'activation de la voie NF- κ B. Il existe deux voies NF- κ B, la voie canonique et non-canonique (figure 5). La voie non canonique a été identifiée comme étant celle activée par le BAFF-R dans les cellules transitionnelles T2 et donc comme étant cruciale pour la survie des cellules B [65]. Cependant, le développement des MZB est restauré dans des souris dont l'activation de la voie non-canonique est déficiente (BAFF-R^{-/-}) mais où la voie canonique est fonctionnelle grâce à l'activation constitutive d'un de ses constituants spécifiques : IKK β . Ce résultat montre l'importance de la voie canonique par rapport à la voie non-canonique pour le développement des MZB [66]. Même si l'importance de la voie canonique NF- κ B est reconnue, l'origine de son activation reste débattue. Le phénotype des mutants *Malt1*^{-/-}, *Carma1*^{-/-} et *Bcl-10*^{-/-} reflète celui de BAFF-R^{-/-}. Ces trois protéines forment un complexe qui est activé par un signal provenant du BCR, une fois activé il active lui-même des kinases, ce qui aboutit indirectement à l'activation de IKK β et donc de la voie NF- κ B canonique. L'activation de la voie NF- κ B canonique pourrait donc provenir d'une activation du BCR plutôt que de BAFFR ou des deux. Le rôle de BAFF et de la voie NF- κ B dans le développement des MZB reste à préciser notamment concernant l'aspect survie pure versus différenciation.

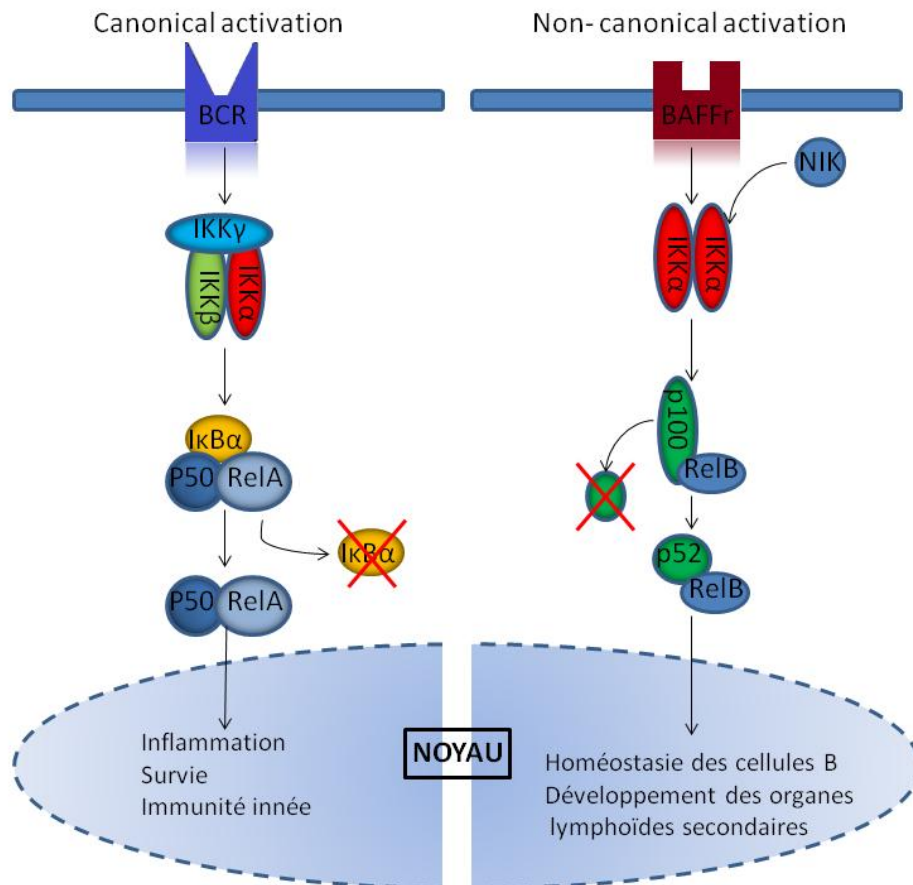


Figure 5 : Représentation schématique de la voie NF-κB dans les T2 de la souris.

1.3.4 Identification d'un précurseur des MZB

Comme suggéré par les travaux de Loder [1] et d'Allman [2], le compartiment T2 de la souris semble être hétérogène. Il a été longtemps spéculé que la population T2 CD21^{fort} puisse être la population précurseur des MZB. Ces cellules en plus du CD21 expriment aussi fortement le CD1d comme les MZB matures. De plus elles étaient elles aussi spécifiquement réduites ou perdues dans des souris *Notch2*^{+/-} ou *Notch2*^{-/-} [48]. Les meilleurs arguments confirmant cette hypothèse ont été fournis au cours d'un travail spécifiquement dédié à la question [67]. Les T2 CD21^{fort} expriment faiblement le marqueur de surface AA4.1 (cf tableau 1) et elles ne prolifèrent pas *in vivo*. Surtout, au cours d'expériences de reconstitution, les T2 CD21^{fort}

apparaissent bien après les cellules immatures (T1 et T2) et folliculaires mais juste avant les MZB matures. Les auteurs calculent aussi que le faible taux de production des T2 CD21^{fort} corrèle avec celui des MZB et serait incapable de soutenir la production du pool FO. Enfin avec des expériences de transfert dans des souris lymphopéniques, ils montrent que des T2 se différencient en MZB et FO en passant par un stade T2 CD21^{fort}. Les T2 CD21^{fort} se différencient, elles, majoritairement en MZB. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc bien que l'hypothèse était correcte et que les T2 CD21^{fort} sont bien des cellules précurseur des MZB. Nous pouvons ainsi schématiser la cinétique de différenciation des différentes populations comme suit : les T1 qui survivent à la sélection négative se différencient en T2, les T2 se différencient via une sélection positive (intensité du signal élevée) en FO I, ou sans sélection en FO II. Elles peuvent aussi se différencier en MZP (T2 CD21^{fort}) sous l'influence ou non d'une sélection positive en fonction des clones (intensité du signal faible) et de Notch2. Enfin les MZP se différencient en MZB grâce à la progression du signal Notch2 (figure 6).

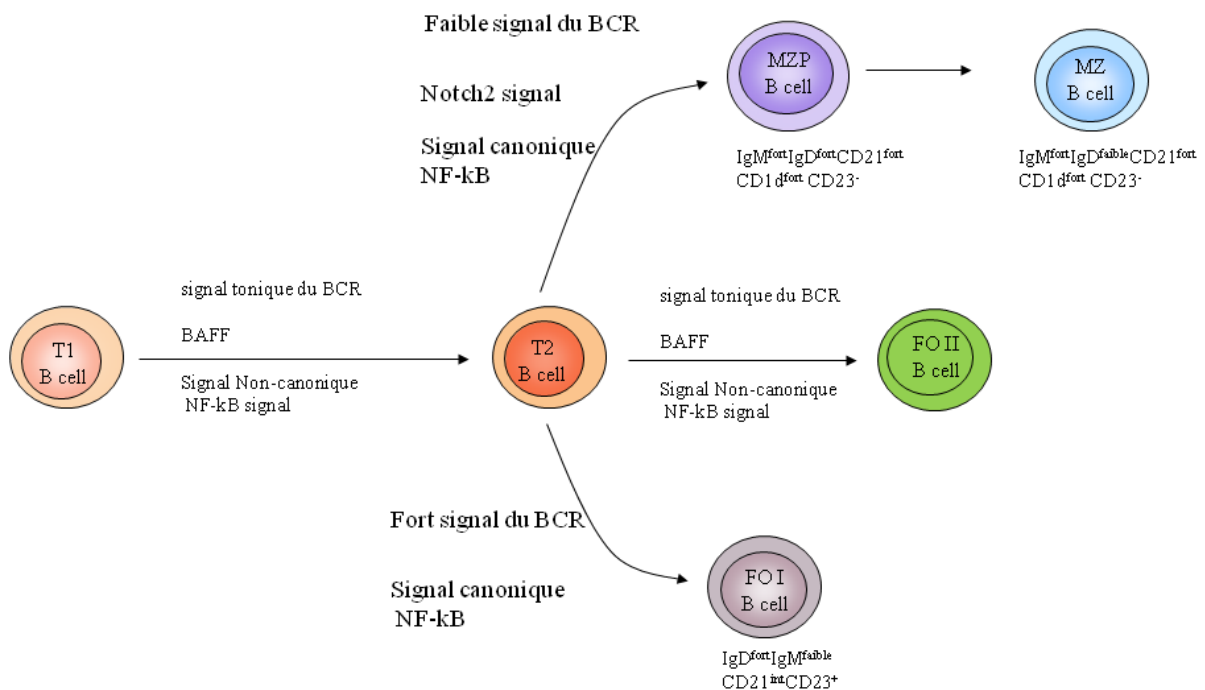


Figure 6 : Voie de différenciation des lymphocytes B périphériques chez la souris d'après [9].

2. Cellules B de la zone marginale chez l'homme

2.1 Le compartiment B périphérique

A l'inverse de la souris, les populations B humaines sont, à quelques exceptions près (cellules B du centre germinatif par exemple) toutes recirculantes. Nous décrirons dans ce chapitre ces différentes populations, identifiées dans le sang, la rate ou les deux en fonction des études qui les décrivent. La localisation des cellules, (dans le sang, la rate etc) ou exceptionnellement ailleurs, sera donc mentionnée uniquement si besoin.

2.1.1 Les cellules transitionnelles et naïves

Comme pour la souris, les cellules B immatures sont produites dans la moelle osseuse jusqu'au stade T1. Le site anatomique où les cellules T1 mûrissent en cellules T2 est relativement peu connu chez l'homme mais des données récentes suggèrent que les T1 puissent se développer directement en T2 dans la moelle osseuse [68]. Cependant, la présence de cellules T1 dans la rate et l'intestin [69] suggère que les T1 puissent quitter la moelle osseuse et migrer dans les organes lymphoïdes secondaires pour s'y développer en T2. L'identification des cellules transitionnelles chez l'homme est permise grâce au marquage CD24/CD38 [70]. Contrairement aux autres populations, elles expriment très fortement ces deux marqueurs. Elles sont en plus IgD^{fort}, IgM^{fort} et CD27 négatives. La distinction entre une population T1 et T2 n'est pas aussi évidente que chez la souris et est souvent basée sur la diminution progressive, au cours de la maturation, de l'intensité du marquage CD24/CD38. En effet, parmi les cellules CD24^{fort} CD38^{fort} les T1 sont considérées comme étant les cellules dont le marquage est le plus fort pour ces deux marqueurs. Les T2 sont les cellules ayant un marquage un peu plus faible [71]. Le marquage CD21 sur les cellules CD24^{fort} CD38^{fort}

CD27^{neg} peut lui aussi aider à distinguer deux populations de cellules transitionnelles [72]. Une population CD21^{faible} a été identifiée comme étant largement auto-réactive. A l'inverse, la population CD21⁺ est elle moins auto-réactive et apparaît après la population CD21^{faible} chez des patients ayant subi une greffe de moelle osseuse, ce qui suggère que la population CD21^{faible} correspondrait aux cellules T1 qui subiraient une sélection négative et se développeraient en cellules T2 CD21⁺.

Le pool de cellules IgD^{fort} IgM^{faible} CD27⁻ CD24^{int} CD38^{int} correspond chez l'homme aux cellules B naïves (le terme folliculaire est peu utilisé chez l'homme) représentant entre 60 et 70% des B totaux. Les cellules naïves expriment spécifiquement à leur surface le transporteur ABCB1 [73]. Cette protéine appartient à la famille des récepteurs de résistance aux drogues (MDR multi drug resistance). Le manque d'anticorps de qualité contre cette protéine rend son marquage direct en cytométrie très difficile. La présence ou l'absence d'ABCB1 est donc en général révélée grâce à des molécules fluorescentes (Rhodamine, Mitotracker...) qui diffusent à travers la membrane plasmique et qui sont expulsées activement par les cellules ABCB1⁺, celles-ci apparaissant donc moins fluorescentes que les cellules ABCB1⁻ [73]. Grâce à cette stratégie de marquage mettant en évidence l'expression d'ABCB1, une étude élégante a mis en évidence une nouvelle population de cellules transitionnelles CD24^{int}, CD38^{int}, jusqu'alors non discernable du pool de cellules naïves [74]. Dans cette étude, les auteurs montrent qu'après déplétion des cellules B par un traitement au Rituximab (anticorps anti-CD20), des cellules IgD⁺ IgM⁺ CD27⁻ CD24^{int} CD38^{int} apparaissent après les cellules transitionnelles T1 et T2 (CD24/38^{fort}). Ces cellules CD24^{int} CD38^{int} qui ont un phénotype de surface identique aux cellules naïves sont néanmoins ABCB1⁻. Elles sont masquées au cours du temps par l'apparition de vraies cellules naïves ABCB1⁺. Les auteurs concluent que ces cellules représentent un stade tardif de développement des cellules transitionnelles, appelé stade T3. Les T3 murines se sont révélées être une population de

cellules anergiques (An1) cependant la très forte proportion des T3 humaines dans le sang de cordon argue en faveur de l'existence d'une vraie population transitionnelle (Figure 7).

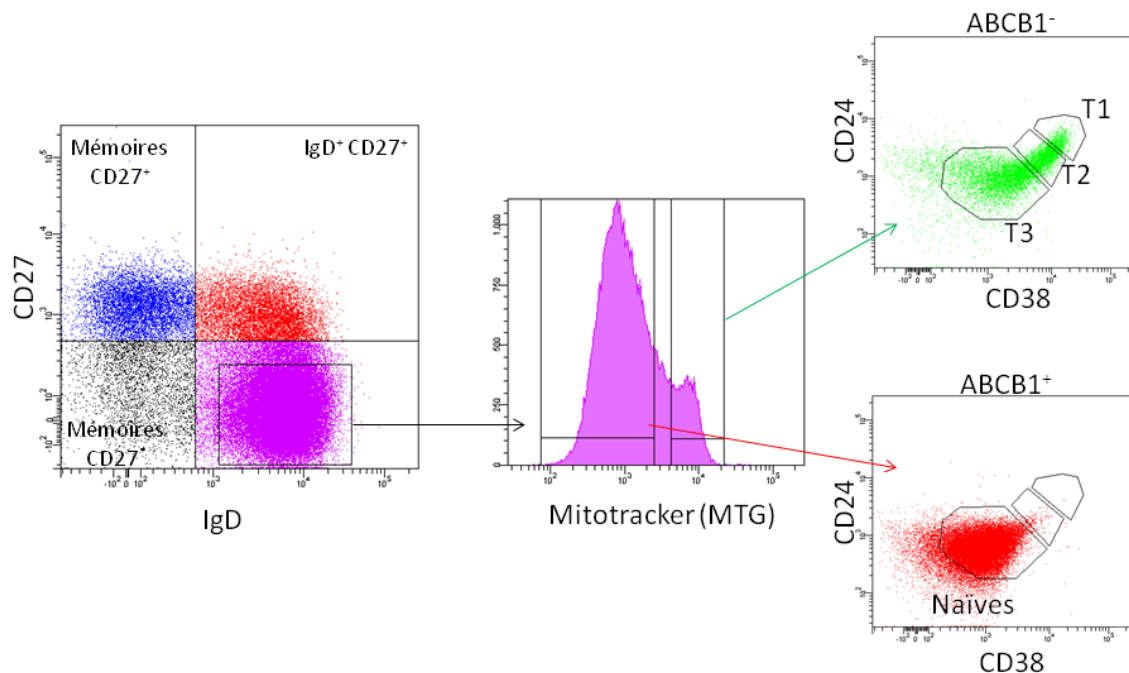


Figure 7 : Le compartiment $\text{IgD}^+\text{CD27}^-$ chez l'homme.

2.1.2 Cellules B anergiques et « exhausted »

L'anergie est un processus physiologique qui consiste à « éteindre » une cellule B en périphérie présentant des propriétés auto-réactives sans que cette cellule ne soit éliminée. Ce processus a été principalement étudié chez la souris via divers modèles transgéniques exprimant des BCR reconnaissant divers auto-antigènes. Il a été montré que la souris possède naturellement un certain pool de cellule anergiques qui a été nommé An1 [3]. Chez l'homme, l'identification de populations anergiques a principalement été effectuée dans des modèles de maladies auto-immunes ou d'infections chroniques où une expansion d'une population $\text{CD21}^{\text{faible}}$ peut être remarquée [75-79]. Ces cellules $\text{CD21}^{\text{faible}}$ sont caractérisées par une très faible réponse après stimulation du BCR, un état non activable de la cellule par le BCR et CD40, elles ne prolifèrent pas ou très peu et sont aptes à entrer rapidement en apoptose. Enfin,

elles ont été montrées comme étant largement auto-réactives [75]. Différentes populations CD21^{faible} peuvent cependant être distinguées. Chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et de DICV (Déficit Immunitaire Commun Variable), la population CD21^{faible} est polyclonale et non mutée, suggérant une origine naïve de ces cellules [75, 77]. A l'inverse, pour des patients atteints du syndrome de Sjögren associé à une lymphoprolifération, infectés par le VIH ou encore l'hépatite C (VHC), la population CD21^{faible} apparaît mutée et présente un répertoire plus restreint [76, 78, 79]. Alors que les populations CD21^{faible} décrites dans ces maladies est CD27⁻, elle semble être très hétérogène chez les patients infectés par le VHC puisqu'elle se partage en une fraction CD27⁺ qualifié de « marginale zone-like » et une fraction CD27⁻ [79-82]. Fait intéressant, l'analyse de la population CD21^{faible} CD27⁻ d'individus sains montre qu'elle est principalement composée de cellules IgD⁻ IgM⁻ ce qui n'est pas le cas des populations CD21^{faible} décrites dans les pathologies précédentes [75]. Chez la souris, les modèles ont montré que l'anergie était provoquée par un auto-antigène. Chez l'homme, le processus aboutissant à la population CD21 anergique reste obscur. S'agit-il d'une anergie induite par des auto-antigènes ou s'agit-il d'une anergie induite par une stimulation chronique des cellules, notamment dans les cas d'infection chronique tel que le VIH ou le VHC aboutissant à des cellules « épuisées », « exhausted » en anglais et incapables de répondre ? Dans tous les cas même si différents processus aboutissent à l'anergisation des cellules, il est frappant de constater à travers l'étude transcriptomique des différentes populations CD21^{faible} identifiées à travers ces différentes pathologies, que les mêmes programmes sont mis en jeu. Notamment, la mise en place d'une « signature inhibitrice » correspondant à la surexpression de gènes inhibiteurs du signal BCR (CD22, CD72 etc.), ainsi que certains facteurs de transcription (*CBL-B* et *EGR-2*) déjà impliqués dans l'anergie des cellules T, ou du composant RFNT1/Raftlin impliqué dans le maintien de l'intégrité des

radeaux lipidiques à la membrane plasmique et de la transduction du signal au niveau du BCR [75, 78, 79].

2.1.3 Le compartiment CD27⁺

Les différentes populations décrites précédemment appartiennent toutes au compartiment CD27⁻. Le compartiment CD27⁺ représente environ 30% des cellules B totales et se décompose en deux grandes populations quantitativement équivalentes. La première est constituée des cellules B mémoires IgG⁺, IgA⁺ et IgE⁺ CD24^{fort} CD38^{faible/int}. Contrairement à la souris, la population mémoire est chez l'homme quantitativement très importante (environ 15-20% des B totaux). Elle provient des cellules B naïves ayant rencontré un antigène T-dépendant et ayant subi la commutation isotypique dans un centre germinatif. Les cellules B mémoires expriment à leur surface un BCR muté, résultat du processus d'hypermutation somatique, actif dans les cellules B du centre germinatif. Ceci permet aux clones les plus affins contre l'antigène, d'être sélectionnés, et de se différencier en cellules B mémoires après extinction de l'expression du facteur de transcription *BCL6* qui contrôle le programme des cellules du centre germinatif [83]. Bien que la majorité des cellules mémoires IgG ou IgA soit CD27⁺, une certaine fraction CD27⁻ existe et représente aux alentours d'un quart à un tiers des cellules mémoires totales [73]. Le taux de mutation de ces cellules comparé aux mémoires CD27⁺ est plus faible [84]. Des cellules IgG⁺ ou IgA⁺ CD27^{fort} CD24^{neg} CD38^{fort} peuvent aussi être identifiées et correspondent aux plasmocytes générés eux aussi dans le centre germinatif sous l'influence des facteurs de transcription BLIMP-1 et IRF4 [85].

Une population IgM⁺ IgD⁻ CD27⁺ extrêmement mineure (environ 1% des B totaux) appelée « IgM-only » existe dans le sang et la rate d'individus sains. Mutée et n'étant pas retrouvée chez des patients dont la formation des réponses T-dépendante est altérée, elle a été initialement proposée comme étant une population de cellule B mémoires générées dans le

centre germinatif au cours des réponses T-dépendantes [86-88]. Mal connue et peu étudiée, l'origine et le rôle de cette population reste cependant débattu.

La deuxième population formant le compartiment CD27⁺ est constituée de cellules IgD^{faible} IgM^{fort} CD24^{fort} CD38^{faible/int}. Elle représente aussi en moyenne entre 15 et 20 % des B totaux. L'origine de ces cellules dans la rate et le sang est actuellement controversée [89, 90] et fait l'objet de l'étude de ce travail de thèse.

Tableau 2 : Phénotype de surface des principales populations B périphériques chez l'homme.

	IgD	IgM	CD27	CD24	CD38	ABCB1	CD19 (pan B)	CD20 (pan B)
T1	++	+++	-	+++	+++	-	++	++
T2	+++	+++	-	++	++	-	++	++
T3	+++	++	-	+	+	-	++	++
NAIVE	+++	++	-	+	+	+	++	++
GC ¹	-	-	-/+	-	+++	-	++	++
MEMOIRE	-	-	++	++	+	-	++	++
« MZB » ²	++	+++	++	++	+	-	++	++
PLASMOCYTE ³	-	-	+++	-	++++	-	+ / ++	-

¹ Une faible fraction des GC est IgD⁺ IgM⁺ et correspond à des cellules du centre germinatif précoces (voir annexe Figure 14).

² Les « MZB » correspondent aux cellules IgD⁺ CD27⁺ et sont aussi caractérisées par une forte expression du CD21 et du CD1c.

³ Les plasmocytes sécrètent des immunoglobulines IgD, IgM, IgG ou IgA mais ne les expriment pas à leur surface.

2.2 La population $IgD^+ IgM^+ CD27^+$ chez l'homme

2.2.1 Première identification des cellules $IgD^+ CD27^+$ chez l'homme : Des cellules mutées avec des propriétés de cellules mémoires.

En 1992, Maurer et coll. parviennent à discriminer trois populations de lymphocytes B dans les amygdales, sur la base de l'expression de l'IgD et du CD27: Les $IgD^+ CD27^-$; Les $IgD^+ CD27^+$ et les $IgD^- CD27^+$ [91]. Ils montrent que le compartiment $CD27^+$ est composé de cellules sécrétrices d'anticorps, à l'inverse du compartiment $CD27^-$. Les $IgD^+ CD27^+$ sécrètent exclusivement de l'IgM, alors que les $IgD^- CD27^+$ sécrètent en majorité de l'IgG. Quelques années plus tard, en 1997, Agematsu et coll. reproduisent ce marquage dans le sang et retrouvent exactement les mêmes populations. Cette étude confirme la capacité des cellules $CD27^+$ contrairement aux $CD27^-$ à sécréter des Immunoglobulines, IgM pour les $IgD^+ CD27^+$ et IgG et IgA pour les $IgD^- CD27^+$. De plus, ils montrent que les $CD27^+$ sont de plus grosses cellules que les $CD27^-$ et présentent un cytoplasme plus large. Enfin, l'étude montre que le taux de cellules B $CD27^+$ augmente avec l'âge, partant de 0 à 4% dans le sang de cordon pour se stabiliser aux alentours de 30 à 40% des B chez l'adulte [92]. L'ensemble de ces résultats suggérait que le compartiment $CD27^-$ correspondait aux cellules naïves et le compartiment $CD27^+$ aux cellules mémoires IgD^+ et IgD^- .

Les observations précédentes ont été appuyées par deux résultats obtenus dans deux études indépendantes, réalisées à quelques années d'intervalle. La première, en 1995, s'est attachée à déterminer le statut mutationnel des cellules B de la zone marginale dans la rate humaine. La zone marginale chez l'homme est définie comme la zone périphérique du follicule B contenant principalement des cellules $IgD^{faible} IgM^{fort} CD27^+$. Elle entoure la

corona formée de cellules naïves $IgD^{fort} IgM^{faible} CD27^{-}$ (figure 8). Contrairement à la souris, la ZM humaine n'est pas aussi bien délimitée et ne possède ni sinus marginal, ni macrophages métallophiliques [93]. Outre les cellules $IgM^{+} IgD^{+} CD27^{+}$, sa composition cellulaire reste relativement inconnue [93]. Par microdissection, des cellules B de la ZM ont été récupérées et les séquences des réarrangements VDJ de chaînes lourdes impliquant les gènes $Vh6$ et $Vh4.21$ ont été séquencées. Une grande partie des séquences des cellules B de la ZM étaient mutées. Les séquences du gène $VH6$ montraient des signes de sélection par l'antigène, mais curieusement pas les séquences du gène $Vh4.21$ [94]. En 1998, une deuxième étude s'intéressant au statut mutationnel des cellules $IgD^{+}CD27^{+}$ dans le sang aboutit aux mêmes conclusions que précédemment : ces cellules sont largement mutées [87]. Partant de l'hypothèse que chez l'homme l'acquisition des mutations somatiques est un processus dépendant du centre germinatif nécessitant la sélection par un antigène et appuyé par les observations de Maurer et Agematsu , la conclusion fut que les cellules $IgD^{+} CD27^{+}$ comme les cellules $IgD^{-} CD27^{+}$ étaient des cellules dérivant du centre germinatif, possédant des caractéristiques fonctionnelles de cellules mémoires, et devaient donc être qualifiées comme telles. Le CD27 pouvait alors être utilisé comme marqueur universel des cellules B mémoires.

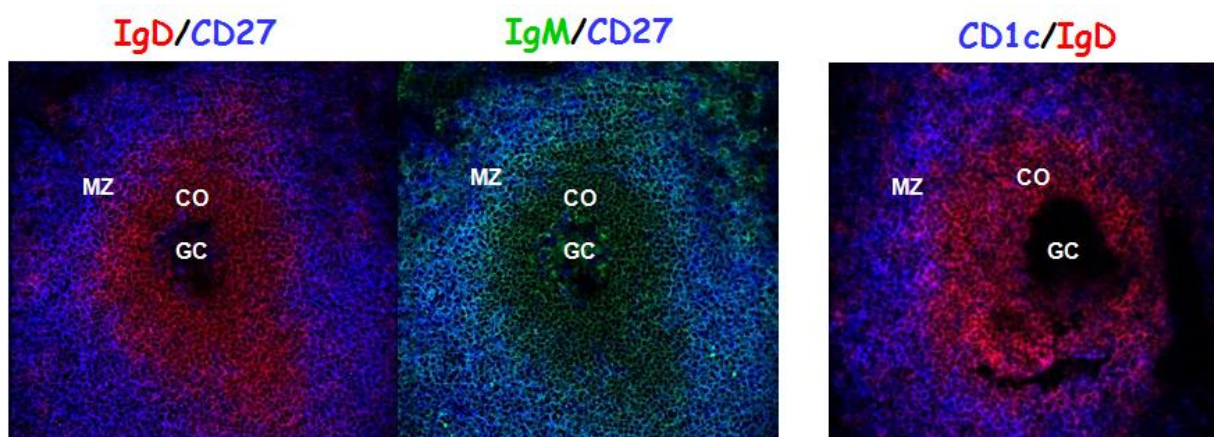


Figure 8 : Histologie de la zone marginale chez l'homme. MZ, Zone Marginale. CO Corona. GC, Centre Germinatif. (Donnée personnelle)

2.2.2 Remise en question du marqueur CD27

L'universalité du marqueur CD27 pour la détection des cellules B mémoires a été remise en question dans plusieurs études [73, 95, 96]. Il est admis aujourd'hui qu'une fraction non négligeable de cellules IgG⁺ ou IgA⁺ possédant des mutations somatiques et dérivant du centre germinatif peuvent être détectées dans le compartiment CD27⁻. Le taux de mutation des cellules B mémoires CD27⁻ est plus faible que pour leur contrepartie CD27⁺. L'analyse clonale de ces cellules montre que le CD27 ne délimite pas non plus un hypothétique développement linéaire allant des cellules mémoires CD27⁻ vers les CD27⁺ (ou l'inverse) [96]. De plus, des cellules immatures CD27⁺, au stade pro-B, ont aussi été identifiées dans la moelle osseuse, démontrant une expression du CD27 variant au cours de la différenciation B [97, 98]. Le marqueur CD27 continue cependant d'être extrêmement utilisé chez l'homme, mais il ne doit dorénavant plus être considéré comme un marqueur universel des cellules B mémoires.

2.2.3 Ontogénie et maintenance des cellules IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺

Très peu de cellules CD27⁺ sont détectables dans le sang de cordon. La proportion des cellules IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ dans le sang et la rate augmente au cours des premières années de la vie pour atteindre un niveau comparable à celui de l'adulte (10-15% des cellules B totales) vers l'âge de 2-4 ans [90, 99] (et données personnelles). Bien que l'émergence du compartiment IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ s'effectue en parallèle de celui des cellules B mémoires IgD⁻ CD27⁺ et que très vite les deux populations se retrouvent dans des proportions très proches, il est intéressant de noter que les taux des deux compartiments ne sont pas tout à fait identiques au cours des deux premières années de la vie. La population IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ est en effet présente à des taux légèrement supérieurs avant deux ans aux cellules B mémoire IgD⁻ CD27⁺

[100] . De plus, au cours de mon M2 au laboratoire, mon étude du taux de mutations somatiques et du nombre de séquences mutées dans la rate pour ces deux populations a révélé quelques différences. Nous avons observé que jusqu'à 2 ans, le taux de séquences non-mutées des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ est très important (environ 50-60%) alors que ce taux pour les cellules mémoires $IgD^- CD27^+$ est déjà extrêmement faible à 8 mois. Aux alentours de 4 ans, le taux de séquences non mutées des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ est comparable aux taux retrouvés chez l'adulte (environ 10%). Le taux de mutations entre les deux populations est lui aussi différent, en moyenne les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ sont 1,5 à 2 fois moins mutées que les mémoires $IgD^- CD27^+$ (figure 9 et revue en annexe) [101]

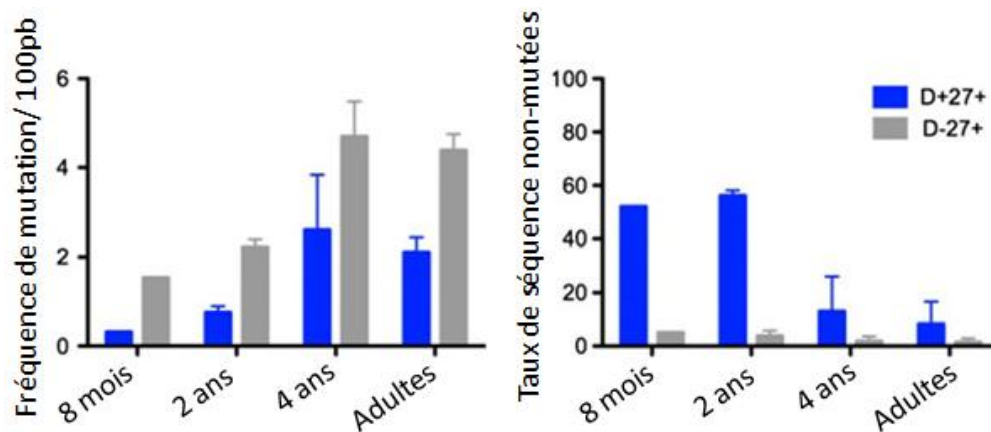


Figure 9 : Ontogénie des mutations somatiques des populations $IgD^+ CD27^+$ et $IgD^- CD27^+$ de la rate chez l'homme.

La déplétion des cellules B par des anticorps anti-CD20 (Rituximab) a émergé comme une stratégie de choix dans la lutte contre certains lymphomes et maladie auto-immunes. L'étude de la reconstitution du pool B après une telle déplétion a montré que le compartiment $CD27^+$ n'était que partiellement restauré 2 ans après le traitement et que la population $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ était, elle, fortement diminuée [102]. Les mêmes auteurs montrent, au cours d'une autre étude, qu'après un an de traitement, les cellules B mémoire IgD^- ont retrouvé un taux de mutations somatiques comparable au taux observé avant traitement. A l'inverse, le taux

observé pour les IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ jusqu'à 6 ans après traitement est toujours inférieur au taux d'avant traitement. Ce résultat tout à fait remarquable et combiné à nos données suggère que le processus d'acquisition des mutations somatiques par ces deux sous-populations de cellules B n'est pas synchrone [103].

Le laboratoire a montré que la population IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ est très fortement réduite (2-3 fois) chez des patients splénectomisés comparé aux contrôles, alors que la population mémoire, elle, est maintenue [90, 104], suggérant que la rate puisse être le principal site de maintenance pour ces cellules au cours de la vie. Les patients aspléniques possèdent jusqu'à 4 ans des proportions presque identiques de cellules IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ et mémoire s'établissant à environ 7 à 8% des B totales, comme retrouvé chez des donneurs sains. Après 4 ans, les patients aspléniques montrent des taux réduits pour ces deux populations comparés aux donneurs sains [90, 105]. En outre chez les patients aspléniques les cellules IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ sont mutées. Ces résultats suggèrent que la rate puisse ne pas être le site de différenciation et diversification des IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺, ou en tout cas que ces processus puissent avoir lieu ailleurs en son absence.

Un travail très récent effectué au laboratoire, a consisté à étudier le compartiment B sanguin de patients déficients pour un Toll Like Récepteur (TLR) spécifique (TLR3) ou des molécules impliquées soit dans la localisation intracellulaire des TLRs (UNC-93B) ou encore dans la transduction du signal (IRAK4, MYD88, TRIF et TIRAP). Ce travail a permis d'attribuer pour la première fois un rôle des TLR dans la maintenance des cellules IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ [100]. IRAK4 et MYD88 sont impliqués dans la transduction du signal de tous les TLR sauf TLR3 dont la signalisation dépend de l'adaptateur TRIF. UNC-93B permet, lui, la localisation au niveau des endosomes des TLR3, 7, 8 et 9. Enfin, TIRAP est requis pour la signalisation du TLR4 et du TLR2 qui forment des hétérodimères avec TLR1, TLR6 et possiblement avec TLR10 (voir figure 10). Les TLR 3, 4, 5 et 8 ne semblent pas exprimés par

les lymphocytes B humains, et TRL2 semble l'être à un faible niveau [100, 106]. La principale conclusion de ce travail fut d'observer une réduction du taux des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ pour les patients déficients pour IRAK4, MYD88 et TIRAP, sans que le taux des cellules mémoires ne soit affecté. A l'inverse, pour les patients UNC93-B, un tel phénotype n'était pas retrouvé. Les TLR 1, 2, 6 et 10, à l'inverse des TLR 7 et 9 semblent donc être impliqués dans la maintenance des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$. Un déficit restreint aux seules cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ est très rare car dans la plupart des cas de déficiences immunes primaires, soit l'intégralité du compartiment $CD27^+$ est diminués soit seules les cellules mémoires IgD^- le sont.

