



HAL
open science

Influence de l'environnement cellulaire sur la dynamique et la sélection du répertoire des lymphocytes B chez la souris

Véronique Thomas-Vaslin

► **To cite this version:**

Véronique Thomas-Vaslin. Influence de l'environnement cellulaire sur la dynamique et la sélection du répertoire des lymphocytes B chez la souris. Immunité adaptative. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), 1990. Français. NNT: . tel-01821761

HAL Id: tel-01821761

<https://theses.hal.science/tel-01821761>

Submitted on 22 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité :

IMMUNOLOGIE

Présentée par :

Véronique THOMAS-VASLIN

pour obtenir le titre de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6**

Sujet de la Thèse

**"INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE SUR
LA DYNAMIQUE ET LA SELECTION DU REPERTOIRE
DES POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B CHEZ LA
SOURIS"**

Soutenue le 27 novembre 1990 devant le jury composé de :

Professeur	P.A. CAZENAVE	Président
Professeur	A. COUTINHO	Examineur
Professeur	M. FOUGEREAU	Rapporteur
Docteur	C. FOURNIER	Rapporteur
Docteur	A. FREITAS	Examineur

A mes parents et amis, merci de votre affection et de votre amitié.

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans l'Unité d'Immunobiologie dirigée par le Professeur Antonio Coutinho à l'Institut Pasteur de Paris. Je tiens à le remercier de m'avoir accueillie dans son laboratoire, et permis d'entrer dans le monde attractif de l'Immunologie.

Le Docteur Antonio Freitas a dirigé mes recherches avec beaucoup de patience, en respectant ma liberté de chercheur débutant, je l'en remercie vivement.

Je remercie le Professeur Pierre-André Cazenave de l'honneur qu'il me fait de présider ce Jury. Le Professeur Michel Fougereau et le Docteur Catherine Fournier ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu le plaisir de travailler dans l'Unité et dans le Département d'Immunologie, qui m'ont apporté, par leur amitié, leur compétence, leur générosité et leur bonne humeur, un soutien précieux durant ces années.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à François Huetz et à Bruno Vaslin qui ont relu ce manuscrit de façon critique. Merci à Anne Demond et Pierrette Vaslin de m'avoir aidé à corriger ce mémoire avec beaucoup de gentillesse.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
RESUME.....	2
1 INTRODUCTION.....	3
1.1 Diversité du système immunitaire.....	4
1.2 Activité autonome du système immunitaire.....	5
1.3 Etat dynamique du système immunitaire.....	7
2 RESULTATS.....	11
2.1 Approche expérimentale.....	11
2.2 Persistance de différentes populations lymphocytaires B en fonction de l'environnement.....	12
2.2.1 Propriétés intrinsèques aux populations cellulaires B.....	12
2.2.2 Propriétés de l'environnement cellulaire.....	13
a) Influence de l'environnement splénique de souris nouveau-nées sur la persistance de cellules B spléniques de souris adultes.....	13
b) Influence de l'environnement du peritoneum de souris adultes sur la persistance des cellules B spléniques de donneur adulte.....	18
2.3 Analyse du répertoire des cellules B du donneur.....	19
2.4 Origine des cellules B produisant des IgM naturelles.....	20
2.5 Mise en évidence de l'activation des cellules B du receveur par les cellules B CD5+ du donneur.....	22
3 DISCUSSION	25
3.1 Cellules B "conventionnelles" et cellules Ly-1B.....	25
3.1.1 Localisation des deux populations de cellules B.....	26
3.1.2 CD5, marqueur d'activation?.....	26
3.1.3 Deux lignées de cellules B?.....	28
a) Capacité d'auto-renouvellement des cellules B matures.....	29
b) Génération de cellules B CD5+ à partir de précurseurs Ig-.....	30
3.1.4 Répertoire exprimé par les deux populations de cellules B.....	32
3.2 Production des cellules B dans la moelle osseuse.....	36
3.2.1 Taux de production élevé, et important renouvellement des cellules B dans la moelle osseuse.....	36
3.2.2 Influence de l'environnement cellulaire sur la différenciation et la production des cellules B.....	38
a) Contrôle de la différenciation des précurseurs	38
b) Régulation du nombre de cellules produites dans la moelle osseuse.....	40

3.3	Dynamique des cellules B périphériques.....	41
3.3.1	Méthodes d'études et durée de vie des cellules B spléniques.....	41
	a) Marquage des cellules en division.....	41
	b) Déplétion des cellules en cycle.....	43
	c) Etude de la cinétique de populations lymphocytaires après leur transfert.....	44
3.3.2	Dynamique des cellules B de la cavité péritonéale.	48
3.3.3	Dynamique des cellules B durant l'ontogénie.....	49
3.4	Influence de l'environnement cellulaire sur l'activation et la persistance des cellules B.....	51
3.4.1	Mise en évidence du rôle de l'environnement cellulaire sur la persistance et la sélection des cellules B.....	51
3.4.2	Régulation du nombre et de l'état d'activation des cellules B périphériques.....	53
	a) Régulation du nombre de cellules B périphériques.....	53
	b) Régulation de l'activation des cellules B.....	55
	c) Barrière syngénique observée lors des transferts.....	57
	d) Conditions nécessaires à l'activation et à la persistance des cellules B.....	59
3.5	Sélection du répertoire des lymphocytes B.....	61
3.5.1	Analyse du répertoire des cellules B.....	62
3.5.2	Influence de l'environnement cellulaire sur la sélection du répertoire des lymphocytes B.....	64
3.5.3	Répertoire et durée de vie des cellules B.....	65
3.6	Activité fonctionnelle naturelle des cellules B.....	66
CONCLUSION		70
BIBLIOGRAPHIE.....		73

ANNEXE	88
--------------	----

Publication N°1	
A. FREITAS, P. PEREIRA, F. HUETZ, V. THOMAS-VASLIN, C. PENA-ROSSI, L. ANDRADE, A. SUNBLAD, L. FORNI, and A. COUTINHO. B cell activities in normal unmanipulated mice. 1989. in "B cells and B cells products" <i>Contributions to Microbiology and Immunology</i> Ed. P. del Guercio, J.M. Cruse. Karger. 11:1-26.....	88
Publication N°2	
V. THOMAS-VASLIN and A. FREITAS. Lymphocyte population kinetics during the development of the immune system. B cell persistence and life span can be determined by the host environment. 1989. <i>Int. Immunol.</i> 1 : 237-246.....	114
Publication N°3	
V. THOMAS-VASLIN and A. FREITAS. Population kinetics of peritoneal LPS reactive B lymphocytes. 1990. <i>Int. Immunol.</i> 2 :73-81.....	124
Publication N°4	
V. THOMAS-VASLIN , L. ANDRADE, A. FREITAS and A. COUTINHO. Clonal persistence of B lymphocytes in normal mice is determined by V-region dependent selection. <i>Soumis à publication</i>	133
Publication N°5	
V. THOMAS-VASLIN and F. HUETZ. Origin of natural IgM secreting cells : Reconstitution potential of adult bone marrow, spleen and peritoneal cells. <i>soumis à publication</i>	156

ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucleique
Ag	Antigène
B6. Igh ^a	C57Bl/6. Igh ^a
B10.Cr	C57Bl/10 Sc.Cr
BrDU	Bromodeoxyuridine
CFU-B	cellule B formant des colonies
CIS	système immunitaire central
GRSBr	globule rouge syngénique traité à la broméline
HU	Hydroxyurée
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LDA	analyse en dilution limite
LPS	lipopolysaccharide
LPS non r	non réactif au LPS
LPSr	réactif au LPS
PC	Phosphorylcholine
PFC	cellules formant des plages
PIS	système immunitaire périphérique
PMA	phorbol myristate acétate
TdT	transférase déoxynucleotidyl terminale
TI	thymo-indépendant
TNP	trinitrophénol
XID	Immunodéficience liée au chromosome X

RESUME

L'activité physiologique des cellules B chez la souris normale et plus particulièrement la dynamique des populations de lymphocytes B et les mécanismes de sélection de leur répertoire anticorps ont été étudiés. Grâce à un système de transfert de cellules entre souris histocompatibles, nous avons mis en évidence que la durée de vie des populations de lymphocytes B n'est pas inhérente aux cellules mais dépend de leur sélection par l'environnement cellulaire local et a lieu par l'intermédiaire des régions variables des immunoglobulines membranaires. En effet, alors que les cellules spléniques d'adultes meurent rapidement dans leur propre environnement, elles se divisent et persistent lors de leur transfert chez des souris nouveau-nées ou dans la cavité péritonéale de souris adultes. Nous avons montré que la sélection et la persistance des cellules B du donneur dans ces environnements, dépend de la famille de gènes VH utilisée. Un tel processus de sélection pourrait expliquer la persistance et la division des cellules B présentes chez le nouveau-né ou dans la cavité péritonéale de souris adultes, particulièrement enrichies en cellules B CD5⁺. La présence des cellules B CD5⁺ pourrait empêcher la sélection et la persistance des cellules B chez les animaux dont le système immunitaire est à l'état d'équilibre. Nous avons également mis en évidence que la population de cellules B CD5⁺ comme les cellules B CD5⁻ peut être reconstituée par le transfert de cellules spléniques, péritonéales ou Ig- médullaires, et que ces cellules participent à la sécrétion d'IgM naturelles. L'origine des cellules B CD5⁺ et leur rôle possible sur la régulation de l'activation et du nombre de cellules B est discuté.

1 INTRODUCTION

Le concept actuel du système immunitaire est celui d'un système complexe, dynamique et organisé, établi sur la diversité, l'interaction et le fort renouvellement des populations cellulaires le constituant. Ce système, cellulaire et moléculaire, organisé en réseau est doué de propriétés cognitives et anamnestiques.

Les interactions entre les récepteurs lymphocytaires et l'immunorégulation qui en découle, ont cependant été perçues très tôt, dès la fin du 19^{ème} siècle, par Erlich et plusieurs de ses collègues mais cette idée a été abandonnée (Revue par Silverstein, 1986). La "Side Chain Theory" d'Erlich fut développée par Jerne (Jerne, 1955) puis par Burnet dans la Théorie de la sélection clonale (Burnett, 1957). Le rôle du système immunitaire était alors limité à la reconnaissance et à la destruction des antigènes du monde extérieur, des agents infectieux, l'ignorance du "soi" mettant en jeu la délétion des clones auto-réactifs. L'auto-immunité était considérée comme un dérèglement accidentel, un échappement à la tolérance.

Il fallut attendre 1974, pour que Jerne postule que le système immunitaire est basé sur la formation d'un réseau d'interactions complexes. Ce réseau fait intervenir l'interaction et la reconnaissance des structures portées par les récepteurs lymphocytaires, que Jerne dénomme idiotopes et paratopes. Les interactions de ces éléments définissent le réseau idiotypique (Jerne, 1974). Jerne propose un dualisme entre la réponse positive et la réponse négative des lymphocytes, les conduisant à l'activation, la prolifération et à la différenciation terminale dans le premier cas, à la tolérance et la suppression dans le deuxième cas. Un réseau d'interaction dynamique fonctionnel est créé par l'évolution constante des interactions des récepteurs. Un deuxième niveau d'équilibre dynamique est défini par l'évolution des populations lymphocytaires, comprenant la production et la mort cellulaire.

Ce concept met en évidence que le système immunitaire est un système dynamique reposant sur l'interaction entre ses diverses populations

cellulaires, au travers de récepteurs spécifiques. Ceux-ci reconnaissent autant les molécules propres à l'individu, dont les récepteurs lymphocytaires eux-mêmes, que les antigènes du "monde extérieur". La diversité de ce système complexe et connecté est entretenue par le perpétuel renouvellement des populations lymphocytaires. Ces propriétés semblent être à l'origine de la formation autonome du système immunitaire et de son autorégulation lui permettant de rester dans un état stable.

1.1 DIVERSITE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Comme l'avait suggéré Jerne, la diversité des récepteurs lymphocytaires a lieu au niveau somatique (Jerne, 1971). Le réarrangement des gènes germinaux V, D, J, (Tonegawa, 1983), la variabilité des recombinaisons, les associations au hasard des chaînes lourdes et légères, sont autant de possibilités permettant la création de structures moléculaires différentes au niveau des régions variables des récepteurs. Le répertoire naïf théorique des cellules B correspondant à toutes ces possibilités est ainsi estimé à 10^{10} structures différentes (Berek & Milstein, 1988). Cependant, ces auteurs suggèrent qu'environ 50 à 90% des structures seraient aberrantes et ne permettraient pas la survie des cellules. Le répertoire potentiel, correspondant aux motifs moléculaires qui pourraient être effectivement créés, compte tenu également des mutations somatiques, est estimé à environ 10^9 structures différentes.

Les cellules B qui émergent du grand nombre de cellules journallement formées dans la moelle osseuse à partir des cellules souches (Opstelten & Osmond, 1983) constituent le répertoire émergent. La majorité de ces cellules B médullaires nouvellement formées, est exportée dans les compartiments périphériques (Brahim & Osmond, 1970). Cet ensemble de lymphocytes constitue le répertoire disponible. Celui-ci correspond au nombre de clones effectivement disponibles à un moment donné, et serait de l'ordre de 10^7 clones. Parmi les cellules B au repos, certaines entrent en interaction avec un antigène, sont activées, et définissent le répertoire actuel, qui comprend moins de 10^6 clones. Parmi ces cellules activées, certaines peuvent évoluer vers une différenciation terminale en plasmocytes sécrétant des anticorps et constituent le répertoire sécréteur.

Cette sélection aboutit à une population de 10^8 lymphocytes B chez la souris adulte dont le nombre total de cellules lymphoïdes matures est estimé à 3×10^8 (abstraction faite des cellules de la moelle osseuse et du thymus) (Jerne, 1984).

1.2 ACTIVITE AUTONOME DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Dans les conditions naturelles, en l'absence d'immunisation expérimentale, le système immunitaire de l'animal est soumis non seulement aux interactions propres aux éléments qui le constituent mais aussi aux interactions avec le milieu extérieur (nourriture, micro-organismes...). Les relations avec le milieu extérieur peuvent être quasiment éliminées chez des animaux axéniques, soumis à une diète de produits de bas poids moléculaires (animal "antigen free"). Ces souris ont permis de mettre en évidence l'activité autonome du système immunitaire. En effet, chez ces souris environ 15% des lymphocytes sont de grande taille et donc activés, dans des proportions similaires à celles de souris conventionnelles (Pereira et coll., 1986). L'activité naturelle et autonome des lymphocytes B, serait basée sur l'auto-réactivité (contre les idiotypes et autres auto-antigènes). Cette activité autonome se traduit par l'activation et la différenciation des cellules B en plasmocytes sécrétant des immunoglobulines d'isotype μ (IgM). Chez les souris axéniques, le nombre de plasmocytes sécrétant des IgM et la concentration des IgM sériques sont similaires à ceux d'individus normaux. Au contraire, très peu d'anticorps d'isotype IgG ou IgA y sont synthétisés (Pereira et coll., 1986, Hooijkaas et coll., 1984, Bos et coll., 1989). Les tissus associés aux muqueuses et aux viscères ainsi que les ganglions lymphoïdes de ces souris ne sont pas colonisés par les lymphocytes et ne sont pas détectables. C'est dans ces tissus que se produit normalement la commutation isotypique, lors de la stimulation des lymphocytes B par les antigènes de "l'extérieur". Ainsi, la sécrétion d'IgM est le reflet de l'activité naturelle du système immunitaire.

La présence d'un réseau idiotypique fonctionnel créé par les anticorps naturels, a été mise en évidence *in vivo* chez la souris normale. Des concentrations oscillatoires d'anticorps naturels, liés par leurs interactions idiotypiques, sont à la base du maintien du système dans un état stable. Ce système oscillatoire stable, peut d'ailleurs être perturbé pendant plusieurs

mois par l'injection d'un idiotype en quantité plus faible que celle présente naturellement (Lundkvist et coll., 1989).

Le fonctionnement du système immunitaire ne s'appuie cependant pas exclusivement sur les interactions du réseau, même si celui-ci en est le moteur. En effet, le système immunitaire répond également aux lois de la sélection clonale, qui ne peuvent être expliquées par le réseau idiotypique. Cette conception bi-fonctionnelle du système immunitaire a conduit A. Coutinho à proposer deux compartiments virtuels dans le système immunitaire :

1) Un compartiment cellulaire à activité interne, appelé système immunitaire central (CIS), représentant 10-20% des lymphocytes, dont les interactions sont basées sur le réseau idiotypique et la reconnaissance des auto-antigènes. La prolifération des lymphocytes de ce compartiment semble être très régulée et limitée à un ou deux cycles cellulaires.

2) Un compartiment cellulaire à activité externe, appelé système immunitaire périphérique (PIS), comprenant 80-90% des lymphocytes, indépendant du réseau, pour la majorité au repos mais pouvant répondre aux stimulations antigéniques extérieures par des proliférations clonales de grande amplitude et obéissant à la théorie de la sélection clonale (Coutinho et coll., 1989).

La division du système immunitaire en deux compartiments est fonctionnelle et repose sur son évolution dynamique, ce qui implique que certains clones peuvent passer d'un compartiment à l'autre en fonction des interactions des populations avec leur environnement. Ainsi, le CIS semble être le moteur permettant l'établissement d'un système immunitaire fonctionnel, dans lequel on trouve les lymphocytes naturellement activés. L'activité de ce compartiment semble très importante durant l'ontogénie lors de l'établissement du répertoire des lymphocytes. En effet, une forte proportion des lymphocytes est auto-réactive et poly-réactive durant l'ontogénie (Holmberg et coll., 1984, Holmberg et coll., 1986a) et contribuerait à l'établissement du répertoire des lymphocytes T et B (Martinez-A. et coll., 1988).

1.3 ETAT DYNAMIQUE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Si la réponse du système immunitaire face à d'innombrables antigènes expérimentaux et agents pathogènes a été largement étudiée, on est néanmoins surpris de constater que l'activité physiologique du système immunitaire est encore mal connue. En effet, les mécanismes de tolérance au soi, la mémoire immunitaire, ainsi que les dérèglements du système immunitaire conduisant à des maladies auto-immunes, aux lymphoproliférations ou à l'allergie restent inexpliqués.

Quels sont les mécanismes de régulation qui régissent la production, le renouvellement des populations lymphocytaires, la sélection et l'activation naturelle des clones lymphocytaires? Comment le répertoire des lymphocytes est-il sélectionné durant l'ontogénie et comment est-il maintenu dans des conditions d'équilibre à l'âge adulte alliant "auto-réactivité" et "tolérance" au soi ?

La connaissance de tels mécanismes nécessite une approche globale du fonctionnement du système immunitaire *in vivo*, faisant intervenir les interactions des cellules et des molécules dans leur ensemble, qui ne soit pas restreinte à l'échelle individuelle, celle-ci assurant cependant les fondements de nos connaissances. Ainsi, c'est à l'échelle des populations lymphocytaires, et de leur environnement que nous tenterons d'appréhender les mécanismes régissant le fonctionnement du système immunitaire.

Les études concernant la dynamique des populations lymphocytaires montrent que la forte production de cellules B par la moelle osseuse (3 à 5 x 10⁷ cellules/jour) et leur exportation dans les organes périphériques (Brahim & Osmond, 1970) suffisent à renouveler totalement la population de lymphocytes périphériques (10⁸) en 2 à 5 jours, (revue par Osmond, 1986). Afin que le système immunitaire de l'adulte reste dans un état d'équilibre, on peut s'attendre à une forte mortalité de cellules B dans les compartiments périphériques. Cependant, il doit nécessairement s'établir une sélection de certains clones entre leur production et l'activité fonctionnelle d'un centième d'entre eux, qui entrent dans le répertoire actuel. Ces lymphocytes naturellement activés, définissent le répertoire actuel naturel, largement enrichi en cellules auto-réactives et connectées par leurs idiotypes (Holmberg et coll., 1984; Holmberg et coll., 1986a et b; Portnoi et coll., 1986).

Ces lymphocytes sélectionnés naturellement par les antigènes présents dans l'individu pourraient avoir une dynamique différente des petits lymphocytes non sélectionnés par des antigènes.

L'étude de la dynamique des populations lymphocytaires dans les organes périphériques a fait l'objet de nombreux travaux. Des résultats très divers, concernant la durée de vie des lymphocytes B et leur renouvellement, ont été publiés. La critique des méthodes expérimentales employées (Freitas et coll., 1986 a, Rocha et coll., 1990) permet cependant aujourd'hui d'éclairer le débat, et les derniers résultats arrivent à un consensus. L'ensemble de ces études montre que les lymphocytes B périphériques sont effectivement renouvelés très rapidement à partir des cellules de la moelle osseuse (Osmond, 1986 ; Rocha et coll., 1990) et ont des durées de vie courtes pour la majorité d'entre eux. En effet, il a été estimé qu'environ 80% des lymphocytes B ont des durées de vie inférieures à 7 jours et meurent vraisemblablement à l'état de petites cellules avant d'avoir interagi avec un antigène. Certains lymphocytes B (environ 5% des cellules B produites par jour) sont sélectionnés par un antigène et incorporés dans la population des grandes cellules B activées (Freitas et coll., 1986b, Coutinho et coll., 1990). Ceux-ci peuvent s'orienter soit vers quelques cycles de division, une différenciation terminale et la sécrétion d'immunoglobulines ou retourner à l'état de petites cellules B au repos à vie longue (cellules mémoires?)(revue Freitas et coll., 1986b).

La dynamique des cellules T est moins bien connue que celle des lymphocytes B. On peut cependant signaler que les précurseurs des cellules T provenant de la moelle osseuse se différencient dans le thymus où une forte mortalité cellulaire intervient (revue Scollay et coll., 1986). Les cellules T matures sont exportées du thymus vers les organes périphériques, où elles sont capables de proliférer, notamment dans la rate et de persister durant plusieurs mois par leur renouvellement périphérique. Le compartiment de cellules T matures $\alpha\beta$ est donc renouvelé rapidement, par les cellules T matures provenant du thymus et assurant seulement 1/3 du renouvellement journalier, le reste étant assuré par la prolifération périphérique (Freitas et coll., 1982, Freitas et coll., 1986b Stutman, 1986, Rocha, 1987). Le nombre de cellules T et la prolifération périphérique sont soumis à une étroite régulation (Rocha et coll., 1989). Les cellules T $\gamma\delta$ semblent être au contraire peu renouvelées (A. Bandeira, communication personnelle).

Nous avons délibérément choisi de restreindre notre étude à la dynamique des populations de cellules B et à la sélection de leurs répertoires, en fonction de l'environnement des différents compartiments cellulaires présent *in vivo*. Au cours des dernières années, une petite sous-population de cellules B portant le marqueur Ly-1 ou CD5 à leur surface, (cellules Ly-1B) a été mise en évidence (revues Herzenberg et coll., 1986, Hardy & Hayakawa, 1986, Hayakawa & Hardy, 1988, Kipps, 1989). L'origine de ces cellules n'a pas encore été déterminée. Ces cellules Ly-1 B sont essentiellement présentes durant l'ontogénie puis dans les cavités coelomiques des souris adultes. Elles auraient des propriétés dynamiques différentes des cellules B "conventionnelles" et pourraient jouer un rôle important dans la sélection du répertoire des autres lymphocytes (Martinez-A. et coll., 1988) et la régulation de l'activité du système immunitaire. Nous nous sommes donc intéressés au comportement dynamique et au rôle de ces populations cellulaires B dans le fonctionnement physiologique du système immunitaire durant l'ontogénie et à l'âge adulte.

Nous avons étudié les propriétés dynamiques des populations de cellules B durant l'ontogénie, période où le système immunitaire est en formation et où une accumulation de cellules B se produit. Cette période est cruciale pour l'établissement d'un réseau fonctionnel et du répertoire. Nous nous sommes intéressés également à la dynamique des populations de cellules B chez la souris adulte dont le système immunitaire est dans un état d'équilibre, la production cellulaire étant égale à la mortalité cellulaire.

Nous avons analysé les propriétés dynamiques des cellules B de la rate de souris adultes qui représentent principalement les cellules B "conventionnelles", alors que les cellules de la rate de nouveau-nés et de la cavité péritonéale de souris adulte sont enrichies en cellules Ly-1 B.

D'autre part, l'influence de l'environnement de ces divers compartiments cellulaires et le rôle des cellules Ly-1B sur la dynamique des populations de lymphocytes B et la sélection de leur répertoire ont été abordés. En effet, le système immunitaire est soumis aux variations de l'environnement, ceci induisant des perturbations qui déplacent son état d'équilibre vers un autre. Le système immunitaire lui-même, constitue une partie de cet environnement par les interactions qui agissent sur chaque élément le composant, ainsi que tous les antigènes synthétisés par l'individu. Les antigènes apportés par "l'extérieur" tels les bactéries, virus et micro-

organismes, la nourriture ou un antigène expérimental, agissent également sur le système immunitaire. Pour aborder le fonctionnement physiologique et naturel du système immunitaire, on doit éviter l'apport volontaire d'antigènes de "l'extérieur", c'est pourquoi notre étude a porté sur des souris normales non immunisées. L'environnement cellulaire naturel est différent d'un instant à l'autre et d'un compartiment cellulaire à un autre, pour chaque lymphocyte. Cependant au niveau d'une population cellulaire, nous considérerons que l'environnement de la rate d'une souris adulte est similaire à celui de la rate d'une autre souris adulte de même âge et de même souche. Au contraire, nous considérerons que l'environnement cellulaire de la rate et celui de la cavité péritonéale d'une même souris sont différents et que l'environnement dans un même compartiment évolue durant l'ontogénie. Ainsi le système immunitaire est à la fois très stable dans la composition de ses populations et de ses répertoires, mais également très flexible et capable de s'adapter très rapidement aux variations auxquelles il est soumis, grâce à son caractère dynamique. De plus, la dégénérescence des interactions de ses récepteurs (Jerne, 1955) confère au système immunitaire la capacité de reconnaître une infinité de molécules et il apparaît donc comme complet (Coutinho, 1980).

Nos travaux nous ont permis d'examiner l'influence de l'environnement cellulaire naturel, tel que nous venons de le définir, sur la persistance, la durée de vie, la sélection des populations lymphocytaires B et sur le répertoire exprimé par leurs récepteurs, ainsi que leur activité fonctionnelle. Nous allons maintenant présenter puis discuter des résultats obtenus, en les replaçant dans le contexte des connaissances actuelles.

2 RESULTATS

2.1 APPROCHE EXPERIMENTALE

Afin d'étudier la cinétique des populations de cellules B et l'influence du micro-environnement cellulaire, nous avons dans la plupart de nos expériences fait appel à des systèmes de transferts cellulaires entre animaux histocompatibles. Ceux-ci permettent de suivre le comportement de populations de cellules B matures, isolées du donneur, après leur injection dans des souris receveuses et donc sans apport de cellules B nouvellement formées par la moelle osseuse. Ce système expérimental permet d'étudier l'influence de l'environnement des différents compartiments cellulaires aussi bien sur la persistance des cellules B, que sur la sélection de leur répertoire et d'étudier leur activité fonctionnelle.

Toutes les études expérimentales que nous allons présenter ont été réalisées chez des souris normales, non immunisées de souche C57Bl/6 et syngéniques ou congéniques. Nous avons utilisé différents marqueurs cellulaires et adapté différentes techniques permettant de discriminer les cellules B du donneur de celles du receveur:

1) La différence dans la capacité à répondre à un activateur polyclonal, le lipopolysaccharide (LPS), utilisé *in vitro*, permet de discriminer les cellules B de souris donneur de souche B6 répondant au (LPSr), des cellules B de souris receveuses B10.Cr histocompatibles ne répondant pas au LPS (LPS nonr). Ce système permet d'estimer la fréquence des cellules du donneur en dilution limite (Freitas & Coutinho, 1981) avec une très grande sensibilité et de détecter des fréquences de cellules du donneur très faibles (1/20000) en l'absence de réponse des cellules du receveur. Ce type de transfert permet d'analyser le répertoire disponible des cellules B du donneur, poussant en colonies en agar en présence de LPS grâce à la technique de "mRNA colonie blot assay" (Wu & Paige, 1986) qui permet de mettre en évidence l'utilisation des familles de gènes VH (Brodeur & Riblet, 1984) par l'utilisation de sondes radiomarquées.

2) La différence allotypique au niveau de la chaîne lourde des IgM permet de discriminer les cellules B de souris B6 (allotype Igh^b) et B6.Igh^a (allotype Igh^a) (Schreier et coll., 1986) et d'analyser :

- le phénotype allotypique en cytométrie de flux, (le seuil minimal de détection est d'environ 1%)

-les IgM sécrétées par le donneur ou le receveur : détermination du titre des IgM sériques en inhibition en ELISA et numération des cellules sécrétant des IgM en ELISA Spot Assay et portant l'allotype du donneur ou du receveur.

3) La combinaison des deux marqueurs : le transfert de cellules de souris B6.Igh^a (LPSr, Igh^a) chez des hôtes B10.Cr (Igh^b, LPS nonr) permet de tester éventuellement le répertoire disponible (en LDA, colonies en agar) et le répertoire actuel (en ELISA ou ELISA spot) au cours du même transfert. La conjugaison des deux propriétés nous a en outre permis de diminuer considérablement le bruit de fond dû aux cellules du receveur détecté en LDA, à des fréquences inférieures à 1/70000 en utilisant un anticorps anti-allotypique pour détecter les IgM du donneur (Publication N°4).

2.2 PERSISTANCE DE DIFFERENTES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B EN FONCTION DE L'ENVIRONNEMENT.

2.2.1 Propriétés intrinsèques aux populations cellulaires B.

Nous avons tout d'abord comparé les propriétés de persistance de différentes populations cellulaires B provenant de la rate de souris adultes ou de souris âgées de deux semaines, et des lymphocytes B provenant de la cavité péritonéale de souris adultes, après leur transfert par voie intraveineuse dans des souris adultes hôtes intacts. La persistance des cellules du donneur a été suivie dans la rate des receveurs.

Nos résultats montrent que les lymphocytes B spléniques de souris adultes disparaissent rapidement de la rate du receveur : environ 80% des cellules B présentes au jour 1, ont disparu au jour 7 après le transfert,

confirmant que les lymphocytes B de la rate de souris adultes ont pour la majorité des durées de vie courtes (Publication N°2). Au contraire, nous avons mis en évidence que la population de lymphocytes B de la rate de nouveau-nés âgés de deux semaines (Publication N°2) ainsi que les cellules B provenant de la cavité péritonéale de souris adultes (Publication N°3), sont capables de se maintenir en nombre constant, par la division des cellules, dans la rate de receveurs adultes, pendant 10 à 15 jours après leur transfert. Nous avons suggéré que les cellules B CD5⁺ dont la fréquence est élevée parmi les cellules spléniques de souris âgées de deux semaines et parmi les cellules du péritoneum pourraient contribuer à la longévité de ces populations cellulaires. La forte fréquence de cellules autoréactives et multiréactives parmi ces populations cellulaires pouvant contribuer à leur sélection sera discutée.

2.2.2 Propriétés de l'environnement cellulaire.

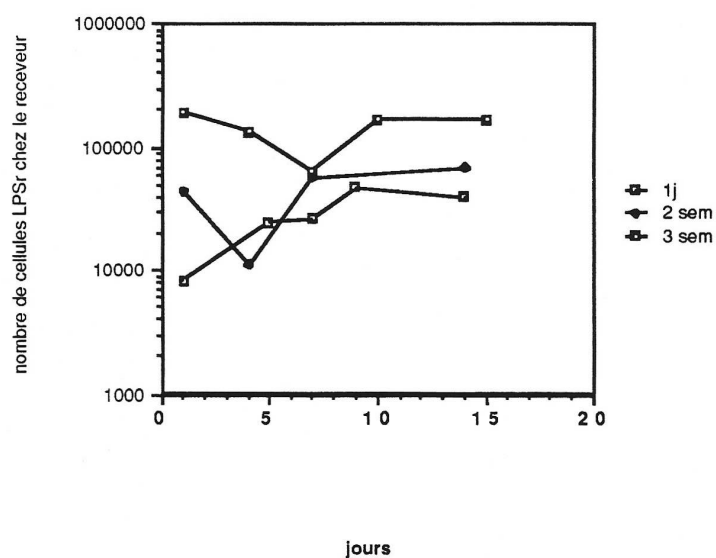
Nous avons examiné le rôle de différents environnements cellulaires sur la persistance d'une même population de lymphocytes B spléniques de souris adultes. En effet, les comportements cinétiques particuliers aux différentes populations cellulaires B analysées plus tôt, pourraient dépendre de leur interaction et de leur sélection par leur récepteur spécifique dans ces environnements.

a) Influence de l'environnement splénique de souris nouveau-nées sur la persistance de cellules B spléniques de souris adultes

L'environnement de la rate de receveurs nouveau-nés âgés de 1 jour, de 2 ou de 3 semaines, au moment du transfert par voie intraveineuse de cellules de rate de souris adultes, permet la division et la persistance de ces cellules jusqu'à ce que la souris hôte atteigne l'âge adulte. Par la suite, les cellules B du donneur meurent aussi rapidement que lorsqu'elles sont transférées chez un hôte adulte (Publication N°2).

Nous avons mis en évidence, que la possibilité de division des cellules B spléniques de souris donneurs adultes diminue, lorsque l'âge du nouveau-né receveur augmente. En effet, les courbes des cinétiques de persistance des cellules de souris adultes sont biphasiques indiquant que des populations de cellules B disparaissent alors que d'autres se divisent (Fig.1).

Figure 1 : Cinétique des cellules spléniques B LPSr provenant de souris adultes B6 dans la rate des receveurs nouveau-nés B10.Cr âgés de 1 jour, de 2 ou de 3 semaines au moment du transfert i.v.. Le nombre de cellules spléniques totales injectées est 5×10^6 cellules chez les receveurs de 1 jour et de 2 semaines et de 15×10^6 chez ceux de 3 semaines, la fréquence de réponse au LPS est en moyenne de 1/10. Chaque courbe représente la moyenne de 4 à 6 transferts cellulaires indépendants.



Les résultats présentés dans la Figure 2 et le Tableau I, mettent en évidence que le nombre de cellules B du donneur qui migrent dans la rate et qui persistent chez des receveurs âgés de 1 jour, est proportionnel au nombre de cellules injectées. Ces résultats indiquent que la migration des cellules dans la rate se fait sans contrainte, en fonction de la concentration cellulaire.

Figure 2 : Comportement des cellules B LPSr spléniques de souris adultes B6 injectées i.v., dans la rate des nouveau-nés B10.Cr agés de 1 jour au moment du transfert. Le nombre de cellules B LPSr persistant dans la rate des receveurs est proportionnel au nombre de cellules spléniques LPSr injectées (10^5 , 5×10^6 ou 20×10^6 cellules injectées, la fréquence de réponse des cellules au LPS est de 1/10)

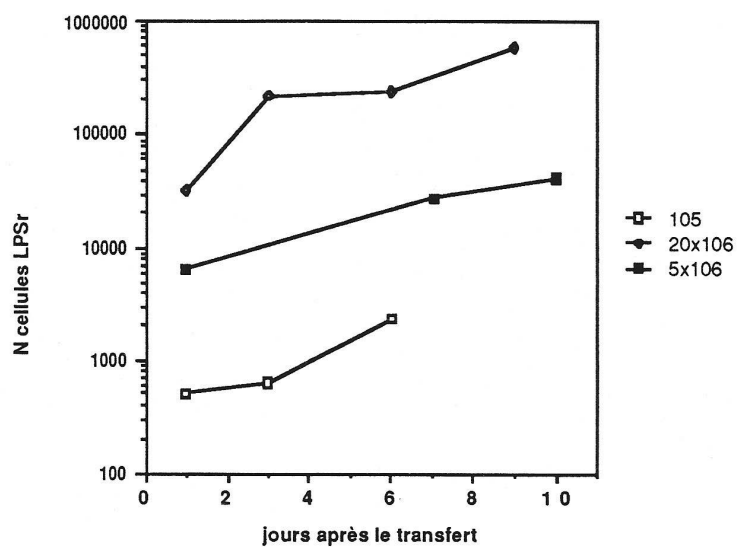


Tableau I : transfert d'un nombre variable de cellules spléniques de souris adulte dans des nouveau-nés âgés de un jour

N cellules spléniques LPSr injectées (a)	10 ⁴ (b)	0,5 x 10 ⁶ (c)	2 x 10 ⁶ (b)
N cellules LPSr jour 0 (x 10 ⁻³) (d) (%/ N de cellules injectées)	0,32 (3,2%)	6,42 (1,2%)	22,5 (1,1%)
N cellules LPSr jour 1 (x10 ⁻³) (e) (%/ N de cellules injectées)	0,49 (4,9%)	8,2 (1,6%)	32,6 (1,6%)
% cellules LPSr qui se divisent (f)	64,7	77,5	68,8

(a) La fréquence de réponse au LPS est d'environ 1/10 parmi les cellules spléniques totales du donneur adulte.

(b) Résultats obtenus pour un transfert.

(c) Moyenne des résultats de 5 transferts indépendants.

(d) Nombre de cellules LPSr obtenu par extrapolation des courbes de cinétique sur l'axe des ordonnées. Ces valeurs correspondent au nombre de cellules LPSr que l'on estime entrer en division dès le jour du transfert, dans la rate des receveurs.

(e) Nombre de cellules LPSr récupérées dans la rate des receveurs au jour 1 après le transfert.

(f) Pourcentage de cellules que l'on estime se diviser dans la rate des receveurs, dès le jour du transfert, par rapport aux cellules LPSr présentes dans la rate au jour 1, obtenu par le rapport :

$$\% \text{ Cell. LPSr qui se divisent} = \frac{\text{nombre cell. LPSr jour 0}}{\text{nombre cell. LPSr jour 1}}$$

L'extrapolation de la partie ascendante des courbes des cinétiques (Fig.1) sur l'axe des ordonnées, réalisée de façon indépendante pour chaque expérience de transfert, permet d'estimer le nombre de cellules qui entrent vraisemblablement en division dès le jour du transfert, dans les receveurs d'âges différents. Pour cela il faut considérer que la division des cellules se fait de la même façon dans les différents hôtes, et de façon homogène pour toutes les cellules B (Tableau I et II).

Tableau II : Comportement des cellules B spléniques de donneur adulte dans la rate de souris nouveau-nées selon leur âge

âge du receveur au jour du transfert	1 jour	2 semaines	3 semaines
N cellules LPSr injectées ($\times 10^{-6}$)	0,5	0,5	1,5
N cellules LPSr jour 0 ($\times 10^{-3}$) (%/ N de cellules injectées)	6,4 +/- 3,1 (1,2%)	5,9 +/- 6,2 (1,1%)	17,5 +/- 13,4 (1,1%)
N cellules LPSr jour 1 ($\times 10^{-3}$) (%/ N de cellules injectées)	8,2 +/- 3,8 (1,6%)	42,8 +/- 20,9 (8%)	273,7 +/- 3,2 (18%)
% cellules LPSr qui se divisent	77,5 +/- 3,1	14,7 +/- 11,9	6,3 +/- 4,9
N cellules nuclées/rate ($\times 10^{-6}$)	2,4 +/- 2,6	62,4 +/- 22,2	91,6 +/- 34,7

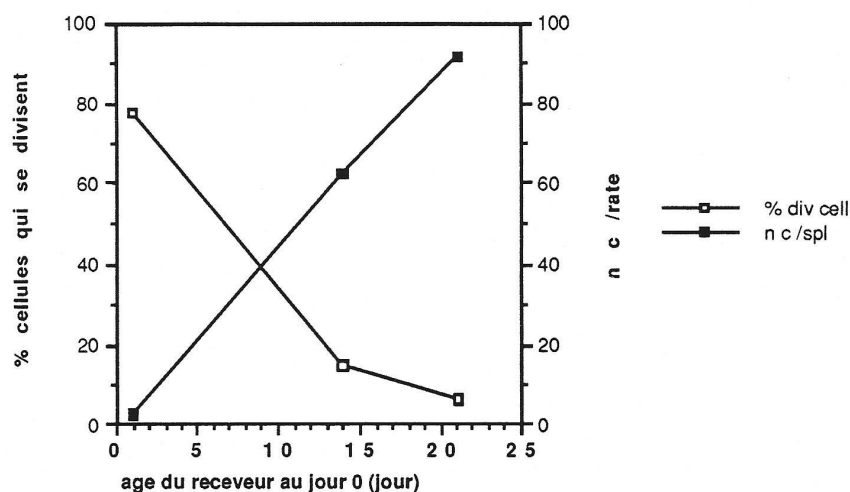
Moyennes et déviations standard des résultats de 5 transferts réalisés indépendamment dans chaque type d'hôte. Voir Tableau I pour les explications.

Ces résultats montrent que le nombre de cellules qui migrent dans la rate au jour 1 est proportionnel au nombre de cellules par rate et donc à l'âge du receveur, probablement par une augmentation des surfaces d'échange, puisque la rate augmente de volume (Tableau II). Au contraire, le pourcentage de cellules B LPSr qui se divisent à partir du jour 0 est

inversement corrélé au nombre de cellules par rate et donc à l'âge du receveur (Figure 3).

Figure 3 :

correlation inverse entre le nombre de cellules capables de se diviser au jour 0
et l'âge ou le nombre de cellules dans la rate du receveur



La sélection des cellules du donneur permettant leur division dans la rate de souris nouveau-nées semble donc être lié au nombre de cellules présentes dans la rate du receveur qui atteint des valeurs proches de celles de l'adulte vers 3 à 4 semaines et préviendrait la prolifération des cellules du donneur.

b) Influence de l'environnement du peritoneum de souris adultes sur la persistance des cellules B spléniques de donneur adulte

Nous avons également mis en évidence que l'environnement de la cavité péritonéale de receveur adulte permet la persistance et la division des lymphocytes B spléniques du donneur durant deux semaines après le transfert intra-péritonéal des cellules. Des lymphocytes B du donneur migrent du peritoneum dans la rate du receveur et s'y accumulent, vraisemblablement par une migration constante depuis le peritoneum (Publication N°4).

Cependant, les populations de cellules B que nous avons transférées et qui sont capables de persister ou de se diviser, semblent néanmoins soumises à des processus de régulation. En effet, elles ne persistent pas au-delà de deux semaines dans des hôtes adultes intacts, disparaissant rapidement au cours de la troisième semaine après le transfert (Publication N° 2, 3, 4). Au contraire, le transfert de ces mêmes cellules, dans des receveurs adultes irradiés, ou dans des hôtes nouveau-nés permet une plus grande expansion d'une fraction des cellules péritonéales injectées, et leur persistance pendant plusieurs mois (Publication N°3). Ces différences suggèrent que des mécanismes de régulation préviennent la prolifération ou la persistance excessives des cellules B normales chez la souris adulte.

En conclusion, si certaines des cellules B de la cavité péritonéale et les cellules B spléniques de souris de deux semaines se divisent et persistent, ces propriétés pourraient être le résultat de leur sélection dans leur environnement particulier et ne seraient pas des propriétés génétiques des cellules B. Les mécanismes permettant d'expliquer la persistance des cellules ainsi que la régulation du nombre de cellules seront développés dans la discussion.

2.3 ANALYSE DU REPERTOIRE DES CELLULES B DU DONNEUR

La division et la persistance des cellules B spléniques de souris adultes dans l'environnement de la rate de souris nouveau-nées ou dans la cavité péritonéale de receveurs adultes peuvent être le résultat d'une activation polyclonale non spécifique ou d'une sélection de certains clones par l'intermédiaire de leur récepteur spécifique. Le système de transfert que nous avons utilisé, nous a permis de suivre l'évolution du répertoire des cellules B du donneur et de déterminer si des changements intervenaient, reflétant un processus de sélection.

L'analyse du répertoire des cellules B spléniques du donneur adulte, par l'utilisation des familles de gènes VH met en évidence que la division des cellules spléniques du donneur adulte est le résultat d'une activation polyclonale chez les receveurs nouveau-nés. Cependant, des lymphocytes B utilisant les familles de gènes telles que J558, VH11, et VGAM3.8 se divisent davantage que d'autres. Ceci suggère qu'une sélection des cellules exprimant

ces familles de gènes a lieu par l'intermédiaire des régions variables de leurs récepteurs. On ne peut toutefois déterminer si le comportement des cellules B utilisant une même famille est homogène. Ces résultats mettent en évidence que la durée de vie courte de la majorité des cellules B spléniques de souris adultes n'est pas la conséquence de la mort programmée irréversible de ces cellules, mais témoigne de l'incapacité de l'environnement splénique de l'adulte à permettre leur sélection positive, permettant leur division ou leur survie.

La persistance des cellules B spléniques de donneurs adultes, dans la cavité péritonéale de souris adultes, est due à la sélection positive des cellules utilisant les familles de gènes VH11, J558, S107 et X24 qui persistent dans la cavité péritonéale du receveur. Au contraire, les cellules B utilisant les autres familles de gènes VH disparaissent rapidement de la cavité péritonéale, suggérant qu'elles ne sont pas sélectionnées ou qu'elles sont sélectionnées négativement. Une utilisation similaire des familles de gènes VH a été observée pour les cellules du donneur qui se sont accumulées dans la rate du receveur suggérant que la sélection des cellules B du donneur a lieu dans le péritoine, puis que les cellules migrent dans la rate indépendamment de leur réactivité.

Ces études mettent en évidence que l'utilisation préférentielle de certaines familles de gènes VH par les cellules B du donneur est la conséquence de leur sélection clonale par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques, qu'elle dépend de l'environnement local rencontré, qu'elle évolue avec le temps et serait due à des antigènes (ou des idiotypes) présents naturellement dans leur environnement.

L'ensemble de ces résultats tend à montrer que la durée de vie des cellules B n'est pas une propriété génétique des cellules mais est le résultat de leur sélection par l'environnement interne qui détermine leur comportement.

2.4 ORIGINE DES CELLULES B PRODUISANT DES IGM NATURELLES

Nous avons cherché, par la suite, quelles étaient les cellules B produisant des IgM naturelles. Nous nous sommes demandés si elles

provenaient des cellules spléniques ou de la cavité péritonéale, et si elles pouvaient se différencier à partir de précurseurs de la moelle osseuse. Nous avons, comme précédemment, réalisé des transferts de ces différentes populations cellulaires, dans des souris adultes irradiées qui permettent d'obtenir le meilleur chimérisme. Nous avons mené en parallèle une étude phénotypique et une analyse fonctionnelle de la production des IgM par les cellules du donneur et du receveur, à différents moments après les transferts.

Les cellules B sécrétant des IgM naturelles peuvent être mises en évidence après le transfert de cellules spléniques et de cellules Ig⁻ de la moelle osseuse et, dans une moindre mesure, après le transfert de cellules péritonéales (Publication N°5). Ces résultats indiquent que toutes ces populations cellulaires contiennent des cellules précurseurs de plasmocytes naturels. Dans tous les cas, nous avons observé la présence de cellules B CD5⁺ provenant du donneur et essentiellement présentes parmi les cellules larges de la cavité péritonéale ainsi que la reconstitution de cellules B CD5⁻.

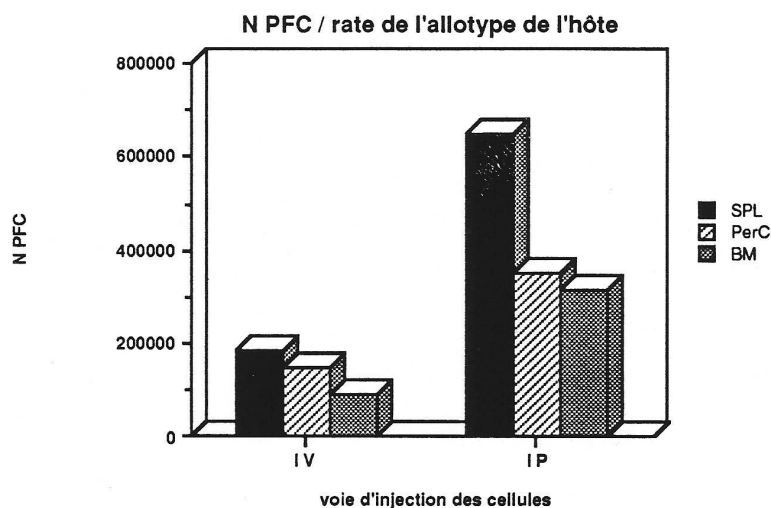
Ces expériences mettent donc en évidence que des cellules B CD5⁺ peuvent être générées à partir de cellules Ig⁻ provenant de la moelle osseuse de souris adultes. Les cellules B CD5⁺ ainsi que les cellules B CD5⁻ qui se développent à partir des cellules Ig⁻ du donneur empêchent l'apparition des cellules B CD5⁺ et CD5⁻ endogènes. Ainsi, le nombre de cellules B CD5⁺ totales dans les différents chimères est toujours constant. En conclusion, les précurseurs Ig⁻ reconstituent donc les cellules B CD5⁺ et CD5⁻ et les cellules sécrétant des IgM naturelles.

2.5 MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVATION DES CELLULES B DU RECEVEUR PAR LES CELLULES B CD5+ DU DONNEUR

Nous avons remarqué que selon la voie d'injection utilisée, intraveineuse (i.v.) ou intrapéritonéale (i.p.), les cellules B injectées chez un individu adulte ont un comportement cinétique différent (Publication N°3). La persistance d'une partie des cellules B spléniques du donneur après leur transfert i.p. chez un receveur adulte (Publication N°4), semble due à leur sélection par la partie variable des Ig, dans l'environnement cellulaire de la cavité péritoneale, alors que leur disparition est rapide après une injection i.v..

Le rôle de la cavité péritonéale sur la sélection et l'activation des cellules B nous a été confirmé par la découverte de l'activation des cellules B de l'hôte en plasmocytes, à la suite de transfert de cellules spléniques péritonéales ou médullaires de donneur adulte injectées par voie i.p. dans des hôtes adultes irradiés et qui s'autoreconstituent (Figure 4).

Figure 4 : Nombre de cellules sécrétant des IgM de l'allotype de l'hôte, dans la rate de receveurs B6 adulte irradiés, 3 mois après le transfert de $8,5 \times 10^6$ cellules spléniques ou cellules péritonéales ou de 20×10^6 cellules Ig- de moelle osseuse, provenant de souris adulte B6.Igha. Les injections ont été réalisées par voie intraveineuse (i.v.) ou intrapéritonéale (i.p.). Les résultats représentent la moyenne obtenue pour 3 souris dans chaque groupe.



Ces résultats suggèrent que les cellules du donneur injectées i.p. dont certaines sont sélectionnées positivement dans la cavité péritonéale du receveur, pourraient à leur tour sélectionner les cellules du receveur et activer leur sécrétion dans la rate. Au contraire, les cellules du donneur injectées i.v. ne sont pas sélectionnées positivement (ou en nombre non détectable) et ne peuvent interagir avec celles de l'hôte. L'activation non spécifique des cellules de l'hôte liée à l'injection intrapéritonéale paraît pouvoir être exclue, car des souris injectées i.p. avec du milieu salin sont identiques à des souris normales.

Nous nous sommes alors demandés si les cellules B CD5⁺ particulièrement fréquentes dans la cavité péritonéale, pouvaient avoir un rôle sur l'activation des autres cellules B. Nous avons injecté par voie intraveineuse chez des nouveau-nés B6 le jour de leur naissance, des cellules B CD5⁺ purifiées au trieur de cellules à partir de cellules péritonéales, et, comme contrôle, des cellules spléniques totales, provenant de souris adultes B6Igha. Un mois plus tard nous avons analysé le nombre de cellules sécrétant des IgM de l'allotype de l'hôte et du donneur (Tableau III).

Tableau III	Origine des cellules sécrétant des IgM			
	donneur (IgMa)		receveur (IgMb)	
cellules injectées	N cell ^{a)} secr/rate	conc. IgM serum ^{b)}	N. cell secr/rate	conc. IgM serum
cellules B CD5 ⁺ (2 x10 ⁵)	15000	76,5	2,5 x 10 ⁶	1050
cellules spléniques totales (2 x10 ⁷)	14130	281	148400	78

moyenne des résultats pour 2 souris par groupe.

a) Le nombre de cellules sécrétant des IgM de chaque allotype a été obtenu en ELISA spot .

b) concentration en µg/ml des IgM sériques de chaque allotype, en équivalent de protéine monoclonale purifiée, déterminé par un test d'inhibition en ELISA.

Ces résultats, encore préliminaires, mettent en évidence que les cellules B CD5⁺ injectées provoquent l'activation et la sécrétion des cellules B du receveur qui est 10 à 25 fois plus élevée que chez une souris normale ou chez les receveurs injectés avec des cellules spléniques totales. Il faut noter que ce n'est pas le nombre absolu de cellules B CD5⁺ injectées qui compte mais plutôt leur fréquence parmi les autres cellules injectées. En effet, 20 x 10⁶ cellules spléniques comprennent environ 2 x 10⁵ cellules B CD5⁺ car elles sont représentées à 1% dans la rate de souris adultes et dans ce cas nous n'avons pas observé de sélection des cellules du receveur.

3 DISCUSSION

Afin de discuter de nos résultats concernant la dynamique des populations de cellules B et de la sélection de leur répertoire, il nous semble opportun de bien définir tout d'abord les populations de cellules B, leur production et leur développement et de replacer nos résultats dans le contexte des recherches actuelles. Nous allons commencer par discuter des propriétés des deux populations de cellules B qui ont été décrites récemment.

3.1 CELLULES B "CONVENTIONNELLES" ET CELLULES LY-1B

Les populations de lymphocytes B sont hétérogènes de par leur localisation, les marqueurs présents à leur surface, leur stade de différenciation et d'activation, leurs durées de vie, et leur répertoire.

Ces différentes caractéristiques ont incité certains immunologistes, durant ces dernières années, à distinguer deux populations de cellules B : les cellules B "conventionnelles" (CD5⁻) et les cellules Ly-1B (CD5⁺).

La distinction entre ces deux populations de cellules B a fait l'objet de nombreux débats afin de déterminer si ces cellules représentent deux lignées de cellules B qui ont divergé très tôt dans l'ontogénie, ou si les cellules B CD5⁺ représentent simplement une sous-population de cellules B naturellement activées (revues par Kipps, 1989, Hayakawa & coll., 1983a, Hardy & Hayakawa, 1986, Herzenberg et coll., 1986, Hayakawa & Hardy, 1988, Wetzel, 1989). L'importance du problème ne nous semble pas tant de définir si ces cellules proviennent ou non de la même lignée, mais plutôt de définir si ces cellules ont des propriétés dynamiques et un répertoire différents des autres cellules B ce qui leur conférerait un rôle différent dans le fonctionnement du système immunitaire. Ainsi, le problème de la compréhension de leur participation dans la physiologie du système immunitaire, l'auto-immunité naturelle et dans la pathologie auto-immune, n'est pas encore résolu.

3.1.1 Localisation des deux populations de cellules B.

Chez la souris, les cellules B dites "conventionnelles" (définies par leur intensité de fluorescence membranaire par les marqueurs suivants; IgM⁺faible, CD5⁻, B220⁺fort) représentent la majorité des lymphocytes B alors que les cellules "Ly-1 B" ou CD5⁺ (IgM⁺fort, CD5⁺faible, B220⁺faible) ont été trouvées en faibles quantités parmi les grandes cellules B de la rate (Manohar et coll., 1982). Les cellules Ly-1B ne sont pas détectées dans les ganglions ni dans la moelle osseuse (Hayakawa et coll., 1983b). Au contraire, elles sont présentes à une fréquence élevée parmi les cellules que l'on peut extraire par lavage du peritoneum (Hayakawa et coll., 1986b) ou de la pleura (Marcos et coll., 1989a), et représentent plus de 60% des cellules B trouvées dans le thymus de souris normales (Miyama-Inaba et coll., 1988). Les cellules Ly-1B apparaissent en forte proportion dans la rate vers le 5^{ème} jour après la naissance, et vers le 7^{ème} jour dans la cavité péritonéale des souriceaux. Il s'opère ensuite une dilution de ces cellules parmi les autres populations de lymphocytes dont le nombre augmente plus rapidement durant l'ontogénie, diminuant ainsi le pourcentage de ces cellules chez la souris adulte (Hayakawa et coll., 1983b).

