



HAL
open science

La lymphopoïèse B chez le *Danio rerio*

Olivia Derne

► **To cite this version:**

Olivia Derne. La lymphopoïèse B chez le *Danio rerio*. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01739764

HAL Id: dumas-01739764

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01739764>

Submitted on 21 Mar 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.

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017

N°106

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Le 7 décembre 2017 à Bordeaux (Gironde)

Par **Olivia DERNE**

Née le 15 Août 1991 à Fort-de-France (Martinique)

La lymphopoïèse B chez le *Danio rerio*

Directeur de thèse

Paul GUGLIELMI

Jury

Mme Véronique MICHEL	Maître de conférence	Président
Mr Paul GUGLIELMI	Directeur INSERM	Directeur
Mme Maria MAMANI-MATSUDA	Maître de conférence	Juge
Mr Loïc RIVIERE	Maître de conférence	Juge

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mr GUGLIELMI pour m'avoir non seulement encadrée durant mon stage de Master 2 microbiologie-immunologie mais aussi pour sa précieuse implication lors de la rédaction de ma thèse. Merci pour toutes les connaissances et expériences que vous m'avez apporté ces derniers mois, j'ai beaucoup appris. Je n'ai pu approcher qu'une des nombreuses responsabilités qui vous incombent, votre implication dans le monde de la recherche immunologique attire le respect et est une source d'inspiration. Grâce à vous j'ai pu prendre part au 26^{ème} cours de la Société Française d'Immunologie durant lequel les nombreux échanges, débats et rencontres ont profondément marqués et enrichis ma jeune expérience scientifique.

Je remercie Mme MICHEL d'avoir accepté d'être ma présidente de jury. Vos qualités d'enseignement, largement reconnues au sein du corps étudiant, m'ont grandement influencées et motivées pour suivre ce parcours. C'est l'une des raisons pour lesquelles je me destinais à la pharmacologie avant que je ne change d'avis pour l'immunologie (après une très longue hésitation).

Merci à Mme MAMANI-MATSUDA qui m'a ouvert au monde de l'immunologie. Cette discipline assez complexe ne l'était plus dans vos cours. De plus, votre disponibilité et votre implication auprès des étudiants m'ont beaucoup marqué. Vous m'avez décidé à m'engager en immunologie et c'est sans regrets que je poursuis dans cette voie, en espérant pouvoir collaborer avec vous un jour qui sait.

Merci à Mr RIVIERE pour la qualité de ses enseignements et son implication dans l'amélioration de la pédagogie au sein de notre UFR. Vous êtes un enseignant très à l'écoute, la transmission du savoir vous tient à cœur et cela s'en ressent dans vos cours. Vous avez marqué mes études dès ma première année et vos précieux conseils et soutiens m'ont permis d'avancer dans mes projets, notamment lors de notre contribution à l'organisation de conférences à visée recherche durant le IV^{ème} forum des carrières pharmaceutiques.

Un gros merci au laboratoire DIMNP qui m'a généreusement accueilli pour mon stage de Master 2. Merci à Mai et Laure avec qui j'ai partagé le bureau, à Catherine et Stéphane pour leur gentillesse et leur bonne humeur, à Georges, chef du laboratoire qui sait toujours se rendre disponible pour tout un chacun. Merci à Alexandra qui m'a accompagnée chaque midi au restaurant universitaire et m'a permis de m'intégrer auprès des étudiants de l'autre côté du couloir.

Je tiens à remercier tous mes amis pharmaciens, en particulier Florent, Marie B., Marie C., Natacha, Céline, Thalia, Amélie, avec qui j'ai pu rigoler, partager, crier durant ces 6 ans. Car bien que nous ayons été séparés, nous avons toujours pu garder un très bon contact. Un grand merci à mes amis du BEPIB : Marie-Emilie, Vincent, Camille et Medhi et surtout Antoine et Blaise. Grâce à vous j'ai pu participer à l'organisation des conférences recherche du IVème forum des carrières pharmaceutiques. Merci à mes camarades de Master 2 microbiologie-immunologie, en particulier Alice, Justine et Pauline, qui m'ont aidé à m'intégrer et avec qui j'ai eu plaisir à travailler pendant ces quelques mois.

Merci à tous ceux qui ont pu assister à la soutenance de ma thèse et à tous ceux que j'ai côtoyés durant mes 6 années de pharmacie. Merci à Yohan mon meilleur ami et soutien indéfectible depuis le collège, ta présence m'a été très précieuse notamment pendant mes années PACES. Merci à mes colocataires et amis : Sarah, Grégory, Sylvain et Benjamin, j'ai passé des moments inoubliables avec vous. Merci à Sarah qui a toujours fait preuve de douceur et bienveillance à mon égard, ta cuisine me marque encore aujourd'hui. Merci à Gregory qui m'a été d'un secours indispensable pendant mes longues heures de révisions : tu portes à ravir ton surnom de Mister Fiches. Les moments que nous avons passés tous ensemble en colocation resteront gravés à jamais.