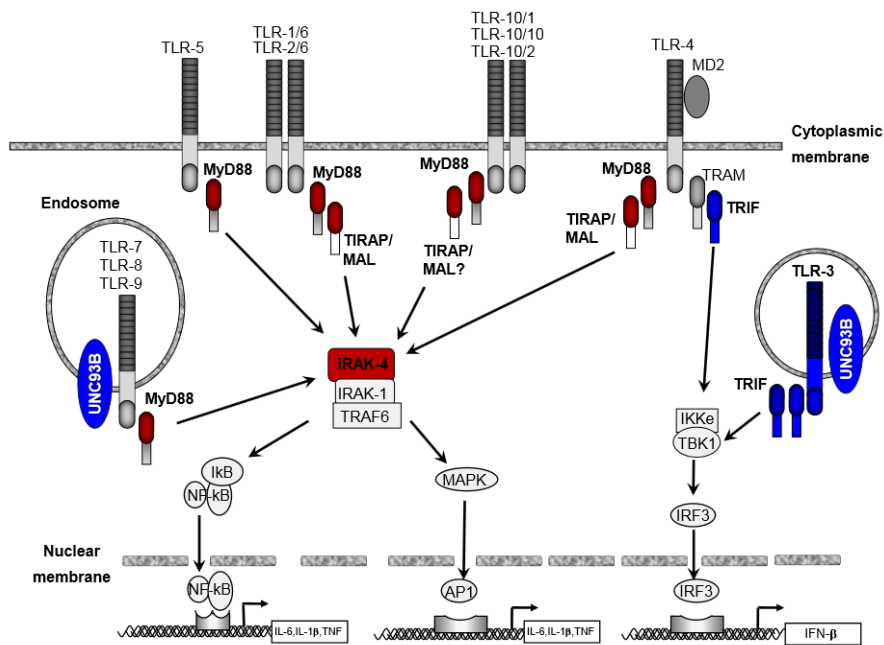


Fig 10 : Schéma des voies de signalisations associées aux TLR. Tiré de [100]

2.2.4 Biologie des cellules $IgD^+ IgM^+ CD27^+$

Comme pour les MZB murines, les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ chez l'homme ont été proposées comme étant la principale population de cellules B répondant aux antigènes T-indépendants [107]. Cette proposition repose notamment sur la corrélation établie entre l'absence ou la forte réduction de cette population chez les patients splénectomisés et leur forte susceptibilité aux

infections par des bactéries encapsulées induisant des réponses T-indépendantes. Aussi, d'autres travaux corrélient le taux sanguin des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ chez des patients infectés par le VIH au risque d'infection au pneumocoque ou au cryptocoque, deux bactéries encapsulées induisant des réponses T-indépendantes. Ainsi, pour ces patients, plus le taux des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ était faible, plus le risque de contracter de telles infections était élevé [108, 109]. Il a été montré de plus que des cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ des amygdales et du sang périphérique pouvaient sécréter *in vitro* des IgM et IgG dirigées contre les polysaccharides composant le vaccin Pneumo23, et ce après différents types de stimulation [110]. Enfin, dans un modèle de souris SCID reconstitué avec des cellules $CD27^+ IgM^+ IgD^+$ puis immunisées par le Pneumo23, des IgM et IgG humaines anti-capPS (Polysaccharide de la capsule) étaient détectables dans le sang, 14 jours après la vaccination. Fait intéressant, les souris SCID reconstituées par des cellules $CD27^+ IgM^- IgD^-$ développent également une réponse anti-capPS, mais essentiellement de type IgG [111]. Ces résultats suggèrent donc que la sous-population $CD27^+ IgM^+ IgD^+$ n'est pas la seule à pouvoir développer une réponse anticorps dirigées contre les capPS du pneumo23 *in vivo*.

Une observation plus générale de la réponse TI chez l'homme suggère que les cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ en sont bien les principaux effecteurs. Chez l'homme, la réponse humorale à des vaccins non conjugués, donc T-indépendants, dirigée contre des bactéries encapsulées mobilise paradoxalement essentiellement des anticorps mutés. La mobilisation très rapide (2-3 jours) de cellules B portant des Ig mutées dirigée contre des Ag polysaccharidiques au cours de ces réponses apparaît peu compatible avec la mutagenèse *de novo* de cellules B naïves. Ceci suggère que ces cellules soient recrutées à partir d'un pool de cellules B mutées préexistant, qui contrairement aux cellules mémoires IgD^- ne deviendrait fonctionnelles que vers l'âge de 2 ans. Ces observations ont donné lieu à la formulation du « paradoxe de la réponse anti polysaccharidique chez l'homme » [112].

L'élaboration des réponses T-indépendantes chez l'être humain avant deux ans est extrêmement peu efficace, rendant les jeunes enfants sensibles aux infections par les bactéries encapsulées, type pneumocoque. Il a été suggéré que cette incapacité à former de telles réponses était due à l'absence de cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ [113], mais cette proposition a été contredite par un travail du laboratoire montrant que cette population de cellules est présente avant deux ans dans le sang et la rate [99] (et figure 11). Bien que présente, il a aussi été suggéré que l'absence de réponse avant deux ans aux antigènes T-indépendants serait due à une immaturité de ces cellules qui n'exprimeraient pas, ou faiblement, certains récepteurs impliqués dans la reconnaissance de tels antigènes, notamment le CD21 [114]. Cela ne semble pas être le cas, comme le suggère certaines de nos données, notamment des marquages révélant la présence du CD21 en histologie et cytométrie de flux avant 2 ans sur les cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$. Savoir si l'absence d'une réponse T-indépendante chez le jeune enfant est bien due à une immaturité des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ et/ou une immaturité de la zone marginale splénique et des ses constituants cellulaires autres que B, reste une question ouverte chez l'homme.

La participation aux réponses T-dépendantes pour les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ est très peu documentée, mais il semble qu'elle soit possible [115].

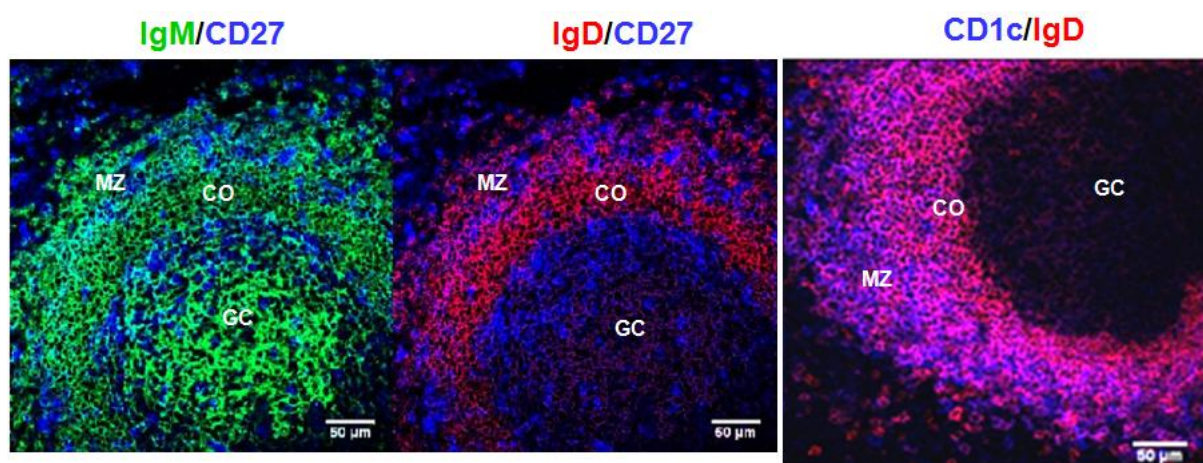


Figure 11 : Histologie de la zone marginale chez un enfant de 8 mois. MZ, Zone Marginale. CO Corona. GC, Centre Germinatif. (Donnée personnelle)

2.3 Travaux du laboratoire et formulation de l'hypothèse d'un lignage B zone marginale complexifié chez l'homme.

2.3.1 Première observation : Les patients déficients en CD40 ligand.

L'analyse au début des années 2000, du compartiment B de patients n'exprimant pas la molécule CD40L, molécule essentielle à la mise en place de la réponse T-dépendante et à la formation du centre germinatif, s'est effectuée dans le contexte scientifique suivant : les mutations somatiques des Ig chez l'homme sont caractéristiques des cellules B mémoires et ont été acquises au cours du processus d'hypermutation somatique dans le centre germinatif. Il existe donc deux grandes populations de cellules B mémoire chez l'homme : les cellules $IgD^- (IgG^+ \text{ et } IgA^+) CD27^+$ (et plus tard $CD27^-$) et les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$.

Les patients mutés pour le CD40 ligand sont atteints du syndrome hyper IgM. Ces patients n'élaborant pas de réponses T-dépendantes du fait de leur incapacité à former des centres germinatifs, ne possèdent pas de cellules IgG ou IgA. La présence dans le sang de ces patients de la population $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ avait déjà été décrite [116] et les taux d' $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ paraissaient correspondre aux taux retrouvés chez les contrôles. L'étude du laboratoire confirme bien l'absence de cellules $IgD^- CD27^+$ et la présence d'une population $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ avec des taux souvent diminués comparés aux contrôles, de l'ordre d'un à deux tiers. L'étude du taux de mutation de ces cellules montre qu'il varie de faiblement à normalement muté comparé aux contrôles [88]. Ce résultat en contradiction avec le dogme mentionné précédemment a permis de proposer l'hypothèse selon laquelle les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ humaines acquerraient leurs mutations somatiques indépendamment du centre germinatif et d'une réponse T-dépendante. Plusieurs questions restaient en suspens

notamment celle-ci : les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ du sang et de la rate sont mutées, mais puisque celles du sang semblent provenir d'une voie indépendante du centre germinatif, en est-il de même pour la population splénique ? Ce qui revient à formuler la question de cette façon : le compartiment sanguin $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ est-il la contrepartie du compartiment splénique et *vice et versa* ?

2.3.2 Les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ du sang et de la rate représentent une seule population recirculante

Pour pouvoir affirmer que les $IgD^+ CD27^+$ du sang et de la rate n'étaient qu'une seule population de cellules, le laboratoire s'est appuyé sur plusieurs critères : 1) leur phénotype de surface indistinguable l'une de l'autre, à l'exception du CD21, plus exprimé par les cellules de la rate, les cellules du sang et de la rate apparaissant $IgM^{fort} IgD^{faible} CD27^+ CD21^{fort} CD1c^{fort} CD23^{neg}$. 2) leur expression génique proche. En prenant en compte les gènes les plus discriminants entre les cellules B mémoires de la rate et les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$, les cellules du sang $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ ségrégent avec leur contrepartie splénique plutôt qu'avec les cellules naïves et mémoires provenant du sang où de la rate. Enfin 3) un argument d'ordre fonctionnel, puisqu'il a été possible au cours d'une vaccination T-indépendante chez un enfant de retrouver un même clone ayant subi une expansion dans les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ de la rate et du sang et partageant des mutations somatiques [105]. Au cours de cette étude, il avait aussi été montré que chez un enfant de moins de 2 ans les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ étaient déjà pleinement mutées alors que la réponse T-indépendante n'est pas encore fonctionnelle à cet âge. Cette observation a permis à l'époque de suggérer que l'acquisition de ces mutations sur ces cellules pouvait s'effectuer via un programme de développement indépendant de l'antigène,

plutôt qu'au cours d'une réponse immune. C'est à cette question que le laboratoire a alors choisi de s'intéresser.

2.3.3 Pré-diversification antigène indépendante des IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ via un programme de développement

Pour tenter de déterminer si la diversification du répertoire des IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ du sang et de la rate s'effectuait via un programme de développement plutôt qu'au cours d'une réponse immune, le laboratoire a étudié le répertoire des cellules mémoires IgD⁻ CD27⁺ ; des cellules naïves ; des cellules du centre germinatif et des IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ chez des enfants avant 2 ans.

Pour ce faire, la technique du H-CDR3 spectratyping a été employée. Cette technique consiste à analyser le répertoire des chaînes lourdes d'Ig par l'analyse de la distribution de taille des CDR3 (Complementary Determining Region 3). Un répertoire hautement diversifié ou polyclonal comprendra des tailles de CDR3 diverses, suivant une quasi distribution de Gauss. A l'inverse, un répertoire faiblement diversifié qu'on qualifiera d'oligoclonal montrera une distribution discontinue des tailles de CDR3, avec certaines tailles surreprésentées comparées à d'autres. Le spectratyping nous permet donc de séparer parmi une population de cellules B les différents clones en fonction de la taille de leur CDR3. Cependant, pour une taille précise de H-CDR3 on peut distinguer deux cas de figure. 1) le séquençage d'une bande obtenue (après amplification et migration) montre des réarrangements VDJ différents. Cela indique que pour une même taille de CDR3, la population de cellules B contient une multitude de clones différents, codant pour des Ig (mutées ou non) de spécificité différente. 2) le séquençage ne montre qu'un seul réarrangement VDJ, ou peu de réarrangement VDJ différent, nous indiquant une expansion clonale. Dans ce dernier cas de figure, si des

mutations somatiques sont présentes, il est possible de mettre en évidence une diversité intraclonale.

Le laboratoire a ainsi montré qu'avant deux ans, un âge où la réponse T-dépendante est fonctionnelle, contrairement à la réponse T-indépendante, le répertoire des cellules mémoires $IgD^- CD27^+$ du sang et de la rate est oligoclonal et montre des expansions clonales, signe d'une diversification et d'une sélection par l'antigène(s) au cours d'une réponse. A l'inverse les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ du sang et de la rate montrent un répertoire beaucoup plus large, comparable aux cellules naïves, sans trace d'expansion clonale. L'étude du profil des cellules du centre germinatif (IgM et IgG) revêt un intérêt particulier puisqu'il est déjà largement plus restreint que le profil des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$, mettant à mal l'hypothèse selon laquelle ces cellules pourraient provenir d'une sortie précoce du centre germinatif [99].

En conclusion les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ du sang et de la rate semblent acquérir leurs mutations somatiques et ainsi établir un répertoire pré-diversifié au cours d'un programme de développement antigène indépendant, à l'inverse des cellules mémoires qui, elles, mutent au cours d'une réponse vis-à-vis d'un antigène.

2.3.4 Pré-diversification du répertoire par un mécanisme d'hypermutation somatique : exemple du mouton

Une population de cellules B qui pré-diversifie son répertoire en acquérant des mutations somatiques au cours d'un programme de développement ne nécessitant pas d'antigène semble ne pas exister chez la souris, sauf dans des modèles non-physiologiques possédant des répertoires très restreints [117, 118]. De fait, le modèle de choix en immunologie qu'est la souris révèle souvent des différences fondamentales avec l'homme [119]. On peut cependant trouver au moins un modèle pour lequel un tel mécanisme existe : le mouton.

Chez la plupart des espèces, les cellules B prolifèrent dans l'intestin et forment des follicules qui s'organisent pour former une structure appelée « plaque de Peyer ». Pour le mouton les réarrangements des gènes d'immunoglobuline ne se produisent pas dans cette structure, mais les cellules B, en proliférant dans les plaque de Peyer iléales, diversifient leur BCR en acquérant des mutations somatiques [120]. Cette diversification du répertoire commence durant la vie fœtale de l'animal et se poursuit après la naissance. En outre, ce mécanisme ne requiert en rien la présence d'antigènes exogènes puisqu'il n'y a aucune différence dans le pattern de mutation pour des tissus stériles recueillis sur un fœtus et des tissus provenant d'adulte axéniques, comparé aux contrôles [121].

2.3.5 Proposition du laboratoire.

Sur la base des faits suivants : 1) La présence d'une zone marginale chez l'homme composé de cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$.

2) L'implication probable des cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ chez l'homme dans la réponses aux antigènes T-indépendants.

3) Le développement et la diversification des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ du sang et de la rate indépendante de la mise en place de réponse T-dépendante et T-indépendante et de la présence d'antigène.

Le laboratoire à proposé par analogie avec le modèle murin que les cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ du sang et de la rate chez l'homme ne sont pas des cellules mémoires comme initialement proposé, mais représentent un lignage de cellules B indépendant, représentant la contrepartie murine d'un lignage MZB complexifié, car muté et recirculant.

2.4 Controverses et résultats contradictoires concernant l'hypothèse d'une population MZB chez l'homme

Plusieurs arguments et résultats plus ou moins convaincants ont été avancés, remettant en cause l'hypothèse formulée par le laboratoire. Le taux de mutation environ 1.5 à 2 fois plus faible comparé aux cellules B mémoires et les isotypes exprimés par les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ suggère que ces cellules puissent résulter d'une sortie précoce du centre germinatif. Or il a été montré que chez des patients CD40 ou CD40L déficients, des structures avortées de centre germinatif existent [122]. Bien que cela n'ait pas été montré, de telles structures pourraient soutenir les premières étapes d'une réaction d'hypermutation somatique qui séquentiellement arrive avant la commutation isotypique de classe.

Un autre moyen de montrer que les $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ viennent du centre germinatif est de montrer qu'elles y sont passées et/ou de les relier aux cellules mémoires $IgG^+ CD27^+$ qui en viennent. Une étude a ainsi montré que 20% des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ du sang portent des mutations somatiques sur la séquence du gène *BCL6*. Or *BCL6* est un gène spécifiquement exprimé par les cellules du centre germinatif en même temps que l'*AID*, l'enzyme qui introduit les mutations somatiques et qui ne mute pas que les Ig, mais introduit aussi des mutations sur l'ADN là où il est le plus relâché et accessible, donc sur les gènes transcrits. L'acquisition des mutations sur le gène *BCL-6* est donc vue ici comme une preuve d'un passage par la cellule dans le centre germinatif. De plus, les auteurs montrent qu'il existe des relations clonales entre des cellules mémoires $IgG^+ CD27^+$ et des cellules $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ [123]. Ce dernier point est un argument très fort mais a depuis été remis en cause et sera discuté dans ce mémoire (voir discussion).

L'identification d'une population B1 équivalente à la souris chez l'homme a été et est toujours un sujet extrêmement controversé. Sur la base de critères fonctionnels, une équipe a

annoncé avoir identifié en 2011 l'équivalent humain des B1 [124]. Dans cette étude les auteurs affirment que comme pour les B1 murines, la population CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70⁻ du sang de cordon et du sang adulte sécrète spontanément de l'IgM, stimule efficacement des lymphocytes T et possède un fort signal tonique provenant du BCR. Nous aurions pu imaginer qu'une population traquée depuis plus de 50 ans serait une population mineure et représenterait quelques pourcents des lymphocytes B totaux. Or, les CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70⁺ représentent d'après les auteurs, la moitié des cellules B CD27⁺ jusqu'à environ 60 ans, avant de diminuer progressivement au alentour de 20-30%. De plus, elles seraient à 90% IgD⁺. Cette population correspondrait donc en grande partie aux cellules IgD⁺ CD27⁺ (MZB). Nous avons nous même ainsi que d'autres équipes remis en cause les taux et la nature de la population B1 identifiée [125, 126] (voir annexe). Nous avons montré que la population CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ ne représente que quelques pourcents des B totaux et entre 10 et 20% des B CD27⁺. De plus, la moitié de ces cellules sont IgD négatives. Enfin l'intensité du marquage CD38 suggère que ces cellules puissent être sur une voie de différenciation plasmablastique. Cette hypothèse a depuis été largement confirmée par une autre équipe remettant en cause l'existence d'une population B1 chez l'homme [127].

Résumé

Chez la souris, l'existence d'un lignage MZB dont les signaux de différenciation, impliquant notamment Notch2 et Dll1, est admise et reconnue. Chez l'homme, la population IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ semble être la principale composante de la réponse T-indépendante. Bien que ces cellules soient mutées, et pré-activées, elles ne semblent pas dériver des mêmes voies de développement que les cellules mémoires. Cependant un certain nombre de données contredisent cette hypothèse. C'est dans ce contexte scientifique, où une controverse intense et stimulante régnait, que j'ai démarré mon projet de thèse.

Hypothèse de travail

S'il existe chez l'homme une population de lymphocytes B ayant conservé les caractéristiques fonctionnelles de la population MZB du modèle murin et qui représente un lignage spécifique, alors une voie de différenciation spécifique lui est associée. Par analogie avec la souris, nous émettons l'hypothèse que les signaux de différenciation des MZB murines aient pu être au moins en partie conservés pour la différenciation des MZB chez l'homme. Une telle hypothèse implique donc qu'il est théoriquement possible d'identifier chez l'homme une population de cellules précurseurs des MZB de par leur capacité à se différencier via la voie NOTCH en cellules présentant les caractéristiques des MZB.

TRAVAUX ORIGINAUX

ARTICLE

A splenic marginal zone B-cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties in humans

Marc Descatoire, Sandra Weller, Sabine Irtan, Jean Feuillard, Sébastien Storck, Anne Guiochon-Mantel, Jérôme Bouligand, Alain Morali, Emmanuel Jacquemin, Maria Iascone, Christine Bole-Feysot, Nicolas Cagnard, Claude-Agnès Reynaud, and Jean-Claude Weill.

(En revue à The Journal of Experimental Medicine)

Présentation oral au Congrès International d'Immunologie de Milan 2013

A splenic marginal zone B-cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties in humans

Marc Descatoire¹, Sandra Weller¹, Sabine Irtan², Jean Feuillard³, Sébastien Storck¹, Anne Guiochon-Mantel⁴, Jérôme Bouligand⁴, Alain Morali⁵, Emmanuel Jacquemin^{6,7}, Maria Iascone⁸, Christine Bole-Feysot⁹, Nicolas Cagnard¹⁰, Claude-Agnès Reynaud^{1,*} and Jean-Claude Weill^{1,*}

¹INSERM U783, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine-Site Broussais, Paris, 75014, France

²Service de Chirurgie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Université Paris Descartes, Paris, 75015 France

³Unité Mixte de Recherche CNRS 7276, Faculté de Médecine, Limoges, 87025, France; and Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Laboratoire d'Hématologie, Limoges 87042, France

⁴INSERM Unité Mixte de Recherche S693, Université Paris Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre 94276, France, and AP-HP, Hôpital de Bicêtre, Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique, et Hormonologie, Le Kremlin-Bicêtre 94275, France

⁵Hépatologie et gastro-entérologie pédiatriques, Hôpital d'enfants, CHU de Nancy-Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy, 54511, France

⁶Hépatologie Pédiatrique and Centre de Référence National de l'Atrésie des Voies Biliaires, Hôpital Bicêtre, AP-HP and Université Paris-Sud 11, Le Kremlin-Bicêtre, 94275 France

⁷INSERM U757, Université Paris-Sud 11, Orsay, 91405, France

⁸Molecular Genetics Laboratory, AO Papa Giovanni XXIII, Bergamo, 24127, Italy

⁹Plateforme de génomique de la fondation Imagine, Hôpital Necker, Paris, 75015, France

¹⁰Plateforme de bioinformatique de l'université Paris Descartes, Paris, 75015, France

*Correspondence : claud-agnes.reynaud@inserm.fr; jean-claude.weill@inserm.fr

Running Title: An MZP subset in humans

SUMMARY

Mouse splenic marginal zone precursors (MZP) differentiate into marginal zone B cells (MZB) under a signaling pathway involving Notch2 and its ligand, Dll1. We report here the identification of an MZP subset in the spleen of young children. These MZP differentiate into MZ-like B cells *in vitro* in presence of OP9 cells expressing human DLL1, as demonstrated by the up-regulation of classical MZ B-cell markers. A set of diagnostic genes discriminating IgM+IgD+CD27+ blood and splenic marginal zone B cells from switched B cells was identified (upregulation of SOX7; downregulation of TOX, COCH and HOPX), and their expression during the induction assay mirrored the one of MZB cells. Moreover, Alagille patients with a NOTCH2 haplo-insufficiency display a marked reduction of IgM+IgD+CD27+ B cells in blood, while their switched memory B cells are not affected. Altogether these results argue in favor of the existence of a rodent-like MZ B-cell lineage in humans.

INTRODUCTION

The rodent marginal zone B cell population represents a distinct B cell lineage that resides in the marginal zone (MZ) of the spleen. These MZ B cells bear an unmutated B cell receptor (BCR) and are in a pre-activated state allowing them to respond rapidly to challenge by blood borne T-independent antigens (Martin and Kearney, 2002). In contrast, the existence of an equivalent MZ B cell subset in humans remains controversial. Why is this so? B cells with a similar surface Ig phenotype (IgM^{high}IgD^{low}) are found in the human splenic marginal zone, but they display the CD27⁺ marker and mutated immunoglobulin genes, and have been accordingly considered as post-germinal center memory B cell (Agematsu et al., 1997; Dunn-Walters et al., 1995). However patients who have crippling mutations in the CD40 or CD40L gene, mutations that prevent formation of germinal centers (GC) and of switched memory B cells, still possess a circulating IgD⁺IgM⁺CD27⁺ mutated subset (Weller et al., 2001). It was thus proposed that, in humans, IgD⁺IgM⁺CD27⁺ B cells recirculate and diversify their BCR by hypermutation outside germinal centers (Weller et al., 2004; Weller et al., 2001). Moreover IgD⁺IgM⁺CD27⁺ B cells, either in blood or spleen, do not show, as opposed to switched memory B cells, any sign of antigen-driven selection and expansion in young children below 2 years of age, in spite of the several vaccinations episodes they experience (Weller et al., 2008). Since mutations on their BCR are observed before 2 years, i.e. before immunological competence against T-independent antigens is acquired, it was proposed that human IgD⁺IgM⁺CD27⁺ B cells diversify their BCR along a developmental program outside any immune response, whether T-dependent or T-independent. Based on these observations and on their marginal zone-like B cell phenotype (CD21^{high}, CD23^{low}, CD1^{high}), it was thus put forward that splenic and blood IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells, which represent 15-20% of total B cells, are the human equivalent of the mouse marginal zone lineage (Weill et al., 2009). Their predominant role in the response to T-independent antigens,

such as polysaccharides from encapsulated bacteria, was also suggested (Kruetzmann et al., 2003).

Contradictory data have however been reported (Tangye and Good, 2007). First, switched and IgD+IgM+CD27+ B cells have been shown to be transcriptionally and phenotypically very close (Good et al., 2009; Good and Tangye, 2007). Second, clonal relationships between these two subsets were found when analyzed in blood, VDJ junctions being frequently shared between cells belonging to both populations (Seifert and Kuppers, 2009). These results thus suggested that the majority, if not all, IgD+IgM+CD27+ B cells, or at least those present in blood, are in fact memory B cells responding to T-dependent antigens that left the GC reaction before switching to other isotypes.

Marginal zone precursors (MZP) were characterized in mice among splenic transitional B cells (Srivastava et al., 2005). Convincing *in vivo* experiments defined these immediate precursors at a differentiation stage after transitional T2 cells, which, contrarily to MZP, were still able to give rise to both follicular and marginal zone B cells. Moreover it was proposed that mouse transitional B cells could show some capacity to differentiate into MZ B cells *in vitro*, under a Notch2 stimulation mediated by the Delta-like 1 (Dll1) ligand (Roundy et al., 2010). This experiment was in agreement with *in vivo* gene inactivation experiments showing that the Notch2/Dll1 pathway controlled the differentiation of splenic transitional B cells into MZ B cells (Hozumi et al., 2004; Saito et al., 2003). A haplo-insufficiency of either Notch2 or Dll1 effectively induced a marked reduction of the MZ B cell subset, and a complete B-cell restricted Notch2 deficiency abrogated its formation.

The transmembrane CD45 protein is expressed on all human hematopoietic cells, acting as a negative regulator of antigen receptor signaling through its tyrosine phosphatase activity. In T cells, several isoforms of CD45 are generated by alternate splicing, resulting in the expression of various combinations of exons (RA, RB, RC) and different N- and O-linked

glycosylation patterns (Earl and Baum, 2008; Oberdoerffer et al., 2008). Such variants segregate with commitment to different effector fates, as well as with different antigen receptor signaling thresholds, although the precise molecular mechanism underlying this regulation is still not clear. While the differential expression of various forms of CD45 has not been well studied in human B cells, the group of M. Bemark recently described a new epitope on CD45 characterized by the O-glycosylation of the CD45RB isoform and identified by the monoclonal antibody MEM-55 (Koethe et al., 2011). This epitope is not expressed on classical transitional and naive B cells but is highly expressed on switched CD27⁺ and CD27⁻ memory B cells, plasmablasts and IgD⁺IgM⁺CD27⁺ B cells. Using this monoclonal antibody, these authors identified in blood a new MEM55⁺ B cell subset, which, as opposed to naive B cells, was IgM^{high} and ABCB1 transporter-negative, but did not bear the classical transitional markers CD10 and CD38. This MEM55⁺ immature population was enlarged in blood in young children and in bone marrow transplanted patients. Based on these data, the authors proposed that this new subset could be the precursor of naive B cells or immediate MZ B cell precursors (Bemark et al., 2012; Koethe et al., 2011).

We define in this report an MZP population in spleen from young children that represents a new entity among this immature MEM55⁺ population since it expresses, like naive B cells and as opposed to all other human B cell subsets, the ABCB1 transporter. This new B cell fraction possesses the cardinal property of MZP, being able to differentiate *in vitro* into MZ B cells under the NOTCH2/DLL1 signaling pathway. Moreover, patients suffering from an Alagille syndrome and with a heterozygous mutation in NOTCH2, are shown to display a reduction of their circulating IgD⁺IgM⁺CD27⁺ B cells while their switched memory B cells are not affected. Altogether these results argue in favor of the existence in humans of a bona fide MZ B cell population, which differentiates, like its mouse counterpart, from a splenic marginal zone precursor through a NOTCH2 signaling pathway.

RESULTS

MTG+MEM55+ and MTG-MEM55+ cells present in the spleen of young children are putative marginal zone precursors

B cells residing in the splenic MZ in humans are characterized by the surface phenotype CD27+IgD+IgM++ (Weller et al., 2004). In mice, among different integrated signals, Notch2 signaling plays a key role in the differentiation of splenic transitional T2 cells into MZP that further differentiate into MZB cells (Pillai and Cariappa, 2009). To identify an MZP equivalent in humans, and by analogy with the mouse, we looked for a splenic B cell subset, present among CD27-negative cells, that would acquire a MZ-like phenotype (defined by the de novo expression of CD27) after a NOTCH2-dependent signal. Based on our previous observations that the frequency of immature B cells decline with age in the human spleen (Weill et al., 2009), we focused on spleen samples from young children between 4-8 years of age, for which MZP may likely be present in a higher proportion. Transitional B cells in humans have been initially identified based on the high expression of CD10, CD24 and CD38 relative to mature B cell subsets (Cuss et al., 2006; Sims et al., 2005). Refined subsets of transitional B cells have been further delineated from naive cells using markers such as the ABCB1 transporter (which expression allows the extrusion of the MitoTracker Green (MTG) fluorescent dye) or the recently described CD45RB isoform detected by the MEM55 mAb (Koethe et al., 2011; Palanichamy et al., 2009). We thus analyzed CD27-depleted splenic B cells that have been pulsed/chased with MTG and then labeled with anti-IgG, -IgA, -IgE, -CD20, -CD24, -CD38, -CD27 Abs together with the MEM55 mAb (Figure 1A). Based on the staining with MTG and MEM55, 4 distinct IgG-IgA-IgE-CD27-CD20+ B cell populations were identified (Figure 1B): transitional cells (MTG+MEM55-), further separated from residual germinal center B cells by the CD38/CD24 marker, naive B cells (MTG-MEM55-),

as well as the new MEM55⁺ B cell subset recently described in blood by Bemark and colleagues (Koethe et al., 2011). Surprisingly, and as opposed to their initial description, this latter subset included a clear population expressing the ABCB1 transporter (MTG⁻), previously known to be uniquely expressed by naive B cells (Wirhth and Lanzavecchia, 2005). The four subsets were sorted and plated on OP9 stromal cells expressing or not human Delta like-1 (hDLL1), a NOTCH2 ligand. In some cases, anti-NOTCH1 or NOTCH2 blocking antibodies were added to the sorted fractions cultured on OP9-hDLL1. After a 3-day culture, the up-regulation of CD27 was used as the main criteria of the differentiation of the initial cell fraction into MZ-like B cells. A fold induction, corresponding to the ratios of IgD⁺ cells becoming CD27-positive in the OP9-hDLL1 (or OP9-hDLL1+anti-Notch2) vs. OP9 condition was plotted for each experiment. As shown (Figure 1C and Table S1), most naive B cells either cultivated with OP9-hDLL1 or OP9 cells alone, retained their original CD27-phenotype. The proportion of transitional B cells that acquired expression of CD27 in the OP9-hDLL1 culture (a mean of 9.5%) remained low in comparison to the one observed for MTG-MEM55⁺ and MTG⁺MEM55⁺ cells. Indeed, the proportion of cells that strongly up-regulated CD27 in the OP9-hDLL1 culture reached a mean of $22 \pm 8\%$ and $43 \pm 7\%$ for MTG-MEM55⁺ and MTG⁺MEM55⁺ cells respectively (Figure 1C and Table S1). However, the fold induction was higher for MTG-MEM55⁺ cells than for MTG⁺MEM55⁺ cells, for which the proportion of induced CD27⁺ cells without a DLL1 signal was already quite high ($30 \pm 9.5\%$). For both subsets, the induction was inhibited by an anti-Notch2 blocking antibody added into the OP9-hDLL1 cell culture, while an anti-Notch1 antibody tested on MTG-MEM55⁺ cells had no effect (Table S1). However when comparing the fold induction values, the inhibition was statistically significant only for MTG-MEM55⁺ cells (Figure 1D). In conclusion, based on their ability to acquire an MZ-like surface phenotype under a NOTCH2/DLL1 signal, both MTG-MEM55⁺ and MTG⁺MEM55⁺ cells can be considered as

putative MZP precursors. However, the higher proportion of MTG+MEM55+ cells having up-regulated CD27 in the absence of hDLL1, suggests that this subset may have already received a signal in vivo that would allow them to be at least partly independent from the NOTCH2 signal provided in vitro. This suggests also that MTG+MEM55+ might be at a more advanced differentiation stage toward MZB cells.

MTG-MEM55+ cells are MZP based on transcriptional, phenotypic and Ig somatic hypermutation analysis

To further characterize MTG-MEM55+ and MTG+MEM55+ cells, the gene expression profiles of these two populations together with those of naive and MZB cells were determined by microarray analysis. The transcription profile of MZB and naive B cells differed for 1855 probes, considering a 2-fold change and a p-value below 0.05. According to the same criteria, the MTG-MEM55+ subset differed by 249 and 990 probes from naive and MZB cells, respectively, while the corresponding values for the MTG+MEM55+ subset were 750 probes compared to naive and 462 compared to MZB. To further determine the relationships between these 4 subsets, a principal component analysis was performed using the 1855 probes that were differentially expressed between naive and MZB cells (Figure 2A). Unlike naive and MZB cells that appeared as rather homogeneous groups, MTG-MEM55+ and MTG+MEM55+ cells in particular were less tightly clustered. Nevertheless both subsets displayed an intermediate gene profile between MZB and naive B cells, while MTG-MEM55+ cells were closer to naive cells, and were thus the most distant subset from MZB cells in terms of transcriptional program. This suggests that MTG-MEM55+ cells represent an earlier differentiation stage than MTG+MEM55+ cells.

We next analyzed the frequency of somatic mutations on Ig genes of splenic MZB, MTG+MEM55+ and MTG-MEM55+ cells isolated from 5 different children (aged 4 to 6 years) (Figure 2B and Figure S1). As expected, MZB cells from all the donors were already diversified with a mean mutation frequency of 1.74 % and with 77% of the sequences being mutated. Interestingly, in both MTG+MEM55+ and MTG-MEM55+ cells, we could find mutated sequences, but both the range and the frequency of mutations were much lower (0.65% and 0.18%, respectively). While most of the sequences (88%) were unmutated in MTG-MEM55+ cells (except for one donor who showed also a much higher load of Ig mutations in its MZB compartment (Figure S1)), the proportion of germline sequences was only of 55% in the MTG+MEM55+ cell fraction. At the phenotypic level, MTG+MEM55+ B cells were similar to their MTG- counterpart, apart from a few differences that make them closer to MZB (e.g. CD24, CD200) (Figure 2D and S2). At the transcriptional level, the most striking difference, which discriminates them from all other splenic subsets, is the expression of SOX5, previously reported in FCRL4+CD27- tissue memory B cells (not shown) (Ehrhardt et al., 2008). Altogether, given its greater dependency to a NOTCH2 signal to differentiate into MZ-like B cells, its gene profile and its almost non-mutated Ig status, the MTG-MEM55+ cell fraction appears as the earliest marginal zone precursor characterized. As a consequence, MTG-MEM55+ will be referred to as MZP thereafter.