3.1.2 CD5, marqueur d'activation?

A ce jour, on connaît mal l'origine et le stade d'activation et de différenciation des cellules Ly-1B. Les cellules B CD5⁺ se développent dans des cultures de cellules spléniques *in vitro* par une croissance continue et s'établissent en des lignées cellulaires. Ces lignées ne sont pas tumorigènes, car elles n'évoluent pas en tumeurs après leur transfert chez des receveurs syngéniques (Braun, 1983). Chez l'Homme, des cellules B CD5⁺ (LEU 1) qui semblent être l'équivalent des cellules B CD5⁺ de la souris, sont également décrites. La proportion de cellules B humaines portant le marqueur CD5 peut être augmentée *in vitro*, par l'incubation des cellules avec un ester de phorbol (phorbol myristate acétate (PMA)) (Miller & Galow, 1984, Freedman et coll., 1987). De plus, la présence du marqueur CD5 peut être induite de façon transitoire sur 70% des cellules B CD5⁻ cultivées en présence de

surnageant de cellules T et du Thymome EL4. Ce protocole induit également la prolifération et la sécrétion des cellules B CD5⁺, suggérant que "CD5" est un marqueur d'activation des cellules B chez l'Homme (Werner-Favre et coll., 1989).

Au contraire, l'induction *in vitro* du CD5 n'a pu être mise en évidence sur les cellules B CD5⁻ de souris, cultivées en présence de LPS (Hayakawa et coll., 1984). Ce résultat ne peut toutefois exclure que d'autres conditions, peut-être rencontrées uniquement dans certains environnements cellulaires *in vivo*, puissent induire l'expression du CD5 sur les cellules B CD5⁻ de la souris. Des données récentes mettent en évidence une augmentation de l'expression de l'antigène Pgp1 à la surface des cellules B CD5⁺ de la cavité péritonéale et à la suite de l'activation par du PMA et un ionophore ou encore par l'activation de cellules spléniques par du LPS. Ces auteurs suggèrent que le marqueur Pgp1 naturellement présent sur les cellules péritonéales, pourrait être le résultat de leur activation *in vivo* (Murphy et coll., 1990, Wortis et coll., 1990). D'autres auteurs disent avoir mis en évidence l'induction de cellules B CD5⁺ autoimmunes à partir de cellules B CD5⁻, en présence d'un facteur de 19-20 KD récemment isolé par cette équipe, à partir d'un hybridome B CD5⁺ (Hardin et coll., 1990 ; Gibson & coll.; 1990). Il faut noter que les cellules B CD5⁺ constituent la majorité des cellules B dans les leucémies lymphocytaires chroniques humaines ou murines alors qu'elles ne représentent que 5% des cellules B chez un homme normal (Calligaris- Cappio & coll. 1982, Hayakawa & coll. 1983b). Comme chez la souris, les cellules B CD5⁺ sont présentes en fréquences élevées dans la rate foetale humaine (Antin & coll. 1986). L'ensemble de ces données suggèrent que la présence de cellules B CD5⁺, tôt durant l'ontogénie, et dans les leucémies pourrait être la conséquence de leur sélection et activation, respectivement pendant la période d'apprentissage du système immunitaire et lors d'un dérèglement pathologique.

Même si l'antigène CD5 peut être induit sur des cellules matures CD5⁻, l'activation des cellules B CD5⁺ *in vivo* reste controversée. Les cellules B CD5⁺ de la souris sont de grandes cellules (Manohar et coll., 1982) ce qui est généralement un signe d'activation pour les lymphocytes. Pourtant, moins de 2% des cellules extraites de la cavité péritonéale, sont en cycle et incorporent du Bromo-désoxy-uridine (BrDU) selon les études de Förster et coll. (Förster et coll., 1989). Ces données sont confirmées par l'analyse du cycle cellulaire de cellules péritonéales et pleurales qui montre que 2 à 11% des cellules sont en phase S, valeurs comparables à celles des lymphocytes de la rate (Marcos et

coll., 1989a). L'analyse du cycle cellulaire des cellules Ly-1 B spléniques met en évidence, au contraire, que les cellules B CD5⁺ de la rate sont en phase S pour 16 à 73% d'entre elles selon les souches de souris, ce qui a conduit les auteurs à envisager que cette population de cellules puisse être arrêtée en phase S ou qu'elles prolifèrent rapidement *in vivo* dans ce compartiment (Rabinovitch et coll., 1986).

Par ailleurs, les cellules B de la cavité péritonéale sécrètent très peu d'Ig spontanément. Cependant, la mise en culture de ces cellules avec ou sans LPS pendant deux à trois jours permet la sécrétion des cellules péritonéales sans nécessiter leur division. Ce même protocole est au contraire sans effet sur les cellules spléniques qui nécessitent une culture à long terme avec du LPS induisant la prolifération de clones pour donner une sécrétion d'Ig anti-globule rouge syngénique traité à la broméline (GRSBr). Ces différences de comportement des cellules péritonéales et spléniques ont permis de suggérer qu'une partie des cellules péritonéales sont à un stade d'activation peu représenté dans les cellules B spléniques, qui correspond au stade de précurseur de plasmocyte, intermédiaire entre le précurseur clonal et le plasmocyte (Huetz & Poncet, 1989).

L'ensemble de ces études montre que les cellules B CD5⁺ des cavités coelomiques sont blastiques mais ne sont pas, pour leur majorité, impliquées dans des processus de division *in vivo*. Elles ne semblent pas non plus sécréter des immunoglobulines dans la cavité péritonéale. Cependant, le fait que ces cellules puissent se diviser après leur transfert dans des receveurs, comme nous allons le voir, ou qu'elles sécrètent des anticorps après une brève culture *in vitro* suggère que ces cellules pourraient être bloquées à un stade de maturation avancé. Ainsi, le marqueur CD5 pourrait être exprimé de façon transitoire à cette étape de leur maturation.

3.1.3 Deux lignées de cellules B?

La proposition de l'existence de deux lignées de cellules B par l'équipe de Herzenberg repose sur deux arguments : d'une part, la capacité des cellules B CD5⁺ matures à s'auto-renouveler au contraire des cellules B conventionnelles, et d'autre part, la disparition de précurseurs de la moelle osseuse chez les souris adultes, capables de générer des cellules B CD5⁺, au

contraire des cellules B conventionnelles qui sont renouvelées durant toute la vie à partir des cellules souches de la moelle osseuse.

Il nous faut préciser ici la définition de l'auto-renouvellement de lymphocytes B périphériques : Il s'agit de la capacité de lymphocytes matures à entretenir leur propre population en conservant leur diversité, et en l'absence d'apport de cellules à partir de précurseurs. Ainsi, la division périphérique de certains clones de cellules B n'est pas considéré comme un auto-renouvellement, car il implique une restriction dans le répertoire des cellules.

a) *Capacité d'auto-renouvellement des cellules B matures*

Hayakawa et coll. ont mis en évidence que les cellules B de la cavité péritonéale sont capables de régénérer 2-4 fois le nombre de lymphocytes Ly-1B injectés dans des hôtes syngéniques adultes irradiés et ont conclu à leur auto-renouvellement contrairement aux cellules B "conventionnelles" (Hayakawa et coll., 1985). Nous avons confirmé la capacité des cellules B péritonéales à proliférer et à persister dans des hôtes syngéniques irradiés (Publication N°3 et 5) et dans une moindre mesure lors du transfert de cellules péritonéales dans des nouveau-nés d'allotypes différents (Förster & Rajewsky, 1987 et publication N°3). Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure à l'auto-renouvellement des cellules B CD5⁺. En effet, la prolifération des cellules du donneur peut-être oligoclonale comme le suggère d'autres expériences (Förster et coll., 1988) sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement (c.f.3.5.3).

La capacité de division périphérique des cellules Ly-1B matures n'est, non plus, pas un argument suffisant pour conclure que ces cellules définissent une lignée B différente. D'une part, les transferts de cellules péritonéales de souris adultes dans des hôtes adultes irradiés ou nouveau-nés permettent d'étudier les capacités de division de ces populations lymphocytaires dans des environnements sélectifs, mais ne permettent pas de conclure quant à leur comportement chez une souris adulte normale. En effet, nous avons mis en évidence qu'après le transfert des mêmes cellules péritonéales chez des hôtes adultes intacts, la division de ces cellules B semble très contrôlée et limitée (Publication N°3). Ces résultats corroborent le fait que peu de cellules B des cavités coelomiques se divisent *in vivo*.

D'autre part, les cellules spléniques de souris adultes, transférées par voie intrapéritonéale chez des souris adultes normales, ou par voie intraveineuse chez des nouveau-nés sont capables de se diviser et de persister en l'absence de cellules précurseurs (Publication N°2, 4). Ce résultat ne peut être attribué uniquement à d'éventuelles cellules Ly-1B contenues dans les populations cellulaires du donneur (représentant environ 1% des cellules totales), étant donné que 30 à 60 % des cellules B spléniques injectées persistent dès les premiers jours après leur transfert dans la cavité péritonéale du receveur (Publication N° 4). Ces résultats mettent donc en évidence que les cellules B "conventionnelles" matures de la rate sont capables de se diviser à la périphérie tout comme les cellules B CD5⁺, lorsqu'elles sont sélectionnées, ce qui permet leur division et leur persistance.

La capacité de prolifération des cellules B CD5⁻ ou CD5⁺ ne semble donc pas être différente, ni prédéterminée, mais paraît dépendre de la sélection des cellules dans les compartiments périphériques, et ne peut être retenue comme un argument permettant de distinguer deux lignées de cellules B.

b) Génération de cellules B CD5⁺ à partir de précurseurs

Ig⁻.

L'autre argument qui laissait penser que les cellules B CD5⁺ définissent une lignée B différente des cellules B conventionnelles, est l'incapacité de mettre en évidence des cellules médullaires capables de générer des cellules B CD5⁺. En effet, après le transfert de cellules de moelle osseuse de souris adultes dans des hôtes irradiés, Hayakawa et coll. n'ont obtenu qu'un très faible pourcentage de reconstitution de cellules Ly-1B provenant du donneur, ou des reconstitutions ponctuelles et non reproductibles, alors que le transfert de cellules péritonéales Ly-1B conduit à un fort pourcentage de Ly-1B du donneur (Hayakawa et coll., 1985; Herzenberg et coll., 1986). Ces résultats ont incité ces auteurs à conclure que les cellules Ly-1B proviennent de précurseurs présents uniquement dans la cavité péritonéale de la souris adulte ainsi que dans la rate et la moelle osseuse de souris âgées de moins de 4 semaines, mais absents dans la moelle osseuse de souris adultes (Hayakawa et coll., 1985). Une année plus tard, ces auteurs ont mis en évidence que seules les cellules B CD5⁺ et non les cellules Ig⁻ de la cavité péritonéale de l'adulte permettaient la reconstitution des cellules Ly-1B de la rate et du péritoneum

des receveurs irradiés. Au contraire, des précurseurs Ig⁻ présents dans la rate de nouveau-nés reconstituent les cellules Ly-1B chez des hôtes irradiés (Hayakawa et coll., 1986b). L'ensemble de ces travaux a conduit l'équipe de Herzenberg à définir deux lignées de cellules B provenant de précurseurs différents situés dans des compartiments cellulaires distincts. Les cellules B conventionnelles seraient renouvelées continuellement à partir de précurseurs Ig⁻ de la moelle osseuse. Au contraire, les cellules Ly-1B se renouvelleraient à partir de cellules B CD5⁺ matures présentes dans le péritoneum, dont les précurseurs Ig⁻ n'existeraient que durant l'ontogénie et disparaîtraient à l'âge adulte (Herzenberg et coll., 1986). En outre, les cellules B CD5⁻ présentes dans les cavités coelomiques, qui ont toutes les caractéristiques des cellules B CD5⁺ (IgM^{fort}, IgD^{faible}, MAC1, grande taille) mais qui n'expriment pas le marqueur CD5 et appelées pour cette raison "sister population", pourraient, selon ces auteurs, définir une troisième lignée de cellules B (Herzenberg et coll., 1986).

Nos résultats montrent au contraire, que des cellules B CD5⁺ sont produites après le transfert de cellules spléniques ou de cellules Ig⁻ provenant de moelle osseuse de souris adultes. En effet, notre interprétation permet de mettre en évidence que le nombre absolu de cellules B CD5⁺ du donneur, obtenu lors de ces transferts est même supérieur à celui obtenu après le transfert de cellules de la cavité péritonéale bien que la fréquence des cellules B CD5⁺ y soit plus faible (Publication N°5). Il semble important, dans ces expériences d'analyser le nombre total de cellules B CD5⁺, plutôt que leur représentation en terme de pourcentage. Cet argument est en accord avec les résultats de Lalor qui montrent qu'il existe une régulation du nombre total de cellules B CD5⁺ (Lalor et coll., 1989a). Cette même étude révèle, bien que les auteurs n'y fassent pas référence, que des précurseurs Ig⁻ capables de générer des cellules Ly-1B sont présents chez des souris âgées de 8 semaines, sans présager de leur localisation.

L'ensemble de ces résultats indique que la moelle osseuse de souris adulte contient des précurseurs Ig⁻ capables de générer des cellules B conventionnelles et des cellules Ly-1B, mais ne permet pas de dire si ces précurseurs sont identiques ou non. Il faut également noter que les cellules B CD5⁺ sont reconstituées en forte proportion chez des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse (Ault & coll. 1985)

En conclusion, la division des cellules B semblent provenir de leur interaction avec leur environnement cellulaire, qui entraîne leur sélection, plutôt qu'être la propriété inhérente à certaines cellules, comme le suggère l'équipe de Herzenberg. Le fait que des précurseurs Ig^- de cellules Ly-1B (peut-être communs à ceux des cellules B $CD5^-$) soient présents chez la souris adulte, n'exclut toutefois pas que la population de cellules B $CD5^+$ s'entretienne à partir de cellules B $CD5^+$ matures qui comme nous allons le voir sont hautement sélectionnées.

3.1.4 Répertoire exprimé par les deux populations de cellules B

Un autre critère laissant à penser que les cellules Ly-1B pourraient définir une lignée différente, est le répertoire exprimé par ces cellules (Alt et coll., 1989). En effet, les cellules Ly-1 B extraites de la cavité péritonéale des souris sont très souvent impliquées dans des réactions d'auto-réactivité. Les cellules B $CD5^+$ de la cavité péritonéale de souris normales produisent des IgM naturelles qui reconnaissent des antigènes du soi tels que les globules rouges syngéniques traités à la broméline (GRSBr) (Cunningham, 1974), ou la phosphatidyl-choline (Mercolino et coll., 1988, Mercolino et coll., 1989), le DNA, des antigènes des cellules T (Hayakawa et coll., 1984), mais aussi des anticorps reconnaissant des composants bactériens comme le dextran 1-3 (Förster & Rajewsky, 1987), ou la phosphoryl choline (PC) ou encore le TNP (Lalor & Morahan, 1990). Cependant, les cellules B $CD5^+$ ne répondent pas à l'injection d'autres antigènes protéiques ou aux haptènes (Herzenberg et coll., 1986, Hayakawa et coll., 1984) comme le font les autres cellules B. Ces différences de réponse peuvent être dues à des différences dans le répertoire des cellules B $CD5^+$ et des cellules B conventionnelles mais aussi à des différences dans la régulation de la réponse immunitaire. Les cellules B $CD5^+$ participeraient à la production d'IgA dans l'intestin où les antigènes bactériens sont nombreux (Kroese et coll., 1989). Pourtant, des études récentes montrent que le répertoire des cellules B $CD5^+$ de la cavité péritonéale de souris axéniques est similaire à celui de souris normales et la fréquence de cellules réactives au GRSBr et à la phosphoryl choline est même supérieure chez les souris axéniques (Lalor & Morahan, 1990). Ces résultats suggèrent que ce ne sont pas les antigènes bactériens mais plutôt des auto-

antigènes, qui sélectionnent ces cellules. Ainsi, la migration de cellules B CD5⁺ ayant ces réactivités, vers les intestins, serait plutôt secondaire.

Les études des derniers auteurs montrent que les anticorps synthétisés par des clones de cellules B CD5⁺ de la cavité péritonéale, obtenus par dilution limite et révélant le répertoire disponible, sont de faible affinité et se lient à différents antigènes (anticorps multi-réactifs), avec une fréquence plus élevée que les anticorps produits par les cellules B conventionnelles provenant de la rate. Ces fréquences de réactivité sont particulièrement élevées en ce qui concerne les réactivités anti-GRSBr et anti-PC qui correspondent à des déterminants d'auto-antigènes (Lalor & Morahan, 1990). D'autres études récentes mettent en évidence que les cellules B CD5⁺ péritonéales ont un répertoire différent des cellules B CD5⁺ spléniques (Klinman & Holmes, 1990), suggérant que l'environnement cellulaire influencerait le répertoire des cellules B CD5⁺.

D'autre part, les cellules spléniques du nouveau-né de 3 à 12 jours dont environ 10-15% des cellules B portent le marqueur CD5⁺ (Hardy & Hayakawa, 1986), ont des fréquences de réactivité beaucoup plus faibles que les cellules B CD5⁺ de la cavité péritonéale, contre les antigènes tels que PC, Dextran ou GRSBr. Or, il a été montré que l'apparition de certaines réactivités chez le nouveau-né est liée à l'âge (Teale, 1985) et est dépendante de la présence de cellules T matures (Huetz et coll., 1989). Cependant, les anticorps provenant d'hybridomes de souris nouveau-nées âgées de 6 jours sont plus auto-réactifs et multi-réactifs que les anticorps provenant de clones de cellules spléniques de souris adultes. Ceci pourrait être lié au fait que les cellules de nouveau-nés utilisent les familles proches des régions D, au contraire des cellules spléniques des souris adultes qui utilisent davantage la famille J558 (Holmberg et coll., 1986a ; Holmberg, 1987).

Ces résultats suggèrent que le répertoire des cellules B CD5⁺, qui est différent dans la cavité péritonéale de la souris adulte par rapport à celui des cellules spléniques d'adulte ou de nouveau-né, est le résultat de la sélection due à l'âge et à l'environnement. L'interprétation des résultats de l'analyse des familles de gènes utilisées par ces cellules, comme nous allons le voir, va dans le même sens.

En effet, l'analyse du répertoire des familles de gènes VH montre, que les cellules Ly-1B de la cavité péritonéale utilisent préférentiellement les familles de gènes VH11 (Reininger et coll., 1988; Hardy et coll., 1989) et VH12

(Pennell et coll., 1989a et b) à 15-20% contre 1-2% pour les cellules Ly-1B de la rate (Andrade et coll., 1989) en association avec un nombre limité de gènes Vk. Par ailleurs, les gènes de ces cellules sont dépourvus de mutations somatiques.

Pratiquement toutes les cellules péritonéales utilisant les familles de gènes VH11 ou VH12 codent pour des anticorps anti-GRSBr (Reininger et coll., 1988, Pennell et coll., 1989a et b, Mercolino et coll., 1989, Poncet et coll., 1990). Au contraire, des anticorps ayant cette réactivité, codés par d'autres familles de gènes, ont été trouvés exclusivement dans la rate (Holmberg et coll., 1986, Pennell et coll., 1988, Conger et coll., 1989). Pourtant, il existe des clones spléniques utilisant VH 11 (Poncet et coll., 1989) et la chaîne légère $\lambda 1$, dont les séquences ont une variabilité restreinte, qui ne reconnaissent pas les GRSBr (Braun & King, 1989). Ainsi, seul le répertoire des cellules B CD5⁺ de la cavité péritonéale et non celui des cellules B CD5⁺ de la rate d'adulte ou de nouveau-né, est biaisé quant à l'utilisation de la famille VH11 associée à la réactivité anti-GRSBr. Ces résultats donnent à penser que l'utilisation préférentielle de la famille VH11 serait dépendante de l'âge et de l'environnement, et est le résultat d'une sélection (Andrade et coll., 1990) qui pourrait être liée à la réactivité contre des auto-antigènes dont les déterminants sont présents sur les GRSBr. Les autres familles de gènes VH sont utilisées par les cellules B CD5⁺ selon la complexité de la famille, de façon similaire aux cellules B de la rate (Andrade et coll., 1989, Andrade et coll., 1990).

L'ensemble des résultats montre que le répertoire des cellules B CD5⁺ n'est pas restreint comme cela avait été suggéré plus tôt (Förster et coll., 1988, Tarlinton et coll., 1988, Wetzel, 1989). La restriction de l'utilisation des familles VH observée par ces auteurs semble être le résultat de la sélection par l'environnement cellulaire de certains clones au cours du temps, conduisant à l'oligoclonalité observée chez les souris âgées (Stall et coll., 1988), et aux stratégies utilisées pour l'analyse du répertoire. La prolifération de cellules B CD5⁺ est souvent associée à des maladies auto-immunes chez la souris NZB (Hayakawa et coll., 1986a; Stall et coll., 1988, Wofsy & Chiang, 1987) ou chez l'Homme (Casali & Notkins, 1989). Cette prolifération pourrait provenir, non pas d'une capacité anormale de ces cellules de se diviser et de sécréter des anticorps anti-ADN, anti-GRSBr ou des facteurs rhumatoïdes, mais plutôt de la sélection de ces cellules par ces antigènes naturellement présents dans l'environnement cellulaire (Klinman & Steinberg, 1987,

Klinman et coll., 1988b). Des données récentes renforcent cette hypothèse en mettant en évidence que le répertoire disponible des gènes VH de souris viables "Motheaten", auto-immunes et immunodéficientes, dont les cellules B sont presque exclusivement CD5⁺, est similaire à celui de souris normales. Au contraire, leur répertoire actuel est biaisé par une utilisation préférentielle de la famille J606 alors que la famille 7183 n'est quasiment pas sélectionnée (Freitas & Sidman, 1990).

En conclusion, les cellules B "conventionnelles" tout comme les cellules "Ly-1B" sont capables de se diviser à la périphérie chez des souris normales. Ces deux populations cellulaires peuvent être générées par des cellules Ig⁻ de la moelle osseuse de souris adulte et pourraient provenir de précurseurs identiques. Les différences apparaissant dans le répertoire des cellules B CD5⁺ et CD5⁻ semblent provenir de l'expansion de clones auto-réactifs CD5⁺ à la périphérie, due à une sélection clonale par des auto-antigènes présents dans l'environnement cellulaire. Ces différences dans le répertoire ne semblent pas être dues à des lignées cellulaires B ayant des différenciations indépendantes.

Il existe pourtant des différences entre le renouvellement des cellules B conventionnelles et des cellules B CD5⁺ *in vivo*, qui semblent venir de leur localisation (c.f.3.3) et de leur régulation (c.f. 3.4.2).

En conséquence, aucun résultat chez la souris, ne permet à l'heure actuelle de rejeter l'hypothèse selon laquelle les cellules B CD5⁺ seraient identiques aux cellules B CD5⁻ et que le marqueur CD5 serait présent à une étape de différenciation avancée sur des cellules B naturellement activées, ou au cours de la différenciation de cellules précurseurs en cellules B matures.

3.2 PRODUCTION DES CELLULES B DANS LA MOELLE OSSEUSE

Nous allons maintenant aborder plus spécifiquement la production des cellules B au niveau de la moelle osseuse. Comme nous venons de le voir, les cellules B CD5⁺ peuvent être générées également par les précurseurs de la moelle osseuse. Cependant, aucun résultat ne permet de dire si une telle production a lieu chez une souris adulte normale, ou si leur renouvellement est uniquement périphérique, entretenu par la sélection constante de ces cellules et soumis à une étroite régulation. Les résultats des études que nous allons mentionner concernent des travaux effectués sur les lymphocytes B dans leur ensemble, sans distinction entre cellules B CD5⁺ et CD5⁻, dans la plupart des expériences présentées.

3.2.1 Taux de production élevé, et important renouvellement des cellules B dans la moelle osseuse

Le lieu majeur de production des lymphocytes B est la moelle osseuse chez la souris adulte. Les cellules B se développent à partir des cellules souches pluripotentes qui pourraient donner des cellules souches restreintes à la lignée lymphoïde (Phillips, 1989) et se différencient en précurseurs Pro-B C μ ⁻S μ ⁻ capables d'auto-renouvellement. Ces précurseurs qui seraient déjà orientés vers la lignée B, expriment l'enzyme transférase déoxynucléotidyl terminale (TdT), se divisent une fois et expriment alors le marqueur B220. Ces cellules participent elles-mêmes à 2 ou 3 cycles cellulaires donnant des cellules TdT⁻ B220⁺ μ ⁻ (Park & Osmond, 1989a) et finissent par exprimer la chaîne lourde μ dans leur cytoplasme (grande cellule pré-B B220⁺ C μ ⁺, S μ ⁻). Cette grande cellule pré-B se divise une seule fois pour donner deux petites cellules pré B (B220⁺ C μ ⁺, S μ ⁻) qui par maturation donneront des petits lymphocytes B B220⁺ exprimant des IgM à leur surface (Landreth et coll., 1981). De nombreux marqueurs de surface ainsi que la présence d'enzyme ou des chaînes d'Ig permettent de distinguer huit stades dans le développement des cellules B (revue par Phillips, 1989). Landreth signale également la présence de grandes cellules B matures C μ ⁺S μ ⁺ qui sont capables d'auto-renouvellement lent et dont les précurseurs ne sont pas connus mais qui pourraient être issus des progéniteurs C μ ⁻S μ ⁻ et pourraient représenter une

lignée cellulaire différente des autres cellules B issues des cellules pré B (Landreth et coll., 1981). La présence de cellules Ly-1B qui pourrait expliquer ce phénomène, n'a pas été analysé à cette époque.

Les cellules B matures apparaissent environ 3,5 jours après le début de réarrangement de la chaîne μ (Park & Osmond, 1989a) et la moitié de la population est renouvelée en 24-36 heures (Osmond & Nossal, 1974). La production de cellules pré B à partir de précurseurs en prolifération (Rusthoven & Phillips, 1980) est estimée à environ $30-50 \times 10^6$ /jour pour la moelle osseuse totale de la souris (Opstelten & Osmond, 1983, Osmond, 1986, Rocha et coll., 1990). Environ 16-20 millions de ces nouvelles cellules entrent chaque jour dans le compartiment de cellules B matures médullaires (Opstelten & Osmond, 1983, Rocha et coll., 1990). Cette quantité de cellules produite permet le renouvellement de toutes les cellules B périphériques de la souris en quelques jours (Opstelten & Osmond, 1983). Des données comparables obtenues chez le rat, montrent qu'en fait la production de cellules pré-B par la moelle osseuse est très supérieure à la quantité de cellules nécessaire dans les organes périphériques (Deenen et coll., 1987). Ces mêmes auteurs ont décrit récemment que 60% des cellules meurent au stade de petites cellules pré B chez le rat (Deenen et coll., 1990). La quantité de cellules B matures produite suffit alors à renouveler toutes les cellules B périphériques en 3 à 4 jours. La mort de 75% des cellules avant ou au stade pré B a également été suggérée chez la souris (Osmond, 1986). D'autres données récentes mettent également en évidence le fort renouvellement des cellules dans la moelle osseuse puisque 60% des cellules immatures et 30% des cellules B de la moelle osseuse sont marquées après 24 heures de traitement avec du BrDU (Rocha et coll., 1990). Ces auteurs ont calculé que 40×10^6 cellules pré B ($B220^{+}$ (faible) IgM^{-}), 20×10^6 cellules B IgM^{+} et 10×10^6 cellules B IgD^{+} sont produites en 24 heures ce qui est en accord avec les résultats de l'équipe d'Osmond qui utilisait la technique de blocage des cellules en métaphase. Des valeurs bien inférieures ont été obtenues par Förster et coll. (Förster et coll., 1989).

Des études sur d'autres animaux mettent en évidence cependant que la moelle osseuse n'est pas le seul lieu de production et de différenciation de cellules B. Chez l'agneau la production des lymphocytes a lieu dans les plaques de Peyer, cette production étant suffisante pour renouveler les cellules de la rate et des ganglions en 4 à 16 heures (Reynolds, 1986). Ici aussi, il semblerait qu'une forte mortalité intervienne *in situ*, indispensable

pour maintenir un état d'équilibre. Chez le poulet, les lymphocytes sont produits dans la bourse de Fabricius, qui est colonisée très tôt durant l'embryogénèse par des cellules précurseurs. La bourse de Fabricius subit ensuite une involution à l'âge adulte (Weill & Reynaud, 1987). Des expériences de suppression allotypique chez des poulets hétérozygotes indiquent que chez l'adulte, les cellules B sont renouvelées exclusivement à partir des cellules B portant des Ig à leur surface (Ratcliffe et coll., 1986). Le fait que les cellules Ly-1B de la souris soient capables de se renouveler à la périphérie, a conduit certains auteurs à émettre l'hypothèse que ces cellules puissent avoir des caractères ancestraux et ressembleraient aux cellules B trouvées chez le poulet (Herzenberg et coll., 1986). Nous verrons plus loin qu'au contraire des cellules B du poulet, les cellules B CD5⁺ de souris hétérozygotes réapparaissent après la suppression avec un anti-allotype d'IgM (Lalor et coll., 1989).

3.2.2 Influence de l'environnement cellulaire sur la différenciation et la production des cellules B

a) Contrôle de la différenciation des précurseurs

L'interaction des cellules hématopoïétiques avec le micro-environnement cellulaire des cellules stromales et des macrophages qui secrètent de nombreux facteurs paraît essentiel à leur survie, à leur auto-renouvellement et leur différenciation (Phillips, 1989, Kincade, 1989). Il semble que les précurseurs des cellules B ne soient acceptés par le foie foetal que durant une période de 24 heures, vers le jour 13 de gestation. Ces précurseurs nécessitent l'interaction avec un type de cellules stromales médullaires permettant leur prolifération. Ensuite, un autre type de cellules stromales est nécessaire au réarrangement des gènes des Ig, durant le stade pré-B. La capacité des cellules à devenir sIg⁺ et réactives aux antigènes et aux mitogènes est ensuite indépendante de la présence de cellules stromales (Strasser et coll., 1989).

Les résultats de Palacios ont montré qu'il existe des clones de lymphocytes Pro-B B220⁺ MAC1⁺ CD5⁺ Ig⁻, provenant de la moelle osseuse de souris âgées de 4 semaines qui selon les cellules stromales avec lesquelles elles interagissent *in vitro* se différencient en cellules B portant des

marqueurs différents. L'interaction avec des cellules accessoires de la rate de souris adulte conduit à la différenciation de lymphocytes B IgM⁺ CD5⁺. Au contraire, la différenciation de cellules B CD5⁺ et CD5⁻ provient de l'interaction avec des cellules stromales de foie foetal, les CD5⁺ étant alors minoritaires. L'interaction des clones Pro-B avec des cellules stromales hétérogènes de moelle osseuse ou avec une lignée stromale de moelle osseuse, permet leur différenciation en cellules B IgM⁺ CD5⁻ MAC1⁻ et IgM⁺ CD5⁻ MAC1⁺ (ces dernières pourraient correspondre à la "sister population" définie par l'équipe de Herzenberg) et en cellules IgM⁻ GM1.2⁺ MAC1⁺ Ia⁺ qui définissent des cellules myéloïdes. L'impossibilité de mettre en évidence une nouvelle induction du marqueur CD5 sur les cellules IgM⁺ CD5⁻ en présence de cellules accessoires de rate, ne peut exclure, comme le soulignent les auteurs, que d'autres interactions donneraient un résultat positif (Palacios et coll., 1987 ; Palacios et coll., 1989).

Un exemple des conséquences de la déficience du micro-environnement médullaire est celui des souris immunodéficientes Motheaten (Me) et Motheaten viables (Me^v). Ces souris ont des précurseurs des cellules TdT⁺ en nombre normal dans leur moelle osseuse, mais le micro-environnement médullaire ne permet pas la différenciation de ces précurseurs en cellules B. Cependant, des cellules B peuvent se différencier *in vitro* en présence de cellules stromales et nourricières de moelle osseuse de souris normales attestant de la normalité des précurseurs (Medlock et coll., 1987). Ces souris Me développent, par contre, presque exclusivement des cellules B CD5⁺ (Sidman et coll., 1986). L'incapacité des cellules stromales de moelle osseuse de souris adulte à permettre la différenciation des cellules Ly-1B pourraient expliquer la faible proportion de ces cellules dans ce compartiment. Au contraire, on peut se demander si d'autres cellules stromales nécessaires à la différenciation des Ly-1B pourraient être présentes dans le péritoneum, la pleura ou encore le thymus des souris où la fréquence de cellules B CD5⁺ est élevée, et si la différenciation des cellules B CD5⁺ pourrait avoir lieu à la périphérie. Un autre exemple montrant qu'à la fois l'environnement cellulaire mais également l'origine des cellules précurseurs sont importants dans la différenciation, sont les expériences du groupe de Weissman. Ces auteurs ont montré que seules des cellules hématopoiétiques foetales, et non celles d'adultes, peuvent se différencier en cellules T Vβ3 dans des lobes thymiques de fœtus, et que les précurseurs foetaux nécessitent l'environnement cellulaire des lobes de fœtus (Ikuta et coll., 1990).

D'autres expériences concernant l'engagement des cellules hématopoïétiques en lignée myéloïde, érythroïde ou lymphoïde durant le développement embryonnaire du Xénope montrent que la différenciation d'une même cellule hématopoïétique en l'une de ces lignées est affectée et déterminée par le micro-environnement avec lequel elle interagit (Turpen & Smith, 1989).

b) Régulation du nombre de cellules produites dans la moelle osseuse

Le taux de production des lymphocytes B dans la moelle osseuse de la souris est soumis à la régulation par des mécanismes complexes liés à l'environnement cellulaire (revue par Osmond, 1986). Une diminution du renouvellement des lymphocytes médullaires a été mise en évidence chez des souris axéniques. Au contraire des facteurs existant dans la circulation des souris NZB (souris auto-immunes comprenant une forte proportion de cellules B CD5⁺), sont capables de promouvoir la formation de cellules pré B et B à partir de précurseurs en culture. Des immunisations avec différents antigènes, par exemple les globules rouges de mouton, induisent une augmentation de la production de cellules dans la moelle osseuse (Fulop & Osmond, 1983 ; Opstelten & Osmond, 1985) probablement due à l'activation des macrophages. Par contre, des souris soumises à suppression par traitement avec un anti-IgM ne montrent pas d'hyperplasie compensatrice de la moelle osseuse (Fulop et coll., 1983; Revue Phillips, 1989). La participation des IgM naturelles semble impliquée dans la stimulation des précurseurs des cellules B médullaires. En effet, des IgM monoclonales provenant d'hybridomes de nouveau-nés (Holmberg et coll., 1984), stimulent la prolifération et la sécrétion de cellules de moelle osseuse *in vitro* (Publication N°1).

Des résultats récents mettent en évidence qu'un défaut ou un excès de cellules B CD5⁺ semble modifier le nombre de cellules B médullaires. Ainsi, une forte diminution du nombre de cellules B dans la moelle osseuse de souris est observée, 48 heures après le lavage de la cavité péritonéale *in vivo*, qui induit une déplétion des cellules B CD5⁺. L'injection de cellules B CD5⁺ induit également une déplétion du nombre de cellules B dans la moelle osseuse (M.A. Marcos, communication personnelle). Ainsi une déficience ou un excès de cellules B CD5⁺ perturbe le nombre des cellules médullaires. L'injection d'immunoglobulines sériques provenant de souris d'origines diverses, dans

d'autres souris conduit également à une diminution du nombre de cellules pré-B et B médullaires (Sundblad & coll., 1990b). Les parties variables des immunoglobulines sembleraient être impliquées dans les interactions avec les petites cellules pré-B qui portent la chaîne μ en association avec $\lambda 5$ et Vpre B (Tsubata & coll., 1990 ; Karasuyama & coll., 1990). Les cellules Ly-1B ou les anticorps sécrétés par ces cellules et d'une façon générale les anticorps naturels, pourraient avoir un rôle dans la régulation du nombre et peut être de la production médullaire des cellules. Nous verrons plus loin que les cellules B CD5⁺ ou leur produit pourraient intervenir également dans la régulation du nombre et de l'activité des lymphocytes périphériques (c.f. 3.4.2).

3.3 DYNAMIQUE DES CELLULES B PERIPHERIQUES

Pour aborder la dynamique des populations lymphocytaires B dans les compartiments périphériques chez la souris adulte et durant l'ontogénie, nous nous devons de discuter des modèles expérimentaux couramment utilisés et qui ont donné lieu à des résultats parfois contradictoires.

3.3.1 Méthodes d'études et durée de vie des cellules B spléniques

La durée de vie des lymphocytes répond à plusieurs définitions. On peut estimer la durée de vie individuelle d'une cellule par l'intervalle de temps entre deux divisions. C'est plus généralement la durée de vie d'une population cellulaire qui a été étudiée et c'est l'évolution et la persistance de cette population qui est examinée dans ce cas.

a) Marquage des cellules en division

Une des premières méthodes permettant l'évaluation de la durée de vie des lymphocytes B périphériques a été abordée dès les années 1965 par Robinson qui marquait les cellules en division *in vivo* par des injections continues de Thymidine marquée au tritium (Robinson et coll., 1965). Ce protocole permet d'évaluer le nombre de cellules qui ont persisté sans se diviser, car elles ne sont pas marquées, et donc d'apprécier le temps nécessaire pour le renouvellement de la population totale. Ces méthodes de

marquage continuels des lymphocytes en division par incorporation d'un nucléotide marqué ont été poursuivies par Sprent & Basten, 1973) qui concluait que la majorité des cellules B avaient des durées de vie longues de plusieurs mois, car elles n'étaient pas marquées par l'isotope. L'utilisation de ce protocole conduit en fait à la mort des cellules à vie courte par le stress induit par les manipulations répétées lors des injections (Rocha, 1985) et par la cytotoxicité due à l'élément radioactif employé (Freitas et coll., 1986a).

Cette méthode de marquage a été remplacée par l'incorporation d'un analogue de base, le bromo-desoxy-uridine (BrDU), dans l'ADN des cellules, incorporé dans l'eau des animaux afin de limiter le stress induit par des injections répétées et prolongées. Le BrDU incorporé dans l'ADN des cellules en division peut être révélé par immuno-marquage spécifique et permet le double marquage des cellules et leur analyse en cytométrie de flux. Les auteurs utilisant cette méthode chez le rat, ont montré que seulement 20% des cellules B sont marquées après 5 jours d'incorporation de BrDU et proposent des durées de vie des lymphocytes B de 4 semaines (Gray, 1988). Plus récemment Förster et coll. (Förster et coll., 1989) ont mis en évidence que seuls 20% des lymphocytes B de la rate et 2 à 3% dans la cavité péritonéale de la souris ont absorbé du BrDU en 8 jours. Ils ont conclu à des durées de vie de plusieurs semaines pour les lymphocytes B. Cependant, le protocole d'administration orale de BrDU utilisé par ces auteurs a fait l'objet de critiques récentes (Rocha et coll., 1990). La dose de BrDU administrée oralement semble trop faible pour que le BrDU soit en concentration suffisante dans la cellule, pour entrer en compétition avec la Thymidine endogène. Un traitement de 8 jours ou plus avec du BrDU est toxique pour les cellules et entraîne la mort des souris de souche B6 en 2 semaines. Effectivement, le BrDU a déjà été employé comme agent cytostatique (O'Brien & Coons, 1963). En conséquence, selon les dernières études réalisées (Rocha et coll., 1990), l'administration de BrDU doit être faite par injections intrapéritonéales répétées du produit (toutes les 4 heures) conduisant à une concentration locale suffisamment importante, et permettant de marquer toutes les cellules en division. Ce traitement ne doit pas être prolongé au-delà de 24 heures, car des perturbations apparaissent (toxicité, stress) et ne permettent pas une analyse correcte. Utilisant ce protocole chez la souris, Rocha et coll. ont ainsi mis en évidence que 30 à 40% des lymphocytes B de la rate sont renouvelés tous les 2 à 3 jours. Des résultats récents mettent en évidence que du Bromodeoxycytidine administré par une pompe osmotique conduit au marquage de 50% des cellules spléniques en 6 jours (Crippen &

Jones, 1989). Ces résultats sont en accord avec une deuxième méthode d'analyse de la durée de vie des cellules B qui utilise la déplétion des cellules en cycle.

b) Déplétion des cellules en cycle

Cette méthode permet d'évaluer le pourcentage de cellules en cycle dans une population donnée et d'étudier la reconstitution de la population cellulaire après l'arrêt du traitement. Deux protocoles ont été employés pour éliminer sélectivement les cellules en cycle :

- le traitement par un agent cytostatique, tel l'Hydroxyurée (HU) tue 45% des cellules B de la rate et 30% des cellules des ganglions après un jour de traitement (Freitas et coll., 1982, Freitas et coll., 1986b, Lévy et coll., 1988) et 7% des cellules du canal thoracique (Publication N°1); parmi les cellules B résistant à 4 jours de traitement, un petit nombre persistent jusqu'à 3 mois dans la rate de souris adoptives (Lévy & Coutinho, 1987). La reconstitution des cellules B après le traitement à l'HU est de 3 à 4 jours, indiquant le fort renouvellement à partir de cellules précurseurs (Freitas et coll., 1982).

- l'utilisation de souris transgéniques HSV-1-tk dont le gène de thymidine kinase du virus de l'Herpes Simplex 1, sous le contrôle du promoteur des gènes des Ig, permet la transformation d'un produit inoffensif en un produit toxique pour les lymphocytes en division exclusivement. Dans les souris transgéniques traitées, le nombre de cellules Ig⁺ ou B220⁺ de la rate diminue de 95% en 7 jours. Une déplétion de 85% du nombre de cellules dans la moelle osseuse est également mise en évidence. Ces résultats montrent également que les cellules B sont rapidement renouvelées (Heyman et coll., 1989).

L'ensemble des résultats des expériences de déplétion ou de marquage des cellules en division montre donc que les lymphocytes B de la rate sont renouvelés très rapidement à partir de cellules en cycle et ont des durées de vie courtes pour la majorité. Cependant, ces protocoles ne permettent pas de déterminer si les cellules sont renouvelées à la périphérie ou par un apport constant de cellules à partir de la moelle osseuse.

c) Etude de la cinétique de populations lymphocytaires après leur transfert

La troisième méthode permet d'évaluer le comportement cinétique (mort, persistance ou expansion) de populations de lymphocytes B périphériques isolées, sans renseignement sur la division des cellules. Le transfert de populations cellulaires chez des hôtes histocompatibles, dont on peut distinguer les cellules du donneur et du receveur par des caractéristiques différentes, permet de suivre la persistance de ces populations cellulaires en l'absence d'apport de cellules nouvellement formées par la moelle osseuse. Par ce système de transfert on peut donc analyser le comportement des populations de cellules B matures dans les différents environnements des compartiments périphériques, ou même après le transfert dans des hôtes ayant des caractéristiques différentes (génétique ou âge différents). La critique de l'utilisation de systèmes de transfert de cellules et de l'interprétation que l'on peut faire quant à l'acceptation et la survie des cellules du donneur et leur interaction avec les cellules du receveur sera discutée dans le chapitre 3.4.2. Nous allons maintenant présenter la méthodologie et les résultats obtenus par différentes équipes concernant la persistance des cellules B périphériques.

Afin de suivre correctement les cellules B injectées parmi les cellules du receveur on doit utiliser une méthodologie permettant :

- la distinction des cellules du donneur de celles du receveur par l'utilisation d'un marqueur approprié.

Le marqueur utilisé pour discriminer les cellules du donneur de cellules de l'hôte peut être fonctionnel. La capacité des cellules du donneur à répondre à un activateur polyclonal comme le LPS (Freitas & Coutinho, 1981), ou à un anti- μ (Udhayakumar et coll., 1988), ou encore à un antigène tel que le TNP-Ficoll (Sprent et coll., 1985 Udhayakumar et coll., 1988) a été utilisée. Un marqueur antigénique, par exemple l'allotype porté par la chaîne légère K (Kumararatne et coll., 1985) ou par la chaîne lourde H (Park et coll., 1985; Gorof & Finkelman, 1989) ou la combinaison marqueur allotypique et marqueur fonctionnel (Publication N°4) peut également être employé. Dans tous les cas, les cellules du receveur ne doivent pas répondre au stimulus utilisé afin de visualiser les cellules du donneur. La propriété des cellules du

donneur doit être distribuée de façon homogène sur les cellules B et être indépendante de leur durée de vie. Ces propriétés ont été démontrées en ce qui concerne la réponse au LPS de lymphocytes B de la souris (Freitas et coll., 1982). D'autres études mettent également en évidence que la stimulation des cellules B par le LPS n'induit pas de biais dans l'expression de leur répertoire (Jeong & Teale, 1989). Ainsi, le récepteur au LPS est présent indépendamment de la durée de vie de la cellule et de la réactivité de son récepteur.

- Le marqueur doit permettre de quantifier précisément les cellules du donneur même à des fréquences très faibles. La mise en culture des cellules en dilution limite, que nous avons utilisée permet justement une quantification précise des cellules du donneur même très diluées parmi les cellules de l'hôte.

Les expériences de transfert de cellules spléniques de souris adulte LPSr, par voie intraveineuse dans des souris hôtes ne répondant pas au LPS, ont permis de montrer que les cellules B de la rate ont des durées de vie courtes pour la majorité d'entre elles, puisque 70 à 80% des cellules ont disparu de la rate une semaine après le transfert. Les autres cellules, représentant 20 à 30% des cellules B, persistent de 1 semaine à plusieurs mois après le transfert. Ce sont pour la plupart des petites cellules B à durée de vie longue, au repos (Freitas & Coutinho, 1981, Freitas et coll., 1986b et c). Udhayakumar et coll.(1988) ont mis en évidence que des cellules spléniques de donneur repérables par leur faculté de prolifération *in vitro* en présence d'anti- μ , disparaissent pour 50% d'entre elles, 4 jours après leur transfert dans des souris hôtes XID, dont les cellules ne répondent pas à la stimulation par un anti- μ . D'autres auteurs ont également obtenu des durées de vie similaires pour les lymphocytes B spléniques en examinant le phénotype des cellules du donneur persistant dans l'hôte (Park et coll., 1985; Gorof & Finkelman, 1989). Par ailleurs, il a été décrit que le transfert de cellules de ganglions de rat dans des animaux d'allotypes différents, conduit à la persistance de cellules B du donneur dans la rate et les ganglions du receveur 2 mois après le transfert. Cet auteur a conclu à une "demi-vie" des cellules B de 4 semaines en considérant que toutes les cellules B injectées survivent et gagnent les organes lymphoïdes (Gray, 1988). Or, nos résultats mettent en évidence que seulement 20 à 30% des cellules injectées migrent dans la rate et les ganglions, les autres cellules étant captées (et probablement perdues) par le foie et les poumons durant les premières heures après le transfert. Cependant il faut remarquer que d'après les données de cet auteur, on peut

calculer que 5% et 18% des cellules B injectées persistent deux mois après le transfert, respectivement dans la rate des hôtes intacts ou irradiés. Ces résultats mettent donc en évidence que relativement peu de cellules survivent dans un hôte intact. D'autre part, la cinétique de persistance des cellules B n'a pas été établie durant les premiers jours après le transfert, ce qui ne peut permettre d'exclure que le repeuplement de cellules B du donneur, 2 mois après le transfert, n'est pas dû à la présence de cellules hématopoïétiques parmi les cellules du donneur qui auraient colonisé préférentiellement l'hôte irradié.

Le fait que les cellules spléniques du donneur disparaissent rapidement de la rate et des ganglions du receveur ne permet cependant pas d'exclure qu'un petit nombre de lymphocytes spléniques injectés pourraient coloniser d'autres compartiments cellulaires. En particulier, il serait intéressant d'examiner la persistance des cellules B spléniques injectées par voie intraveineuse, après leur migration dans la cavité péritonéale du receveur qui semble activer la division des cellules spléniques lorsqu'elles sont injectées directement dans ce compartiment (cf 3.4).

La durée de vie de cellules B réactives à un antigène particulier a également été étudiée. Les résultats obtenus après le transfert de cellules répondant au TNP-Ficoll montrent que les cellules B spléniques (Udhayakumar et coll., 1988), les cellules des ganglions et du canal thoracique (Ron & Sprent, 1985) ayant cette réactivité persistent durant plusieurs mois après le transfert vraisemblablement par le renouvellement lent de ces cellules, selon ces derniers auteurs. Il faut noter que les cellules du donneur ayant la capacité de répondre à cet antigène T-indépendant de type 2 (TI-2), sont transférées dans des souris XID immunodéficientes. Chez ces souris, la sélection du répertoire des cellules du donneur peut être différente de la sélection dans des souris hôtes normales, conduisant à la persistance des cellules spécifiques du TNP. Au contraire, dans le système de transfert entre souris LPSr et LPS non réactives et non immunodéficientes, la cinétique de cellules spléniques spécifiques du TNP-LPS (TI-1) est similaire à celle des cellules B spléniques totales LPSr, c'est à dire que ces cellules disparaissent rapidement après le transfert (Colle et coll., 1988).

Deux populations de cellules B matures avaient été définies précédemment: (1) une population de cellules B à vie courte ayant une persistance limitée à moins d'une semaine pour 70 à 80% d'entre elles et qui

semblent mourir au stade de petites cellules, avant d'avoir rencontré un antigène, (2) une population de cellules B à vie longue persistant de 1 semaine à plusieurs mois, sans division (Freitas & Coutinho, 1981; Freitas et coll., 1986b; Lévy et coll., 1988). Une autre hypothèse est de considérer qu'il existe un grand nombre de populations de cellules B ayant des durées de vie très hétérogènes, plutôt que deux populations de cellules B à durées de vie bien définies (Coutinho et coll., 1990). Les durées de vie hétérogènes des cellules B seraient la conséquence de leurs interactions avec les antigènes de l'environnement cellulaire, et ne seraient pas codées génétiquement, comme nous en discuterons plus loin (cf 3.4)

En résumé, l'ensemble des données actuelles obtenues chez la souris adulte montre qu'une forte prolifération cellulaire intervient dans la moelle osseuse accompagnée d'une forte mortalité avant le stade pré-B et entre le stade pré-B et B. Les raisons possibles de cette mortalité seront discutées plus loin (c.f. 3.5.1). Les cellules B matures sont exportées à la périphérie principalement dans la rate (Brahim & Osmond, 1970), et sont renouvelées constamment par l'apport de nouvelles cellules B provenant de la moelle osseuse. Les cellules B meurent rapidement après leur arrivée dans la rate pour la majorité d'entre elles. Peu de multiplications cellulaires ont lieu parmi les cellules B dans la rate, estimées à 1 ou 2 cycles cellulaires au plus. Ces cellules en division ne représentent que 5 à 10% des cellules spléniques. La production périphérique de lymphocytes B pourrait être estimée à environ 2×10^6 cellules B par jour dans la rate (voir la revue sur la dynamique des populations lymphocytaires, Freitas et coll., 1986b). Toutes ces études concernent les cellules B de la rate et des ganglions dont la dynamique paraît être similaire. Au contraire, les lymphocytes B circulant ont des durées de vie plus longues (Freitas et coll., 1986c, Publication N°1)

Ainsi, la forte production cellulaire médullaire, et la forte mortalité cellulaire périphérique, contribuent à maintenir le système immunitaire de la souris adulte dans un état d'équilibre dynamique, en perpétuel renouvellement.

3.3.2 Dynamique des cellules B de la cavité péritonéale.

Les données concernant la dynamique des cellules B trouvées dans le peritoneum et sur les cellules Ly-1B sont beaucoup plus récentes et restreintes. Le peritoneum et la pleura ne définissent pas des organes lymphoïdes mais des tissus d'origine mésodermique, qui délimitent la cavité coelomique et abritent un nombre de cellules tout à fait restreint (environ $3-4 \times 10^6$ cellules B pour ces deux compartiments), par rapport au nombre de cellules B trouvé dans la rate, les ganglions et les muqueuses. Il faut toutefois signaler que le nombre absolu de cellules Ly-1B trouvées dans la rate est sensiblement égal à ceux additionnés, du peritoneum, de la pleura et du thymus.

Comme nous l'avons signalé ci-dessus (c.f. 3.1.2), peu de cellules B sont en cycle dans la cavité péritonéale (Förster et coll., 1989, Marcos et coll., 1989a). L'étude récente du renouvellement des cellules pleurales dans des souris traitées par l'hydroxyurée, indique aussi que ces cellules ne sont pas en division (M.A. Marcos communication personnelle).

Le fait que les cellules B péritonéales se maintiennent à un nombre relativement constant durant 2 à 3 semaines après leur transfert dans des individus adultes intacts (Publication N°3), au contraire des cellules spléniques qui meurent rapidement après leur transfert i.v. (Publication N°2) indique que ces cellules ont des propriétés cinétiques différentes. Ces différences sont amplifiées lors du transfert dans des animaux irradiés qui permettent une expansion considérable des cellules péritonéales (Hayakawa et coll., 1986b; Publication N°3), au contraire des cellules spléniques qui meurent en quelques jours (Freitas et coll., 1986b). La majorité des cellules B qui persistent sont CD5⁺ (Hayakawa et coll. 1986b; Förster & Rajewsky, 1987; Publication N°5). Ces différences dans le comportement des cellules péritonéales transférées dans des hôtes intacts ou irradiés suggèrent que le nombre et la division des cellules B péritoneales sont très contrôlés chez la souris adulte, dont le système immunitaire est en état d'équilibre et prévient la prolifération des cellules B injectées (Publication N°3). La régulation du nombre de cellules B sera abordée plus loin (c.f.3.4.2).

En conclusion, les cellules B de la cavité péritonéale ont un comportement cinétique tout à fait différent de celui des cellules spléniques de l'adulte. La division et la persistance des cellules péritonéales pourrait pourtant ne pas être génétique, mais provenir de l'interaction constante et répétée avec des antigènes particuliers à l'environnement des cavités coelomiques, conduisant à leur sélection et à leur persistance par leur activation. Les cellules B péritonéales seraient des cellules à vie longue, persistantes, se diviseraient peu et par conséquent aurait un renouvellement lent chez l'adulte. Au contraire, la majorité des cellules spléniques de la souris adulte meurent et sont renouvelées rapidement car elles ne sont pas sélectionnées dans leur environnement.

3.3.3 Dynamique des cellules B durant l'ontogénie

Le premier lieu de production de cellules lymphoïdes durant la vie embryonnaire ne semble pas être extra-embryonnaire, tel que cela avait été proposé pour le sac vitellin, mais plutôt intra-embryonnaire et commencerait dans la zone intra-aortique et para-aortique. Ces zones sont en étroit contact avec la cavité coelomique qui se compartimentalise plus tard en cavité péricardiale, pleurale et péritonéale dans lesquelles les cellules B CD5⁺ sont majoritaires (revue Marcos et coll., 1990). La production de cellules souches lymphoïdes est détectée dans le foie foetal à partir de la moitié de la gestation et jusqu'à deux semaines après la naissance. Peu avant la naissance, l'hématopoïèse commence dans la moelle osseuse (Grossi et coll., 1985). L'omentum (Kubai & Auerbach, 1983, Solvason & Kearney, 1989) et peut-être le placenta (Melchers, 1979) durant la gestation puis la rate dans les premiers jours après la naissance (revue Phillips, 1989) pourraient produire des cellules B. Le taux de production de cellules B par ces tissus ne semble pas être connu à ce jour.