Merci à mes acolytes Séverine et Céline, ma rencontre la plus marquante à Bordeaux en dehors de mes amis pharmaciens. Vous êtes devenues des amies précieuses et ma vie à Bordeaux n'aurait pas eu la même saveur sans vous. Merci à mes amis de l'association VaKBand en particulier Elodie R., Elodie B., Kathy, Mylène, Aurélie, Ananda. Nous avons vécu de très bons moments musicaux ensemble et c'est grâce à vous que j'ai pu autant m'épanouir dans le groupe. J'espère que notre amitié durera longtemps. Merci aussi à Boris de m'avoir supporté pendant mes longues heures de travail aussi bien studieuses qu'infructueuses.

Enfin merci à ma famille, maman, papa, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Vous m'avez toujours couvert de votre attention et de votre amour sous toutes ses formes (cris, câlins, silences, mots doux) faisant de moi celle que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours encouragé à faire ce que je voulais, d'avoir supporté vaillamment la distance qui nous séparait bien trop tôt, d'avoir été fier de moi, je vous aime.

LISTES DES ANNEXES

Annexe 1 : Arbre phylogénétique de différents isotypes de chaînes légères de vertébrés (*Zimmerman et al. 2007*).....p.61

Annexe 2 : Alignement annoté des séquences de transcrits de chaînes légères de type 2 amplifiées par PCR sur différentes matrices d'ADNc.....p.62

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des informations relatives aux gènes V, J et C de chaînes légères d'Ig analysées.....p.65

Table des matières

INTRODUCTION	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
I. La différenciation et la maturation des lymphocytes B	10
2) Ce que l'on sait chez les mammifères.....	10
3) La lymphopoïèse B chez le <i>Danio rerio</i>	19
II. L'étude des répertoires anticorps chez le <i>Danio rerio</i>	26
1) Matériels et méthodes.....	27
2) Résultats.....	30
3) Bilan de l'analyse des chaînes légères d'Ig	39
III. Exemples de modèles d'étude de la lymphopoïèse B chez le <i>Danio rerio</i>	40
1) Marquage de la lignée B à l'aide de CD79	40
2) Marquage de la lignée B à l'aide du promoteur IgBP-1 ou Alpha-4	48
3) Utilisation de la protéine AID comme marqueur de sites de maturation d'affinité	52
CONCLUSION	58
ANNEXES.....	59
Bibliographie	66

INTRODUCTION

L'hématopoïèse est le mécanisme biologique qui permet la production des cellules et éléments figurés du sang à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Il s'agit d'un phénomène essentiel à l'homéostasie d'un organisme, c'est pourquoi il est étudié de manière extrêmement détaillée depuis de nombreuses années. Parmi les cellules produites lors de l'hématopoïèse on retrouve les lymphocytes T (LT) et B (LB). Dans leur cas, il est courant d'employer plus spécifiquement le terme de lymphopoïèse. La lymphopoïèse est donc l'ensemble des mécanismes cellulaires aboutissant au développement et à la maturation des LT ou LB acteurs essentiels de l'immunité.

Les LB sont les cellules de l'immunité adaptative responsables de la production des anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig), un des moyens de défense les plus efficaces dont nous disposons. En effet lors d'une infection, les microorganismes pathogènes (bactéries, virus, parasites...) doivent être spécifiquement reconnus par notre organisme pour être éliminés. Les LB font partie des cellules capables de reconnaître les éléments pathogènes ou antigènes, grâce au complexe formé par leurs Igs membranaires associées à des molécules de transduction pour former un récepteur particulier : le BCR (B-cell receptor ou récepteur des cellules B). La production continue et quantitativement importante de LB contribue à l'élaboration d'un répertoire à large spectre contre les principales menaces dirigées contre l'organisme. La liaison des antigènes aux BCR, avec une affinité suffisante, va permettre d'activer la cellule B, c'est-à-dire qu'elle va pouvoir se multiplier pour produire de grandes quantités d'Ac afin de stopper l'infection. De plus, la capacité de maturation d'affinité des Ac permet de sélectionner les plus efficaces d'entre eux. Toutes ces observations nous prouvent que tout au long de l'évolution, les organismes ont su mettre en place des stratégies adaptées visant à neutraliser le plus efficacement possible les pathogènes.