To gain further insights into a “NOTCH2 signature” that may be already present in MZP cells, we took advantage of a genome-wide expression analysis performed on an EBV-transformed human B lymphoblastoid cell line induced to express an activated NOTCH2 receptor (NOTCH2-IC) (Kohlhof et al., 2009). Through data mining, a list of 1678 and 1453 genes that were respectively up- or down-regulated after 3 days of induction of the NOTCH2-IC was established. We then established a list of 369 genes that were differentially expressed between naive and MZP cells, with a fold change ≤ 1.5 ($p < 0.05$). Both lists were then

confronted to generate the Venn diagrams shown in Figure 2C. Among the genes that distinguish MZP from naive cells, we found already a clear Notch2 signature, since 44 out of the 215 up-regulated genes and 53 out of the 154 down-regulated genes were found in the listed genes that were respectively up- or down-regulated after activation of the Notch2 pathway. This signature reflects nevertheless a preliminary stage of induction, since it lacks major NOTCH2 downstream effectors activated in the MZB subset, like DTX1 or HES4. It thus appears that MZP might have already received *in vivo* some activating signals of the NOTCH2 pathway upon their splenic localization.

To better characterize the phenotype of MZP cells, several cell surface markers discriminating MZB from naive B cells were analyzed by flow cytometry but, except for CD24, CD1c and IgM, none of the tested markers were differentially expressed between naive and MZP cells (Figure 2D and Figure S2). When compared to splenic naive and MZB cells, MZP displayed an intermediate expression of CD24 and CD1c. Their IgM expression was higher than naive cells (and similar to the one of MZB cells), while they expressed high level of IgD, like naive B cells. Conversely, the expression of CD21 was lower on MZP and naive B cells as compared to its high expression on MZB cells. Altogether, the phenotype of MZP cells is ABCB1⁺ MEM55⁺ CD27-IgM^{high}IgD^{high}CD21⁺CD1c^{int}CD24^{int}Cd38^{int}.

Transcriptional profiling of *in vitro* derived MZ-like B cells

A fraction of MZP cells cultured with OP9-hDLL1 cells differentiated into CD27-expressing cells (termed p27). To determine if such cells acquired other MZ-like characteristics and to delineate their relationship with naive and MZB cells, p27 cells obtained after 2 days of culture were sorted and their gene expression profile was determined and compared to those of *ex vivo* sorted naive, MZB and MZP cells. We performed a hierarchical clustering of the 4 cell fractions (each represented by 3 independent samples), based on the

expression of the 1855 probes used previously that discriminates MZB from naive cells with a 2-fold change. We found that p27 cells clustered with MZB cells in one arm of the dendrogram, while naive and MZP B cells clustered in the other arm (Figure 3A). Thus, after in vitro differentiation from MZP, p27 cells have acquired a gene expression profile that makes them closer to MZB for the interrogated set of genes. Among this list of 1855 discriminating probes, we focused on the 50 cell surface markers identified according to GSEA annotation (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Their expression levels in the various samples are depicted in Figure 3B. Interestingly, some surface markers-coding genes associated with the MZB and/or the CD27+ profile (CD1c, CR2, TNFRSF13B, TLR9) were up-regulated in p27 cells, while the ABCB1 transporter gene as well as IL21R and IL4R were down-regulated. Of interest was also the up-regulation in p27 of Notch target genes: DTX1, highly expressed in MZB, and the recently identified CD300a (Kohlhof et al., 2009; Moellering et al., 2009) expressed by mature CD27+ B cells in both blood (Silva et al., 2011) and spleen (Weller S, Weill JC, and Reynaud CA, unpublished data). In our in vitro induction, CD300a up-regulation by MZP was confirmed at the protein level reaching in p27 an intermediate value between MZP and MZB cells only on OP9-hDLL1 (Figure S3A). Moreover, addition of a NOTCH2-blocking antibody abolished the CD300a induction (Figure S3B).

In an attempt to find diagnostic genes that not only discriminates CD27- from CD27+ B cells, but also MZB from CD27+IgG+ cells, we compared the gene expression profile of these two populations. To this end, splenic MZB and IgG+CD27+ B cells, isolated from 10 and 11 spleen samples respectively (from 4 children between 4 to 8 yrs, 3 adults, and 3-4 seniors above 75 yrs), were analyzed on microarrays. Starting from the genes that were differentially expressed between splenic IgG+CD27+ and MZB cells (with a fold change ≤ 2 $p < 0.05$), we determined the 50 most significant genes (either under- or over expressed) that

achieved the highest fold change (Figure 4A). Thirty-five of them were also present among the 50 most differentially expressed genes between IgG+CD27+ and MZB cells from blood (23 upregulated and 12 downregulated in switched cells; Weller S, Weill JC and Reynaud CA, unpublished data), and are marked by an asterisk in Figure 4A. Among those 35 discriminating genes, we selected 4 genes of particular interest: COCH, TOX, HOPX that were more than 10-fold overexpressed in switched cells, and SOX7 that was 10 times overexpressed in MZB cells. Similar differences were also observed for these genes between splenic IgA+ and MZB cells (Weller S, Weill JC, Reynaud CA, unpublished data). TOX and HOPX code for transcription factors playing a major role in various immune subsets, and notably in the transcriptional regulation of exhausted CD8 T cells for TOX, and of TH1 effector memory for HOPX (Albrecht et al., 2010; Doering et al., 2012), while cochlin, an extracellular matrix protein coded by the COCH gene, has been recently proposed to be secreted by follicular dendritic cells and to modulate immune responses (Py et al., 2013). SOX7 is a transcription factor known to be an important player in the molecular regulation of the first committed blood precursors (Seguin et al., 2008). It is noteworthy that SOX7 is the most discriminating transcription factor identified to be upregulated in MZB compared to switched cells both in spleen and blood (Figure 4A and data not shown). These 4 selected genes were further validated by quantitative real-time PCR (qPCR) performed on sorted splenic MZB, naive and switched IgG+CD27+ cells (Figure 4B). SOX7 was confirmed to be about 8 times more expressed in MZB cells than in switched cells while COCH, TOX and HOPX were about 20 times more expressed in switched IgG+CD27+ cells than in MZB cells. While SOX7, TOX and COCH had minimal expression in naive B cells, the HOPX expression profile was different: it was expressed at an intermediate level in naive cells, downregulated in MZB and upregulated in switched B cells.

The expression of this four discriminating genes was tested in the p27 fraction, and in *ex vivo* sorted MZB, naive and MZP cells fractions used in the microarray analysis. SOX7 was already expressed at low level in MZP cells but its expression increased in p27 cells to a comparable level to the one observed in MZB cells. In contrast, none of the IgG+CD27+-related diagnostic genes (TOX, COCH and HOPX) were induced in p27 cells, their relative expression being similar or lower in p27 compared to MZB cells (Figure 3C). Noteworthy, HOPX, whose expression is at an intermediate level in naive cells compared to switched cells, was also already shut down at the MZP stage and remained at a similar expression level during the differentiation from MZP to p27 cells. In conclusion, for the interrogated set of genes that discriminates MZB from naive CD27- cells, *in vitro* differentiated-p27 cells showed a gene expression profile closer to the one of MZB cells, and most strikingly, acquired or maintained the MZB pattern of expression for the four diagnostic genes that distinguish MZB from other CD27+ subsets.

Age-related decline of the MZP B cell subset.

We next wanted to determine the frequency of MZP among CD19+ B cells in the spleen as a function of age and analyzed therefore a cohort of donors from various ages (15 children: 4 to 9 yr-old and 24 adults: 10 to 78 yr-old). We observed a mean frequency of $4.4\% \pm 0.44$ in the spleen of children under 10 years of age, while the mean frequency dropped to $1.7\% \pm 0.26$ in older individuals, this difference being highly significant (Figure 4). MZP were also found in the blood (25 children: 1 to 9 yr-old and 10 adults), at a mean frequency of $6.7\% \pm 0.16$ under 10 years of age. As for spleen, MZP in blood were present at a lower frequency (a mean of $1.9\% \pm 0.27$) in older individuals.

In conclusion, MZP cells are more frequent in young individuals but are nevertheless present throughout life, being eventually able to replenish the MZB cell pool. We studied also the frequency of MTG+MEM+ cells, which correspond to more mature cells (Figure S4).

Their frequency shows minor variation with age in the spleen, staying around 4%. A slight decrease with age was observed in the blood, with a mean frequency of 4.4 ± 0.4 (SEM) under 10 years of age and 2.6 ± 0.3 in older individuals.

DLL1 expressing cells are present in the human splenic marginal zone

It has been proposed that MZP cells in the mouse encounter the Dll1 ligand on fenestrated venules in the marginal zone and at its periphery (Tan et al., 2009). To localize DLL1-expressing cells in the human spleen, splenic cryosections from children (aged from 2 to 6 yr) were stained for DLL1, together with IgD and CD27 (that allow the identification of splenic lymphoid structures), and examined by confocal microscopy (Figure 6). The sections contained generally numerous secondary B cell follicles, one of these full-blown IgD-negative germinal centers (GC) surrounded by an IgD-positive zone being shown in figure 6A. Two distinct areas within the IgD+ zone are visible, an inner zone of CD27-negative IgD+ cells corresponding to the corona (Co) and mostly populated by naive B cells, and an outer zone corresponding to the MZ with CD27+ cells that express IgD at lower level. Some CD27^{high} cells, most probably T cells, are also scattered in the MZ. At one pole of the follicle, a CD27^{high} zone that did not stain for IgD corresponds to the periarteriolar lymphatic T-cell sheath (PALS) that surrounds an arteriole. While a DLL1 staining is visible on this arteriole, only very few DLL1-expressing cells were seen in the red pulp and none in the corona. In contrast, DLL1+ cells that did not stain for IgD nor CD27 were clearly present in the MZ of all the children spleen samples that were analyzed, their numbers being however variable from one sample to another (Figure 6B and 6C showing different DLL1+ cell densities). These DLL1+ cells were of elongated and irregular shape, suggesting a non-lymphoid nature, and were intermingled with lymphoid cells. Interestingly, some IgD^{high}CD27- cells scattered in the MZ were in close vicinity of DLL1+ cells (i and ii, enlarged insets of Figure 6C).

However, it was not possible to establish if these cells were bona fide MZP cells rather than transitional B cells, given the absence of a reliable staining allowing the unequivocal identification of such cells on cryosections. In conclusion, the NOTCH2 engagement on immature B cells including MZP may take place in the MZ itself, via interaction with DLL1+ non-lymphoid cells.

Patients heterozygous for a Notch2 mutation (Alagille syndrome) display a marked reduction of their blood MZB cells.

In the spleen of mice with B cell-restricted Notch2 deficiency, MZB cells are virtually absent. Furthermore Notch2 haploinsufficiency in the B cell lineage compromises MZB cell differentiation, the numbers of MZB cells ranging from one-sixth to one-fourth of those in control mice (Saito et al., 2003). To evaluate the incidence of a NOTCH2-deficiency on the development of MZB cells in humans, we searched for a condition where NOTCH2 mutations have been described. This is the case for the Alagille syndrome (ALGS), a rare (1:70,000) autosomal dominant disorder with variable multisystem organ involvement, which is caused by mutations in one of two genes in the Notch signaling pathway, JAG1 or NOTCH2. The majority of cases (94%) are caused by haploinsufficiency of the JAG1 gene and a few percent of cases are caused by heterozygous mutations in NOTCH2. We could have access to blood samples from 3 patients (8, 10 and 32 yr-old), who presented an Alagille syndrome with NOTCH2 mutations. Thus, to evaluate whether the development of MZB cells was altered in these 3 patients, peripheral blood B cell subsets were analyzed by flow cytometry after CD19, IgD and CD27 staining. In healthy controls, the frequency of MZB and switched B cells may vary widely, while staying at a similar frequency for each individual, i.e. displaying a MZB over switched cell ratio of one (Figure 7C). In the three Alagille patients, the proportion of MZB (IgD+CD27+) cells was low compared to age-matched controls, but more strikingly, the MZB over switched cells ratio was reduced (1.6 to 3.8 fold). Whereas one cannot exclude

that this deficit may come from a compromised survival that would be restricted to this subset, the similar phenotype induced by Notch2 insufficiency in mice and humans strongly argues in favor of a similar NOTCH2-dependent commitment of human MZB cells.

DISCUSSION

Notch2 interaction with its ligand, Dll1, is required in the mouse to drive a marginal zone precursor into the marginal zone B cell lineage (Hozumi et al., 2004; Saito et al., 2003). By analogy, we searched for a marginal zone precursor (MZP) in the spleen from young children, taking as diagnostic criteria its capacity to acquire a marginal zone phenotype when cultured in presence of OP9 cells expressing human DLL1, a differentiation that moreover should be specifically inhibited in presence of anti-NOTCH2 blocking antibodies. This precursor subset was identified using the recently described MEM55 antibody, which marks a glycosylated variant of the CD45RB molecule, harbored by CD27⁺ B cells and an immature B-cell subset (Koethe et al., 2011). Surprisingly, these MZP were further characterized as expressing the ABCB1 transporter reported so far as the unique hallmark of naive B cells (Wirhth and Lanzavecchia, 2005), and harbored an IgM^{high}IgD^{high}CD27⁻CD24^{int}CD38^{int}ABCB1⁺MEM55⁺CD21⁺CD1c^{int} surface phenotype. At the transcriptional level, MZP were closer to naive than to MZ B cells (a difference of 249 gene probes compared with naive vs. 990 with MZB, considering a 2-fold change and a p-value < 0.05), and accordingly carried for most of them an unmutated BCR. Interestingly, comparison with a transformed human B cell line induced to express an activated NOTCH2 receptor (Kohlhof et al., 2009) revealed that MZP were already partly engaged in the NOTCH2 pathway, most probably through inductive cues that they encounter upon their splenic location.

Upon in vitro induction by DLL1, their transcriptional profile became closer to MZB, with the up-regulation of classical MZ B cell markers such as CD1c, DTX1 and CR2 (CD21).

Other markers induced, like CD27, CD300A or TNFSFR13B (TACI) discriminate all CD27+ subsets from naive B cells, but are not specific for MZB cells. Switched and IgM+IgD+CD27+ have indeed been shown to share many transcriptional similarities (Good et al., 2009). We however performed a transcriptional analysis of 12 spleen samples from various ages (children, adult and senior), to identify diagnostic genes that would be differentially expressed by these two populations. Four genes were selected that constitute a specific signature of MZB cells, presenting an over 10-fold expression difference with switched memory B cells, a difference also observed between blood subsets (S.W., J.-C.W and C.-A.R., unpublished data): SOX7, TOX, COCH (Cochlin) and HOPX. SOX7 was found to be highly expressed in blood and splenic MZB cells, while being at a low level in IgG+ and IgA+CD27+ B cells. SOX7 is a member of the Sox family of transcription factors, which has been involved in several developmental processes as well as in the maintenance in stem cells and progenitors cells, of their self-renewal and multipotent capacity (Seguin et al., 2008). Conversely, TOX, COCH and HOPX were highly expressed in splenic and blood switched B cells, as opposed to their low expression in MZB cells. These three genes have recently emerged as new players in the immune system: as a lineage-commitment transcription factor for HOPX (Albrecht et al., 2010), a transcription network nodal point for TOX (Doering et al., 2012), and for COCH, which had been mainly known for being mutated in a human deafness congenital disease, as an immune response adjuvant secreted by follicular dendritic cells (Py et al., 2013). However, their role in the generation and maintenance of switched memory B cells is unknown at the moment. Remarkably, SOX7, already expressed at a low level in MZP, was induced up to its MZB level during the in vitro induction process (4-fold). This transcription factor may thus come out as a major regulator for this differentiation pathway in humans, although we do not know at this stage which gene expression it controls. Conversely, TOX, HOPX and COCH remained at a low level during in vitro induction,

strongly supporting the proposition that this induction was specifically driving MZP B cells towards the MZB cell lineage, and not broadly inducing a CD27-like activated profile.

Interestingly, the immature B cell fraction originally described by Bemak and colleagues (Koethe et al., 2011), which did not express the ABCB1 gene, was also inducible in the in vitro induction assay using as a read-out the up-regulation of CD27. However this induction was already very potent in the absence of DLL1 with the OP9 stroma, and it was not significantly inhibited by the addition of an anti-NOTCH2 blocking antibody. Moreover, more than 50% of these cells carried somatic mutations on their BCR. This ABCB1-MEM55+ B cell fraction, which, as opposed to MZP, appears closer at the transcriptomic level to MZB than to naive B cells, could therefore represent a more advanced stage of differentiation toward the MZB lineage. On the other hand, the presence of a consistent number of mutations on their Ig genes may argue in favor of a different cell type. Strikingly, expression of SOX5, another member of the Sox family, is the most discriminating gene between the ABCB1-MEM55+ subset and all other splenic subsets. SOX5 expression has been reported in tissue-memory B cells, described as a CD27- subset in tonsils and related to exhausted B cells described in the blood of HIV-infected patients (Ehrhardt et al., 2008; Moir et al., 2008) . SOX5 expression was also reported in anergic B cells, although this later subset is CD27+ (Charles et al., 2011). Whether ABCB1-MEM55+ B cells represent a "diverted" MZ maturation stage rather than an advanced MZ precursor is obviously an open issue that warrants further study.

Many questions obviously remain concerning MZP B cells. Where, in a linear model of differentiation, should they be placed, since they carry at the same time immature and naive B cell markers? What is their contribution throughout life towards the MZB lineage, assuming that splenic MZB cells should be replaced as they are engaged in immune responses? Along this line, although their frequency decline with age, MZP were still present in the spleen and

blood of adults. Moreover, confocal analysis of splenic sections revealed that DLL1 is expressed, as in the mouse, on an intricate network of non-lymphoid cells within the marginal zone in young children. Interestingly, B-cell depletion studies have reported that re-emergence of marginal zone B cells may lag behind switched cells, suggesting that precursors, inducing cells or factors may be more limiting in the adult (Roll et al., 2006).

Marginal zone B cell lymphomas are neoplasms of mature B cells, a subset of which are localized in the splenic MZ. Exome sequencing showed that mutations in the NOTCH2 pathway were present in 30% of these tumors, with, in many instances, a mutation in the C-terminal PEST domain of NOTCH2 that controls its proteosomal degradation (Kiel et al., 2012; Rossi et al., 2012). Since a constitutive activation of NOTCH2 was associated with a splenic marginal zone B cell malignant phenotype and not with any other type of B cell lymphoma, it was instructive to find out whether NOTCH2 insufficiency would conversely disclose a MZ B cell phenotype. The Alagille syndrome is a multi-system autosomal dominant genetic disorder that affects the liver, the heart and the eyes, along with skeletal abnormalities and facial features (Kamath et al., 2012). Micro-deletions of the JAG1 gene that disrupt the NOTCH2 pathway are usually associated with this syndrome, but in rare cases in which JAG1 is not mutated, patients present an inactivating mutation on one of their NOTCH2 allele. Strikingly, and as observed for mouse splenic MZB cells with a heterozygous Notch2 inactivation, analysis of blood B cells from NOTCH2 haploinsufficient Alagille patients showed a reduction of their IgD+IgM+CD27+ cells, while their switched B cells were at a normal level.

The existence of a human blood and splenic MZ B cell subset was put into question, notably through the work of Küppers and colleagues who reported that CD27+ blood B cells originated for most of them from a germinal center precursor cell, which gave rise to both IgM+ and switched B cells (Seifert and Kuppers, 2009). Surprisingly, these data were

challenged by recent studies involving high throughput sequencing of the different blood B cell sub-populations from several healthy donors, which did not reveal any clonal relationship between blood IgD+IgM+CD27+ and switched cells. In contrast, such relationships could be found between other B cell subsets, like CD27+ and CD27- switched or IgM-only cells, or, even more rarely between IgD+IgM+CD27+ and IgM-only B cells (Wu et al., 2011; Wu et al., 2010b). Further studies using high throughput sequencing of paired blood and spleen samples may help to decipher further clonal relationships between B-cell subsets and clarify this issue.

Altogether, the NOTCH2 dependence observed in Alagille patients for the development of the IgM+IgD+CD27+ MZB cell subset, along with the identification of a candidate splenic MZ B cell precursor reported here, brings new evidence in favor of the existence of a separate MZ B cell lineage in humans.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Samples and mononuclear cell isolation

Spleen and blood samples were obtained from children undergoing a splenectomy for nonimmunological disease-related reasons (spherocytosis or drepanocytosis) and an informed consent was obtained from the parents of each patient. Leftover blood samples (taken for blood counts) from healthy children undergoing orthopedic surgery were obtained from the Service d'Hématologie Biologique of the Necker Hospital. Adult spleen and blood samples were obtained respectively from organ donors with the authorization of the French Agence de la Biomédecine and from the blood bank (Etablissement Français du Sang). Spleen mononuclear cells (MNC) and PBMCs were obtained respectively from mechanically disrupted spleen samples and heparinized blood after a density gradient centrifugation on Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare).

ABCB1 transporter activity assay

Since available specific anti-ABCB1 mAbs give only poor stainings, the expression of the ABCB1 transporter is usually detected by measuring the extrusion of MitoTracker Green FM (MTG) (Palanichamy et al., 2009; Wirths and Lanzavecchia, 2005) . Thus, to distinguish ABCB1-positive from negative cells, cells were diluted at 10⁷ cells/ml in RPMI (GIBCO BRL) and pulsed at 37°C under 5% CO₂ with MTG (Molecular probe) at 20 nM for 30 min. After three washes, cells were chased for one hour at 37°C under 5% CO₂ and were then stained on ice with additional Abs before flow cytometry analysis. Cells that do not express the ABCB1 transporter fully retain MTG, whereas ABCB1+ cells are MTG-.

Flow cytometry analysis and cell sorting

All the immunofluorescence stainings were performed by incubating cells with antibodies (described in Table S2) in PBS 2% FCS, on ice for 15 min. After a final wash, labeled cells were briefly incubated with the Sytox Blue Dead Cell stain (Life technologies), allowing the exclusion of dead cells in all the subsequent flow cytometric data acquisitions and cell sorts which were performed respectively with a FACSCantoII and FACS Aria Cell Sorter (BD Biosciences). Data were analyzed either with Diva (BD Biosciences) or FlowJo (Tree Star) softwares. The distinct cell fractions analyzed in the present work were isolated through purification, staining and sorting procedures that vary depending on experiments and that are detailed in the supplemental data.

In vitro cell differentiation assay

The differentiation potential of transitional, naive, MTG-MEM55+ and MTG+MEM55+ subsets (see Figure 1C) was tested by plating them on mouse OP9 stromal cells engineered to express either the green fluorescent protein (GFP) alone (OP9) or GFP and the human Notch

ligand Delta-like1 gene (OP9-hDLL1), (a gift from Dr. E Six (Six et al., 2007)). The day before, OP9 and OP9-hDLL1 cells were plated in 24 wells plate at 20 000 cells/well in MEM medium (Invitrogen) containing 20% FCS and 1% Pen-Strep (Invitrogen). On day 0, the different subsets were sorted and collected into MEM + 20% FCS. Each fraction was put in culture on OP9 or OP9-hDLL1 (around 50 000 cells per well). For MTG-MEM55+ and MTG+MEM55+ cells, the effect of a selective blocking of the Notch2 or Notch1 signaling pathway on their differentiation was evaluated by adding an anti-NOTCH2 mAb or anti-NOTCH1 mAb at 5 µg/ml (a kind gift of Dr CW Siebel, from Genentech (Wu et al., 2010a)) when plating the cells on OP9-hDLL1 stromal cells. On day 3, cells were removed from culture, washed, labeled with anti-CD20, -IgD and -CD27 antibodies and lymphoid CD20+GFP- cells were analyzed by flow cytometry for the expression of CD27.

Microarray analysis

Total RNA was isolated from the different cell fractions using the RNeasy Micro kit (QIAGEN). RNA quality and concentration were assessed using RNA6000 Pico LabChips with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). For the microarray analysis shown in figure 3, 8 ng of total RNA (corresponding approximately to 6,000 -18,000 cells depending on the RNA content of the fractions) was preamplified by Ribo-SPIA (Ribo-single primer isothermal amplification) RNA Amplification using the Ovation Pico WTA Sytem V2 Kit (NuGEN Technologies), fragmented, and labeled with biotin using the Encore Biotin Module (NuGEN Technologies), as recommended by the manufacturer. For the microarray analysis shown in figure 4A, 100 ng of total RNA (corresponding approximately to 140,000 cells) was amplified with the GeneChip® Two-Cycle Target Labeling Kit (Affymetrix). Transcript expression levels were assessed with Affymetrix human Genome U133Plus2 arrays according to the manufacturer's instruction. Fluorescence data were imported into Affymetrix

Expression Console and R Bioconductor analysis software. Gene expression levels were calculated using GCRMA and flags were computed using MAS5 within R. To limit potentially biased measurements (background or saturating), all probes whose flags were absent or marginal were flagged as 0, whereas those present were flagged as 1. The group comparisons were done using a Student's t test. To estimate the false discovery rate, we filtered the resulting p-values at 0.05 and considered data with 1.5 or 2 fold changes between samples.

Confocal microscopy

Immediately after splenectomy, pieces of splenic tissue were excised and embedded in OCT (Sakura), snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Cryosections (7–9 μm) were cut, fixed in cold (-20°C) acetone for 15 min, rehydrated in wash buffer (TBS, pH 7.6), and incubated in blocking buffer (0.5% BSA and 10% goat serum in PBS) for 30 min at room temperature (RT). Sections were then incubated for 60 min at RT or 4°C overnight, with the indicated primary antibodies (Table S2) in the blocking buffer solution. Incubations without primary antibodies were used as control. Sections were washed 3 times and incubated with the secondary antibody as indicated (30 min, RT). Sections were washed and mounted in Fluoromont-G (Southern Biotech). Images were acquired by confocal microscopy with a SP5 (Leica). Fluorescence of single channels was measured, and control reference was systematically done. Pictures were taken with an objective $\times 40$. Images were analyzed and processed with ImageJ version 1.46.

Analysis of mutation frequencies in JH4-JH5 intron flanking rearranged VHDJH4

Starting from 20,000-40,000 highly purified sorted cells, total genomic DNA was extracted with Micro DNeasy kit (QIAGEN). The JH4-JH5 intronic region was amplified with Phusion DNA polymerase (Finnzymes) by the use of mixture of 6 FR3 primers (FR3-mix) designed to amplify all VH gene sequences and a primer binding 5' to the JH5 exon, as previously described (Weller et al., 2008). PCR conditions were as follows: 40 cycles of 98°C for 10 seconds, 60°C for 20 seconds, and 72°C for 20 seconds. The resulting JH4-JH5 PCR products were gel purified and cloned with Zero Blunt PCR Cloning kit (Invitrogen). Sequences were run in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Mutation frequencies were calculated by comparing the sequences obtained with germline intronic JH4-JH5 sequences over 284bp, starting at the 3' border of the JH4 gene segment.

mRNA isolation and Real-time quantitative PCR (qPCR)

Total RNA was isolated from each sorted cell fraction with the RNeasy Micro kit and reverse transcribed by random priming with the AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies). qPCR for the human B2M, SOX7, TOX, COCH and HOPX transcripts was performed with specific TaqMan gene expression assays designed by Applied Biosystems (B2M Hs00984230_m1; TOX Hs01055573_m1; HOPX Hs041888695_m1; COCH; Hs00187937_m1; SOX7 Hs00846731_s1) on 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with the 9600 Emulation run mode. Normalized values for gene expression were determined using B2M as internal gene reference. PCR with a threshold cycle (Ct)>36 were considered NS.

REFERENCES

- Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., and Komiyama, A. (1997). B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur. J. Immunol.* 27, 2073-2079.
- Albrecht, I., Niesner, U., Janke, M., Menning, A., Loddenkemper, C., Kuhl, A.A., Lepenies, I., Lexberg, M.H., Westendorf, K., Hradilkova, K., et al. (2010). Persistence of effector memory Th1 cells is regulated by Hopx. *Eur. J. Immunol.* 40, 2993-3006.
- Bemark, M., Holmqvist, J., Abrahamsson, J., and Mellgren, K. (2012). Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 15-25.
- Charles, E.D., Brunetti, C., Marukian, S., Ritola, K.D., Talal, A.H., Marks, K., Jacobson, I.M., Rice, C.M., and Dustin, L.B. (2011). Clonal B cells in patients with hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia contain an expanded anergic CD21low B-cell subset. *Blood* 117, 5425-5437.
- Cuss, A.K., Avery, D.T., Cannons, J.L., Yu, L.J., Nichols, K.E., Shaw, P.J., and Tangye, S.G. (2006). Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J. Immunol.* 176, 1506-1516.
- Doering, T.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Paley, M.A., Ziegler, C.G., and Wherry, E.J. (2012). Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* 37, 1130-1144.
- Dunn-Walters, D.K., Isaacson, P.G., and Spencer, J. (1995). Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J. Exp. Med.* 182, 559-566.
- Earl, L.A., and Baum, L.G. (2008). CD45 glycosylation controls T-cell life and death. *Immunol. Cell. Biol.* 86, 608-615.
- Ehrhardt, G.R., Hijikata, A., Kitamura, H., Ohara, O., Wang, J.Y., and Cooper, M.D. (2008). Discriminating gene expression profiles of memory B cell subpopulations. *J. Exp. Med.* 205, 1807-1817.
- Good, K.L., Avery, D.T., and Tangye, S.G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J. Immunol.* 182, 890-901.
- Good, K.L., and Tangye, S.G. (2007). Decreased expression of Kruppel-like factors in memory B cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 13420-13425.

- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., and Owen, M.J. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 5, 638-644.
- Kamath, B.M., Bauer, R.C., Loomes, K.M., Chao, G., Gerfen, J., Hutchinson, A., Hardikar, W., Hirschfield, G., Jara, P., Krantz, I.D., et al. (2012). NOTCH2 mutations in Alagille syndrome. *J. Med. Genet.* 49, 138-144.
- Kiel, M.J., Velusamy, T., Betz, B.L., Zhao, L., Weigelin, H.G., Chiang, M.Y., Huebner-Chan, D.R., Bailey, N.G., Yang, D.T., Bhagat, G., et al. (2012). Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J. Exp. Med.* 209, 1553-1565.
- Koethe, S., Zander, L., Koster, S., Annan, A., Ebenfelt, A., Spencer, J., and Bemark, M. (2011). Pivotal advance: CD45RB glycosylation is specifically regulated during human peripheral B cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 90, 5-19.
- Kohlhof, H., Hampel, F., Hoffmann, R., Burtscher, H., Weidle, U.H., Holzel, M., Eick, D., Zimmer-Strobl, U., and Strobl, L.J. (2009). Notch1, Notch2, and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 signaling differentially affects proliferation and survival of Epstein-Barr virus-infected B cells. *Blood* 113, 5506-5515.
- Kruetzmann, S., Rosado, M.M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H.H., Berner, R., Peters, A., Boehm, T., Plebani, A., et al. (2003). Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J. Exp. Med.* 197, 939-945.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323-335.
- Moellering, R.E., Cornejo, M., Davis, T.N., Del Bianco, C., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Kung, A.L., Gilliland, D.G., Verdine, G.L., and Bradner, J.E. (2009). Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* 462, 182-188.
- Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A.C., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottlilil, S., Arthos, J., Proschan, M.A., et al. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.* 205, 1797-1805.
- Oberdoerffer, S., Moita, L.F., Neems, D., Freitas, R.P., Hacohen, N., and Rao, A. (2008). Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science* 321, 686-691.
- Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Wei, C., Looney, R.J., Sanz, I., and Anolik, J.H. (2009). Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J. Immunol.* 182, 5982-5993.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767-777.

Py, B.F., Gonzalez, S.F., Long, K., Kim, M.S., Kim, Y.A., Zhu, H., Yao, J., Degauque, N., Villet, R., Ymele-Leki, P., et al. (2013). Cochlin produced by follicular dendritic cells promotes antibacterial innate immunity. *Immunity* 38, 1063-1072.

Roll, P., Palanichamy, A., Kneitz, C., Dorner, T., and Tony, H.P. (2006). Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 54, 2377-2386.

Rossi, D., Trifonov, V., Fangazio, M., Brusca, A., Rasi, S., Spina, V., Monti, S., Vaisitti, T., Arruga, F., Fama, R., et al. (2012). The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J. Exp. Med.* 209, 1537-1551.

Roundy, K.M., Jacobson, A.C., Weis, J.J., and Weis, J.H. (2010). The in vitro derivation of phenotypically mature and diverse B cells from immature spleen and bone marrow precursors. *Eur. J. Immunol.* 40, 1139-1149.

Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., et al. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675-685.

Seguin, C.A., Draper, J.S., Nagy, A., and Rossant, J. (2008). Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell. Stem. Cell.* 3, 182-195.

Seifert, M., and Kuppers, R. (2009). Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J. Exp. Med.* 206, 2659-2669.

Silva, R., Moir, S., Kardava, L., Debell, K., Simhadri, V.R., Ferrando-Martinez, S., Leal, M., Pena, J., Coligan, J.E., and Borrego, F. (2011). CD300a is expressed on human B cells, modulates BCR-mediated signaling, and its expression is down-regulated in HIV infection. *Blood* 117, 5870-5880.

Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105, 4390-4398.

Six, E.M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A., et al. (2007). A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *J. Exp. Med.* 204, 3085-3093.

Srivastava, B., Quinn, W.J., 3rd, Hazard, K., Erikson, J., and Allman, D. (2005). Characterization of marginal zone B cell precursors. *J. Exp. Med.* 202, 1225-1234.

Tan, J.B., Xu, K., Cretegnny, K., Visan, I., Yuan, J.S., Egan, S.E., and Guidos, C.J. (2009). Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like 1 in splenic endothelial niches. *Immunity* 30, 254-263.

Tangye, S.G., and Good, K.L. (2007). Human IgM⁺CD27⁺ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J. Immunol.* 179, 13-19.

Weill, J.C., Weller, S., and Reynaud, C.A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267-285.

Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647-3654.

Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist, F.F., de Saint Basile, G.G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 1166-1170.

Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecue, D., Gauthier, F., Weill, J.C., and Reynaud, C.A. (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* 205, 1331-1342.

Wirhth, S., and Lanzavecchia, A. (2005). ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur. J. Immunol.* 35, 3433-3441.

Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T.J., de Leon, G.P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., Wu, X., Ridgway, J., et al. (2010a). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 464, 1052-1057.

Wu, Y.C., Kipling, D., and Dunn-Walters, D.K. (2011). The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front. Immunol.* 2, 81.

Wu, Y.C., Kipling, D., Leong, H.S., Martin, V., Ademokun, A.A., and Dunn-Walters, D.K. (2010b). High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 116, 1070-1078.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pr. Jean-Pierre Grunfeld for his contribution, the patients and their families.

We thank Paolo Conti, Francesca Conti, Erika Della Mina and Remi Fritzen for their contribution. We thank Emmanuelle Six for the gift of GFP- and hDDL1 expressing vectors, and Dr CW Siebel (Genentech) for the gift of anti-NOTCH1 and -NOTCH2 antibodies. We thank Nicola Goudin for assistance with confocal microscopy and Jérôme Mégret for cell sorting. INSERM U783 is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer ("Equipe

labelisée”), the Fondation Princesse Grace, the INCA for the LYMPH-IMM-MARGE project, and by an ERC advanced investigator grant. Marc Descatoire was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

The authors declare to have no conflict of interests.