Au contraire du système immunitaire de l'adulte qui est dans un état d'équilibre, celui du souriceau est en pleine croissance et expansion. Une accumulation rapide de cellules doit se produire durant les premières semaines de vie pour atteindre le plateau d'équilibre existant chez l'adulte. L'accumulation des cellules peut se faire, soit par une augmentation de la production cellulaire à partir des cellules souches, soit par une meilleure maturation avec moins de mortalité au stade pré B que chez l'adulte, c'est à

dire sans sélection négative à ce niveau, soit par une augmentation de la durée de vie des cellules B ou encore par la division de cellules B matures dans les compartiments cellulaires périphériques.

La persistance des cellules spléniques B de nouveau-nés âgés de 10 à 14 jours, durant deux semaines après leur transfert chez des souris adultes, est assurée en partie par la division des cellules mise en évidence par la déplétion de 34% des cellules du donneur en traitant les receveurs avec de l'HU (Publication N°2). La possibilité que la persistance des cellules B provenant du nouveau-né provienne de la différenciation de cellules hématopoiétiques peut être exclue car le transfert de cellules médullaires des receveurs chez des hôtes irradiés ne met pas en évidence la reconstitution des cellules du donneur. De même la possibilité de quelques divisions de grandes cellules pré-B permettant la persistance de la population de cellules du donneur nouveau né semble exclue, car nous avons obtenu un comportement cinétique similaire avec des cellules de donneur, dont les grandes cellules éventuellement contaminantes avaient été éliminées.

Nous avons donc mis en évidence, qu'un des mécanismes, non exclusif, d'accumulation des lymphocytes B chez la jeune souris est la division des cellules B matures dans les compartiments périphériques.

Le fait que l'environnement cellulaire de la souris nouveau-née, permette la multiplication et à la persistance de cellules spléniques d'adultes suggère que la division des cellules B dans les compartiments périphériques durant l'ontogénie, pourrait provenir de leur sélection, plutôt que de propriétés inhérentes aux cellules. En effet, l'existence de cellules auto-réactives et multi-réactives B en forte proportion chez le nouveau-né, de même que dans la cavité péritonéale de l'adulte pourraient contribuer comme nous allons le voir, à la sélection des cellules injectées ou des lymphocytes nouvellement formées, et à l'auto-sélection de ces populations lymphocytaires.

3.4 INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE SUR L'ACTIVATION ET LA PERSISTANCE DES CELLULES B

Nous avons vu précédemment que l'environnement cellulaire était déterminant pour la différenciation des lymphocytes B à partir des cellules souches. Nous voudrions maintenant souligner l'importance de l'environnement cellulaire interne, sur la persistance de populations de lymphocytes B matures mais aussi sur leur activation et propriétés fonctionnelles, ainsi que sur leur régulation dans les organes périphériques.

Les cellules B matures provenant de la moelle osseuse sont au repos, et la majorité d'entre elles meurent rapidement dans la rate. Pourtant certaines persistent et même prolifèrent après une immunisation. Dans les conditions naturelles en l'absence d'immunisation volontaire, quel est le mécanisme qui permet la survie des cellules B ? L'ensemble de nos expériences de transfert, ainsi que les données de la littérature, nous permettent de proposer que la durée de vie et la persistance des cellules B dépendrait de l'interaction de leurs récepteurs lymphocytaires avec des antigènes. Ainsi, tous les lymphocytes B matures émergeant des précurseurs hématopoïétiques auraient les mêmes potentialités quant à leur durée de vie et quant à la persistance d'un clone. Seules les interactions des antigènes (internes ou externes) avec leurs récepteurs spécifiques détermineraient le comportement de la cellule : survie au repos, activation, prolifération ou différenciation terminale.

3.4.1 Mise en évidence du rôle de l'environnement cellulaire sur la persistance et la sélection des cellules B

Le fait que l'environnement splénique de souris nouveau-nées (Publication N°2) de même que l'environnement du péritoneum de la souris adulte (Publication N°3) soient capables de permettre la persistance et la division de lymphocytes B spléniques de donneur adulte selon leur répertoire VH, met en évidence que les cellules B spléniques de la souris adulte ne sont pas destinées irréversiblement à mourir mais que leur survie dépend de leur sélection. Ce processus de sélection est très fréquent dans la rate à la

naissance et diminue jusqu'à l'âge de 3 à 4 semaines (Résultats non publiés, 2.2.2). Cet environnement sélectif semble conservé au moins partiellement dans la cavité péritonéale à l'âge adulte.

L'influence de l'environnement cellulaire sur la persistance des cellules B et leur capacité à sécréter des auto-anticorps a également été étudiée par l'équipe de Klinman et Steinberg. Ces auteurs ont constaté que les cellules B spléniques de souris auto-immunes NZB ou normales DBA/2, auto-réactives à l'ADN, aux cellules T, ou aux GRSBr prolifèrent beaucoup plus rapidement que la population de cellules B totale ou anti-TNP-KLH, après leur transfert dans des souris XID (Klinman & Steinberg, 1986, Klinman et coll., 1988b). L'environnement de souris NZB XID permet toutefois une expansion plus rapide des cellules B anti-ADN que l'environnement de receveurs DBA/2 XID (Klinman & Steinberg, 1987). L'ensemble des résultats de cette équipe laisse à penser que les cellules B auto-réactives peuvent proliférer car elles sont en contact permanent avec l'auto-antigène et sont sélectionnées, ce qui n'est pas le cas pour les cellules B non auto-réactives.

La multiplication des cellules B matures est donc liée à leur sélection, plutôt qu'à l'origine génétique des cellules du donneur. Chez un animal adulte intact, la majorité des petites cellules B matures en provenance de la moelle osseuse meurt rapidement, en l'absence d'interaction avec des antigènes. Par contre, certaines cellules auto-réactives peuvent être sélectionnées naturellement par les auto-antigènes de l'individu, conduisant à leur activation ou à leur délétion ou paralysie. Ceci n'exclut pas que les autres cellules non autoréactives puissent se multiplier si leurs récepteurs rencontrent des antigènes adéquats. La prolifération des cellules B est d'ailleurs un phénomène bien connu qui a lieu après une stimulation antigénique et qui peut être entretenu par des transferts successifs en présence de l'antigène, jusqu'à la sénescence des cellules, après une quarantaine de divisions (Björklund & Coutinho, 1982).

Il pourrait exister des différences entre l'environnement cellulaire d'une souris nouveau-née et l'environnement cellulaire splénique et péritonéale d'une souris adulte au niveau de la composition des auto-antigènes cellulaires mais aussi des récepteurs portés ou sécrétés par les lymphocytes. En effet, le répertoire des cellules B est différent selon les compartiments cellulaires et l'âge. Ainsi, les lymphocytes produits chez le nouveau-né sont fortement autoréactifs et multiréactifs (c.f. 3.5) et les

immunoglobulines produites pourraient participer à la sélection de ces lymphocytes et des autres lymphocytes non autoréactifs par la reconnaissance de structures extérieures au paratope. La compartimentalisation très tôt durant l'ontogénie, dans les cavités coelomiques (Marcos et coll., 1990) pourrait expliquer la présence de cellules qui semblent être autoréactives et multiréactives dans la cavité péritonéale (Lalor & Morahan, 1990). Ces cellules pourraient contribuer à leur auto-sélection et leur persistance, mais aussi à la sélection de cellules transitant par la cavité péritonéale, naturellement ou après un transfert cellulaire. L'activation des cellules de l'hôte que nous avons mis en évidence après le transfert de cellules B CD5⁺, ou l'activation de cellules B en plasmocytes après leur transit par la cavité péritonéale (voir 2.5) renforce cette hypothèse.

Les différences de persistance des populations de cellules B spléniques de souris nouveau-nées et d'adulte (Publication N°2) ou des cellules B péritoneales (Publication N°3) peuvent alors s'expliquer par la sélection des répertoires de ces différentes populations. En effet, comme les cellules B du nouveau-né et de la cavité péritonéale ont une fréquence élevée d'autoréactivité et de multiréactivité (c.f. 3.5), la fréquence de cellules sélectionnées par des antigènes du soi et susceptibles de persister après un transfert, est donc plus grande pour ces lymphocytes que pour les cellules B spléniques d'adultes.

Des conclusions similaires ont été formulées quant à la durée de vie des cellules T périphériques qui semble dépendre davantage de l'environnement cellulaire que de propriétés génétiques (Stutman, 1986).

3.4.2 Régulation du nombre et de l'état d'activation des cellules B périphériques

a) Régulation du nombre de cellules B périphériques

L'implantation et la survie des cellules du donneur que nous avons observées lors des transferts cellulaires dépendent de l'état de l'hôte. Lorsque les cellules B sont transférées dans un individu dont le système immunitaire a subi une déplétion par irradiation, ou dans un individu nouveau-né, certaines cellules B du donneur sont capables de se diviser un plus grand nombre de fois et de persister durant plusieurs semaines ou mois après le transfert (voir Publication N° 2, 3).

Une illustration des phénomènes de régulation du nombre de lymphocytes du donneur et de l'hôte est la suivante ; chez un hôte irradié, nous avons observé que la courbe de croissance des cellules péritonéales du donneur est parallèle à la courbe de reconstitution des cellules de l'hôte, et les deux courbes atteignent le pic de reconstitution au même moment. Le nombre de cellules de l'hôte au moment du pic est supérieur au nombre de cellules dans une souris normale. Il a été décrit que c'est l'irradiation qui provoque ce dépassement ou "overshoot". En effet, d'autres auteurs ont montré que la production de cellules B dans la moelle osseuse est augmentée de 1,5 à 2 fois, une semaine après l'irradiation puis revient à des valeurs normales en quelques jours (Park & Osmond, 1989b). Le même phénomène semble exister en ce qui concerne la cinétique des cellules B péritonéales du donneur, dont le nombre se stabilise à une valeur inférieure à celle de l'"overshoot". Les lymphocytes B du donneur sont donc soumis aux mêmes processus de régulation de leur nombre que les lymphocytes du receveur. Ces évolutions dans la cinétique de persistance des cellules du donneur suggèrent qu'un processus de régulation du nombre de cellules B du donneur capables d'être activées et de persister, intervient selon la quantité des cellules de l'hôte et comme nous allons le voir selon leur qualité.

Nos résultats mettent en évidence (Publication N°5) que le nombre absolu de cellules Ly-1B est constant chez les souris irradiées, dont le système immunitaire a été reconstitué avec des cellules péritonéales ou avec des cellules de moelle osseuse ou spléniques, trois mois après le transfert. Les cellules Ly-1B du donneur préviennent la reconstitution des cellules Ly-1B de l'hôte, ce qui montre qu'un processus de régulation du nombre de cellules Ly-1B intervient. Des conclusions similaires ont été formulées par Lalor qui a proposé qu'un mécanisme de régulation en retour contrôle le nombre de cellules B CD5⁺ (Lalor et coll., 1989a et b). En effet, le traitement de souris nouveau-nées homozygotes avec un anti- μ prévient le développement endogène des cellules B mais à l'arrêt du traitement, vers 8 semaines, les cellules B CD5⁻ et CD5⁺ réapparaissent. L'apparition des cellules B CD5⁺ endogènes peut être réduite ou supprimée par l'injection de cellules B CD5⁺ ou même de tumeur Ly-1B monoclonale non sécrétrice. L'injection de cellules CD5⁻ Ig⁺ de la cavité péritonéale n'a, par contre, aucun effet. Le traitement de souris nouveau-nées hétérozygotes, par un anti- μ dirigé contre l'allotype paternel, conduit à la disparition définitive des cellules B CD5⁺ de cet allotype

alors que les cellules B CD5⁺ de l'allotype maternel augmentent leur nombre pour compenser.

Des mécanismes de régulation similaires, du nombre de lymphocytes B existent également chez les oiseaux (Ratcliffe & Ivanyi, 1981, Ratcliffe et coll., 1986, Pink et coll., 1985, Pink, 1986). Chez la souris le nombre de cellules T périphériques est aussi soumis à régulation. En effet, le nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ obtenu après le transfert dans des hôtes histocompatibles est toujours constant, de même que le rapport CD4/CD8 qui est conservé, quel que soit le nombre de cellules T injectées, (Rocha, 1987, Rocha et coll., 1989).

Les processus de régulation du nombre de lymphocytes semblent très complexes. Différentes hypothèses peuvent être proposées, faisant intervenir des interleukines ou la concentration des lymphocytes ou de récepteurs spécifiques solubles. L'action d'Ig circulantes, qui semble également impliquée dans la régulation du nombre de cellules médullaires, mais aussi des interactions cellulaires directes pourraient intervenir dans la régulation du nombre des cellules périphériques et de leur état d'activation.

b) Régulation de l'activation des cellules B.

La régulation de l'activation des lymphocytes B semble dépendre de plusieurs populations cellulaires et des lymphokines sécrétées par ces cellules, mais il semble que les lymphocytes B eux-mêmes ou les Ig jouent un rôle important dans le contrôle de l'activation des cellules B. Le rôle régulateur des cellules B CD5⁺ est très discuté. Pour certains auteurs ces cellules auraient une activité stimulante, pour d'autres inhibitrice. Okumura a décrit des cellules B CD5⁺ qui augmentent la réponse secondaire anti-haptène *in vitro*, de cellules B ayant les mêmes gènes IgVH sans différence allotypique, ce qui suggère des interactions idiotypiques régulatrices entre les cellules B (Okumura et coll., 1982). D'autre part, les IgM produites *in vitro* par les cellules Ly-1 B inhibent la croissance des cellules B spléniques mais pas la croissance des lymphocytes Ly-1B (Braun et coll., 1986). Des interactions entre cellules B pourraient être responsables de l'amplification des réponses de sécrétion et de prolifération de cellules B. Ces interactions pourraient provenir de cellules Ly-1B par l'intermédiaire d'interactions idiotypiques et d'une lymphokine (Sherr & Dorf, 1984, Sherr et coll., 1987), ou par des cellules B naturellement activées, par une combinaison de

surnageant de ces cellules et de fragments membranaires (Uher & Dickler, 1988). Des travaux récents mettent en évidence que les immunoglobulines sériques ont également un rôle sur l'activation des cellules B périphériques (Sundblad & coll. 1990a).

Chez la souris, la prolifération et la sécrétion de cellules péritonéales B CD5⁺ ou CD5⁻ peuvent être stimulées par l'addition d'ester de phorbol (PMA) *in vitro*. L'ester de phorbol seul ne permet pas l'activation des cellules de la rate qui nécessitent l'addition d'un ionophore. L'activation des cellules péritonéales par le PMA peut être augmentée par l'addition de surnageant de cellules T ou d'interleukine 4 (IL-4) recombinante. Ce protocole n'a, au contraire, aucun effet sur les cellules spléniques (Rothstein, 1989). D'autre part, la stimulation des cellules péritonéales par le PMA est inhibée par l'addition d'anticorps anti-Ig (Rothstein & Kolber, 1988 a et b). De même la croissance de cellules tumorales B CD5⁺ peut être inhibée *in vitro* par l'addition d'anti-Ig (Rothstein & Kolber, 1988 a). Ces auteurs ont proposé que l'inhibition de l'activation des cellules B péritonéales par les Ig pourrait s'opérer *in vivo* et serait un moyen de régulation de ces cellules. L'IL-5 est également capable d'augmenter la prolifération et la sécrétion des cellules B activées et particulièrement des cellules B CD5⁺ de la cavité péritonéale de souris, dont la fréquence de réponse semble plus élevée que celle des cellules B d'origine tissulaire différente ce qui serait en faveur du stade de différenciation plus avancé des cellules B CD5⁺ (Wetzel, 1989).

D'une façon générale, le fait que les cellules B spléniques et péritonéales ne répondent pas aux mêmes signaux d'activation *in vitro*, suggère que ces cellules ne sont pas au même stade de maturation. La forte expression d'IgM et la faible expression d'IgD sur les cellules B du péritoneum, ainsi que l'expression des marqueurs Pgp1, MAC1 et CD5 sur les cellules B de la cavité péritonéale, au contraire des cellules B conventionnelles ou CD5⁺ de la rate, pourraient refléter l'existence de ces différents stades de différenciation, d'activation ou de maturation.

Si l'ensemble de ces résultats montrent que les cellules B CD5⁺ ont une action sur la régulation de la prolifération et de la sécrétion des cellules B *in vitro*, les résultats de nos expériences *in vivo* sont en corrélation avec les données précédentes. En effet, le transfert de lymphocytes B quelque soit leur origine, par voie intra-péritonéale provoque une augmentation du nombre de cellules des receveurs sécrétant des IgM. Le transfert de cellules

spléniques par voie intraveineuse n'a, au contraire, aucun effet. Le rôle de cellules sélectionnées dans le péritoneum et éventuellement des immunoglobulines sécrétées par ces cellules, sur la sélection et l'activation d'autres cellules B (pas nécessairement autoréactives) est à prendre en considération. Il a en effet été montré que des anticorps anti-GRSBr se fixent sur les cellules B CD5⁺ de la cavité péritonéale qui utilisent les gènes VH11, ce qui suggère que les Ig sécrétées par ces cellules B sont capables d'auto-fixation (Carmack et coll., 1990). Des conclusions similaires ont été obtenues par notre groupe (F. Huetz communication personnelle). Le rôle régulateur de telles interactions, qu'elles soient stimulatrices ou inhibitrices, peut-être selon la concentration des Ig en jeu, pourrait expliquer les résultats de nos expériences.

La forte augmentation du nombre de cellules B du receveur sécrétant des IgM à l'âge adulte, observée après le transfert de cellules B CD5⁺ provenant de la cavité péritonéale, injectées chez des souris nouveau-nées, alors que le transfert de cellules spléniques ne produit aucune perturbation, sont en faveur du rôle activateur des cellules B CD5⁺ *in vivo*. De telles expériences devront être renouvelées et en particulier expérimentées sur des animaux adultes. Ces propriétés stimulatrices existent-elles pour toutes les cellules B présentes dans le péritoneum ou sont-elles réservées aux seules cellules B CD5⁺ ou d'une façon plus générale aux cellules B auto-réactives? L'intégrité des cellules B CD5⁺ injectées est elle nécessaire à l'activation des cellules B de l'hôte, ou les Ig sécrétées sont elles suffisantes? On peut également se demander si l'effet d'une telle activation des cellules B par les cellules B CD5⁺, n'influence pas la durée de vie des cellules B activées. L'injection simultanée par voie intraveineuse de cellules B CD5⁺ provenant de souris B10.Cr et de cellules B spléniques provenant de souris adulte B6.Igh^a, dont on peut suivre la persistance chez des receveurs B10.Cr, permettrait de vérifier cette hypothèse.

c) *Barrière syngénique observée lors des transferts*

Les mécanismes de régulation de l'activation et du nombre de cellules B que nous venons de voir nous permettent de proposer une interprétation du comportement des cellules B après leur transfert chez des animaux

syngéniques et d'expliquer les phénomènes de "barrière syngénique" décrits par de nombreux auteurs, dont nous allons résumer les observations.

Celada a décrit que la présence d'une "barrière isogénique" empêche la survie et la fonction de cellules immunes lorsqu'elles sont transférées dans des hôtes adultes normaux. En revanche, cette barrière est dépendante de l'âge de la souris. Nulle au début de la vie embryonnaire de la souris, elle augmente exponentiellement jusqu'à l'âge de deux mois et se stabilise en un plateau. Cette barrière radiosensible chez la souris adulte, laissait à penser qu'il s'agissait d'un "manque de place" ou d'une "compétition" entre les cellules du donneur et celles du receveur. Des études plus récentes, sur les raisons possibles de la présence d'une barrière montrent que celle-ci est dépendante de la présence de cellules T (Kobow & Weiler, 1975). En effet, la barrière est inexistante chez les jeunes Nude mais présente chez des souris Nude âgées, chez lesquelles existent des cellules T CD4⁺ qui agissent sur les cellules B (Moll & Bösing-Schneider, 1988). D'autres études suggèrent que la barrière chez les Nude est due à des cellules suppressives radio-sensibles inhibant spécifiquement la réponse primaire à un antigène mais pas la production d'Ig non spécifiques (Weiler et coll., 1985).

A partir d'expériences de transfert de cellules immunes ou naïves dans des hôtes allotypiquement différents, euthymiques, athymiques ou irradiés, Kolb et ses collègues (Kolb & Weiler, 1988) ont tiré les conclusions suivantes : la barrière n'induit pas l'élimination des cellules immunes du donneur, celles-ci pouvant être stimulées dans l'hôte même euthymique, la réponse du donneur dominant même la réponse de l'hôte. Les cellules naïves sont, par contre, sujettes à la barrière de receveur normaux ou même athymiques. Le sens des transferts utilisant des souris congéniques d'allotypes différents est également déterminant pour l'acceptation des cellules naïves. Les transferts utilisant des cellules B de donneur d'allotype Ighb injectées dans des souris hôtes d'allotype Igha conduisent à la suppression des lymphocytes B du donneur, même lors du transfert dans des hôtes irradiés. Ces auteurs suggèrent que la barrière est établie par les cellules B et amplifiée par les cellules T et serait due à des mécanismes faisant intervenir des interactions idiotypiques, comme l'avaient également proposé Bösing-Schneider et coll.. Ceux-ci ont montré que la barrière est absente dans les souris XID et dépendrait du stade de maturation des cellules B plutôt que des cellules T (Bösing-Schneider et coll., 1986). Cette équipe a également mis en évidence que les souris nouveau-nées n'acceptent pas les cellules Ig⁻ provenant de la

moelle osseuse ou de la rate de souris nouveau-nées, et ne permettent pas la différenciation en cellules sécrétant des IgM. Ces auteurs ont proposé que les structures des parties variables des Ig du donneur doivent être reconnues par les cellules du receveur (Bösing-Schneider & Selinka, 1987).

Le fait que la barrière soit dépendante de l'âge du receveur, que les nouveau-nés permettant la survie de cellules immunes, mais aussi celle de cellules naïves de rate de souris adultes, sont des arguments qui font penser que la barrière dépend du stade de maturation et d'activation des cellules de l'hôte et du donneur et de l'interaction entre ces deux populations cellulaires.

Dans le système de transfert que nous avons utilisé, il a été montré que la disparition rapide des cellules spléniques de souris adultes après leur transfert par voie intraveineuse dans des receveurs adultes intacts n'est pas due à des mécanismes actifs de rejet des cellules, ou un manque de place puisqu'une disparition aussi rapide est obtenue après le transfert dans des souris hyperimmunisées ou irradiées. D'autre part, des cellules B à vie longue peuvent persister dans des souris adultes intactes (revue, Freitas et coll., 1986b). Nous allons maintenant proposer une interprétation permettant d'expliquer le comportement des cellules B, après leur transfert ou *in vivo* chez un animal normal.

d) Conditions nécessaires à l'activation et à la persistance des cellules B.

Les mécanismes contrôlant le stade d'activation des cellules B semble faire intervenir des Ig et peut être des anti-IgM ou des anti-idiotypes qui permettraient une régulation négative ou positive de la prolifération et la sécrétion des cellules B. Il a été proposé que selon le taux d'occupation des récepteurs ou la fréquence des interactions, les flux de calcium intracellulaires seraient différents, et conduiraient à des signaux internes particuliers. Ainsi, selon ces hypothèses, sans aucune interaction, le lymphocyte meurt rapidement, alors que le faible taux d'occupation des récepteurs permet la survie des lymphocytes au repos. Une occupation plus importante des récepteurs permet l'activation, la prolifération, la fonction effectrice, alors qu'une occupation maximale des récepteurs conduit à la paralysie (Coutinho, 1990) qui entraînerait la mort cellulaire (apoptosis) (McConkey et coll., 1990). Les cellules autoréactives ont donc des chances d'être activées par des auto-antigènes et de survivre, ou de proliférer ou de

sécréter des Ig. Ces Ig peuvent à leur tour reconnaître des structures idiotypiques sur d'autres cellules non autoréactives et les activer. Ce système provoquerait très vite une activation générale de la population si des mécanismes de régulation n'intervenaient. Cette auto-régulation peut justement avoir lieu en cas de trop forte occupation des récepteurs (ou avec une fréquence trop élevée, ou une trop grande affinité) par la paralysie des lymphocytes. Une telle paralysie pourrait expliquer le comportement des cellules B péritonéales, bloquées dans ce compartiment pour la sécrétion et la prolifération mais capables de ces deux fonctions dans d'autres environnements cellulaires. Un tel mécanisme préviendrait l'excès de cellules (médullaires et périphériques). Si l'origine des cellules B CD5⁺ n'est pas encore bien connue, lignée B différente ou cellules B naturellement activées, il semble que ces cellules aient un rôle particulièrement important dans ces processus d'activation naturelle et de régulations cellulaires. Les cellules B CD5⁺ pourraient être responsables de la barrière syngénique. En effet, ces cellules sont déficientes ou leur répertoire est immature chez les souris qui ne présentent pas de barrière vis à vis de cellules B de donneur, telles que les souris nouveau-nées, les souris adultes irradiées ou XID ou Nude. Les conditions nécessaires à l'acceptation de cellules B de donneur par un hôte syngénique semble être la sélection des cellules du donneur qui n'est possible que si le nombre de cellules B n'est pas optimal.

L'activation et la persistance de cellules B *in vivo* ou de cellules B adoptives semblent, en fait, être des mécanismes de "reconnaissance" et de "tolérance" des cellules syngéniques, et ressemblent aux mécanismes de maintien de tolérance de cellules allogéniques. En effet, il a été mis en évidence que le mécanisme de tolérance à des greffes allogéniques, chez des souris tolérisées à la naissance par des cellules spléniques, n'est pas la conséquence de la suppression ou de la délétion des clones auto-réactifs mais au contraire de l'hyper-activation du système immunitaire de l'hôte et des cellules T et B du donneur, et révélée par la splénomégalie et le fort pourcentage de lymphocytes activés (Bandeira et coll., 1989).

3.5 SELECTION DU REPERTOIRE DES LYMPHOCYTES B

Les mécanismes de sélection du répertoire sont complexes et semblent provenir de l'interaction de plusieurs populations de lymphocytes les unes sur les autres. Il a été mis en évidence que les cellules Ly-1B ou les grandes cellules B de la rate, naturellement activées *in vivo* (présentes chez les souris germ-free) (Pereira et coll., 1986), participent à la sélection du répertoire des lymphocytes T, lesquelles elles-mêmes sélectionnent les lymphocytes B, grâce à un phénomène de récursivité (Marcos et coll., 1988, Martinez-A. et coll., 1988), ce qui conduit à un réseau d'interactions idiotypiques (Jerne, 1974). Ce processus prendrait place très tôt dans l'ontogénie, de manière autonome, indépendamment de l'influence d'antigènes "extérieurs". L'établissement du répertoire durant l'ontogénie est fondamental et des interactions avec des antigènes à cette étape du développement peuvent donner lieu à de graves perturbations dans le répertoire de la souris adulte. Ce phénomène a été mis en évidence par l'injection d'anticorps anti-idiotypique contre un idiotype dominant durant l'ontogénie, porté par des anticorps anti-phosphoryl-choline ou anti-dextran. Une forte diminution de la réponse à ces antigènes a été observée à l'âge adulte après de tels traitements (Vakil et coll., 1986, Kearney & Vakil, 1986).

Si le répertoire est établi durant l'ontogénie, il doit par la suite rester dans un état d'équilibre, alors que des lymphocytes sont produits et sélectionnés tous les jours. Le répertoire exprimé par les cellules B de différentes souris d'une même souche est similaire et reflète cet état d'équilibre existant au sein du système immunitaire. Les répertoires de différentes souches de souris ne sont pas identiques ce qui suppose que le répertoire est au moins partiellement déterminé génétiquement. Cependant, au sein du même individu, le répertoire des lymphocytes est différent durant l'ontogénie, puis dans les divers compartiments cellulaires à l'âge adulte. Il apparaît donc que l'environnement cellulaire joue un rôle primordial dans la sélection et l'expression du répertoire des lymphocytes.

3.5.1 Analyse du répertoire des cellules B

L'étude du répertoire disponible des cellules B a été réalisée par l'analyse de la réactivité des anticorps contre des batteries d'antigènes, soit en utilisant des banques d'hybridomes (Holmberg et coll., 1986a et c), en analysant la fréquence de clones cellulaires B contre les différents antigènes en dilution limite (Eichmann et coll., 1977, Portnoï et coll., 1986), ou récemment en analysant le répertoire actuel des cellules B en ELISA Spot (Bos et coll., 1988, Klinman & Holmes, 1990). D'autres méthodes permettant d'étudier le répertoire des cellules B au niveau moléculaire, consistent en l'étude de la fréquence d'utilisation des familles de gènes VH ou VK par les lymphocytes. Cette étude n'est cependant pas directement reliée à la spécificité de l'anticorps mais permet d'analyser les mécanismes de sélection.

Dans l'ensemble, les résultats montrent qu'il existe de nombreux anticorps auto-réactifs, multi-réactifs (Dighiero et coll., 1985), et anti-idiotypiques (Holmberg et coll., 1984; Holmberg et coll., 1986 a, b, c; Araujo et coll., 1987) dans la rate du nouveau-né, principalement des IgM. Au contraire, le répertoire des cellules B spléniques de souris adultes montre une auto-réactivité bien moins élevée et les clones sont moins poly-réactifs (Holmberg et coll., 1986a).

L'analyse des familles de gènes VH révèle que les gènes VH ne sont pas réarrangés au hasard, mais au contraire, les familles proches de la région D sont réarrangées préférentiellement dans les lignées de cellules Pré B (Yancopoulos et coll., 1984), durant l'ontogénie (Perlmutter et coll., 1985, Yancopoulos et coll., 1988 Jeong & Teale, 1988), et pour les cellules Pré B dans la moelle osseuse chez la souris adulte, (Freitas et coll., 1990, Malynn et coll., 1990). Il existe une corrélation entre les lymphocytes auto-réactifs et multi-spécifiques du nouveau-né et l'utilisation des familles proches de D, 7183 et Q52 (Holmberg, 1987). Ces anticorps utilisent des gènes germinaux avec très peu de diversité de la région N (Carlsson & Holmberg, 1990). L'utilisation de familles VH proche des gènes D et auto-réactifs a également été mise en évidence dans les cellules de foie foetal. Les gènes humains et murins proches de la région D qui semblent impliqués dans des réactions d'auto-réactivité, ont beaucoup d'homologies, ce qui indique qu'ils proviendraient du même gène ancestral. Les régions du "framework" semblent particulièrement impliquées dans le caractère auto-réactif et poly-

spécifique de ces anticorps (Schroeder et coll., 1990). La conservation phylogénique et germinale des gènes VH codant pour des anticorps auto-réactif et poly-réactifs suggère que leur utilisation n'est pas fortuite durant l'ontogénie, mais nécessaire à la sélection du répertoire. L'utilisation ordonnée des gènes VH entraîne la formation séquentielle du répertoire exprimé par les cellules B durant l'ontogénie et l'apparition progressive des réactivités contre les différents antigènes.

Si une forte proportion de cellules pré B de la moelle osseuse expriment des gènes VH proches de la région D, cette préférence n'est plus constatée pour les cellules B matures médullaires (Freitas et coll., 1990). Dans les organes périphériques de la souris adulte, et particulièrement dans la rate, les cellules B semblent utiliser les familles de gènes selon leur complexité et non plus selon leur localisation sur le chromosome (Yancopoulos et coll., 1984, Yancopoulos et coll., 1988, Freitas et coll., 1989a). L'analyse des réactivités des anticorps sécrétés par les cellules B nouvellement formées de la moelle osseuse comparée à celle des cellules B conventionnelles de la rate (Lalor & Morahan, 1990, A. Grandien communication personnelle) révèle que les cellules médullaires ont des fréquences de réactivités à de nombreux antigènes beaucoup plus élevées que les cellules B spléniques. Ces observations suggèrent qu'un bon nombre des cellules pré B, principalement autoréactives et multiréactives, pourraient subir une délétion qui serait corrélée à la forte perte de cellules, décrite entre les stades pré B et B dans la moelle osseuse. Cette hypothèse est renforcée par les expériences de Nemazee & Buerki, (1989) qui ont mis en évidence la délétion clonale de lymphocytes B autoréactifs dont le récepteur est codé par un transgène, entre les stades pré B et B dans la moelle osseuse. La découverte des protéines $\lambda 5$ et Vpré-B, associées de façon provisoire à la chaîne μ et exprimée à la surface des cellules pré B (Sakaguchi & Melchers, 1986; Tsubata & Reth, 1990; Karasuyama et coll., 1990), permettrait d'expliquer la sélection au niveau des cellules pré B en l'absence de récepteur Ig complet. Les cellules ayant une très forte affinité pour les auto-antigènes pourraient subir la délétion peut-être par une trop forte occupation de leur récepteurs, alors que les cellules B ayant des autoréactivités plus faibles ou les cellules non autoréactives seraient conservées et éventuellement sélectionnées et activées dans les compartiments périphériques.

3.5.2 Influence de l'environnement cellulaire sur la sélection du répertoire des lymphocytes B

Certains environnements, par la présence d'antigènes peuvent influencer la distribution des familles de gènes VH. L'établissement du répertoire des cellules B à la périphérie semble en effet dépendre de la présence d'antigènes extérieurs. La famille de gènes 7183 qui est plus fortement exprimée durant l'ontogénie ou dans la moelle osseuse de la souris adulte, persiste à un niveau d'expression élevé dans le répertoire disponible et actuel de souris germ-free, alors qu'elle diminue fortement chez une souris conventionnelle. Ce résultat suggère qu'il existe une sélection négative des cellules utilisant cette famille de gènes chez la souris adulte. Au contraire, la famille X24 est peu exprimée chez la souris germ-free et son utilisation augmente fortement dans le répertoire actuel de souris conventionnelles (Freitas et coll., 1989a). C'est également le cas des lymphocytes B présents dans les plaques de Peyer qui expriment la famille de gènes X24 de façon préférentielle (Freitas et coll., 1989a). Les anticorps codés par cette famille de gènes sont dirigés essentiellement contre les antigènes bactériens qui peuvent être présents localement dans les plaques de Peyer.

Le répertoire exprimé par les cellules B de la cavité péritonéale est légèrement différent de celui des cellules B spléniques à cause de la présence de cellules Ly-1B qui utilisent préférentiellement la famille de gènes VH11 comme nous l'avons signalé plus tôt. L'utilisation de cette famille proviendrait de la sélection des lymphocytes exprimant de tels récepteurs dans l'environnement de la cavité péritonéale et non de propriétés génétiques des cellules B CD5⁺ à utiliser cette famille (Andrade et coll., 1990). D'autres auteurs ont également mis en évidence des différences entre le répertoire des cellules B CD5⁺ de la rate et de la cavité péritonéale (Klinman & Holmes, 1990)

La présence de cellules T influence également le répertoire des cellules B. L'expression de la famille J558 est liée à la présence de cellules T CD4⁺. Cette famille a une représentation diminuée chez la souris Nude mais peut-être restaurée et même augmentée par le transfert de cellules T CD4⁺. De même la famille de gènes J558 est plus utilisée par les cellules B des ganglions que par celles de la rate (rapport T/B supérieur dans les ganglions). Au contraire, l'utilisation de la famille X24 est liée à la présence de cellules T CD8⁺ (Freitas

et coll., 1989b). La présence de cellules T pour la sélection de la réactivité anti-GRSBr des cellules Ly-1B de la rate semble être indispensable, alors que cette réactivité est T-indépendante dans la cavité péritonéale. Ainsi les précurseurs anti-GRSBr sont matures vers 3 semaines dans la cavité péritonéale alors que leur maturation dans la rate nécessite 6 semaines et est dépendante de la présence de cellules T CD4+ (Huetz et coll., 1988 ; Huetz et coll., 1989).

Des hormones peuvent également avoir une incidence sur la sélection du répertoire des cellules B. Les oestrogènes augmentent le taux de production d'anticorps anti-GRSBr dans la cavité péritonéale et dans la moelle osseuse de souris femelles, ou de souris ayant subi un traitement prénatal ou postnatal avec des oestrogènes. Les souris traitées développent alors l'équivalent du syndrome de Sjögren de l'Homme (Ahmed et coll., 1989a). Les oestrogènes n'augmentent pas le nombre total de cellules B ou CD5⁺ mais facilitent la sélection de cellules B réactives aux GRSBr (Ahmed et coll., 1989b), peut être en augmentant la présence de l'antigène sélectionnant ces lymphocytes.

3.5.3 Répertoire et durée de vie des cellules B

La persistance ou l'expansion préférentielle de cellules B de donneur exprimant certaines familles de gènes VH, après leur transfert chez des individus nouveau-nés ou dans la cavité péritonéale de souris adultes, suggèrent que la persistance de certains clones provient de leur sélection positive par l'environnement cellulaire, présent durant l'ontogénie ou dans la cavité péritonéale. Au contraire, la majorité des cellules B de donneur adulte meurent rapidement quelle que soit l'expression de leur famille de gène VH dans la rate du receveur adulte après leur injection i.v. (A.C. Viale, communication personnelle). Ces cellules pourraient être soit sélectionnées négativement par une trop forte occupation des récepteurs conduisant à leur paralysie, soit non sélectionnées, ce qui conduirait également à leur mort en l'absence de stimulus.

En conséquence, le transfert de cellules B conduit à la sélection de certains clones et la population de cellules B qui survit a donc un répertoire différent de la population initialement injectée (Publication N°4). Ce type d'expérience retient donc de tirer des conclusions quant au répertoire de la population de cellules du donneur. Ainsi l'analyse des gènes VH et VL

d'hybridomes dérivés de cellules péritonéales extraites de souris âgées de 6-12 mois, 9 mois après leur transfert chez des nouveau-nés (Rajewsky et coll., 1987, Förster et coll., 1988) a révélé une utilisation très restreinte de gènes VH et VL, correspondant aux familles VH J558, Q52 et VK9, d'origine germinale. Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus, concernant la persistance préférentielle de cellules exprimant ces familles de gènes VH chez les nouveau-nés receveurs de cellules spléniques de donneur adultes. Il semble donc que la restriction obtenue dans le répertoire des hybridomes analysés provienne de leur sélection chez les receveurs nouveau-nés et ne permette pas de conclure quant à la restriction du répertoire des cellules Ly1-B.

La durée de vie des cellules B ne serait donc pas prédéterminée et toutes les cellules B auraient les mêmes potentialités. Cependant, leur interaction avec les antigènes naturellement présents dans chaque individu, conduisent à l'activation de certains clones B, principalement auto-réactifs, qui peuvent se diviser ou peut-être retourner à l'état de cellules B au repos ou encore être éliminés. C'est donc la sélection de certaines cellules B par leur récepteur spécifique qui conduirait à des durées de vie différentes des lymphocytes. L'oligoclonalité de cellules Ly-1B dans la cavité péritonéale de souris âgées et la prolifération de cellules Ly-1 B chez les souris NZB pourrait provenir de la stimulation constante de cellules par un autoantigène particulièrement présent chez ces souris et conduirait à leur activation permanente et leur division si le système de rétro-contrôle est défectueux.

3.6 ACTIVITE FONCTIONNELLE NATURELLE DES CELLULES

B.

Comme nous venons de le voir, il existe des différences dans le répertoire disponible, liées à l'environnement des différents compartiments cellulaires et à la sélection des cellules. Nous pouvons donc nous interroger sur le lieu de différenciation terminale des cellules B et sur l'origine des cellules B sécrétant les anticorps naturels ainsi que le répertoire actuel des Ig sécrétées.

L'activation naturelle des cellules B révélée par la grande taille des cellules met en évidence que 20 à 25% des cellules spléniques contre 45 à 50%

des cellules péritonéales sont grandes. Cependant, il faut noter que seulement 2 à 5 % des cellules activées sécrètent des anticorps principalement d'isotype IgM, la commutation isotypique dépendant de stimulus antigéniques de l'extérieur (Publication N°1). L'existence de cellules B naturellement activées chez la souris axénique sécrétant essentiellement des IgM (Hooijkaas et coll., 1984; Bos et coll., 1989) a permis de démontrer l'activité autonome du système immunitaire (Pereira et coll., 1986). Ces cellules naturellement activées sont présentes en nombre similaire chez les souris axéniques et conventionnelles attestant de l'activation d'origine "interne" des lymphocytes. Il a été montré que les cellules sécrétrices d'anticorps ont une durée de vie courte et proviennent de cellules B en division (Levy & coll., 1987).

Différents organes ont été examinés quant à la production spontanée d'Ig. Les tissus normalement colonisés par les cellules B dans les souris antigen-free, essentiellement la rate, produisent en majorité des IgM à une fréquence de 0,1 à 0,6%. Au contraire, les cellules B des ganglions et des plaques de Peyer sont pratiquement inexistantes et produisent très peu d'IgM. Les cellules sécrétrices de la moelle osseuse dont le nombre augmente avec l'âge, sont essentiellement des cellules préalablement activées dans les organes périphériques qui migrent dans la moelle osseuse (Benner et coll., 1981).

L'activation naturelle des lymphocytes, par les auto-antigènes présents dans tout individu normal implique que les anticorps naturels doivent être auto-réactifs. Les IgM naturelles sont effectivement souvent des anticorps poly-réactifs et des auto-anticorps, et sont associées à l'auto-réactivité naturelle, présente chez tous les individus normaux et ne donnant pas lieu à une pathologie (Guilbert et coll., 1982, revue Marcos et coll., 1989b).

Les anticorps naturels (auto-anticorps) sont sécrétés par les lymphocytes B naturellement activés. L'association entre la production de forte concentration d'IgM sériques et le taux élevé de cellules B CD5⁺ chez la souris auto-immune NZB et la capacité des cellules B CD5⁺ de ces souris à produire spontanément des IgM en culture, a amené certains auteurs à conclure que les cellules Ly-1B étaient responsables de la synthèse des IgM sériques, et ont extrapolé ce résultat à l'animal normal (Hayakawa et coll., 1984, Stall et coll., 1988, Herzenberg et coll., 1986). Cette conclusion est appuyée par le fait que les souris immunodéficientes XID, pauvres en cellules

Ly-1B, ont moins d'IgM sériques que les souris normales (Perlmutter et coll., 1979). Au contraire, les souris Motheaten viables qui ne produisent que des cellules Ly-1B présentent une augmentation de 20 à 50 fois de la concentration de leur IgM et IgG3 sériques (Sidman et coll., 1986). Ces conclusions concernent cependant des souris immunodéficientes dont les régulations sont différentes de celles de souris normales. De plus, les transferts de cellules péritonéales entraînent de fortes productions d'IgM de l'allotype du donneur et la persistance de cellules B CD5⁺ presque exclusivement, et renforcent donc le rôle possible des cellules Ly-1B dans la sécrétion des IgM naturelles. Cependant, ces mêmes auteurs n'ont pu mettre en évidence ni de chimérisme après le transfert de cellules de moelle osseuse dans des souris nouveau-nés ni à fortiori de sécrétion d'IgM. Ces constatations les ont incités à conclure que la majorité des IgM sériques étaient sécrétées par les cellules B CD5⁺ (Förster & Rajewsky, 1987).

Ces résultats ne peuvent exclure que les cellules B conventionnelles puissent se différencier en plasmocytes sécrétant des Ig naturelles. Les résultats de nos transferts de cellules nous ont permis de mettre en évidence que les cellules Ig⁻ de la moelle osseuse ainsi que les cellules spléniques de souris adultes, génèrent des cellules produisant de grandes quantités d'IgM après leur transfert dans des hôtes adultes irradiés, et qui sont même supérieures à celles obtenues après le transfert de cellules péritonéales (Publication N°5). Cependant, tous ces types de transferts conduisent à la reconstitution de cellules B CD5⁺ et CD5⁻. Il semble cependant, qu'une bonne corrélation entre le nombre de cellules B CD5⁻ spléniques et le taux d'IgM sériques puisse être établie.

D'autres auteurs ont rapporté que les transferts de cellules spléniques et de cellules péritonéales chez des souris SCID conduisent à la production d'IgM sériques dans les deux cas, bien que plus faible après le transfert de cellules spléniques (Riggs & coll. 1990).

Il semble que la régulation de la différenciation des cellules B en plasmocytes soit très contrôlée et différente selon les compartiments cellulaires. Ainsi les cellules B de la cavité péritonéale produisent peu d'IgM spontanément. Leur culture pendant un jour même sans LPS permet leur sécrétion. On ne peut donc exclure que les cellules B qui sont dans le péritoneum se différencient en plasmocytes lors de leur migration dans d'autres compartiments cellulaires. Les interactions avec les antigènes de la

cavité péritonéale pourraient bloquer leur différenciation en plasmocytes de la même façon que leur prolifération.

Cette hypothèse est renforcée par les résultats suivants: les souris NZB âgées développent des cellules B CD5⁺ hyperdiploïdes dans la rate mais rarement dans la cavité péritonéale. Le transfert de ces cellules hyperdiploïdes de rate à des souris F1(NZB X DBA/2) non irradiées conduit à une augmentation de 2 à 10 fois du nombre de cellules B qui sont pour la plupart originaires du donneur. Cependant, le taux d'IgM dans le sérum des souris ayant reçu ces cellules est très diminué et indique que les cellules B CD5⁺ hyperdiploïdes ne secrètent pas d'anticorps et qu'elles permettraient la régulation négative de la production d'anticorps par les autres cellules B (Raveche et coll., 1988).

Il semble donc difficile de tirer des conclusions sur l'origine des cellules B qui secrètent les anticorps naturels. Les cellules B spléniques secrètent spontanément des IgM alors que les cellules B coelomiques semblent bloquées dans leur stade de différenciation terminale. La sélection des cellules B pourrait avoir lieu dans la cavité péritonéale qui constituerait un réservoir de cellules auto-réactives très régulées permettant la sélection d'autres lymphocytes si le maximum du nombre de cellules B n'est pas atteint. Les lymphocytes B sélectionnés pourraient alors migrer dans la rate et s'y différencier en cellules sécrétrices.

CONCLUSION

L'approche expérimentale que nous avons employée pour étudier l'influence de l'environnement cellulaire sur la dynamique et la sélection des cellules B a fait appel à des systèmes de transfert de cellules. Ce système expérimental a un caractère artificiel puisqu'il implique la manipulation des cellules *in vitro* et l'usage de marqueurs cellulaires différents entre donneur et receveur. Nous avons analysé les conditions propres au transfert de cellules et agissant sur les cellules du donneur ou de l'hôte, concernant aussi bien la voie d'injection des cellules, l'âge du donneur et du receveur, l'organe d'origine des cellules, l'état du système immunitaire de l'hôte. Tenant compte de ces paramètres nous avons pu analyser précisément le comportement des populations cellulaires B du donneur et de l'hôte aussi bien au niveau de leur cinétique que de la sélection de leur répertoire des gènes VH, de leur capacité à reconstituer les différentes populations de cellules B et à sécréter des IgM naturellement, et de l'interaction entre les différentes populations cellulaires B. Les principales conclusions que nous avons tirées de ce travail sont les suivantes :

- 1) La majorité des cellules B spléniques de souris adultes meurent rapidement en l'absence de sélection positive dans leur environnement.
- 2) L'environnement cellulaire de souris nouveau-nées permet la sélection positive et la division des cellules spléniques d'adulte, selon les familles de gènes VH exprimées par les récepteurs des lymphocytes B.
- 3) Cet environnement sélectif néonatal pourrait permettre la sélection des cellules du nouveau-né dont une certaine proportion peut persister et se diviser dans les organes périphériques et contribueraient à la croissance du système immunitaire du souriceau.
- 4) L'environnement cellulaire de la cavité péritonéale a également la propriété de sélectionner positivement certaines cellules B spléniques de souris adultes selon le récepteur VH exprimé.

5) La persistance de la population des cellules B péritonéales et leur division dans différents compartiments cellulaires de souris hôtes peut alors être expliquée par la sélection primaire de certaines cellules B dans la cavité péritonéale, comme nous l'avons proposé pour les cellules B du nouveau-né.

6) En conséquence, la persistance et/ou la division des cellules B dépend de leur sélection par l'intermédiaire de leur récepteur, par des antigènes présents naturellement dans les environnements cellulaires. La décision de division ou de persistance au repos ou de maturation des cellules B n'est donc pas une propriété génétiquement déterminée, mais dépend directement des interactions de leurs récepteurs avec des antigènes.

7) Une étroite régulation prévient la persistance et la sélection des populations lymphocytaires chez les souris dont le système immunitaire est à l'état d'équilibre. Au contraire, les cellules B sélectionnées positivement peuvent proliférer chez des animaux dont le système immunitaire est en expansion tels que les nouveau-nés ou les souris adultes rendues immunodéficientes par irradiation.

8) Alors que les propriétés de sélection de l'environnement cellulaire sont maximales dans la rate à la naissance elles diminuent jusqu'à l'âge adulte mais sont conservées au moins partiellement dans la cavité péritonéale. Cependant, la régulation du nombre de cellules empêche leur prolifération et activation dans la cavité péritonéale de l'adulte.

9) Le transfert de cellules B CD5⁺ péritonéales est capable d'activer la sécrétion des cellules B de l'hôte. Ainsi, les cellules B CD5⁺ présentes dans la cavité péritonéale ou chez les souris nouveau-nées pourrait avoir un rôle dans la sélection et la persistance des cellules B spléniques provenant de donneur adulte, ou dans la sélection des cellules B naturellement présentes dans ces environnements.

10) Outre leur persistance et/ou leur division après leur transfert, les populations de cellules B quelle que soit leur origine, splénique, péritonéale ou médullaire participent à la sécrétion d'IgM naturelles. Les cellules Ig⁻médullaires reconstituent les populations de cellules B CD5⁻ et CD5⁺ chez des animaux irradiés et peuvent participer à la sécrétion d'IgM naturelles.

Ces résultats posent de nombreuses questions, concernant la dynamique des lymphocytes B durant l'ontogénie qui reste encore très peu connue, la

régulation du nombre et de l'activation des lymphocytes B. Les mécanismes de la sélection positive ou négative des lymphocytes, les antigènes qui sélectionnent les cellules B de façon naturelle ou encore le rôle des cellules B CD5⁺, dont l'origine reste toujours obscure, dans la sélection des lymphocytes B et leur régulation sont autant de points qui restent à élucider.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, S. A., Aufdemorte, T. B., Chen, J. R., Montoya, A. I., Olive, D. & Talal, N. (1989a) Estrogen induces the development of autoantibodies and promotes salivary gland lymphoid infiltrates in normal mice. *J. Autoimmun.* 2 : 543.
- Ahmed, S. A., Dauphinee, M. J., Montoya, A. I. & Talal, N. (1989b) Estrogen induces normal murine CD5+ B cells to produce autoantibodies. *J. Immunol.* 142 : 2647.
- Alt, F. W., Rathbun, G., Berman, J., Malynn, B., Morrow, M., Logtenberg, T. & Yancopoulos, G. (1989) B cell differentiation : development of antibody repertoires. *Progress in Immunology.* 7 : 351.
- Andrade, L., Freitas, A. A., Huetz, F., Poncet, P. & Coutinho, A. (1989) Immunoglobulin VH gene expression in Ly-1 and conventional B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19 : 1117.
- Andrade, L., Huetz, F., Poncet, P., Thomas-Vaslin V., Goodheart, M. & Coutinho, A. (1990) Biased VH gene expression by Ly1-B cells results from age-dependent cellular selection. *Submitted for publication.*
- Antin, J. H., Emerson, S. G., Martin, P., Gadol, N. & Ault, K. A. (1986) Leu-1+ (CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J. Immunol.* 136 : 505.
- Araujo, P. M. F., Holmberg, D., Martinez-A., C. & Coutinho, A. (1987) Idiotypic multireactivity of "natural" antibodies: "natural" anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. *Scand. J. Immunol.* 25 : 497.
- Ault, K. A., Antin, J. H., Ginsburg, D., Orkin, S. H., Rapoport, J. M., Keohan, M. L., Martin, P. & Smith, B. R. (1985) Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 161 : 1483.
- Bandeira, A., Coutinho, A., Carnaud, C., Jacquemart, F. & Forni, L. (1989) Transplantation tolerance correlates with high levels of T- and B-lymphocyte activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 272.
- Benner, R., Rijnbeek, A. M., Bernabé, R. R., Martinez-A., C. & Coutinho, A. (1981) Frequencies of background Ig-secreting cells in mice, as a function of organ, age and immune status. *Immunobiology.* 158 : 225.
- Berek, C. & Milstein, C. (1988) The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol. Rev.* 105 : 5.

- Björklund, M. & Coutinho, A. (1982) Isotype commitment in the in vivo immune responses. I. Antigen-dependent specific and polyclonal plaque-forming cell responses by B lymphocytes induced to extensive proliferation. *J. Exp. Med.* **156** : 690.
- Bos, N. A., Kimura, H., Meeuwsen, C. G., De Visser, H., Hazenberg, M. P., Wostmann, B. S., Pleasants, J. R., Benner, R. & Marcus, D. M. (1989) Serum immunoglobulin levels and naturally occurring antibodies against carbohydrate antigens in germ-free BALB/C mice fed chemically defined ultrafiltered diet. *Eur. J. Immunol.* **19** : 2335.
- Bos, N. A., Meeuwsen, C. G., Wostmann, B. S., Pleasants, J. R. & Benner, R. (1988) The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. *Cell. Immunol.* **112** : 371.
- Bösing-Schneider, R. & Selinka, H. C. (1987) Evidence for a mutual influence of idiotype expressing donor cells and recipient lymphocytes in neonatal hosts. *Eur. J. Immunol.* **17** : 1531.
- Bösing-Schneider, R., Selinka, H. C. & Lehle, G. (1986) B cell dependence of the congenic barriers towards idiotype-carrying cells. *Eur. J. Immunol.* **16** : 1401.
- Brahim, F. & Osmond, D. G. (1970) Migration of bone marrow lymphocytes demonstrated by selective bone marrow labelling with ³H-thymidine. *Anat. Rec.* **168** : 139.
- Braun, J. & King, L. (1989) Unique V gene usage by B-Ly1 cell lines, and a discordance between isotype switch commitment and variable region hypermutation. *J. Mol. Cell Immunol.* **4** : 121.
- Braun, J. (1983) Spontaneous in vitro occurrence and long-term culture of murine B lymphoblast cell lines. *J. Immunol.* **130** : 2113.
- Braun, J., Citri, Y., Baltimore, D., Forouzanpour, F., King, L., Teheranizadeh, K., Bray, M. & Kliwer, S. (1986) B-Ly1 cells : immortal Ly1+ B lymphocyte cell lines spontaneously arising in murine splenic cultures. *Immunol. Rev.* **93** : 5.
- Brodeur, P. H. & Riblet, R. (1984) The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur. J. Immunol.* **14** : 922.
- Burnet, M. F. (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci.* **20** : 67.
- Caligaris-Cappio, F., Gobbi, M., Bofill, M. & Janossy, G. (1982) Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **155** : 623.
- Carlsson, L. & Holmberg, D. (1990) Genetic basis of the neonatal antibody network: high connectivity correlates with limited N-region diversity and germ-line V-gene expression. *Intern. Immunol.* **2** : 639.