C'est pourquoi la compréhension approfondie des différentes étapes de différenciation et de maturation cellulaire constitue un enjeu majeur de la recherche immunologique actuelle. Le système immunitaire se doit d'être performant, sans pour autant porter atteinte à l'intégrité de l'individu. Il doit être finement régulé car les conséquences d'une exacerbation des réponses immunitaires peuvent être létales. Ce constat procure une certaine fascination vis-à-vis de ce système. C'est l'une des raisons qui m'a poussé à approfondir mes connaissances dans ce domaine. L'immunologie est donc une discipline transversale : associant des études fondamentales de différenciation et maturation cellulaire, aux analyses bien ciblées de relations hôtes pathogènes ou encore de cancers (leucémies). Bien qu'ayant déjà été étudiée de manière intensive, la lymphopoïèse présente encore de nombreux mystères qu'il convient d'élucider. La souris, support préférentiellement utilisé pour les études immunologiques, a permis de révéler d'importants mécanismes grâce aux différents modèles et outils génétiques développés. Bien que les grandes voies de défense soient conservées dans l'évolution, chaque espèce présente des particularités propres en matière de lymphopoïèse. Leur étude peut nous fournir des outils de compréhension et des

exemples de lutte contre les pathogènes ou les cancers utilisables dans les situations humaines. En ce sens, le *Danio rerio* ou poisson zèbre a largement prouvé son utilité. Ce vertébré fait partie de la classe des téléostéens chez lesquels s'est développée une immunité adaptative reposant entre autre sur l'utilisation des Igs. Bien que la plupart des mécanismes de défense y soient conservés (présence des LT et LB, synthèse d'Igs faisant suite à des réarrangements génomiques, maturation d'affinité des Ac...), le *Danio* présente néanmoins des particularités distinctes de la souris et de l'homme. De nombreuses étapes du développement B restent encore à identifier. En particulier, l'absence de centres germinatifs pose la question des modalités et des tissus dans lesquels se produit la maturation d'affinité au cours d'une infection. Une autre différence majeure est que la commutation de classe ou switch isotypique des Igs ne peut pas se produire à cause de la structure du locus codant les chaînes lourdes. Cela implique que chez le poisson zèbre, les LB doivent être d'emblée spécialisés soit dans la synthèse des IgM (avec ou sans IgD), soit dans celle des IgZ (équivalent fonctionnel des IgA des mammifères). Enfin, il est possible de vacciner efficacement les poissons zèbres, ce qui atteste leur capacité de produire des LB mémoires responsables d'une immunisation durable contre les antigènes. Cela fait d'eux une espèce de choix pour les tests d'immunisation, notamment pour l'évaluation de la vaccination par voie orale. Le *Danio rerio* représente donc un support de travail intéressant pour la compréhension de mécanismes de la lymphopoïèse B. Certaines caractéristiques du développement du *Danio* peuvent être mises à profit à cette fin : ses embryons et ses larves sont transparents, permettant de visualiser des phénomènes biologiques *in vivo* par simple microscopie. Il est donc possible de recueillir des informations inédites à des stades précoces de développement. Bien que l'arsenal technique actuellement disponible ne soit pas aussi étoffé que celui de la souris, il est tout à fait envisageable d'élaborer des expériences simples aboutissant à des résultats significatifs.

C'est pourquoi j'ai choisi d'exposer les informations relatives à la lymphopoïèse B chez le *Danio rerio* au cours de ma thèse. Durant mon stage de Master 2, j'ai pu recueillir des données tout à fait intéressantes ouvrant des pistes prometteuses. Pour exposer le contexte scientifique de nos travaux, je présenterai dans un premier temps, les mécanismes généraux de développement et maturation des LB chez les mammifères que je confronterai aux premiers éléments recueillis chez le *Danio*. Dans un second temps, je développerai plus en détail les résultats obtenus au laboratoire DIMNP lors de mon stage de Master 2 concernant l'étude des répertoires anticorps chez le poisson zèbre : des protocoles expérimentaux à l'analyse et interprétation des résultats. Enfin, dans une troisième partie, j'aborderai trois modèles d'études du développement des LB mis en place chez le poisson zèbre, des stratégies d'élaboration, aux résultats préliminaires obtenus, en confrontant nos résultats à ceux de la littérature récente, avant de conclure.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : anticorps

Ag(s): Antigène(s)

ADCC: Antibody-dependent-cell-mediated-cytotoxicity

ADNc : ADN complémentaire

AGM : Aorte-Gonade-Mesonepros

AID: Activating-Induced cytidine Deaminase

ARNm : ARN messenger

BCR : B-Cell receptor (récepteur d'antigène des cellules B)

CDR : Complement Determining Region

CFD(s) : cellule(s) folliculaire(s) dendritique(s)

CHT: Caudal Hematopoietic Tissue (tissu hématopoïétique caudal)

CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité II

CSH(s) : cellule(s) souche(s) hématopoïétique(s)

dNTP : désoxyNucleotide triphosphate

EGFP : enhanced green fluorescent protein

HIS : Hybridation in situ

Hpf : heures post-fécondation

ICM : intermediate cell mass

Ig(s) : Immunoglobuline(s)

IgA : immunoglobuline de classe α

IgBP-1 : Ig binding protein-1 ou alpha 4

IgD : immunoglobuline de classe λ

IgE : immunoglobuline de classe ϵ

IgM : immunoglobuline de classe μ

jpf : jours post-fécondation

kb : kilo base (10^3 bases) d'ADN

LB : lymphocyte B

LC : chaîne légère

LT : lymphocyte T

pb : paire de base d'ADN

PBI : Posterior blood island

RAG : Recombination activating gene

RSS : séquences signales de recombinaison

SLC : surrogate light chain ou substitut de chaîne légère

spf : semaines post-fécondation

TCR : T-cell receptor (récepteur d'antigène des cellules T)

TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase

I. La différenciation et la maturation des lymphocytes B

2) Ce que l'on sait chez les mammifères

a) De la cellule hématopoïétique à la cellule B immature

La lymphopoïèse B est un long processus qui, à l'âge adulte, débute au niveau de la moelle osseuse à partir des CSH. Ces cellules, qui possèdent aussi la capacité d'autorenouvellement, vont se différencier en progéniteurs multipotents lymphoïdes (LMPPs pour Lymphoid-multipotent primed progenitors) pour former entre autre les progéniteurs lymphoïdes précoces (ELPs). Par la suite, les ELPs pourront se différencier soit en progéniteurs thymiques précoces (ETP) donnant des LT, soit en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) capable de produire toutes les cellules lymphoïdes dont la lignée B. Tous ces phénomènes sont finement régulés et dépendent majoritairement du microenvironnement cellulaire et cytokinique des différents progéniteurs. Tout ceci concourt à la production de LB matures¹.

La formation des Igs, protéines constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères reliées par des ponts disulfures, représente une étape fondamentale dans la maturation des cellules B. Les chaînes lourdes comprennent une partie constante (C) et une partie variable associant une région variable (V), une région de diversité (D) et une zone de jonction (J). On retrouve la même structure dans les chaînes légères, à la différence que leur partie variable ne comprend qu'une région V et J (figure 1). Dans l'Ig, c'est la partie variable qui est impliquée dans la reconnaissance spécifique de l'Ag tandis que la partie constante va déterminer le moyen par lequel l'Ag sera éliminé. L'expression des Igs nécessite des **réarrangements** des gènes codant pour les chaînes d'Igs suivant un ordre bien précis.