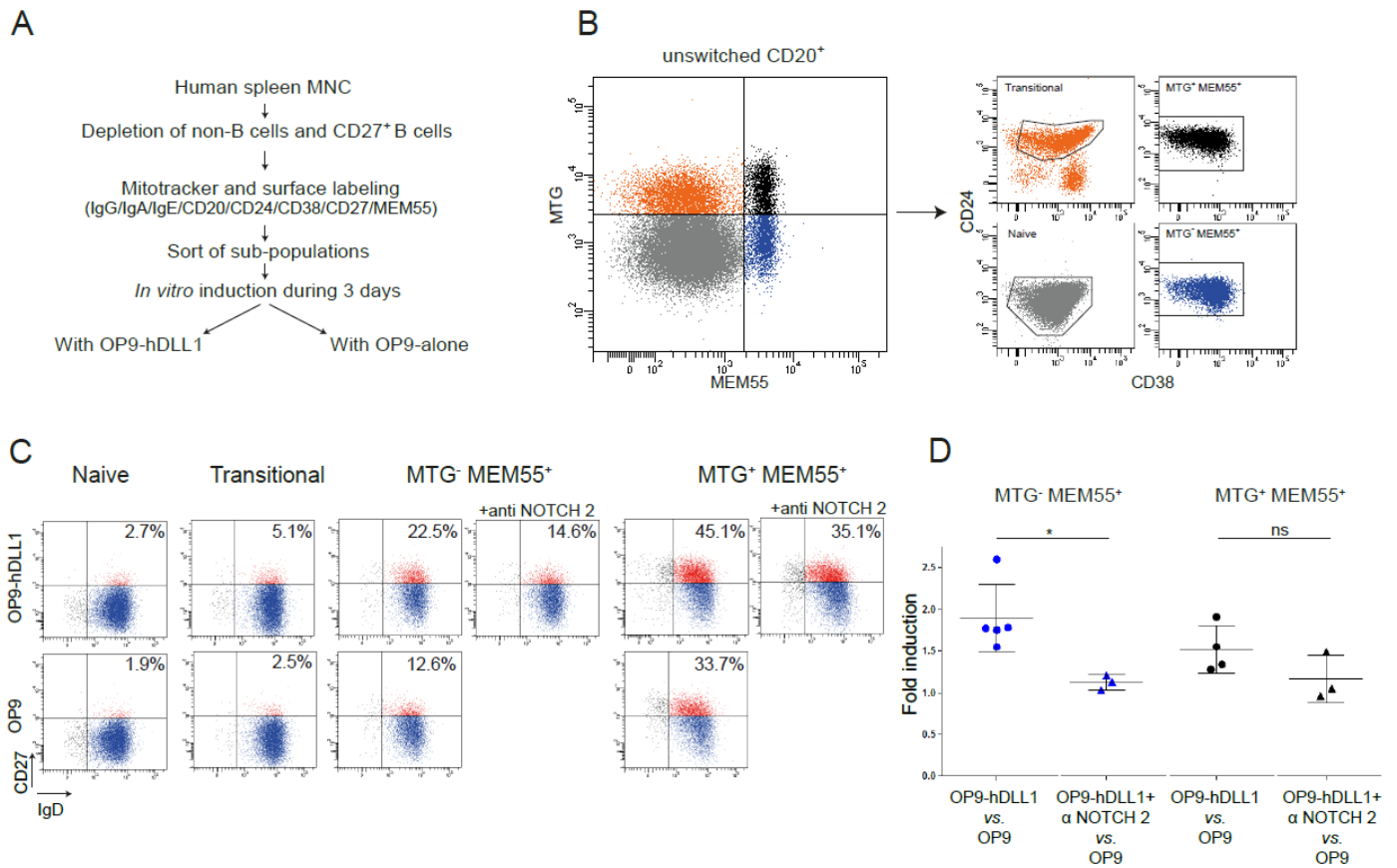


Figure 1. Identification of candidate marginal zone precursors from children spleen.

A) Isolation scheme of candidate marginal zone precursor subsets from mononuclear cells (MNC) from children spleens (4-8 yr).

B) Mitotracker Green (MTG) and MEM55 (an antibody against a glycosylated variant of CD45RB) flow cytometry profiles of IgG⁻IgE⁻IgA⁺CD27⁺CD20⁺ cells revealed 4 distinct fractions that were isolated following the indicated CD24 and CD38 sort gates.

C) The four fractions isolated in B) were cocultured either with OP9 + hDLL1 or OP9 cells alone. After 3 days, cells were recovered, stained for CD20, IgD and CD27 and CD20⁺-gated cells were analyzed for CD27 up-regulation. For MTG⁻MEM55⁺ and MTG⁺MEM55⁺ cells, the effect of a blocking anti-NOTCH2 mAb added in the OP9-hDLL1 cultures was evaluated. Percentages of IgD⁺CD27⁺ among total B cells after differentiation are indicated on each dot plot.

D) For the two MEM55⁺ subsets, a fold induction corresponding to the ratio of IgD⁺ cells becoming CD27-positive in the OP9-hDLL1 (with or without anti-NOTCH2 mAb) vs. OP9 condition were

plotted with indicated means \pm SD (complete data from 5 different donors are listed in Table S1). Statistical significance is * $p < 0.05$ as determined by a Mann-Whitney test.

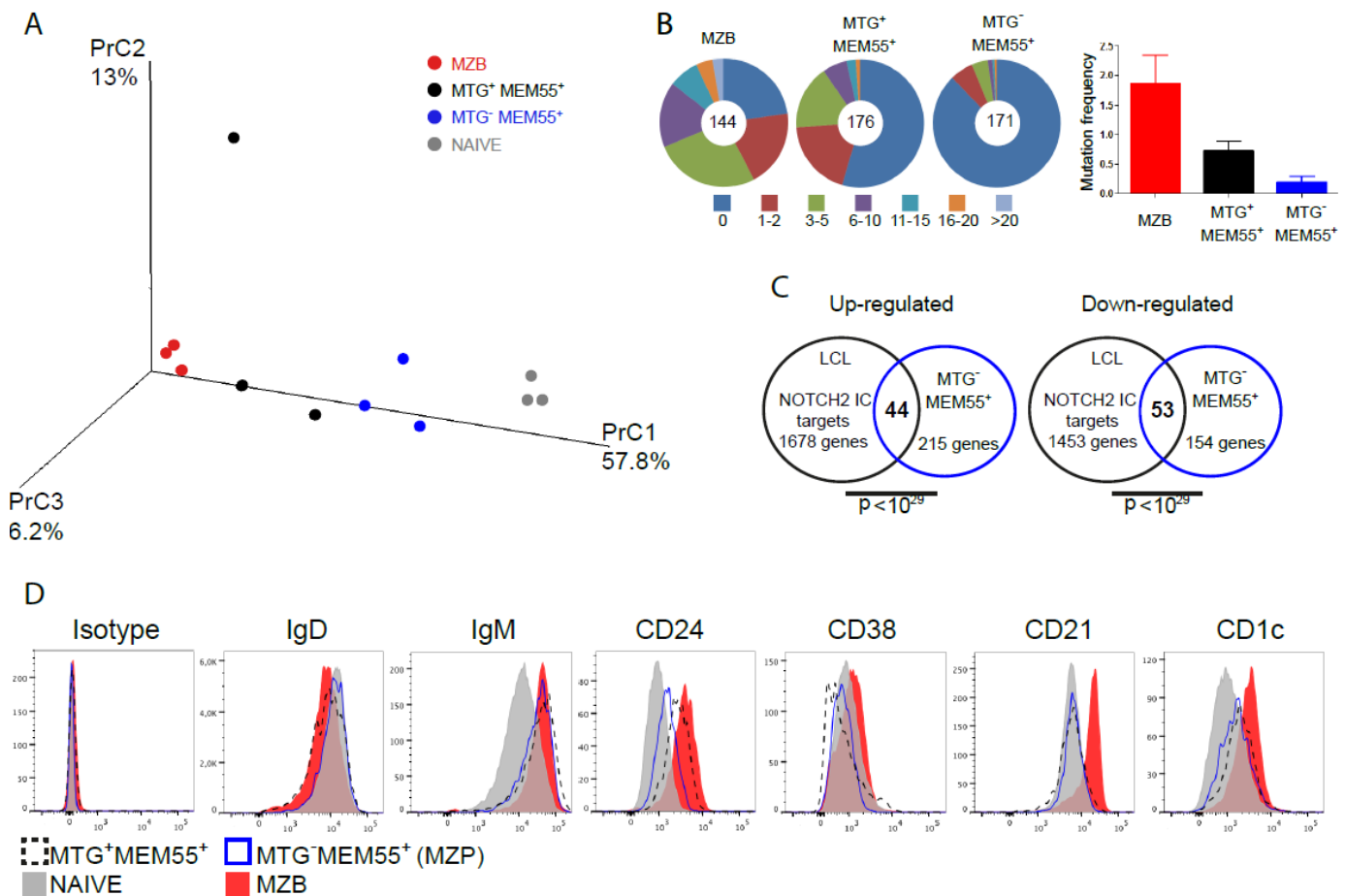


Figure 2. The MTG^-MEM55^+ subset represents an early marginal zone precursor stage prior to Ig gene diversification.

A) Gene expression profiles of naive, MZB, MTG^-MEM55^+ and MTG^+MEM55^+ cells were determined using Affymetrix Human Genome U133 2.0 Plus microarrays (see Experimental Procedures). A 3D representation of a principal component analysis (PrC) performed for these 4 subsets, based on the expression of the 1855 probes that were differentially expressed between naive and MZB cells with a fold change ≥ 2 , ($p < 0.05$) is shown, with each dot representing a single sample.

(B) Mutation distribution within Ig sequences from splenic MZB, MTG⁺MEM55⁺ and MTG⁻MEM55⁺ subsets and mutations frequencies per total sequences. Mutations were analyzed within 284 pb of rearranged J_H4-J_H5 intronic sequences with data pooled from 5 children (detailed in Figure S1). The pie charts depict relative proportions of sequences with a given mutation range (see the color legend). The total number of analyzed sequences is indicated in the center of each chart. Mutation frequencies of all sequences from each subset are represented, expressed as mutations per 100 bp.

(C) Through data mining, a list of 1678 and 1453 genes that were respectively up or down-regulated after induction of an activated NOTCH2 receptor (NOTCH2-IC) in an EBV-transformed human B lymphoblastoid cell line (LCL) was established. Those genes were confronted to the 215 and 154 genes that were respectively over or under-expressed in MZP compared to naive cells (with a fold change ≥ 1.5 , $p < 0.05$) to generate Venn diagrams. The numbers of genes that are common in both lists are indicated in bold at the intersection between two circles. Hypergeometric distribution was used to calculate the p -value according to GSEA.

(D) After gating on dump⁻CD19⁺ cells, and based on their respective expression of MTG, MEM55, CD27 and IgD, naive (grey), MZB (red), MTG⁻MEM55⁺ (blue) and MTG⁺MEM55⁺ (black, dotted line) cells from children spleen samples were analyzed for expression of several surface markers by flow cytometry. Data are representative of 3 different samples.

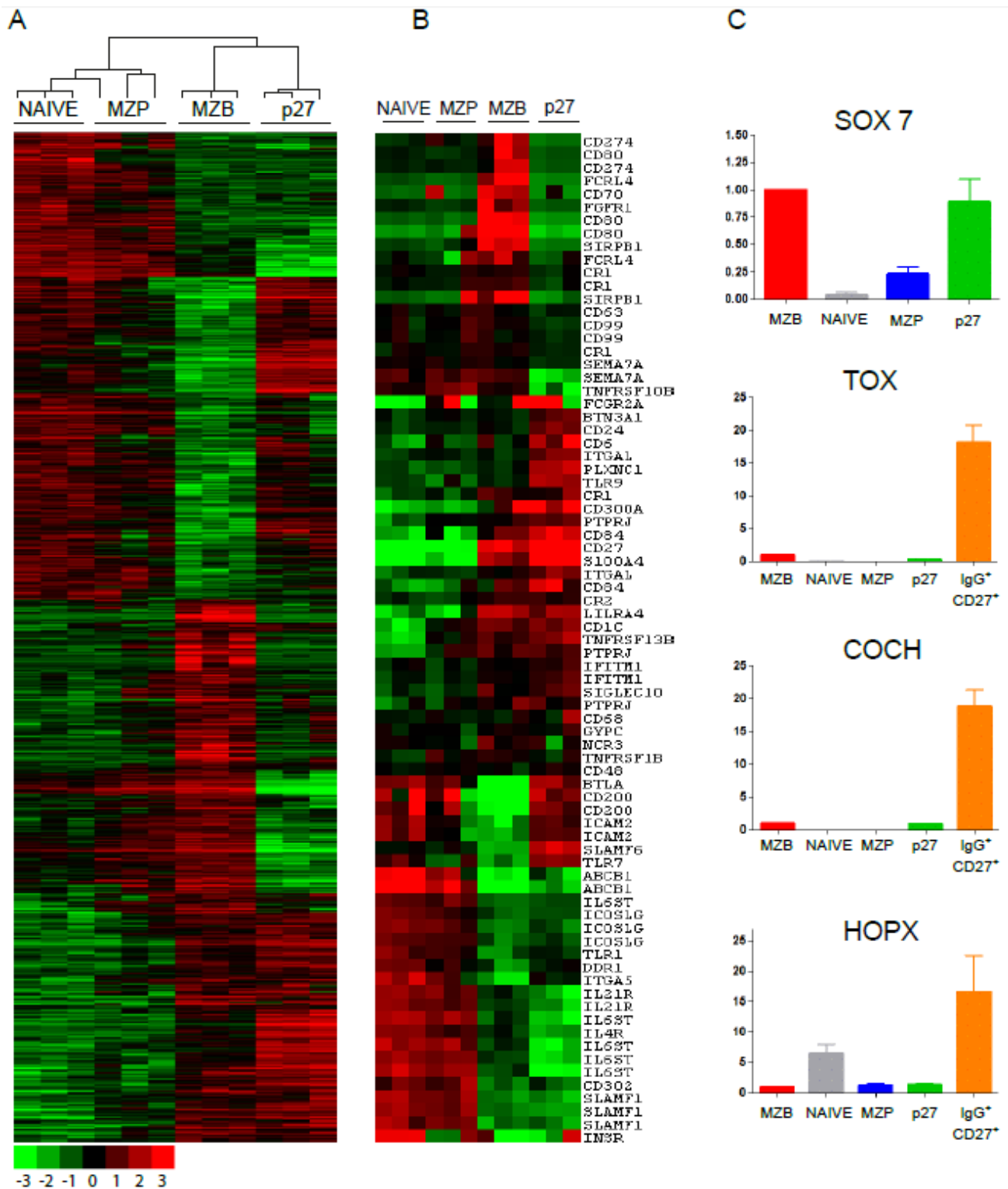


Figure 3. *In vitro* NOTCH2 stimulation induces MZP cells toward an “MZB-like” profile.

A) *Ex-vivo* naive, MZB and MZP (MTG⁻MEM55⁺) cells were sorted from splenic samples of 3 children as described (see Experimental Procedures). In parallel, after a two-day culture on OP9-hDDL1 cells, MZP cells having acquired a CD27 expression (p27 cells) were sorted as

well and their respective gene expression profiles were determined. The array dendrogram and heat-map expression profiles of naive, MZB, MZP and p27, obtained by hierarchical clustering using the 1855 probes that differentiated naive from MZB cell ($p < 0.05$, 2-fold higher expression) are shown. Each column represents microarray data from a sample of the indicated cell subtype and each row represents the expression of a single gene. Red squares indicate increased expression and green squares indicate decreased expression relative to the median expression of the gene according to the color bar shown (\log_2 scale).

B) Among the 1855 probes discriminating MZB from naive B cells, those corresponding to cell surface proteins using the GSEA tool were determined, and the heat map expression profile of these surface markers represented for each splenic sample.

C) Relative expression levels of *SOX7*, *TOX*, *COCH* and *HOPX* (see Figure 4) were determined by qPCR for the very fractions of naive, MZB, MZP and p27 cells that have been used for the microarray-based gene expression analysis and for $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ cells. Expression values normalized by *B2M* expression were calculated by the comparative method, normalizing to 1 the expression of the different genes in the MZB fraction. Mean values \pm SEM of three independent experiments done in triplicates are shown.

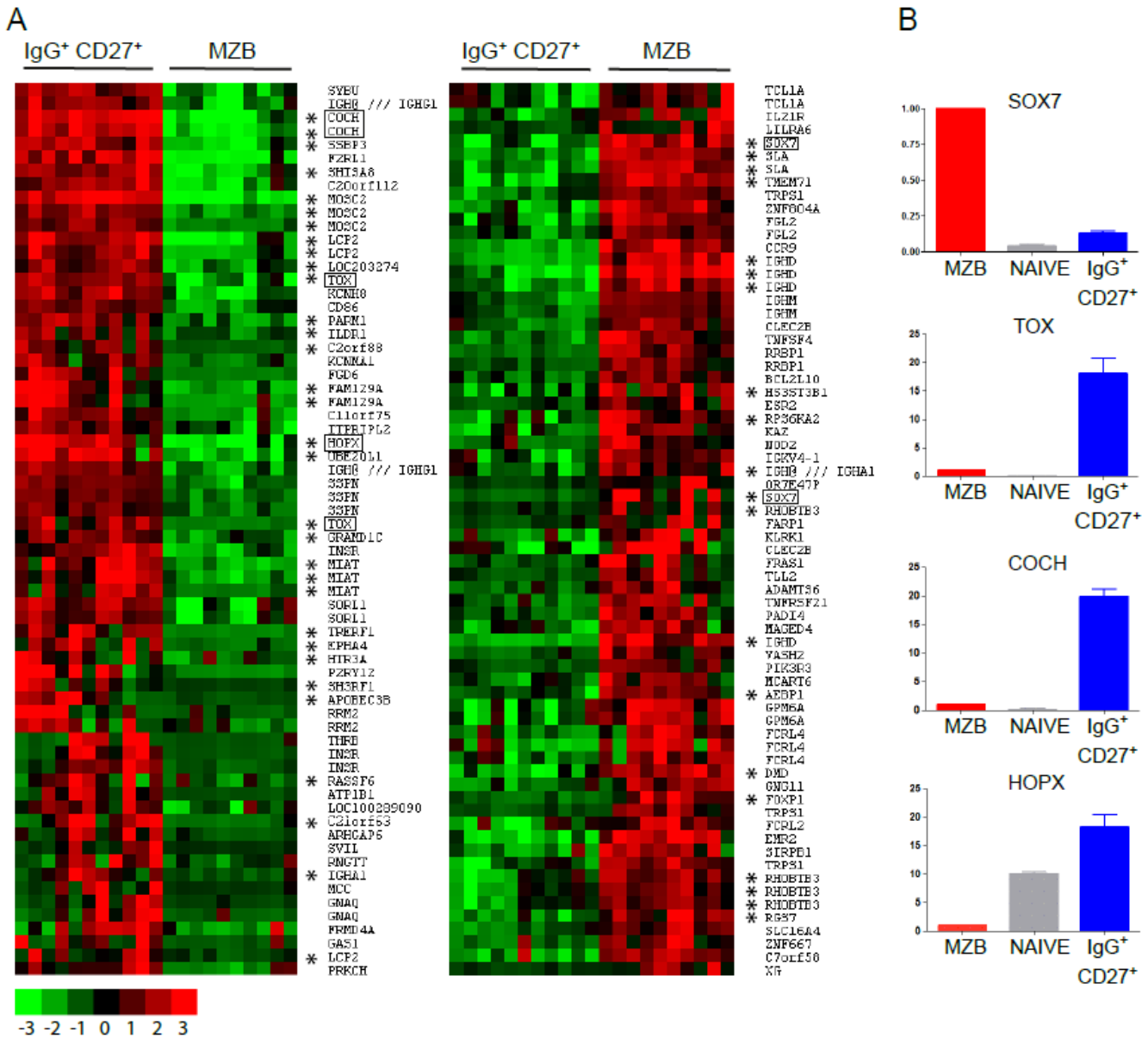


Figure 4. *TOX*, *HOPX*, *COCH* and *SOX7* display a markedly different expression between MZB and switched B cells.

A) Splenic IgG⁺CD27⁺ and IgD⁺CD27⁺ MZB were sorted from either 10 or 11 spleen samples from donor of different ages (see Experimental procedures) and their gene expression profiles were determined. The 50 genes that achieve the highest difference in expression ($p < 0.05$) between those two subsets in spleen are shown (left part, upregulated in IgG⁺ CD27⁺; right part, upregulated in MZB cell; The log₂ scale bar is indicated), with spleen samples arrayed by increasing age. The same comparison was made for blood IgG⁺CD27⁺ and MZB IgD⁺CD27⁺ (not shown) to establish a list of the 50 most discriminating genes. The

discriminating genes that are shared between the blood and spleen comparisons are identified by asterisks, and the four genes studied by qPCR are boxed.

B) MZB, naive and switched $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ cells from splenic samples of 4 different children were obtained by two consecutive sorts (see Experimental Procedures). Relative expression levels of *SOX7*, *TOX*, *COCH* and *HOPX* in each subset were determined by q-PCR. Expression values normalized by *B2M* expression were calculated by the comparative method, normalizing to 1 the expression of the different genes in the MZB fraction. Mean values \pm SEM of three independent experiments done in triplicates are shown.

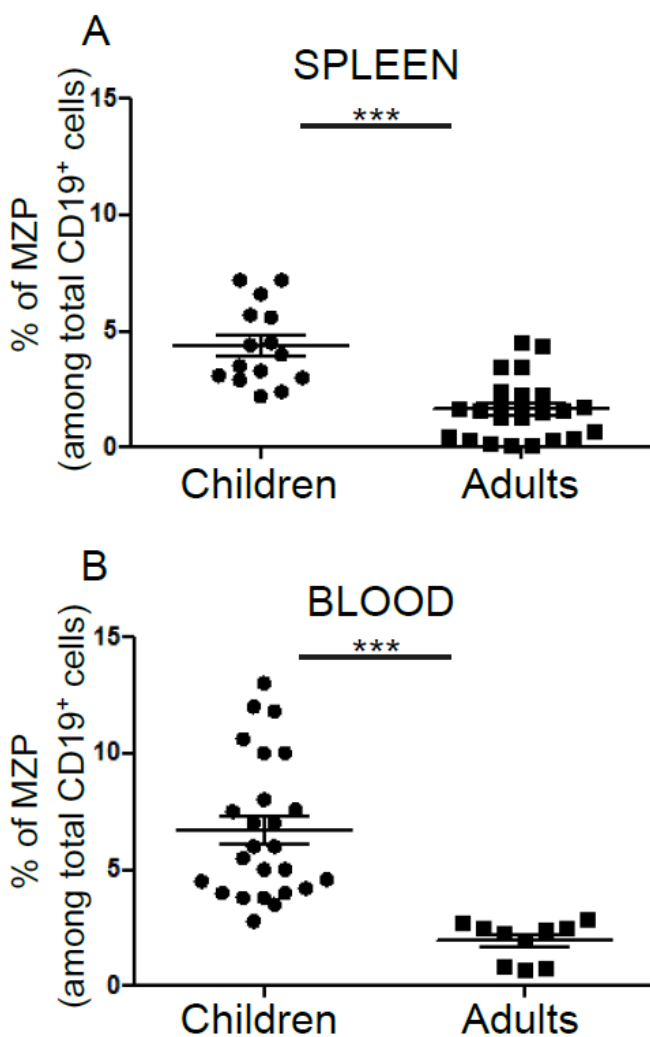
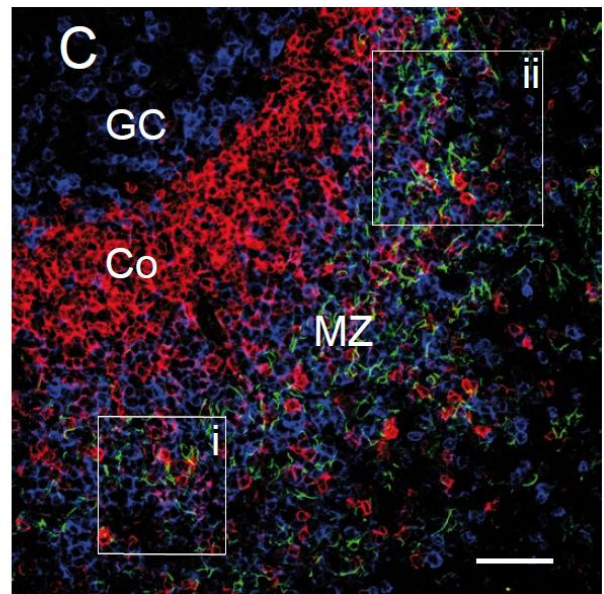
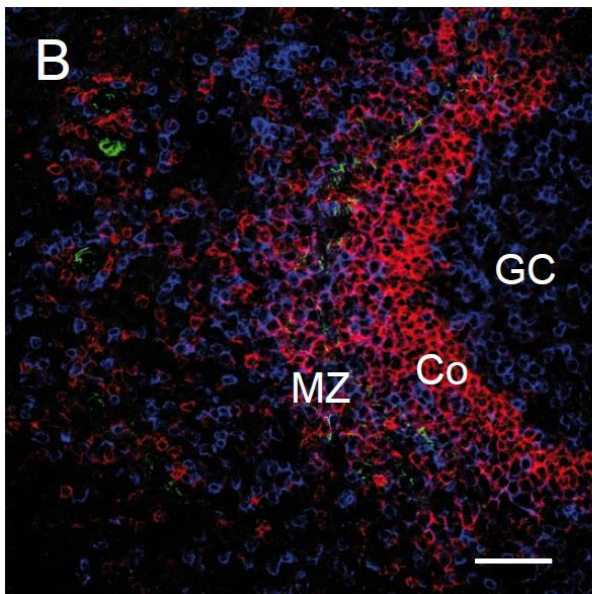
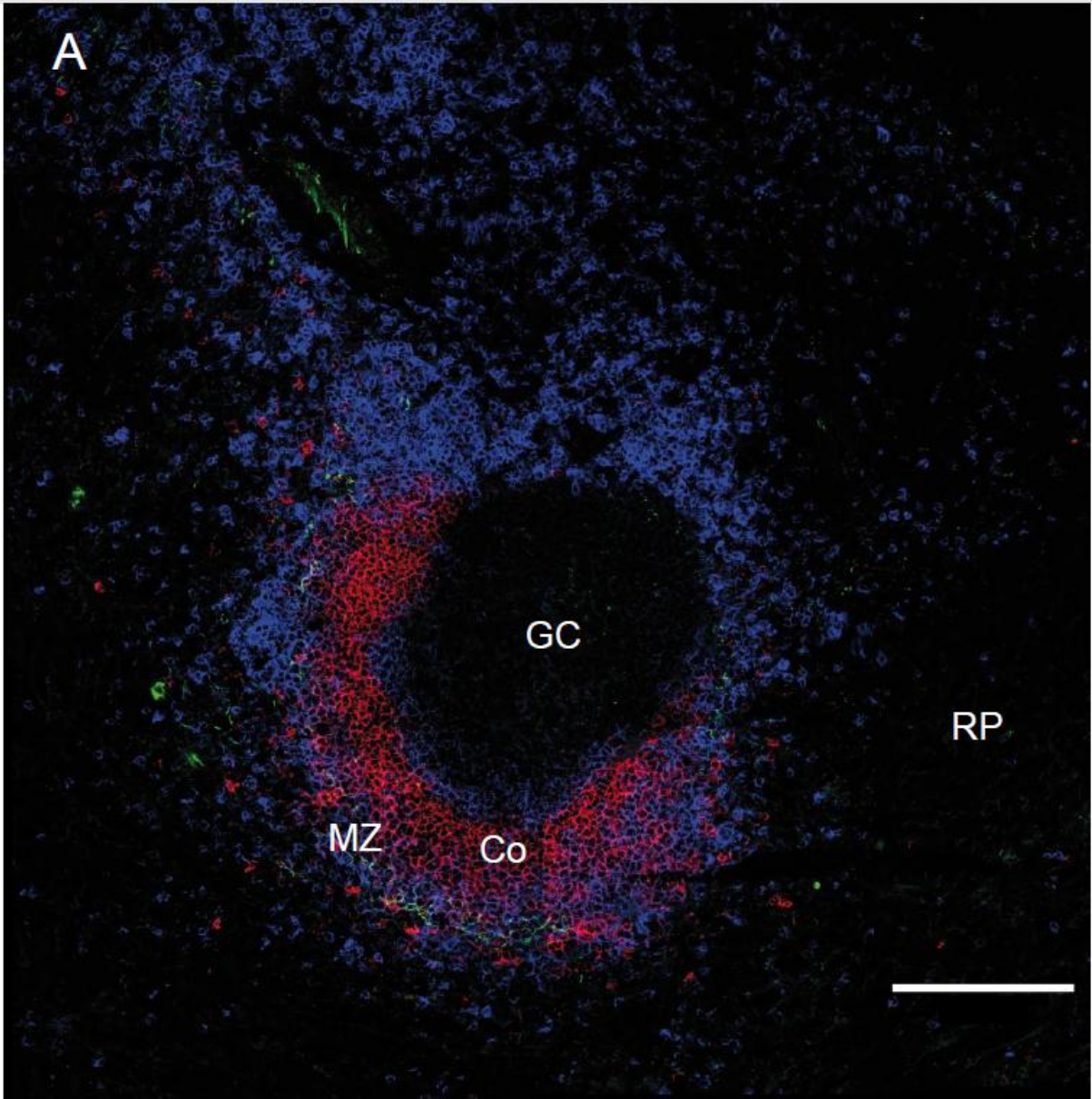


Figure 5. Splenic MZP frequencies decline with age in spleen and blood.

A) Proportions (expressed as percentages of total CD19⁺ B cells) of Dump⁻CD19⁺-gated $\text{IgD}^+\text{CD27}^-\text{MTG}^-\text{MEM55}^+$ (MZP) cells in spleen from children (4 – 9yr) and adults. Mean values \pm SEM are indicated on the graphs. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$ (Mann-Whitney statistical test).

B) Same analysis performed on blood samples.



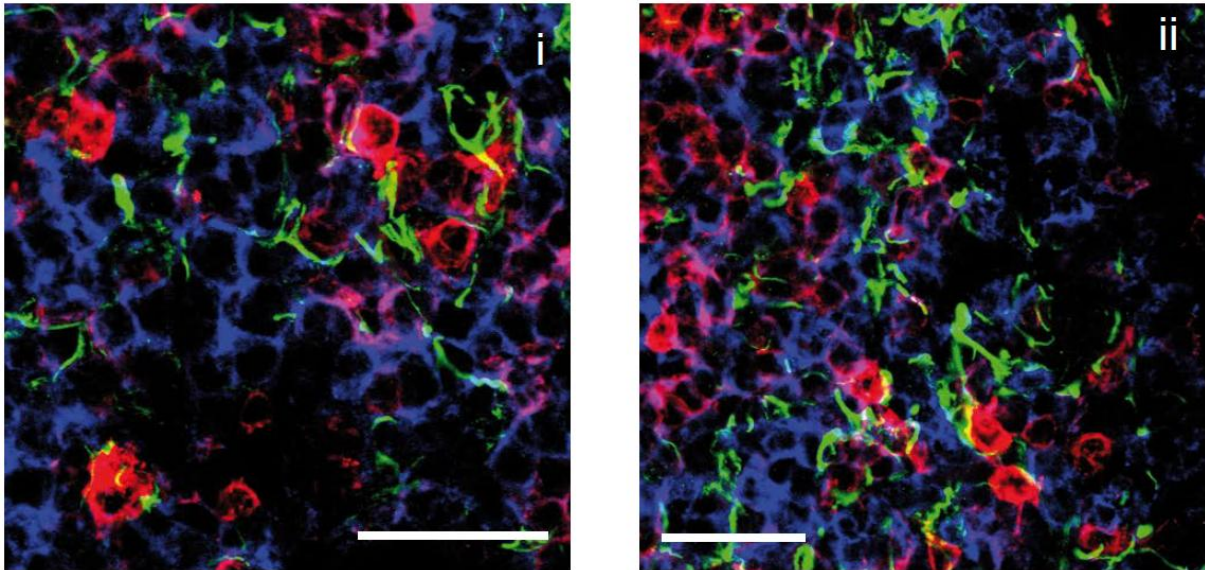


Figure 6. Non-lymphoid DLL1⁺ cells are located in the splenic marginal zone.

Confocal imaging analysis of spleen sections from children stained with fluorescent-conjugated anti-DLL1 (green), anti-IgD (red) and anti-CD27 (blue), (original objective lens magnification $\times 40$).

A) A representative image of a GC surrounded by densely distributed IgD⁺CD27⁻ naive cells forming the corona and the marginal zone at the periphery, occupied by CD27⁺IgD^{low} B cells (lightly colored in purple) (splenic section of a 4-year-old child) (scale bar, 150 μ m).

B) and C) Selected areas of splenic sections (from 2- and 4-year-old children respectively), illustrating the presence at various density of DLL1⁺ cells in the MZ. Note the complete absence of DLL1 staining in the corona (scale bar, 50 μ m). The insets i) and ii) show respectively a 4- and 3- fold magnification of DLL1-positive cells that are in close contact with IgD^{high} cells in the MZ (scale bar, 30 μ m). Co, corona; GC, germinal center; MZ, marginal zone; RP, red pulp.

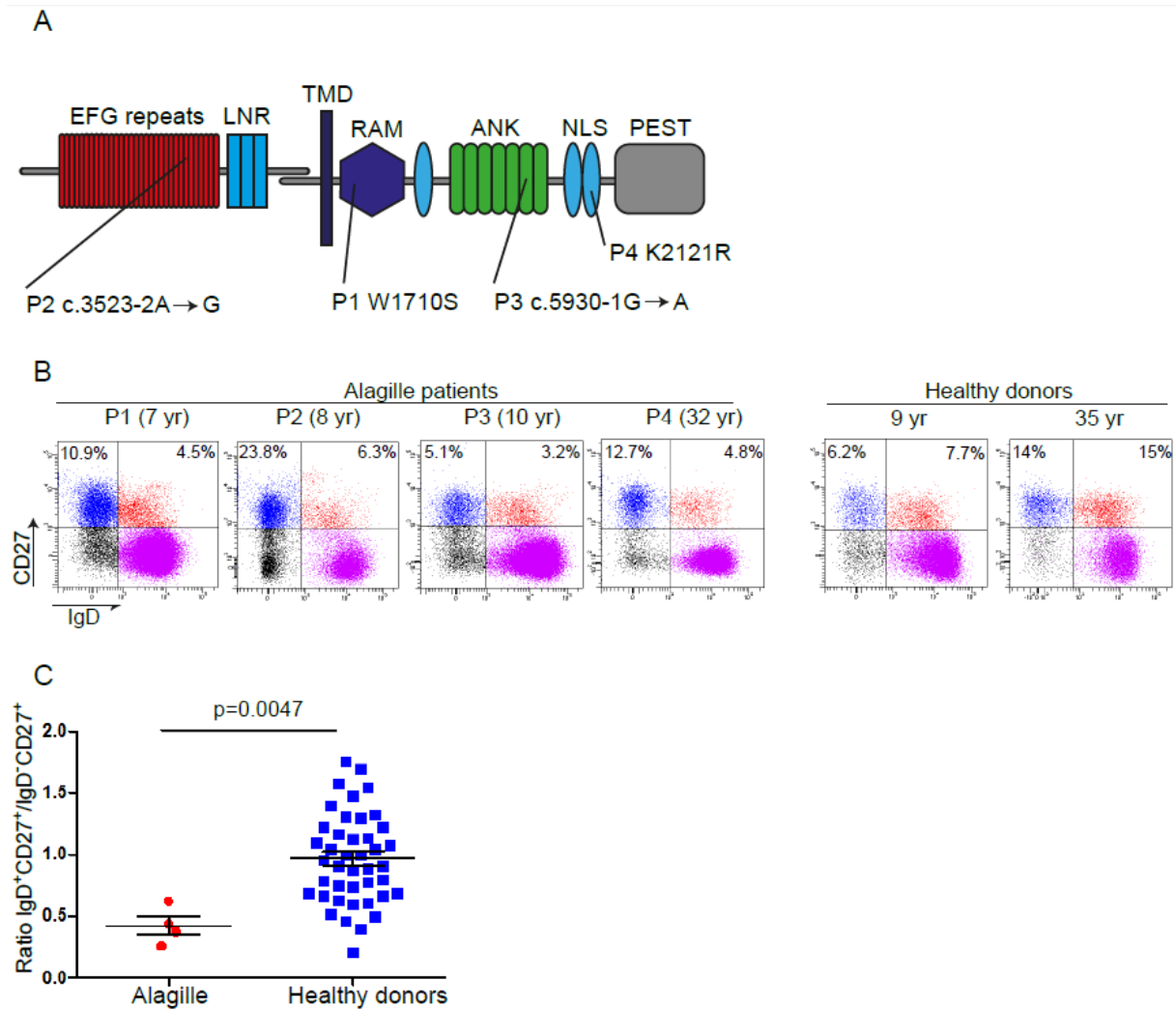


Figure 7. NOTCH2 haploinsufficiency results in a reduced proportion of circulating MZB cells.

A) Scheme of the NOTCH2 protein with its different domains. The extracellular domain of NOTCH2 contains 36 epidermal growth factor (EGF) repeats involved in ligand binding and three Lin/Notch repeats (LNR). The intracellular portion of the protein includes seven ankyrin repeats (ANK) required for binding and activating the RBPJ transcription factor, flanked by nuclear localization signals (NLS). Other domains include: a transmembrane domain (TMD), an RBP-J associated module (RAM), a proline/glutamic acid/serine/threonine rich domain (PEST) involved in proteosomal degradation. The mutations identified in the 4 Alagille patients studied are depicted: two affect splicing sites in introns (P2 and P3) and two are a missense mutation in RAM domain (P1) or NLS (P4).