- Carmack, C. E., Shinton, S. A., Hayakawa, K. & Hardy, R. R. (1990) Rearrangement and selection of VH11 in the Ly-1 B cell lineage. *J. Exp. Med.* **172** : 371.
- Casali, P. & Notkins, A. L. (1989) CD5⁺ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today*. **10** : 364.
- Colle, J., Truffa-Bachi, P. & Freitas, A. A. (1988) Secondary antibody responses to thymus-independent antigens. Decline and life-span of memory. *Eur. J. Immunol.* **18** : 1307.
- Conger, J. D., Sage, H. J. & Corley, R. B. (1989) Diversity in the available repertoire of murine antibodies reactive with bromelain-treated isologous erythrocytes. *J. Immunol.* **143** : 4044.
- Coutinho, A. (1980) The self-nonself discrimination and the nature and acquisitions of the antibody repertoire. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*. **131 D** : 235.
- Coutinho, A. (1990) The physiology of auto-immune reactivities. 1989 Yakult International Symposium "Frontiers in Immunology". Yakult Honsha Co.Ltd. : 7.
- Coutinho, A., Andersson, A., Sundblad, A., Lundkvist, I., Holmberg, D., Arala-Chaves, M., Stewart, J. & Varela, F. (1989) Immune networks dynamics. J. & U. Urbain F.G.C.M. Idiotypic Networks in Biology and Medicine, Osterhaus, A.D.M.E. Elsevier Science Publishers : In press.
- Coutinho, A., Bandeira, A., Pereira, P., Portnoi, D., Holmberg, D., Martinez-A., C. & Freitas, A. (1990) Selection of lymphocyte repertoires: the limits of clonal versus network organization. C. S. H. Laboratory. Symposia on Quantitative Biology. **54** : 159.
- Crippen, T. L. & Jones, I. M. (1989) Cell proliferation in the bone marrow, thymus and spleen of mice studied by continuous, in vivo bromodeoxycytidine labelling and flow cytometric analysis. *Cell Tissue Kinet.* **22** : 203.
- Cunningham, A. J. (1974) Large numbers of cells in normal mice produce antibody. *Nature (Lond.)*. **252** : 749.
- Deenen, G. J., Hunt, S. V. & Opstelten, D. (1987) A statmokinetic study of B lymphopoiesis in rat bone marrow: proliferation of cells containing cytoplasmic μ -chains, terminal deoxynucleotidyl transferase and carrying HIS24 antigen. *J.Immunol.* **39** : 702.
- Deenen, G. J., Van Balen, I. & Opstelten, D. (1990) In rat B lymphocyte genesis sixty percent is lost from the bone marrow at the transition of nondividing pre-B cell to sIgM⁺ B lymphocyte, the stage of Ig light chain expression. *Eur. J. Immunol.* **20** : 557.
- Dighiero, G., Lymberi, P., Holmberg, D., Lundkvist, I., Coutinho, A. & Avrameas, S. (1985) High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J. Immunol.* **134** : 765.

- Eichmann, K., Coutinho, A. & Melchers, F. (1977) Absolute frequencies of Lipopolysaccharide-reactive B cells producing A5A idiotype in unprimed, streptococcal A carbohydrate-suppressed A/J mice. *J. Exp. Med.* **146** : 1436.
- Förster, I. & Rajewsky, K. (1987) Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur. J. Immunol.* **17** : 521.
- Förster, I., Gu, H. & Rajewsky, K. (1988) Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *EMBO J.* **7** : 3693.
- Förster, I., Vieira, P. & Rajewsky, K. (1989) Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse. *Int. Immunol.* **1** : 32.
- Freedman, A. S., Boyd, A. W., Bieber, F. R., Daley, J., Rosen, K., Horowitz, J. C., Levy, D. N. & Nadler, L. M. (1987) Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **70** : 418.
- Freitas, A. A. & Coutinho, A. (1981) Very rapid decay of mature B lymphocytes in the spleen. *J. Exp. Med.* **154** : 994.
- Freitas, A. A., Andrade, L., Lembezat, M. P. & Coutinho, A. (1990) Selection of VH gene repertoires: differentiating B cells of adult bone marrow mimic fetal development. *Int. Immunol.* **2** : 15.
- Freitas, A. A., Lembezat, M. P. & Coutinho, A. (1989) Expression of antibody V-regions is genetically and developmentally controlled and modulated by the B lymphocyte environment. *Int. Immunol.*, **1** : 342.
- Freitas, A. A., Lembezat, M. P. & Rocha, B. (1989) Selection of antibody repertoires. Transfer of mature T lymphocytes modifies VH gene family usage in the actual and available B cell repertoires of athymic nude mice. *Int. Immunol.* **1** : 398.
- Freitas, A. A., Rocha, B. & Coutinho, A. (1986b) Life span of B lymphocytes: the experimental basis for conflicting results. *J. Immunol.* **136** : 470.
- Freitas, A. A., Rocha, B. & Coutinho, A. (1986) Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol. Rev.* **91** : 5.
- Freitas, A. A., Rocha, B. & Coutinho, A. (1986) Two major classes of mitogen-reactive B lymphocytes defined by life-span. *J. Immunol.* **136** : 466.
- Freitas, A. A., Rocha, B., Forni, L. & Coutinho, A. (1982) Population dynamics of B lymphocytes and their precursors: demonstration of high turnover in the central and peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.* **128** : 54.
- Freitas, A. F. & Sidman, C. L. (1990) VH gene family repertoires of "viable motheaten" (mev) mice. *Eur. J. Immunol.* **20** : 1033.
- Fulop, G. M. & Osmond, D. G. (1983) Regulation of bone marrow, lymphocyte production. III. Increased production of B and non-B lymphocytes after administering systemic antigens. *Cell. Immunol.* **75** : 80.

- Fulop, G. M., Gordon, Y. & Osmond, D. G. (1983) Regulation of bone marrow lymphocyte production. I. Turnover of small lymphocytes in mice depleted of B lymphocytes by treatment with anti-IgM antibodies. *J. Immunol.* **130** : 644.
- Gibson, M., Hardin, J. A. & Sherr, D. H. (1990) A CD5+ B cell hybridoma derived factor(s), which induces maturation of CD5+, idiotype-specific B-cell populations. *J. Mol. Cell. Immunol.* **4** : 241.
- Gorof, D. K. & Finkelman, F. D. (1989) Life span of mature BALB/c B cells in allotype congenic CB20 mice. *7th. Int.Cong.Immunol. (abstract).* : 262.
- Gray, D. (1988) Population kinetics of rat peripheral B cells. *J.Exp.Med.* **167** : 805.
- Grossi, C. E., Velardi, A. & Cooper, M. D. (1985) Postnatal liver hemopoiesis in mice : generation of pre-B cells, granulocytes, and erythrocytes in discrete colonies. *J. Immunol.* **135** : 2303.
- Guilbert, B., Dighiero, G. & Avrameas, S. (1982) Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterisation. *J Immunol.* **128** : 2779.
- Hardin, J. A., Gibson, M., Kawano, Y., Spielberg, S., Martin, C., Collins, M., Dorf, M. E. & Scherr, D. H. (1990) Characterization of a B cell helper factor(s) derived from CD5+ B cell hybridomas. *Cell. Immunology.* **126** : 304.
- Hardy, R. & Hayakawa, K. (1986) Development and physiology of Ly-1 B cells and its human homology Leu-1 B cells. *Immunol. Rev.* **93** : 53.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Riblet, R. J. & Hayakawa, K. (1989) A single VH gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the VH11 family. *J. Immunol.* **142** : 3643.
- Hayakawa, K. & Hardy, R. (1988) Normal, autoimmune and malignant CD5+ B cells: the Ly-1 B lineage? *Ann. Rev. Immunol.* **6** : 197.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R. & Herzenberg, L. A. (1986a) Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur. J. Immunol.* **16** : 450.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. (1985) Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors from other B cells. *J. Exp. Med.* **161** : 1554.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Herzenberg, L. A., Steinberg, A. D. & Herzenberg, L. A. (1983a) A functionally distinct B cell population. *Progr. Immunol.* **5** : 661.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Honda, M., Herzenberg, L. A., Steinberg, A. D. & Herzenberg, L. A. (1984) Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81** : 2494.

- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R. & Herzenberg, L. A. (1983b) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal, immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* **157** : 202.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Stall, A. M. & Herzenberg, L. A. (1986b) Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur. J. Immunol.* **16** : 1313.
- Herzenberg, L. A., Stall, A. M., Lalor, P. A., Sidman, C., Moore, W. A., Parks, D. R. & Herzenberg, L. A. (1986) The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.* **93** : 81.
- Heyman, R. A., Borrelli, E., Lesley, J., Anderson, D., Richman, D. D., Baird, S. M., Hyman, R. & Evans, R. M. (1989) Thymidine kinase obliteration : creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **86** : 2698.
- Holmberg, D. (1987) High connectivity, natural antibodies preferentially use 7183 and QUPC 52 VH families. *Eur. J. Immunol.* **17** : 399.
- Holmberg, D., Forsgren, S., Ivars, F. & Coutinho, A. (1984) Reactions amongst IgM antibodies derived from normal, neonatal mice. *Eur. J. Immunol.* **14** : 435.
- Holmberg, D., Freitas, A., Portnoi, D., Jacquemart, F., Avrameas, S. & Coutinho, A. (1986a) Antibody repertoires of normal BALB/c mice: B lymphocyte populations defined by state of activation. *Immunol. Rev.* **93** : 147.
- Holmberg, D., Wennerström, G., Andrade, L. & Coutinho, A. (1986b) The high idiotypic connectivity of "natural" newborn antibodies is not found in adult, mitogen-reactive B cell repertoires. *Eur. J. Immunol.* **16** : 82.
- Hooijkaas, H., Benner, R., Pleasants, J. R. & Wostmann, B. S. (1984) Isotypes and specificities of immunoglobulin produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur. J. Immunol.* **14** : 1127.
- Huetz, F. & Poncet, P. (1989) Immunocompetence of peritoneal B cells. *Res. Immunol.* **140** : 75.
- Huetz, F., Poncet, P., Coutinho, A. & Portnoi, D. (1989) Ontogenic development of auto-antibody repertoires: examples of T cell-dependent and independent reactivities. *Eur. J. Immunol.* **19** : 1195.
- Huetz, F., Sciard-Larsson, E., Pereira, P., Portnoi, D. & Coutinho, A. (1988) T cell dependence of "natural" auto-reactive B cell activation in the spleen of normal mice. *Eur. J. Immunol.* **18** : 1615.
- Ikuta, K., Kina, T., MacNeil, I., Uchida, N., Peault B., Chien, Y-H., & Weissman, I. (1990) A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell.* **62** : 863.
- Jeong, H. D. & Teale, J. (1988) Comparison of the foetal and adult functional B cell repertoires by analysis of VH gene family expression. *J. Exp. Med.* **168** : 589.

- Jeong, H. D. & Teale, J. (1989) VH gene family repertoire of resting B cells. Preferential use of D-proximal families early in development may be due to distinct B cell subsets. *J. Immunol.* **143** : 2752.
- Jerne, N. K. (1955) The natural selection theory of antibody formation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **41** : 848.
- Jerne, N. K. (1971) The somatic generation of immune recognition. *Eur. J. Immunol.* **1** : 1.
- Jerne, N. K. (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Inst. Pasteur)*. **125C** : 373.
- Jerne, N. K. (1984) Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol. Rev.* **79** : 5.
- Karasuyama, H., Kudo, A. & Melchers, F. (1990) The proteins encoded by the VpreB and lambda5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J. Exp. Med.* **172** : 969.
- Kearney, J. & Vakil, M. (1986) Idiotype directed interaction during ontogeny play a major role in the establishment of the adult B cell repertoire. *Immunol. Rev.* **94** : 39.
- Kincade, P. W. (1989) Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Ann. Rev. Immunol.* **7** : 111.
- Kipps, T. J. (1989) The CD5 B cell. *Adv. Immunol.* **47** : 117.
- Klinman, D. A. & Steinberg, A. D. (1986) Proliferation of anti-DNA-producing NZB B cells in a non-autoimmune environment. *J. Immunol.* **137** : 69.
- Klinman, D. M. & Holmes, K. L. (1990) Differences in the repertoire expressed by peritoneal and splenic Ly-1 (CD5+) B cells. *J. Immunol.* **144** : 4520.
- Klinman, D. M. & Steinberg, A. D. (1987) Similar in vivo expansion of B cells from normal DBA/2 and autoimmune NZB in xid recipients. *J. Immunol.* **139** : 2284.
- Klinman, D. M., Ishigatsubo, Y. & Steinberg, A. D. (1988a) Acquisition and maturation of expressed B cell repertoires in normal and autoimmune mice. *J Immunol.* **141** : 801.
- Klinman, D. M., Ishigatsubo, Y. & Steinberg, A. D. (1988b) Studies on the influence of the internal environment on autoantibody production by B cells. *Cell.Immunol.* **117** : 360.
- Kobow, U. & Weiler, E. (1975) Permissiveness of athymic ("nude") mice towards congenic memory cells. *Eur. J. Immunol.* **5** : 628.
- Kolb, C. & Weiler, E. (1988) Regulation of B-cell expression as revealed in the congenic barrier : exerted by B cells, augmented by T cells, and directed toward memory as well as naive donor B lymphocytes. *Cell. Immunol.* **111** : 433.

- Kroese, F. G. M., Butcher, E. C., Stall, A. M., Lalor, P. A., Adams, S. & Herzenberg, L. A. (1989) Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int. Immunol.* **1** : 1.
- Kubai, L. & Auerbach, R. (1983) A new source of embryonic lymphocytes in the mouse. *Nature.* **301** : 154.
- Kumararatne, D. S., Gray, D., MacLennan, I. C. M., Lortan, J., Platteau, B. & Bazin, H. (1985) The paradox of high rates of B cell production in bone marrow and the longevity of most mature B cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* **186** : 73.
- Lalor, P. A. & Morahan, G. (1990) The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. *Eur.J.Immunol.* **20** : 485.
- Lalor, P. A., Herzenberg, L. A., Adams, S. & Stall, A. M. (1989a) Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur. J. Immunol.* **19** : 507.
- Lalor, P. A., Stall, A. M., Adams, S. & Herzenberg, L. A. (1989b) Permanent alteration of the murine Ly-1 B repertoire due to selective depletion of Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur. J. Immunol.* **19** : 501.
- Landreth, K. S., Rosse, C. & Clagett, J. (1981) Myelogeneous production and maturation of B lymphocytes in the mouse. *J. Immunol.* **127** : 2027.
- Lévy, M. & Coutinho, A. (1987) Long-lived B cells: mitogen reactivity as a tool for studying their life spans. *Eur. J. Immunol.* **17** : 295.
- Lévy, M., Bandeira, A., Forni, L. & Coutinho, A. (1988) A phenotypic and functional analysis of long-lived B and T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **117** : 327.
- Lévy, M., Vieira, P., Coutinho, A. & Freitas, A. (1987) The majority of "natural" immunoglobulin-secreting cells are short-lived and the progeny of cycling lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **17** : 849.
- Lundkvist, I., Coutinho, A., Varela, F. & Holmberg, D. (1989) Evidence for a functional network amongst natural antibodies in normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86** : 5074.
- Malynn, B. A., Yancopoulos, G. D., Barth, J. E., Bona, C. A. & Alt, F. W. (1990) Biased expression of Jh-proximal VH genes occurs in the newly generated repertoire of neonatal and adult mice. *J. Exp. Med.* **171** : 843.
- Manohar, V., Brown, E., Leiserson, W. M. & Chused, T. M. (1982) Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. *J. Immunol.* **129** : 532.
- Marcos, M. A. R., De la Hera, A., Pereira, P., Marquez, C., Toribio, M. L., Coutinho, A. & Martinez-A., C. (1988) B-cell participation in the recursive selection of T-cell repertoires. *Eur. J. Immunol.* **18** : 1015.
- Marcos, M. A. R., Gutierrez, J. C., Huetz, F., Martinez-A, C. & Dieterlen-Lievre, F. (1990) Waves of B-lymphopoiesis in the establishment of the mouse B-cell compartment. *Submitted for publication.* :

- Marcos, M. A. R., Huetz, F., Pereira, P., Andreu, J. L., Martinez-A., C. & Coutinho, A. (1989a) Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* **19** : 2031.
- Marcos, M. A. R., Sundblad, A., Grandien, A., Huetz, F., Avrameas, S. & Coutinho, A. (1989b) The physiology of autoimmune reactivities. *Progress in Immunology.* **7** : 793.
- Martinez-A., C., Toribio, M. L., Pereira, P., Marcos, M. A. R., Bandeira, A., De la Hera, A., Marquez, C., Cazenave, P.-A. & Coutinho, A. (1988) The participation of B cells and antibodies in the selection and maintenance of T cell repertoires. *Immunol. Rev.* **101** : 191.
- McConkey, D. J., Orrenius, S. & Jondal, M. (1990) Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol.Today.* **11** : 120.
- Medlock, E. S., Goldschneider, I., Greiner, D. L. & Shultz, L. (1987) Defective lymphopoiesis in the bone marrow of motheaten (me/me) and viable motheaten (me v/me v) mutant mice. II. Description of a microenvironmental defect for the generation of terminal deoxynucleotidyltransferase-positive bone marrow cells in vitro. *J. Immunol.* **138** : 3590.
- Melchers, F. (1979) Murine embryonic B lymphocyte development in the placenta. *Nature.* **277** : 219.
- Mercolino, T. J., Arnold, L. W., Hawkins, L. A. & Haughton, G. (1988) Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. *J. Exp. Med.* **168** : 687.
- Mercolino, T. J., Locke, A. L., Afshari, A., Sasser, D., Travis, W. W., Arnold, L. W. & Haughton, G. (1989) Restricted immunoglobulin variable region gene usage by normal Ly-1 (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. *J. Exp. Med.* **169** : 1869.
- Miller, R. A. & Gralow, J. (1984) The induction of Leu-1 antigen expression in human malignant and normal B cells by phorbol myristic acetate (PMA). *J. Immunol.* **133** : 3408.
- Miyama-Inaba, M., Kuma, S., Inaba, K., Ogata, H., Iwai, H., Yasumizu, R., Maramatsu, S., Steinman, R. M. & Ikehara, S. (1988) Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *J. Exp. Med.* **168** : 811.
- Moll, H. & Bosing-Schneider, R. (1988) The transplantation barrier of nude mice. *Immunobiol.* **177** : 23.
- Murphy, T. P., Kolber, D. L. & Rothstein, R. L. (1990) Elevated expression of Pgp-1 (Ly-24) by murine peritoneal B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **20** : 1137.
- Nemazee, D. & Buerki, K. (1989) Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86** : 8039.

- O'Brien, T. F. & Coons, A. H. (1963) Studies on antibody production. VII. The effect of 5-bromodeoxyuridine on the "in vitro" anamnestic antibody response. *J. Exp. Med.* **117** : 1063.
- Okumura, K., Hayakawa, K. & Tada, T. (1982) Cell-to-cell interaction controlled by immunoglobulin genes. Role of Thy-1-, Lyt-1+, Ig+ (B') cell in allotype-restricted antibody production. *J. Exp. Med.* **156** : 443.
- Opstelten, D. & Osmond, D. G. (1983) Pre-B cells in mouse bone marrow: immunofluorescence stathmokinetic studies of the proliferation of cytoplasmic μ -chain-bearing cells in normal mice. *J. Immunol.* **131** : 2635.
- Opstelten, D. & Osmond, D. G. (1985) Regulation of pre-B cell proliferation in bone marrow : immunofluorescence stathmokinetic studies of cytoplasmic mu chain-bearing cells in anti-IgM-treated mice, hematologically deficient mutant mice and mice given sheep red blood cells. *Eur. J. Immunol.* **15** : 599.
- Osmond, D. G. & Nossal, G. J. V. (1974) Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. II. Kinetics of maturation and renewal of antiglobulin-binding cells studied by double labelling. *Cell. Immunol.* **13** : 132.
- Osmond, D. G. (1986) Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol. Rev.* **93** : 103.
- Palacios, R., Karasuyama, H. & Rolink, A. (1987) Ly-1+ PRO-B lymphocyte clones. Phenotype, Growth requirements and differentiation *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.* **6** : 3687.
- Palacios, R., Stuber, S. & Rolink, A. (1989) The epigenetic influences of bone marrow and fetal liver stroma cells on the developmental potential of Ly-1+ pro-B lymphocyte clones. *Eur. J. Immunol.* **19** : 347.
- Park, Y. H. & Osmond, D. G. (1989a) Dynamics of early B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow : proliferation of cells containing terminal deoxynucleotidyl transferase. *Eur. J. Immunol.* **19** : 2139.
- Park, Y. H. & Osmond, D. G. (1989b) Post-irradiation regeneration of early B-lymphocyte precursor cells in mouse. *Immunol.* **66** : 343.
- Park, Y., Yoshida, Y., Uchino, H., Miyama-Inaba, M. & Masuda, T. (1985) Migration and differentiation of bone marrow lymphocytes: development of surface immunoglobulin, Fc receptor, complement receptor and functional responsiveness as studied with anti-allotype serum. *Cell. Immunol.* **93** : 58.
- Pennell, A. C., Mercolino, T. J., Grdina, T. A., Arnold, L. W., Haughton, G. & Clarke, S. H. (1989a) Biased immunoglobulin variable region gene expression by Ly-1 B cells due to clonal selection. *Eur. J. Immunol.* **19** : 1289.
- Pennell, C. A., Arnold, L. W., Haughton, G. & Clarke, S. M. (1988) Restricted Ig variable region gene expression among Ly-1+ B cell lymphomas. *J. Immunol.* **141** : 2788.

- Pennell, C. A., Sheehan, K. M., Brodeur, P. H. & Clarke, S. H. (1989b) Organization and expression of VH gene families preferentially expressed by Ly-1+ (CD5) B cells. *Eur. J. Immunol.* **19** : 2115.
- Pereira, P., Forni, L., Larsson, E. L., Cooper, M. D., Heusser, C. & Coutinho, A. (1986) Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur. J. Immunol.* **16** : 685.
- Perlmutter, R. M., Kearney, J. F., Chang, S. P. & Hood, L. E. (1985) Developmentally controlled expression of immunoglobulin VH genes. *Science.* **227** : 1597.
- Perlmutter, R. M., Nahm, M., Stein, K. E., Slack, J., Zitron, I., Paul, W. E. & Davie, J. M. (1979) Immunoglobulin subclass-specific immunodeficiency in mice with an X-linked B-lymphocyte defect. *J. Exp. Med.* **149** : 993.
- Phillips, R. A. (1989) Development and Regulation of the B lymphocyte lineage : an interpretive overview. *Progress in Immunol.* **7** : 305.
- Pink, J. R. L. (1986) Counting components of the chicken's B cell system. *Immunol.Rev.* **91** : 115.
- Pink, J. R. L., Ratcliffe, M. J. H. & Vainio, O. (1985) Immunoglobulin-bearing stem cells for clones of B (bursa-derived) lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **15** : 617.
- Poncet, P., Reininger, L., Freitas, A., Holmberg, D., Dighiero, G. & Coutinho, A. (1989) Expression of VH11 genes family in hybridoma collections from peritoneum and spleen: differential correlation with BrMRBC reactivity. *Res. Immunol.* **140** : 255.
- Poncet, P., Huetz, F., Marcos, M. A. R. & Andrade, L. (1990) All VH11 genes expressed in peritoneal lymphocytes encode anti-bromelaine-treated mouse red blood cells autoantibodies but other VH gene families contribute to this specificity. *Eur. J. Immunol.*, **20** : 1583.
- Portnoi, D., Freitas, A., Bandeira, A., Holmberg, D. & Coutinho, A. (1986) Immunocompetent autoreactive B lymphocytes are activated cycling cells in normal mice. *J. Exp. Med.* **164** : 25.
- Rabinovitch, P. S., Torres, R. M. & Engel, D. (1986) Simultaneous cell cycle analysis and two-colour surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation : applications to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. *J. Immunol.* **136** : 2769.
- Rajewsky, K., Förster, I. & Cumano, A. (1987) Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science.* **238** : 1088.
- Ratcliffe, M. J. H. & Ivanyi, J. (1981) Allotype suppression in the chicken. II. Suppression in homozygous chickens with anti-allotype antibody and allotype-disparate B cells. *Eur. J. Immunol.* **11** : 296.
- Ratcliffe, M. J. H., Lassila, O., Pink, J. R. L. & Vainio, O. (1986) Avian B cell precursors : surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *Eur. J. Immunol.* **16** : 129.

- Raveche, E. S., Lalor, P., Stall, A. & Conroy, J. (1988) In vivo effects of hyperdiploid Ly-1+ B cells of NZB origin. *J. Immunol.* **141** : 4133.
- Reininger, L., Käushik, A., Izui, S. & Jatou, J. C. (1988) A member of a new V_H gene family codes anti-bromelinized mouse red blood cell autoantibodies. *Eur. J. Immunol.* **18** : 1521.
- Reynolds, J. D. (1986) Evidence of extensive lymphocyte death in sheep peyer's patches. I. A comparison of lymphocyte production and export. *J. Immunol.* **136** : 2005.
- Riggs, J.E., Stowers R.S. & Mosier, D.E. (1990) The immunoglobulin allotype contributed by peritoneal cavity B cells dominates in SCID mice reconstituted with allotype disparate mixtures of splenic and peritoneal cavity B cells. *J. Exp. Med.* **172** : 475.
- Robinson, S. H., Brecher, G., Lourie, I. S. & Haley, J. E. (1965) Leucocyte labelling in rats during and after continuous infusion of tritiated thymidine : implications for leucocyte longevity and DNA reutilization. *Blood.* **26** : 281.
- Rocha, B. (1985) The effects of stress in normal and adrenalectomized mice. *Eur. J. Immunol.* **15** : 1131.
- Rocha, B. (1987) Population kinetics of precursors of Il-2 producing T lymphocytes: evidence for short life expectancy, continuous renewal and post-thymic expansion. *J. Immunol.* **139** : 365.
- Rocha, B., Dautigny, N. & Pereira, P. (1989) Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios "in vivo". *Eur. J. Immunol.* **19** : 205
- Rocha, B., Penit, C., Baron, C., Vasseur, F., Dautigny, N. & Freitas, A. F. (1990) Accumulation of BrdU-labelled cells in central and peripheral lymphoid organs : minimal estimates of production and turnover rates of mature lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **20** : 1697
- Ron, Y. & Sprent, J. (1985) Prolonged survival in vivo of unprimed B cells responsive to a T-independent antigen. *J. Exp. Med.* **161** : 1581.
- Rothstein, T. L. & Kolber, D. L. (1988a) Anti-Ig antibody inhibits the phorbol ester-induced stimulation of peritoneal B cells. *J. Immunol.* **141** : 4089.
- Rothstein, T. L. & Kolber, D. L. (1988b) Peritoneal B cells respond to phorbol esters in the absence of co-mitogen. *J. Immunol.* **140** : 2880.
- Rothstein, T. L. (1989) Interleukin-4 enhances peritoneal B cell stimulation induced by phorbol ester. *Cell. Immunol.* **120** : 450.
- Rusthoven, J. J. & Phillips, R. A. (1980) Hydroxyurea kills B cell precursors and markedly reduces functional B cell activity in mouse bone marrow. *J. Immunol.* **124** : 781.
- Sakaguchi, N. & Melchers, F. (1986) Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature.* **324** : 579.

- Schreier, P. H., Quester, S. & Bothwell, A. (1986) Allotypic differences in murine mu genes. *Nucleic Acids Res.* **14** : 2381.
- Schroeder, H. W. J., Hillson, J. L. & Perlmutter, R. M. (1990) Structure and evolution of mammalian VH families. *Intern.Immunol.* **2** : 41.
- Scollay, R., Smith, J. & Stauffer, V. (1986) Dynamics of early T cells : prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus. *Immunol.Rev.* **91** : 129.
- Sherr, D. H. & Dorf, M. E. (1984) An idiotype-specific helper population that bears immunoglobulin, Ia, and Lyt-1 determinants. *J. Exp. Med.* **159** : 1189.
- Sherr, D. H., Braun, J. & Dorf, M. E. (1987) Idiotype-specific Ly-1 B cell-mediated helper activity : hybridomas that produce anti-idiotype antibody and non-immunoglobulin lymphokine(s) 1. *J. Immunol.* **138** : 2057.
- Sidman, C. L., Shultz, L. D., Hardy, R. R., Hayakawa, K. & Herzenberg, L. A. (1986) Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science.* **232** : 1423.
- Silverstein, A. M. (1986) History of Immunology : Anti-antibodies and anti-idiotype immunoregulation, 1899-1904 : the inexorable logic of Paul Ehrlich. *Cell. Immunol.* **99** : 507.
- Solvason, N. W. & Kearney, J. F. (1989) Reconstitution of lymphocyte subsets in SCID mice by transplantation of fetal primordia. M. J. P. Bosma R.A., Schule, W. The SCID mouse. Springer Verlag :
- Sprent, J. & Basten, A. (1973) Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II. Lifespan. *Cell.Immunol.* **7** : 40.
- Sprent, J., Bruce, J., Ron, Y. & Webb, S. R. (1985) Physiology of B cells in mice with X linked immunodeficiency. I. Size, migratory properties and turnover of the B cell pool. *J. Immunol.* **134** : 1442.
- Stall, A. M., Farinas, M. C., Tarlinton, D. M., Lalor, P. A., Herzenberg, L. A., Strober, S. & Herzenberg, L. A. (1988) Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85** : 7312.
- Strasser, A., Rolink, A. & Melchers, F. (1989) One synchronous wave of B cell development in mouse fetal liver changes at day 16 of gestation from dependence to independence of a stromal cell environment. *J. Exp. Med.* **170** : 1973.
- Stutman, O. (1986) Post-thymic T cell development. *Immunol. Rev.* **91** : 159.
- Sundblad, A., Huetz, F., Portnoi, D. & Coutinho, A. (1990a) High dose immunoglobulin administration in normal mice. I. Effects on peripheral lymphoid organs. *J. Clin. Invest.* : in press.

- Sundblad, A., Marcos, M. A. R., Huetz, F., Freitas, A., Heusser, C., Portnoi, D. & A., C. (1990b) Normal serum immunoglobulins regulate the numbers of bone marrow pre-B and B cells. : Submitted for publication.
- Tarlinton, D., Stall, A. M. & Herzenberg, L. (1988) Repetitive usage of immunoglobulin V_H and D gene segments in CD5+ Ly-1 B clones of (NZB x NZW) F1 mice. *EMBO J.* 7 : 3705.
- Teale, J. M. (1985) B cell immune repertoire diversifies in a predictable temporal order in vitro. *J. Immunol.* 135 : 954.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature (Lond.)*. 302 : 575.
- Tsubata, T. & Reth, M. (1990) The product of pre-B cell-specific genes ($\lambda 5$ and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J. Exp. Med.* 172 : 973.
- Turpen, J. B. & Smith, P. B. (1989) Location of hemopoietic stem cells influences frequency of lymphoid engraftment in *Xenopus* embryos. *J. Immunol.* 143 : 3455.
- Udhayakumar, V., Goud, S. N. & Subarao, B. (1988) Physiology of murine B lymphocytes. I. Life-spans of anti- μ and haptenated Ficoll(thymus-independent antigen)-reactive B cells. *Eur.J.Immunol.* 18 : 1593.
- Uher, F. & Dickler, H. B. (1988) Interactions between B lymphocyte subpopulations. Augmentation of the responses of resting B lymphocytes by activated B lymphocytes. *J. Immunol.* 140 : 1442.
- Vakil, M., Sauter, J., Paige, C. & Kearney, J. F. (1986) In vivo suppression of perinatal multispecific B cells results in a distortion of the adult B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 16 : 1159.
- Weiler, I. J., Sprenger, R. & Weiler, E. (1985) Nude mice are nonpermissive towards the anti-dextran response of congenic cells. *Eur. J. Immunol.* 15 : 1102.
- Weill, J. C. & Reynaud, C. A. (1987) The chicken B cell compartment. *Science*. 238 : 1094.
- Werner-Favre, C., Vischer, T. L., Wohlwend, D. & Zubler, R. H. (1989) Cell surface antigen CD5 is a marker for activated human B cells. *Eur. J. Immunol.* 19 : 1209.
- Wetzel, G. D. (1989) A study of interleukin-5, CD5+ (Ly1/leu1) B lymphocytes and their interaction. *Bull. Inst. Pasteur.* 87 : 229.
- Wofsy, D. & Chiang, N. Y. (1987) Proliferation of Ly-1 B cells in autoimmune NZB and (NZB x NZW)F1 mice. *Eur. J. Immunol.* 17 : 809.
- Wortis, H. H., Ying-zi, C. & Rabin, E. (1990) Ly-5 (B220) and CD23 surface expression decrease while Ly-24 (PGP-1) increases upon activation of both conventional and Ly-1+ B cells (abstract). *J. Cell. Biochem. Supp* 14D : 213.

- Wu, G. E. & Paige, C. J. (1986) VH gene family utilization in colonies derived from B and pre-B cells detected by the RNA colony blot assay. *EMBO J.* **5** : 3475.
- Yancopoulos, G. D., Desiderio, S. V., Paskind, M., Kearney, J. F., Baltimore, D. & Alt, F. W. (1984) Preferential utilization of the most D_H-proximal V_H gene segments in pre-B cell lines. *Nature (Lond.)*. **311** : 727.
- Yancopoulos, G. D., Malynn, B. A. & Alt, F. W. (1988) Developmentally regulated and strain-specific expression of murine VH gene families. *J.Exp.Med.* **168** : 417.

PUBLICATION I

B cell activities in normal unmanipulated mice.

**Del Guercio P, Cruse JM. (eds)
B lymphocytes : Function and regulation.
Contrib. Microbiol. Immunol. Basel,
Karger, 1989. 11 : 1-26**

Del Guercio P, Cruse JM (eds): B Lymphocytes: Function and Regulation.
Contrib Microbiol Immunol. Basel, Karger, 1989, vol 11, pp 1-26

B Cell Activities in Normal Unmanipulated Mice

Antônio Freitas^a, Pablo Pereira^a, François Huetz^a,
Véronique Thomas-Vaslin^a, Claudia Pena-Rossi^a, Luiz Andrade^a,
Anne Sundblad^a, Luciana Forni^b, Antônio Coutinho^a

^aLaboratory of Immunobiology, Department of Immunology, Pasteur Institute,
Paris, France; ^bBasel Institute for Immunology, Basel, Switzerland

Not longer than a few years ago it would have been impossible, or at least surprising, to find an article on the 'regulation of B cell activity in normal unmanipulated mice'. Thus, in the 'Burnetian' world in which immunology has developed since the late 1950s, there are no immune activities to study in normal unimmunized mice: once all autoreactive lymphocytes have been eliminated, the whole immune system *rests* awaiting external antigens, in the absence of all activity. Since, in addition, neither Burnet nor his followers were concerned with the selection of available lymphocyte repertoires – again because nothing should be happening before we introduce foreign antigens – clonal B cell repertoires are nothing to study in normal unmanipulated mice. Finally, since lymphocyte population dynamics, their rates of production, life spans and decays are intimately related to the question of repertoire selection, this has not been a very popular subject either, although, even for Burnetian immunologists, this could appear as an important question to address.

A few years ago, we took the decision of studying normal, nonmanipulated individuals, primarily on the basis of two major concerns. First of all, if the central questions of immunology relate to the cognitive properties of immune systems – learning, discrimination, memory – these can only emerge as features of an organized system [1], and thus we must progress from the study of isolated molecules and cells to the observation of the whole system at work. Furthermore, a system with those properties is necessarily self-referential [2], and thus we must study the physiology of self-reference, which in this case is *autoreactivity* as it operates in normal individuals. Our second main motivation to study normal, unmanipulated

individuals was determined by the rather useless but abundant discussion and experimentation on 'idiotypic networks' for the first 10 years after the theory was proposed [3]. It appeared to us that if a *functional* immune network existed, it would necessarily have consequences to the functional behavior of the lymphocytes participating in that network. In other words, just by quantitating numbers of resting (nonfunctional) versus activated (functional) lymphocytes in a normal, unmanipulated individual, it should be possible to determine the fraction of all cells which are not connected in any functional immune network (all resting lymphocytes) and to provide an upper estimate of those that might be (activated lymphocytes). Indeed, all network experiments had been carried out by manipulating individuals and thus have told us nothing about a putative idiotypic network functioning in normal individuals. By and large, 'immune network' research has been devoted to the use of artificially prepared antibodies as surrogates of antigens, emptying the whole network idea of its most fundamental perspectives [4].

For a few years, therefore, we have been occupied (and actually quite busy) in addressing a number of questions which are not considered (and actually do not exist) in the frame of the clonal selection theory. It is obvious, therefore, that while granting the one cell/one antibody rule of the first postulate in the theory, we have departed from the accepted notions in practically all other aspects of that framework. The fact that the Editor of this book has asked us to write a whole chapter on a question that did not exist in conventional, but still modern, immunological thinking, probably means that approaches such as ours have permeated the scientific community to some extent.

We shall briefly consider the current knowledge on B cell activities in normal adult mice, including population dynamics, selection of repertoires, effector functions and their regulation before discussing some aspects of their ontogenic development, and finish with some considerations on the perspectives opened by these findings.

B Cell Activities in Normal Adult Mice

B Cell Production and Population Dynamics

The work of Osmond and his colleagues has established that the bone marrow of a normal adult, unmanipulated mouse produces very large numbers of B lymphocytes [5, 6]. The rates of B cell production in bone

B Cell Activities in Normal Unmanipulated Mice

3

Table 1. Effect of hydroxyurea (HU) treatment on the number of recirculating B cells recovered from the mouse thoracic duct¹

	Number of cells recovered in 12 h of cannulation			
	control mice	days after HU treatment		
		day 1	day 3	day 5
Total number of nucleated cells	20×10^6	19×10^6	6×10^6	4×10^6
% SIg ⁺ cells	36	35	6.5	6
Total number of Ig ⁺ cells	7.2×10^6	6.7×10^6	0.4×10^6	0.24×10^6
% depletion	—	7	94	97

¹ C3H/Tif mice were injected i.p. with HU (1 μ g/g body weight) at 7-hour intervals. At days 1, 3 or 5 after treatment, the thoracic duct of the mice was cannulated and draining lymph collected for a 12-hour period. The number of cells drained represent the mean value of three different mice per group. Control mice were injected with saline and operated on the day after.

marrow of adults are actually so high ($3-5 \times 10^7$ cells per day) that within 2-4 days enough new B lymphocytes are produced to replenish the whole peripheral compartment of the mouse. There is general agreement that such newly formed B cells are immunocompetent, i.e. they express immunoglobulin receptors on the cell membrane and are reactive to competent stimuli such that they can be activated into proliferation or antibody secretion. It is thus quite clear that all the newly formed B cells in the bone marrow incorporate the immunocompetent B lymphocyte pool, and thus the available B cell repertoires. There is, however, some controversy on whether all such newly formed B cells migrate to the peripheral lymphoid organs and are available there, at least for some time. For example, it has been argued that the majority of such cells never enter the so-called 'recirculating B cell pool'. It should be noted, however, that antimitotic treatments deplete 30-50% of lymph node B cells [7] and even, as shown in table 1, thoracic duct lymphocytes. This controversy is obviously quite academic (as these cells are in any case immunocompetent), and there is actually evidence for the migration to the spleen of the majority of newly formed B cells in the bone marrow [8].

Since cell numbers in a normal immune system are kept constant, these rates of production must correspond to equal rates of decay from the

immunocompetent B lymphocyte pool [7]. Indeed, evidence has been produced in a few, completely independent experimental systems, indicating that a very large fraction (up to 80%) of peripheral B cells have very short life expectancies, disappearing less than 7 days after they are produced in the bone marrow [9, 10].

Although some increase in the rates of lymphocyte production in bone marrow, by immunization or 'nonspecific' stimulation protocols has been described [11, 12], it appears that the bulk of B cell generation is independent of environmental influences and thus submitted to 'internal' driving forces and mechanisms. Several lymphokines, including T cell-derived molecules, have been characterized as growth/differentiation factors for B cell progenitors in fetal liver and bone marrow [13-15], but their necessity is difficult to evaluate. Thus, athymic nude mice maintain normal B cell production rates [16], but if T cell depletion is 'complemented' by a given type of B cell defect, B cell generation is profoundly impaired [17, 18]. Macrophages [12] as well as stromal cells [19] have been directly implicated in B cell differentiation, but the molecular bases of these activities needs further clarification. Furthermore, natural killer (NK) cells were found to lyse cycling lymphocyte precursors in bone marrow and thymus [20] and were postulated to (negatively) regulate lymphopoiesis. Finally, although the normal rates of bone marrow B cell production observed in B cell-deprived animals have suggested the absence of 'feedback' mechanisms generated at the periphery [21, 22], a number of observations could be interpreted to indicate that the growth and/or differentiation of B cell precursors is stimulated by circulating antibodies in normal individuals. More than 10 years ago, we described the ability of anti-idiotypic antisera, as well as many monoclonal anti-idiotypic antibodies, to bind to surface molecules, distinct from immunoglobulin receptors, expressed by Ig-negative lymphoid cells in fetal liver and adult bone marrow [23, 24]. Most importantly, we showed that exposure of differentiating precursors in culture to such antibodies drastically stimulated the number of B cells produced, as measured by simply counting Ig-positive lymphocytes or studying polyclonal plaque-forming cell (PFC) responses to mitogenic stimulation of those populations [25]. Since we could also demonstrate large increases in B cell generation in vivo by maternally derived transfer of anti-idiotypic antibodies [26], we concluded that B cell production is, at least in part, stimulated by circulating antibodies [25]. We noted that anti-idiotypic specificities related to 'major', recurrent idiotypes (such as T15, J558 and M460) often showed that reactivity, and derived the hypothesis

that anti-idiotypic-driven B cell generation was intimately associated with selection of the emerging specificity repertoire [26]. These observations have more recently acquired a particular relevance, after the repeated demonstrations that many of the 'natural' antibodies produced in the neonatal period show precisely those patterns of idiotypic reactivities [27-29]. Moreover, Kearney and his associates [personal commun.] have directly shown that such antibodies, isolated from normal individuals, bind to nonimmunoglobulin surface molecules on B cells and stimulate them to divide and secrete immunoglobulin. In other very elegant experiments, this group had already demonstrated the role of such 'natural' anti-idiotypes in the process of selecting 'dominant' antibody clonotypes [30]. As shown in table 2, stimulation of B cells and/or B cell precursors in adult bone marrow and neonatal spleen by natural, neonatal IgM antibodies can readily be demonstrated, even at very low doses, which are compatible with circulating concentrations in vivo. Given the abundance of these antibody reactivities in normal individuals, particularly in neonatal life, it is very likely that B cell production is regulated, at least partly, on the basis of these mechanisms. Independent indications for this conclusion are contributed by the observations with athymic (nude) or T cell-suppressed *Xid* mice. Thus, the *Xid* immunodeficiency is believed to include low rates of production in the set of idiotypically connected 'natural' antibodies [31]. Either in the absence of a thymus or after ciclosporin suppression of T cell function, these animals appear very deficient in bone marrow production of B lymphocytes [16, 17, 32], as if these two mechanisms - T cell activity and 'natural anti-idiotypic antibodies' - were the major driving forces for B cell precursor growth and differentiation.

To die and disappear is not the only possible fate of resting, newly formed B cells arriving in the periphery. Naturally, if a given B lymphocyte, by virtue of its receptor reactivities, engages in productive interactions with ligands and other cells available in the peripheral lymphoid organs, it will be activated and will incorporate a compartment of large activated B cell blasts, which constitutes roughly 10-20% of all splenic B lymphocytes [7, 33]. Most of these activated cells, however, are also very short-lived and they do not significantly contribute to the production of new B cells by their multiplication. Thus, we have previously calculated that lymphocytes in this compartment do not undergo more than one or two mitotic cycles, and argued that many of these cells might actually die after DNA replication but before mitosis [7]. Some of them, however, appear to integrate a compartment of stable, relatively persistent activated

Freitas et al.

6

Table 2. Stimulation of B cells in bone marrow and neonatal spleen by low concentrations of natural, neonatal IgM antibodies

a. Bone marrow cells

Additions to cultures, ng/ml		cpm/culture	PFC/culture
-		1,335	114
BA.N 2 : 3.39	1	2,061	321
	10	4,694	456
	100	13,301	6,738
BA.N 4 : 2.2	1	2,038	241
	10	4,193	420
	100	12,807	4,224
LPS	10,000	59,783	17,124

Bone marrow cells from 12-week-old BALB/c mice were cultured (10^5 cells in 0.2 ml microtiter wells) in the presence of the indicated concentrations of purified IgM secreted by two hybridomas derived from neonatal syngeneic mice [51]. TdR uptake and total PFC responses were measured on days 4 and 8 of culture, respectively.

LPS = Lipopolysaccharide.

b. Neonatal spleen cells

Additions to cultures, ng/ml		PFC/culture on day 7	
at the start		on day 3	
-		-	6
-		LPS 10,000	7,980
BA.N 2 : 3.39	1	LPS 10,000	14,040
	10	LPS 10,000	17,320
	100	LPS 10,000	14,080
BA.N 4 : 2.2	1	LPS 10,000	17,860
	10	LPS 10,000	21,560
	100	LPS 10,000	13,960

Neonatal (6-day-old) BALB/c spleen cells were cultured (10^5 cells in 0.2-microtiter wells) in the presence of the indicated concentrations of purified natural IgM antibodies from neonates. Three days later, all cultures received LPS and the total PFC response was measured after another 4 days.

B cells with longer life expectancies, while others acquire longevity by reverting to a small lymphocyte stage and incorporating the pool of long-lived, small, recirculating B cells [7]. Finally, a minority of the activated B cells in the normal mouse spleen terminally differentiate to high-rate secretion of immunoglobulin, becoming short-lived 'natural plasma cells' or 'background plaque-forming cells', which secrete 'natural antibodies' for 1 or 2 days [34].

Many important aspects of B lymphocyte population dynamics and its regulation remain to be elucidated. Furthermore, precise quantitation of the size of the various cellular compartments and of the rates of transit between them is still poor. Nevertheless, the current picture is sufficient to leave us with the notion of a highly dynamic system, a few characteristics of which should be underlined.

First of all, the unique property of the immune system to continuously maintain, throughout life, a source of novelty. Thus, in addition to the multiplicity of V-, D- and J-genes and the very large number of combinatorial possibilities, the error-prone mechanisms involved in somatic recombination of gene segments to produce mature genes, provide a constant source of unique molecular species [35]. Furthermore, since uncommitted precursor cells in the bone marrow should have no 'memory', antibody repertoire generation in bone marrow always 'starts from scratch' to produce many specificities that had never been 'tried' before. Clearly, therefore, the dynamics of immune systems is enriched by, but cannot avoid either to incorporate, this continuous meta-dynamic process [1].

Secondly, the fact that the majority of B cells being formed in the bone marrow and arriving in the periphery do not contribute in any way to the immune system's dynamics and performance, as they die very soon thereafter without being activated [7]. This is most likely due to the fact that clonal specificities of the rapidly decaying cells are not used in the context of that immune system for the particular period of time in which they are available. Clearly, therefore, most B lymphocytes are useless, 'make no sense', and have to be rapidly destroyed to leave room for yet new specificities. It should be noted that while arguing on the basis of positive selection of the activated or persisting B cells, we cannot exclude negative selection of the short-lived cells.

Thirdly, and perhaps most importantly here, B lymphocytes that actually function in a normal individual have been positively selected by activation. Furthermore, persistence of some clonal specificities is also the result of positive selection by activation, even if some of the selected cells

revert to a state of small lymphocytes [7]. Since, however, positive selection of newly produced cells is carried out, at least in part, by the immune system's components themselves (particularly those that have been previously activated and selected) the whole process is recursive. In other words, it is by existing that the system determines its own way of existing amongst 'a thousand and one' possible ways [36]. On this basis, therefore, stability of repertoires does not necessarily mean stability or persistence of cells, and phenomena such as 'clonal dominance' do not necessarily imply a high frequency of expression of the corresponding gene by maturing B cell precursors.

Two final points of clarification in relation to B cell population dynamics: The first concerns a set of B lymphocytes that has recently been described as a separate differentiation lineage, independent of the B cells produced in adult bone marrow [37]. Such lymphocytes, usually designated as *Ly-1 B cells*, in opposition to *conventional* bone marrow-derived B lymphocytes, in addition to differential levels of expression of some membrane-bound molecules, show singular properties of long-term persistence, states of activation, and biased antibody repertoires [37]. The current contention is that precursors for these cells are exclusively present in fetal liver or neonatal spleen, while adult bone marrow precursor cells are unable to produce them. It appears to us, however, that all available observations can also be explained considering that this set of B lymphocytes represents a set of positively selected specificities. According to the above discussion, such cells would be activated, persistent, show a biased specificity repertoire, and express phenotypic profiles that are compatible with their activation state (high μ , low δ); in some cases *Ly-1*, if this molecule is actually an activation antigen [38]. The reason why adult bone marrow precursor cells do not give rise to some antibody reactivities at the frequencies found among *Ly-1 B cells* is simply because they are allowed to differentiate in an environment which is different from that of the newborn. On the basis of the immune system's recursive properties, the positively selected set of B cells and antibody reactivities will in this case be different.

The other point concerns the interesting notion that immune systems do not all have to be constructed in this way. Experiments in birds suggest that most clonal B cell specificities are kept once produced in the bursa, and that peripheral B cells can keep their numbers in the adult animal, even in the absence of input from precursors [39]. It is tempting to speculate that this strategy is related to the alternative genetic mechanisms used in birds for diversity generation [40] and to consider that exuberant B cell

production and decays evolved together with 'mammalian' antibody genetics, capable of producing many more specificities than those that can actually be expressed.

B Lymphocyte Activities in Normal Unmanipulated Mice as Defined by Cell Activation Parameters

Lymphocytes are produced as resting cells in the central lymphoid organs. Most of them, existing as immunocompetent cells in the periphery, are still resting, small, non-functional lymphocytes. Upon activation, lymphocytes enlarge (blast transformation), may or may not enter and complete the mitotic cycle, and may or may not differentiate to the expression of effector functions. We can, therefore, divide the peripheral immunocompetent B lymphocyte compartment into three classes of functionally defined cells: resting lymphocytes, activated noneffector lymphocytes, and immunoglobulin-secreting cells. The measurement of the relative representation of each one of these classes in normal mice should provide indications as to the levels of B cell activity.

This kind of analysis, carried out with spleen cell population from normal unmanipulated adult mice in a variety of strains, revealed that 80–85% of all B lymphocytes defined by surface expression of Ig constitute a homogeneous population of small, dense cells that sediment slowly at unit gravity. The other 15–20% of Ig⁺ splenic lymphocytes constitute a population of cells that are larger, less dense and more rapidly sedimenting than the homogeneous, small lymphocyte population, but which is, nevertheless, heterogeneous as to those parameters, and can be morphologically described as consisting of medium size and large blast cells. Cell cycle studies indicate that roughly half of this cell population is engaged in mitotic activity, and this population accounts for all 'spontaneous' thymidine uptake observed with fresh spleen cells [33]. Interestingly, however, only a minor fraction of this activated B lymphocyte population scores as effector cells in single cell assay for Ig secretion. Only 2–5% of all *activated* B lymphocytes in the spleen are actually secretory cells ($1-3 \times 10^5$ 'background PFC'), and no Ig secretion is detected in the homogeneous, small lymphocyte population. More than half of all Ig-secreting cells in normal, adult spleens are of the IgM isotype, the distribution of the other isotypes being quite variable from strain to strain, particularly in what concerns the numbers of IgA-secreting cells.

If healthy mice, bred under SPF conditions, is what should be called 'normal', the description of B cell activities should be extended to other

Table 3. Natural activities of splenic and peritoneal B lymphocytes in germ-free or conventional mice

Cell population	Marker	Size distribution, % total			
		germ free		conventional	
		small	large	small	large
Peritoneal cells	total	60.7 ± 5	39.3 ± 5	55.8 ± 5	44.2 ± 5
	μ*	55.3 ± 5	44.7 ± 5	51.5 ± 6	48.5 ± 6
Spleen cells	total	88	12	80	20
	μ*	81.6	18.4	74.2	25.8

Spleen cell suspensions or peritoneal resident cells were stained with FITC-labeled anti-μ antibodies and analyzed by forward light scatter (FSC) in a FACScan (Becton Dickinson). Acquisition gates for lymphocytes were set as described by Hayakawa et al. [Eur. J. Immunol. 16: 450, 1988]. 'Small' and 'large' cell fractions were set from the peritoneal B cell populations of germ-free mice which showed two distinct, well-identifiable 'peaks'. These markers were kept for all other cell suspensions, although the 'two-peak' pattern was not always as clear. Interestingly, roughly the same distribution of small and large cells is obtained if spleen B cells are analyzed for volume or FSC and the markers set by the gaussian distribution of the homogeneous small cell peak [33, 43].

organized and nonorganized lymphoid tissues. Thus, normal mice show some B cell activity also in lymph nodes, particularly in the mesenteric nodes, although the levels of such activity are much lower than those detected in the spleen. Furthermore, as previously described [41], secretory cells accumulate with age in bone marrow, which as a whole organ contains from 4 to 6 months onwards more Ig-secreting cells than the spleen, particularly in the IgG isotypes. Moreover, normal mice contain a very large number of (T and) B lymphocytes in the gut-associated lymphoid tissue, and practically all B lymphocytes in those areas are activated secretory cells, especially in the IgA and IgE isotypes [unpubl. observations; 42]. Finally, over one-third of all cells in the peritoneal cavity of normal mice are B lymphocytes, half of which are activated, but extremely few are secretory (table 3). If, however, the interest in normal, unmanipulated mice relates to the description of immune activities that are independent of environmental stimulation, we should then consider B cell activities in 'germ-free' or even in 'antigen-free' mice, which are extensively or completely deprived of antigenic contacts with the environment. In these

B Cell Activities in Normal Unmanipulated Mice

11

Table 4. Absence of IgG- and IgA-secreting PFC in the spleen of antigen-free and germ-free mice

Spleen cells from	Reduction in splenic PFC numbers, %					
	IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgA
BALB/c (antigen-free)	26	91	98	85	95	> 99
BALB/c (germ-free)	56	90	98	92	n.d.	> 99
C3H/Tif (germ-free)	73	95	98	85	> 99	> 99

Groups of 4 antigen- or germ-free mice, as indicated, were individually assayed for numbers of splenic PFC in the isotypes shown, in parallel with age-matched SPF animals of the same strain. Mean PFC numbers were calculated for each group, and the % reduction compared to control SPF animals was determined.

extreme situations, deprivation of environmental stimulation is so radical that 'antigen-free' mice are devoid of macroscopically identifiable lymph nodes, and of microscopically identified mucosal-associated lymphocytes [43, 44]. Interestingly, however, the representation of *activated B cells* in the spleen and in the peritoneal cavity of such mice (table 3) is perfectly comparable to that of conventionally bred SPF animals [43]. The spleen of antigen-free mice also contains a population of Ig-secreting cells of roughly the same numbers as that found in conventional mice, which is limited, however, to the IgM isotype [43]. Clearly, therefore, B cell activities, at least those leading to IgM production, observed in the spleen and peritoneal cavity, are truly 'internal' and thus induced by interactions with the self molecules. The absence of B cells secreting other isotypes is readily explainable by the very limited proliferation undergone by internally activated cells, already noted above [7].