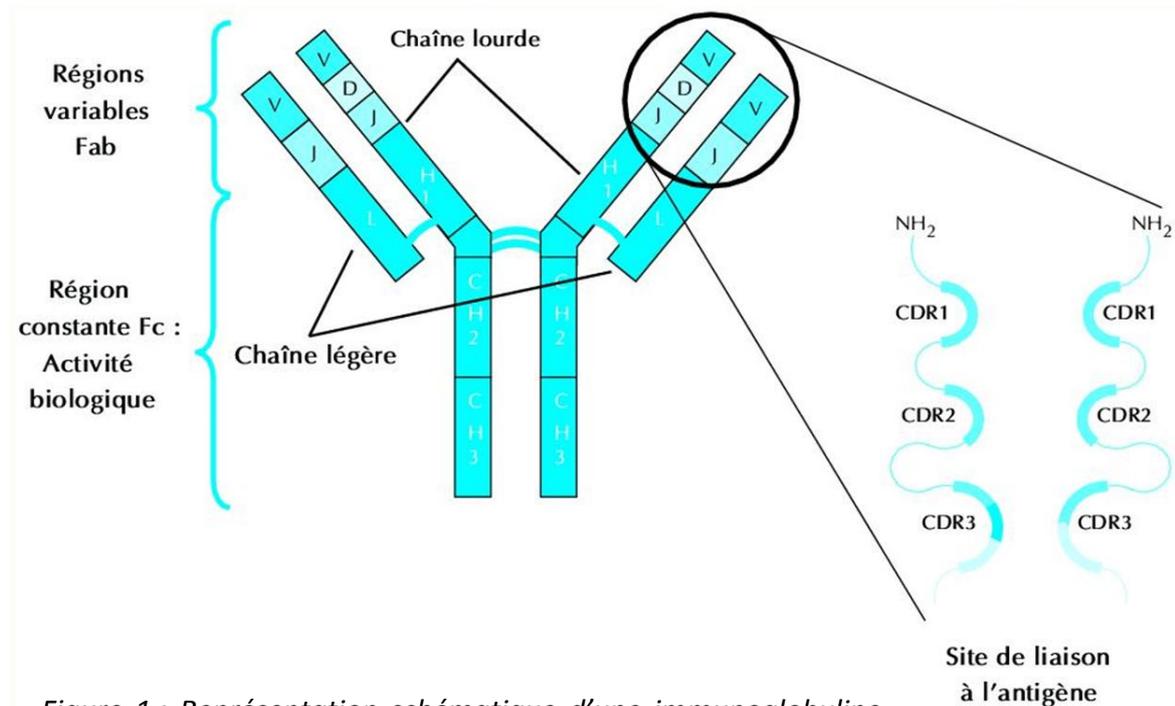


Figure 1 : Représentation schématique d'une immunoglobuline et du site de liaison à l'antigène

Les réactions de réarrangement des gènes d'Ig dans la lignée B font intervenir un complexe enzymatique spécifique appelé **RAG1-RAG2** pour *Recombination activating gene*². Il va induire des cassures doubles brins, grâce à son activité endonucléase, dans des zones bien précises de l'ADN : les **séquences de recombinaisons (RSS)** adjacentes aux gènes V, D, J et qui présentent une organisation caractéristique³. Ces séquences RSS sont formées d'une séquence heptamer (7 paires de bases ou pb) (5'-CACAGTG) associée à une séquence nonamer (9 pb) (5'-ACAAAACC), séparée par une région non conservée de 12 ou 23 pb appelée « spacer ». Le système est conçu de telle sorte que les séquences RSS possédant un spacer de 12 pb ne peuvent s'associer qu'avec des séquences RSS comprenant un spacer de 23 pb ; on parle de la **règle du 12-23**^{3,4}. Il est à noter qu'il y a plusieurs versions différentes des gènes V, D et J. Lors des réarrangements, les gènes sont utilisés de façon aléatoire ce qui permet une variabilité des chaînes lourdes synthétisées à partir d'un même génome. Par ailleurs les réparations effectuées après cassure de l'ADN par RAG sont de type non homologues et donc non fidèles. Des erreurs peuvent donc se glisser avec comme conséquences soit la formation de chaînes lourdes d'Ig non fonctionnelles, soit d'accroître la diversité en créant des séquences inédites, distinctes des séquences génomiques.

La première étape identifiable de la lymphopoïèse B correspond à la cellule **pro-B** : c'est à ce stade que l'on observe les **réarrangements** des gènes D et J des chaînes lourdes d'Igs⁵. Dans la cellule suivante, dénommée **pré-B**, un gène V est recombinaisonné à la portion DJ déjà formée. Cette séquence VDJ va constituer la partie variable de la chaîne lourde. Le gène recombinaisonné VDJC (gène C de type μ) sera transcrit en ARNm primitif puis l'intron, présent entre la séquence VDJ et la séquence C, sera éliminé par épissage. Enfin l'ARNm va subir d'autres modifications post-transcriptionnelles (ajout d'une queue polyA, coiffe...) et pourra être traduit en chaîne lourde d'Ig fonctionnelle (figure 2).