B) Blood B cells from 4 patients heterozygous for NOTCH2 mutations and age-matched controls (healthy donors, HD) were analyzed by flow cytometry after IgD, CD27, and CD19 staining. The proportion of IgD⁺CD27⁺ (MZB) and switched IgD⁻CD27⁺ (as a percentage of total B cells) for each of them is indicated on dot plots.

C) Ratios of IgD⁺CD27⁺ vs. switched cells were plotted for each patient and for a control group (with ages varying from 6 to 40 yr), with mean values \pm SEM indicated by bars.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Both for the *in vitro* differentiation assays and microarray analysis shown in Figures 1, 2 and 3, CD27⁻ cells were first enriched from total spleen MNC by negative selection with the EASYSEP Human naive B cell Enrichment kit (Stemcell Technologies) which removes unwanted cells with mouse IgG1 antibodies recognizing CD27 and non-B cell markers. Thus, to avoid any possible residual contamination with CD27⁺ B cells, after the pulse /chase step with MTG, the enriched CD27⁻ cells were further incubated with a biotin rat anti-mouse IgG1. After a wash, cells were first incubated with saturating concentrations of mouse IgG1 (100 μ g/ml) for 15 min on ice, before adding a combination of anti-CD24, -CD38, -IgG, -IgA, -IgE, -CD27, -CD20, -CDR45RB (MEM55 clone) antibodies for an additional 15-min incubation time. Following a final wash, cells were incubated with a streptavidin conjugate, allowing to further exclude the remaining rare CD27⁺ cells from the sorting gates. Both for the differentiation assay and microarray analysis, four distinct CD20⁺IgG⁻IgA⁻IgE⁻CD27⁻ fractions were sorted based on their MTG and MEM55 expression: transitional (MTG⁺MEM55⁻ cells), naive (MTG⁻MEM55⁻) cells, MTG⁻MEM55⁺ (also designed as “MZP”

in Figure 3) and MTG⁺MEM55⁺ cells. CD24/CD38 expression of these different subsets along with sorting gates are indicated in Figure 1.

The cells designed as MZB (figure 2A, 3A-C) and IgG⁺CD27⁺ (Figure 3C) were isolated as follows. Total splenic MNC pulse/chased with MTG, labeled with a combination of anti-CD3, -CD14, -CD16, -CD24, -CD38, -IgD, -IgG, -CD27, -CD20, antibodies, were sorted with gates set on CD3⁻CD14⁻CD16⁻CD20⁺CD27⁺CD24⁺CD38^{low} cells that were further divided into IgG⁻IgD⁺ (MZB) or IgG⁺IgD⁻ (IgG⁺CD27⁺) fractions. The p27 fraction (see Figure 3) corresponds to MZP cells having acquired the expression of CD27 after a 2-day culture on OP9-hDLL1 cells and were sorted with gates set on IgD⁺CD20⁺CD27⁺ cells, OP9-GFP⁺ DLL1⁺ cells being excluded. Cells depicted as MZB and IgG⁺CD27⁺ in the transcriptomic analysis shown in Figure 4A were isolated as follows from splenic samples of 4 children (from 4 to 6 yr of age), 3 adults and 3 (or 4) seniors of more than 75 yr. B cells enriched from splenic MNC with the Dynabeads Untouched Human B Cells kit (Life technologies) were labeled either with anti-IgD, -IgM, -CD24, -CD38, -CD19 and -CD27 antibodies, or with anti-IgG, -IgA, -CD38, -CD27 and -CD19 antibodies. MZB cells (CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD27⁺CD24⁺CD38^{low}) and CD27⁺IgG⁺ (CD19⁺IgG⁺IgA⁻CD24⁺CD38^{low}) were then sorted. All the fractions that were analyzed on microarrays were purified by two successive rounds of cell sorting, to achieve >99% purity.

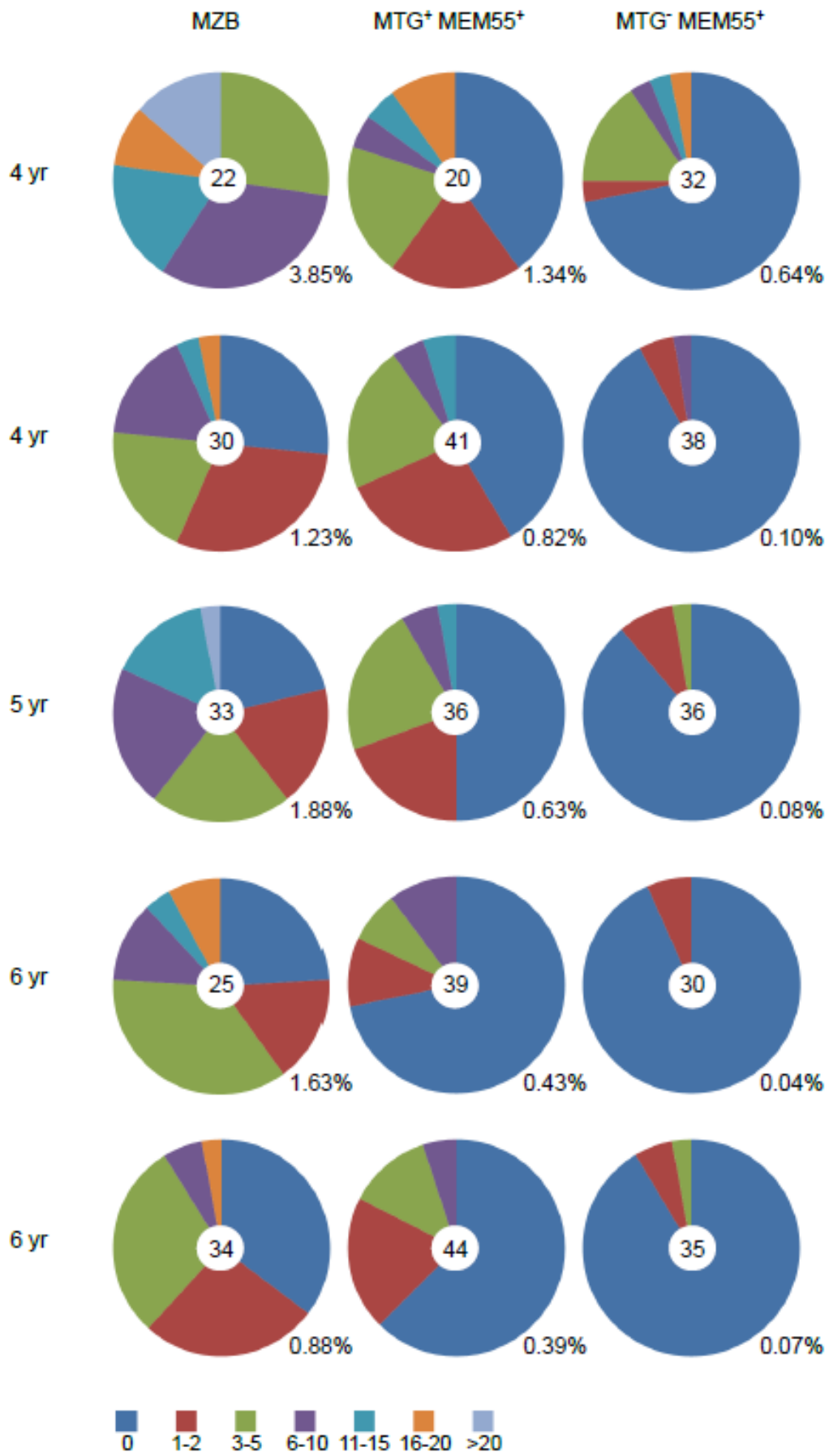
MZB, naive and IgG⁺CD27⁺ cells in Figure 4B (qPCR) were isolated as follows. Total splenic MNC were labeled with a combination of anti- CD3, -CD14, -CD16, -CD24, -CD38, -IgD, -IgG, -CD27, and -CD19 antibodies. After gating on dump⁻CD19⁺ cells, IgD⁺CD27⁺CD24⁺CD38^{low}IgG⁻ (MZB), IgD⁺CD27⁻CD24⁺CD38^{low/+}IgG⁻ (naive) and IgG⁺CD27⁺CD24⁺CD38^{low}IgD⁻ (IgG⁺CD27⁺) were purified by two consecutive sorts.

For the analysis of somatic mutations (Figure 2B), total splenic MNC cells were pulse/chased with MTG, labeled with a combination of anti-CD3, -CD14, -CD16, -IgD, -CD27, -CD19, and MEM55 antibodies and after gating on dump⁻CD19⁺ cells, cells designed as MZB (IgD⁺CD27⁺), MTG⁺MEM55⁺ (IgD⁺CD27⁻MTG⁺MEM55⁺) and MTG⁻MEM55⁺(IgD⁺CD27⁻MTG⁻MEM55⁺) were sorted.

SUPPLEMENTAL DATAS

Figure S1. Mutation distribution in Ig genes of children splenic MZB, MTG⁺MEM55⁺ and MTG⁻MEM55⁺ subsets for the 5 analyzed samples.

The pie charts depict the relative proportions of sequences with a given mutation range (see the color legend). The total number of analyzed sequences is indicated in the middle of each chart. The mutation frequencies, expressed as mutations per 100 bp per total sequences are indicated below each pie chart. Children age (yr) are indicated.



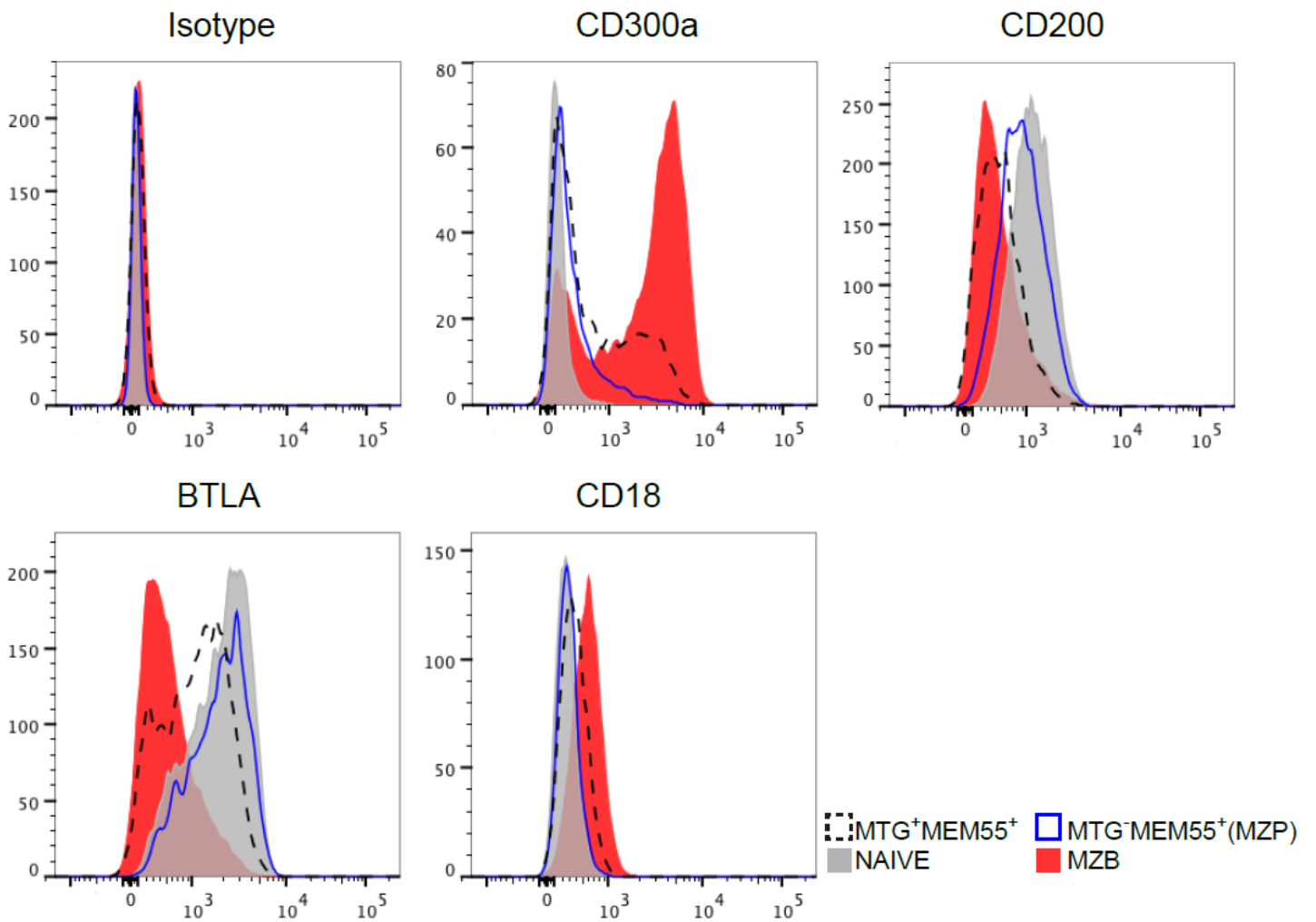


Figure S2. Surface phenotype of splenic naive, MZB, MTG⁺MEM55⁺ and MTG⁻MEM55⁺ subsets.

After gating on Dump⁻ CD19⁺ cells, and based on their respective expression of MTG, MEM55, CD27 and IgD, naive (grey), MZB (red), MTG⁻MEM55⁺ (blue) and MTG⁺MEM55⁺ (black, dotted line) cells from children spleen samples were analyzed for expression of several surface markers by flow cytometry. Data are representative of 3 different samples.

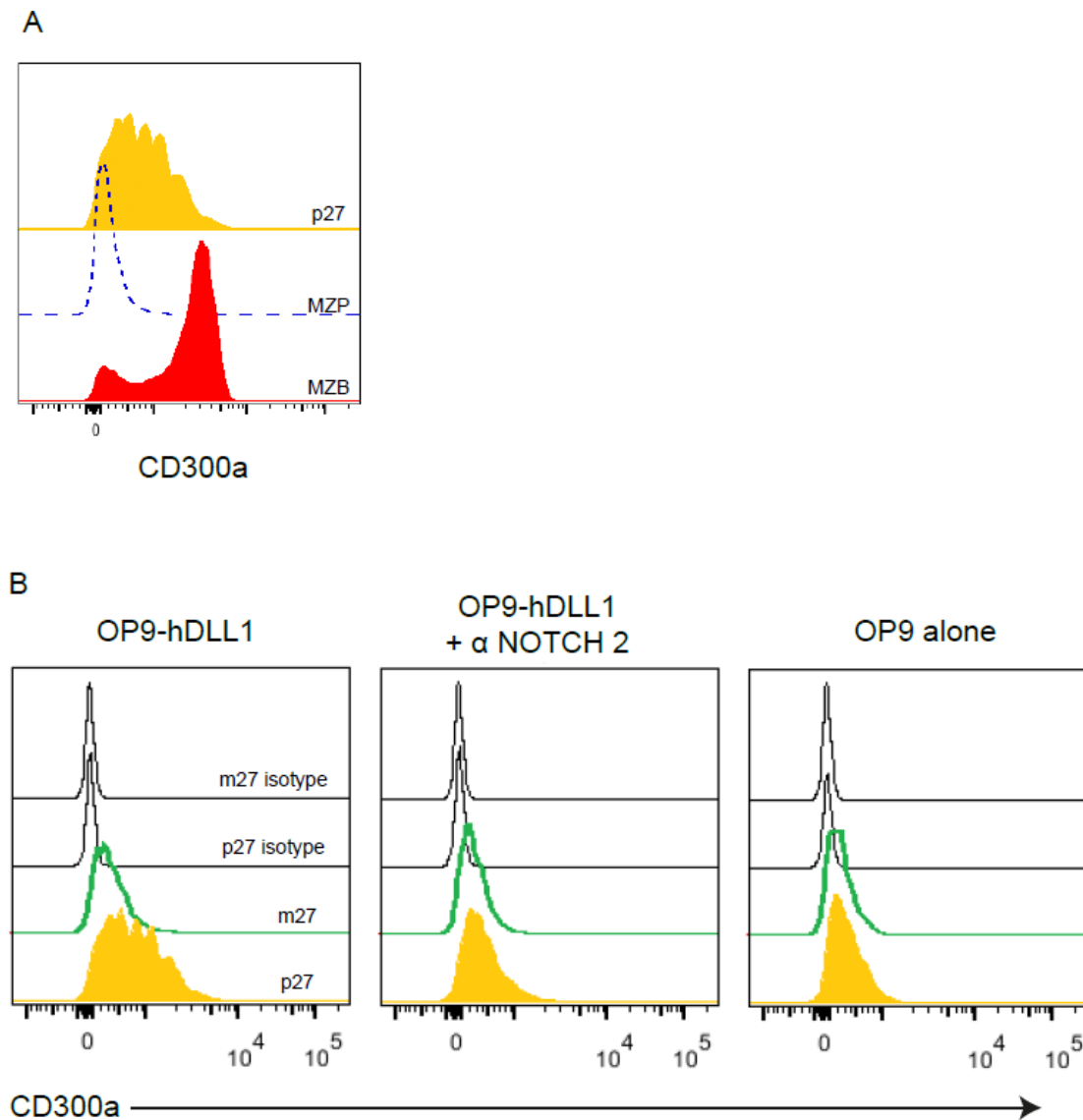


Figure S3. CD300a up-regulation after in vitro culture of MZP on OP9-DLL1 cells.

MZP were cocultured either with OP9-hDLL1 or OP9 cells alone. After 3 days, cells were recovered, stained for CD20, IgD, CD27 and CD300a and analyzed by flow cytometry, OP9 GFP⁺ cells being excluded from the analysis gate.

A) Expression of CD300a on p27 (IgD⁺CD20⁺ having up-regulated the CD27 marker) and on *ex vivo* MZP and MZB cells.

B) Expression of CD300a on p27 and m27 (IgD⁺CD20⁺ cells remaining CD27-negative) fractions, that were recovered after a 3 day culture of MZP cells on OP9-hDLL1 cells, in the

presence of a blocking anti-NOTCH2 mAb. Respective isotype controls are shown as specified on the histograms.

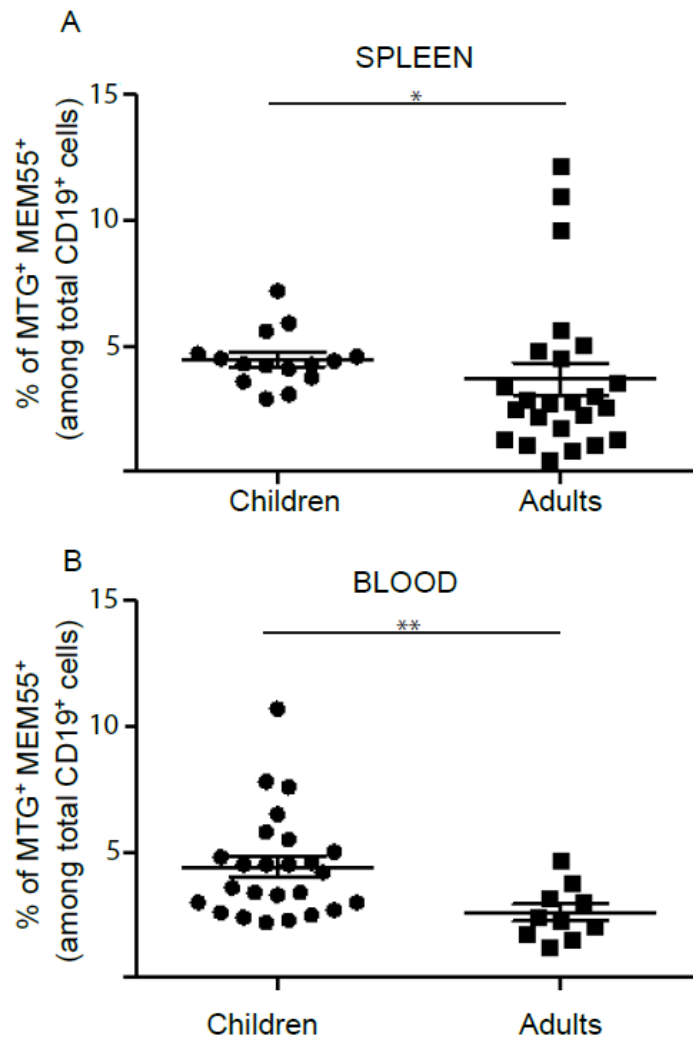


Figure S4. Relative frequencies of MTG⁺MEM55⁺ cells in spleen (A) or blood (B) from children and adults.

Frequencies of Dump⁻CD19⁺IgD⁺CD27⁻ MTG⁺MEM55⁺ cells (expressed as percentages of total CD19⁺ B cells) are represented for the indicated age categories (spleen: 15 children 4 to 9 yr and 24 adults 10 to 78 yr) (blood: 25 children 1 to 9 yr and 10 adults), with mean values \pm SEM.

B cell subset	Age of donors	% of CD27 ⁺ cells				Fold induction			
		OP9-hDLL1	OP9	OP9-hDLL1 + α NOTCH1	OP9-hDLL1 + α NOTCH2	OP9-hDLL1 vs. OP9	OP9-hDLL1 + α NOTCH1 vs. OP9	OP9-hDLL1 + α NOTCH2 vs. OP9	
Transitional		15.9	9.8	ND	ND	1.62	ND	ND	
Naive	5 yr	9.1	4.7	ND	ND	1.94	ND	ND	
MTG-MEM55 ⁺		33.4	19.1	29.7	23.2	1.75	1.55	1.21	
MTG ⁺ MEM55 ⁺		52.4	41	ND	39.5	1.28	ND	0.96	
Transitional		3.2	3.3	ND	ND	0.97	ND	ND	
Naive	5 yr	1.5	0.8	ND	ND	1.88	ND	ND	
MTG-MEM55 ⁺		12.1	7.8	13.2	8	1.55	1.69	1.03	
MTG ⁺ MEM55 ⁺		36.8	23.7	ND	35.4	1.55	ND	1.49	
Transitional		5.1	2.5	ND	ND	2.04	ND	ND	
Naive	4 yr	2.7	1.9	ND	ND	1.42	ND	ND	
MTG-MEM55 ⁺		21.9	12.6	20.7	14.2	1.74	1.64	1.13	
MTG ⁺ MEM55 ⁺		45.1	33.7	ND	35.4	1.34	ND	1.05	
Transitional		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Naive	5 yr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
MTG-MEM55 ⁺		17	9.6	ND	ND	1.77	ND	ND	
MTG ⁺ MEM55 ⁺		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Transitional		13.6	5.2	ND	ND	2.62	ND	ND	
Naive	8 yr	7.2	3.6	ND	ND	2.00	ND	ND	
MTG-MEM55 ⁺		24	9.4	ND	ND	2.55	ND	ND	
MTG ⁺ MEM55 ⁺		38.3	20.1	ND	ND	1.91	ND	ND	
Transitional		9.45 ± 6.2	5.20 ± 3.2	ND	ND	1.81 ± 0.7	ND	ND	
Naive	All	5.12 ± 3.6	2.75 ± 1.7	ND	ND	1.80 ± 0.3	ND	ND	
MTG-MEM55 ⁺	(Mean ± SD)	21.68 ± 8	11.7 ± 4.5	21.2 ± 8.2	15.1 ± 7.6	1.87 ± 0.4	1.6 ± 0.1	1.12 ± 0.1	
MTG ⁺ MEM55 ⁺		43.15 ± 7.1	29.62 ± 9.5	ND	36.77 ± 2.4	1.52 ± 0.3	ND	1.17 ± 0.3	

Table S1: Percentages of CD20⁺IgD⁺ cells becoming CD27⁺ after 3 days in different coculture conditions.

Table S2 : Antibodies and reagents

Technique	Type of Abs/ reagents	Antigen/CD	Conjugate	clone	Suppliers	
Flow cytometry	Primary Abs	IgA1/IgA2	biotin	G20-359	BD	
		IgE	biotin	G7-26	BD	
		IgG	PE-Cy7	G18-145	BD	
		IgG	FTTC	-	DAKO	
		CD27	Pe-Cy7	M-T271	BD	
		CD24	PE	L128	BD	
		CD38	PerCP-Cy5.5	HIT2	Biologend	
		CD38	PE	HIT2	BD	
		CD45RB	Alexa647	MEM55	Clinisciences	
		CD45RB	PE	MEM55	Biologend	
		CD20	APC-H7	L27	BD	
		CD27	Brillant Violet	M-T271	BD	
		CD27	APC	M-T271	BD	
		DLL1	PE	MHD1-314	Biologend	
		IgD	PE-Cy7	IA6-2	Biologend	
		IgD	PerCP-Cy5.5	IA6-2	Biologend	
		IgD	PE	-	Southern Biotech	
		CD19	Brillant Violet 421	HIB19	Biologend	
		CD3	APC-H7	5K7	BD	
		CD14	APC-H7	MΦP9	BD	
		CD16	APC-H7	IV N409	BD	
		CD18	PE	CLB-LFA-1/1	ebioscience	
		CD200	PE	OX-104	Biologend	
		CD300	PE	MEM-260	Abcam	
		BTLA	PE	MIH26	Biologend	
		IgM	PE	MHM-88	Biologend	
		CD1c	PE	L161	Santa Cruz Biotech.	
	CD21	PE	B-ly4	BD		
		Secondary Abs	Rat anti-mouse IgG1	biotin	A85-1	BD
		Isotype controls	mouse IgG1	-	MOPC-21	biologend
			mouse IgG1	PE	MOPC-21	BD
		Streptavidin		Pacific Blue	-	Invitrogen
Confocal microscopy	Primary Abs	Rabbit anti-human DLL1	-	ab10554	ABCAM	
		mouse IgG1 anti-human CD27	-	M-T271	BD	
		mouse IgG1 anti-human CD27	-	-	Novacastra	
		Goat anti-human IgD	biotin	-	Southern biotech	
	Secondary Abs	Goat F(ab') ₂ anti-Rabbit	Alexa 488	-	Invitrogen	
		Goat anti-mouse IgG1	Cy5	-	Southern biotech	
		Streptavidin		Pacific Blue	-	Invitrogen

DISCUSSION

Nous souhaitons dans cette partie étendre la discussion à certains points qui n'ont pas été abordés dans la discussion de l'article ou qui n'ont pas été développés. En outre, nous ferons référence à certaines données non publiées qui pourront être le cas échéant présentées en annexe

Etat de l'induction *in vitro* : NOTCH2 nécessaire mais pas suffisant.

Tableau 3 : Nombre de sondes dont l'expression est au moins 2 fois différente entre différentes populations ($p < 0.05$).

	NAIVE	MZP	MTG ⁺ MEM55 ⁺	MZB	m27	p27
NAIVE	-	249	750	1855	5511	5632
MZP	-	-	327	990	5902	5721
MTG ⁺ MEM55 ⁺	-	-	-	462	5000	4495
MZB	-	-	-	-	6313	5557
m27	-	-	-	-	-	691
p27	-	-	-	-	-	-

Le tableau ci-dessus résume le nombre de sondes du micro-array dont la différence d'expression est au moins de deux fois entre deux populations. On peut constater qu'un nombre « raisonnable » de sondes, allant de quelques centaines à un peu moins de 2000, discriminent les populations *ex-vivo* naïves, MZP, MTG⁺ MEM55⁺ et MZB entre elles. De la

même manière, les deux populations qui ont passé 3 jours en culture, p27 et m27 ne sont séparées que par 691 sondes. A l'inverse, les nombres paraissent très élevés lorsqu'on compare les populations *ex-vivo* aux populations cultivées *in-vitro*, jusqu'à 6313 sondes séparent les MZB des cellules n'ayant pas acquis le CD27 en culture (m27). La culture *in-vitro* semble donc induire un biais dans l'expression des gènes du micro-array. Le stress induit par les conditions de culture perturbe l'expression des gènes en activant ou réprimant des voies biologiques entières. Pour tenter de contourner cette difficulté, nous avons analysé les différentes populations en prenant en compte les 1855 sondes séparant les naïves des MZB. Nous avons vu avec l'analyse par PCA que le profil d'expression des gènes des MZP est proche de celui des naïves alors que celui des MTG⁺ MEM55⁺ est proche de celui des MZB (figure 2A des résultats). De plus le « clustering » et la « heat map » de la figure 3A des résultats nous montrent que les MZP cultivées 3 jours sur les OP-9 DLL1 et ayant acquis le CD27, appelées alors p27, acquièrent un profil d'expression qui ressemble plus à celui des MZB qu'à celui des autres populations. Ce profil d'expression génique que nous qualifions de « MZB-like » présente cependant des grandes différences avec le profil des MZB (voir les heat-map de la figure 3 des résultats).

Chez la souris nous savons qu'un signal fourni par le BCR et/ou BAFF agit dans la différenciation des MZB sans savoir vraiment comment s'intègrent ces différents signaux entre eux [9, 21]. Ici nous n'avons interrogé que le signal fourni par la voie NOTCH. La différenciation incomplète des p27 sur les 1855 sondes considérées peut refléter l'absence de signaux annexes requis pour la différenciation des MZB humaines. D'ailleurs, même si aucune donnée formelle n'a jamais corrélié la différenciation des MZB chez l'homme à un signal du BCR et/ou BAFF, il a récemment été montré que la plupart des gènes mutés dans les lymphomes splénique de la zone marginale sont impliqués dans la voie NOTCH2 mais aussi dans la voie de signalisation du BCR et de NF- κ B [128].

La signature *NOTCH2* dans les MZP

369 gènes discriminent les MZP des cellules naïves avec une différence d'expression d'au moins 1,5 fois. Les MZP sont donc très proches des naïves. En comparant la liste de gènes différenciant ces deux populations avec la liste de gènes discriminant une lignée cellulaire B lymphoblastoïde humaine exprimant ou non un récepteur *NOTCH2* intracellulaire constitutivement activé, nous avons mis en évidence une importante signature *NOTCH* (Figure 2C des résultats). 44 gènes communs sont surexprimés dans les MZP et induits par *NOTCH2* et 53 sont réprimés dans les MZP et réprimés par *NOTCH2* (voir annexe tableau 5). En tout, cette signature représente 26% des gènes différenciant les MZP des naïves. Bien qu'importante, cette signature *NOTCH* est sûrement sous-évaluée. Le tableau 4 ci-dessous et le tableau 6 de l'annexe indiquent qu'un certain nombre de gènes surexprimés dans les MZP sont réprimés par *NOTCH2* dans la cellule B lymphoblastoïde et vice-versa. Le nombre élevé de gènes discordants ne peut absolument pas être dû au hasard et s'explique par la régulation fine de la voie *NOTCH*. En fonction du ligand, de l'intensité du signal, du type cellulaire, et de l'état physiologique de la cellule, un même gène cible de *NOTCH* peut être activé ou réprimé. Or ici, nous comparons deux signaux *NOTCH2* qui diffèrent par certains aspects : absence de ligand et intensité du signal extrêmement fort dans le cas du *NOTCH2* intracellulaire et état physiologique des cellules différent. En prenant en compte l'ensemble des gènes concordants et discordants, la signature *NOTCH* atteint 39%. *FUT8* est un de ces gènes discordant et représente un très bon exemple. *FUT8* est une alpha 1,6 fucosyltransferase exprimé dans les MZP comparées au naïves, son expression continue d'augmenter fortement dans les MZB comparées au MZP et enfin elle est induite par *NOTCH2* dans les p27. Cependant *FUT8* est réprimée par *NOTCH2* dans la lignée lymphoblastoïde B. La O-fucosylation post-traductionnelle de *NOTCH2* et des récepteurs *NOTCH* en général est essentielle à la bonne interaction du récepteur avec son ligand [129]. La O-

fucosyltransferase POFUT1 a été identifiée comme initiateur de la fucosylation de NOTCH1 dans les lymphocytes T [130, 131]. D'après nos données, POFUT1 n'est pas ou très peu exprimée dans les lymphocytes B et n'a jamais été identifiée comme jouant un rôle dans ces cellules. FUT 8 apparait donc comme un candidat idéal à l'initialisation de la O-fucosylation de NOTCH2 dans les lymphocytes B.

Dans la signature NOTCH2 identifiée dans les MZP, aucun des grands gènes cibles de NOTCH, tel que les DELTEX ou HES, n'est activé. De plus, si l'analyse est effectuée avec les gènes dont l'expression est au moins deux fois différente entre les MZP et les naïves (au lieu de 1.5 fois), la signature NOTCH tombe à 19% en ne prenant que les gènes concordant et 25% avec les gènes discordants. Bien que quantitativement importante, la signature NOTCH2 identifiée dans les MZP correspond donc à une activation NOTCH relativement précoce.

Tableau 4 : Nombre de gènes de la signature NOTCH2 dans les MZP.

FOLD 1.5	Induit dans les MZP (215 gènes)	Réprimé dans les MZP (154 gènes)
Induit par NOTCH 2	44	16
Réprimé par NOTCH2	30	53

En noir les gènes concordants et en rouge les gènes discordants

SOX7 gène maître de la différenciation des MZB.

Le transcriptome des MZB et des mémoires IgG (ou IgA) de la rate effectué au laboratoire nous apprend que ces deux populations ont des profils d'expression relativement proches. Moins de 500 gènes avec une différence d'au moins deux fois discriminent les MZB des mémoires ! Ce résultat a priori surprenant et non attendu peu finalement être expliqué de la sorte : les MZB et les mémoires vivent dans un environnement similaire, elles sont suggérées comme étant des populations à longue vie et surtout elles ont finalement la même fonction, celle de répondre rapidement à un antigène.

Encore plus surprenant a été la découverte que parmi les gènes différenciant ces deux populations, aucune signalisation NOTCH n'est vraiment détectée. Parmi les grands gènes cibles de NOTCH, les *HES*, *HEYL* ou *DELTEX*, seul *HES4* est plus exprimé par les MZB (2,7 fois). En toute logique, il faut donc conclure que les cellules B mémoires ont du recevoir comme les MZB un signal NOTCH. Un travail suggère que ce signal NOTCH pourrait avoir été fourni dans le centre germinatif par les cellules folliculaires dendritiques. Celles-ci expriment le ligand JAGGED1 et fournissent un signal de survie (et de différenciation ?) aux cellules B du centre germinatif [132].

Les facteurs de transcription de la famille *SOX* (Sex determining region Y) sont impliqués dans une multitude de processus développementaux, de différenciations cellulaires et d'homéostasies. Cette famille de protéines est conservée des métazoaires jusqu'à l'homme. Il existe 20 protéines *SOX* regroupées sur la base de leurs homologues de séquence en 8 groupes A-H (le groupe B étant subdivisé en B1 et B2). Les protéines *SOX* possèdent toutes un domaine conservé de liaison à l'ADN appelé HGM (High Mobility Group). D'autres familles de protéines possèdent ce domaine HGM, notamment les protéines de la famille TCF. Parmi toutes les familles de protéines contenant des domaines HGM, les protéines *SOX* et TCF sont les seules à reconnaître des séquences spécifiques de liaison à l'ADN. Cependant, les protéines *SOX* reconnaissent avec une très faible affinité et peu de spécificité une séquence de liaison très dégénérée 5_-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3_ [133]. Ainsi la spécificité d'action des protéines *SOX* provient de leur liaison avec des protéines partenaires, dont les plus importantes sont les TCF, les LEF (Lymphoid Enhancer Binding Factor) (les protéines TCF et LEF formant elles aussi très souvent des complexes TCF/LEF) et les OCT (Octamer Transcription Factor) [134]. Le meilleur exemple d'un tel partenariat est l'interaction de *SOX2* avec OCT3/4 dans les cellules souches induites.

SOX7 appartient avec *SOX17* et *SOX18* au groupe F. *SOX7* est l'une des protéines SOX dont les effets sont les moins bien connus. Elle est impliquée comme beaucoup de protéines SOX dans la voie Wingless (Wnt) de par son interaction avec la β -caténine (β -cat) [135]. Les protéines TCF/LEF sont elles des cibles de la β -caténine et de la voie Wnt. Nous voyons donc une forte connexion entre ces différents effecteurs SOX-TCF/LEF- β -cat/Wnt. Nous avons découvert que *SOX7* est le principal facteur de transcription identifiant les MZB comparées aux cellules B mémoires. Il commence à être exprimé dans les MZP et atteint un niveau d'expression maximale dans les MZB. De plus *SOX7* est induit dans les p27 à un niveau d'expression comparable à celui des MZB. Nous avons donc proposé que *SOX7* puissent être le gène maître de la différenciation des MZB.