The complete dependence of the secretion of non-IgM isotypes upon environmental stimulation should be underlined in the context of the mechanisms of B cell activation to be discussed below. Germ-free and antigen-free mice are extensively deprived of IgG- and IgA-secreting cells and contain practically no PFC in the spleen other than IgM (table 4) [43]. Environmental stimulation, however, has no influence on the normal differentiative pathways of B lymphocytes and in the acquisition of immunocompetence, as antigen-free mice contain normal numbers of B cells which show full competence to switch to all classes of Igs if appropriately stimulated [unpubl. observations]. We would be, therefore, inclined to consider

Table 5. Inhibition of background PFC after anti-CD4 antibody treatment in vivo

Anti-CD4 antibody injections	Reduction of PFC, %						
	total	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA
Days -3, -1	14	4	95	78	13	48	64
Days -6, -4, -1	33	40	85	75	54	39	58

Twelve-week-old BALB/c males were injected with 30 μ l of anti-CD4 ascites (H129.19.69) (equivalent to 30 μ g/mouse) at days 0 and 2, or 0, 2 and 5, and the number of splenic PFC in each isotype were measured the day after the last injection.

The % reduction was calculated on the bases of the mean number of isotype-specific PFC in 3 injected and in 3 control mice in each experiment. The geometric mean and \pm SE \times 10^{-3} /spleen of the 6 control animals were 349 \pm 1.2 for total Ig, 241 \pm 1.0 for IgM, 22.3 \pm 1.7 for IgG, 26 \pm 2.7 for IgG2a, 24.8 \pm 2.2 for IgG2b, 4.7 \pm 1.4 for IgG3 and 59.3 \pm 1.2 for IgA.

that all B cell activities leading to IgG and IgA secretion in normal, SPF animals, are the result of ongoing conventional immune responses to environmental antigens, which induce significant proliferation. They are then less relevant to be considered in the context of the present paper.

Mechanisms of Peripheral Immunocompetent B Cell Activation in Normal Unmanipulated Mice

This topic has recently been reviewed [45] and, therefore, we will only briefly summarize it here. Besides, given the difficulties in experimental approaches to this question, most of the existing evidence is indirect and the putative mechanisms are suggested by observations in model systems.

Let us first consider the most conventional part of natural antibody production in normal animals, namely the environment-dependent production of non-IgM isotypes. As pointed out above, such ongoing antibody responses to common antigens entering through mucosal surfaces, seems to follow B cell activation mechanisms which are the same as those described after experimental immunization. As could be expected, some of these responses will be dependent on efficient cooperation with helper cells, and likely submitted to inhibitory mechanisms mediated by CD8⁺ T cells, while other responses are T cell independent. Evidence for this conclusion is given in table 5, which shows the effects of helper cell inactiva-

Table 6. Effect of anti-CD4 antibody treatment of normal adult mice on the numbers of activated splenic B cells

Treatment	Cell type	Number of cells/spleen	
		total	large blasts
-	total	139×10^6	14.7×10^6
+	total	104×10^6	6.0×10^6
-	B cells	57×10^6	10.4×10^6
+	B cells	42×10^6	5.1×10^6

Groups of 3 BALB/c mice (16 weeks old) were either injected intravenously with 300 μ g of purified H 129.19.69 antibodies (anti-CD4) or left untreated. Two and a half days later, spleen cells were surface stained with anti-Ig antibodies and analyzed in a FACS Analyser I for volume distribution.

tion in vivo by injection of appropriate doses of anti-CD4 antibodies on the numbers of splenic background PFC of the various isotypes. As can be seen, normal unmanipulated animals, if momentarily deprived of helper cell activity, essentially stop producing IgG1 and IgG2a isotypes and reduce the production of the other non-IgM isotypes while maintaining near control levels of IgM PFC. Clearly, transient partial inhibitions of CD4⁺ T cells in vivo are sufficient to drastically inhibit the secretion of the most T cell-dependent Ig isotypes, what is compatible with the co-existence of T cell-dependent and independent non-IgM response to environmental stimulation.

The question on the mechanisms driving truly internal B cell activities, which lead exclusively to IgM secretion by a minority of the activated B cell blasts is far more difficult to consider. First of all, since no 'antigen-free' athymic (nude) mice have been thus far analyzed, we cannot even tell whether or not helper cell participation is required. However, more intense anti-CD4 antibody treatments decrease PFC numbers in all isotypes including IgM PFC that are reduced to about half (table 5), as well as the total number of activated B cell blasts (table 6). The fact that anti-CD4 antibody treatments only diminish to about half IgM production and the numbers of activated B cell blasts in the spleen is not very informative. Thus, this could be due to the life spans of B cell blasts and PFCs, or of the activated T cells themselves. Furthermore, it is well known that such treat-

ments never completely remove all CD4⁺ T cells, and it can be argued that helper cells participating in the natural activation of B lymphocytes are precisely those resisting antibody treatment and in general poorly sensitive to this kind of inhibition. While entertaining the possibility that most or all 'internal' activation of B cells may well be helper cell dependent, we can only conclude, at the present time, that T cells participate in driving such activities in normal mice. This is all the more plausible since normal animals, even if 'germ free' or 'antigen free', contain in their spleen a population of activated CD4⁺ T cells, which very efficiently display effector functions *in vitro* and help appropriate B lymphocytes to proliferate and secrete Igs [33, 43]. These cell populations also appear to be active *in vivo*, as shown by the modification in the background Ig production of nude mice upon the transfer of these cell populations [45]. Furthermore, as discussed below, there is considerable evidence indicating that T cells actively participate in the selection of clonal repertoires in the activated B cell pool, which demonstrates in one way or another their participation in the activation and/or maintenance of the pool of B cell blasts.

These conclusions, however, do not exclude that 'internal' B cell activities may also be driven by helper cell-independent mechanisms. As pointed out above, it is quite clear that normal individuals produce and contain in their serum antibodies with apparent anti-idiotypic specificity, which bind to and stimulate immunocompetent peripheral B cells into proliferation and antibody production. It is therefore, likely that at least a part of *in vivo* normal B cell activity is driven by antibodies which integrate a functional idiotypic network. More often than not, we believe, antibody-dependent and helper cell-dependent mechanisms will actually operate in conjunction.

The question of the T cell-dependence of natural B cell activation is related to that of helper cell tolerance to self determinants, since, as seen above, much of that natural activation is internally driven. Although several examples of clonally-specific T cell reactivity to self antigens have been described [47], the notion of self-reactive helper cells has little popularity in today's immunology, and the prevalent concept is that such cells are eliminated in normal individuals. This problem lays outside the scope of this paper and we shall not discuss it. It should be underlined, however, that the natural helper cell activity described in antigen-free animals necessarily represents self-directed activation of helper cells.

Helper cell-dependent B cell activation in normal animals, however, can be brought about by mechanisms other than 'linked' antigen-specific

collaboration [45], and some properties of the activated B cell clones actually suggest that alternative mechanisms of activation are prevalent. We have previously demonstrated that specific ligand binding to B lymphocytes that are targets for helper cell activity, facilitates the induction of these cells [48]. We have more recently shown that naturally activated CD4⁺ helper cells isolated from normal or antigen-free individuals provide help to syngeneic B lymphocytes if these are either bridged to the effector helper cells by lectins or antibodies [33, 43], or else, if they are exposed to high concentrations of specific ligands (in our experimental system, anti-Ig antibodies) [unpubl. observations]. It can thus be envisaged that B lymphocytes with binding affinities to abundant self molecules will be suitable targets to 'natural activation' by effector CD4⁺ cells available in the normal individual. If the probability of being induced is directly correlated with the amount of ligand bound, B lymphocytes that are internally activated should be expected either to have very high affinities for a given kind of self-antigen epitope, or minimal affinities for 'cross-reactive' epitopes on several self molecules. Obviously, the latter possibility is far more frequent than the former, particularly because many of the self epitopes are known to occur in multivalent form. According to this model, B lymphocytes carrying Ig receptors that are reactive with a variety of self epitopes (multispecific) should predominate amongst naturally activated B cells, and antibodies showing 'multi-reactivities' on a variety of self antigens should constitute a large fraction of all natural antibodies produced in normal individuals. This is indeed the many times repeated observation [49, 50].

Clearly, another efficient way of obtaining extensive ligand binding by target B lymphocytes is the operation of an idiotypic network. It is also well established that antibodies with degenerate, multiple anti-idiotypic reactivities are detected in normal individuals [27, 29, 51]. It is then very likely that such antibodies will bind to B lymphocyte clones arising in the bone marrow, carrying the appropriate idiotypic determinants. Just as seen above, these B cells are then exposed to 'specific but unlinked' helper activity, which leads to the selective activation of ligand-binding B lymphocytes. This mechanism is particularly interesting, because it is self-maintained. Thus, the B cells that will be activated are those that produce antibodies which are 'connected' to other antibodies that preexisted their activation and will, thus, maintain a functional network amongst natural antibodies.

A final variant of network induction of B cells also applies to T lymphocytes, and is supported by direct evidence [52, 53]. T cells and B cells

that produce complementary receptors appear to be mutually stimulatory. It could then be expected, if these mechanisms operate extensively in normal individuals, that many natural antibodies would actually be directed to clonotypic determinants of T cell receptors expressed by naturally activated CD4⁺ cells. This has actually been found previously [54]. Notably, these activation pathways would also result in recursivity and self-maintenance of natural antibody repertoires.

Negative Regulation of Natural B Cell Activity

Given this wealth of possible mechanisms driving B cell activation in normal individuals by internal complementarities, it becomes necessary to consider how this activity is limited and regulated. Upon superficial consideration of these problems, many would ask why the whole system does not explode. This question is superficial for various reasons. First, because for reasons of specificity only a fraction of the whole system is implicated in interactions with self components. The fraction of all B cell specificities that is naturally activated is rather constant, and we have previously argued that this proportion represents the fraction of randomly generated B cell and antibody repertoires with minimal functional affinities to the universe of self determinants. In other words, the self-antigenic universe of a normal, adult mammal would represent, from the point of view of the antibody repertoires of the same species, roughly 10–20% of the whole antigenic universe.

The suggestion of unlimited expansion of these 10–20% B lymphocytes is still superficial, since the process leading to induction of these cells is, by its very mechanisms, self-limited. As previously discussed and actually formational [1], this is due to the property of B lymphocytes to secrete at a high rate in the form of soluble free molecules, the same specificities that are used as receptors implicated in the activation of the cell. It is quite obvious that whatever self ligand is driving activation of B lymphocytes (a self antigen or an antibody molecule), that type of ligand will be competed out from interactions with functional receptors on cell surfaces by free antibodies (identical to those receptors) which were produced after activation. It is, thus, apparent that an equilibrium between cell-bound receptors (functionally competent in the induction) and free antibodies (which inhibit ligand accessibility to those receptors) will be established for each clonal specificity. The dynamics of the process will of course be determined, among other variables, by the rates of decay of each one of the components in these interactions.

Two other aspects deserve consideration in what concerns regulation of B cell activities in normal individuals. The first is imposed by the observation that a fraction of all CD8⁺ T lymphocytes in normal individuals is activated and competent to perform effector suppressor functions towards activated B lymphocytes [39, 43]. The inhibitory activities of these cells apply both to B cell proliferation and antibody secretion, and they appear, *in vitro*, to be extremely potent (50% inhibition of a B cell blast PFC response is usually achieved at effector-target cell ratios ranging from 1:10 to 1:50). It is more than likely that such activities go on in normal animals, since large CD8⁺ T lymphocytes, freshly isolated, perform *in vitro* assays in the absence of further activation. Even if we ignore most of the mechanisms leading to suppression and, particularly, the clonal specificities of naturally activated CD8⁺ cells, practically all the mechanisms explicated above in the models of B cell activation by natural helper cells are applicable here to B cell suppression by natural suppressor cells. The analysis of the complex dynamics that can be expected from the above mechanisms is practically all that can be done so far.

The last point to be discussed on regulation of natural B cell activation has to do with the population dynamics of activated cells. As pointed out above, only a very minor fraction of all B cell blasts existing in a normal animal are actually Ig-secreting cells. Given the importance of the relative concentrations of cell-bound versus free antibodies in regulating the activation of new B cells, it is quite clear that the control of terminal maturation, that is, of the proportion of cells within the same clonal specificity that are driven to secretion, is fundamental in these dynamics. Although many other possibilities can be considered (e.g. differential production of growth versus differentiation factors) we favor the primary role of specific ligand binding, also in the regulation of terminal differentiation. Thus, as described by Andersson et al. [55] many years ago, excess Ig-mediated ligand binding, while having no inhibitory effects on the activation or even proliferation of B cells, can entirely suppress terminal differentiation, as is known today by inhibiting Ig gene transcription [56]. It is to be expected, therefore, that B cells induced by mechanisms dependent upon specific ligand binding will also be inhibited from secreting antibodies if their affinity or multispecificity lead to binding of ligands above a critical inhibitory threshold. These cells remain in the activated pool, at least for some time, and will only incorporate into the plasma cell set as soon as, for whatever reason, ligand pressure is released. In this model it is to be expected that the ratio of secretory to nonsecretory cells within the set of

activated B lymphocytes in normal individuals will vary according to the clonal specificity considered, contributing again to enrich the dynamics of a process which is not analyzed at all so far.

On the Selection of Clonal Repertoires of B Lymphocytes in a Normal Unmanipulated Individual

Much evidence has accumulated on the selection of B cell repertoires by various kinds of (idiotypic) manipulations. These, however, cannot be considered here since manipulated animals are not the object of the present discussion. It has always been the contention in those experiments, however, that the same kind of mechanisms should be operating continuously in normal individuals, the immune system in this case utilising its own reagents, i.e. natural antibodies, receptors of naturally activated T cells and all other self components. Since these extrapolations, however, might seem unwarranted, and in every case they only consider a small fraction of the whole repertoire that scored in the particular experimental system, we find it more appropriate to discuss unmanipulated normal individuals and to consider, if possible, the whole B cell repertoire. Accordingly, we have developed techniques which measure the absolute frequencies of whatever specificities we need in the various functionally defined subsets of B lymphocytes: resting cells, activated nonsecretory cells, or Ig-secreting cells. Moreover, since practically the whole H-chain V-gene pool in the mouse has been structurally classified in homology families, it becomes possible, by analyzing the relative representation of each family within the various B cell compartments, to derive general conclusions on the whole repertoire. This work is still in progress, but a variety of conclusions can already be taken [Freitas et al., to be publ.]. The V_H -gene family representation amongst committed B cell precursors in adult bone marrow is different from that observed amongst newly formed B cells, implying, therefore, an important step of repertoire selection accompanying B cell production. Furthermore, the family representation is also quite different according to the life spans of B cells and the organ localization, showing that repertoire selection in normal individuals is an ongoing process. Most interestingly, the V_H -gene family distribution is also quite different in normal or athymic nude mice, and it is extensively altered by transfer into the latter of T cells isolated from syngeneic, unmanipulated donors. Since such T cell-dependent differences are also observed amongst small, resting B cells, these observations demonstrate the existence of T cell-dependent mechanisms participating in the selection of the available

repertoire, in addition to the expected role of T lymphocytes in selecting activated B cell pools.

These kinds of analyses of B cell repertoires are not discriminatory enough to reveal differences in the repertoires of naturally activated versus resting B cells, or amongst secretory and nonsecretory activated B cells. Other methods, however, have allowed us to demonstrate such differences. Thus, a limiting dilution analysis of clonable B cells, comparing the pool of resting B lymphocytes with blast cells in the same individual, has demonstrated two important differential characteristics of the naturally activated B cell repertoire. First, naturally activated B cells are enriched, while small B cells are depleted, of clones which produce antibodies capable of binding to several autoantigens [57]. In some cases, the enrichment and depletion are quite complete, i.e. all B lymphocytes present in a normal individual which react, for example, with thyroglobulin, autologous erythrocytes, or DNA, are activated cells. Second, B cells producing antibodies which specifically react with variable regions of a number of antibodies tested are also enriched in the activated pool [Pena-Rossi and Pereira, to be publ.]. This property, however, does not extend to all antibodies tested. Actually, in some cases, the reverse is found, namely that a particular idiotypic specificity is exclusively found amongst small cells [58]. From the mechanisms discussed above, it should actually be expected that increased connectivity amongst activated B cells should apply exclusively to the members of this very same set. Further experimentation is required to directly conclude on this point.

It is important to point out that mechanisms involved in the activation and positive selection of autoreactive B cells are T cell dependent [46], and the same appears to be the case in the positive selection for idiotypic connectivity [Pereira, to be publ.]. This conclusion, which lends support to the above models on in vivo T-B cell interactions in unmanipulated animals, and is globally supported by the findings on V_H -gene family distribution in nude versus normal animals, has profound implications as the genetic controls of activated B cell repertoires. Thus, if the process of B cell activation is T cell dependent, it is to be expected that genes which contribute to the selection of T cell repertoires (such as the structural T cell receptor genes themselves and MHC genes) will indirectly participate in the genetic determination of natural antibody repertoires. Ultimately, this could be at the origin of the repeated observations associating susceptibility to disease, particularly autoimmune, with both MHC- and Ig-variable region genes.

Ontogenic Development of B Cell Activities and the Establishment of Repertoire Selection Mechanisms

It has been shown that antibody repertoires in embryonic and neonatal life contain an overrepresentation of antibodies encoded by the most D-proximal-V_H gene families [59, 60]. It is also reasonably established that neonatal antibody repertoires show unusually high levels of idiotypic connectivity [51] and a very high frequency of antibodies reacting with self structures [61]. As seen above, these general properties are, in the adult, preferentially associated with the activated B cell compartment, and it is, therefore, not astonishing to observe that neonatal mice contain a much higher fraction of activated B cells than adult individuals [43, 62]. Since, at these ontogenic stages, T cell function is very poorly if at all developed, it is tempting to consider that most, if not all, B cell activities, at this point in life, are driven by T cell independent mechanisms. In view of the B cell mitogenic activities of anti-idiotypic natural antibodies, the following model could be derived. Expression of germ-line-encoded antibody V-region genes is developmentally controlled, such that normal immune systems necessarily start with the expression of a relatively restricted set of specificities, which are both idiotypically connected and competent in the activation and expansion of the existing pools of pre-B and B cells. This ensures the internal driving forces necessary for the establishment of the system, and opens the possibilities for expression (and positive selection) of the V-region gene repertoire. *The fact that such specificities are already present and operating in functional interactions when all the others, including T cell specificities, start to be produced, gives to this set of antibodies a fundamental importance in the determination of the future selective processes and the establishment of the naturally activated cell repertoires in the adult.* Such 'founder effects' are easy to understand on the basis of the recursivity of the processes operating in repertoire selection, and because activated cells persist longer than newly formed lymphocytes which engage in no interactions in the internal environment. There is good evidence indicating that clonotypic repertoires of activated T cells in normal individuals are originally selected on the basis of the clonal specificities in this pool of perinatal B cells [63, 64]. Once such T cell repertoires have been selected, however, they will in turn select from the bone marrow-derived B cells continuously arising in the individual, the appropriate set of specificities which will maintain the selected interactions. The whole process could then be summarized as follows. The original set of antibody specificities first expressed in an individual is evolutionarily selected and devel-

opmentally controlled. It contains specificities which show high idiotypic connectivity and the ability to stimulate the production of new B cells, while simultaneously selecting their emergent repertoires. Secondly, this original set of activated B cells and antibodies will participate in the post-thymic education and selection of T cell repertoires, particularly in what concerns the selection of the activated T cell pool. In turn, activated T cells contribute, together with the antibody specificities from the set of persisting perinatal B cells, in the selection by activation of bone marrow-derived newly formed B cells into the actual repertoire.

Concluding Remarks

The consideration of B cell activities in normal individuals is a central aspect in our attempts to analyze and comprehend the physiology of normal immune systems. It is our conviction, on the other hand, that immunopathology, particularly the mechanisms participating in the development of autoimmune diseases, can only be approached after we have developed some knowledge on immunophysiology. An autoimmune disease is for us an alteration in the processes that we discussed in the present paper, and before we know the general principles and the details driving these processes, our attempts to intervene in autoimmune disease will be limited to general, nonspecific immunosuppression. From the discussion above, it is, however, quite obvious that pathological autoimmunity may well represent a deficit in cell activation or the physiological cooperative processes, rather than an exacerbation of B cell activities.

It is also our conviction that once the dynamics of the physiological autoreactive processes and the mechanisms underlying them are well understood, they will be prone to intervention, such that some clonal specificities can be manipulated to regulate the biological activities of other molecules (hormones enzymes, etc.), which are important in the normal physiological processes.

It is clear to us, therefore, that the study of B cell activities in normal individuals is a central topic in modern immunology and will be developed in the future. The approaches to such studies, however, depart quite substantially from the conventional approaches to immune responses – molecular and cellular immunology of artificial challenges with external antigens. Thus, B cell activities which involve very poor clonal expansions and are driven by 'unlinked' interactions with helper cells are essentially differ-

ent from those operating in conventional immune responses. Furthermore, and these aspects will certainly be more difficult to deal with, selective processes ongoing in normal unmanipulated individuals, certainly follow dynamic rules that are different from the exacerbated production of a given antibody specificity upon immunization, and obey to recursive principles with life-long consequences in repertoires. Finally, in contrast with the disconnected responses of a few clones stimulated by antigens, normal B cell activities in unmanipulated animals can only be understood in the global context of the whole compartment of functionally connected lymphocytes. Methods to *quantitate* structure and dynamics of immune networks must, therefore, be developed.

Acknowledgements

Acknowledgements to all colleagues that contributed to the development of the results and ideas discussed in this paper; to Jacqueline Badella for excellent secretarial assistance, and to DRET, ARC, AFM, CEE, Krupp Foundation and INSERM for grant support. The Basel Institute for Immunology was founded and is supported by Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland.

References

- 1 Varela, F.; Coutinho, A.; Dupire, B.; Vaz, N.: Cognitive networks: neural, immune and otherwise; in Perelson, *Theoretical Immunology*, p. 359 (Addison-Wesley Publ. Co., 1988).
- 2 Vaz, N.; Martinez-A., C.; Coutinho, A.: The uniqueness and boundaries of the idiotypic self; in Köhler, Cazenave, Urbain, *Idiotypy in biology and medicine*, p. 43 (Academic Press, New York 1984).
- 3 Jerne, N.K.: Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol., Paris 124C: 373* (1974).
- 4 Coutinho, A.; Forni, L.; Holmberg, D.; Ivars, F.; Vaz, N.: From an antigen-centered, clonal perspective of immune responses to an organism-centered, network perspective of autonomous activity in a self-referential immune system. *Immunol. Rev. 79: 151* (1984).
- 5 Opstelten, D.; Osmond, D.G.: Pre-B cells in mouse bone-marrow: immunofluorescence statmokinetic studies of the proliferation of cytoplasmic μ -chain bearing cells in normal mice. *J. Immun. 131: 2635* (1983).
- 6 Osmond, D.G.: Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol. Rev. 93: 103* (1986).
- 7 Freitas, A.A.; Rocha, B.; Coutinho, A.: Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol. Rev. 91: 5* (1986).

- 8 Brahim, F.; Osmond, D.G.: Migration of bone marrow lymphocytes demonstrated by selective bone marrow labelling with ^3H -thymidine. *Anat. Rec.* 168: 139 (1970).
- 9 Freitas, A.A.; Coutinho, A.: Very rapid decay of mature B lymphocytes in the spleen. *J. exp. Med.* 154: 994 (1981).
- 10 Freitas, A.A.; Rocha, B.; Coutinho, A.: Two major classes of mitogen-reactive B lymphocytes defined by life-span. *J. Immun.* 136: 466 (1986).
- 11 Fulop, G.M.; Osmond, D.G.: Regulation of bone marrow, lymphocyte production. III. Increased production of B and non-B lymphocytes after administering systemic antigens. *Cell. Immunol.* 75: 80 (1983).
- 12 Shortman, K.; Howard, M.C.; Baker, J.: Antigen-initiated B lymphocyte differentiation: XIV non-specific effects of antigen stimulation cause proliferation in the pre-progenitor subset of primary B cells. *J. Immun.* 121: 2060 (1978).
- 13 Palacios, R.; Henson, G.; Steinmetz, M.; McKearn, J.P.: Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B cell clones in vitro. *Nature, Lond.* 309: 126 (1984).
- 14 Namen, A.-E.; Schmierer, A.E.; March, C.J.; Ourell, R.W.; Park, L.S.; Urdal, D.L.; Mochizuki, D.Y.: B cell precursor growth-promoting activity. *J. exp. Med.* 167: 988 (1988).
- 15 Kincade, P.W.: Experimental models for understanding B lymphocyte formation. *Adv. Immunol.* 41: 181 (1987).
- 16 Fulop, G.M.; Osmond, D.G.: Regulation of bone marrow lymphocyte production. IV. Cells mediating the stimulation of marrow lymphocyte production by sheep red blood cells: studies in anti-IgM suppressed mice, athymic mice and silica-treated mice. *Cell. Immunol.* 75: 91 (1983).
- 17 Reid, G.K.; Osmond, D.G.: B lymphocyte production in the bone marrow of mice with x-linked immuno-deficiency (xid). *J. Immun.* 135: 2299 (1985).
- 18 Wortis, H.H.; Burkly, L.; Hughes, D.; Roschelle, S.; Waneck, G.: Lack of mature B cells in nude mice with x-linked immune deficiency. *J. exp. Med.* 155: 903 (1982).
- 19 Witte, P.L.; Robinson, M.; Henley, A.; Low, M.G.; Stiers, D.L.; Perkins, S.; Fleischman, R.A.; Kincade, P.W.: Relationships between B-lineage lymphocytes and stromal cells in long-term bone marrow cultures. *Eur. J. Immunol.* 17: 1473 (1987).
- 20 Shortman, K.; Wilson, A.; Baker, J.; Burton, R.C.: An NK-like cell limits the adoptive response from 'pre-progenitor' B cells. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 60: 581 (1982).
- 21 Osmond, D.G.; Gordon, J.: Differentiation of bone marrow lymphocytes after prolonged administration of anti-IgM antibodies to neonatal and adult mice; in Baum, Ledney, *Experimental haematology today*, p. 129 (Springer, Berlin 1979).
- 22 Opstelten, D.; Osmond, D.G.: Regulation of pre-B cell differentiation in bone marrow immunofluorescent statmokinetic studies of cytoplasmic μ -chain bearing cells in anti-IgM treated, hematologically deficient mutant and antigen stimulated mice. *Eur. J. Immunol.* 15: 599 (1985).
- 23 Forni, L.; Cazenave, P.-A.; Cozenza, H.; Forsbeck, K.; Coutinho, A.: Expression of V-region-like determinants on Ig-negative precursors in murine foetal liver and bone marrow. *Nature, Lond.* 280: 241 (1979).
- 24 Coutinho, A.; Forni, L.; Blomberg, B.: Shared antigenic determinants by mitogen receptors and antibody molecules to the same thymus-independent antigen. *J. exp. Med.* 148: 862 (1978).

- 25 Coutinho, A.; Forni, L.; Bernabé, R.R.: The polyclonal expression of immunoglobulin variable region determinants on the membrane of B cells and their precursors. *Springer Semin. Immunopath.* 3: 171 (1980).
- 26 Bernabé, R.R.; Coutinho, A.; Cazenave, P.-A.; Forni, L.: Suppression of a 'recurrent' idiotype results in profound alterations of the whole B-cell compartment. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 78: 6416 (1981).
- 27 Holmberg, D.; Wennerström, G.; Andrade, L.; Coutinho, A.: The high idiotypic connectivity of 'natural' newborn antibodies, is not found in adult, mitogen-reactive B cell repertoires. *Eur. J. Immunol.* 16: 82 (1986).
- 28 Araujo, P.; Holmberg, D.; Martínez-A., C.; Coutinho, A.: Idiotypic multireactivity of 'natural' antibodies: 'natural' anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. *Scand. J. Immunol.* 25: 497 (1987).
- 29 Kearney, J.; Vakil, M.: Idiotype directed interactions during ontogeny play a major role in the establishment of the adult B cell repertoire. *Immunol. Rev.* 94: 39 (1986).
- 30 Vakil, M.; Sauter, H.; Paige, C.; Kearney, J.: In vivo suppression of perinatal multispecific B cells results in distortion of the adult B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 16: 1159 (1986).
- 31 Möller, G. (ed.): B cell lineages. *Immunol. Rev.* 93 (1986).
- 32 Marcos, M.A.R.; Hera, A. de la; Gaspar, M.L.; Marquez, C.; Bellas, C.; Mampaso, F.; Toribio, M.L.; Martínez-A., C.: Modifications of emerging repertoires by immunosuppression in immunodeficient mice results in autoimmunity. *Immunol. Rev.* 94: 51 (1986).
- 33 Pereira, P.; Larsson, E.-L.; Forni, L.; Bandeira, A.; Coutinho, A.: Natural effector T lymphocytes in normal mice. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 82: 7691 (1985).
- 34 Lévy, M.; Vieira, P.; Coutinho, A.; Freitas, A.A.: The majority of 'natural' immunoglobulin-secreting cells as short-lived and the progeny of cycling lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 17: 849 (1987).
- 35 Tonegawa, S.: Somatic generation of antibody diversity. *Nature, Lond.* 302: 575 (1983).
- 36 Forni, L.; Coutinho, A.: Individuality of immune systems: the thousand ways and one way of being complete; in Steinberg, Lefkowitz, *The immune system*, vol. 1, p. 21 (Karger, Basel 1981).
- 37 Herzenberg, L.A.; Stall, A.M.; Lalor, P.A.; Sidman, C.; Moore, W.A.; Parks, D.R.; Herzenberg, L.A.: The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.* 93: 81 (1986).
- 38 Miller, R.A.; Galow, J.: The induction of Leu-1 antigen expression in human malignant and normal B cells by phorbol myristic acetate (PMA). *J. Immun.* 133: 3408 (1984).
- 39 Pink, J.R.; Ratcliffe, M.J.; Vainio, O.: Immunoglobulin bearing stem cells for clones of B (bursa-derived) lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 15: 617 (1985).
- 40 Weil, J.-C.; Reynaud, C.A.: The chicken B cell compartment. *Science* 238: 1094 (1987).
- 41 Benner, R.; Rijnbeek, A.-M.; Bernabé, R.R.; Martínez-A., C.; Coutinho, A.: Frequencies of background Ig-secreting cells in mice, as a function of organ, age and immune status. *Immunobiology* 158: 225 (1981).
- 42 Van der Heijden, P.J.; Stok, W.; Bianchi, T.J.: Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine of the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology* 62: 551 (1987).

- 43 Pereira, P.; Forni, L.; Larsson, E.-L.; Cooper, M.D.; Heusser, C.; Coutinho, A.: Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur. J. Immunol.* *16*: 685 (1986).
- 44 Hooijkaas, H.; Benner, R.; Pleasants, J.R.; Wostman, B.: Isotypes and specificities of immunoglobulin produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered 'antigen-free' diet. *Eur. J. Immunol.* *14*: 1127 (1984).
- 45 Bandeira, A.; Coutinho, A.; Martinez-A., C.; Pereira, P.: The origin of 'natural antibodies' and the internal activity in the immune system. *Int. Rev. Immunol.* *3*: 47 (1988).
- 46 Huetz, F.; Larsson, E.-L.; Pereira, P.; Portnoï, D.; Coutinho, A.: T cell dependence of 'natural' auto-reactive B cell activation. *Eur. J. Immunol.* *18*: 1615 (1988).
- 47 Hooper, D.C.; Taylor, R.B.: Specific helper T cell reactivity against autologous erythrocytes implies that self tolerance need not depend on clonal deletion. *Eur. J. Immunol.* *17*: 797 (1987).
- 48 Pereira, P.; Forsgren, S.; Portnoï, D.; Bandeira, A.; Martinez-A., C.; Coutinho, A.: The role of immunoglobulin receptors in 'cognate' T-B cell collaboration. *Eur. J. Immunol.* *16*: 355 (1986).
- 49 Guilbert, B.; Dighiero, G.; Avrameas, S.: Naturally occurring antibodies against mice common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.* *128*: 2779 (1982).
- 50 Holmberg, D.; Freitas, A.; Portnoï, D.; Jacquemart, F.; Avrameas, S.; Coutinho, A.: Antibody repertoires of normal BALB/c mice: B lymphocyte populations defined by state of activation. *Immunol. Rev.* *93*: 147 (1986).
- 51 Holmberg, D.; Forsgren, S.; Ivars, F.; Coutinho, A.: Reactions amongst IgM antibodies derived from normal, neonatal mice. *Eur. J. Immunol.* *14*: 435 (1984).
- 52 Kaye, J.; Porcelli, S.; Tite, J.P.; Jones, B.; Janeway, C.A., Jr.: Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual helper T cell lines can substitute for antigen and antigen presenting cells in the activation of T cells. *J. exp. Med.* *158*: 836 (1983).
- 53 Tite, J.P.; Kaye, J.; Saizawa, K.M.; Ming, J.; Katz, M.E.; Smith, L.A.; Janeway, C.A., Jr.: Direct interactions between B and T lymphocytes bearing complementary receptors. *J. exp. Med.* *163*: 189 (1986).
- 54 Coutinho, A.; Marquez, C.; Araujo, P.M.F.; Pereira, P.; Toribio, M.; Marcos, M.A.R.; Martinez-A., C.: A functional idiotypic network of T helper cells and antibodies limited to the compartment of 'naturally' activated lymphocytes in normal mice. *Eur. J. Immunol.* *17*: 821 (1987).
- 55 Andersson, J.; Bullock, W.W.; Melchers, F.: Inhibition of mitogen stimulation of mouse lymphocytes by anti-mouse immunoglobulin antibodies. I. Mode of action. *Eur. J. Immunol.* *4*: 715 (1984).
- 56 Högban, E.; Martensson, I.L.; Leandersson, T.: Regulation of immunoglobulin transcription rates and mRNA processing in proliferating normal B lymphocytes by activators of protein kinase C. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* *84*: 9135 (1987).
- 57 Portnoï, D.; Freitas, A.; Bandeira, A.; Holmberg, D.; Coutinho, A.: Immunocompetent autoreactive B lymphocytes are activated cycling cells in normal mice. *J. exp. Med.* *164*: 25 (1986).
- 58 Portnoï, D.; Lundkvist, I.; Coutinho, A.: Inverse correlation between the utilization of an idio type in specific immune responses and its representation in pre-immune 'natural' antibodies. *Eur. J. Immunol.* *18*: 571 (1988).

- 59 Yancopoulos, G.D.; Desiderio, S.V.; Paskind, M.; Kearney, J.F.; Baltimore, D.; Alt, F.: Preferential utilization of the most JH proximal VH gene segments in pre-B cell lines. *Nature, Lond.* *311*: 727 (1984).
- 60 Perlmutter, R.M.; Kearney, J.F.; Chang, S.P.; Hood, L.E.: Developmentally controlled expression of immunoglobulin VH genes. *Science* *227*: 1597 (1985).
- 61 Dighiero, G.; Lymberi, P.; Holmberg, D.; Lundkvist, I.; Coutinho, A.; Avrameas, S.: High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J. Immun.* *134*: 765 (1985).
- 62 Forni, L.; Heusser, C.; Coutinho, A.: Natural lymphocyte activation in post-natal development of germ-free and conventional mice. *Annls Inst. Pasteur, Paris, Immunol.* *139*: 245 (1988).
- 63 Marcos, M.A.R.; Hera, A. de la; Pereira, P.; Marquez, C.; Toribio, M.L.; Coutinho, A.; Martinez-A., C.: B-cell participation in the recursive selection of T-cell repertoires. *Eur. J. Immunol.* *18*: 1015 (1988).
- 64 Martinez-A., C.; Pereira, P.; Toribio, M.L.; Marcos, M.A.R.; Bandeira, A.; Hera, A. de la; Marquez, C.; Cazenave, P.-A.; Coutinho, A.: The participation of B cells and antibodies in the selection and maintenance of T cell repertoires. *Immunol. Rev.* *101*: 191 (1988).

PUBLICATION II

Lymphocyte population kinetics during
the development of the immune system.
B cell persistence and life-span can be
determined by the host environment

Intern. Immunol., 1989
1 : 237-246

Lymphocyte population kinetics during the development of the immune system. B cell persistence and life-span can be determined by the host environment

Véronique Thomas-Vaslin and Antonio A. Freitas

Laboratory of Immunobiology, Department of Immunology, Pasteur Institute, F-75724 Paris Cedex 15, France

Key words: life-span, B lymphocytes, ontogeny

Abstract

We have investigated the kinetic behaviour of LPS reactive B cells during the development of the immune system. By studying the persistence of LPS reactive spleen cells transferred from adult C57BL/6 donor mice into histocompatible C57BL/10 Sc.Cr LPS non-responder mice we have confirmed that B cell populations obtained from adult donor mice decay rapidly after transfer into adult recipients. In contrast, the same cell populations after transfer into neonatal recipients are able to divide and maintain their numbers for ~2–5 weeks in the host's spleen. In fact, comparison of hosts at different ages show that with the increasing age of the host the fate of donor B cells evolves to mimic the behaviour observed upon transfer into adult recipients. Kinetic studies of LPS reactive spleen cells obtained from newborn (2 weeks old) C57BL/6 donors after transfer into adult C57BL/10 Sc.Cr mice have shown that young donor cells were able to keep at constant numbers in the adult environment for the first ~10–15 days after transfer and to decay afterwards in the host's spleen at the same rate as observed upon transfer of spleen cells from adult donors into adult hosts. These studies provide the first evidence for the different kinetic behaviour of lymphoid B cell populations in developing and mature immune systems, confirm that cell persistence correlates with cell activation and division, and show that B cell life-span is also dependent on the host environment.

Introduction

In the development of the mouse immune system, lymphocyte populations evolve through distinct kinetic phases. (i) First, during ontogeny and to ~4–6 weeks of age, lymphocytes represent, like any other growing tissue, an expanding cell population where cell production exceeds cell loss (1). (ii) Later, from 6 weeks onwards, in the adult, lymphocyte populations maintain constant numbers, with cell production equalling cell loss, and can be said to be in a steady state (1).

Recent studies have shown that in the adult mouse, in steady-state conditions, the peripheral pool of B lymphocytes is a renewing cell population, where fast turnover rates allow for the rapid substitution of a major part of the immunocompetent cell pool (2). In these studies it was demonstrated that the majority

(70–80%) of mature B lymphocytes in the peripheral lymphoid organs have a short life expectancy (i.e. they survive for <7 days) and that only about 20–30% of the peripheral B cells have a relatively longer life expectancy (i.e. can persist for >10–15 days at the periphery) (2,3). It was also shown that the peripheral mature B cell populations have a limited expansion potential and that the high renewal rate of mature B cells is maintained by the continuous input of newly produced cells from the bone marrow precursor pool (2–4). These conclusions, however, cannot apply to the early ontogeny of the immune system since lymphocyte populations then represent an expanding cell population where cell production exceeds cell loss (1). In such developmental stages the accumulation of numbers of B cells in the peripheral

238 *B cell life-span and host environment*

lymphoid organs could be achieved by the following mechanisms which do not exclude each other: (i) increased B cell production from precursors; (ii) peripheral expansion of newly formed B cells; (iii) increased survival of peripheral B cells.

It follows that in the developing mouse, B cells may have kinetic properties distinct from those of the B cells of the adult mouse. Such divergent kinetic behaviour could be due to either (i) intrinsic properties of the perinatal B cells (i.e. cells from newborn or young mice) which could be able to both expand and survive at the periphery in contrast to the B cells of adult mice, or (ii) environmental influences which may allow expansion and survival of peripheral B cells in the growing mouse, independent of their origin.

To test these different possibilities, we have decided to compare the kinetics of peripheral B cells populations in the adult and developing immune systems and, in particular, to determine whether the environment could influence or modify the fate of peripheral mature B cells.

For this purpose we have compared the kinetic behaviour of peripheral B cells from adult mice transferred into either adult or developing mice and studied the fate of B cells transferred from a growing immune system into an adult host. In either case we have used a well characterized cell transfer system previously employed to study B cell population kinetics in the adult mouse (2,5). This experimental model involves the transfer of cells, from a C57BL/6 LPS reactive (LPSr) mouse strain into a histocompatible C57BL/10 Sc.Cr (B10Cr) LPS non-reactive strain (6). Such transfer makes it possible, in the absence of any histocompatibility reactions, to study by limiting dilution analysis (LDA) the frequency of LPSr cells (7), and thus the direct quantification of the low number of functional donor LPSr cells persisting in the host at different time intervals after transfer, without any contribution of newly formed cells from the bone marrow.

The results obtained indicate that the different kinetic behaviour in the developing versus adult immune system are not only due to intrinsic properties of the B cells, but are also influenced by the environment. Such results further suggest that lymphocyte life-span can be determined by the cellular environment. The role of different B cell types, Ig specificities and/or growth hormones as factors for the different kinetic behaviours is discussed.

Materials and methods

Animals

C57BL/6 (B6) and B10Cr inbred strains of mice were raised at our colony at the Pasteur Institute, Paris. For each experiment donor and recipient mice were used at the indicated age. Adult mice were used between 2 and 4 months of age.

Lewis or Fisher inbred strains of rats from the Pasteur Institute were used between 3 and 5 weeks, as donors of thymus filler cells for all limiting dilution cell cultures.

Cell suspensions

Rat thymus and mouse spleen cell suspensions were prepared by gentle teasing of the organ in cold balanced salt solution (BSS) and the cells were washed twice in cold BSS before use. For some experiments mouse spleen cells were separated according to size by velocity sedimentation at 1 g in a continuous gradient of 0.5–2% bovine serum albumin (8). Lymphocytes with a

sedimentation velocity < 4 mm/h were pooled and used as a small cell fraction. The degree of purification of the small cell fraction as controlled by both cell counter analysis and morphometry of cytocentrifuged cells was shown to contain < 1% of cells with a diameter > 9 μm .

The bone marrow cell suspensions were prepared by flushing the femur with BSS containing 5% foetal calf serum (FCS) and then washed. S Ig⁺ cells were depleted by panning as previously described (15). The depleted cell fraction contained < 1% S Ig⁺ cells as controlled by cell surface staining with an FITC-coupled rabbit anti-mouse antibody.

Cell transfer

Total unseparated or the small fraction of B6 spleen cells or bone marrow cells were washed in BSS solution and injected i.v. into the retro-orbital sinus of recipient mice.

Irradiation of recipient mice

B10Cr adult mice were whole-body-irradiated with 500 rads of a ¹³⁵Cs source 24 h before bone marrow cell transfer.

Culture and limiting dilution analysis

Limiting dilution cell cultures were done as previously described (3,7). In brief, limiting numbers of spleen cells were distributed in 0.2 ml microculture wells in RPMI 1640 medium (Gibco, Scotland, UK) complemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Merk, Darmstadt, FRG), 10% FCS (Boehringer, Mannheim, FRG), Hepes buffer 10 mM, pH 7.3 (SIGMA, St Louis, MO, USA), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of lipopolysaccharide of *Salmonella abortus equii* (Difco Laboratories, St Louis, MO), penicillin, streptomycin (Flow, Irvine, UK), and gentalin (Gentamycine, Unilabo, Levallois Perret, France), and containing 3×10^6 rat thymus filler cells per ml which were previously irradiated with 50 rads of ¹³⁵Cs source. For each determination of the frequency of LPSr B cells, 4–6 different cell concentrations were used. Cultures were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 5–8 days, according to the detection assay employed. At the end of the incubation period, cultures were tested and the number of positive wells scored by one of the three methods described below. For most experiments we have preferred the ELISA spot assay technique, which allows the direct estimate of the number of IgM-secreting cells (9). This method was found to be more sensitive, more rapid, and efficient for testing the LDA.

Protein A plaque-forming cells (PFC)

Limiting dilutions were tested for IgM-secreting cells in the protein A PFC assay on day 5 of culture (3,10). Thirty-six identical replicates were tested for each cell concentration and cultures containing > 5 PFC were scored as positive.

ELISA (11). LDA culture supernatants were tested with the ELISA technique for IgM concentration on day 8 of culture. Forty-eight replicates for each dilution were tested. The ELISA plates (Luxlon, M29 LSE, CEB) were coated with goat anti-mouse total Ig (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) overnight and saturated with PBS containing 1% gelatin for 30 min at 37°C. Fifty microlitres of culture supernatant was added into each well and the plates incubated for a further 2 h at 37°C. After extensive washing an anti-mouse IgM coupled to horseradish peroxidase was added and the bound antibodies revealed with the peroxidase substrate, orthophenylendiamine,

and H_2O_2 . The reaction was stopped 20 min later by addition of 10% sodium dodecylsulphate (50 μ l). The OD was measured in each well at 450 nm in a photometer (Titertek multiscan, Flow). Positive wells were scored if the OD values were above the mean + 3 SD of the values obtained in wells with filler cells alone.

ELISA spot assay. With this method cultures were tested on day 5 for the presence of IgM secreting cells, using a modification of the Sedgwick and Holt technique (9). In brief, flat-bottom ELISA plates (Luxlon, M29 LSE, CEB) were coated with 50 μ l/well of a sheep anti-mouse total Ig antiserum diluted in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 8). Afterwards the plates were first saturated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin for 30 min at 37°C and then washed with PBS. The cells to be tested were washed in BSS containing 1% FCS and resuspended in 100 μ l of RPMI 1640 complete medium supplemented with 1% FCS and then transferred into the coated plates. The plates were then further incubated for 3–5 h at 37°C in the presence of a 5% CO_2 atmosphere. The cells were removed by flicking the plate, followed by lysis with 0.05% Tween 20 in H_2O . After extensive washing (3–4 times) with PBS supplemented with 0.05% Tween 20 a rabbit anti-mouse IgM antiserum coupled to biotin was added to each well (50 μ l/well) and the plates incubated overnight. The next day the plates were washed three times with PBS Tween 20, and a solution of Streptavidin labelled with alkaline phosphatase (Southern Biotech. Assoc. P.O., Birmingham, AL) was added to each well (50 μ l/well) and the plates incubated for 1 h at 37°C. After further washing, the revealing substrate, a solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 2.3 mM (Sigma) diluted in 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (Merck) containing 0.75% low melting agarose (type 1, Low EEO, Sigma, St Louis, MO) and kept at 46°C, was added (50 μ l/well). After a 1–2 h incubation period at 37°C, the IgM PFC, revealed as blue spots, could be counted. For each cell concentration in the test 48 replicates were used, and the culture wells containing >5 spots were considered as positive.

In all cases the results were found to conform to the first term of Poisson's distribution and the frequencies were derived from semi-log plots to indicate the number of cells per culture at which 37% of the cultures failed to respond.

Hydroxyurea (HU) treatment

HU was dissolved in PBS and administered i.p. at a dose of 1 g/kg body weight in two daily injections separated by a 7 h interval (12,13).

Results

Experimental strategy

The strategy of these experiments was to follow the decay of LPSr B cells in histocompatible untreated LPS non-responder hosts, using techniques that provide a direct count, by limiting dilution analysis of all mitogen-reactive cells in a population (5,7). Because the spleen is the major site of migration of the injected spleen cells, we were concerned in the present study with the fate of splenic B cells (5,14). The frequency determinations of donor LPSr cells in the recipient's spleen were performed on different days after cell transfer. Taking into account the total number of nucleated cells in the host spleen, these frequencies allowed for

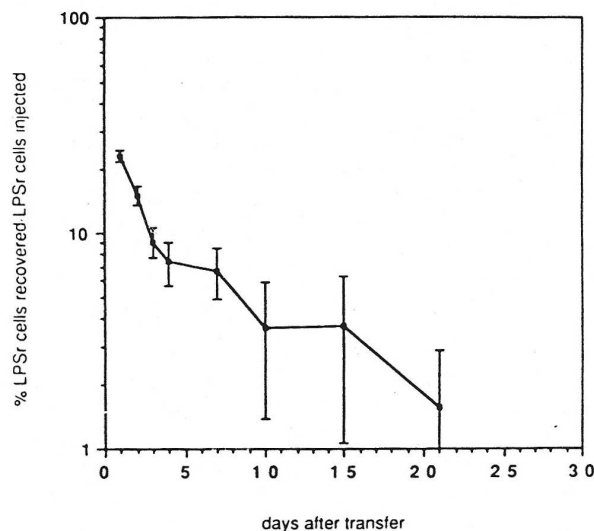


Fig. 1. Fate of spleen cells transferred from adult mice into adult recipient mice. $15-30 \times 10^6$ adult B6 spleen cells were injected i.v. into B10Cr adult hosts. On different days after cell transfer 2–3 B10Cr recipient mice were killed and cells pooled. The frequency of LPSr cells was evaluated in the donor cell population and in the spleens of the host mice by LDA. From these frequencies the total number of LPSr cells recovered per recipient's spleen was calculated at different time points after transfer and is expressed as a percentage of the number of LPSr cells injected. Each point represents the geometric mean \pm SD of 16 independent experiments.

the calculation of the total number of donor LPSr cells in the organ, and these values were then compared to the number of injected LPSr cells, i.e. the number present in the inoculum of transferred cells.

Fate of LPSr splenic B cells transferred from adult B6 mice into young LPS-non-reactive B10Cr hosts

The relative numbers of short- and long-lived B cells in the peripheral pools of adult mice were evaluated by studying the decay of LPSr lymphocytes transferred into adult LPS non-responder hosts for periods of up to 3 weeks after cell transfer (Fig. 1). It was found that the majority of peripheral B lymphocytes have a short life expectancy, i.e. they persist for <7 days in the host and show rates of decay compatible with bone marrow production and export, i.e. cell production equals cell loss (2,4). In contrast, during the ontogeny of the immune system peripheral accumulation of B cell occurs up to 5–6 weeks of age. This suggests that in young mice peripheral B cells may be able to expand or survive longer than in the adult, which could be due to either intrinsic cell properties in the developing immune system or the environmental influences present in the growing mouse. It was therefore of interest to investigate the decay rates of peripheral B cells transferred from adult mice into the environment of a developing mouse. In a first series of experiments we have followed the decay of LPSr splenic B lymphocytes transferred from adult B6 mice into histocompatible LPS non-reactive B10Cr young hosts.

Fate of B cells from adult mice upon transfer into newborn (1 day old) hosts. Total spleen cells (5×10^6) from adult B6 mice

240 B cell life-span and host environment

were transferred i.v. into newborn B10Cr hosts within 24 h of birth. The number of donor LPSr B cells present in the inoculum and in the host spleen was estimated by limiting dilution analysis at different time intervals after cell transfer. The number of LPSr cells recovered in the host's spleen was then expressed as a fraction of the number of LPSr cells injected. The frequency of LPSr cells in adult B6 spleen cells is between 1/9 and 1/20, while for the B10Cr recipient mice the background frequency is lower than 1/20,000. In contrast with the findings obtained using adult

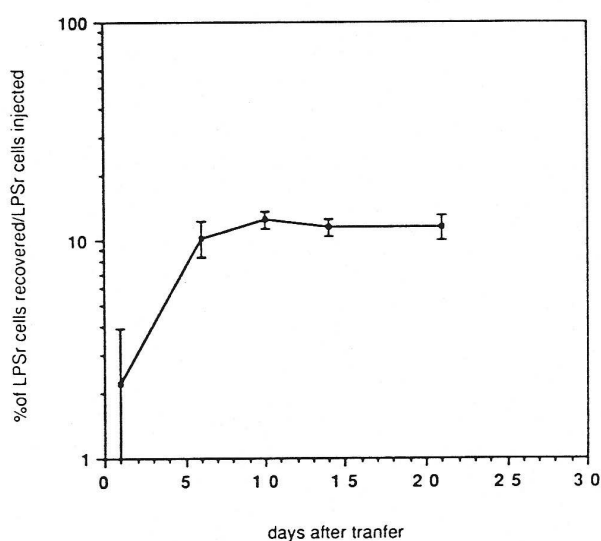


Fig. 2. Fate of spleen cells transferred from adult mice into 1-day-old recipient mice. 5×10^6 adult B6 spleen cells were injected i.v. into B10Cr hosts at birth. At different days after cell transfer 1–2 B10Cr recipient mice were killed. The frequency and number of LPSr cells was determined as for Fig. 1 (see also Table 1). Each point represents the geometric mean \pm SD of five independent experiments.

hosts, where the number of transferred cells decays rapidly in the first 7 days after transfer (Fig. 1), results obtained in five independent experiments (Fig. 2) show that in neonatal hosts the transferred cells expand to 2- to 5-fold the initial values during the first week of transfer. In fact, while on day 1 after transfer the number of LPSr cells recovered in the spleen of the recipient mice represent 2–5% of the total number of LPSr cells injected into each host, on days 7–10 after transfer the fraction of LPSr cells recovered in the recipient's spleen rises to 10–20% of the numbers injected (Fig. 2). Moreover, upon transfer into newborn hosts, donor cells were able to persist and maintain constant numbers at the periphery up to day 52 after transfer (6% of injected cells recovered at this time point; data not shown). The analysis of the total cell number recovered in one of the five experiments is shown in Table 1. In this experiment, as in the remaining four, the comparison of the growth of both recipient and donor cells shows that the expansion of the transferred LPSr cells is limited (from 13,793 to 49,632 LPSr cells) and 20-fold lower than that observed for the cells of the host immune system ($0.8 - 54 \times 10^6$).

Fate of B cells from adult mice upon transfer into 2- and 3-week-old hosts. In order to investigate the evolution of B cell kinetics during the development of the mouse immune system from the neonatal state into adulthood, we have next studied the fate of LPSr cells transferred from adult donors into either 2- or 3-week-old recipient mice.

As shown in Fig. 3, representing the mean \pm SD of five independent experiments, upon i.v. transfer of 5×10^6 splenic cells from adult B6 mice into 2-week-old B10Cr hosts, ~10–18% of the injected cells were recovered 24 h later in the spleen of the recipient mice. We have confirmed that these recovery values correspond to the fraction of the injected cells, which once in the hosts are able to migrate and localize in the spleen of the young recipients within 24 h of transfer, by studying the 1 and 24 h distributions of ^{51}Cr -labelled cells from adult B6 mice transferred i.v. into syngeneic 10-day-old B6 mice (not shown).

In the spleen of 2-week-old recipient mice (Fig. 3) the number

Table 1. Persistence of LPSr spleen cells from adult B6 mice transferred into B10Cr neonatal (1-day-old) mice

Days after transfer	Total cells/spleen	Frequency of donor ^a LPSr cells in spl	Number of donor LPSr cells in spl	%LPSr cells ^b
Donor B6		1/13 (1/11 – 1/15)		
Day 1	0.8×10^6	1/58 (1/45 – 1/75)	13,793	3.5
Day 6	8.2×10^6	1/329 (1/275 – 1/409)	24,924	6.4
Day 10	54×10^6	1/1,088 (1/861 – 1/1,245)	49,632	12.9
Day 14	51×10^6	1/1,116 (1/905 – 1/1,450)	45,698	11.8
Day 21	90×10^6	1/2,409 (1/1,904 – 1/3,277)	37,359	9.7

5×10^6 total spleen cells (corresponding to 384,600 LPSr cells) from B6 adult donor mice were injected i.v. into 1-day-old B10Cr mice. One or two B10Cr mice were killed and spleen cells pooled at different time points after transfer, for each LPSr cell frequency determination. LPSr cell frequency in uninjected B10Cr mice was $< 1/20,000$. Results represent one experiment out of the five performed.

^aFor each frequency determination the numbers represent the estimate frequency (the upper and the lower 95% confidence limits) of LPSr cells in the host spleen.

^bPercentage of the LPSr cells injected and recovered in the host spleen.

of transferred LPSr cells from adult donors, after an initial decay observed in the first 4 days of transfer, recovered to the initial level 7 days after transfer. The number of donor cells recovered in the recipient spleen is thereafter constant for ~3 more weeks, up to day 35 after injection. After this the number of donor LPSr cells declines to ~10–20% of the day 1 values.