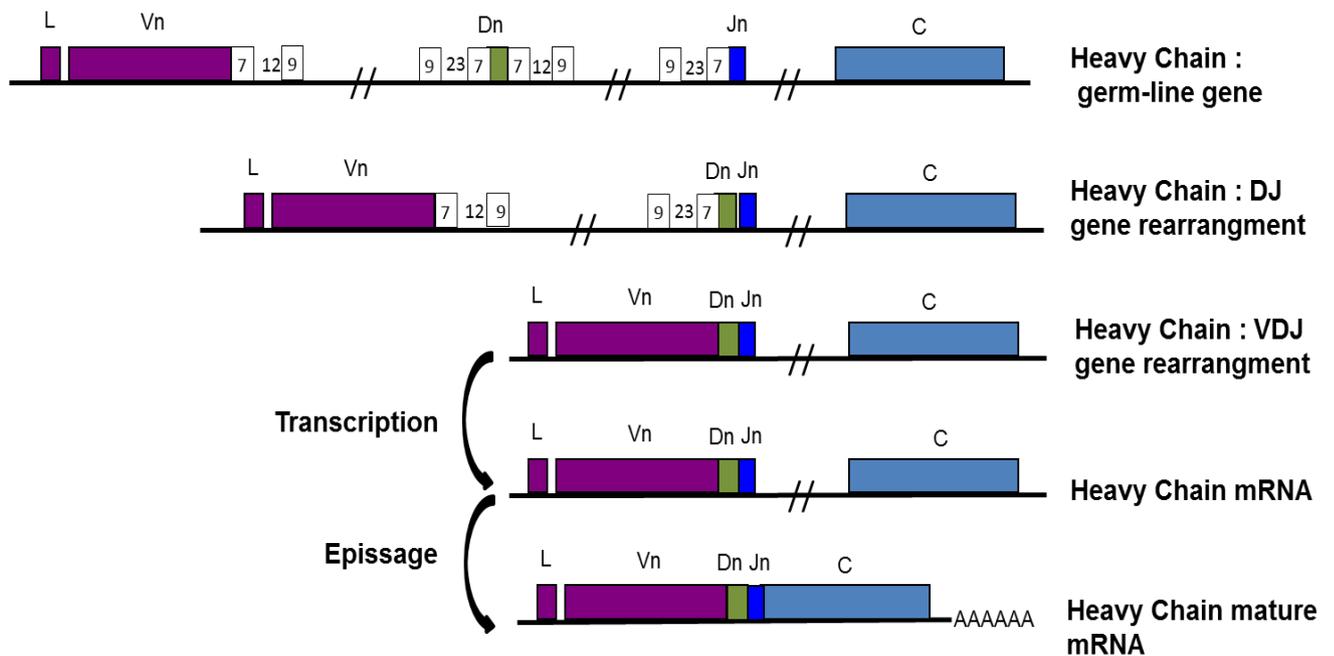


Figure 2 : Schéma d'organisation des gènes d'une chaîne lourde d'Ig (gènes V, J, D et C + séquences RSS) et exemple de réarrangement.

Une fois synthétisée, les chaînes lourdes ne peuvent persister seules dans le cytoplasme de la cellule or à ce stade, les gènes des chaînes légères ne sont pas encore réarrangés. Pour pallier ce manque, la cellule synthétise un substitut de chaîne légère ou « **surrogate light chain** » (SLC) constitué de deux protéines : **VpreB** et **$\lambda 5$** , homologues des gènes V et C des chaînes légères.

Ce substitut de chaîne légère va s'associer à une chaîne lourde de type μ préalablement formée pour entrer dans la composition du récepteur pré-BCR (ou pré B-Cell Receptor) ⁶ exprimé à la surface de la cellule B (figure 3). Ce récepteur comprend également un autre hétérodimère **Ig- α /Ig- β** (ou CD79a/CD79b) assurant la transduction intracellulaire du signal lors de sa stimulation. La formation de ce récepteur constitue une étape primordiale du développement de la cellule B. D'une part, il est le témoin du réarrangement fonctionnel des gènes de chaînes lourdes d'Ig et va entraîner la survie et la prolifération des cellules pré-B ⁷. D'autre part, il va moduler négativement l'expression des gènes RAG ⁸ et SLC ⁹ (une seule chaîne lourde exprimée par cellule) tout en induisant par la suite l'activation du gène SLP-65 nécessaire au réarrangement des gènes des chaînes légères ¹⁰. La synthèse du pré-BCR, effectuée dans la cellule au stade pré-B, conditionne son passage au stade B immature.

Le réarrangement des chaînes légères observent les mêmes règles que pour les chaînes lourdes : intervention du complexe protéique RAG, utilisation des séquences RSS et respect de la règle 12/23.

La seule nuance réside dans l'absence de gènes D. Les réarrangements ne concernent donc que les gènes V et J. La synthèse des chaînes légères va permettre la formation du BCR (figure 3) témoin du passage de la cellule B au stade immature (figure 4).

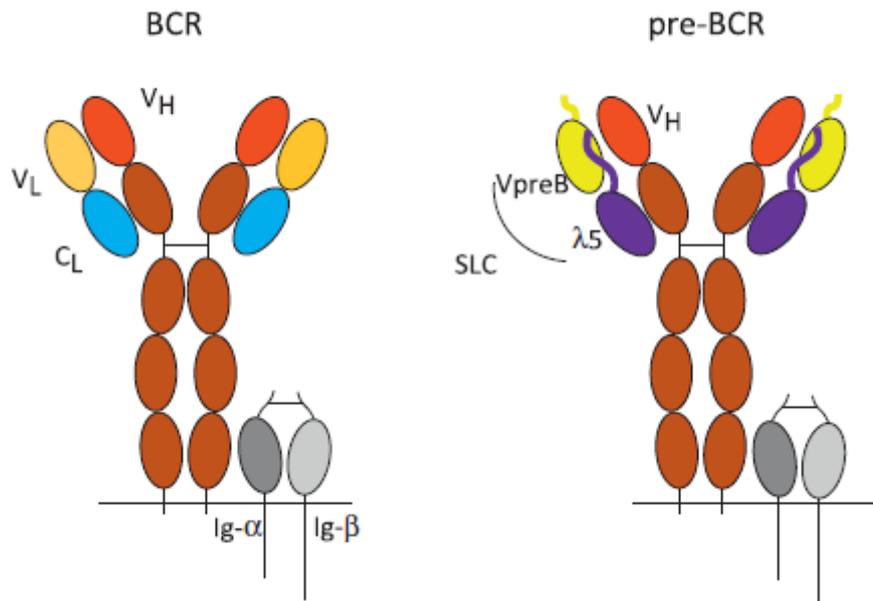


Figure 3 : Représentation schématique des récepteurs pré-BCR et BCR. Le domaine constant μ des chaînes lourdes est dépeint en marron (Surova et al 2014 ¹¹).