Cette proposition est contrebalancée par le fait qu'aucune voie ou processus biologique ne semble émerger lorsque l'on interroge la liste de gènes différenciant les MZB des cellules B mémoires. Cependant, l'analyse bioinformatique de ces gènes effectuée avec l'outil en ligne GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) révèle qu'un nombre statistiquement surreprésenté de ces gènes sont des cibles directes de TCF3, LEF1 et OCT1 pour les gènes différenciant les MZB des mémoires de la rate, et TCF3, LEF1 pour le sang. Or, nous venons de le voir, ces protéines font partie des principaux cofacteurs des protéines SOX. D'après nos données, *LEF1* ne semble exprimée que dans les cellules transitionnelles, mais *TCF3* et *OCT1* sont exprimées à des niveaux comparables dans toutes les populations B. Nous pourrions ainsi imaginer ce schéma de différenciation : NOTCH2 induit *SOX7* dans les MZP, *SOX7* via ses cofacteurs TCF3 et OCT1 dans la rate, active et réprime un certain nombre de gènes permettant la différenciation des MZB. Les cofacteurs étant aussi exprimés dans les autres populations B, ils activent et répriment d'autres gènes de par l'absence de *SOX7*.

Les mutations de la voie NOTCH2

Les souris hétérozygotes pour *Notch2* ont un taux de MZP et de MZB fortement réduit [48]. Nous avons analysé le taux des cellules IgD⁺ CD27⁺ du sang de trois donneurs hétérozygotes pour *NOTCH2* et atteints du syndrome d'Alagille. Nous montrons qu'en moyenne le taux de cellules IgD⁺ CD27⁺ (MZB) est réduit de 2 à 3 fois comparé aux cellules B mémoires IgD⁻ CD27⁺ (Figure 7 des résultats).

L'analyse des gènes mutés dans les lymphomes de la zone marginale a récemment révélé qu'un type de mutation du gène *NOTCH2* est impliqué dans 25% de ces lymphomes. Ces mutations touchent un domaine particulier de la protéine NOTCH2, le domaine PEST, impliqué dans la régulation de la dégradation du récepteur intracellulaire après son activation. Le récepteur n'étant plus dégradé, le signal NOTCH2 est amplifié [128, 136]. Ces mutations n'étant retrouvées dans aucun autre type de lymphome, ces résultats impliquent fortement NOTCH2 comme étant une voie biologique spécifiquement activée dans les MZB.

Le syndrome d'Hadju-Cheney est causé par la mutation somatique du domaine PEST du gène *NOTCH2* et provoque notamment des atteintes osseuses. Curieusement aucune prédisposition au lymphome de la zone marginale n'a été reporté chez ces patients [137, 138]. Nous avons analysé les populations B du sang de trois patients atteints de ce syndrome avec l'hypothèse que la population MZB puisse être anormalement surdéveloppée (voir annexe Figure 13). Bien que ces trois patients présentent des taux variable de MZB, nous ne notons aucune prédominance de la population MZB comparée aux autres, notamment aux cellules B mémoires. Ce résultat qui pourrait paraître à première vue contradictoire peut cependant s'expliquer de plusieurs façons. Comme pour toutes les populations hématopoïétiques, leur développement et leur maintien dépendent essentiellement des signaux de survie fournis par l'environnement. Une fois la population MZB pleinement développée, les signaux de survie fournis pourraient devenir limitant et ainsi empêcher le développement illimité de la

population MZB. La nature de la mutation du syndrome Hadju-Cheney est aussi à prendre en compte. Cette mutation permet au récepteur NOTCH2 de fournir un signal plus long après activation. Donc la mutation n'aboutit pas à un récepteur constitutivement actif qui pourrait entraîner un engagement illimité de cellules vers la différenciation en MZB mais bien en un signal dérégulé après l'engagement du récepteur.

Les IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ une population mixte ?

Ce travail, en proposant une voie de développement des MZB dépendante de *NOTCH2*, s'oppose à certaines données de la littérature et notamment un travail de Seifert et Küppers de 2009, qui suggèrent que la population IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ puisse être en grande partie constituée de cellules provenant du centre germinatif [123]. Ce modèle verrait des cellules sortir du centre germinatif avant d'avoir subi la commutation isotypique de classe mais après avoir subi l'hypermutation somatique et avoir acquis le CD27. Un des arguments les plus forts en faveur de ce modèle est qu'il est possible dans certaines conditions de trouver des relations clonales entre des cellules IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ et les mémoires IgG⁺ CD27⁺ [123]. Dans leur étude Seifert et Küppers cherchent à mettre en évidence des relations clonales entre les IgG⁺ CD27⁺ et les IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺ du sang chez l'adulte. Leur stratégie repose sur le « design » de primers CDR3 spécifiques, générés à partir du pool de séquences CDR3 des cellules IgG⁺ CD27⁺, et permettant l'amplification de séquences à partir de l'ADNc de cellules IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺. Pour cela, ils sont partis de 1 à 1.5 millions de cellules B CD27⁺ (IgG ou IgM) qui ont du être triées à partir d'environ 100 à 200 millilitres de sang, soit environ 1/50ème du volume de sang total d'un individu. A partir de 146 primers CDR3 choisis au hasard parmi les séquences IgG⁺, ils identifient 14 relations clonales (≈10%) entre la fraction IgG⁺ CD27⁺ et IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺. Parmi ces 14 relations clonales, 6 montrent des cellules IgM faiblement mutées apparaissant avant les IgG⁺ dans la reconstruction des clones.

A l'inverse, d'autres clones semblent montrer des relations moins ordonnées. Ils concluent que leur résultats révèlent l'origine post centre germinatif chez l'adulte de la quasi-totalité de la population $IgD^+ IgM^+ CD27^+$.

Néanmoins nous pouvons arguer qu'une telle conclusion engendre l'hypothèse que la distribution des tailles de CDR3 du répertoire des $IgM^+ IgD^+ CD27^+$ de l'adulte devrait être aussi restreinte en spectratyping que celui des mémoires, or nos propres données montrent que ce n'est pas le cas et que le répertoire des MZB est beaucoup plus divers que celui des mémoires même chez l'adulte (données du laboratoire). De plus, si la conclusion de Seifert et Küppers est bonne, il serait tout aussi facile avec leur stratégie de trouver des relations clonales en partant de primers choisis à partir des $IgD^+ IgM^+ CD27^+$, cependant cette démonstration est toujours manquante à l'heure actuelle.

Les conclusions du travail de Seifert et Küppers ont récemment été remises en cause par des études de séquençage haut débit des répertoires des différentes populations B du sang [139]. Dans une première étude publiée par le laboratoire de D. Dunn-Walters, 1829 et 1741 séquences uniques, obtenues respectivement à partir de 22 000 cellules $IgG^+ CD27^+$ et 37 000 cellules $IgD^+ IgM^+ CD27^+$ de 3 donneurs ont été confrontées pour tenter de trouver des relations clonales entre les deux populations. A l'inverse des résultats obtenus par Seifert et Küppers, ce travail ne trouve aucune relation clonale entre les deux populations ! Il apparaît aussi que les deux populations présentent un très fort biais d'utilisation des gènes IGVH3 et IGVH1, le premier étant largement plus utilisé dans les MZB que les cellules B mémoires à l'inverse du deuxième. Les auteurs postulent que si l'une des populations dérivait de l'autre, leur répertoire ne devrait pas montrer de telles différences. Dans un second travail effectué par la même équipe, c'est cette fois-ci 7225 séquences uniques, provenant indifféremment des IgG ou IgA , $CD27^+$ ou $CD27^-$, du sang de 9 donneurs, qui ont été confrontées à 11473 séquences uniques provenant des $IgD^+ IgM^+ CD27^+$ de ces mêmes 9 donneurs [96]. Encore

une fois, aucune relation clonale n'a pu être détectée entre les mémoires IgG ou IgA qu'elles soient CD27⁺ ou CD27⁻ et les MZB. Ce résultat contraste avec l'identification de 32 relations clonales au sein du pool IgG/IgA. Fait intéressant, les relations clonales identifiées entre les cellules B mémoires ne semble pas dépendre de l'expression du CD27 puisque des cellules CD27⁺ ou CD27⁻ peuvent être à la base d'une expansion clonale et être reliées à des cellules dont l'expression du CD27 est différente. Enfin 3784 séquences uniques obtenues à partir des « IgM-only » CD27⁺ ou CD27⁻ et provenant des mêmes donneurs que pour les autres populations ont aussi été intégrées à cette analyse. Curieusement, certains clones sont reliés aux cellules mémoires IgG/IgA, CD27⁺ ou CD27⁻ et d'autres aux IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺ (MZB). Cette population mal connue pourrait donc être hétérogène et composée en partie de cellules mémoires IgM générées au cours des réponses T-dépendantes, comme cela est le cas chez la souris [140]. En plus de trouver des relations clonales entre différentes populations, l'étude révèle aussi un certain nombre d'expansions clonales identifiées à l'intérieur des différentes populations, dont les plus larges sont vues pour les cellules mémoires [139]. L'ensemble des données des deux travaux menés par l'équipe de D Dunn-Walters est résumé dans la figure 12 ci-dessous.

Les résultats obtenus par Seifert et Küppers et par l'équipe de Dunn-Walters apparaissent complètement contradictoires. Le choix de l'approche technique qui sera utilisée pour tenter de trouver des relations clonales entre les cellules B mémoires et les MZB semble être crucial. De nouveaux travaux et de nouvelles approches seront nécessaires à l'avenir pour tenter de trancher la question. Un travail est notamment en cours au laboratoire, basé sur la stratégie de séquençage haut débit utilisé par Dunn-Walters, pour explorer le répertoire des différentes populations B du sang et de la rate chez un même individu.

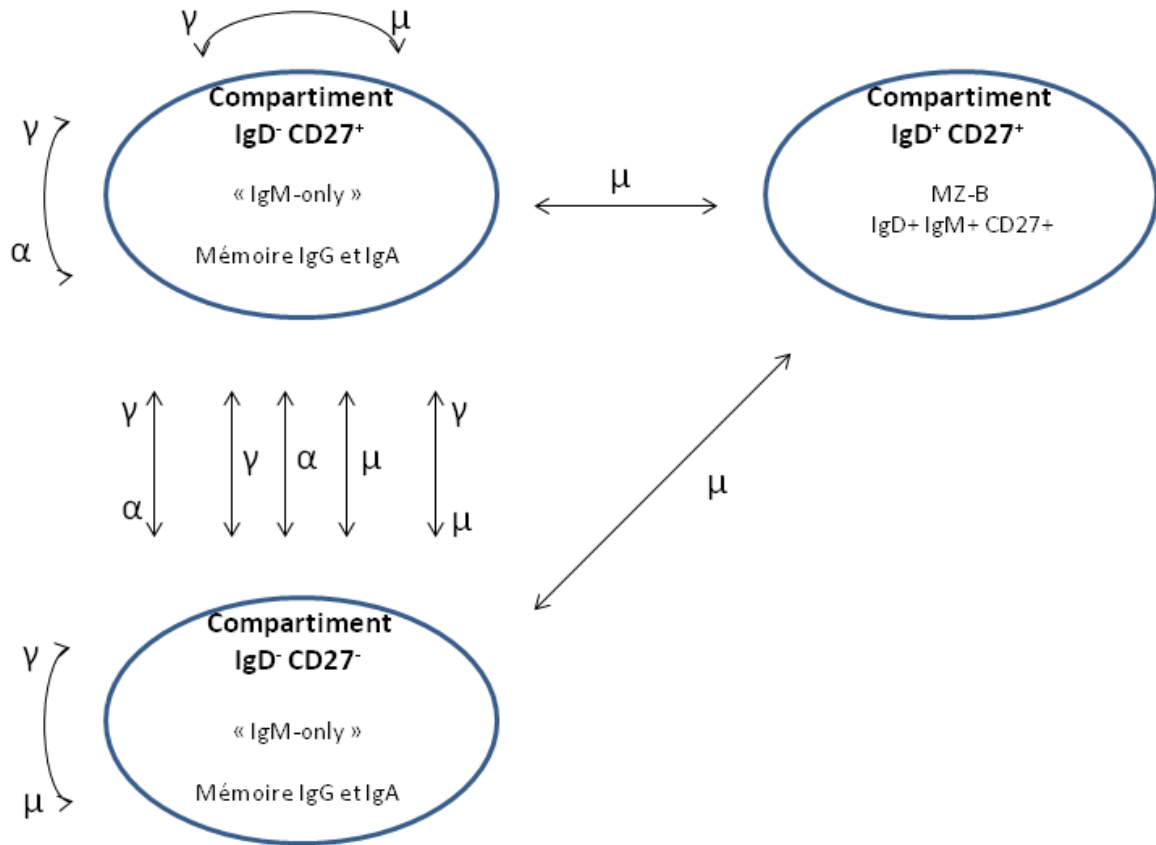


Figure 12 : Illustration résumant la nature des relations clonales trouvées par Dunn-Walters et coll. entre les différentes populations dans [139] et [96].

Rate, différenciation et hypermutation somatique

La localisation des MZP dans la rate d'enfants ainsi que la présence de cellules exprimant DLL1 dans la zone marginale (figure 6 des résultats), nous permet de penser que la rate humaine est le principal lieu de la différenciation des MZB. Chez la souris, une fraction des cellules T2 devient MZP dans la rate sous l'influence de divers signaux. Les MZP murines ne sont donc pas des cellules recirculantes et ainsi ne sont pas détectables dans le sang. Dans notre étude, nous identifions dans le sang des cellules phénotypiquement identiques au MZP de la rate et bien que leur potentiel de différenciation n'ait pas été testé, il est fort probable que les MZP humaines soient circulantes. Il est possible que contrairement au modèle murin, les MZP humaines soient une population qui prend naissance dans la

moelle osseuse et soit ainsi détectée dans le sang lorsqu'elle migre dans la rate. Dans tous les cas, la recirculation des MZP s'accorde avec la présence d'une population MZB chez les patients aspléniques où la différenciation doit prendre place dans d'autres organes. Cependant, puisque certaines données suggèrent qu'une partie mineure des IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ du sang puisse provenir d'une sortie précoce du centre germinatif, il est possible que la rate soit l'unique lieu de différenciation et que les IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ des patients aspléniques soient une expansion de cette fraction mineure qui ne serait pas spécialiste de la réponse aux antigènes T-indépendants. Cette hypothèse s'accorde avec la susceptibilité accrue de ces patients aux infections par les bactéries encapsulées précédemment expliquée comme la perte progressive au cours du temps des IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺.

Dans notre système de différenciation *in vitro*, l'expression de l'AID n'est pas détectable en PCR quantitative, ni dans les MZP, ni dans les p27. De la même manière nous n'avons jamais détecté l'expression ou la présence de l'AID dans les MZB de la rate (sauf dans cette étude [99]). Enfin, les patients atteints du syndrome d'Hadju-Cheney présentent des taux de mutations comparable aux contrôles (voir annexe tableau 7) et des enfants atteints d'asplénie congénitale ont, eux, souvent des taux légèrement supérieurs à des contrôles du même âge [105]. L'ensemble de ces données suggère fortement que le signal de différenciation NOTCH2 n'est pas impliqué dans le processus d'hypermutation somatique des MZB et que ce processus ne prend pas place dans la rate. Cependant une récente étude (I.Puga et coll.) est en contradiction avec nos données [141]. Ce travail montre que les neutrophiles de la rate possèdent des propriétés « aidant » les cellules B de la zone marginale en leur fournissant des signaux (BAFF, IL21 et APRIL) de survie et de sécrétion spontanée d'IgM. Plus spectaculairement, ces auteurs montrent que l'AID est exprimée : 1) à l'état basal, suffisamment fortement pour être détectée en qPCR et 2) que la protéine est détectable dans les noyaux des MZB de la rate. De plus, la coculture *in vitro* des neutrophiles spléniques et

des MZB induit chez ces derniers une très forte expression de l'AID en ARNm (des dizaines de fois supérieure à l'expression basale), ainsi que la commutation isotypique des cellules en IgG2 et IgA. En accord avec l'induction de l'expression de l'AID, la coculture *in vitro* pendant 12 jours des MZB avec les neutrophiles spléniques aboutit aussi à une augmentation du taux de mutations somatiques. Ces résultats suggèrent donc que la rate est le site où le processus d'hypermutation somatique a lieu.

L'étude détaillée de la méthode utilisée dans cet article peut expliquer la différence entre ces résultats et les nôtres. Comment expliquer la détection en messager de l'AID ? Dans leur étude, les MZB sont triées sur un critère CD19⁺ IgD⁺ CD27⁺ uniquement. Or, nous savons que l'utilisation des marqueurs CD24 et CD38 est cruciale pour trier des MZB sans contaminants. Dans la rate d'enfant, et dans une moindre proportion chez l'adulte, une certaine fraction des IgD⁺ CD27⁺ correspond vraisemblablement à des cellules précocement engagées dans le centre germinatif qui se distinguent des MZB en étant CD24⁻ CD38^{fort}. De plus, des plasmocytes IgD⁺ peuvent aussi être détectés. Ces contaminants peuvent atteindre plusieurs pourcents de la population IgD⁺ CD27⁺ (voir annexe Figure 14) et explique la détection de l'AID en PCR quantitative comme ce fut potentiellement le cas pour l'une de nos études [99]. Le tri des IgD⁺ CD27⁺ avec les marqueurs CD24 et CD38 (IgD⁺ CD27⁺ CD24⁺⁺ CD38⁺) aboutit systématiquement à la non détection en qPCR du messager de l'AID alors que le tri IgD⁺ CD27⁺ en permet la détection (voir annexe Figure 14). Bien que nous pensions que les MZB puissent commuter au cours d'une réponse immune, ce travail semble montrer que les neutrophiles induisent spontanément la commutation isotypique des MZB. Or, la présence des contaminants (cellules précoces du GC et plasmocytes) ainsi que les effets indéterminés des neutrophiles sur les cellules contaminantes peuvent expliquer les traces de commutation isotypique détectées. Il est donc fort probable que les MZB de cette étude soient contaminées par des cellules exprimant l'AID et soumises au processus d'hypermutation somatique. La

culture pendant 12 jours des cellules B est techniquement un exploit dans le sens où les cellules B de la zone marginale meurent en quelques jours dans des conditions de culture *in vitro* classique. La présence des neutrophiles et le temps extrêmement long de la culture peuvent induire des effets de survie différentiels sur les cellules. Bien qu'en général les cellules du GC soient des cellules dont la survie en culture est très courte, les cellules précoces du GC pourraient avoir une survie intrinsèquement différente ou pourraient survivre de manière atypique en culture en présence des signaux fournis par les neutrophiles. Ces cellules probablement mutées pourraient ainsi au bout de 12 jours faire apparaître un taux de mutation en culture supérieur aux contrôles. On voit donc que les contaminants remettent en cause les conclusions concernant l'hypermutation de cette étude. Il reste possible que les neutrophiles en culture induisent effectivement l'AID et les mutations sur des vraies MZB, mais la spécificité du processus n'est pas claire, puisque les cellules B mémoires et naïves n'ont pas été testées. De la même manière, l'absence d'expression de l'AID dans des MZB spléniques non contaminées est un argument qui suggère fortement qu'un autre organe que la rate soit le lieu où l'hypermutation somatique a lieu. Il est donc peu probable que ce processus identifié *in vitro* avec les neutrophiles spléniques soit celui impliqué *in vivo* dans la régulation de l'hypermutation somatique. Mentionnons cependant l'hypothèse proposée par le laboratoire, qui permet de ne pas tout à fait exclure la rate comme site anatomique de l'hypermutation des MZB. Selon cette hypothèse, l'ontogénèse des mutations somatiques des MZB peut être tellement lente qu'une expression extrêmement faible, et non détectable par les techniques classique, de l'AID au cours du temps puisse suffire pour faire apparaître une ou deux mutations de temps en temps dans une cellule, mutations qui s'accumuleront ainsi au cours du temps [142]. Quid du marquage de l'AID en protéine dans le noyau des cellules IgD⁺ de la rate observé par Puga et coll. ? Un tel marquage sur autant de cellules IgD⁺ localisées dans la ZM est extrêmement contre-intuitif, lorsque l'on considère l'absence d'expression du

gène de l'AID dans les MZB. K. Willenbrock du laboratoire de R. Küppers avait en 2005 tenté de localiser dans la rate humaine les cellules exprimant l'AID en histologie avec un autre clone anti-AID que celui utilisé par Puga et Coll.. Dans leur étude, quasiment aucun marquage n'est détectable sur les MZB alors que le centre germinatif est lui très marqué [143]. Nous avons nous même utilisé au laboratoire le clone de l'anticorps anti AID utilisé dans l'article de I Puga discuté ici [141] et nous avons vu que dans nos mains et avec nos conditions, nous détectons un marquage clair des noyaux d'une lignée de lymphocyte B (BL2) K-O pour l'AID.

Par analogie avec le modèle du mouton, le laboratoire a proposé que l'acquisition des mutations somatiques puissent avoir lieu dans les tissus associés à l'intestin [142]. Presque aucun neutrophile « aidant » les MZB n'est détecté dans les ganglions lymphatiques, les amygdales et dans les plaques de Peyer mais curieusement les auteurs affirment en détecter une fraction non négligeable dans les ganglions mésentériques [141]. En relation avec cette hypothèse, un article récent identifie dans l'intestin humain des cellules transitionnelles au stade T2, qui sont mutées [69]. Bien que nous ne sachions pas si ces T2 mutent dans l'intestin et si tel est le cas par quel mécanisme, ni même si ces T2 sont reliées au MZP et enfin si elles ne se différencient pas *in situ*, ce résultat laisse plus que jamais l'hypothèse proposée par le laboratoire ouverte.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La controverse à propos des MZB chez l'homme porte principalement sur l'origine de ces cellules et sur le processus par lequel elles acquièrent leurs mutations somatiques. L'identification d'une nouvelle population de lymphocytes B dans la rate humaine qui 1) est phénotypiquement proche des cellules transitionnelles ou naïves ; 2) dont le taux diminue chez l'adulte ; 3) se différencie en cellules « MZB-like » et 4) montre un programme génétique relativement proche de celui des MZB après une stimulation NOTCH 2, nous permet de postuler que nous avons identifié chez l'homme un précurseur des MZB. L'implication de la voie NOTCH 2 dans la différenciation des MZB suggérée par la différenciation *in vitro* du précurseur et par la diminution du taux des MZB comparé aux cellules B mémoires chez des patients hétérozygote pour *NOTCH2* renforce l'hypothèse d'une origine indépendante du centre germinatif de ces cellules, qui seraient produites au cours d'un programme de développement comme chez la souris.

Cependant ce travail n'apporte que peu d'éclairage sur l'autre grande question, le processus d'acquisition des mutations somatiques. Plusieurs hypothèses restent en suspens, notamment celle proposée par le laboratoire, qui verrait les MZB acquérant des mutations somatiques au cours d'un programme de développement, probablement dans les GALT, comme c'est le cas chez plusieurs autres espèces. Cette hypothèse vient d'être renforcée par un récent travail dans lequel des cellules mutées, au phénotype rappelant celui des transitionnelles, sont présentes dans l'intestin humain [69]. Différents travaux sont à envisager pour tenter d'explorer la validité de l'hypothèse GALT. L'accès à des échantillons humains d'intestins serait une formidable opportunité pour tenter d'identifier *in situ* la présence de MZB ou du précurseur. Plus particulièrement la présence de foyers de cellules B en prolifération serait à rechercher. De tels foyers pourraient montrer une diversification intraclonale des cellules pouvant être à l'origine des MZB mutées. Le laboratoire tente actuellement de mettre en place un modèle de souris humanisées pour questionner le rôle des tissus associés à l'intestin et de la flore

commensale sur le développement et l'acquisition des mutations somatiques des MZB. Ce modèle RAG2^{-/-} IL15Rα^{-/-} aurait la particularité de maintenir le développement des cellules LTi (Lymphoïde Tissus Inducer) nécessaires au développement des tissus lymphoïdes associées à l'intestin. Avec un tel modèle, si l'apparition de cellules IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺ mutées est démontrée, nous pourrions identifier le ou les sites anatomiques de la diversification (rate, intestin etc.) et évaluer le rôle de la flore commensale intestinale sur ce processus. L'utilisation de souris axéniques ou reconstituées avec des souches spécifiques de bactéries serait un outil de premier choix pour étudier ce processus.

En lien direct avec le travail sur les précurseurs, l'identification de signaux annexes tel que celui provenant du BCR ou de BAFF et impliqués dans la différenciation des MZB serait à rechercher. L'utilisation d'expériences *in vitro* et *in vivo* avec le modèle de souris humanisées permettraient d'en savoir plus sur les signaux nécessaires au développement et au maintien des MZB et ainsi de peut-être mieux comprendre la dérégulation intervenant dans le cas des lymphomes de la zone marginale.

Un dernier aspect particulièrement intéressant à étudier est l'implication des MZB dans la réponse aux antigènes T-indépendants. Bien que les MZB soient fortement suspectées pour être la principale population B impliquée dans ces réponses, la preuve formelle est toujours manquante chez l'homme. De plus, l'incapacité pour l'homme de répondre correctement aux antigènes T-indépendants avant deux ans est un des aspects cliniques dont l'amélioration est cruciale. Prochainement, le laboratoire démarrera un projet visant à établir au cours d'une vaccination induisant une réponse T-indépendante quelles sont les sous-populations de lymphocytes B à l'origine des anticorps IgM, IgG et IgA produit au cours de la réponse. Cette recherche permettra peut-être de prouver formellement, et pour la première fois, le rôle des MZB dans la réponse T-indépendante chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Loder, F., et al., *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 75-89.
2. Allman, D., et al., *Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6834-40.
3. Merrell, K.T., et al., *Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 953-62.
4. Chung, J.B., M. Silverman, and J.G. Monroe, *Transitional B cells: step by step towards immune competence*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 343-9.
5. Freitas, A.A., et al., *Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5640-4.
6. Gu, H., et al., *Most peripheral B cells in mice are ligand selected*. J Exp Med, 1991. **173**(6): p. 1357-71.
7. Cariappa, A., et al., *The recirculating B cell pool contains two functionally distinct, long-lived, posttransitional, follicular B cell populations*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2270-81.
8. Hardy, R.R., et al., *Demonstration of B-cell maturation in X-linked immunodeficient mice by simultaneous three-colour immunofluorescence*. Nature, 1983. **306**(5940): p. 270-2.
9. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 767-77.
10. Hayakawa, K., et al., *The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice*. J Exp Med, 1983. **157**(1): p. 202-18.
11. Baumgarth, N., *The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(1): p. 34-46.
12. Witt, C.M., et al., *Notch2 haploinsufficiency results in diminished B1 B cells and a severe reduction in marginal zone B cells*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 2783-8.
13. Ghosn, E.E., et al., *Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 2879-84.
14. Montecino-Rodriguez, E., H. Leathers, and K. Dorshkind, *Identification of a B-1 B cell-specified progenitor*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 293-301.
15. Martin, F. and J.F. Kearney, *B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 195-201.
16. Carvalho, T.L., et al., *Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1141-50.
17. Hao, Z. and K. Rajewsky, *Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1151-64.
18. Cinamon, G., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 713-20.
19. Martin, F. and J.F. Kearney, *Marginal-zone B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 323-35.
20. Mebius, R.E. and G. Kraal, *Structure and function of the spleen*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 606-16.
21. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 161-96.
22. Lu, T.T. and J.G. Cyster, *Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone*. Science, 2002. **297**(5580): p. 409-12.
23. Croker, B.A., et al., *The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3376-86.
24. Fukui, Y., et al., *Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration*. Nature, 2001. **412**(6849): p. 826-31.
25. Guinamard, R., et al., *Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 31-6.

26. Muppidi, J.R., et al., *Cannabinoid receptor 2 positions and retains marginal zone B cells within the splenic marginal zone*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1941-8.
27. Karlsson, M.C., et al., *Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 333-40.
28. Amlot, P.L., D. Grennan, and J.H. Humphrey, *Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens*. Eur J Immunol, 1985. **15**(5): p. 508-12.
29. Coil, J.A., J.D. Dickerman, and E. Boulton, *Increased susceptibility of splenectomized mice to infection after exposure to an aerosolized suspension of type III Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1978. **21**(2): p. 412-6.
30. Lane, P.J., et al., *Differences in the recruitment of virgin B cells into antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens*. Eur J Immunol, 1986. **16**(12): p. 1569-75.
31. Mond, J.J., A. Lees, and C.M. Snapper, *T cell-independent antigens type 2*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 655-92.
32. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, *Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens*. Immunity, 2001. **14**(5): p. 617-29.
33. Oliver, A.M., et al., *Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2366-74.
34. Oliver, A.M., F. Martin, and J.F. Kearney, *IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7198-207.
35. You, Y., et al., *Marginal zone B cells regulate antigen capture by marginal zone macrophages*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2172-81.
36. Balazs, M., et al., *Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 341-52.
37. Ferguson, A.R., M.E. Youd, and R.B. Corley, *Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells*. Int Immunol, 2004. **16**(10): p. 1411-22.
38. Arnon, T.I., et al., *Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress*. Nature, 2013. **493**(7434): p. 684-8.
39. Cinamon, G., et al., *Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 54-62.
40. Cyster, J.G. and S.R. Schwab, *Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 69-94.
41. Attanavanich, K. and J.F. Kearney, *Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 803-11.
42. Song, H. and J. Cerny, *Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1923-35.
43. Chappell, C.P., et al., *Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1825-40.
44. Cunningham, A.F., et al., *Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6200-7.
45. Kumararatne, D.S., et al., *Marginal zones: the largest B cell compartment of the rat spleen*. Adv Exp Med Biol, 1982. **149**: p. 67-73.
46. Tanigaki, K., et al., *Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(5): p. 443-50.
47. Kuroda, K., et al., *Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 301-12.

48. Saito, T., et al., *Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development*. *Immunity*, 2003. **18**(5): p. 675-85.
49. Maillard, I., et al., *Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions*. *Blood*, 2004. **104**(6): p. 1696-702.
50. Wu, L., et al., *The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development*. *Blood*, 2007. **110**(10): p. 3618-23.
51. Zhang, Z., et al., *Notch-RBP-J-independent marginal zone B cell development in IgH transgenic mice with VH derived from a natural polyreactive antibody*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38894.
52. Hozumi, K., et al., *Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(6): p. 638-44.
53. Sheng, Y., et al., *Expression of Delta-like 1 in the splenic non-hematopoietic cells is essential for marginal zone B cell development*. *Immunol Lett*, 2008. **121**(1): p. 33-7.
54. Tan, J.B., et al., *Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like 1 in splenic endothelial niches*. *Immunity*, 2009. **30**(2): p. 254-63.
55. Moriyama, Y., et al., *Delta-like 1 is essential for the maintenance of marginal zone B cells in normal mice but not in autoimmune mice*. *Int Immunol*, 2008. **20**(6): p. 763-73.
56. Song, R., et al., *Mind bomb 1 in the lymphopoietic niches is essential for T and marginal zone B cell development*. *J Exp Med*, 2008. **205**(11): p. 2525-36.
57. Cariappa, A., et al., *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21*. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 603-15.
58. Kerner, J.D., et al., *Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk*. *Immunity*, 1995. **3**(3): p. 301-12.
59. Khan, W.N., et al., *Defective B cell development and function in Btk-deficient mice*. *Immunity*, 1995. **3**(3): p. 283-99.
60. Kanayama, N., M. Cascalho, and H. Ohmori, *Analysis of marginal zone B cell development in the mouse with limited B cell diversity: role of the antigen receptor signals in the recruitment of B cells to the marginal zone*. *J Immunol*, 2005. **174**(3): p. 1438-45.
61. Martin, F. and J.F. Kearney, *Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk*. *Immunity*, 2000. **12**(1): p. 39-49.
62. Wen, L., et al., *Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen*. *Immunity*, 2005. **23**(3): p. 297-308.
63. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. *Science*, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
64. Thompson, J.S., et al., *BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF*. *Science*, 2001. **293**(5537): p. 2108-11.
65. Stadanlick, J.E., et al., *Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BlyS signaling*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(12): p. 1379-87.
66. Sasaki, Y., et al., *Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation*. *Immunity*, 2006. **24**(6): p. 729-39.
67. Srivastava, B., et al., *Characterization of marginal zone B cell precursors*. *J Exp Med*, 2005. **202**(9): p. 1225-34.
68. Agrawal, S., et al., *Transitional B cell subsets in human bone marrow*. *Clin Exp Immunol*, 2013.
69. Vossenkamper, A., et al., *A role for gut-associated lymphoid tissue in shaping the human B cell repertoire*. *J Exp Med*, 2013. **210**(9): p. 1665-74.
70. Sims, G.P., et al., *Identification and characterization of circulating human transitional B cells*. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4390-8.
71. Marie-Cardine, A., et al., *Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation*. *Clin Immunol*, 2008. **127**(1): p. 14-25.

72. Suryani, S., et al., *Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells*. Blood, 2010. **115**(3): p. 519-29.
73. Wirths, S. and A. Lanzavecchia, *ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells*. Eur J Immunol, 2005. **35**(12): p. 3433-41.
74. Palanichamy, A., et al., *Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 5982-93.
75. Isnardi, I., et al., *Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones*. Blood, 2010. **115**(24): p. 5026-36.
76. Moir, S., et al., *Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1797-805.
77. Rakhmanov, M., et al., *Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13451-6.
78. Saadoun, D., et al., *Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjogren's syndrome-associated lymphoproliferation*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(4): p. 1085-96.
79. Terrier, B., et al., *Expansion of functionally anergic CD21-/low marginal zone-like B cell clones in hepatitis C virus infection-related autoimmunity*. J Immunol, 2011. **187**(12): p. 6550-63.
80. Visentini, M., et al., *Clonal B cells of HCV-associated mixed cryoglobulinemia patients contain exhausted marginal zone-like and CD21 low cells overexpressing Stra13*. Eur J Immunol, 2012. **42**(6): p. 1468-76.
81. Visentini, M., et al., *Persistence of a large population of exhausted monoclonal B cells in mixed cryoglobulinemia after the eradication of hepatitis C virus infection*. J Clin Immunol, 2012. **32**(4): p. 729-35.
82. Visentini, M., et al., *Clonal expansion and functional exhaustion of monoclonal marginal zone B cells in mixed cryoglobulinemia: the yin and yang of HCV-driven lymphoproliferation and autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2013. **12**(3): p. 430-5.
83. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 429-57.
84. Fecteau, J.F., G. Cote, and S. Neron, *A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3728-36.
85. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
86. Klein, U., R. Kuppers, and K. Rajewsky, *Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1288-98.
87. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, *Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells*. J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1679-89.
88. Weller, S., et al., *CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 1166-70.
89. Tangye, S.G. and K.L. Good, *Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells?* J Immunol, 2007. **179**(1): p. 13-9.
90. Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud, *Human marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 267-85.
91. Maurer, D., et al., *IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 3700-5.
92. Agematsu, K., et al., *B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 2073-9.
93. Steiniger, B., E.M. Timphus, and P.J. Barth, *The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants*. Histochem Cell Biol, 2006. **126**(6): p. 641-8.