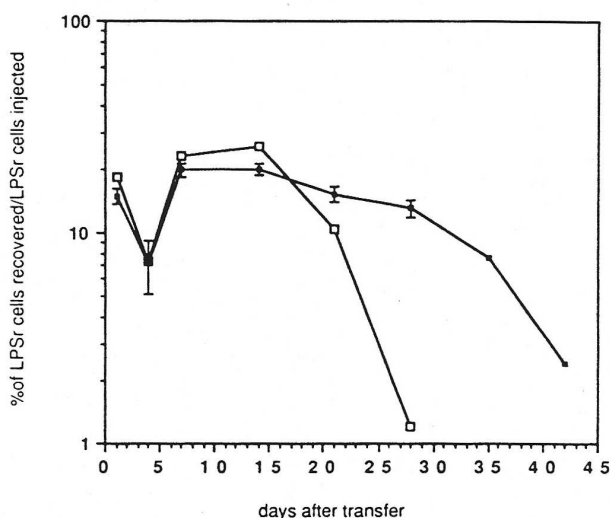


Fig. 3. Fate of spleen cells transferred from adult mice into 2-week-old recipient mice. 5×10^6 total (■) or small purified (□) adult B6 spleen cells were injected i.v. into 10–14 days old B10Cr hosts. On different days after cell transfer two B10Cr recipient mice were killed. The frequency and number of LPSr cells was determined as for Fig. 1. Each point represents the geometric mean \pm SD of five independent experiments.

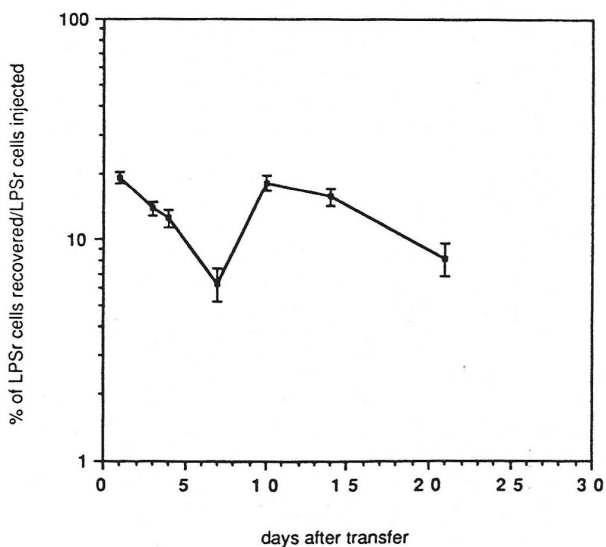


Fig. 4. Fate of spleen cells transferred from adult mice into 3-week-old recipient mice. 15×10^6 adult B6 spleen cells were injected i.v. into 3-week-old B10Cr hosts. On different days after cell transfer 2 B10Cr recipient mice were killed. The frequency and number of LPSr cells was determined as in Fig. 1. Each point represents the geometric mean \pm SD of six independent experiments.

In the 3-week-old recipient mice 17–25% of the injected adult donor cells (15×10^6 cells injected per mouse) can be recovered in the host spleen 24 h after transfer, as shown in Fig. 4, which represents the mean \pm SD of six different experiments. The number of cells recovered decays to about one-third of the day 1 values in the first 7 days in the host. This initial decay is followed by a recovery phase which occurs between days 7 and 10. By day 10 the number of LPSr cells recovered in the host spleen is similar to the original day 1 values. This recovery phase is thereafter followed by a second period of decline in which the number of LPSr cells recovered diminishes by day 21 to about one-third of the number of cells recovered on day 1 after transfer (Fig. 4).

Persistence of LPSr cells transferred from adult mice into B10Cr young hosts is achieved by cell division at the periphery. Persistence of adult donor LPSr cells in young B10Cr mice could occur either by reconstitution of the host mice with precursor stem cells present in the cell inoculum injected, or by survival of the transferred cells in the peripheral lymphoid compartments of the host. Reconstitution of the young mice by stem cell precursors is unlikely, as we obtain, in the first 3 weeks after injection, a similar kinetic behaviour upon the transfer of purified splenic small cells from adult mice, separated by velocity sedimentation, thus eliminating large stem cell precursors from the cellular inoculum (5,8) (Fig. 3). As at later times after transfer the decay of transferred small cells was considerably faster than that of unseparated splenic cells, we decided to control further for the presence of stem cell reconstitution as a mechanism of donor cell persistence in recipient mice. For this purpose, 2- to 3-week-old B10Cr mice were given adult splenic B cells. Five weeks later bone marrow cells harvested from these B10Cr recipients were depleted of S Ig⁺ cells (<1% S Ig⁺ as controlled by immunofluorescence surface staining with a FITC-labelled rabbit anti-mouse Ig antibody). These S Ig⁻ cells were transferred into adult LPS non-reactive B10Cr which had received 500 rads by whole-body irradiation the day before cell transfer. One month

Table 2. Lack of reconstitution of LPS reactivity in irradiated B10Cr mice after transfer of bone marrow cells from 2- or 3-week-old B10Cr mice hosting LPSr B6 adult donor cells

	Freq. of LPSr cells ^a in first B10CR host (donor of bone marrow cells)	Freq. of LPSr cells ^b in secondary B10Cr host (host of bone marrow cells)
Exp. 1	1/2597 (1/2183 – 1/3204)	1/19,300 (1/14,746 – 1/27,922)
Exp. 2	1/791 (1/655 – 1/998)	1/16,941 (1/11,484 – 1/32,281)

Two- (exp. 1) or 3-week-old (exp. 2) B10Cr mice (first host) were given B6 adult spleen cells. The frequency of LPSr cells in B10Cr control mice was below 1/20,000. For all these experiments the spleen or bone marrow cells of two mice were pooled.

^aFive weeks after the transfer, the frequency of LPSr cells in the spleen of this first B10Cr recipient was estimated by LDA. For each frequency determination, the numbers represent the estimate frequency (the upper and the lower 95% confidence limits). At the same time, the bone marrow S Ig⁻ cells of this first host were injected i.v. into B10Cr whole-body irradiated mice (500 rads, 24 h before transfer) (secondary recipient).

^bOne month later, after reconstitution, the frequency of LPSr cells in the spleen of the secondary B10Cr recipient was estimated by LDA.

LPSr lymphocytes transferred into LPS non-responder hosts for periods of up to 3–4 weeks after cell transfer (5). The validity of our transfer model relies on the absence of any histoincompatibility between host and donor cells. The B6 and B10Cr strains share the same major histocompatibility complex and Ig heavy chain constant region allotype, and no immune reactions to the phenotype differences between LPSr and LPS non-reactive mice have been detected (5,15). We have previously shown that LPS non-reactive B10Cr mice do not recognize the transferred B6 cells as foreign, as the rates of the injected cell population are not modified by previous immunization of the recipients with B6 cells (5) or by the destruction of the host immune system by irradiation (16). Moreover, we have also shown that donor B6 spleen cells enriched for long-lived B lymphocytes are able to persist in B10Cr LPS non-reactive hosts (2). Thus, this transfer model allows, in the absence of any histoincompatibility reactions, the precise enumeration of the donor LPSr cells persisting in the host at different time intervals after transfer without any contribution of newly formed cells from the bone marrow, since no LPSr cells can be produced by the hosts (6). The present experimental approach measures exclusively the life-expectancy of the population of LPSr B cells, which represents 20–30% of all peripheral mature B cells (7). We have previously shown, however, similar rates of decay for both LPSr and LPS non-reactive B cells (2). Although it could still be claimed that the LPSr cell population may not be representative of all peripheral B cells (17), it must be noted that in the present report we just compare the recovery and the persistence of the same populations of donor LPSr spleen cells in the spleen of different host mice.

To study the persistence of B lymphocytes in a fully developed immune system we followed the fate of splenic LPSr B cells transferred *i.v.* from adult B6 donors into adult B10Cr hosts. In these conditions it was found that the majority of peripheral B lymphocytes have a short life expectancy, *i.e.* they persist for <7 days in the host (Fig. 1), and thus show rates of decay compatible with bone marrow production (2–4). These results confirm previous observations which have shown that in adult mice B lymphocytes from lymph nodes or spleen comprise two populations with different cellular life-spans: a major population of ~70–80% of cells that survive for <7 days in adoptive hosts and a population of 20–30% of cells which can persist for periods of 1–3 or more weeks after transfer (2,3).

In contrast, when the same cell populations are injected *i.v.* into the environment of a developing immune system they show a totally different kinetic behaviour that was found to be dependent on the age of the host mice at the time of cell transfer. Transfer of spleen cells from adult donors into newborn 1-day-old hosts resulted in the expansion of donor LPSr cells in the first 5–6 days after transfer (Fig. 2). After this initial expansion period the transferred donor LPSr cells were able to persist and maintain constant numbers in the spleens of recipient mice (Fig. 2) up to 3–4 weeks after transfer. Transfer of spleen cells from adult B6 into young (2–3 weeks old) B10Cr host mice resulted in a complex kinetic behaviour in which an initial decay of LPSr cell numbers in the host's spleen was followed by a recovery period, a steady-state phase of variable length, and a second, slower and prolonged period of decay. In fact, comparison of the results obtained with the different young hosts (Figs. 2–4) suggests that with the increasing age of the host the fate of the transferred B cells evolves to mimic the behaviour

observed upon transfer into adult hosts (Fig. 1). It is likely that changes in kinetic patterns may be associated with adulthood and are fully operative between 6 and 7 weeks of age.

Most important is the finding that, upon transfer into young mice, peripheral mature B cells from an adult mouse persist for prolonged periods of time in the host. Persistence of transferred LPSr B cells could, however, occur by reconstitution of the host mice by precursor stem cells present in the cell inoculum. This possibility could be excluded by the inability of S Ig⁺-depleted bone marrow cells (>99% S Ig⁻) from such hosts to transfer LPS reactivity upon transfer in secondary X-irradiated B10Cr recipients (Table 2). Alternatively, persistence of donor cells could be ensured by continuous cell production in the peripheral compartments of the host, as suggested by the observed expansion of transferred LPSr cells in the first days following transfer into newborn hosts (Fig. 2). To test this hypothesis we used HU, a cytostatic agent, which when administered *in vivo* depletes all cycling cells and consequently their immediate progeny (13). Since HU treatment of young B10Cr hosts results in a marked depletion of the donor LPSr cells, we conclude that persistence of donor cells is achieved by continuous peripheral division of the transferred cell populations. It is of interest to note that this finding contrasts with previous observations in adult hosts where HU treatment was unable to reduce the numbers of LPSr B cells transferred from adult mice (2), indicating that most of the persistent cell populations in the adult mice are not cycling.

The present results suggest that growth of the immune system in the first weeks of post-natal life is partially achieved by the peripheral expansion of immunocompetent B lymphocytes (cell production exceeds cell loss). It must be noted, however, that comparison of the growth of host and donor cells in newborn recipients clearly indicates a limited expansion potential for peripheral LPSr B cells transferred from adult donors (Table 1).

In summary, the environment of a developing immune system in contrast to that of an adult mouse allows both the expansion and the prolonged persistence of immunocompetent lymphocytes in the peripheral B cell pools. Such environmental conditions could be attributed to either factors extraneous to the immune system or to differences between the developmental stages of the immune system. In either case, B cell persistence is associated with cell activation and division. As extraneous influences one may refer to the existence of hormones or growth factors which, being present in the young mouse but absent in the adult, could induce the expansion of peripheral lymphocytes. Given the differences between the two stages of the immune system which could influence the divergent kinetic properties observed between adult and young mice, one may envisage several possibilities. Firstly, it could be argued that the immune system of an adult mouse, in contrast to that of a young host, does not provide the space necessary for the intake of the transferred cells (16). This argument of 'lack of space' is not acceptable as we previously found the same decay of donor LPSr cells in both intact and X-irradiated, lymphocyte-depleted adult recipients (2). Moreover, in the same intact adult hosts, *i.e.* in the same space, LPSr cells from neonatal donor mice show a different kinetic pattern than cells from adult donors and were able to maintain steady numbers in the first 10 days after transfer (Fig. 5 and Table 4). Secondly, the contact of the cells from the adult donor with the resident cells in the newborn host could result in a syngeneic MLR-like activation of the donor cells. We were

unable to detect such MLR-like activity *in vitro* (data not shown). Moreover, the simultaneous transfer of cells from B6 adult mice together with cells from B10Cr newborns into B10Cr adult hosts did not modify the decay of the donor LPSr cells, as could be predicted if such mechanisms were operating (not shown). The permissiveness of the newborn environment (19) may then be related to differences in repertoires (20) or in the connectivity of the elements of the immune system, resulting in a modified selection of immunocompetent cells (21–23). It is a well-documented observation that idiotypic anti-idiotypic manipulations of the immune system are more effective and their effects more long lasting if induced in the newborn developing mouse (22–24). The present findings may provide further insight on the mechanisms of induced neonatal tolerance across major allogeneic differences (25), which has been related to chimaerism and long-term persistence of donor cells (26).

The different B lymphocyte population kinetics of the adult and young mice cannot be explained solely by environmental influences. In adult host mice LPSr cells transferred from 2-week-old B6 donors were able to survive and maintain constant numbers in the host's spleen for the first 10 days following transfer (Fig. 5 and Table 4), a finding that contrasts with the previous observations on the decay of cells transferred from adult donors (Figs 1–3). Following the first 10 days after transfer, cells from 'neonatal' donors were no longer able to renew their peripheral splenic numbers and decayed thereafter, with slopes similar to those observed in the first days upon transfer of LPSr cells from adult donors into adult hosts. Persistence of cells from the 'neonatal' (10–15 days old) donors was ensured by continuous peripheral cell division as shown by the ability of *in vivo* HU treatment to deplete a significant fraction of the donor LPSr cells (Table 5). These findings indicate that B lymphocyte populations in neonatal mice have intrinsic properties that allow their peripheral production even in the 'hostile' environment of an adult immune system. It is likely that neonatal B lymphocytes with such properties may be enriched in a subpopulation of cells (i.e. of the Ly1+ B cell lineage; 27). This possibility is presently under investigation. Alternatively, since cell persistence correlates with cell activation and division, the different kinetic behaviour between the cells from neonatal and adult donors could be due to a higher fraction of activated cells present in the cell inoculum transferred from young donor mice (28). Once in the new adult environment such cells could be further stimulated and persist for the first days after transfer. Complete adaptation to the adult environment or limited expansion potential of newborn cells results in a kinetic pattern similar to that of cells from adult mice and thus in the decay of the transferred cells (Fig. 5).

The present results show that B lymphocyte life-spans, as defined by cell persistence, are dependent not only on cellular properties but also on the environment. We have previously suggested that lymphocyte activation is a required step for cell persistence and longevity (2). We would like to propose that differences in the environment of adult and neonatal hosts may determine the fate and life-span of B cell populations by selective mechanisms operating upon clonal specificities. B cells may therefore be positively selected (and activated), as in the case of LPSr B cells transferred from adult into the environment of an immature and permissive immune system of newborn hosts, or negatively regulated, as upon cell transfer into adult mice, if at

the time of their production (or injection) their specificities do not adapt to the equilibrium state of a fully mature immune system.

Acknowledgements

We would like to thank Drs Antonio Coutinho and Benedita Rocha for discussions and careful review of this manuscript. This work was supported by grants from DRET and INSERM.

Abbreviations

B6	C57BL/6
B10Cr	C57BL/10 Sc.Cr
BSS	balanced salt solution
FCS	foetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HU	hydroxyurea
LDA	limiting dilution analysis
LPSr	LPS reactive
PBS	phosphate-buffered saline
PFC	plaque-forming cell

References

- 1 Aherne, W. A., Camplejhon, R. S. and Wright, N. A. 1977. *An Introduction to Cell Population Kinetic*. Edward Arnold, London.
- 2 Freitas, A. A., Rocha, B. and Coutinho, A. 1986. Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol. Rev.* 91:5.
- 3 Freitas, A., Rocha, B. and Coutinho, A. 1986. Two major classes of mitogen-reactive B lymphocytes defined by life span. *J. Immunol.* 136:466.
- 4 Opstelten, D. and Osmond, P. G. 1983. Pre-B cells in bone marrow immunofluorescence statokinetic studies on the proliferation of cytoplasmic μ chain bearing cells in normal mice. *J. Immunol.* 131:2635.
- 5 Freitas, A. A. and Coutinho, A. 1981. Very rapid decay of mature B lymphocytes in the spleen. *J. Exp. Med.* 154:994.
- 6 Coutinho, A. and Meo, T. 1978. Genetic basis for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57BL/10Cr mice. *Immunogenetics* 7:17.
- 7 Anderson, J., Coutinho, A., Lernhardt, W. and Melchers, F. 1977. Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion *in vitro* of every growth inducible lymphocyte. *Cell* 10:27.
- 8 Miller, R. G. and Phillips, R. A. 1969. Separation of cells by velocity sedimentation. *J. Cell. Physiol.* 73:191.
- 9 Sedgwick, D. J. and Holt, P. G. 1983. A solid phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody secreting cells. *J. Immunol. Methods* 57:301.
- 10 Gronowicz, E., Coutinho, A. and Melchers, F. 1976. A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. *Eur. J. Immunol.* 6:588.
- 11 Avrameas, S. and Guilbert, B. 1972. Enzyme immunoassay for the measurement of antigens using peroxidase. *Biochimie* 54:837.
- 12 Hodgson, G. S., Bradley, T. R., Martin, R. F., Sumner, M. and Fry, P. 1975. Recovery of proliferating hematopoietic progenitor cells after killing by hydroxyurea. *Cell. Tissue Kinet.* 8:51.
- 13 Freitas, A. A., Rocha, B., Forni, L. and Coutinho, A. 1982. Population dynamics of B lymphocytes and their precursors: demonstration of high turnover in the central and peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.* 128:54.
- 14 Freitas, A. A. and de Sousa, M. 1975. Control mechanisms of lymphocyte traffic. Modification of the traffic of ^{51}Cr labelled mouse lymph node cells by treatment with plant lectins in intact and splenectomized hosts. *Eur. J. Immunol.* 5:831.
- 15 Goodman, S. and Morrison, D. J. 1985. Lipopolysaccharide receptors on lymphocytes. I. Lack of immunologic recognition of a putative LPS receptor on LPS-responder lymphocytes by LPS-non responder mice. *J. Immunol.* 135:1906.
- 16 Freitas, A. A., Rocha, B. and Coutinho, A. 1986. Life span of B lymphocytes: the experimental basis for conflicting results. *J. Immunol.* 136:470.
- 17 Gray, D. 1988. Population kinetics of rat peripheral B cells. *J. Exp. Med.* 167:805.

246 *B cell life-span and host environment*

- 18 Makela, O. and Mitchinson, N. A. 1965. The role of cell number and source in adoptive immunity. *Immunology* 8:539.
- 19 Bosing-Schneider, R. and Selinka, H. C. 1987. Evidence for a mutual influence of idiotype expressing donor cells and recipient lymphocytes in neonatal hosts. *Eur. J. Immunol.* 17:1531.
- 20 Dighiero, G., Lymbery, P., Holmberg, D., Lundkvist, I., Coutinho, A. and Avrameas, S. 1985. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J. Immunol.* 134:765.
- 21 Holmberg, D., Forsgreen, S., Ivars, F. and Coutinho, A. 1984. Reactions among IgM antibodies derived from normal neonatal rats. *Eur. J. Immunol.* 14:435.
- 22 Kearney, J. F. and Vakil, M. 1986. Idiotype directed interactions during ontogeny play a major role in the establishment of the adult B cell repertoire. *Immunol. Rev.* 94:39.
- 23 Vakil, M., Sauter, H., Page, C. and Kearney, J. F. 1986. In vivo suppression of perinatal multispecific B cells results in a distortion of the adult B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 16:1159.
- 24 Takemori, T. and Rajewsky, K. 1984. Mechanism of neonatally induced idiotype suppression and its relevance for the acquisition of self tolerance. *Immunol. Rev.* 79:103.
- 25 Billingham, R. E., Brent, L. and Medwar, P. B. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603.
- 26 Lubaroff, D. M. and Silvers, W. K. 1973. The importance of chimerism in maintaining tolerance of skin allografts in mice. *J. Immunol.* 111:65.
- 27 Herzenberg, L. A., Stall, A. M., Lator, P. A., Sidman, C., Moore, W. A., Parks, D. R. and Herzenberg, L. A. 1986. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.* 93:81.
- 28 Forni, L., Heusser, C. and Coutinho, A. 1988. Natural lymphocyte activation in post-natal development of germ-free and conventional mice. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 139:245.

PUBLICATION III

**Population kinetics of peritoneal
LPS-reactive B lymphocytes**

**Intern Immunol., 1990
2 : 73-81**

Population kinetics of peritoneal LPS-reactive B lymphocytes

Véronique Thomas-Vaslin and Antonio A. Freitas

Laboratory of Immunobiology, Department of Immunology, Pasteur Institute, F-75724 Paris Cedex 15, France

Key words: peritoneal B lymphocytes, population kinetics, environment

Abstract

The dynamic behaviour of isolated populations of peritoneal LPS-reactive (LPSr) B lymphocytes was studied upon transfer of peritoneal cells (PerC) from C57BL/6 LPS responder into C57BL/10ScCr LPS non-responder mice. We have followed the persistence and life-span of the transferred LPSr donor B cells in the spleen and peritoneal cavity of both intact and X-irradiated adult hosts after i.v. or i.p. injection and neonatal 1-day-old recipients after i.v. transfer. We have found that lymphocyte life-spans can be influenced by local host environments, as the transferred PerC LPSr cells showed different kinetics according to their route of injection, organ localization, and age or state of the recipients. Thus, while in intact hosts most of the transferred peritoneal LPSr cells decayed with time, following transfer into X-irradiated recipients the same cells were able to expand and replenish the lymphoid tissues of the host. Moreover, upon transfer into intact hosts, the kinetic properties of peritoneal LPSr cells from adult mice differ from splenic LPSr cells of age-matched animals, but mimic those of spleen cells from young, 1- to 2-week-old donors. These findings may reflect the different phenotype composition of adult spleen cells (poor in Ly1 B cells) and peritoneal and neonatal spleen cells (both rich for Ly1 B cells), or may be the result of selective events leading to the peritoneal accumulation of cells with different population dynamics.

Introduction

Recent studies on the kinetic behaviour of mature B lymphocytes during the development of the immune system have demonstrated that B cell populations show different dynamic properties in adult and young mice (1). Thus, by investigating the persistence of LPS-reactive (LPSr) spleen cells transferred from C57BL/6 (B6) donor mice into histocompatible C57BL/10ScCr (B10.Cr) LPS non-responder mice, we have found that while B cell populations obtained from adult donors decay rapidly after transfer into adult hosts (2), the same cell populations can persist and expand in the lymphoid tissues of young or neonatal hosts (1). We have also found that in contrast to cells from adult donors, spleen cells from young B6 mice were able to maintain constant numbers for the first 10 days following transfer into adult recipients (1). These results led us to conclude that the divergent dynamic behaviours of B cell populations in the mature and developing immune system are likely to be determined by both (i) intrinsic cell properties and (ii) environmental influences (1).

Lymphoid cell populations of neonatal mice are enriched for B cells bearing the Ly1 antigen and according to some authors these cells constitute a separate independent B cell lineage

(3–5). It has been claimed that Ly1 B cells show different kinetic properties when compared to conventional B cells (Ly1⁻), and that while the Ly1 B cell subset is capable of considerable expansion in the absence of cell input from precursors, i.e. is a self-renewing population (4,5), conventional B cells turn over rapidly and are replenished from bone marrow precursors throughout life (2,6). It is therefore likely that the subpopulation of Ly1 B cells could play a decisive role in the kinetic behaviour of B lymphocytes at the early developing stages of the immune system. If this were the case, it could be predicted that B cell populations enriched for cells of the Ly1 phenotype would mimic the kinetic behaviour of neonatal splenic B cells. Since in adult mice the peritoneal cavity is an enriched source of Ly1 B cells (7), it would be of interest to compare the dynamic properties of peritoneal B cells to neonatal B cells, and to conventional B cell populations of the adult spleen, where the frequency of Ly1 B cells is low (7).

In the present investigation we have studied the kinetics of peritoneal B cells by following the dynamic behaviour of B cells obtained from the peritoneal cavity (PC) of adult mice after transfer into histocompatible hosts. For this purpose we have used an

74 Kinetics of peritoneal B cells

experimental model previously characterized, which involves the transfer of cells from a B6 LPSr mouse strain into an histocompatible B10.Cr LPS non-reactive strain (8,9). Such transfer allows, in the absence of any histocompatibility reactions, the study by limiting dilution analysis of the frequency of LPSr cells (10) and thus the direct quantification of the number of functional donor LPSr B cells present in the host tissues at different time intervals after cell transfer, without any contribution of newly formed cells from the bone marrow (2,9). To evaluate the possible role of environmental influences in the outcome of the transferred cells, we have compared the persistence of the donor cells in the spleen or peritoneal cavity of intact or X-irradiated adult recipients, after i.v. or i.p. injection, and followed the fate of peritoneal B cells in neonatal 1-day-old hosts.

We have found that peritoneal B cells show dynamic properties which diverge from those of splenic B cells from adult donors (2) but are identical to neonatal B cells (1). The results obtained also suggest that environmental factors, such as the age and state of the hosts, the pathways of cell migration, and organ localization, can influence the fate of transferred cells and select the persisting cells.

Materials and methods

Animals

B6 and B10.Cr inbred strains of mice from our own colonies were used at the indicated age. Lewis or Fisher rats from our own colony were used between 3 and 5 weeks of age as donor of thymus filler cells for all limiting-dilution cell cultures.

Cell suspensions

Rat thymus and mouse spleen cell suspensions were prepared by gentle teasing of the organ in cold BSS. Peritoneal cell suspensions (PerC) were prepared by gentle washing of the mouse PC with 10 ml of cold BSS supplemented with 1% of FCS. Only 5 ml of the injected BSS was taken out, cells were counted, and the number of cells found was multiplied by two to obtain the total number of cells in the PC. All cell suspensions were washed twice before use.

Cell transfer

For most experiments, unmanipulated, healthy B10.Cr mice were used as recipients. When stated, recipient B10.Cr mice, with both legs protected with 4-mm-thick lead plaques and under avertin anaesthesia, received a dose of 500–600 rad given by a ^{135}Cs source the day before cell transfer. Donor cells were injected i.v. into the retro-orbital sinus of the mice (0.2 ml for adult mice and 0.05 ml for 1-day-old mice) or i.p. (0.2 ml) into the recipients.

Cell separation

Spleen cells were fractionated on a discontinuous Percoll gradient by centrifugation (11). The cell fractions with densities $1.060 < r < 1.070$ were referred to as large cells, while those with $r > 1.070$ were referred to as small cells. The purified small cells contained <10% blast cells, while in the separated large cells the fraction of contaminating small cells varied from 10 to 30%, as estimated by Coulter Counter cell size analysis.

Cell culture and limiting-dilution analysis

Limiting dilution cell cultures were done as previously described (1,10). In brief, a limiting number of spleen cells was distributed

in 0.2 ml microculture wells, in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK) complemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG), 10% FCS (Boehringer, Mannheim, FRG), 10 mM HEPES buffer, pH 7.3 (Sigma, St Louis, MO), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS from *Salmonella abortus equii* (Difco Laboratories, St Louis, MO), penicillin, streptomycin (Flow, Irvine, UK), and gentamycin (Gentain, Unilabo, Levallois Perret, France), containing 3×10^6 rat thymus filler cells/ml which were previously irradiated with 50 rad from a ^{135}Cs source. For each determination of the frequency of LPSr B cells, between four and six different cell concentrations were used. Cultures were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere for 5 days. At the end of the incubation period the cells were harvested, washed, and tested for IgM secretion with a modification of the ELISA spot-assay technique (12).

ELISA spot assay

Cultures were tested on day 5 for the presence of IgM-secreting cells, using a modification of the Sedgwick and Holt technique (1,12). In brief, flat-bottomed ELISA plates (Luxlon, M29 LSE, CEB) were coated with 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ (50 μg) of a sheep anti-mouse total Ig antiserum diluted in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 8). Afterwards the plates were saturated with PBS containing 1% bovine serum albumin for 30 min at 37°C and then washed with PBS. The cells to be tested were washed in BSS containing 1% FCS, resuspended in 100 μl of RPMI 1640 culture medium supplemented with 1% FCS, and then transferred into the coated plates. The plates were then further incubated for 3–5 h at 37°C in the presence of a 5% CO_2 atmosphere. The cells were removed by flicking the plate, followed by lysis with 0.05% Tween 20 in H_2O . After extensive washing (three or four times) with PBS supplemented with 0.05% Tween 20, a rabbit anti-mouse IgM antiserum coupled to biotin was added to each well (50 $\mu\text{l}/\text{well}$) and the plates incubated overnight. On the following day the plates were washed three times with PBS Tween 20, a solution of Streptavidin labelled with alkaline phosphatase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) was added into each well (50 $\mu\text{l}/\text{well}$), and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After further washing, a 2.3 mM solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma), diluted in 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (Merck), containing 0.75% low melting agarose (type 1, low EEO, Sigma) and kept at 46°C, was added (50 $\mu\text{l}/\text{well}$) as the revealing substrate. After 1–2 h of incubation at 37°C, the IgM PFC revealed as blue spots could be counted. For each cell dilution 48 replicates were used, and cultures were considered as positive when >5 PFC visualized spots were counted. In all cases the results were fitted to the first term of Poisson's distribution and the frequencies were derived from a semi-log plot to indicate the number of cells per culture at which 63% of the cells respond.

Estimate of the number of donor LPSr cells persisting in the host organs

From the calculated frequency of LPSr cells and the total number of nucleated cells present in the host tissues we have estimated the total number of LPSr cells recovered per organ of the host (9), according to the formula:

$$\text{Total no. of LPSr cells} = \text{frequency of LPSr cells} \times \text{no. of nucleated cells (in each host organ)}$$

At the different time intervals following transfer, the number of LPSr cells persisting in the host is expressed either as the total number of LPSr cells recovered in each host organ (in X-irradiated mice) or as a fraction of the number of LPSr cells injected

(calculated from the frequency of LPSr cells present in the cell inoculum) according to the equation:

$$100 \times \frac{\text{no. of LPSr cells present in the host organ}}{\text{no. of LPSr cells injected into each recipient}}$$

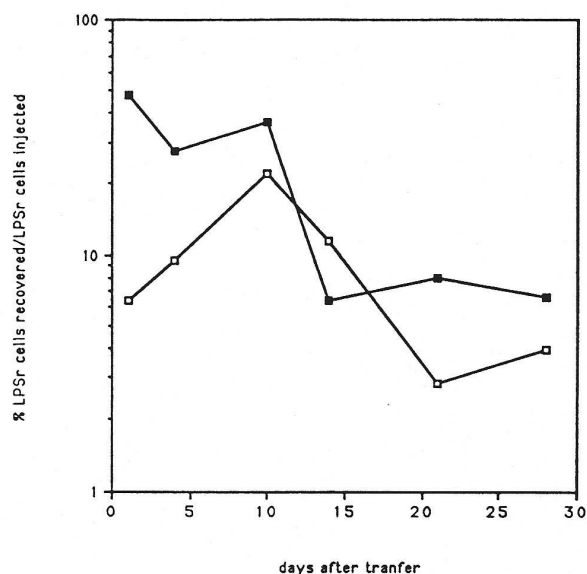


Fig. 1. Persistence of peritoneal LPSr donor cells in the spleen and peritoneal cavity of adult recipient mice following i.v. cell transfer. Two million PerC from B6 adult mice were injected i.v. into B10.Cr adult mice on day 0. At different days after cell transfer spleen or PerC cells from two or three hosts were pooled and tested in LDA to estimate the frequency of donor LPSr cells. The percentage of LPSr cells recovered at different time intervals in the host spleen (■) or peritoneal cavity (□) was expressed according to the formula: % = $100 \times (\text{freq. of LPSr cells recovered} \times \text{no. of nucleated cells per host organ}) / (\text{freq. of LPSr cells in donor cells} \times \text{no. of cells injected})$, i.e. $100 \times (\text{no. of LPSr cells recovered}) / (\text{no. of LPSr cells injected})$. For simplicity results of a single experiment are shown. Similar results were obtained in a second independent experiment.

Results

Kinetics of peritoneal LPSr B cells after i.v. transfer into normal adult hosts

Two million peritoneal cells from adult B6 LPS responder mice were injected i.v. into adult B10.Cr LPS non-responder mice. At different time points after transfer, spleen and PerC were removed from the recipient mice, and the frequency and number of LPSr donor B cells among host cells estimated by LDA (9).

The results, presented in Fig. 1, show that after i.v. cell transfer donor PerC localize preferentially in the spleen rather than in the PC of the hosts. Thus, at day 1, 47% of the injected donor cells were present in the spleen, while only ~6.4% of the injected cells could be recovered from the PC of the recipient mice.

By following the persistence of donor PerC in the host's spleen, we have found that after an initial decrease in the first 4 days following injection, the number of LPSr cells recovered at day 10 after transfer was similar to the original day 1 values (Fig. 1). The transferred PerC B cells seemed thus able to maintain their population size within the first 10 days of parking in the spleen of the hosts. From day 10 onwards, however, there was a marked decay of donor cells, and at 2–4 weeks after transfer the number of LPSr cells present in the host's spleen represents ~13% of the number obtained at day 1, i.e. ~5% of the injected cells (Fig. 1).

At the different time points after i.v. transfer we studied the size distribution of donor LPSr cells recovered in the spleen of the hosts. For this purpose, the recipient's spleen cells were separated on a Percoll gradient into small and large cell fractions and the frequency of donor LPSr cells in each cell fraction estimated. The results obtained show that the donor cells were more frequently present in the large cell fraction of the host's spleen, independently of the time elapsed after transfer (Table

Table 1. Frequency of donor LPSr B cells among nucleated cells in the spleen and in the peritoneal cavity of adult and neonatal hosts

Days	Cell transfer											
	PerC i.v. in adult ^a						PerC i.p. in adult ^b				PC i.v. in neonate ^c	
	Spleen			PC	Spleen			PC	Spleen			PC
	L	S	Total	Total	L	S	Total	Total	L	T	S	Total
1	1/320	1/3250	1/410	1/1000	1/45,000	1/324	1/80	NT				NT
4	1/1100	1/5300	1/585	1/1200	1/17,000	1/80	1/590	NT				NT
7	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1/2800	NT				NT
10	1/800	1/2500	1/215	1/4275	1/21,000	1/1000	1/3600	NT				NT
14	1/6900	1/11,000	1/330	1/3900	1/42,000	1/225	1/540	1/2300				NT
21	1/3200	1/18,000	1/1350	1/2500	1/50,000	1/2830	1/450	1/430				NT
28	1/6300	1/19,000	1/1160	1/2400	1/24,000	1/1700	1/600	1/3600	1/90			

Adult PerC from a pool of 20 B6 mice were injected i.v.^a or i.p.^b into adult or i.v. into neonatal B10.Cr mice^c. At different time points after transfer, two or three host mice were killed and the frequencies of donor LPSr B in the unseparated (T), small (S), or large (L) cell fractions of the spleen, and among nucleated PerC (Total) were estimated by LDA. The frequencies of LPSr cells present in the cell inoculum were also determined and were ^a1/14, ^b1/9, and ^c1/12. The background frequency values in B10.Cr in the present culture conditions and due to the mitogenic properties of the FCS employed were 1/27,000 in the small and 1/14,000 in the large cell fraction of the spleen cell compartment. NT, not tested.

76 Kinetics of peritoneal B cells

1). Taking into account the relative proportions of small (75–85%) and large (15–25%) cells in the spleen of the host, it was possible to quantify the number of LPSr cells present in each cell fraction and thus to estimate the relative representation of donor cells in both small and large cell fractions. We have found that while at day 1 after transfer 66% of the donor cells recovered were present in the large cell compartment of the recipient's spleen, 3 months later up to 100% of the very few donor LPSr cells detected (1.8% of the injected cells) were retrieved from the large cell fraction (not shown).

Persistence of donor PerC was also studied in the recipient's PC after i.v. injection. As shown in Fig. 1, in contrast to the dynamic behaviour of the cells recovered in the host's spleen, the number of donor cells recovered from the host PC increased up to 3-fold in the first 10 days following the transfer. From days 10 to 21 the number of donor cells decayed by ~50% every 4 days, and 3 months after transfer few donor cells could be detected in the host PC. As shown in Table 1, the frequency of LPSr cells is always higher within cells of the host PC than cells of the spleen, which is likely due to the dilution of the transferred cells amongst the different number of resident cells of the two compartments.

These results indicate therefore that after i.v. transfer peritoneal B cells show different kinetics in the spleen or in the PC of the hosts. They also show that most of the peritoneal B cells are not able to persist in the host for more than 1–2 months and that the cells that survive for such prolonged periods of time are preferentially recovered in the fraction of large activated cells, a finding that can either be due to the normal size distribution of peritoneal B cells or be related to mechanisms of *in vivo* activation of the donor cells.

Kinetics of peritoneal LPSr B cells after i.p. transfer into normal adult hosts

The i.v. transfer of PerC may represent a non-physiological approach, since the injected cells are seeded into a localization site that differs from the original homing compartment and this artificial process could alter the final kinetic behaviour of the transferred cells. We have thus investigated the kinetics of PerC upon transfer into their own original environment. For this purpose, $3-10 \times 10^6$ PerC from B6 adult mice were transferred i.p. into B10.Cr adult hosts.

At day 1 after transfer 23% of the cohort of injected donor B cells could be recovered from the recipient's PC while only 2.9% could be recovered from the spleen (Fig. 2). In this case the number of donor peritoneal B cells in the host PC was kept constant for the first 4 days after transfer and decayed thereafter to reach 4–5% of initial day 1 values by 28 days after transfer. The few LPSr donor peritoneal B cells retrieved from the host spleen showed a somewhat distinct kinetic pattern, since after maintaining constant cell numbers in the initial 4 days of transfer the following decay was less marked than that observed for LPSr cells homing in on the PC (Fig. 2). The total (spleen + PC) number of LPSr cells recovered at later time points was, however, always much lower than the number of injected cells (<3%), although in one single experiment, and in contrast to our observations following i.v. transfer, we have been able to retrieve from the host's spleen 9% and from the PC ~5–10% of the injected LPSr PerC 3 months after i.p. injection (not shown). Comparison of the distribution of donor cells in the large and small cell

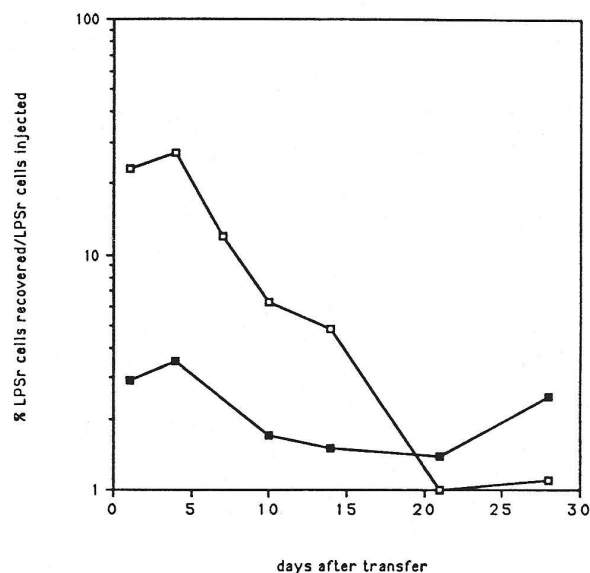


Fig. 2. Persistence of peritoneal donor cells in the spleen and peritoneal cavity of adult hosts following i.p. cell transfer. In this case, 3–10 million PerC from B6 mice were injected i.p. and the number of LPSr donor cells persisting at different time intervals in the spleen (■) and PC (□) of the recipients was estimated and expressed as a fraction of the number of LPSr cells injected as described in Fig. 1. Results represent the mean values of two (spleen) or five (peritoneal cavity) different experiments.

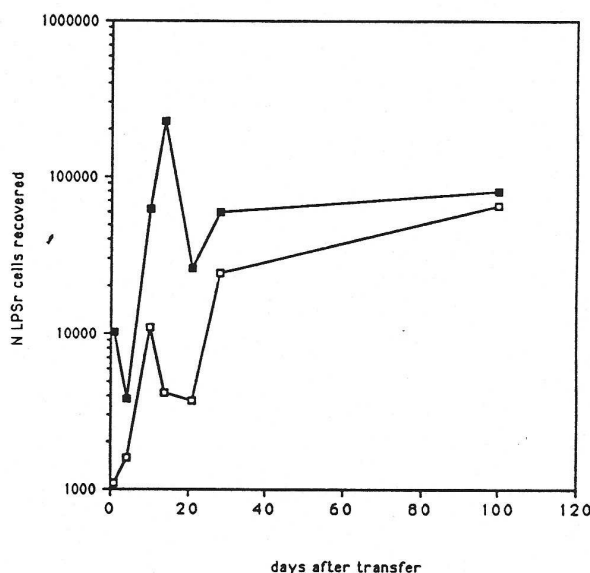


Fig. 3. Expansion of peritoneal donor cells in the spleen and PC of X-irradiated hosts after i.v. cell transfer. Two to three million peritoneal cells from adult B6 donors were injected i.v. into B10.Cr recipient mice which received a dose of 500 rad the day before cell transfer. At different time intervals thereafter we have estimated the frequencies of donor LPSr cells present in the spleen and PC cells from pools of two to three recipient mice. To show better the expansion of the donor cells, results are plotted as the total number of LPSr cells recovered in the spleen (■) and PC (□) of the hosts, calculated from the estimated frequencies of LPSr cells according to the formula given in Methods.

compartments of the host's spleen shows that most, if not all, LPSr cells recovered are present in the large cell fraction (Table 1; note that the frequencies of LPSr cells amongst splenic small cells after i.p. transfer are always close to the background values observed for the uninjected control B10.Cr mice, i.e. 1/27,000).

Thus, upon i.p. injection, peritoneal LPSr B cells show distinct kinetics according to organ localization and the few persistent donor cells are more frequently found within the large cell fraction of the host's spleen as also happens after i.v. injection.

Expansion of peritoneal LPSr B cells upon transfer into X-irradiated adult mice

To evaluate better the possible role of the environment on the fate of the donor cells, we have also analysed the dynamics of

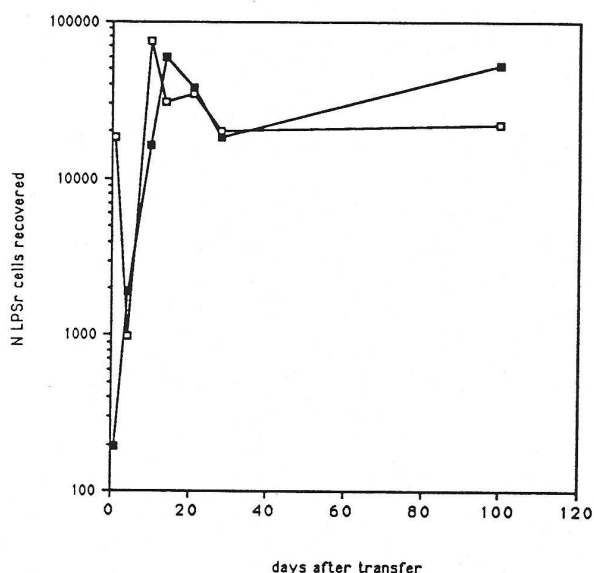


Fig. 4. Expansion of peritoneal donor cells in the spleen and PC of X-irradiated hosts after i.p. cell transfer. In this case peritoneal donor cells were injected i.p. into X-irradiated recipient mice. Results of the total number of LPSr cells recovered in the spleen (■) and PC (□) of the hosts are calculated and plotted as described in the legend to Fig. 3.

peritoneal LPSr cells in the spleen and PC of X-irradiated hosts both after i.v. (Fig. 3) or i.p. (Fig. 4) cell transfer. We have found that, in contrast to the observations made in normal mice, in X-irradiated hosts the transferred peritoneal LPSr B cells were able to expand by 30- to 40-fold the numbers of cells initially recovered at day 1 post-transfer, and to maintain these levels for up to 3 months. The kinetics of expansion differed, however, according to the route of cell injection and the homing site. Thus, while in the secondary localization site [i.e. in the spleen after i.p. (Fig. 4) or in the PC after i.v. (Fig. 3) injection] cell expansion was immediate from day 1 of parking, in the original seeding organ there was an initial decay of donor cell numbers and only later, from day 4 to day 7, did the number of LPSr cells increase significantly. As previously observed in intact recipients, the long-term persisting LPSr cells were more commonly found in the large cell fraction of the host's spleen (Table 2).

Repopulation of the X-irradiated LPS non-responder mice with LPSr cells could have been achieved by the putative presence of haematopoietic precursors contaminating the inoculum of donor PerC. To test for this possibility, we have assessed the capacity of bone marrow cells from X-irradiated B10.Cr mice repopulated with peritoneal LPSr cells (primary recipients) to reconstitute irradiated (600 rad) B10.Cr mice (secondary recipients). The results obtained show that the frequency of LPSr cells present in spleen of the secondary recipients is close to background levels (Table 3), i.e. the bone marrow cells from the repopulated primary hosts did not contain donor LPSr haematopoietic precursors, since they were unable to reconstitute the LPS reactivity in irradiated mice.

These results suggest that once in the appropriate host environment, mature peritoneal LPSr B cells show considerable expansion capacity and can repopulate the depleted immune system of the hosts.

Kinetics of peritoneal LPSr B cells after transfer into neonatal mice

We have previously shown that LPSr spleen B cells from adult donor mice, which decay rapidly upon transfer into adult mice, are able to expand and persist in neonatal hosts. This phenomenon is likely due to the presence in the neonatal recipients of environmental conditions, propitious to cell survival and growth, which are absent in adult host. We have, therefore,

Table 2. Frequency of LPSr donor B cells among total nucleated cells of the spleen and peritoneal cavity of X-irradiated hosts

Days	PerC i.v.			PerC i.p.		
	Spleen		PC	Spleen		PC
	L	S	Total	L	S	Total
1			1/1485			1/247
4			1/1305			1/1620
10			1/360	1/300	1/11,300	1/60
14	1/90		1/480	1/280	1/9400	1/108
21	1/615	1/6800	1/540	1/375	1/7000	1/110
28	1/270	1/3700	1/165	1/620	1/8500	1/170
100	1/470	1/4500	1/77	1/1200	1/2500	1/300

Adult peritoneal cells from a pool of 20 B6 mice were injected i.v. or i.p. into B10.Cr adult mice, which received a dose of 500 rad 24 h before cell transfer as described in Methods. At different times after transfer two or three B10.Cr recipient mice were killed and spleen or peritoneal cells pooled. The frequency of LPSr donor B cells among total nucleated cells of the recipient was estimated by LDA.

^aFrequencies determined for unseparated total spleen cells.

78 Kinetics of peritoneal B cells

Table 3. Lack of reconstitution of LPS reactivity in secondary irradiated B10.Cr hosts after transfer of bone marrow cells from B10.Cr recipients repopulated with LPSr peritoneal cells from B6 donors

	Frequency LPSr cells ^a			
	PerC i.v.		PerC i.p.	
	Small	Large	Small	Large
First hosts ^b	1/4500	1/270	1/8500	1/620
Secondary hosts ^c	1/26,000	1/5400	1/15,500	1/6000

^aThe frequency of LPSr cells was estimated in the spleen of both primary and secondary host mice 1 month after cell transfer.

^bFirst hosts were X-irradiated B10.Cr mice transferred i.v. or i.p. with three million peritoneal cells from B6 donor mice. Mice were killed 28 days after cell transfer and the frequency of donor LPSr cells estimated in the large and small cell fractions of the spleen. Bone marrow cells from these mice repopulated with peritoneal LPSr B cells were depleted of mature Sig⁺ cells by panning with a rabbit anti-mouse Ig as previously described (1) and transferred i.v. into X-irradiated B10.Cr recipients (secondary hosts).

^cSecondary hosts were B10.Cr which received a dose of 600 rad the day before the transfer of 10⁷ Sig⁻ depleted bone marrow cells from the first hosts.

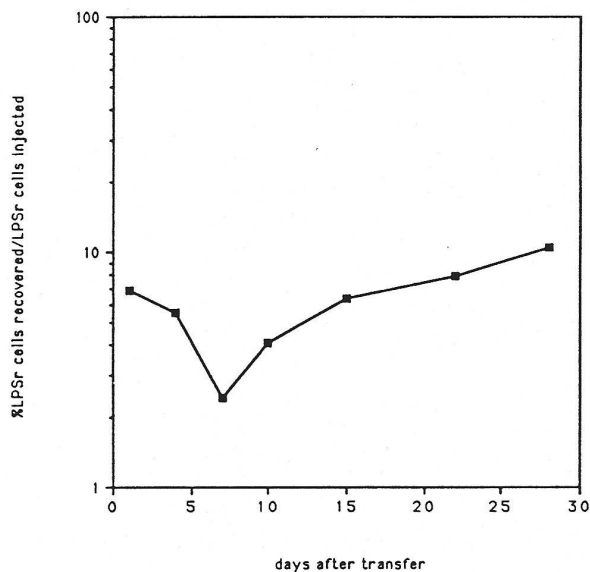


Fig. 5. Persistence of peritoneal donor cells in the spleen of neonatal hosts following i.v. cell transfer. Five million PerC from adult B6 donor mice were injected i.v. into 1-day-old B10.Cr recipient mice on day 0. At different time points after cell transfer, the spleens of two or three recipients were pooled and tested in LDA to estimate the frequency of donor LPSr cells. The results were expressed as a fraction of LPSr cells injected as described for Fig. 1. Two experiments were performed with identical results.

decided to investigate the kinetic behaviour of adult PerC after transfer into neonatal hosts.

Five million PerC from B6 adult mice were injected i.v. into 1-day-old B10.Cr mice. As shown in Fig. 5, at day 1 6–7% of the injected LPSr cells were recovered in the host spleen. The

Table 4. Persistence of LPSr donor PerC of adult mice upon transfer into 1-day-old recipient mice

	Cell injection ^a	% LPSr cells recovered/ LPSr cells injected ^b	
		Small	Large
Exp. 1	5 × 10 ⁶ i.v.		
2 weeks		3,7	2,6
3 weeks		5	2,9
4 weeks		7,2	3,2
Exp. 2	2 × 10 ⁶ i.v.		
5 weeks		< 1 ^c	2,9
10 weeks		3,4	2,3
Exp. 3	2 × 10 ⁶ i.p.		
5 months		< 1 ^c	1,9

^aThe number of PerC of B6 adult mice indicated was injected either i.v. or i.p. into 1-day-old B10.Cr recipient mice.

^bThe values show the percentage of LPSr cells recovered in the small and in the large cell fractions of the spleen of neonatal recipients, as a fraction of the number of LPSr cells injected, at the indicated time after cell transfer.

^cThe background level of detection for LPSr donor cells was ~1%.

number of donor cells decreases thereafter 2- to 3-fold until day 7, then recovers to initial day 1 values by 1 month after transfer. At 3–5 months after transfer few donor cells were detected (Table 4). The long-term, persistent donor B cells were more commonly found in the large cell fraction of the spleen and particularly in the host PC (Tables 1 and 4).

It is of interest to note that the frequency of donor B cells amongst host spleen cells is reduced 35-fold from day 1 to day 7 after transfer (Table 1), as the total number of resident host spleen cells increases with age. From day 7 to day 28, however, the frequency of donor B cells is kept constant (Table 1), suggesting that the donor B cells now expand at the same rate as the host cells. Comparison of the total numbers of LPSr donor and host spleen cells shows that both increase 4-fold in the same time interval (not shown).

Discussion

We have investigated the dynamic properties of peritoneal B cells by following the decay rate and persistence of LPSr peritoneal B cells from B6 mice transferred into LPS non-responder B10.Cr hosts. The B6 and B10.Cr strains share the same major histocompatibility complex and Ig heavy-chain constant region allotype, and no immune reactions to the phenotype differences between the LPSr and LPS non-reactive mice have been described (8,9,13,14). Thus, this transfer model allows, in the absence of any histocompatibility reactions, a precise quantification of the donor LPSr cells persisting in the recipient mice without any contribution of newly formed cells from the bone marrow, since no LPSr cells can be produced by the hosts (2,8,14). Although in the present experimental approach we have only evaluated the dynamics of LPSr B cells, previous studies have shown similar kinetic properties for both LPSr and LPS non-reactive B lymphocytes (2,15).

The study of the fate and persistence of LPSr peritoneal B cells transferred into intact histocompatible LPS non-responder adult

hosts shows that these cells are able to maintain or increase their population size in the first 4–10 days after transfer. Peritoneal LPSr B cells thus show dynamic properties that mimic the kinetic behaviour previously observed for spleen B cells harvested from 1- to 2-week-old donor mice and transferred into adult hosts (1), but differ significantly from those of splenic LPSr cells of adult donor mice, which have been shown to decay rapidly within the first days following transfer (2,16). The different kinetic properties of splenic and peritoneal B cells from adult mice were further confirmed by studies following their fate after transfer into neonatal 1-day-old B10.Cr hosts. In this case, while splenic B cells were shown to expand 5-fold within the first week following transfer and maintain steady numbers thereafter (1), transferred peritoneal LPSr cells decay initially to expand slowly from day 7 onwards, reaching a plateau 1 month later. Although in this investigation we have not addressed the study of the dynamics of purified B cell subsets, it is nevertheless likely that the phenotype composition of splenic B cells from 1- to 2-week-old mice and peritoneal B cells from adult mice, both enriched sources for Ly1+ B lymphocytes (4,5), may be the basis of their identical kinetic behaviour. Thus, while conventional B cells from adult spleen turn over rapidly and are replenished from Ig-precursors throughout life (2,6), Ly1 B cells have been claimed to be a self-renewing, peripheral, expanding cell population which is able to control its own population size through feedback regulation of cell numbers (3,17).

In the present study the expansion of donor peritoneal B cells observed in intact adult hosts was, however, limited as the total number of LPSr cells present in the recipient mice never exceeded significantly the number of cells recovered 1 day after transfer. Moreover, from day 10 onwards, the number of donor cells decayed to reach 10–20% of initial values 1–2 months after transfer. Taking into account the differential expansion of the donor cells homing into either spleen or PC after i.v. injection (see Results) it could be argued that the i.v. transfer of PerC represents a non-physiological seeding of the cells, which could negatively affect their kinetic outcome. To minimize such effects we have therefore followed the fate of peritoneal B cells after i.p. transfer into adult hosts. In this case the donor LPSr B cells, which were recovered at high frequencies in the host peritoneum, did not expand but maintained steady numbers from day 1 to 4 after cell transfer. The number of donor peritoneal B cells recovered in the host's spleen remained constant during the first 4 days following i.p. transfer, a finding that could be accounted for by continuous immigration of cells from the PC if we accept that the 3% of injected cells recovered in the host's spleen 24 h after transfer reflects the daily transit of peritoneal B cells into the spleen. Thus, even after transfer into their original homing site, peritoneal B cells not only did not expand to repopulate intact hosts, but also the majority of these cells showed limited life-spans and were unable to persist, as a self-renewing population, for >2–3 weeks.