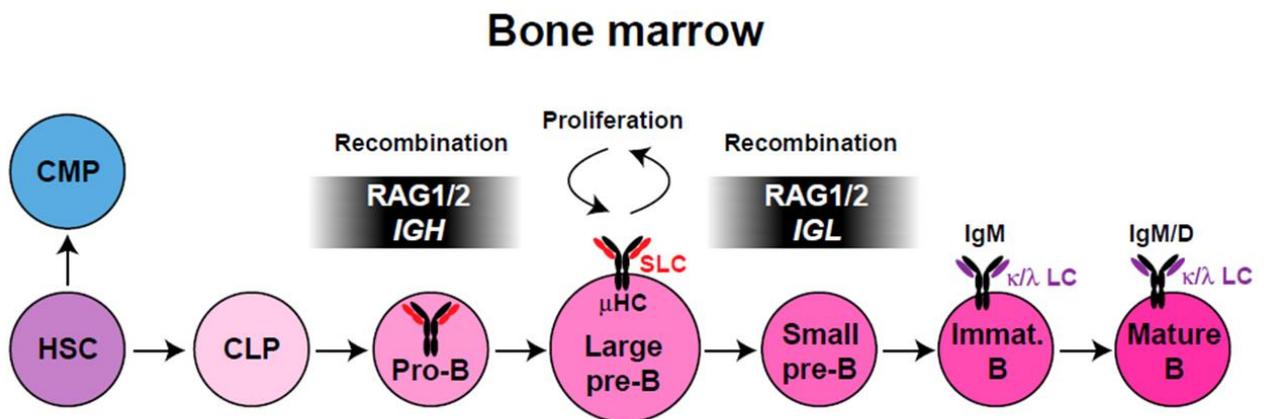


Figure 4 : Schéma récapitulatif de la différenciation B et de la synthèse du BCR dans la moelle osseuse (Bahjat 2017 ¹²).

Enfin, la synthèse du BCR s'accompagne d'une élimination des cellules B autoréactives. En effet si les BCR néo-synthétisés reconnaissent des antigènes du soi, la cellule B reçoit un signal de mort par apoptose. Cette étape constitue le dernier contrôle subit par le LB avant de rejoindre la circulation sanguine puis les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate).

b) Lymphocyte B mature et stimulation antigénique

À ce jour, deux sous populations de cellules B ont été décrites : les cellules B-2 et les cellules B-1 ainsi qu'une subdivision des cellules B-1 (B-1a et B-1b)¹³⁻¹⁵. Les cellules B-2 (ou cellules B conventionnelles) font partie des principaux effecteurs de l'immunité adaptative contrairement aux cellules B-1 qui elles, sont proches de l'immunité innée et participent aussi à l'homéostasie tissulaire.

Après avoir quitté la moelle osseuse, les cellules B-2 matures vont alterner entre la circulation (sanguine, lymphoïde) et les organes lymphoïdes secondaires, comme la rate ou les ganglions lymphatiques, dans l'attente d'une rencontre avec un antigène¹⁶. Leurs déplacements seront influencés par la synthèse de protéines d'adhésions mais aussi par des gradients de chimiokines produites par les autres cellules de l'organisme¹⁷. C'est le cas de la chimiokine CXCL13, reconnue par le récepteur CXCR5 des LB, produite par les cellules folliculaires (stromales, dendritiques...) attirant les LB dans cette région^{18,19}.

Il y a plusieurs contextes de rencontre entre l'Ag et les cellules B²⁰. Les petits Ags solubles peuvent franchir les barrières cellulaires pour atteindre facilement la lymphe. De là, ils seront drainés jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires dans lesquels ils seront pris en charge par les macrophages folliculaire voir même, interagir directement avec les LB. Les Ags de grande taille ne peuvent franchir aisément les membranes cellulaires et sont rapidement pris en charge par les cellules présentatrices d'Ags telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Ces Ags sont souvent opsonisés ou sous forme d'immuns complexes avant d'être phagocytés ou internalisés. Une fois l'Ag internalisé, les cellules dendritiques périphériques pourront migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les Ags aux effecteurs de l'immunité via leur Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II. Les macrophages périphériques ont pour rôle de phagocyter et dégrader les pathogènes. Les produits de dégradations (peptides, polysaccharides, lipides) peuvent servir de support à la mise en place d'une immunité adaptative.