94. Dunn-Walters, D.K., P.G. Isaacson, and J. Spencer, *Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 559-66.
95. Berkowska, M.A., et al., *Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2150-8.
96. Wu, Y.C., D. Kipling, and D.K. Dunn-Walters, *The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 81.
97. McWilliams, L., et al., *The human fetal lymphocyte lineage: identification by CD27 and LIN28B expression in B-cell progenitors*. J Leukoc Biol, 2013.
98. Vaskova, M., et al., *CD44 and CD27 delineate B-precursor stages with different recombination status and with an uneven distribution in nonmalignant and malignant hematopoiesis*. Tissue Antigens, 2008. **71**(1): p. 57-66.
99. Weller, S., et al., *Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1331-42.
100. Weller, S., et al., *IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients*. Blood, 2012. **120**(25): p. 4992-5001.
101. Reynaud, C.A., et al., *IgM memory B cells: a mouse/human paradox*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(10): p. 1625-34.
102. Roll, P., et al., *Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(8): p. 2377-86.
103. Muhammad, K., et al., *Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IGD+CD27+ memory B cell receptors after rituximab treatment*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p. 2284-93.
104. Mamani-Matsuda, M., et al., *The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4653-9.
105. Weller, S., et al., *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
106. Bekeredjian-Ding, I. and G. Jengo, *Toll-like receptors--sentries in the B-cell response*. Immunology, 2009. **128**(3): p. 311-23.
107. Krutzmann, S., et al., *Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 939-45.
108. D'Orsogna, L.J., et al., *Circulating memory B-cell subpopulations are affected differently by HIV infection and antiretroviral therapy*. AIDS, 2007. **21**(13): p. 1747-52.
109. Subramaniam, K., et al., *IgM(+) memory B cell expression predicts HIV-associated cryptococcosis status*. J Infect Dis, 2009. **200**(2): p. 244-51.
110. Takizawa, M., K. Sugane, and K. Agematsu, *Role of tonsillar IgD+CD27+ memory B cells in humoral immunity against pneumococcal infection*. Hum Immunol, 2006. **67**(12): p. 966-75.
111. Moens, L., et al., *Human memory B lymphocyte subsets fulfill distinct roles in the anti-polysaccharide and anti-protein immune response*. J Immunol., 2008. **181**(8): p. 5306-12.
112. Weller, S., C.A. Reynaud, and J.C. Weill, *Vaccination against encapsulated bacteria in humans: paradoxes*. Trends Immunol, 2005. **26**(2): p. 85-9.
113. Zandvoort, A., et al., *CD27 expression in the human splenic marginal zone: the infant marginal zone is populated by naive B cells*. Tissue Antigens, 2001. **58**(4): p. 234-42.
114. Timens, W., et al., *Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response*. J Immunol, 1989. **143**(10): p. 3200-6.
115. Kendall, E.A., et al., *Development of immunoglobulin M memory to both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen following infection with Vibrio cholerae O1 in Bangladesh*. Infect Immun, 2010. **78**(1): p. 253-9.
116. Agematsu, K., et al., *Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 853-60.

117. Han, J.H., et al., *Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors*. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 64-75.
118. Mao, C., et al., *T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype*. *Immunity*, 2004. **20**(2): p. 133-44.
119. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
120. Reynaud, C.A., et al., *Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches*. *Cell*, 1991. **64**(5): p. 995-1005.
121. Reynaud, C.A., et al., *Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process*. *Cell*, 1995. **80**(1): p. 115-25.
122. Facchetti, F., et al., *Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells*. *J Immunol*, 1995. **154**(12): p. 6624-33.
123. Seifert, M. and R. Kuppers, *Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation*. *J Exp Med*, 2009. **206**(12): p. 2659-69.
124. Griffin, D.O., N.E. Holodick, and T.L. Rothstein, *Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70*. *J Exp Med*, 2011. **208**(1): p. 67-80.
125. Descatoire, M., et al., *A human equivalent of mouse B-1 cells?* *J Exp Med*, 2011. **208**(13): p. 2563-4.
126. Perez-Andres, M., et al., *The nature of circulating CD27+CD43+ B cells*. *J Exp Med*, 2011. **208**(13): p. 2565-6.
127. Covens, K., et al., *Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype*. *Blood*, 2013. **121**(26): p. 5176-83.
128. Rossi, D., et al., *The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development*. *J Exp Med*, 2012. **209**(9): p. 1537-51.
129. Stanley, P. and C.J. Guidos, *Regulation of Notch signaling during T- and B-cell development by O-fucose glycans*. *Immunol Rev*, 2009. **230**(1): p. 201-15.
130. Moloney, D.J., et al., *Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(13): p. 9604-11.
131. Wang, Y., et al., *Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 40338-45.
132. Yoon, S.O., et al., *Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis*. *J Immunol*, 2009. **183**(1): p. 352-8.
133. Harley, V.R., R. Lovell-Badge, and P.N. Goodfellow, *Definition of a consensus DNA binding site for SRY*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(8): p. 1500-1.
134. Bernard, P. and V.R. Harley, *Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(3): p. 400-10.
135. Guo, L., et al., *Sox7 Is an independent checkpoint for beta-catenin function in prostate and colon epithelial cells*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(9): p. 1421-30.
136. Kiel, M.J., et al., *Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma*. *J Exp Med*, 2012. **209**(9): p. 1553-65.
137. Isidor, B., et al., *Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis*. *Nat Genet*, 2011. **43**(4): p. 306-8.
138. Simpson, M.A., et al., *Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss*. *Nat Genet*, 2011. **43**(4): p. 303-5.

139. Wu, Y.C., et al., *High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations*. *Blood*, 2010. **116**(7): p. 1070-8.
140. Dogan, I., et al., *Multiple layers of B cell memory with different effector functions*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(12): p. 1292-9.
141. Puga, I., et al., *B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(2): p. 170-80.
142. Weller, S., C.A. Reynaud, and J.C. Weill, *Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor?* *Eur J Immunol*, 2005. **35**(10): p. 2789-92.
143. Willenbrock, K., et al., *Human splenic marginal zone B cells lack expression of activation-induced cytidine deaminase*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(10): p. 3002-7.

ANNEXES

Gènes concordants

induits par NOTCH2 et induits dans MZP*		réprimés par NOTCH2 et réprimés dans MZP*	
BAG1	RHOBTB3	ADARB1	LHFPL2
BEX2	RPF2	ADCK3	LOC100128822
CCDC104	SAMSN1	ADK	LOC283663
CCNE2	SCAMP1	AFF1	LRCH4
CD27	SLC16A1	AGPAT5	MACROD2
CDK4	SRPRB	ANKRD44	MYST4
CEP76	SYNJ2	ARHGAP4	PATL2
CFLAR	TAF9B	ATP2B1	RABGAP1L
CHD3	TNFRSF13B	ATP6V0A1	RAPGEF6
DLAT	UCHL5	ATP7A	SELL
DOCK9	UNG	CLIC4	SLC30A4
DUSP3	USP13	DCK	SLFN5
ESYT2	ZNF35	DGKD	SNX22
FKBP4	ZNF593	DLEU2	SORL1
INPP5A		DOCK8	STIM2
JAM3		DZIP3	STK17A
LYAR		EEA1	STX7
METTL2A		EIF2AK3	TCF3
MPP5		FCER2	TIFA
MRPS15		FLI1	TRAK1
MRPS17		GCNT1	TRAK2
MRPS2		GIT2	UBR7
MTHFD2		HIP1R	WDR45
NET1		HLA-DMB	
NETO2		IGF2BP3	
PAICS		IGHD	
PITPNA		IKZF2	
POLR1B		IL4R	
PSMG1		KDM1B	
PTEN		LASS6	

Tableau 5 : Liste des gènes concordants de la signature NOTCH2 des MZP.

*Comparé aux cellules B naïves

Gènes discordants

induits par NOTCH2 mais réprimés dans MZP*	réprimés par NOTCH2 mais induits dans MZP*
AIG1	AHNAK
ANKRD50	AIM2
ATP1B1	ALKBH7
BARD1	ALOX5
C17orf79	CASP10
CDK5RAP2	CORO7
CDK6	COTL1
CHD6	CTSZ
DDX11	DIDO1
GMEB2	FCRLA
HBS1L	FUT8
KIF22	GLS
LATS2	IGJ
PPFIA1	IL10RB
STK11IP	KCTD6
TMEM48	LAPTM4B
	MAN1B1
	MPEG1
	NCRNA00094
	NFATC1
	PAPSS1
	PLP2
	PRPSAP1
	PTPN1
	RARRES3
	SCRN1
	SRD5A1
	TMED4
	TRIM8
	TTC9

Tableau 6 : Liste des gènes discordants de la signature NOTCH2 des MZP.

*Comparé aux cellules B naïves

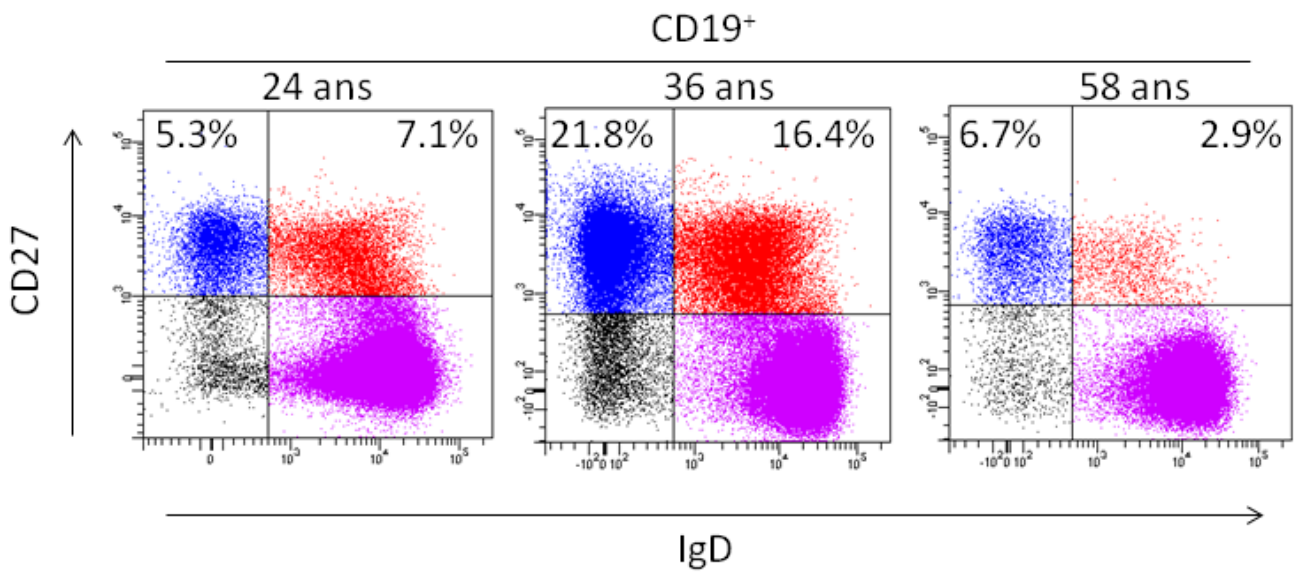


Figure 13 : FACS des B du sang des patients Hadju-Cheney.

Age (en année)	Tissu	Populations	Nombre de séquences		Mutations			
			Totales	Mutées	Nombre	Gamme	Taux / séq. totales (%)	Taux / séq. mutées (%)
24	sang	IgD+ 27+	26	9 (35%)	36	0-10	0,48%	1,40%
		IgD-27+	19	18 (95%)	274	0-46'	5,00%	5,36%
36	sang	IgD+ 27+	22	21 (95%)	211	0-19	3,37%	3,50%
		IgD-27+	19	19 (100%)	259	4-24'	4,80%	4,80%
58	sang	IgD+ 27+	31	30 (95%)	287	0-34	3,26%	3,37%
		IgD-27+	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 7 : Mutations somatiques des cellules IgD⁺ CD27⁺ et IgD⁻ CD27⁺ des patients Hadju-Cheney.

ND, Non Déterminé.

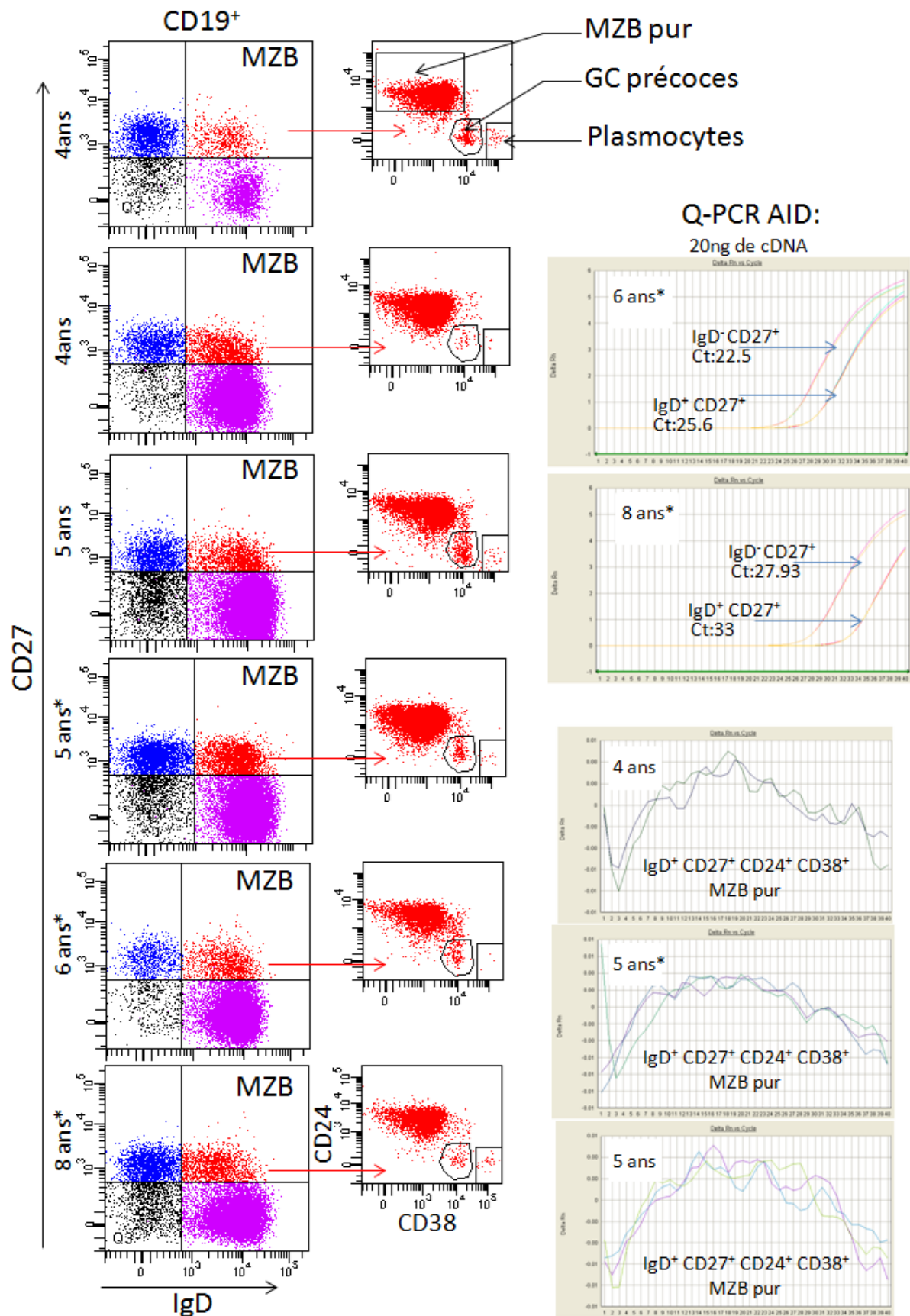


Figure 14 : Contaminants des $IgD^+ CD27^+$ qui influencent la détection de l'AID en qPCR.

A human equivalent of mouse B-1 cells?

To the Editor:

In a recent issue of *The Journal of Experimental Medicine*, Thomas Rothstein and colleagues, a group with long-standing expertise in the field of mouse B1 cells, reported the description of a B1 B cell subset in human blood, a population that has thus far eluded identification (Griffin et al., 2011).

Mouse B1 cells are the main constituents of the B lymphocyte pool in pleural and peritoneal cavities, and are characterized as CD5⁺ and/or CD11b⁺ cells (Hardy, 2006; Baumgarth, 2011). However, CD5, which was initially identified on chronic lymphocytic leukemia tumors (Boumsell et al., 1978), is not a B1 marker in humans. Human CD5 marks immature/transitional B cells in bone marrow, blood, and spleen (Sims et al., 2005; Cuss et al., 2006), as well as in T cells. Mouse B1 cells are also described as IgM^{high}IgD^{low}CD43⁺. The function of CD43 in B1 cells is unknown, and it is also expressed by T lymphocytes, B cell precursors, and plasma cells.

Griffin et al. (2011) described a CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻ subset present in adult and human cord blood with functional characteristics that they describe as typical B1 cell attributes: spontaneous IgM secretion, constitutive BCR signaling, and ability to drive allogeneic T cell proliferation. It should be noted that this last feature has been shown to be displayed by switched memory B cells in humans, likely because of the high expression of CD80 and/or CD86 on these cells (Liu et al., 1995; Good et al., 2009).

A striking point of the observations of Griffin et al. (2011) was their quantitative aspect. Despite considerable variations between individual blood donors, the proportion of CD43⁺ cells among CD27⁺ B cells averaged 40–50% in adults, with a higher frequency in young individuals, and a lower fre-

quency in the elderly. We find this puzzling, as these quantitative figures closely match the frequency of marginal zone–like (or IgM memory) B cells (Weill et al., 2009), with the difference being that marginal zone–like B cells are IgD^{int} whereas CD43⁺ B cells are mainly IgD^{high} (Griffin et al., 2011). Therefore, we analyzed to what extent these two populations may superimpose.

CD43⁺ B cells appear as large cells that require a wide lymphocyte gate to be detected. In so doing, the risk of inclusion of cell doublets in the analysis/isolation is high. Usually, specific selective criteria on the cell flow (FSC-W, SSC-W) are applied to remove doublets, unless the morphological characteristics of the cell population justify such an omission. In such cases, careful controls are obviously required to avoid the confusion between cell doublets and large cells.

We added anti-CD3 antibodies to the staining reaction, as T cells are the major lymphocyte subset in human blood compared with B cells (95:5). A large fraction of CD20⁺CD27⁺CD43⁺ cells stained positive for CD3 (Fig. 1 A). We believe that these CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD3⁺ cells are doublets involving T cells that account for the CD43 and CD27 labeling, and (mainly) naive B cells that account for the IgD^{high} phenotype (unpublished data). Pre-enrichment of peripheral blood B cells through CD19⁺ selection strongly reduced the proportion of CD20⁺CD27⁺CD43⁺ cells (Fig. 1 A).

Gating on CD20⁺ cells excluded plasma cells, identified as CD43⁺⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺. The remaining CD20⁺CD3⁻CD27⁺CD43⁺ cells accounted for 2–3% of the total B cell pool (2.2% for adult samples, 2.8% for child samples; Fig. 1, B and C). These cells harbored either an IgD⁺ or an IgD⁻ phenotype and a somewhat heterogeneous CD38 intensity (Fig. 1 B).

Interestingly, the IgD⁺ over IgD⁻ ratio among CD43⁺ cells varied with age; IgD⁺ cells dominated in children <5 yr, and IgD⁻ cells dominated in adults (Fig. 1 D). IgD⁻ cells include cells expressing IgG or IgA, as well as a minority of IgM-only cells (unpublished data). The presence of CD20⁺CD43⁺ cells displaying IgD, IgG, or IgA makes their possible B1 equivalence a more complex issue, even though B1 cells can give rise to IgA-producing plasma cells in the lamina propria (Suzuki et al., 2010).

We therefore propose that the quantitative variations observed when counting CD43⁺ B cells may be largely contributed by staining artifacts. The potential presence of doublet events in the CD20⁺CD43⁺ population analyzed by Griffin et al. (2011) obviously questions the *in vitro* functional characteristics described for this putative B1 subset. Whether CD20⁺CD43⁺CD27⁺IgD⁺ or IgD⁻ B cells are activated cells on their way to plasma cell differentiation or a new innatelike subset with B1 functional features remains to be seen.

Marc Descatoire, Jean-Claude Weill, Claude-Agnès Reynaud, and Sandra Weller

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 783 "Développement du système immunitaire", Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Site Necker-Enfants Malades, Paris, France

CORRESPONDENCE

Sandra Weller: sandra.weller@inserm.fr

We thank Dr. Chantal Brouzes (Necker Hospital, Paris) for the child blood samples, and Maya Chrabieh and Mélanie Migaud (both from INSERM U980, Paris) for the adult samples. INSERM U783 is supported by the Ligue contre le Cancer (équipe labellisée) and by an ERC Advanced Grant to Jean-Claude Weill.

The authors declare they have no financial conflicts of interest.

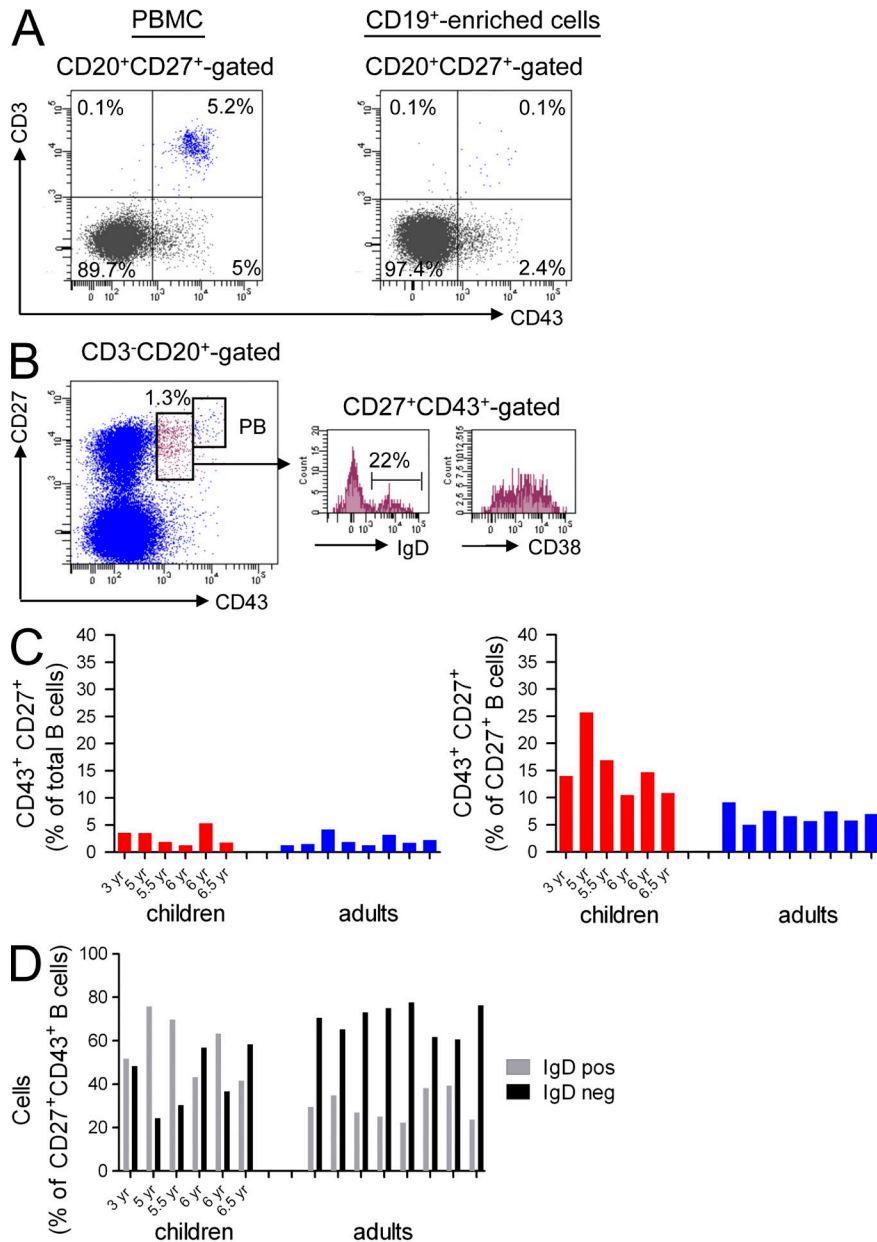


Figure 1. CD3, CD43, CD38 and IgD expression on human CD20⁺CD27⁺ PMBCs. (A) Human PMBCs were analyzed within a large lymphoid gate. The right dot plot represents cells after enrichment by CD19 microbeads (Miltenyi Biotec), whereas the left dot plot represents total PMBCs. The flow cytometric analysis shown was performed at a flow rate of <5,000 events per second. The data shown here for an adult are representative of eight adult blood samples analyzed in four separate experiments. (B) Representative analysis of an adult blood sample. PMBCs were analyzed within a large lymphoid gate, with doublets excluded by SSC-W criteria. Cells were further gated as CD3⁻CD20⁺ for analysis of CD27 and CD43 expression. The small top right gate in the dot plot indicates plasmablasts that are excluded from the cell estimates. The histograms show the expression of IgD and CD38 on the CD43⁺CD27⁺ population. (C) Blood samples from 6 children (3–6.5 yr old) and 8 adults were analyzed as in B. The proportion of CD43⁺CD27⁺ cells among CD3⁻CD20⁺ B cells (expressed either as percentage of total B cells or of CD27⁺ B cells) is indicated. Each bar represents the results obtained for one individual. (D) The relative distribution of IgD⁺ and IgD⁻ B cells among the CD27⁺CD43⁺ B cell population is shown in bar graphs, each bar representing the results obtained for one individual. The following antibodies were used: CD20 (APC-H7, clone 2H7), CD43 (FITC, clone 1G10), CD3 (PE, clone UCHT1), and CD27 (APC, clone M-T271) from BD; CD38 (PerCp-Cy5.5, clone HIT2) and IgD (PE-Cy7, clone IAG-2) from BioLegend. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCanto II apparatus with FACSDiva software.

REFERENCES

- Baumgarth, N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11:34–46. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2901>
- Boumsell, L., A. Bernard, V. Lepage, L. Degos, J. Lemerle, and J. Dausset. 1978. Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur. J. Immunol.* 8:900–904. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830081214>
- Cuss, A.K., D.T. Avery, J.L. Cannons, L.J. Yu, K.E. Nichols, P.J. Shaw, and S.G. Tangye. 2006. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J. Immunol.* 176:1506–1516.
- Good, K.L., D.T. Avery, and S.G. Tangye. 2009. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J. Immunol.* 182:890–901.
- Griffin, D.O., N.E. Holodick, and T.L. Rothstein. 2011. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻. *J. Exp. Med.* 208:67–80. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20101499>
- Hardy, R.R. 2006. B-1 B cell development. *J. Immunol.* 177:2749–2754.
- Liu, Y.J., C. Barthélémy, O. de Bouteiller, C. Arpin, I. Durand, and J. Banchereau. 1995. Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity.* 2:239–248. [http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90048-9](http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613(95)90048-9)
- Sims, G.P., R. Ettinger, Y. Shirota, C.H. Yarboro, G.G. Illei, and P.E. Lipsky. 2005. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 105:4390–4398. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284>
- Suzuki, K., M. Maruya, S. Kawamoto, and S. Fagarasan. 2010. Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. *Immunol. Rev.* 237:180–190. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00941.x>
- Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud. 2009. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:267–285. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132607>

IgM memory B cells: a mouse/human paradox

Claude-Agnès Reynaud · Marc Descatoire · Ismail Dogan · François Huetz · Sandra Weller · Jean-Claude Weill

Received: 10 March 2012/Revised: 13 March 2012/Accepted: 13 March 2012
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Humoral memory is maintained by two types of persistent cells, memory B cells and plasma cells, which have different phenotypes and functions. Long-lived plasma cells can survive for a lifespan within a complex niche in the bone marrow and provide continuous protective serum antibody levels. Memory B cells reside in secondary lymphoid organs, where they can be rapidly mobilized upon a new antigenic encounter. Surface IgG has long been taken as a surrogate marker for memory in the mouse. Recently, however, we have brought evidence for a long-lived IgM memory B cell population in the mouse, while we have also argued that, in humans, these same cells are not classical memory B cells but marginal zone (MZ) B cells which, as opposed to their mouse MZ counterpart, recirculate and carry a mutated B cell receptor. In this review, we will discuss these apparently paradoxical results.

Keywords B cell memory · Somatic hypermutation · AICDA · Marginal zone B cells

Introduction

The T-dependent B cell response starts, after encounter of antigen and appropriate cognate T cell help, by a germinal center reaction involving a strong proliferative phase. Expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) during this reaction allows a series of modifications of the BCR, including mutations of the variable regions of the immunoglobulin genes and isotype switch, shifting the surface Ig expression from IgM to IgG and IgA. The GC reaction peaks in the second week, with both IgM⁺ and IgG⁺ centroblasts detectable, and wanes after a few weeks [1]. Selection of B cells displaying enhanced antigen recognition takes place in the GC environment, mediated by antigen–antibody complexes retained by the follicular dendritic cell network that structures germinal centers. This selection results in the generation of long-lived plasma cells and memory B cells with an affinity matured, mutated BCR.

When working on B cell memory, obvious questions come to mind which, ironically enough, have been around more or less in the same terms for the last 30 years.

What is the role of antigen in maintaining memory?

It has been proposed by several authors that memory B cells are maintained by the presence of their cognate antigen [2–4] and that they could accordingly be continuously stimulated giving rise to short-lived plasma cells that would contribute to maintain the level of specific antibodies in the serum [5]. Conversely, it was shown by the group of K. Rajewsky, through an experimental setting allowing memory B cells to acquire a new antigenic specificity that memory B cells could survive in a quiescent state in the absence of antigen [6, 7]. Although this question has never been approached systematically, it has been inferred that

C.-A. Reynaud (✉) · M. Descatoire · I. Dogan · F. Huetz · S. Weller · J.-C. Weill (✉)
Faculté de Médecine, Site Necker-Enfants Malades, INSERM U783 “Développement du système immunitaire”, Université Paris Descartes, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France
e-mail: claude-agnes.reynaud@inserm.fr

J.-C. Weill
e-mail: jean-claude.weill@inserm.fr

F. Huetz
Unité de Biologie des Populations Lymphocytaires, CNRS URA 1961, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

certain antigens such as viral particles may persist in the organism and entertain long lasting GCs [4].

How do memory B cells respond to a re-encounter with their cognate antigen?

In most reports, the boost is performed a few weeks after the priming and triggers an active GC reaction and the formation of antibody-forming cells (AFC) [8]. However, in some other settings, AFCs could be observed after a boost without the formation of GCs [9–11]. Here again, the analysis of the different protocols used may allow us to explain these conflicting data.

How long does B cell memory last?

While this topic has been thoroughly studied in humans, few data are available concerning this question in mice, as sensitive enough models have been developed only recently [10, 12]. Assuming that the persistence of certain antigenic structures used for immunization must not be different in mice and men, it remains striking to see such a difference in the duration of the B cell memory response between the two species (around 12 months for mice and decades for humans).

We will at first describe the model we have established to follow B cell memory in the mouse and confront the results obtained with recent data from other groups, with the aim to integrate these different models into a plausible framework. In the second part, recent data on human $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B cells will be discussed, confronting the germinal center versus marginal zone models for their ontogeny and function.

IgM memory B cells in the mouse: phenotype and function

Two layers of IgM and IgG memory in mice with different effector functions

In order to monitor the fate of B cells in a physiological situation, we have established a mouse model allowing to timely and irreversibly mark B cells as they engage in a germinal center reaction during a T-dependent response [12]. This was achieved by inserting the tamoxifen inducible Cre-ERT2 gene at the AID locus, allowing its expression in centroblasts during the GC reaction. After backcrossing with the Rosa26-LoxP-EYFP reporter mouse, injection of tamoxifen coupled with immunization induced the expression of EYFP in the responding cells. Two antigens have been used, one in a particulate form, sheep red blood cells (SRBC), and one in a soluble form, NP-

CGG precipitated with alum, with both antigens injected intra-peritoneally.

This highly sensitive model, which allowed the follow-up of memory B cells generated in a precise immune response for up to 1 year by flow cytometry and confocal microscopy, revealed new features of B cell memory.

Active germinal centers identified by GL7 or PNA staining and containing proliferating IgM^+ and IgG1^+ centroblasts could be observed for up to 8–10 months after two immunizations with SRBC. These centroblasts were embedded in FDCs in contact with CD4 T cells [12]. Conversely, germinal centers waned after 2–3 months after two immunizations with NP-CGG, as shown previously [13].

Memory B cells were observed up to 12 months after immunization with SRBC and were composed of two subsets, an IgM^+ and an IgG^+ subset. The IgM^+ subset comprised IgM^+IgD^+ and IgM -only sub-populations. The IgG subset comprises IgG_1 cells, which represent the major fraction of SRBC-specific switched memory B cells, as well as other isotypes (Fig. 1). Memory B cells and plasma cells were located within the spleen in the T cell zone and in the red pulp, with some cells in the follicles and very few in the marginal zone (Fig. 1).

Boosting the animal 12 months after two immunizations with SRBC induced the expansion of all the subsets with the more pronounced formation of GC B cells and plasma cells. The animals immunized with NP-CGG displayed an IgM^+ and an IgG^+ memory subset 3–4 months after the two immunizations while their response to a boost, 1 year after, only induced a small plasma cell response.

Transfer of the different memory subsets 2–6 months after SRBC immunization in normal, pre-immunized animals gave strikingly different results. The IgM^+ subset, whether GL7^+ or GL7^- , gave rise to centroblasts, with part of them switching to IgG_1 , and to a small proportion of SRBC-specific IgM^+ plasma cells. The IgG_1 subset, whether GL7^+ or GL7^- , gave rise to SRBC-specific IgG_1 plasmocytes with some maintenance of the IgG_1 memory pool.

There were on average three and six mutations per sequence in IgM and IgG memory B cells, respectively (a mutation frequency determined on a 440 bp J_H4 intronic sequence) [12]. This frequency of mutations did not change much between 2 and 6 months, implying, as previously shown, that the memory pool is made for a large part during the peak of the GC reaction [14]. On the contrary, IgM^+ and IgG^+ centroblasts showed an increasing amount of mutations with age, with some IgG sequences displaying up to 50 mutations at 6 months. Clonal relationships were found between the different subsets, with some large expansions of clones in the centroblast population.

In summary, this model revealed the existence of a long-lived IgM^+ memory subset in addition to the classical IgG^+ one. It also uncovered a division of labor involving

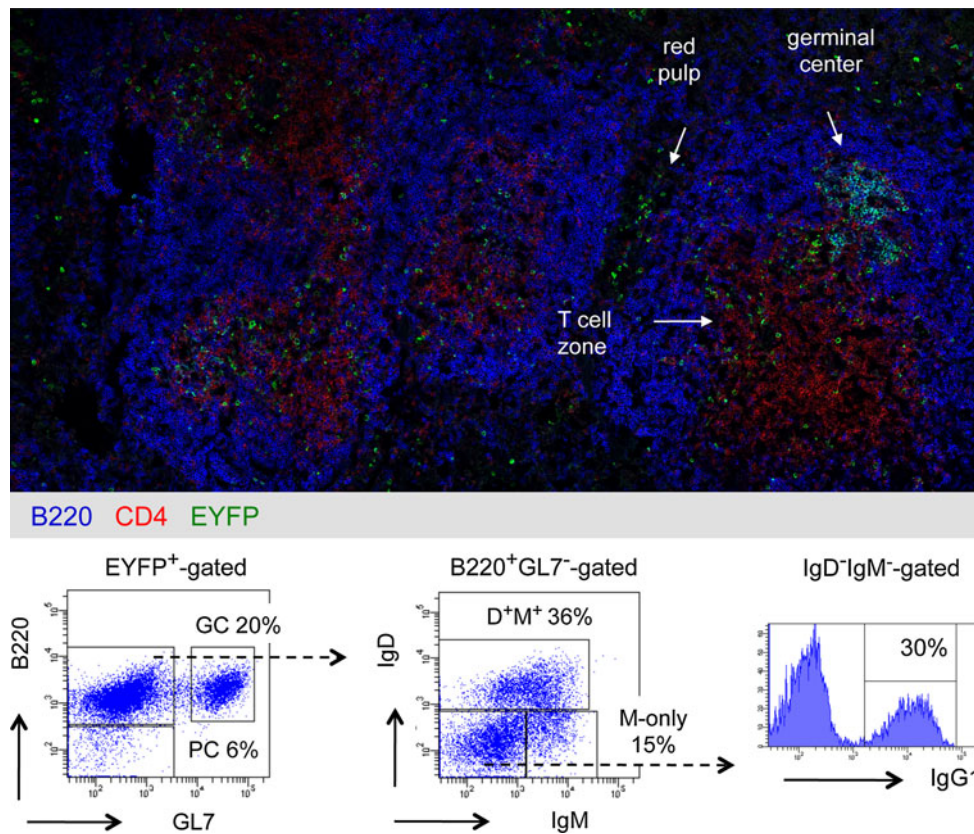


Fig. 1 Location and phenotype of memory B cell subsets in the mouse. Transgenic mice bearing the Cre-ERT2 gene inserted at the AID locus and the ROSA26-loxP-EYFP reporter gene were immunized twice with SRBC at a 1-month interval, with simultaneous ingestion of tamoxifen [12]. (*Upper part*) Analysis by confocal microscopy of a mouse spleen, 2 months after the second SRBC immunization, using anti-B220, CD4 and EYFP antibodies, localization of EYFP⁺ cells in germinal centers, T cell zone and red pulp is

these two subsets somehow similar to the one observed for memory T cells [15]. Upon a boost, IgM memory B cells maintained the central memory pool by going back to GC, undergoing new rounds of SHM and producing later on a new batch of IgM and IgG memory B cells. IgG memory B cells, on the other hand, behaved as effector memory cells giving rise to antibody secreting cells, with some self-maintenance capacity. In such sense, both central and effector memory B cell pool were replenished after a boost in preparation of a new encounter with the original antigen. The nature of the antigen also revealed clear differences. With a particulate antigen like SRBC, a protracted GC response, albeit with a reduced activity, was observed, and the mice gave a full response mobilizing all subsets 1 year after immunization. With a soluble protein like NP-CGG, GCs disappeared after 2–3 months and there was only a small plasma cell response after 1 year with no new formation of GCs (see below).