In contrast with the results obtained following cellular kinetics in normal hosts, we have found that peritoneal LPSr cells from adult donors can fully expand and persist in X-irradiated recipient mice (Figs 3 and 4). Since the expansion capacity of the transferred peritoneal donor cells could not be attributed to contaminating haematopoietic precursors present in the cell inoculum (see Table 3), we can confirm previous reports on the capacity of Ly1+ B-enriched PerC to repopulate X-irradiated

hosts (4). We have previously reported that LPSr B cells from adult spleen show similar decay rates in both intact or X-irradiated hosts (2,18). Since splenic cell populations contain ~1–2% of Ly1+ B cells, the fact that such cells are unable to expand and reconstitute an X-irradiated host suggests that peritoneal and splenic Ly1+ B cells may differ at least with respect to their dynamic properties. Splenic Ly1 B cells may represent a more differentiated cell subset (19) derived from the PC, which has partially lost its expansion capacity. In any case these findings imply, therefore, a different homeostatic regulation for peritoneal and splenic B lymphocytes. Differential 'space' requirements (20) and/or resistance to isogeneic barriers (21) could be invoked to explain the divergent behaviours of the two cell populations. Recent studies indicate the existence of feedback regulation mechanisms through which mature Ly1 B cells, but not conventional bone marrow-derived B cells, abrogate further development from their own precursors (17,22) and establish a tight homeostatic control on cell numbers. It is likely that in our cell transfer model similar homeostatic mechanisms operate in intact hosts and prevent the expansion of peritoneal Ly1 B-enriched cell populations. The same mechanisms seemed to be also operational in neonatal hosts where peritoneal donor cells, after a limited expansion period starting at day 7 after injection, thereafter maintain constant numbers. It is of interest to note that using cell transfer models, strict homeostatic regulation of T cell numbers and CD4/CD8 ratios has also been recently described (23).

We have shown that environmental factors can modify the outcome of transferred cell populations and the dynamic state of lymphocytes in the adult and developing immune systems (1). These observations could be confirmed in the present study as shown by the different kinetics of peritoneal B cells in normal, X-irradiated adult and neonatal hosts. We have now also found that local environmental factors in the host tissues can influence the fate of the donor cells. In fact, after i.v. transfer into intact adult hosts, peritoneal LPSr B cells showed a kinetic behaviour that varied according to tissue localization. Thus, while the number of donor cells recovered in the host spleen diminished in the first 4 days after cell transfer, they increase in the recipient's PC during the same time interval (Fig. 1). These results suggest either the redistribution of donor cells between spleen and peritoneum of the hosts, or more likely that the host PC provides local conditions that favour the initial growth of the transferred LPSr cells, since from day 4 to 10 the number of LPSr cells increases both in the spleen and the PC. Further support for this second alternative was obtained upon injection of PerC into neonatal hosts, which showed that 1 month after transfer donor B cells are preferentially enriched in the peritoneum of the recipients (Table 1). These findings agree with previous reports demonstrating the persistence of μ^+ PerC bearing the donor allotype marker in the PC but not in the spleen of allotype congenic recipients 5 months after cell transfer into 1-day-old mice (24), and suggest that the PC environment favours the survival of transferred PerC. It is therefore likely that local environmental factors may lead to the accumulation in the PC of adult mice of highly selected B lymphocyte populations, which, in comparison with splenic B cells, express different phenotypes (Ly1+) (3–5.7), antibody specificities (anti-BrMRBC) (3–5.7), V_H gene repertoires (25,26), and divergent dynamics.

The possible existence of selective processes determining cell

80 Kinetics of peritoneal B cells

survival was suggested by the finding that, although the majority of peritoneal LPSr B cells have limited life-spans and do not persist for $>2-3$ weeks in intact recipients, the rates of cell persistence varied according to the stage of maturation of the host and tissue localization. In fact, both in normal or in X-irradiated hosts, most of the cells emigrating from the original seeding compartment (spleen after i.v. or PC after i.p. injection) were able to increase their numbers in the second homing tissue, suggesting that either cells are selected and activated during the process of cell migration or alternatively that activated cells migrate better. We have also found that, upon i.p. transfer, the remaining persistent donor LPSr PerC were predominantly recovered from the large cell fraction of the host spleen (Tables 1, 2 and 4), a result which demonstrates that under normal physiological conditions at least a fraction of splenic large cells may come from a selected pool of peritoneal cells. The observation that, in contrast to previous results obtained upon transfer of splenic cells from adult donors into neonates (1), the expansion of transferred peritoneal LPSr B cells in neonatal hosts starts from days 7-10 onwards, at a time when $<1/3$ of the cells initially recovered remained in the recipient, indicates that only a fraction of the donor cells were selected to survive and expand in the new environment. We are at present unable to distinguish whether the decay and expansion of the donor cells is restricted to either the Ly1⁺ or conventional B cells. One possibility would be that the initial decay of the donor LPSr cells may be due to the loss of the Ly1⁺ cell population while the subsequent increase may result from the expansion of conventional B cells present in the donor PerC, if the environment of the neonate is advantageous for the growth of the bone marrow-derived cells. This alternative is, however, difficult to accept due to the high frequency of Ly1 B cells among neonatal spleen cells. We postulate that within the diverse repertoire of the adult spleen cells a majority of cell specificities will be selected to expand, while in the restricted repertoire of the adult PerC B cells (3-5,7,25,26) only a minority of these will be able to integrate the new environment. Lymphocyte persistence may thus be mediated by cell activation acting through clonally distributed receptors to ensure the selection of the most relevant specificities. Cell transfer studies following the fate of dextran-immune cells have, in fact, shown the preferential survival of particular idiotypes according to the maturation stage of the transferred cells and to the age and type of recipient mice (27,28). We would like to propose that long-term persistent B cells represent a selected cell population that is chosen according to the state of development and dynamics of the host immune system.

In conclusion, peritoneal LPSr B lymphocytes show kinetic properties that differ from adult splenic B cells but mimic the behaviour of neonatal spleen cells, a phenomenon that may be related to the phenotype composition of these different cell populations. Thus, while PerC from adults and spleen cells from neonates are enriched sources of Ly1⁺ B lymphocytes, this subpopulation of cells is rare in the spleen of adult mice. The present study also shows that the kinetics of the transferred cells is not only determined by their origin, but also modulated by the host cell types, which may impose a homeostatic regulation of total cell numbers, and by environmental factors that select the remaining persisting cells. Since the B cells from the PC of adult mice represent a highly selected cell population, as shown by studies on the expression of antibody specificities and V_H gene

repertoires (7,26), the different dynamic behaviour of these cells could also result from prolonged cell selection by local environmental factors.

Acknowledgements

We would like to thank Dr A. Coutinho for discussions and criticism and F. Huetz and M. A. Marcos for revision of the manuscript. This work was supported by grants from DRET and ARC, France.

Abbreviations

B6	C57BL/6
B10.Cr	C57BL/10ScCr
BSS	balanced salt solution
LDA	limiting dilution analysis
LPSr	LPS-reactive
PFC	plaque forming cell
PerC	peritoneal cells
PC	peritoneal cavity

References

- 1 Thomas-Vaslin, V. and Freitas, A. 1989. Lymphocyte population kinetics during the development of the immune system. B cell persistence and life-span can be determined by the host environment. *Int. Immunol.* 1:237.
- 2 Freitas, A. A., Rocha, B., and Coutinho, A. 1986. Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol. Rev.* 91:5.
- 3 Hayakawa, K., Hardy, R. R., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. 1985. Progenitors of Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J. Exp. Med.* 161:1554.
- 4 Hayakawa, K., Hardy, R. R., Stall, A. M., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. 1986. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur. J. Immunol.* 16:1313.
- 5 Herzenberg, L. A., Stall, A. M., Lalor, P. A., Sidman, C., Moore, W. A., Parks, D. R., and Herzenberg, L. A. 1986. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.* 93:81.
- 6 Osmond, D. G. 1986. Populations dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol. Rev.* 93:103.
- 7 Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R., and Herzenberg, L. A. 1983. The 'Ly-1 B' cell subpopulation in normal, immuno-defective and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* 157:202.
- 8 Coutinho, A. and Meo, T. 1978. Genetic basis for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57BL/10Cr mice. *Immunogenetics* 7:17.
- 9 Freitas, A. A. and Coutinho, A. 1981. Very rapid decay of mature B lymphocytes in the spleen. *J. Exp. Med.* 154:994.
- 10 Anderson, J., Coutinho, A., Lernhardt, W., and Melchers, F. 1977. Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion *in vitro* of every growth inducible lymphocyte. *Cell* 10:27.
- 11 Nathanson, S. D., Zamfirescu, P. L., Dren, P. I., and Wilburn, S. 1977. Two step separations of human peripheral blood monocytes on discontinuous density gradients of colloidal silica-polyvinyl pyridine. *J. Immunol. Methods* 18:225.
- 12 Sedgwick, D. J. and Holt, P. G. 1983. A solid phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody secreting cells. *J. Immunol. Methods* 57:301.
- 13 Goodman, S. and Morrison, D. J. 1985. Lipopolysaccharide receptors on lymphocytes I. Lack of immunologic recognition of a putative LPS receptor on LPS-responder lymphocytes by LPS-non responder mice. *J. Immunol.* 135:1906.
- 14 Nishikawa, S. I., Kina, T., Amagai, T., and Katsura, Y. 1985. Early B cell precursors in long term bone marrow culture: selective development in the bone marrow of irradiated recipients. *Eur. J. Immunol.* 15:696.
- 15 Freitas, A. A., Rocha, B., Forni, L., and Coutinho, A. 1982. Population dynamics of B lymphocytes and their precursors: demonstration of high turnover in the central and peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.* 128:54.
- 16 Freitas, A. A., Rocha, B., and Coutinho, A. 1986. Two major classes

- of mitogen-reactive B lymphocytes defined by life span. *J. Immunol.* 136:466.
- 17 Lalor, P. A., Herzenberg, A. L., Adams, S., and Stall, A. M. 1989. Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur. J. Immunol.* 19:507.
- 18 Freitas, A. A., Rocha, B., and Coutinho, A. 1986. Life span of B lymphocytes: the experimental basis for conflicting results. *J. Immunol.* 136:470.
- 19 Huetz, F. and Poncet, P. 1989. Immunocompetence of peritoneal B cells. *Res. Immunol.* 140:75.
- 20 Makela, O. and Mitchinson, N. A. 1965. The role of cell number and source in adoptive immunity. *Immunology* 8:539.
- 21 Celada, F. 1966. Quantitative studies of the adoptive immunological memory in mice. I. An age-dependent barrier to syngeneic transplantation. *J. Exp. Med.* 124:1.
- 22 Lalor, P. A., Stall, A. M., Adams, S., and Herzenberg, L. A. 1989. Permanent alteration of the murine Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur. J. Immunol.* 19:501.
- 23 Rocha, B., Dautigny, N., and Pereira, P. 1989. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios 'in vivo'. *Eur. J. Immunol.* 19:905.
- 24 Forster, I. and Rajewsky, K. 1987. Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cell into allotypic congenic, newborn mice. *Eur. J. Immunol.* 17:521.
- 25 Freitas, A. A., Lembezat, M. P., and Coutinho, A. 1989. Expression of antibody V-regions is genetically and developmentally controlled and modulated by the B lymphocyte environment. *Int. Immunol.* 1:342.
- 26 Andrade, L., Freitas, A. A., Huetz, F., Poncet, P., and Coutinho, A. 1989. Immunoglobulin VH-gene expression in Ly-1 and conventional B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19:1117.
- 27 Bosing-Schneider, R., Selinka, H. C., and Lehle, G. 1986. B cell dependence of the congenic barriers towards idiotype-carrying cells. *Eur. J. Immunol.* 16:1401.
- 28 Bosing-Schneider, R. and Selinka, H. C. 1987. Evidence for a mutual influence of idiotype expressing donor cells and recipient lymphocytes in neonatal hosts. *Eur. J. Immunol.* 17:1531.

PUBLICATION IV

**Clonal persistence of B lymphocytes in
normal mice is determined by V-region
dependent selection.**

soumis à publication

**CLONAL PERSISTENCE OF B LYMPHOCYTES IN NORMAL MICE IS
DETERMINED BY V-REGION DEPENDENT SELECTION**

by

Véronique Thomas-Vaslin, Luiz Andrade,

Antonio Freitas & Antonio Coutinho

Unité d'Immunobiologie, CNRS UA 359, Institut Pasteur, Paris, France

Running title: B cell life spans and repertoire selection

Correspondence: V. Thomas-Vaslin, Unité d'Immunobiologie, Institut
Pasteur, 28, rue du Dr. Roux, 75724 PARIS CEDEX 15 France

Abbreviations:

B6.Igh^a, C57Bl/6.Igh^a; B10.Cr, C57Bl/10Sc.Cr; CFU-B, Colony forming unit; BSS, Balanced salt solution; BSA, Bovine serum albumine; FCS, Foetal calf serum; LDA, Limiting dilution analysis; LPS, Lipopolysaccharide; LPSr, LPS reactive; PBS, Phosphate buffer saline

SUMMARY

We have previously shown that adult splenic B cells die in less than one week in the spleen of adult recipient mice, while, in contrast, the cellular environment of newborn recipients allow their expansion and persistence for several weeks. In the present study, we now show that the local environment of the peritoneal cavity of adult recipient mice also allows the persistence of adult splenic B cells during two weeks after intraperitoneal transfer. In order to determine whether the persistence of donor B cells in newborn hosts and in the peritoneum of adult recipients result from a selection process involving the clonal specificities expressed, the VH gene family repertoire of donor LPS reactive B cells was analyzed in mRNA colonic blot assay, at different times after their transfer in LPS nonresponder hosts. The results show that among the donor adult LPS reactive B cells, the cells expressing some VH gene family are differentially selected to expand or persist in both kinds of recipients. Thus, cells expressing VH11 or J558 gene families are particularly positively selected, while those expressing J606 and 36-30 are the less selected. These findings demonstrate that the propensity of B cells to persist and expand is determined by their selection through their immunoglobulin variable regions, rather than to genetic properties linked to particular B cell subsets.

1 Introduction

We have recently shown that life spans of B lymphocytes are determined by the cellular environment. Thus, while the majority of splenic B cells of adult mice have a life expectancy of less than one week if transferred i.v. into histocompatible adult recipients (1, 2) the same cell populations can expand and persist in newborn recipient mice (3). These findings suggest that splenic adult B cells are positively selected in the neonatal environment. On the other hand, we have also shown that in the same adoptive environment, B cells from both neonatal spleen and adult peritoneum show increased life expectancies as compared to adult splenic B cells (4). These kinetic properties could be the result of previous selection of those B cells populations in the newborn or peritoneal environments. If the peritoneal cavity of adult mice is a privileged site selecting B cells for persistence, it could be expected that adult splenic B cells should also be selected to clonal persistence, if exposed to such environment. We have now tested this hypothesis and investigated whether the persistence of donor adult splenic B cells in adult peritoneum and in newborn is related to their Ig variable region.

In this study, the kinetics and repertoires expressed by adult splenic B cells from donor B6.Igha mice, were followed after their transfer into newborns or into the peritoneum of adult histocompatible recipient B10.Cr mice by the combination of two different techniques. Transferred donor B cells were identified on the basis of LPS reactivity and by the IgM allotype difference, which allowed 1) for the precise quantification of donor LPS-reactive B cells, in limiting dilution analysis (1) 2) for the determination of their VH gene family repertoire at molecular level, using the CFU-B mRNA colony blot assay (5).

The present results show that the donor adult splenic B cell populations are selected for persistence in the peritoneal cavity of adult recipient mice and in the spleen of neonatal hosts, according to the VH gene family they express. Differential clonal persistence of B lymphocytes is, therefore, the result of an Ig V-region mediated selection process, which seems to be particularly effective in neonatal spleen and adult peritoneum.

2 Material and Methods

2.1 Animals and cell suspensions

C57BL/6.Igh^a (Igh^a allotype, LPSr) and C57BL/10Sc.CR (B10.Cr) (Igh^b allotype, LPS non r) mice were bred in our colonies at the Pasteur Institute. Donor B6.Igh^a mice were used as adult (3-5 months old). Recipient B10.Cr mice were 3-5 months old adult mice or 24 hours of age neonates. Spleens were removed and dilacerated in cold BSS. Peritoneal cells were obtained by washing the peritoneal cavity with 10 ml of BSS supplemented with 1% FCS. To allow the precise enumeration of total nucleated cells number, only 7 ml of the exudate was removed and cells were counted. We then reported the number of peritoneal cells in 10 ml. All cell suspensions were washed twice in BSS and counted in eosin to exclude dead cells.

2.2 Cell transfer.

Spleen cell suspensions obtained from B6Igh^a mice were injected i.v. in the retro-orbital sinus of one day old B10.Cr recipient mice (20×10^6 cells in a volume of 0,05 ml/mouse) or intraperitoneally into adult B10.Cr mice (5×10^6 cells in a volume of 0,2 ml/ mouse).

2.3 Limiting dilution analysis (LDA) and ELISA.

Limiting number of cells were distributed in 0.2 ml micro-culture wells, containing 3×10^6 rat thymus filler cells per ml which were previously irradiated with 50 rads using a ¹³⁵Cesium source. The utilized medium was RPMI 1640 medium (Gibco, Scotland, UK) supplemented with 2-mercapto-ethanol 5×10^{-5} M (Merk, Darmstadt, RFA), 10% FCS (Boeringer, Manheim, FRG), 10mM HEPES buffer, pH 7.3 (SIGMA, St LOUIS, MO) 25 µg/ml of Lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi* (Difco Laboratories, St Louis M.O.), penicillin, streptomycin (Flow, Irvine, Scotland) and gentamycine (Gentalin, Unilabo, Levallois Perret, France). For each determination of the frequency of LPS reactive B cells, 4 to 6 different cell concentrations were used. Cultures were incubated at 37° C, in a 5% CO₂ atmosphere for 8 days. At the end of the incubation period, the supernatants of the culture were removed and tested in ELISA for the presence of IgM of donor allotype. ELISA plates were coated with anti-IgMa monoclonal antibody (RS3.1) (6) at 5 µg/ ml. After the saturation of the plates with PBS-gelatine 1%, 50 µl of the LDA culture supernatants were transferred to the

ELISA plates and incubated for 2 hours at 37°C. After further washing with PBS, anti-IgM-peroxydase labelled antibody (Southern Biotechnology Lab., Birmingham, AL) was added to the plates and incubated 1 hour at 37°C. This step was followed by extensive washing of the plates and addition of 100 µl of the orthophenylene-diamine substrate. After 20 minutes, the enzymatic reaction was stopped by the addition of 50 µl 10% sodium dodecyl sulfate, and the O.D. were read in a photometer (Titertek Multiskan, Flow) at 450 nm length-wave. For each cell dilution, 48 replicates were used and cultures were considered as positive when the O.D. was found superior to the mean plus 3 SD of the 48 wells culture containing filler cells alone. In all cases, the results were conform to the first term of Poisson's distribution and the frequencies of LPSr cells were derived from semi-log plot which indicate the number of cells per culture at which 37% of the cultures are negatives.

The absolute number of donor LPSr cells was calculated from the frequency of LPS reactivities cells, taking into account the total number of cells per compartment.

2.4 B cell colony assay

The different cell types were cultured in double-layer colony technique, as described by Wu and Paige (5). Briefly, the bottom layer, plated in culture dishes corresponded to 1 ml Iscove's modified Dulbecco's medium, supplemented with 5mg/ml delipidated BSA, 10% FCS, 0.3% melted Bacto Agar (Difco, Detroit, MI), 50 µg lipopolysaccharide (LPS) and 1% washed sheep red blood cells (SRBC). Cells were resuspended in the same medium without LPS and SRBC, and plated as a top layer. The cultures were incubated at 37°C, 5% CO₂, for 5-6 days, and transferred by suction to Hybond N filters (Amersham). The RNA blots were prehybridized overnight at 42°C in 50% formamide, 5x SSPE, 4x Denhardt's, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 100 µg/ml each, polyadenylic acid and denatured E. coli DNA, and hybridized with the specific VH probes for 48 h at 42°C. After hybridization, the filters were washed once with 2x SSPE, 0.2% SDS for 30 min at 60°C, and once with 1x SSPE, 0.1% SDS for 30 min at 60°C, dried and autoradiographed for 3-14 days.

The dots of colony-forming unit (CFU-B) were enumerated, and the relative representation of each VH gene family was calculated as a percentage of total VH gene (% VH-B cell) scored in each experiment. From the total number of LPSr cells obtained by LDA (N total LPSr cells) we have

calculated the number of B cells expressing each VH gene family (N VH B cell) as:

$$N \text{ VH B cell} = (N \text{ total LPSr cells}) \times (\% \text{ VH-B cell})$$

The number of cells recovered and expressing each VH gene family on day X after the cell transfer, was compared to the value obtained on day one after transfer and expressed as index of cell expansion :

$$\text{Expansion index} = \frac{N \text{ VH-B cells on day X}}{N \text{ VH-B cells on day 1}}$$

2.5 Probes

The VH gene family probes were gifts of Drs. F. Alt, S. Riley, J. Kearney, U. Krawinkel, L. Reininger. The nine VH probes used were VH 81X (7183), VH 300-19 (Q52), VH S107 (S107), VH X24 (X24), VHPB14 (J606), VH P6-3R1 (36-60), VH PNP B4 (J558), VH Vgam.3.8 (Vgam.3.8.), VH CP12 (VH11) and were described elsewhere (7, 8, 9, 10, 11; 12, 13). Probes were labeled by the random priming method (14), using 32P-dCTP (Amersham Int., Bucks.,GB).

3 Results

3.1 Experimental strategy

The purpose of the present study was to investigate whether the decay or expansion of mature B cells transferred to normal mice is related to the receptor V-regions expressed. These questions can be studied following the persistence and VH gene family repertoire of donor LPS-reactive B cells after transfer into histocompatible LPS-non-responder hosts. The experimental protocol is summarized in Figure 1. The number of clonable donor LPSr mature B cells, can be estimated by frequency determinations in LDA, as previously described using donor B6 and B10.Cr recipient mice (15, 16, 3). Moreover, the use in the present experiments, of congenic B6.Igh^a donor mice bearing an IgM allotypic difference with B10.Cr recipients allows for the specific detection of IgM^a-secreting donor B cells, at a frequency as low as 1/70,000. The introduction of an allotypic difference

does not alter the behaviour of the donor B cell populations as compared to the B6 to B10.Cr transfers previously studied (not shown).

Selection of donor B cells in recipient mice was examined by scoring the representation of VH-gene families expressed by donor B cells at different times after transfer. This provided a global assessment of V-region repertoires which covers essentially all B lymphocytes. Analysis of VH gene family expression was done using the mRNA colony blot assay on LPS-driven CFU-B (5) which exclusively reveals donor B cells. With this method the "background" frequency of the clonable B cells from the recipient B10.Cr mice was less than $1/10^5$, while the cloning efficiency of the donor B cells was 1/6 to 1/10, as revealed with the use of a C μ specific probe (Figure 2). Similar frequencies of donor LPSr cells were obtained in LDA and in colonies.

Using these protocols we have estimated both the total number and the VH gene family representation of LPSr splenic B cells from adult donors after transfer into either newborn hosts or into the peritoneum of adult recipient mice.

3.2 Analysis of VH gene family expression by adult splenic B cells upon their transfer into 1 day old recipient mice.

Twenty millions spleen cells were transferred i.v. from B6.Igh^a adult mice into 1 day old B10.Cr mice. The number of donor LPSr cells in the spleen of the hosts was determined by LDA, on days 1, 3, 6 and 9 after transfer. Donor LPSr B cells grow exponentially in the newborn recipients for the first two weeks after transfer, as previously reported (3) (not shown). The representation of VH gene families in the donor LPSr B cells was analyzed at the time of transfer, (day 0), and thereafter in the spleen of newborn recipient mice on days 1 and 9 after transfer (Table I). VH gene family usage was not very different in the donor B cell inoculum and for donor B cells recovered on day 1 after the transfer. In contrast, donor LPSr B cells persisting 9 days after transfer, showed a pattern of VH gene families distribution which differed from that observed on day one after transfer. Thus, the relative representation of most VH gene families was decreased while cells expressing VH11 and VH J558 were more represented. From the total number of donor LPSr B cells and their respective VH-gene family

expression, we determined the number of LPSr donor B cells expressing each of the 10 different VH gene families tested, 1 and 9 days after transfer. The results shown in Table 1, demonstrate that although the number of donor B cells expressing each VH gene family increases in the recipient, the rate of cell expansion varied with the VH gene family expressed. Thus, while the number of VH J606 bearing B cells increases 4 times, the number of VH11 expressing B cells increases more than 100 times, during this 9 days period. This is illustrated in Figure 3, as the rate of expansion of each VH gene family among donor B cells recovered in the spleen of the neonatal recipients, on day 9 compared to day 1.

These results show that the expansion of adult splenic B cells in the spleen of neonatal mice concerns B cells expressing all VH gene families, but the preferential expansion of some of these indicates that the process may be related to an Ig V-region mediated selection.

3.3 Analysis of the VH repertoire expressed by adult splenic B cells persisting in the peritoneum of adult recipient mice.

Peritoneal B cells were previously found to have similar kinetics properties as those of newborn B lymphocytes (4), suggesting that these two environments may similarly select for persistence of B cell populations. This was directly tested by following the kinetics of adult splenic B cells transferred into the peritoneal cavity of adult recipients.

Five millions spleen cells from B6.Igh^a adult mice were transferred intraperitoneally into B10.Cr adult recipient mice. The number of donor LPSr cells present in the peritoneal cavity and in the spleen of the recipients was estimated by LDA at different days after transfer. The kinetic behavior of the donor splenic LPSr B cells in the host peritoneal cavity show 2 distinct phases (Fig.4) : initially, following a decay in the 3 first days after transfer, LPSr cells maintain constant numbers during 2 weeks. In the third week after transfer, however, their numbers decrease rapidly. This observation establishes the ability of the adult peritoneal cavity to allow for the persistence of B cells which would rapidly decay in the donor spleen after i.v. transfers (2).

We have next investigated whether persistence of donor LPSr B cells in the adult peritoneal cavity was related to clonal specificities and VH gene family expression. For this purpose, VH gene family utilization of donor B cells recovered from the peritoneal cavity of adult hosts, was analyzed on days 1, 3 and 6 after transfer. The VH gene family composition of the persisting donor B cells was modified on day 3 and 6 compared to day 1 (Fig.5a). Thus, on days 3 and 6 following transfer, B cells expressing the VH11, S107, J558 and X24 VH gene families maintain approximately constant numbers. In contrast, the cells expressing other VH-gene families such as VGAM3.8, Q52, J606, 36-60 and 7183, are rapidly lost in the same time period (Fig.5a). The fact that VH gene family representation does not change for most VH gene families between day 3 and day 6, while important alteration occurs in the first three days following transfer, show that the selection process occurs early after transfer.

In these experiments, we have also noticed that donor LPSr cells were detectable in the host spleen, but in very low numbers at day one after transfer. Their numbers, however, increase approximately 40 fold in the initial 2 weeks after transfer, and as observed in the host peritoneum, decrease rapidly thereafter (Fig.4). Whether these donor B cells expand locally in the spleen or accumulate by continuous migration from the peritoneum is not known, but it should be underlined that, if transferred intravenously, donor spleen B cells homing to the host spleen would have rapidly decayed and represent no more than 4 % of the transferred cells after 2 weeks (3). In contrast, after intraperitoneal transfer, nearly 100% of the injected splenic B cell populations can be recovered 2 weeks later from the host's spleen and peritoneum.

In the next experiment we have compared the VH gene family distribution among the donor LPSr B cells recovered from the host's spleen and peritoneum. Similar variation in the VH gene family distribution of LPSr B cells persisting in the peritoneal cavity of the host mice was observed between day 1 and day 10 (Table II and Fig. 5b) compared with the previous experiment (Fig.5a). Since the number of donor B cells homing on day 1 into the spleen after i.p. transfer is so low, that it does not allow for VH gene family analysis, we have just compared the VH gene family usage in the peritoneal cavity and in the spleen of the adult hosts, on day 10 after the transfer (Table II). The results show that the VH gene family distribution

was similar for donor cells recovered in spleen or in peritoneal cavity. By adding the numbers of LPSr B cells expressing a given VH gene family, in the spleen and in the peritoneum of the adult recipient mice on day 10, the VH J606 and 36-60 bearing B cells decrease 2 fold their total numbers compare to day 1, while donor LPSr B cells expressing the VH11, J558, X24 and S107 families are more persistent than others and even increase in total cell numbers in both compartments, as compared to day 1.

Altogether, these results show that the adult peritoneum allows for the persistence and expansion of some donor splenic B cells, and selects them on the basis of their VH gene family expression. This finding, and a similar VH selection process also observed in newborn recipient mice, suggest that the persistence and/or expansion of B cells is due to their selection through their Ig V-regions.

4 Discussion

In this report, we show that the peritoneal cavity of adult recipient mice allows for persistence and expansion of a considerable fraction of adult splenic B cells which would otherwise decay rapidly, if located in their own environment. In addition, the VH gene family repertoire of adult splenic B cells persisting in adoptive recipients changes with time and with host environment. These results therefore show that persistence and/or expansion of adult splenic B cells in adoptive hosts differs according to the VH-gene family expressed, suggesting that B cell kinetics in the peripheral compartments is driven by V-region mediated selection processes. Since the present study involved no conventional immunization, it is likely that our observations relate to "preimmune" repertoire selection, ongoing in normal animals and resulting from interactions with autoantigens or common environmental antigens.

We have previously shown that donor adult splenic LPSr B cells, which would decay rapidly in their own splenic environment (3) are able to expand in the splenic environment of neonatal recipients. Here we report a similar kinetic behavior for splenic B cells transferred into the peritoneal cavity of adult syngeneic recipients. Thus, in contrast to the rapid decay of donor splenic B cells previously observed, in the spleen of adult recipient mice after i.v. cell transfer (1, 15, 3) we show here that donor splenic B cells

persist when transferred in the peritoneal cavity and progressively accumulate in the spleen of the adult recipient mice during the first 2 weeks following transfer. The rapid decrease of the donor B cells in the third week following transfer, may be related to homeostatic processes controlling the absolute number of B cells, as previously discussed (4). The different dynamic behavior of the transferred splenic B cells could be due to: 1) nonspecific local or ontogenic constraints (homing receptors, growth factors, recirculation etc..) or, 2) Ag driven (local autoantigen) specific selection process. We reasoned that the analysis of the VH gene family repertoire of the transferred population in different moments could sort out these possibilities. Thus, in the first case the VH gene family distribution should not be altered, whereas specific changes in repertoire are expected if an ongoing selection process would account for the changes in population dynamics.

The analysis of VH repertoires expressed by donor B cells shows that, in both peritoneum and spleen of adult recipient mice, as well as in the spleen of newborn recipients, the differential persistence of donor B cells depends on their Ig V-regions. Thus, in both kinds of recipient mice the relative representation of the cells using the VH11 and J558 gene families is increased, while that of cells expressing the J606 and 36-60 VH genes diminishes with time after transfer. Selection of the donor splenic B cells however differ in the two kinds of recipients ; while in newborn hosts all donor cells expand, in the peritoneum of adult recipient mice only B cells expressing VH J558, VH11 and X24 gene families increase in numbers. This suggests that in neonatal hosts, both nonspecific and specific processes lead to the expansion of B cell populations, with alterations in repertoires, while in adult peritoneum specific repertoire selection is prevalent. It is interesting to note that, in "their own" splenic environment, LPSr B cells decay rapidly after i.v. transfer, for all VH gene families expressed (Viale, personal communication). The fact that the donor B cells using the D proximal VH gene families do not expand preferentially in neonates, indicates that increased expression of such VH gene families in newborns is not the result of their positive selection in peripheral organs but rather results mechanism improving preferential utilization by precursor cells (17).

These findings suggest that persistence and life spans of B cells are continuously determined by Ig V-region interactions. The idea that the

environment selects B lymphocytes, allowing for differential persistence was also suggested by Klinman and colleagues. These authors reported that while autoreactive B cells from normal or autoimmune NZB mice do not differ for their intrinsic capacity to proliferate, the cellular environment of mice bearing the XID gene in the genetic background of autoimmune NZB is much more efficient compared to the normal XID counterpart to allow the growth and expansion of autoreactive B cells (18, 19). Similar conclusions have been reached by studying B cells responding to polysaccharide antigens which can give rise to Ig secretion in XID or neonatal environments but not in normal recipient (20, 21).

Interestingly, the most efficient selection and expansion observed here concerns B cells expressing the VH11 gene family which accounts for 20% of all adult peritoneal CD5⁺ B cells (22). This finding suggests that a local selection process may explain the higher representation of VH11-B lymphocytes in the peritoneum of normal adult mice (22, 23, 24). In turn, this indicates that life expectancy of particular B cells may be selected, rather than proliferation capacity linked to a B cell subset, as suggested for CD5 B cells. CD5⁺ B cells were indeed described to have particular growth and persistence properties (25, 26). However, while confirming these data (4), we have also shown here that splenic B cells if transferred i.p., show a kinetic behavior that is similar to that of peritoneal B cells (4), highly enriched in CD5⁺ B cells. In this case, we can exclude that the persistence of the donor B cells is only due to CD5 B cells, because these represent only 1-3% of the transferred splenic B cells and we recovered between 30 to 60% of the injected donor B cells, in the recipient's peritoneum. Given that CD5⁺ B cells are particularly abundant in organs that were shown here to select CD5⁻ B cells for longer persistence, our results are compatible with a single differentiation lineage for B lymphocytes. CD5⁺ B cells would then be those that are selected in these environments, and thus acquire particular kinetic properties. Förster and colleagues have observed that donor adult peritoneal B cells expressed a restricted set of V genes, several months after their transfer of into newborn recipient mice and concluded that CD5 B cell repertoire is restricted (27). This restriction is most likely due to a selection process occurring in the recipient mice, rather to the "original" V gene representation in the CD5 B cell subset, which has been demonstrated to show VH gene diversity similar to CD5⁻ B cells.

The persistence of the adult splenic B cells in the recipient mice may be due to resting or dividing cells. It is clear that the selection of the adult splenic B cells in the spleen of the neonate allows the division and expansion of some B cells. This seems also to be the case, at least for VH-11 and J558 donor B cells recovered in adult recipient mice. However, some cells may persist as resting cells, leading to the speculation that selection does not necessarily involve the activation of the cells, and may represent rescue from programmed cell death (2, 28). Whether the accumulation of donor B cells in the adult host spleen results from local division of some clones or from ongoing migration from the peritoneum is not known. However, several indications favour the latter hypothesis. The similar VH gene family distribution observed for donor B cells accumulating in the spleen and persisting in the peritoneum of the same mice (Fig. 3), suggests that these two compartments are at equilibrium and that migration per se is independent of Ig V-regions.

The selection mechanism is still not clear. It has to be dictated by self ligands present in the cellular environment of the neonate or of the adult peritoneum. It is described that multireactive B lymphocytes are particularly abundant in newborn (29, 30, 31) as well as in adult peritoneum (32) but less frequently present in the adult spleen (31). Such cells or their secreted Ig may participate in the selection of the donor B cells or of the newly formed B cells *in vivo*. Finally the selection of the donor B cells may be T cell mediated. It has been shown that B and T cell populations influence each other's repertoires (33). Moreover while the repertoire expressed by B cells is independent of the presence of T cells early after birth, it is T cell dependant compartmentalized in the adult mice, (34, 35, 36).

Altogether our results demonstrate that the life expectancy of B lymphocytes is determined by the local internal environment and results from specific selection of Ig receptor V-regions by "natural ligands" present in the individual. It has previously been shown that the state of activation of B cells in normal mice is dependant upon their interaction with self autoantigens (37, 38, 39). Moreover, persistence of cells result from their previous activation (2). Thus, autoreactive and multireactive B cell populations present in the newborn and in the peritoneal cavity of the adult may be continuously triggered, leading to their selection and persistence. In

contrast, B cells that are not reactive with internal antigens may die rapidly after their production.

Aknowlegments

We thank the Doctors M.A.R. Marcos and F. Huetz for their critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from EEC, DRET, ARC, INSERM, CNRS. V. Thomas-Vaslin was a fellow from Ligue Nationale Française contre le Cancer.

5 References

1. Freitas, A.A. and Coutinho, A., *J. Exp. Med.*, (1981). **154** : 994.
2. Freitas, A.A., Rocha, B. and Coutinho, A., *Immunol. Rev.*, (1986). **91** : 5.
3. Thomas-Vaslin, V. and Freitas, A.A., *Int. Immunol.*, (1989). **1** : 237.
4. Thomas-Vaslin, V. and Freitas, A., *Int. Immunol.*, (1990). **2** : 74.
5. Wu, G.E. and Paige, C.J., *EMBO J.*, (1986). **5** : 3475.
6. Schüppel, R., Wilke, J. and Weiler, E., *Eur. J. Immunol.*, (1987). **17** : 739.
7. Hartman, A.B. and Rudikoff, S., *EMBO J.*, (1984). **3** : 3023.
8. Near, R.F., Juszcyak, E.C., Huang, S.Y., Sicar, S.A., Margolies, M.N. and Geftter, M.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (1984). **81** : 2167.
9. Perlmutter, R.M., Klotz, J.L., Bond, M.W., Nahm, M., Davie, J.M. and Hood, L., *J.Exp.Med.*, (1984). **159** : 179.
10. Yancopoulos, G.D., Desiderio, S.V., Paskind, M., Kearney, J.F., Baltimore, D. and Alt, F.W., *Nature (Lond.)*, (1984). **311** : 727.
11. Winter, E., Radbruch, A. and Krawinkel, U., *EMBO J.*, (1985). **4** : 2861.

12. Reth, M.G., Jackson, S. and Alt, F.W., *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, (1986). **5** : 2131.
13. Reininger, L., Kaushik, A., Izui, S. and Jatou, J.C., *Eur. J. Immunol.*, (1988). **18** : 1521.
14. Feinberg, A.P. and Vogelstein, B., *Anal. Biochemistry*, (1983). **132** : 6.
15. Freitas, A.A., Rocha, B. and Coutinho, A., *J. Immunol.*, (1986). **136** : 466.
16. Freitas, A.A., Rocha, B. and Coutinho, A., *J. Immunol.*, (1986). **136** : 470.
17. Freitas, A.A., Andrade, L., Lembezat, M.P. and Coutinho, A., *Int.Immunol.*, (1990). **2** : 15.
18. Klinman, D.M. and Steinberg, A.D., *J. Immunol.*, (1987). **139** : 2284.
19. Klinman, D.M., Ishigatsubo, Y. and Steinberg, A.D., *Cell.Immunol.*, (1988). **117** : 360.
20. Bösing-Schneider, R., Selinka, H.C. and Lehle, G., *Eur. J. Immunol.*, (1986). **16** : 1401.
21. Bösing-Schneider, R. and Selinka, H.C., *Eur. J. Immunol.*, (1987). **17** : 1531.
22. Andrade, L., Freitas, A.A., Huetz, F., Poncet, P. and Coutinho, A., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 1117.
23. Pennell, A.C., Mercolino, T.J., Grdina, T.A., Arnold, L.W., Haughton, G. and Clarke, S.H., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 1289.
24. Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Riblet, R.J. and Hayakawa, K., *J. Immunol.*, (1989). **142** : 3643.
25. Hayakawa, K., Hardy, R.R., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A., *J. Exp. Med.*, (1985). **161** : 1554.
26. Förster, I. and Rajewsky, K., *Eur. J. Immunol.*, (1987). **17** : 521.
27. Förster, I., Gu, H. and Rajewsky, K., *EMBO J.*, (1988). **7** : 3693.

28. Coutinho, A., in *1989 Yakult International Symposium "Frontiers in Immunology"* (Yakult Honsha Co.Ltd., Tokyo, 1990), pp. 7.
29. Holmberg, D., Forsgren, S., Ivars, F. and Coutinho, A., *Eur. J. Immunol.*, (1984). **14** : 435.
30. Holmberg, D., Wennerström, G., Andrade, L. and Coutinho, A., *Eur. J. Immunol.*, (1986). **16** : 82.
31. Holmberg, D., Freitas, A., Portnoi, D., Jacquemart, F., Avrameas, S. and Coutinho, A., *Immunol. Rev.*, (1986). **93** : 147.
32. Lalor, P.A. and Morahan, G., *Eur.J.Immunol.*, (1990). **20** : 485.
33. Martinez-A., C., Toribio, M.L., Pereira, P., Marcos, M.A.R., Bandeira, A., De la Hera, A., Marquez, C., Cazenave, P.-. and Coutinho, A., *Immunol. Rev.*, (1988). **101** : 191.
34. Freitas, A.A., Lembezat, M.P. and Rocha, B., *Int. Immunol.*, (1989). **1** : 398.
35. Freitas, A.A., Lembezat, M.P. and Coutinho, A., *Int. Immunol.*, (1989). **1** : 342.
36. Huetz, F., Poncet, P., Coutinho, A. and Portnoi, D., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 1195.
37. Portnoi, D., Freitas, A., Bandeira, A., Holmberg, D. and Coutinho, A., *J. Exp. Med.*, (1986). **164** : 25.
38. Portnoi, D., Lundkvist, I. and Coutinho, A., *Eur. J. Immunol.*, (1988). **18** : 571.
39. Pena Rossi, C., Pereira, P., Portnoi, D. and Coutinho, A., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 1941.

Figures legends

Figure 1: Sheme of the experimental protocol.

Figure 2: Typical autoradiographs obtained from clonable B cells harvested from the donor B6.Igh^a or from the B10Cr recipient mice. The filters were hybridized with a C μ specific probe. The cloning efficiencies were 1/6 for the donor cells and less than 1/10⁵ amongst the cells from the recipient mice .

Figure 3 : B6.Igh^a adult splenic B cells were recovered in the spleen of newborn recipient mice on day 1 and 9 after the cell transfer and VH gene family expression analysed. See also legend of Table I. Results are expressed as index of expansion on day 9 compare to day 1. 373 and 490 clones were examined respectively.

Figure 4 : Kinetic behavior of adult splenic B cells upon their transfer into the peritoneal cavity of adult recipient mice. 5 x10⁶ total spleen cells from B6.Igh^a adult mice were transferred i.p. into intact B10Cr adult recipient mice. Spleen and peritoneal cells were removed from 2-3 recipient mice, pooled and cultured in LDA, at different days after the cell transfer. The numbers of LPSr cells recovered in two independant cell transfers are plotted and the mean behavior of the donor B cells in the peritoneal cavity (\square) and in the spleen (\blacksquare) of the recipient is traced.

Figure 5a : Evolution of the VH repertoire of the donor LPSr B cells from adult B6.Igh^a donor mice after i.p. injection of 5x10⁶ spleen cells, recovered in the peritoneum of adult B10.Cr recipient mice. The VH gene family distribution was analysed on day 1, 3, 6 in the same cell transfer experiment. The number of clones analysed was between 270 and 300. The results are expressed as the index of expansion for cells expressing each VH gene family as compared to day 1 values.

Figure 5b : Expression of the expansion index of cells expressing each VH gene family on day 10 as compared to day 1, in the same experiment as shown in Table II. 273 and 472 clones were examined respectively.

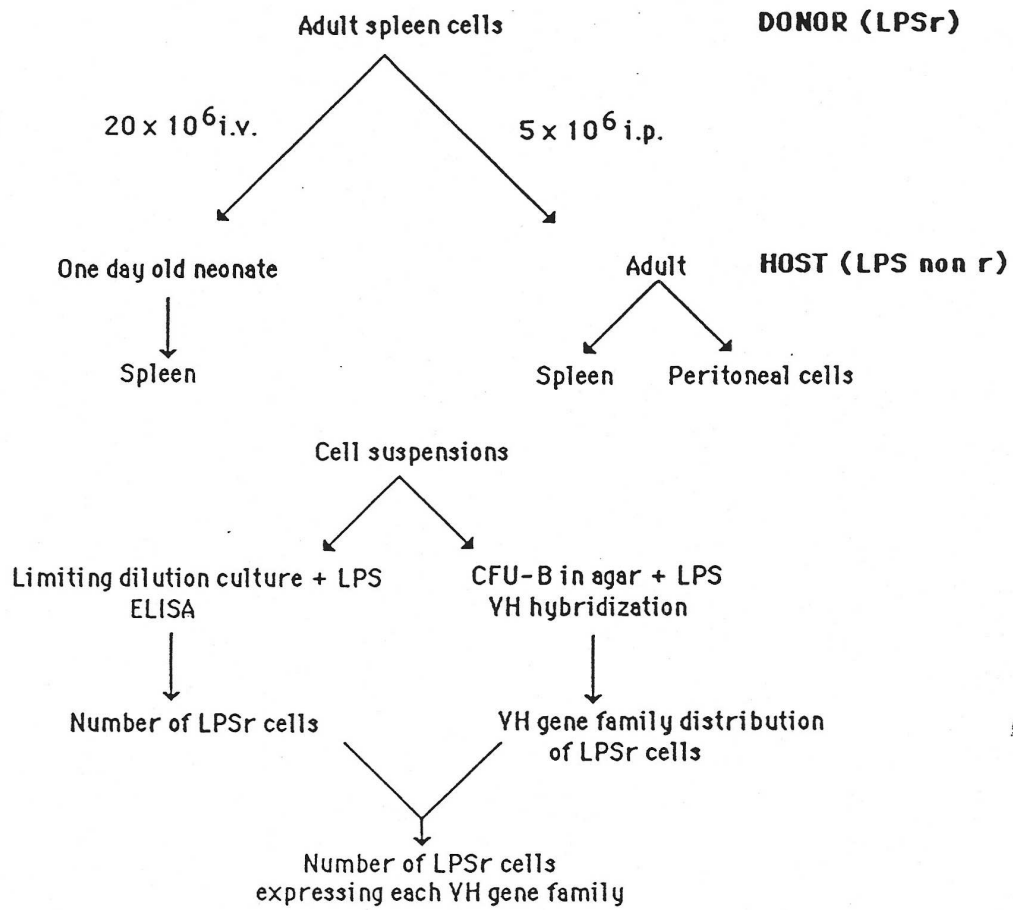
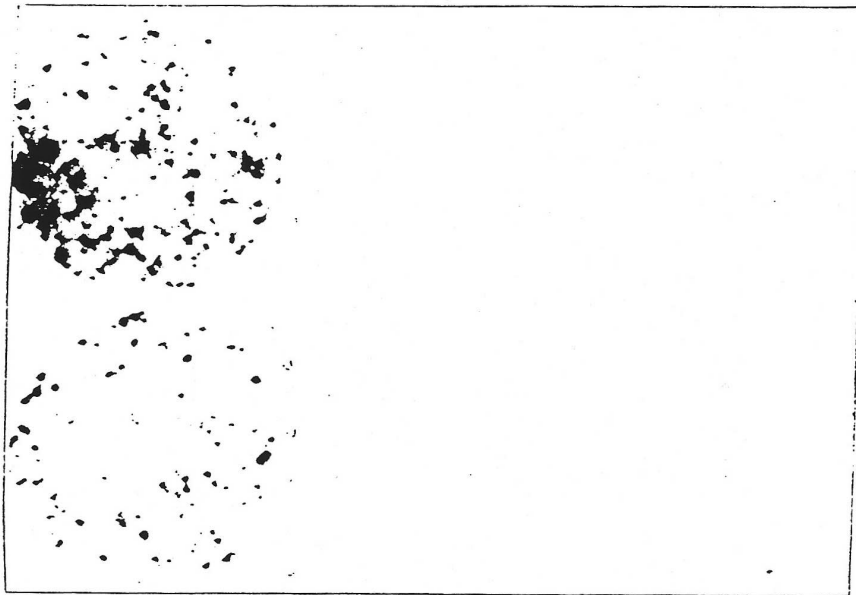
Experimental protocol

fig 1.

B6 Igh^a

B10 ScCr



Cμ

fig 2

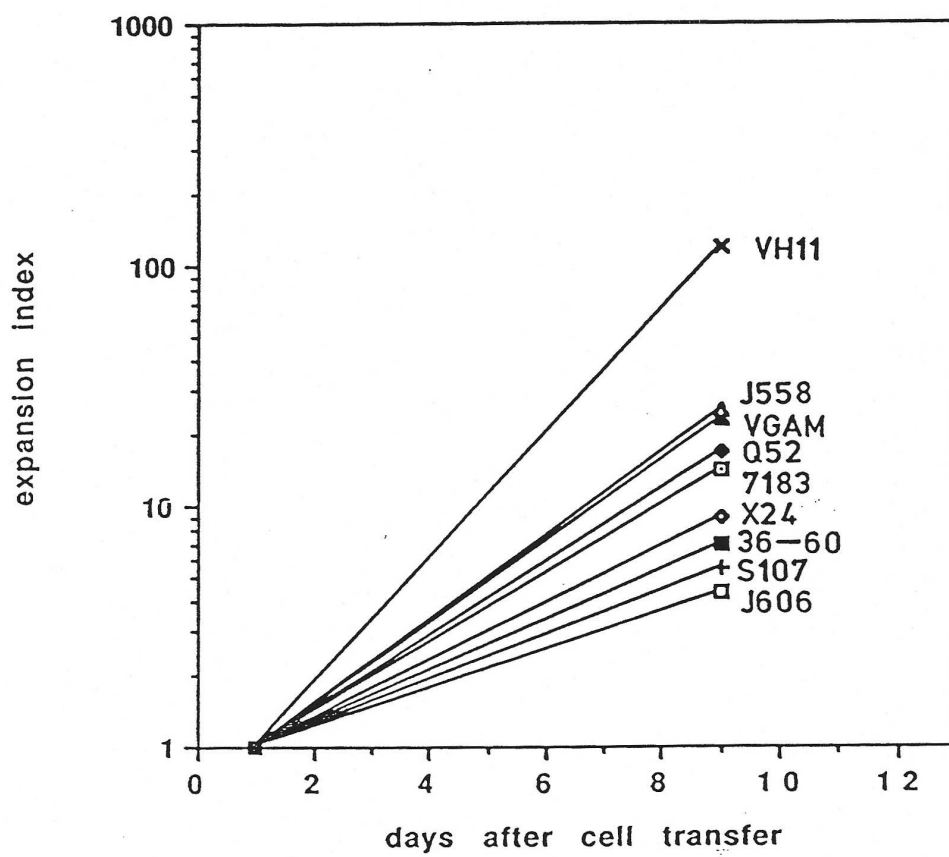


fig 3

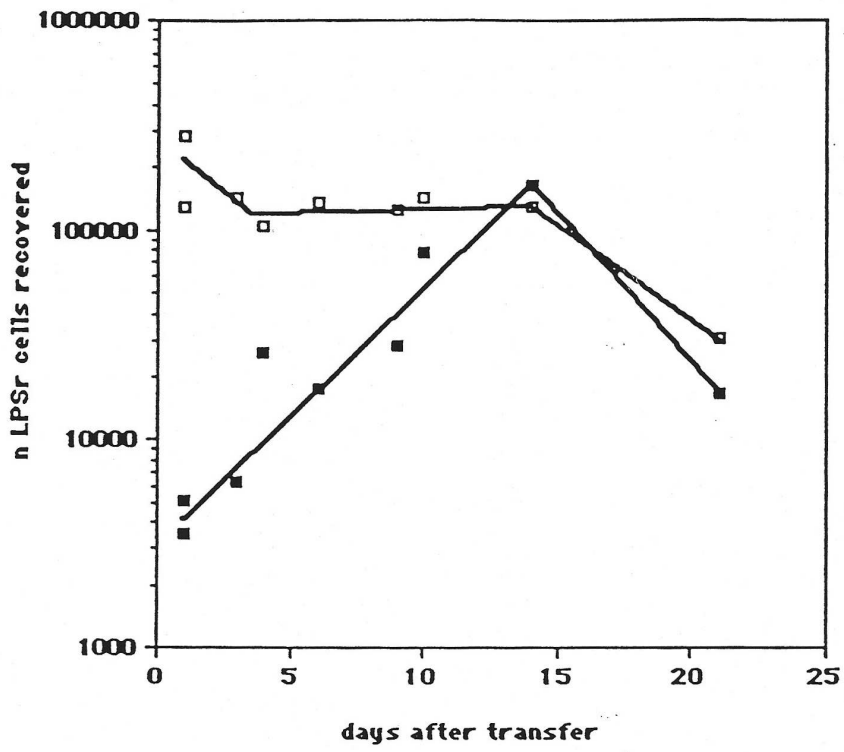


fig 4

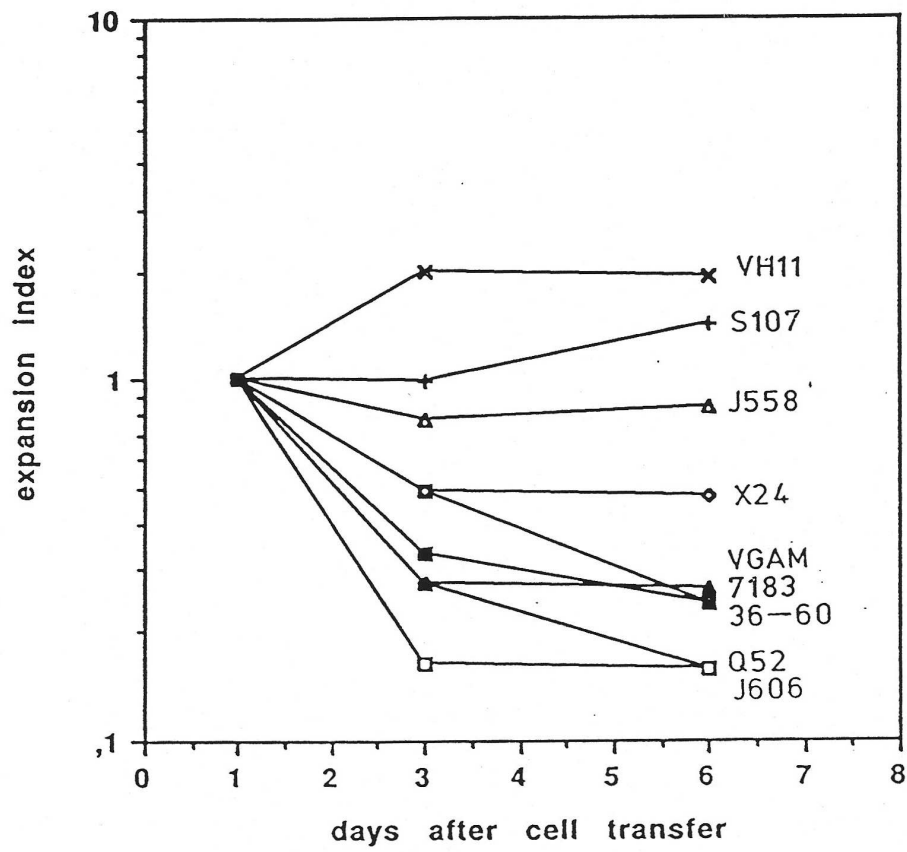


fig 5a

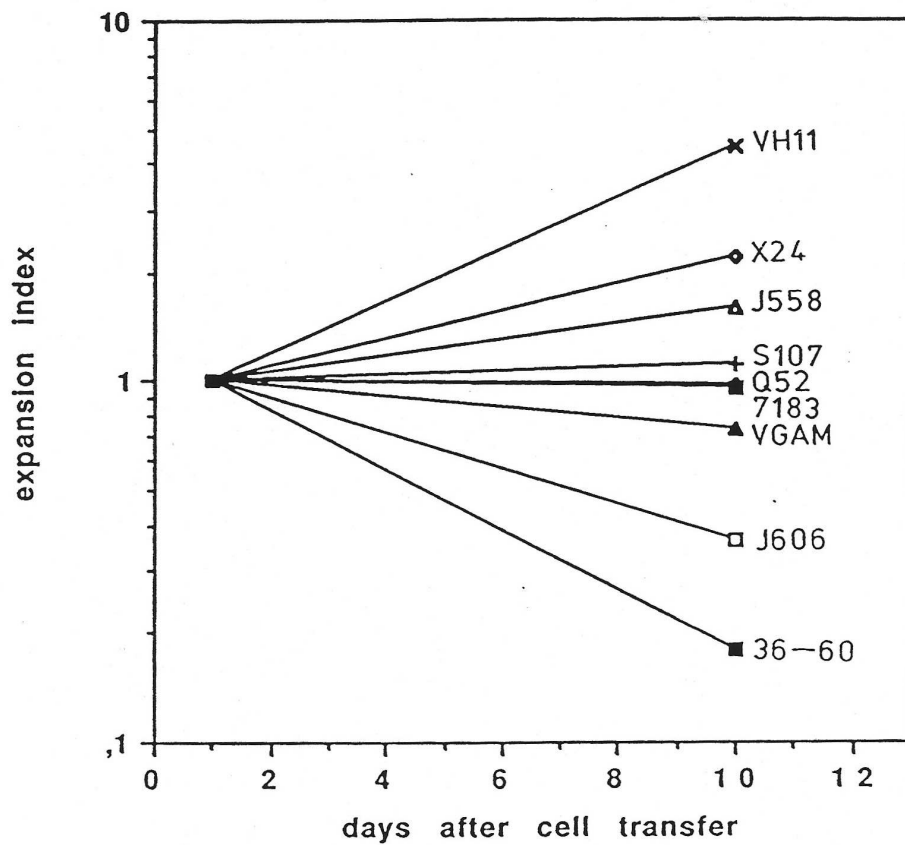


fig 5b

Number of donor B cells expressing each VH gene family										
days after cell transfer	LPSr cells a)	7183	Q52	S107	X24	36-60	J606	VGAM3.8	J558	VH11
day 0		(10) ^{b)}	(11)	(3)	(6)	(6)	(5)	(10)	(46)	(1)
day 1	32625	3269 ^{c)}	5230	1046	1307	2615	2615	3269	13076	98
		(10)	(16)	(3,2)	(4)	(8)	(8)	(10)	(40)	(0,3)
day 9	571661	23333	87499	5833	11666	17499	11666	75833	326666	11666
		(4)	(15)	(1)	(2)	(3)	(2)	(13)	(56)	(2)

Table I : Number of donor LPSr B cells recovered in the spleen on day 1 and 9 after the i.v. cell transfer of 20×10^6 spleen cells from adult B6.Igha donor mice into one day old recipient B10.Cr. a) total number of LPSr cells recovered, as estimated by LDA. Spleen cells of 2 mice were pooled for the analysis. b) percentage of relative distribution of VH gene families in the donor cell inoculum c) Number of LPSr cells in each VH gene family screened. (percentage of relative distribution) A total of 700, 373 and 490 clones were screened respectively on day 0, 1 and 9, for VH gene family expression.