Overall, this model seems to suggest that particulate antigens give rise to a more durable B cell memory.

highlighted. Very few EYFP⁺ cells are detectable in the marginal zone that forms the outer ring around B cell follicles. (*Lower part*) Flow cytometry analysis of EYFP⁺-cells for the markers B220, GL7 (germinal centers, GC), IgM, IgD and IgG1, plasmocytes (PC) being identified as B220⁻. Reported to the initial EYFP⁺-gate, the IgG1⁺ population, which includes most of the SRBC-specific switched cells, represents 12 % of the initial population

Moreover, one could speculate that the centroblasts in persistent GCs, in which ongoing mutation is taking place, could feed the memory pool at a low level, giving rise to a much larger panel of antibody affinities and specificities against the original antigen. If one thinks in terms of a mutating pathogen, such diversity might help to maintain protection of the host. Assuming that GCs are structures open to circulating B cells [16], persistent GCs could also constantly recruit newcomers into the immune response. On the negative side, the large expansion of some clones observed in persisting GCs might represent an oncogenic threat.

IgM memory B cells: controversial issues on effector functions

Confronting recent publications on B cell memory reveals striking similarities and differences. M. Shlomchik and his colleagues, using a mouse model in which NP⁺ memory B cells from an anti-NP V_H knocked-in mouse were

transferred into an Ig transgenic animal with an irrelevant Ag specificity and boosted, confirmed the presence of an IgM and IgG memory subset. Moreover, they identified among these subsets new markers (PD-L2, CD80, CD73) whose combinatorial expression indicated a gradient of memory-like properties [17]. Along the same line, M. Jenkins and colleagues, using for the primary immunization the soluble protein phyco-erythrin (PE) precipitated with alum, also observed long-lived IgG and IgM memory subsets identified through the binding of this fluorophore [10]. Upon a boost, by injection of a large PE dose in emulsion with complete Freund's adjuvant 1 year after the primary immunization, PE-specific IgG⁺ memory B cells expanded considerably and differentiated into PE-specific antibody producing cells. Strikingly, while the IgM⁺ memory subset was more prominent and more stable than its IgG⁺ counterpart, being present at a steady level until 450 days after immunization, it did not react to this robust antigen boost, and could only give rise to active GCs containing IgM⁺ and IgG⁺ centroblasts when transferred into a naive animal. As expected, the IgG memory subset gave rise 5 days after its transfer to switched memory B cells and plasmocytes whose secreted antibodies prevented the formation of endogenous GCs in the host. These authors concluded that the long-lasting IgM memory subset was inhibited by circulating anti-PE antibodies and hence represented a low affinity memory B cell pool that could serve as a reservoir of memory B cells once the level of circulating antibodies has declined [10]. The phenomenon of serum inhibition of a B cell response has been reported some time ago, the most likely explanation being that specific high affinity antibodies prevented the immunogen from gaining access to the B cell receptor [18]. A similar expansion of PE-specific antibody producing cells in the absence of GCs induction, was observed by R. Noelle and colleagues [11], who used the same PE antigen for the primary immunization and a minimal amount of soluble antigen for the boost, several weeks later. Surprisingly, a similar epitope masking phenomenon had been also reported during a T-independent response in which it was shown that memory B cells were in fact present but prevented from responding by the antigen-specific IgG antibodies [19].

In summary, for a soluble protein antigen, a boost performed either with a very low amount of antigen at a short interval after the primary immunization or more potently at a later time will not mobilize IgM memory B cells and therefore not induce a GC reaction. It will do so if the boost is more robust and not too distant from the primary immunization (6–8 weeks). In all cases, the boost will induce the differentiation of IgG memory B cells into AFCs. With particulate antigens such as virus particles or SRBC, IgM memory B cells will respond to a boost distant

from the primary immunization even once GCs have mostly disappeared.

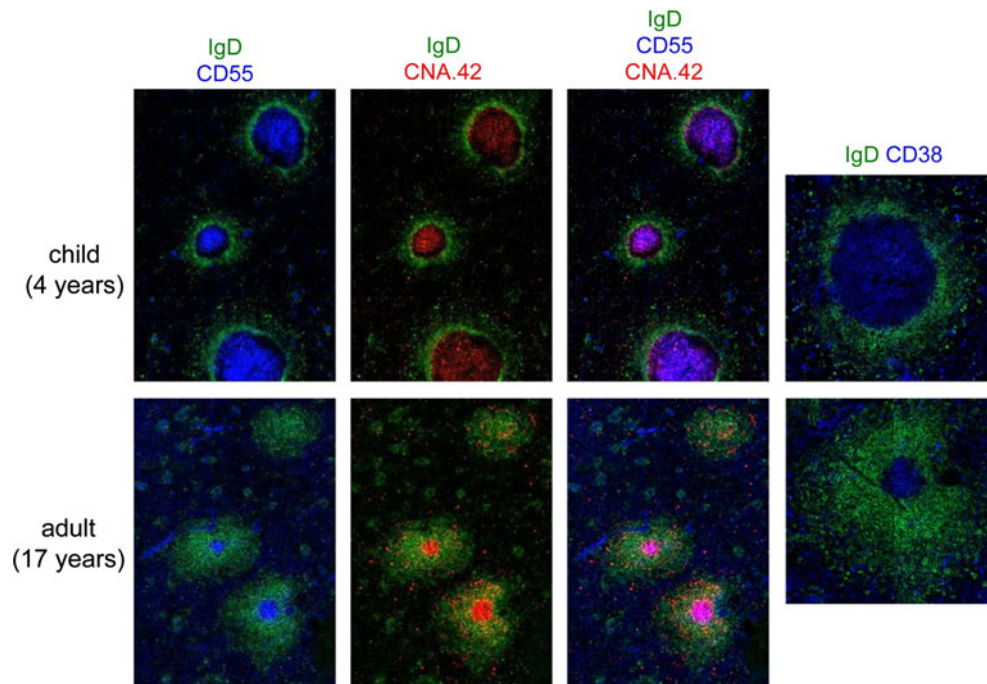
Different parameters can thus control the behavior of the IgM memory subset upon a booster immunization: the time elapsed between the primary immunization and the boost, and the dose and type of antigen used. It has been reported that a different signaling is required to trigger IgM and IgG memory B cells, both membrane-bound IgM and IgD bearing a short cytoplasmic tail of 3 amino-acids compared to the 28 amino-acid tail of membrane-bound IgG [20]. Effectively it was shown that phosphorylation of a tyrosine in the IgG tail recruited the Grb2 protein, which was responsible for the enhanced signaling observed upon antigen stimulation [21]. Moreover, another segment of the IgG tail seemed to favor oligomerization of the BCR thus increasing the recruitment of the Syk kinase and the calcium response [22]. It appears therefore that, for soluble proteins that often behave as monovalent antigens, circulating antibodies will more easily compete out the BCR at the surface of IgM memory B cells. The differential response observed with time for the IgM memory subset could be related to the presence of a residual GC reaction that would allow IgM memory B cells to be mobilized faster and to benefit from more potent local help from T helper follicular cells.

In conclusion, and as opposed to what has been proposed for T cells [23], the initial signaling event sustained by the B cell may not play such a decisive role in the generation of memory, taking into consideration that both soluble protein and particulate antigens will induce the formation of long-lived IgM and IgG memory subsets. The protocol of immunization and the type and dose of antigen and adjuvant used would seem more important for the efficiency of the memory response.

Long-term memory in humans

How is this relevant to the human model, which, despite its obvious difficulties, offers a unique window of observation for long-term responses? Adult spleen rarely displays germinal centers, confirming that this organ at the adult stage is seldom engaged into active T-dependent immune responses. Conversely, a few residual GCs with a clear CD38⁺ B cell population within B cell follicles could be observed in the spleen of young adults, which evoked the mark of previous immune responses, due to vaccination or infections (Fig. 2) [24]. B cell memory against certain vaccines such as smallpox and yellow fever can have an almost infinite lifespan [25–27]. For a pathogen like smallpox that has been eradicated in the 70s, one can assume that such memory B cells have not been boosted by their cognate antigen since the time of vaccination. It is also very unlikely that anti-vaccinia memory B cells could

Fig. 2 Active and residual germinal centers in human spleen. Germinal centers were analyzed by confocal microscopy of two spleen samples, one from a 4-year-old child, one from a young adult. The IgD marker was used, together with CNA.42 that marks follicular dendritic cells (FDC) throughout their development, and CD55 that marks FDCs in reactive lymphoid tissues [59]. CD38 marks GC B cells. Residual GCs can be found at a low frequency in the spleen of young adults, whereas germinal centers are always numerous and prominent in spleen samples from young children



be boosted by cross-reacting orthopoxviruses since we have never observed any positive reaction against vaccinia virus with memory B cells of young, non-vaccinated people (Huetz et al., in preparation).

What can we learn from these long-lived memory B cells as far as their generation and behavior in front of a boost or a persisting antigen? V_H genes in long-lived anti-vaccinia memory B cells carried on average 10–20 mutations, implying that this may reflect the formation of the memory pool during the vaccination protocol (Huetz et al., in preparation). In a recent report on memory B cells from individuals who survived the 1918 influenza pandemic, and taking into account that these memory B cells were most probably boosted by the 1930 cross-reacting influenza infection, their V_H genes displayed up to 32 mutations [28]. In the case of a persistent infection such as HIV, up to 60 mutations per V_H gene could be observed in HIV-specific memory B cells [29]. It seems therefore that, as in mice, humans generate their memory pool at the beginning of the response with a frequency of mutations in the lower range as compared to GC centroblasts. Upon a boost, which can happen some years after, memory B cells display a higher frequency of mutations implying either that ongoing GCs have continuously fed hypermutated B cells into the memory pool and/or that IgM (and possibly some IgG) memory B cells have gone back to GCs to undergo a new round of SHM [30].

The fact that these memory B cells can remain in the spleen throughout life ready to react to their cognate antigen remains a puzzling biological phenomenon. It has been proposed, according to their *in vitro* properties, that

memory B cells could proliferate *in vivo* and give rise to plasmocytes under bystander stimulations generated by unrelated immune responses [31]. It is difficult to imagine that such long-lasting memory could be maintained for a lifetime by constant stimulation, considering the number of cell divisions this would imply. Conversely, one could imagine for these memory B cells a quiescent state in a privileged niche in which they would be protected from the surrounding milieu. This status could then be reminiscent of what has been proposed for naive T cells in which an inaccessible compact chromatin prevents any cytokine stimulation unless the antigen receptor is specifically stimulated [32].

Human IgM B cells with a mutated Ig receptor: marginal zone B cells, IgM memory or B1 cells?

The human and mouse B cell compartment are not easily comparable, with species-specific differences in terms of surface markers (e.g., CD38, CD27) and proportion of effector subsets. Among both splenic and blood B cells in humans, around 70 % of cells are naive $CD27^-$ B cells and 30 % are $CD27^+$ B cells which are composed equally of switched B cells (15 %) and IgM^+IgD^+ B cells (15 %), with IgM-only B cells representing a minor population (1 %) [33, 34].

The marginal zone (MZ) B cell population could be a paradigmatic example of such divergences. In mice, it is widely accepted that MZ B cells are a separate lineage, along which immature B cells engage following a complex

array of signals: among those are signals triggered by the Notch2 pathway, tonic signaling from the BCR, signals mediated by survival factors and through distinct NF- κ B activators (e.g., the MALT1-Bcl10-CARD11 complex) [35]. Mouse MZ B cells bear an unmutated BCR, reside in the splenic marginal zone and do not recirculate, and respond rapidly to blood borne T-independent antigens, giving rise to IgM and IgG3 antibody-secreting cells. In humans, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells present a similar surface phenotype (IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD23⁻CD1c^{high}) and reside in the marginal zone of the spleen, but they carry a mutated Ig receptor and are recirculating [36].

The presence of somatic mutations in the Ig genes of this subset has nevertheless fostered an alternate interpretation on the origin of IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells, which would accordingly be the result of a T-dependent response and represent IgM memory B cells that exited the germinal center reaction prior to isotype switch. We have reviewed recently the developmental and functional characteristics of human marginal zone B cells that led us to propose that they may constitute a separate B cell diversification pathway [34], and, on the other side, a thorough critical evaluation of these arguments has been developed by Tangye and colleagues [37].

Molecular footprints of a germinal center experience in the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cell subset

Recently, a paper from the group of R. Küppers has brought solid arguments for the existence of a germinal center-derived IgM B cell population in human adult blood [38], which, together with the parallel description by our group of long-lasting antigen-specific IgM B cells in the mouse, strongly shifted the balance toward the IgM memory proposition. In this paper, a thorough analysis of clonal relationships through CDR3-specific amplification identified around one tenth of randomly selected V-D-J

junctions from switched B cells as being present within the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ compartment, based on a sample size that represent 1–2 % of total blood. The second argument was the presence of mutations in the *BCL6* gene in IgM⁺IgD⁺CD27⁺ cells, a gene activated during the germinal center reaction and preventing the premature detection of AID-induced DNA lesions through transcriptional repression of DNA damage response genes [39]. However, whatever the site where diversification of the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ subset may take place, it is not unreasonable to assume that a similar BCL6-mediated control might be required outside the strict germinal center response to allow for mutation accumulation and to prevent DNA damage-induced apoptosis.

While these data obviously establish a direct filiation between (at least some) IgM⁺IgD⁺CD27⁺ and switched B cells in adult blood, should we conclude that the existence of an IgM memory compartment accounts for all the properties of the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ subset, both in spleen and blood, in adults and in infants? We would like to briefly summarize some of the recent data, most of which concern developmental/differentiation aspects, which clearly document a distinct behavior of the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ subset compared to switched memory B cells.

Distinct repertoire diversification of the various B cell subsets during B cell ontogeny in infants

IgM⁺IgD⁺CD27⁺ and switched B cells develop in parallel in infants (Fig. 3 and [34]). T-dependent germinal center responses appear soon after birth, while immune responses to T-independent antigens remain defective during the first years of life. Up to 3 years of age, germinal center B cells can represent up to 20 % of the total splenic B cell population, a value indicative of the strong immune activation induced by childhood vaccinations [34]. We took advantage of this functional dissociation to analyze the

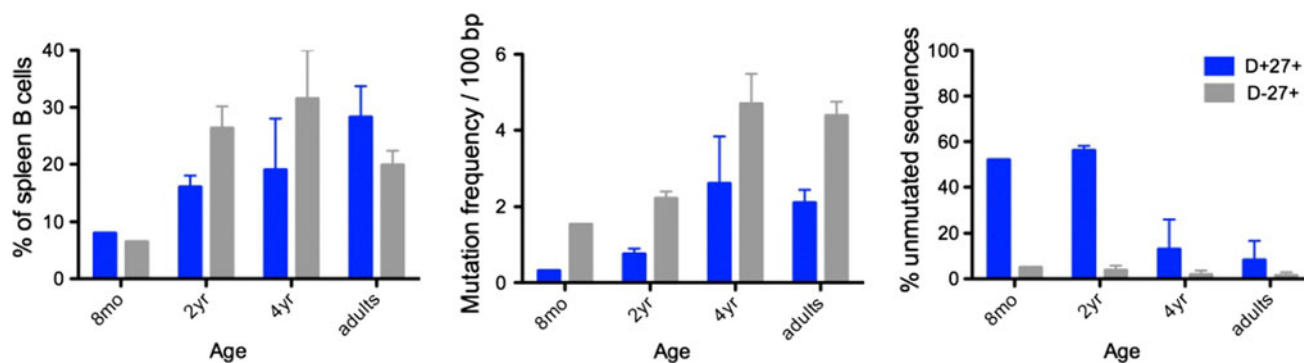


Fig. 3 Ontogeny of spleen CD27⁺ subsets and Ig gene mutations. Spleen samples from one infant at 8 months, three children around 2 years of age and two around 4 years, together with three adults, were analyzed for the proportion of IgM⁺IgD⁺CD27⁺ (D⁺27⁺) and

switched (D⁻27⁺) B cell subsets among total splenic B cells, the Ig mutation frequency (estimated on a 341 bp fragment from the rearranged J_H4–J_H5 intron), and the proportion of unmutated sequences among them ([40] and Descatoire et al., in preparation)

complexity of the repertoire of various B cell subsets from blood or spleen of young children. Using CDR3 spectratyping and sequencing of specific V_H rearrangements with defined CDR3 sizes, we were able to show that the repertoire of $IgM^+IgD^+CD27^+$ B cells was very large, like the one of naive B cells, and displayed no clonal amplification, hallmarks of antigen-induced activation and selection, whether mutated or unmutated sequences were analyzed (see below) (Fig. 4) [40]. By contrast, the repertoire of switched B cells, either in blood or in spleen, appears much more restricted. The presence of abundant germinal centers in these spleen samples allowed the specific analysis of GC B cells, both at the switched and at the early IgM expressing stages (Fig. 4). Most strikingly, repertoire restriction and clonal amplification were already manifest at the IgM^+ germinal center stage, making unlikely a direct filiation between a population displaying antigen-mediated selection and a population that lacks such imprint [40].

A marked difference was also observed in the ontogeny of mutations between splenic $IgM^+IgD^+CD27^+$ and switched B cells (Fig. 3) [40]. While most of Ig sequences from switched B cells harbored mutations, about half of the $IgM^+IgD^+CD27^+$ V_H sequences remain unmutated during the first 2 years of life, revealing a much slower accumulation of mutations during early development, in spite of the early acquisition of a CD27 marker.

Distinct ontogeny of $IgM^+IgD^+CD27^+$ B cells during recovery from B cell depleting therapies

B cell depleting therapies mediated by anti-CD20 antibodies (Rituximab) are now used to treat a number of autoimmune diseases. Such treatments allowed the follow-up of B cell recovery in “milder” conditions as compared to the treatment of lymphomas that include a general aplasia induced by the drastic concurrent chemotherapy. Such analyses have delineated new intermediates in the B

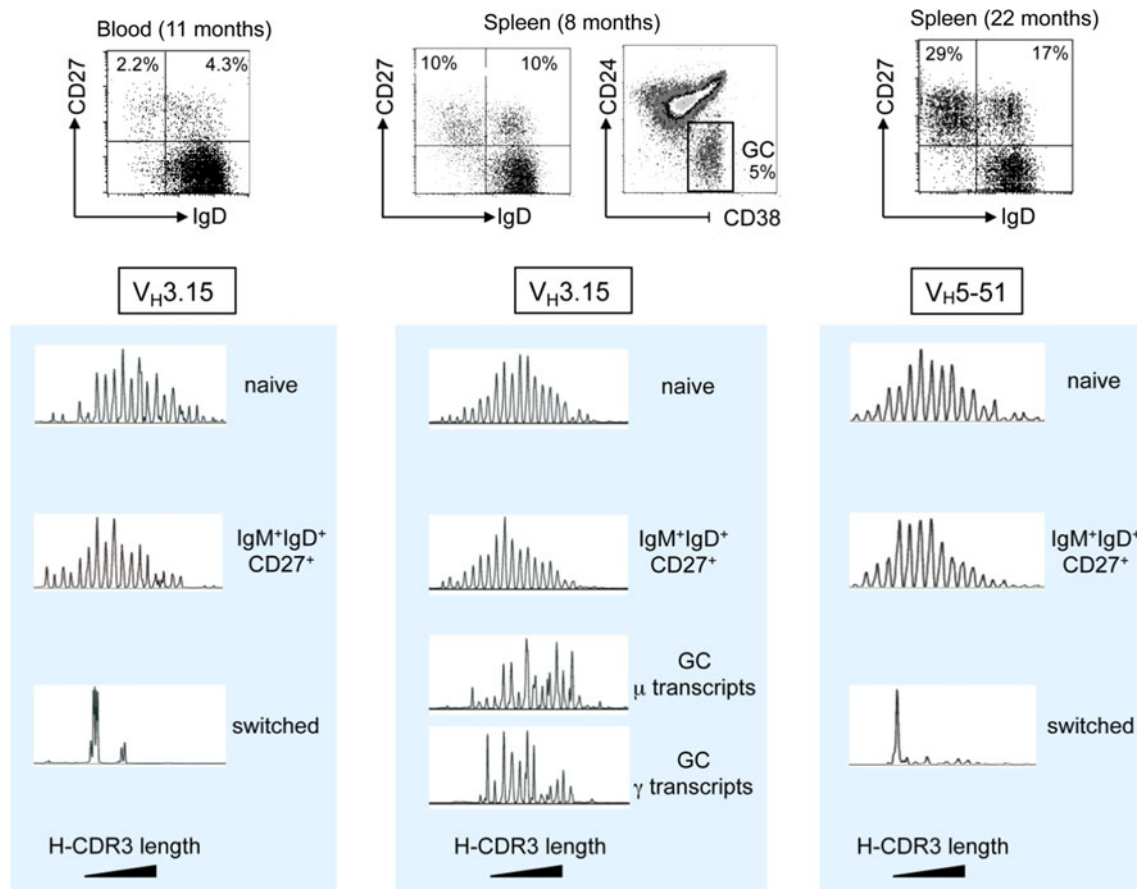


Fig. 4 Heavy-chain CDR3 spectratyping of blood and splenic subsets from young children. Blood and spleen samples at the indicated ages were sorted into naive (IgD^+CD27^-), $IgM^+IgD^+CD27^+$, and switched (IgD^-CD27^+) subsets, as well as into germinal center (GC) B cells ($CD24^-CD38^+$) for the 8-months spleen sample. Spectratyping for the V3-15 or the V5-51 genes was performed using μ or γ primers, according to the subset analyzed. Increasing CDR3

sizes are represented from left to right. A marked reduced diversity in CDR3 sizes is observed for switched cells and is already apparent for the IgM^+ germinal center stage, which was confirmed by sequencing for some CDR3 peaks [40]. In spite of a large size distribution similar to naive cells, $IgM^+IgD^+CD27^+$ cells always display a 1–2 amino acids shift in average CDR3 sizes, a phenotype also described for mouse marginal zone B cells [60]

cell maturation pathway (e.g., a “T3” transitional stage) [41]. They have also revealed a slow recovery of the CD27⁺ B cell fraction in the blood, persisting several years after treatment [42, 43]. Interestingly, this delayed reconstitution appeared more pronounced for the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ subset, and affected as well the Ig mutation frequency that failed to reach the level of healthy adults over the 6-year period of the study [43, 44]. It remains to uncover what are the factors affecting the B cell recovery process: the presence of a mature adult microenvironment, a lower impact of antigenic challenges mediated by vaccinations, a long-lasting disturbance of immune interactions generated by previous treatments, like corticoids, or even a protracted impact of the anti-CD20 depleting agent. It nevertheless establishes that, like during normal ontogeny, the acquisition of somatic mutations in the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ subset is substantially dissociated from those accumulating in switched memory B cells.

A role for Toll-like receptors in the ontogeny and homeostasis of IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells

The marginal zone lineage branches at the transitional/immature stage of B cell development, whereas IgM-memory B cells are formed during activation of naive B cells. Previous works from the groups of G. Kelsoe and T. Imanishi-Kari have shown that inflammation and/or TLR signals can drive a T-independent proliferation and accumulation of somatic mutations in immature B cells, which were shown to express a basal level of AID [45, 46]. A similar observation was made recently by R. Carsetti and colleagues for human B cells: activation of immature B cells from cord blood through TLR9 signaling was shown to induce plasmacytic differentiation and isotype switch, as well as proliferation of a subset of these cells accompanied by the acquisition of marginal zone markers (CD27⁺, CD24⁺, CD38⁻) and a low level of somatic mutation [47, 48]. Like in the mouse model, these authors proposed that signals triggered by external bacterial antigens may drive an innate-like response of Ig secretion and early Ig gene diversification after birth, creating a first line of defense against invading bacteria. These cells would then throughout life ensure protection against further infections. Whereas the relevance of this process to *in vivo* B cell differentiation remains to be demonstrated, it highlights anyway a striking T-independent diversification pathway outside classical germinal center activation.

We have taken a different approach to study the role of TLR signals in the human B cell lineage, through the analysis, in collaboration with the group of J.-L. Casanova, of patients deficient for essential mediators of the TLR signaling pathway: MyD88, IRAK4 (which both affects signaling through all TLRs except TLR3), and Unc93B

(which only affects the proper endosomal localization of nucleic acid sensors, TLR3, 7, 8 and 9) [49–51]. A marked reduction of IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells in presence of a normal switched subset was observed in the case of IRAK4- and MyD88-deficient children and young adults while no specific alteration was observed in Unc93B-deficient patients, with normal Ig mutation frequencies in all cases (Weller et al., submitted). The role of TLR9 thus appears facultative, pointing to the role of other TLRs, like possibly the B cell-specific TLR10, in this deficit. The fact that this deficit was not compensated as patients aged, suggest a role of TLRs in the specific homeostatic maintenance of IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells. Interestingly, it also indicates that, in spite of the recent implication of MyD88 in a TACI-mediated isotype switch process, MyD88- or IRAK4-deficiency does not impact the peripheral pool of IgG⁺ and IgA⁺ memory B cells *in vivo* [52].

Distinct repertoire features revealed by a deep-sequencing analysis of the different B cell subsets from adult blood

A high throughput analysis of V_H sequences from blood samples of three adult donors was reported recently [53]. No clonal relationships were found among 1700 sequences from IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells and 2,000 from switched IgG⁺ and IgA⁺ B cells. Even though the sample size analyzed was very large, this sequencing obviously lacked the sensitivity of the approach developed by R. Küppers and colleagues. Nevertheless, clonal relationships within each subset were recurrently found, with larger and more frequent clonal amplifications among switched B cells. The most striking difference observed concerned the V_H repertoire, with a distinct V_H usage affecting most importantly the V_H1 and V_H3 families: a twofold higher ratio for the V_H3 and a 20-fold lower ratio for V_H1 for IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells compared to switched cells. Such a marked V_H bias, together with other minor differences, indicates a minima that different selective forces are shaping the repertoire of these two subsets.

A human B1 cell compartment?

A newcomer among human B cell subsets is the B1 cell compartment, a long-searched equivalent of the mouse B1 cell lineage present in the spleen and the peritoneal cavity and which is responsible for most of the spontaneous IgM production in this species. This subset, identified through the CD43 marker, and being IgD⁺CD27⁺, displayed B1 cell characteristics, i.e., spontaneous BCR tonic signaling, a low level of spontaneous IgM plasmocyte production, and a capacity to drive allogenic T cell proliferation [54]. Curiously enough, this subset was shown to comprise

around 40 % of CD27⁺ B cells in adults, while declining in the elderly, a proportion quite similar to the one of IgM⁺IgD⁺CD27⁺ cells. These figures raised the question as to whether B1 cells and IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells were simply superimposable, which would have united the human equivalent of mouse circulating B1 and splenic marginal zone B cells in the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ compartment as a unique subset with innate-like properties [55, 56]. However, serious concerns have been formulated recently about the effective size of this human B1 population, and, consequently about its intrinsic properties [57, 58].

In conclusion, marginal zone, IgM memory, or B1 B cells? Major differences between classical memory and IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells remain, concerning mainly their ontogeny and the signals mediating their selection/survival. Later on in adult life, the identity and possible heterogeneity of the IgM⁺IgD⁺CD27⁺ subset, be it in blood or in spleen, obviously appears as an unsettled issue.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Cozine CL, Wolniak KL, Waldschmidt TJ (2005) The primary germinal center response in mice. *Curr Opin Immunol* 17:298–302
- Mandel TE, Phipps RP, Abbot AP, Tew JG (1981) Long-term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immunized mice. *Immunology* 43:353–362
- Gray D, Skarvall H (1988) B cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336:70–73
- Bachmann MF, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM (1996) Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 183:2259–2269
- Zinkernagel RM (2002) On differences between immunity and immunological memory. *Curr Opin Immunol* 14:523–536
- Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K (2000) Memory B cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 407:636–642
- Schitteck B, Rajewsky K (1990) Maintenance of B cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346:749–751
- Vora KA, Tumas-Brundage K, Manser T (1999) Contrasting the in situ behavior of a memory B cell clone during primary and secondary immune responses. *J Immunol* 163:4315–4327
- Siekevitz M, Kocks C, Rajewsky K, Dildrop R (1987) Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. *Cell* 48:757–770
- Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK (2011) Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 331:1203–1207
- Benson MJ, Elgueta R, Schpero W, Molloy M, Zhang W, Usherwood E, Noelle RJ (2009) Distinction of the memory B cell response to cognate antigen versus bystander inflammatory signals. *J Exp Med* 206:2013–2025
- Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Megret J, Storck S, Reynaud CA, Weill JC (2009) Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 10:1292–1299
- Takahashi Y, Ohta H, Takemori T (2001) Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14:181–192
- Ridderstad A, Tarlinton DM (1998) Kinetics of establishing the memory B cell population as revealed by CD38 expression. *J Immunol* 160:4688–4695
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708–712
- Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhari G, Skokos D, Kosco-Vilbois MH, Dustin ML, Nussenzweig MC (2007) In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446:83–87
- Tomayko MM, Steinel NC, Anderson SM, Shlomchik MJ (2010) Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *J Immunol* 185:7146–7150
- Heyman B (2003) Feedback regulation by IgG antibodies. *Immunol Lett* 88:157–161
- Obukhanych TV, Nussenzweig MC (2006) T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* 203:305–310
- Pierce SK, Liu W (2010) The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences. *Nat Rev Immunol* 10:767–777
- Engels N, Konig LM, Heemann C, Lutz J, Tsubata T, Griep S, Schrader V, Wienands J (2009) Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat Immunol* 10:1018–1025
- Liu W, Meckel T, Tolar P, Sohn HW, Pierce SK (2010) Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling. *Immunity* 32:778–789
- Zehn D, Lee SY, Bevan MJ (2009) Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458:211–214
- Steiniger B, Trabant M, Barth PJ (2011) The follicular dendritic cell network in secondary follicles of human palatine tonsils and spleens. *Histochem Cell Biol* 135:327–336
- Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R (2003) Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* 171:4969–4973
- Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, Faili A, Staib C, Garcon L, Hermine O, Beyne-Rauzy O, Fieschi C, Pers JO, Arakelyan N, Varet B, Sauvanet A, Berger A, Paye F, Andrieu JM, Michel M, Godeau B, Buffet P, Reynaud CA, Weill JC (2008) The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood* 111:4653–4659
- Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK (2007) Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 357:1903–1915
- Yu X, Tsibane T, McGraw PA, House FS, Keefer CJ, Hicar MD, Tumpey TM, Pappas C, Perrone LA, Martinez O, Stevens J, Wilson IA, Aguilar PV, Altschuler EL, Basler CF, Crowe JE Jr (2008) Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* 455:532–536
- Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC (2009) Broad diversity of neutralizing

- antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458:636–640
30. Bende RJ, van Maldegem F, Triesscheijn M, Wormhoudt TA, Guijt R, van Noesel CJ (2007) Germinal centers in human lymph nodes contain reactivated memory B cells. *J Exp Med* 204:2655–2665
 31. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A (2002) Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199–2202
 32. Rawlings JS, Gatzka M, Thomas PG, Ihle JN (2011) Chromatin condensation via the condensin II complex is required for peripheral T-cell quiescence. *EMBO J* 30:263–276
 33. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R (1998) Human immunoglobulin (IgM + IgD + peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188:1679–1689
 34. Weill JC, Weller S, Reynaud CA (2009) Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27:267–285
 35. Pillai S, Cariappa A (2009) The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 9:767–777
 36. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC (2004) Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104:3647–3654
 37. Tangye SG, Good KL (2007) Human IgM+CD27+B cells: memory B cells or “memory” B cells? *J Immunol* 179:13–19
 38. Seifert M, Kuppers R (2009) Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM⁺(IgD⁺)CD27⁺ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med* 206:2659–2669
 39. Klein U, Dalla-Favera R (2008) Germinal centres: role in B cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8:22–33
 40. Weller S, Mamani-Matsuda M, Picard C, Cordier C, Lecoecue D, Gauthier F, Weill JC, Reynaud CA (2008) Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM⁺IgD⁺CD27⁺B cell repertoire in infants. *J Exp Med* 205:1331–1342
 41. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, Looney RJ, Sanz I, Anolik JH (2009) Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol* 182:5982–5993
 42. Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ, Sanz I (2007) Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 56:3044–3056
 43. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP (2006) Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54:2377–2386
 44. Muhammad K, Roll P, Einsele H, Dorner T, Tony HP (2009) Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IgD⁺CD27⁺ memory B cell receptors after rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 60:2284–2293
 45. Han JH, Akira S, Calame K, Beutler B, Selsing E, Imanishi-Kari T (2007) Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity* 27:64–75
 46. Ueda Y, Liao D, Yang K, Patel A, Kelsoe G (2007) T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol* 178:3593–3601
 47. Aranburu A, Ceccarelli S, Giorda E, Lasorella R, Ballatore G, Carsetti R (2010) TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. *J Immunol* 185:7293–7301
 48. Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, Seganti G, Zuntini R, Ferrari S, Cagliuso M, Quinti I, Carsetti R (2008) CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 180:800–808
 49. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammass D, Davies G, Al-Ghonaum A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidal MA, Ozinsky A, Casanova JL (2003) Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299:2076–2079
 50. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Sirvent N, Guedes M, Vitor AB, Herrero-Mata MJ, Arostegui JI, Rodrigo C, Alsina L, Ruiz-Ortiz E, Juan M, Fortuny C, Yague J, Anton J, Pascal M, Chang HH, Janniere L, Rose Y, Garty BZ, Chapel H, Issekutz A, Marodi L, Rodriguez-Gallego C, Banchereau J, Abel L, Li X, Chaussabel D, Puel A, Casanova JL (2008) Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321:691–696
 51. Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouangy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Senechal B, Geissmann F, Tabeta K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Heron B, Mignot C, de Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L, Casanova JL (2006) Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314:308–312
 52. He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, Shan M, Xiong H, Bussell JB, Chiu A, Puel A, Reichenbach J, Marodi L, Doffinger R, Vasconcelos J, Issekutz A, Krause J, Davies G, Li X, Grimbacher B, Plebani A, Meffre E, Picard C, Cunningham-Rundles C, Casanova JL, Cerutti A (2010) The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* 11:836–845
 53. Wu YC, Kipling D, Leong HS, Martin V, Ademokun AA, Dunn-Walters DK (2010) High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B cell populations. *Blood* 116:1070–1078
 54. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL (2011) Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻. *J Exp Med* 208:67–80
 55. Martin F, Oliver AM, Kearney JF (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14:617–629
 56. Krutzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R (2003) Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* 197:939–945
 57. Descatoire M, Weill JC, Reynaud CA, Weller S (2011) A human equivalent of mouse B-1 cells?. *J Exp Med* 208:2563–2564 (author reply 2566–2569)
 58. Perez-Andres M, Grosserichter-Wagener C, Teodosio C, van Dongen JJ, Orfao A, van Zelm MC (2011) The nature of circulating CD27⁺CD43⁺ B cells. *J Exp Med* 208:2565–2566 (author reply 2566–2569)
 59. Kasajima-Akatsuka N, Maeda K (2006) Development, maturation and subsequent activation of follicular dendritic cells (FDC): immunohistochemical observation of human fetal and adult lymph nodes. *Histochem Cell Biol* 126:261–273
 60. Martin F, Kearney JF (2002) Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2:323–335