Number of donor B cells expressing each VH gene family										
days after cell transfer	LPSr cells a)	7183	Q52	S107	X24	36-60	J606	VGAM3.8	J558	VH11
day 0		(10) ^{b)}	(11)	(3)	(6)	(6)	(5)	(10)	(46)	(1)
Per Cav day 1	129310	10345 ^{c)}	23276	1293	2586	7759	15517	11638	51724	647
		(8)	(18)	(1)	(2)	(6)	(12)	(9)	(40)	(0,5)
day 10	142857	9942	22724	1420	5681	1420	5681	8522	80956	2841
		(7)	(16)	(1)	(4)	(1)	(4)	(6)	(57)	(2)
Spleen day 10	63700	4459	4459	637	2548	2548	3822	2548	35035	1274
		(7)	(7)	(1)	(4)	(4)	(6)	(4)	(55)	(2)

Table II : Number of donor LPSr B cells recovered in the peritoneal cavity or in the spleen of B10CR adult recipient mice on day 1 or 10 after the i.p. injection of 5×10^6 spleen cells from B6.IgH^a mice. a) total number of LPSr cells recovered, as estimated by LDA. The total number of LPSr cells recovered on day one in the spleen of the recipient mice was 373, and do not allow the VH gene family analysis, since their frequency was too low. Spleen or peritoneal cells of 2 to 3 mice were pooled for the analysis. b) relative distribution of each VH gene family in the cell inoculum c) number of LPSr cells in each VH gene family screened (percentage of relative distribution),

PUBLICATION V

**Origin of natural IgM secreting cells :
Reconstitution potential of adult bone
marrow, spleen and peritoneal cells**

Soumis à publication

**ORIGIN OF NATURAL IGM SECRETING CELLS : RECONSTITUTION
POTENTIAL OF ADULT BONE MARROW, SPLEEN AND PERITONEAL
CELLS**

by

Véronique Thomas-Vaslin and François Huetz

Laboratory of Immunobiology, Pasteur Institute, France

Correspondance to : Véronique Thomas-Vaslin, Unité d'Immunobiologie,
Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Abbreviations : FCS: foetal calf serum, BSS : balanced salt solution, PE :
phycoerythrine, FITC : Fluoresceine isothiocyanate, IBMP :irradiated bone
marrow protected, SPL : spleen, PER : peritoneal, BM : bone marrow.

The work was supported by grants from EEC, CNRS, DRET, ARC and
INSERM. V. Thomas-Vaslin was a recipient from a fellowship from Ligue
Nationale contre le Cancer.

Summary

Natural IgM secretion was mainly attributed to CD5⁺ B cells, highly enriched in the peritoneum. We have now compared the capacity of peritoneal, or splenic cells from normal adult donor mice to give rise to natural IgM secreting cells after i.v. transfer into allotypic congenic bone marrow protected and irradiated recipient mice. Although both cell populations allow long term chimerism as revealed by the presence of donor IgM secreting cells in the spleen and IgM of donor allotype in the serum of the recipients, donor spleen cells are more efficient. In both cases, endogenous IgM secretion recovered levels similar to normal control mice. Since reconstitution of the recipients may occur by rare hematopoietic cells present in the donor spleen cell inoculum rather than to the persistence of mature B cells, we also investigated the capacity of Ig⁻ bone marrow cells (Ig⁻BM) to reconstitute natural IgM secreting cells in whole body irradiated mice. These cells were found to allow the most efficient reconstitution of donor IgM secreting cells. In such Ig⁻BM chimeras the number of host IgM secreting cells was highly reduced compare to the non transferred irradiated self reconstituting mice. In order to analyse more precisely the discrepancies between the different cell transfers, the phenotype of B cells (IgM, CD5) present in spleen and in peritoneum of recipient mice was analysed. Donor spleen and Ig⁻ BM cells reconstitute a percentage of donor B cells in the spleen and in the peritoneum comparable to those of normal mice, in agreement with the high level of IgM secreting cells observed. In constrast, the donor peritoneal cells reconstitute very poorly the B cells in recipient spleen cell compartment. Comparison of the percentage of IgM secreting cells among the IgM⁺ cells of the same allotype, suggest that normal levels of IgM are kept even when the number of B cells present in the animal is very limited. Our results also show that Ig⁻BM cells as well as spleen or peritoneal donor cells give rise to the reconstitution of CD5⁺B cells in the peritoneum of the recipient mice.

1. INTRODUCTION

In Ag-free as well as in normal mice, autonomous activation of the immune system occurs (1, 2,3), most likely driven by interactions between its elements, and other self molecules, in a connected network (4, 5, 6). Natural B cell activation leads essentially to IgM secretion, and these secreting cells have been found to react against external but also self components (7, 8). Most of these autoreactive and often multireactive cells are available in the repertoire of peripheral adult B cells and are activated (9) and some of them differentiate into IgM plasmocytes (10, 8). B cells from any compartment or subpopulations, therefore, if naturally selected should produce IgM. This implies the presence of a selection process which depends of the autoreactive repertoire of the cell population considered and on the cellular environment allowing activation.

A subset of B lymphocytes bearing the CD5 marker, present among naturally activated cells, is often thought to be responsible of the production of most natural IgM in normal mice (11). Thus, it was previously found that the transfer of peritoneal B cells, which are enriched in CD5⁺ B cells, into neonatal recipient mice, leads to the predominance of IgM donor allotype in the recipient (12). The emergence of natural IgM-secreting cells after bone marrow cell transfer, however has not been directly investigated.

We compared here the capacity of spleen, peritoneal, and bone marrow Ig⁻ cells to produce natural IgM antibodies upon their i.v. transfer into sublethally, allotype congenic irradiated recipient mice. In the case of spleen and peritoneal cell transfers, the recipients were bone marrow protected during irradiation. Donor and host IgM secreting cells were scored in the spleen and levels of IgM allotypes quantitated in the sera of the recipient mice, various times thereafter. We have found that spleen cells and bone marrow Ig⁻ donor cells are much more efficient to maintain long term reconstituting natural IgM secretion than B cells derived from the peritoneal cavity. The phenotypic analysis of the donor and host B cells was also performed. Spleen or Ig⁻ bone marrow cells also reconstitute B cell populations in recipients, while peritoneal B cells are much less efficient.

Cellular analysis of cells in the peritoneal cavity of recipient mice show that CD5⁺, IgM^{high} or CD5⁻ IgM^{high} cells of donor allotype are present among the population of large cells, independantly of the kind of cells transferred. Transfers of spleen or Ig⁻ bone marrow cells, compete with host B cell reconstitution suggesting a "feedback" regulation process.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Mice and cell transfers

C57Bl/6 (B6)(Igh^b) and congenic C57Bl/6.Igh^a (B6.Igh^a) mice, were bred in our facilities at the Pasteur Institute. Mice were used between 3-5 months of age.

Adult B6 recipient mice were irradiated 24 h before cell transfers, with 500 rads delivered by a ¹³⁵Cesium source. In the case of spleen or peritoneal cell transfers, the two femurs of the mice were protected with a 4 mm thick lead plaque, under Avertin anesthesia. For bone marrow cell transfers, total body irradiation with 600 rads was performed. This irradiation dose was however not lethal as non transferred control mice reconstituted and survived.

Spleen (SP) cell suspensions were prepared in cold BSS and peritoneal cells (PER) were removed by washing the peritoneal cavity with 10 ml of cold BSS containing 1% FCS. Around 90% of the volume injected could be recovered, allowing for the precise count of nucleated cells in the peritoneum. Bone marrow cells were obtained by flushing the femurs with BSS containing 1% FCS. Cells were washed 2 times in cold BSS before use.

Total spleen or peritoneal cells ($8,5 \times 10^6$) or bone marrow Ig⁻ cells (20×10^6) from adult B6.Igh^a mice, were injected (in a 0,2 ml volume of PBS) into irradiated B6 recipients. These numbers of injected cells were chosen according to preliminary experiments. The injections were done i.v., in the retro-orbital sinus. At different times after cell transfer, three mice per group were bled, sacrificed, and the spleen and peritoneal cells removed for analysis.

2.2 Depletion of Ig⁺ cells in the donor bone marrow cells

Bone marrow cells were depleted of Ig⁺ cells by panning of 10⁷ bone marrow cells, for 1 hour at 4°C, on Petri dishes previously coated with affinity purified sheep anti-mouse Ig antibodies at 50µg/ml. Non-adherent cells were removed by gentle pipeting of the supernatant. Control of purification was performed by FACS analysis after staining with anti-IgM^a and anti-CD5 monoclonal antibodies (see 2.5).

2.3 Detection of IgM secreting cells

Cellular secretion of IgM of the Igha (IgM^a) or Igh^b(IgM^b) allotypes was assayed by a modification (13) of Sedgwick and Holt's ELISA-Spot technique (14). ELISA plates were coated overnight with either 5 µg/ml of RS3-1 (anti-IgM^a) (15) or MB86 (anti-IgM^b) monoclonal antibodies (16). After 30 minutes of saturation with PBS containing 1 % BSA, each cell suspension was titrated, in duplicates, and incubated for 3 to 5 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Then, cells were removed by flicking the plates and extensively washed in PBS containing 0.05 % Tween 20. Then biotin-conjugated anti-IgM antibodies was added for 1 h and the plates washed again, incubated with avidine-coupled alkaline phosphatase during one h, and extensively washed. Finally, blue spots were revealed after 2 h incubation with the bromo-chloro-indolyl-phosphate substrate diluted in aminopropranol buffer and supplemented with agarose low melting.

2.4 Determination of serum IgM concentrations

Mice were bled from the retro-orbital sinus. Each sera was tested in duplicate for the concentration of IgM of Igh^a and Igh^b allotype by an ELISA inhibition test. Dilutions of each sera were incubated in saturated V plates for 1 h at 37°C together with a fixed concentration (0,1 µg/ml) of MB 86 or RS 3-1 antibodies coupled to biotin. The supernatants were then transferred to ELISA plates previously coated with 5 µg/ml of purified monoclonal IgM proteins B1.8 (µ^b, λ₁) or MOPC 104E (µ^a, λ₁) and saturated with PBS gelatine 1%. After overnight incubation at 4°C, the plates were washed with PBS and avidine-conjugated horse raddish peroxydase was added for 1 h at 37°C. Finally peroxydase substrate, (orthophenylenediamine and H₂O₂) were added (100 µl/ wells) for 20 min and the reaction stopped by the addition of 10% sodium dodecyl sulfate (50 µl). Optical densities were read on a Titertek

multiscan at 450 nm wave-length. Four "references" (without inhibitor), 4 replicate "blanks" (no coating) were added in each plate tested and the percentages of inhibition for each serum dilution on IgM^a and IgM^b mAb were calculated as :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{1 - (\text{mean OD at each sera dilution} - \text{mean blank})}{\text{mean reference} - \text{mean blank}} \times 100$$

Percentage of inhibition obtained with sera were compared with those obtained with known concentrations of B1.8 or MOPC104E monoclonal IgM. The titer of each sera was expressed in $\mu\text{g/ml}$ equivalent monoclonal antibodies of the standard IgM^b or IgM^a

2.5 FACS analysis

Cell concentration in all samples was adjusted to $20 \times 10^6/\text{ml}$ and the suspension kept with fluorescein isothiocyanate-labeled mouse RS-3.1 or MB86 monoclonal antibodies, and biotin-coupled rat IgG2a anti-Ly1 (CD5) 53-7.3 (17) (final concentration $20 \mu\text{g/ml}$) for 15 minutes on ice. The cells were then washed three times in BSS supplemented with 3% FCS and incubated for 15 minutes with streptavidin-coupled phycoerythrin (Becton Dickinson, Mountain View, CA). After washing, the cells were suspended at $2 \times 10^6/\text{ml}$ and analysed on a FACSCAN. All analyses were carried out on a Hewlett Packard computer (HP900) using Consort 30 program (Becton Dickinson).

3. RESULTS

3.1 Origin natural IgM secreting cells

3.1.1 Reconstitution of adult irradiated mice by allotype spleen and peritoneal congenic cells

The numbers of IgM-secreting cells of donor and host origin were assayed in the spleen of B6 irradiated and bone marrow protected mice (IBMP) (Table I), at 2 weeks and 3 months after the transfer of 8.5×10^6 SP or PER cells from B6.Igha donors. The sera of the chimeras were also titrated in inhibition assays to evaluate the concentration of the IgM^a and IgM^b (Table II). The results show that early after the cell transfer, donor PER cells are more efficient than SPL cells as a source of IgM secreting cells, and seric IgM. Late after transfer, however, PER cell chimeras did not maintain high levels of donor IgM production, while the recipients of SPL cells actually increased donor IgM production. Consequently, the levels of chimerism increase with time after SPL cell transfer, while it decreases after PER cell transfer. It is of interest to notice that in both types of chimeras, the levels of IgM-secreting cells and seric IgM of host allotype are similar to those of IBMP control mice.

These results show that B cells from either spleen or peritoneum have roughly the same potential to give rise to natural IgM secreting cells upon transfer to irradiated recipients reconstituted with autologous bone marrow. Moreover, either cell population seems not to compete with the differentiation of IgM secreting host cells.

3.1.2 Reconstitution of irradiated mice by bone marrow Ig-cells.

Natural IgM production by donor PER and SPL cells could be attributed to the persistence and activation of mature B cells, or else to establishment of hematopoietic precursors chimerism upon transfer of rare stem cells present in the donor inoculum. We proceeded, therefore to evaluate the potential of Ig⁻ precursor cells in regenerating natural IgM secretion. Bone marrow Ig⁻ cells (20×10^6) from B6.Igha donors were transferred into irradiated non protected B6 mice. FACS analyses of the inoculum showed that less than 0.2% of purified bone marrow cell population used in the transfer was IgM⁺ (Fig.1).

As shown in Table III, 3 and 5 months after the transfer, the levels of IgM-secreting cells of donor origin in the spleen of recipients was particularly high, while the number of secreting cells of host origin was decreased as compared to control auto-reconstituted mice. Accordingly, seric concentrations of donor derived IgM^a, was as high as in donor control mice, while IgM^b host concentration were much lower than in control irradiated mice, let reconstitute from autologous bone marrow. Five months after transfer, the discrepancy between donor and endogenous reconstitution was even more marked, with more than 90% chimerism. Furthermore, the levels of seric IgM and IgM secreting-cells of host origin represent, 2-8% of the values found in irradiated control mice, that received no bone marrow transfer.

These results demonstrate that bone marrow Ig⁻ precursors cells differentiate in sublethally irradiated recipient mice and give rise to natural IgM producing cells. Furthermore, transferred precursor cells seem to prevent the regeneration by host bone marrow cells and, with time, donor cells occupy essentially all the functional B cell compartment. It seemed important, therefore, to investigate whether the discrepancy between the transfer of bone marrow precursors *versus* spleen or peritoneal B cells was also observed for B lymphocyte populations other than plasmocytes, and whether they may result from the different irradiation protocols employed. The presence and phenotype of donor and host B cells was, therefore analysed by cytofluorometry in the spleen and peritoneum of those chimeras.

3.2. Splenic and peritoneal B cell origin in allotype chimeras.

Three months after the transfer of PER, SPL cells or bone marrow Ig⁻ donor cells, the peritoneal and spleen cell compartments of recipient mice were analysed by flow cytometry using double staining with anti-IgM^a or anti-IgM^b and anti-CD5 antibodies. The results show (Fig.2) that the splenic B cell compartment is well reconstituted in control IBMP mice. This is also the case in B6 mice given 600 rads without bone marrow shielding (not shown). In autologous bone marrow or spleen cell chimeras, donor allotype B cells account for most or essentially all the splenic B cell compartment. In contrast, in similar chimeras produced by peritoneal cell transfers, the splenic B cell compartment is essentially all reconstituted by host allotype

bearing cells (Fig.2). This finding suggest that the decrease IgM secretion of host origin after BM transfer was not due to the inhibition of the cells to secrete but rather to the absence of their reconstitution.

Cellular analysis of the peritoneal cavity in the same animals (Fig.3) revealed the IgM^{low} and IgM^{high} B cell populations previously described in normal mice (18). The latter population is found to be particularly abundant among large peritoneal cells. By gating these "large" peritoneal cells, we could analyse and precisely quantitate such cells (Fig.4). They are distributed in two distinct subpopulations : one is IgM⁺, CD5⁺; the other is IgM⁺, CD5⁻. These two subsets may correspond respectively to Ly-1⁺ B cells, since the density of the CD5 marker is 10 times lower than in T cells (19), and to the "sister" (CD5⁻) B cell populations previously described (20, 21). A third population which is IgM^{low} may correspond to "conventionnal" B cells. As exemplified in Figures 3, 4 and resumed in Table V, spleen and bone marrow Ig⁻ cells reconstitute both IgM^{high} cell populations and IgM^{low} population, leading to a percentage of "sister" and "conventionnal" B cell populations, close respectively to 20 and 30% and to CD5⁺ B cells with a percentage of 5-8%. These donor derived B cells prevent the reconstitution of the corresponding host cell population. Donor peritoneal cells while reconstituting two times less (9,7%) the IgM^{high} CD5⁻ B cell population give rise to CD5⁺ B cells at levels similar to spleen and bone marrow donor cells (6,0%). In contrast to bone marrow or spleen cells, the peritoneal cells transfer does not prevent endogenous reconstitution of peritoneal cells, as previously observed in the spleen cell compartment.

4.DISCUSSION

If recovery of B cells after transplantation of various cell progenitors has been well described (22), the phenotype and functional activity of the donor and host B cells is however far less understood. In this study, we have investigated the capacity of spleen and peritoneal cells to reconstitute B cell populations and to undergo natural activation in IBMP mice and we furthermore investigated the capacity of Ig⁻BM cells to reconstitute whole body irradiated mice. These conditions, cell numbers, irradiation, way of cell injection, were found to allow the best engraftment of donor cells. The present results show that donor Ig⁻BM cells and in less extent SPL cells, reconstitute the number of splenic B cells in the host to levels comparable to those of normal mice. Donor SPL cells are also able to reconstitute IgM^{low} and IgM^{high} cells populations in the host peritoneum and to participate to the production of natural IgM, as detected respectively in the spleen or in the sera of the recipient mice, at least from 2 weeks to several months after transfer. In contrast, PER cells reconstitute very poorly the splenic B cells in IBMP recipients. Thus, the number of donor IgM⁺ cells was 100 times lower than in mice reconstituted with SPL or BM cells, while the number of donor IgM secreting cells however, was reduced of only 10 times and the level of seric IgM reduced only 3 times. These findings suggest that most of the donor peritoneal cells present in the spleen of the recipient mice are naturally activated, and differentiate into terminal IgM secreting cells. The important proportion of activated B cells derived from donor peritoneal cells compare to other donor cells, early after transfer, may be due to the fact that the donor peritoneal cells contain a large proportion of CD5⁺ B cells (23) cells which are already highly selected by self antigen and are activated to secrete when transferred in irradiated recipients. In contrast, spleen cells or bone marrow virgin B cells may be less frequently selected, in accordance with their higher turnover (24). Reconstitution of IgM^{low} and IgM^{high} B cells in the host peritoneal cell compartment was also lower after transfer of PER cells than BM or SPL cells.

Host B cell reconstitution is higher after PER cell transfer, where the engraftment of donor cells was low, while after SPL cells transfer, the reconstitution of host B cells was low. These differences in host cell reconstitution are only due to the differences in the donor cell populations injected, since the protocols of irradiation and cell numbers injected were

similar. As we underlined in the results, although the number of B cells of host allotype was reduced of 85 to 92% compared to control IBMP mice, after SPL cell transfer, the number of host IgM secreting cells and seric IgM was kept to levels similar to those of normal mice. This observation is compatible with the high level of activation of donor PER B cells, previously discussed. Thus, by calculating the percentage of IgM-secreting cells among the IgM⁺ cells present in the spleen of the different mice, we found that around 5% of donor B cells recovered in the spleen of PER cells reconstituted recipient mice are IgM secreting cells and 1,9% or 27% of host B cells after respectively transfer of SPL or Ig⁻BM cells, versus 0,5% of B cells in normal mice or for other cells populations in chimeras. These findings show that independently of the number of donor B cells present in the recipient, the proportion of IgM secreting cells either from donor or host origin is maintained to a level close to those of normal mice.

The differences in chimerism 2 weeks and 3 months after SPL or PER cells transfer, are in accordance with the kinetics of persistence of these populations in adoptive hosts. Thus, it has previously been shown that while splenic B cells decrease rapidly their numbers in the 2 weeks following their i.v. transfer (24; 13), in contrast, peritoneal donor B cells expand during this period (25). Later on, some precursors cells present in the splenic inoculum colonize the irradiated recipient and mature in B cells, while peritoneal B cells which seems to not contain such precursors cells (25), decrease their number. Thus, competition between stem cells present in donor SPL cells and in the protected recipient mice may occur, and prevent the expansion of the host cells, while donor PER cells do not. Alternatively, the high level of donor IgM present early after PER cells transfer, may prevent the differentiation of host B cells, as a feedback regulation. Such regulation has been described by others concerning CD5⁺ B cells but seems to not require soluble IgM (26). It has recently been shown that seric Ig from normal mice regulate the number of bone marrow pre-B and B cells as well as the activation of the peripheral lymphocytes (27, Sundblad et al. submitted for publication). Moreover autobinding properties of some IgM secreted by CD5⁺ B cells (28) suggest that in normal mice the seric IgM may regulate the renewal and/or activation of CD5⁺ B cells.

Since the level of total IgM (IgM^a+ IgM^b) was higher in the chimeras than in IBMP mice, we have controlled that the activation of the donor and host cells, was not due to allotypic interaction between host and donor B cells.

REFERENCES

1. Hooijkaas, H., Benner, R., Pleasants, J.R. and Westmann, B.S., *Eur J Immunol.*, (1984). 14 : 1127.
2. Pereira, P., Forni, L., Larsson, E.L., Cooper, M.D., Heusser, C. and Coutinho, A., *Eur. J. Immunol.*, (1986). 16 : 685.
3. Bos, N.A., Meeuwssen, C.G., Van Wijngaarden, P. and Benner, R., *Eur. J. Immunol.*, (1989). 19 : 1817.
4. Coutinho, A., Andersson, A., Sundblad, A., Lundkvist, I., Holmberg, D., Arala-Chaves, M., Stewart, J. and Varela, F., in *Idiotypic networks in Biology and Medicine* Osterhaus, A.D. and Uytdehaag, F.G., Eds. (Excerpta Medica, Amsterdam, 1990), pp. 59.
5. Coutinho, A., in *Workshop on Tolerance. Mechanisms and Implications.* (Fundacion Juan March, Serie Universitaria, 1989), pp. 53.
6. Coutinho, A., in *1989 Yakult International Symposium "Frontiers in Immunology"* (Yakult Honsha Co.Ltd., Tokyo, 1990), pp. 7.
7. Holmberg, D., Freitas, A., Portnoï, D., Jacquemart, F., Avrameas, S. and Coutinho, A., *Immunol. Rev.*, (1986). 93 : 147.
8. Bos, N.A., Meeuwssen, C.G., Westmann, B.S., Pleasants, J.R. and Benner, R., *Cell.Immunol.*, (1988). 112 : 371.
9. Portnoï, D., Freitas, A., Bandeira, A., Holmberg, D. and Coutinho, A., *J. Exp. Med.*, (1986). 164 : 25.
10. Benner, R., Rijnbeek, A.M., Bernabé, R.R., Martinez-A., C. and Coutinho, A., *Immunobiology*, (1981). 158 : 225.
11. Hayakawa, K., Hardy, R.R., Honda, M., Herzenberg, L.A., Steinberg, A.D. and Herzenberg, L.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1984). 81 : 2494.
12. Förster, I. and Rajewsky, K., *Eur. J. Immunol.*, (1987). 17 : 521.
13. Thomas-Vaslin, V. and Freitas, A.A., *Int. Immunol.*, (1989). 1 : 237.
14. Sedgwick, D.J. and Holt, P.G., *J. Immunol. methods*, (1983). 57 : 301.
15. Schüppel, R., Wilke, J. and Weiller, E., *Eur. J. Immunol.*, (1987). 17 : 739.
16. Nishikawa, S.I., Sasaki, Y., Kina, T., Amagai, T. and Katsura, Y., *Immunogenetics*, (1986). 23 : 137.
17. Ledbetter, J.A. and Herzenberg, L.A., *Immunol. Rev.*, (1979). 47 : 63.
18. Marcos, M.A.R., Huetz, F., Pereira, P., Andreu, J.L., Martinez-A., C. and Coutinho, A., *Eur.J.Immunol.*, (1989). 19 : 2031.
19. Manohar, V., Brown, E., Leiserson, W.M. and Chused, T.M., *J. Immunol.*, (1982). 129 : 532.

20. Hayakawa, K., Hardy, R.R. and Herzenberg, L.A., *Eur. J. Immunol.*, (1986). **16** : 450.
21. Herzenberg, L.A., Stall, A.M., Lalor, P.A., Sidman, C., Moore, W.A., Parks, D.R. and Herzenberg, L.A., *Immunol Rev*, (1986). **93** : 81.
22. Paige, C.J., Kincade, P.W., Moore, M.A.S. and Lee, G., *J. Exp. Med.*, (1979). **150** : 548.
23. Hayakawa, K., Hardy, R.R., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A., *J. Exp. Med.*, (1985). **161** : 1554.
24. Freitas, A.A., Rocha, B. and Coutinho, A., *Immunol. Rev.*, (1986). **91** : 5.
25. Thomas-Vaslin, V. and Freitas, A., *Int. Immunol.*, (1990). **2** : 74.
26. Lalor, P.A., Herzenberg, L.A., Adams, S. and Stall, A.M., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 507.
27. Sundblad, A., Huetz, F., Portnoi, D. and Coutinho, A., *J. Autoimmunity*, (1990). : in press.
28. Carmack, C.E., Shinton, S.A., Hayakawa, K. and Hardy, R.R., *J. Exp. Med.*, (1990). **172** : 371.
29. Riggs, J.E., Stowers, R.S. and Mosier, D.E., *J. Exp. Med.*, (1990). **172** : 475.
30. Lalor, P.A., Stall, A.M., Adams, S. and Herzenberg, L.A., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 501.
31. Förster, I., Vieira, P. and Rajewsky, K., *Int.Immunol.*, (1989). **1** : 32.
32. Andrade, L., Freitas, A.A., Huetz, F., Poncet, P. and Coutinho, A., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 1117.
33. Klinman, D.M. and Holmes, K.L., *J. Immunol.*, (1990). **144** : 4520.
34. Hayakawa, K., Hardy, R.R., Stall, A.M. and Herzenberg, L.A., *Eur. J. Immunol.*, (1986). **16** : 1313.
35. Miller, R.A. and Galow, J., *J. Immunol.*, (1984). **133** : 3408.
36. Werner-Favre, C., Vischer, T.L., Wohlwend, D. and Zubler, R.H., *Eur. J. Immunol.*, (1989). **19** : 1209.
37. Ault, K.A., Autin, J.H., Ginsburg, D., Orkin, S.H., Rappeport, J.M., Keohan, M.L., Martin, P. and Smith, B.R., *J. Exp. Med.*, (1985). **161** : 1483.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Control of the purification of the bone marrow cells before and after panning on anti-IgM coated plates. From the total bone marrow cells, the population corresponding to lymphocytes was gated out, according to their forward scatter, side scatter and represent 18,6 and 16,1% of the total events. Among these gated populations, 24,3% are IgM⁺ before panning, while this percentage is reduced to 1,3% after panning.

Figure 2 : FACS pattern observed in the spleen after CD5-biotine and avidine-PE and IgM^a-FITC or CD5 biotine and avidine-PE and IgM^b-FITC staining, either in controls, normal B6.Igh^a or irradiated B6 mice, or in the B6 irradiated mice 3 months after transfer of peritoneal, spleen or bone marrow cells.

Figure 3 : FACS pattern observed in the total lymphoid population of peritoneal cells after CD5-biotine and avidine-PE and IgM^a-FITC or CD5 biotine and avidine-PE and IgM^b-FITC staining, either in controls, normal B6Igh^a or irradiated B6 mice, or in the B6 irradiated mice 3 months after transfer of peritoneal, spleen or bone marrow cells.

Figure 4 : FACS pattern observed in the large lymphoid population of peritoneal cells after CD5-biotine and avidine-PE and IgM^a-FITC or CD5 biotine and avidine-PE and IgM^b-FITC staining, either in controls, normal B6Igh^a or irradiated B6 mice, or in the B6 irradiated mice 3 months after transfer of peritoneal, spleen or bone marrow cells.

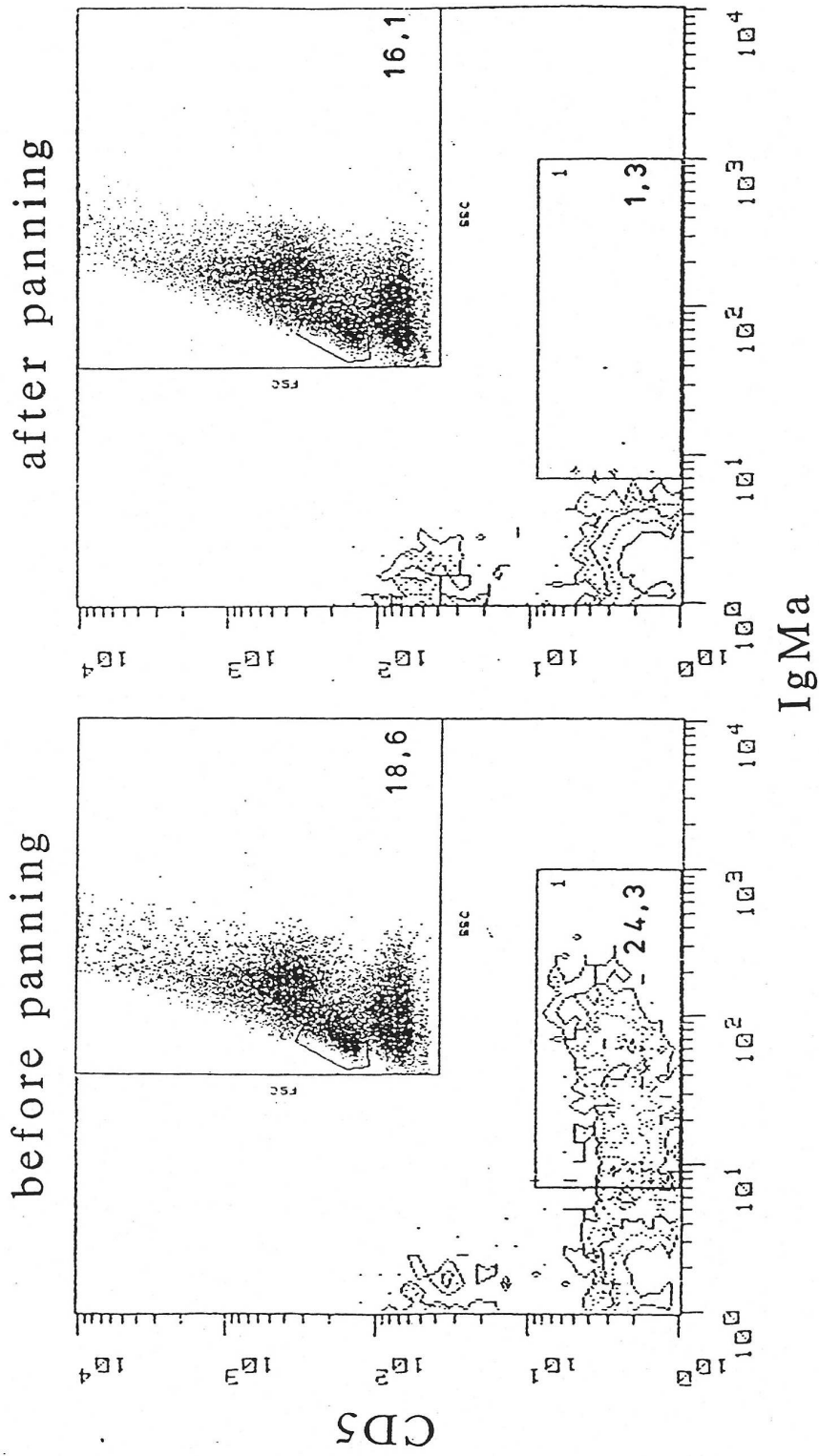
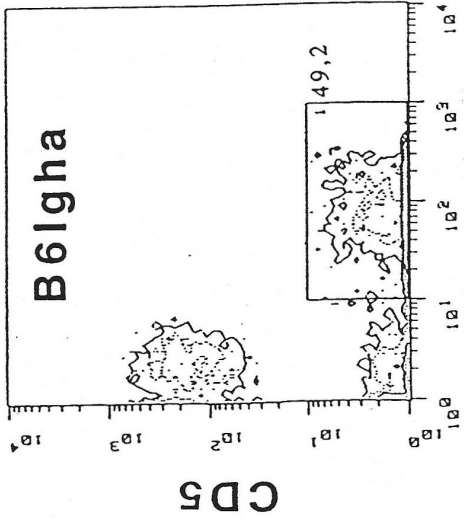
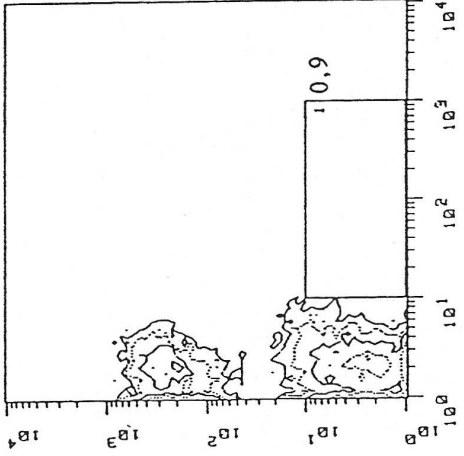


fig 1

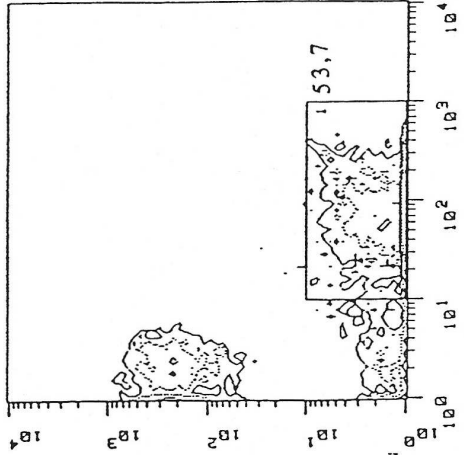
controls



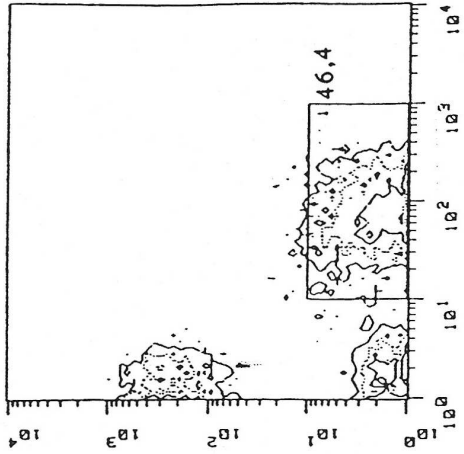
Per cells



spl cells

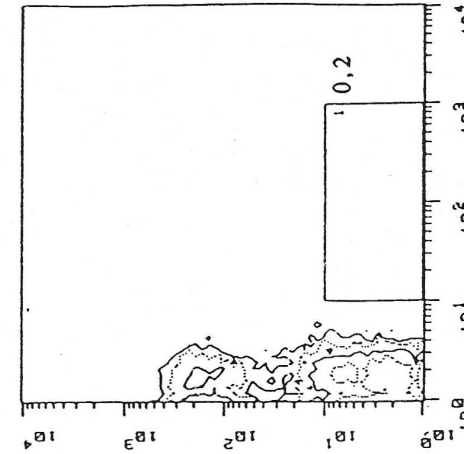
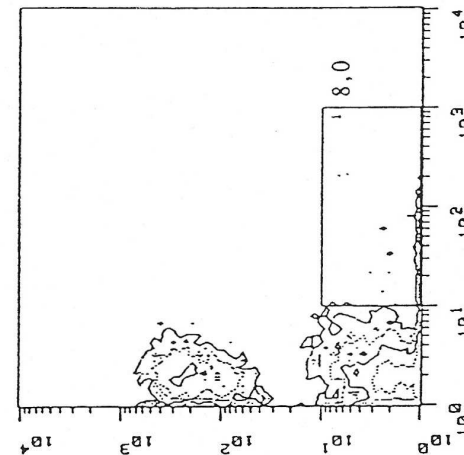
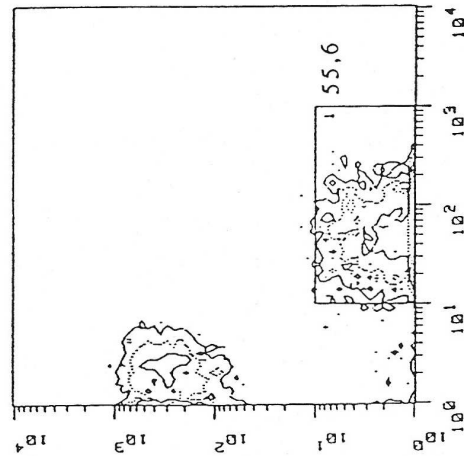
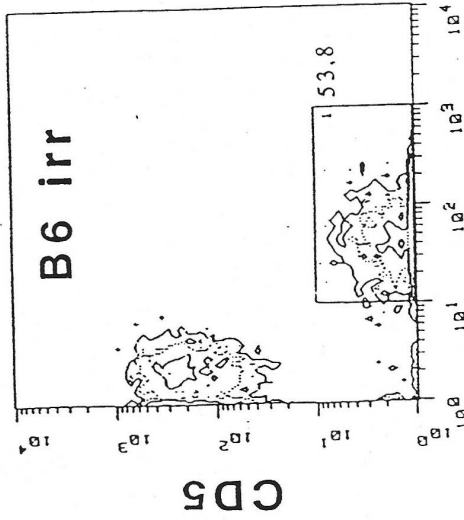


BM cells



IgMa

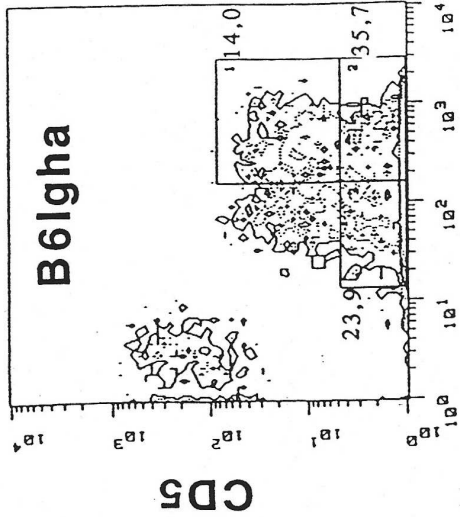
B6 irr



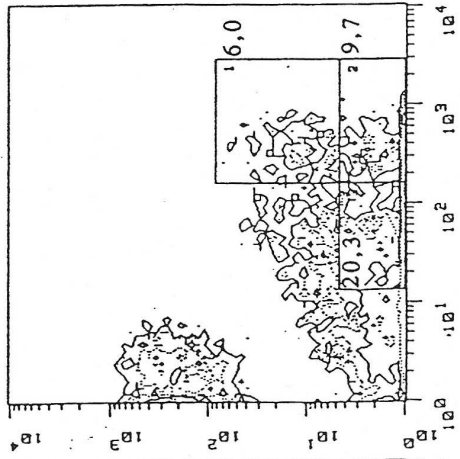
IgMb

fig 2

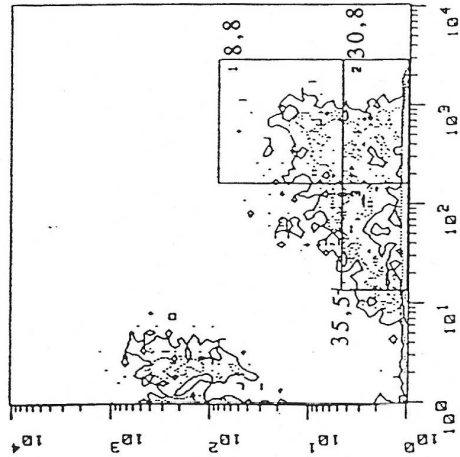
controls



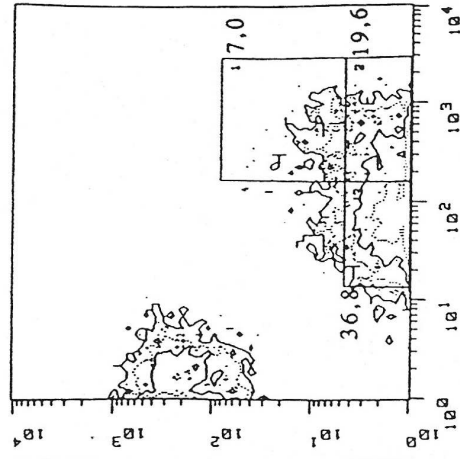
Per cells



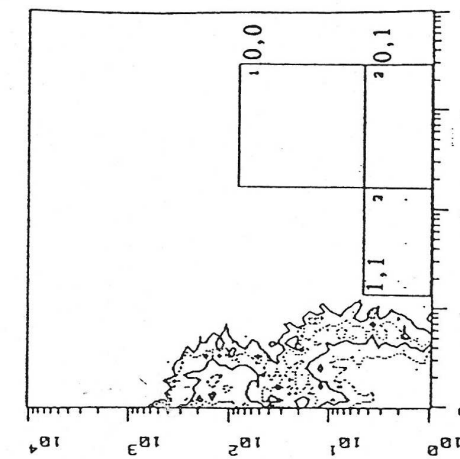
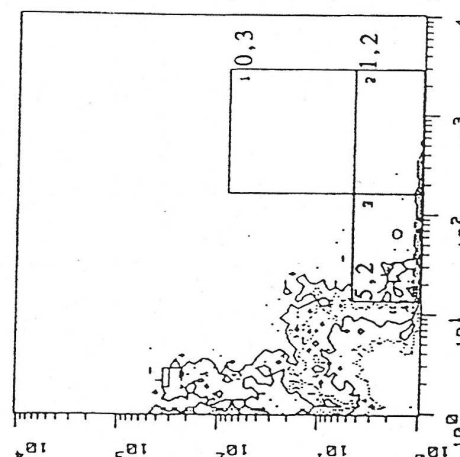
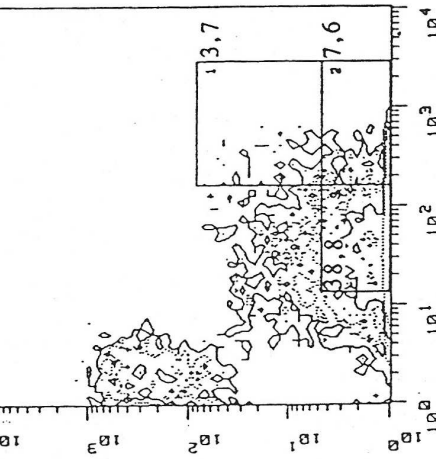
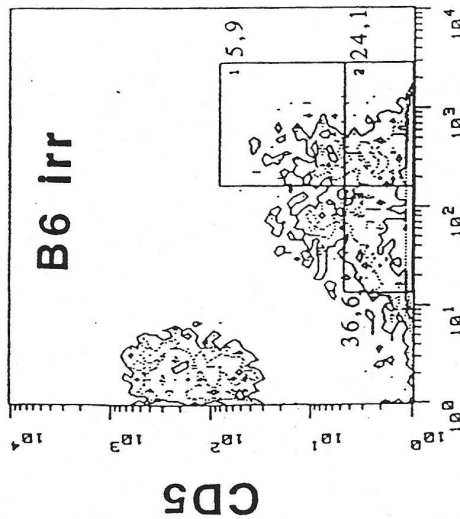
spl cells



BM cells



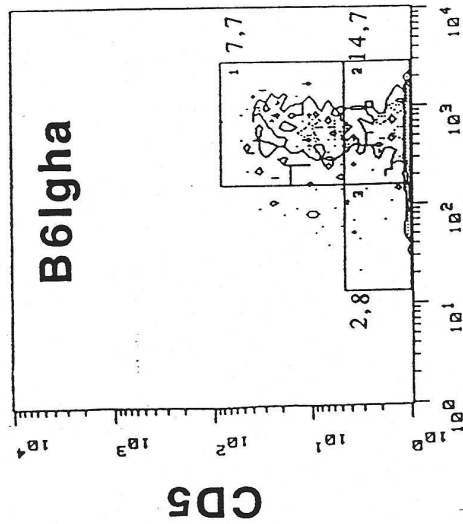
IgMa



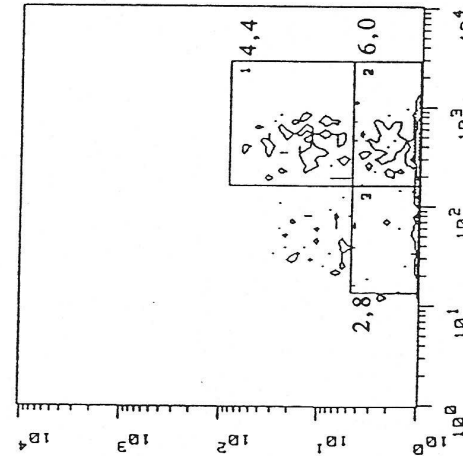
IgMb

f.g 3

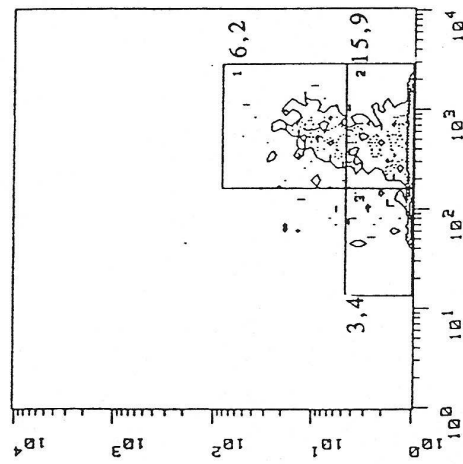
controls



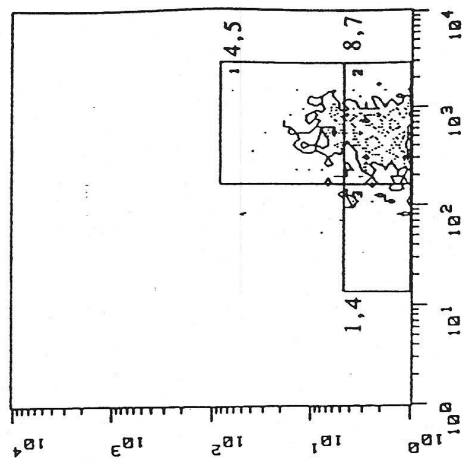
Per cells



spl cells

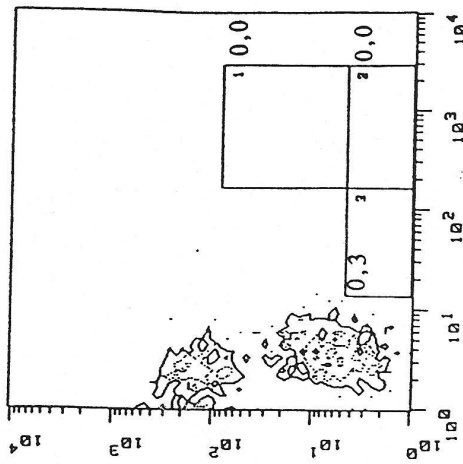
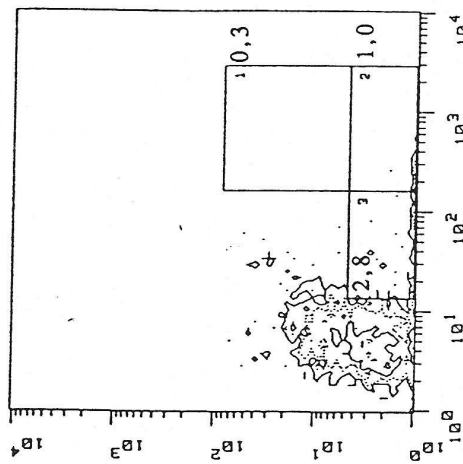
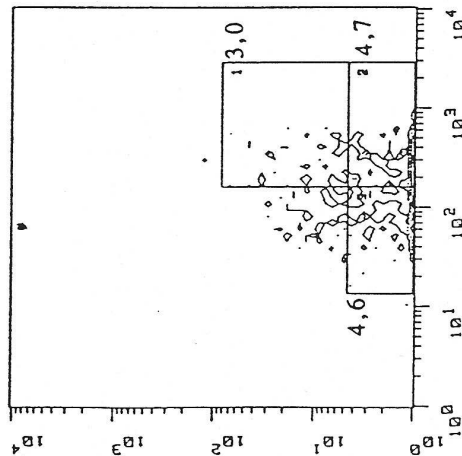
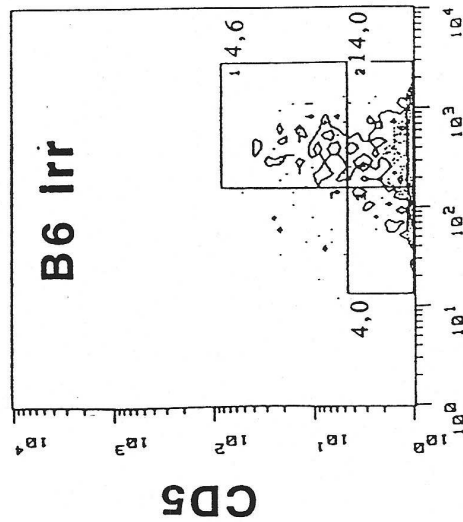


BM cells



IgMa

B6 Irr



IgMb

fig 4

Table I : Numbers of natural IgM-secreting cells of donor (IgM^a) and host allotype (IgM^b) in the spleen of IBMP recipient mice, 2 weeks and 3 months after transfer of spleen or peritoneal cells.

Time after transfer	Controls			Chimeras with			
	B6 Igha	B6	B6 IBMP	SPL cells		PER cells	
				IgM ^a	IgM ^b	IgM ^a	IgM ^b
2 weeks	178,500	90,300	97,612	145,529	145,100	323,658	105,222
				± 79,523	± 76,787	± 57,375	± 18,016
				50 %		74 %	
3 months	228,000	104,025	169,125	311,525	181,208	29,600	147,200
				± 211,697	± 88,430		
				60 %		16 %	

Results are expressed as mean and SE of group of splenic IgM-secreting cells per spleen in group of three mice assayed individually.

* Percentage of donor chimerism IgM^a/IgM^a + IgM^b. The controls were normal age matched B6.Igh or B6 adult mice or IBMP B6 animal that received no cell transfer

Table II : Concentration of IgM^a and IgM^b in the sera of IBMP recipient after transfer of spleen or peritoneal cells

Time after transfer	Controls			Chimeras with			
	B6 Igha	B6	B6 IBMP	SPL cells		PER cells	
				IgM ^a	IgM ^b	IgM ^a	IgM ^b
2 weeks	2,067	348	272	706	277	1,272	322
				± 80	± 150	± 0	± 125
				70 % *		79 %	
3 months	1,595	442	468	1,498	522	580	1300
				± 586	± 431		
				76 %		30 %	

Results are expressed as mean and SE of group of 3 mice, in µg/ml equivalents of monoclonal IgM antibodies of donor (IgM^a, equivalent of RS3.1) or host (IgM^b, equivalent of B1.8).

Table III: Number of natural IgM-secreting cells of donor (IgM^a) and host allotype (IgM^b) in the spleen of bone marrow of mice, 3 and 5 months after transfer of bone marrow cells.

Time after transfer	Controls			Bone marrow chimeras	
	B6 Igha	B6	B6 irr	IgM ^a	IgM ^b
3 months	357,000	202,575	123,200	531,450 ± 294,227 93 % *	92,688 ± 91,304
5 months	227,850	429,000	864,200	173,933 ± 87,446 91 %	16,600 ± 6,907

Results are expressed as mean and SE of group of 3 mice, as number of secreting cells per spleen.

* Percentage of chimerism $IgM^a/IgM^a + IgM^b$. The controls were normal age matched B6.Igh^a or B6 adult mice or self reconstituting B6 totally irradiated mice.

Table IV: Concentration of IgM^a and IgM^b in the sera of irradiated mice 3 and 5 months after transfer of bone marrow cells

Time after transfer	Controls			Bone marrow chimeras	
	B6 Igha	B6	B6 irr	IgM ^a	IgM ^b
3 months	1,433 ± 334	1,577 ± 1,458	912 ± 659	1,984 ± 911 93 % *	152 ± 124
5 months	1,406 ± 61	1,462 ± 967	1,567 ± 1,118	2,156 ± 2,176 94 % *	126 ± 105

Results are expressed as mean and SE of group of 3 mice, in µg/ml equivalents of monoclonal IgM antibodies of donor (IgM^a, equivalent of RS3.1) or host (IgM^b, equivalent of B1.8).

* Percentage of chimerism $IgM^a/IgM^a + IgM^b$. The controls were normal age matched B6.Igh^a or B6 adult mice or self reconstituting B6 irradiated mice.