Certaines sous-populations macrophagique se sont spécialisées dans la présentation d'Ags dans le but d'optimiser les probabilités de rencontre avec les cellules effectrices adaptatives. C'est le cas des macrophages des sinus subscapulaires folliculaires. Ces macrophages vont phagocyter le pathogène avec un processus modifié, plus lent, qui pourrait s'apparenter à une phagocytose « douce ». Cette dégradation ralentie favorisera la formation d'Ags qui pourront être présentés aux LB médullaires par un processus pourrait s'apparenter à une transcytose (figure 5)²¹. Autre exemple de cellules spécialisées : les cellules dendritiques folliculaires. Ces cellules sont capables de recycler les Ags présentés à leur surface afin de prolonger leur contact avec les LB en cours de maturation²². Ce mécanisme est très important pour la maturation d'affinité des LB.

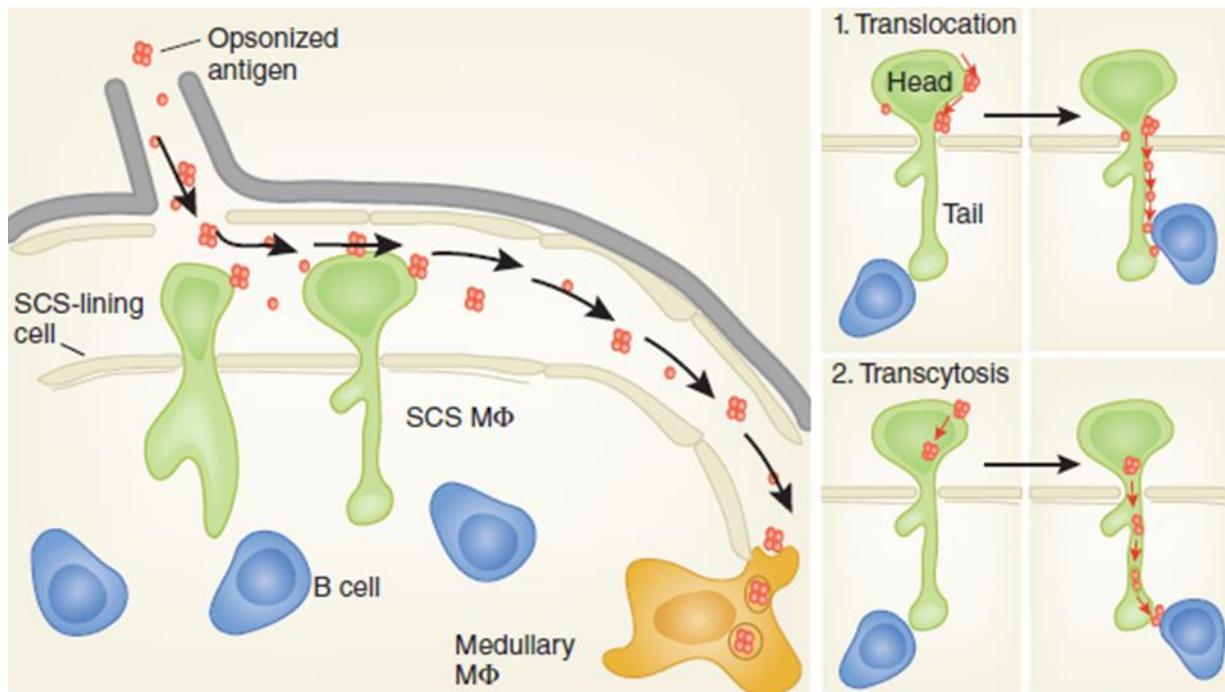


Figure 5 : Exemple de présentation d'Ag aux LB médullaires par les macrophages du sinus subscapulaire (Cyster 2010²¹).

La reconnaissance de l'Ag se fait par liaison spécifique réversible avec le BCR. Plusieurs modèles ont tenté d'expliquer la dynamique du BCR au repos et durant les phases d'activation. Comme par exemple le modèle « monomérique et oligomérisation induite » décrit par l'équipe de Tolar²³ qui stipule que le BCR est sous forme monomérique au repos et que son activation induit son oligomérisation. À l'inverse, le modèle décrit par l'équipe de Reth²⁴ intitulé « modèle oligomérique et activation par dissociation » présente cette fois un BCR au repos sous forme de polymère dont la fixation de l'Ag va entraîner sa dissociation. Les hypothèses ont été nombreuses. Cependant la dynamique du BCR tient compte, de la nature et des propriétés de l'isotype impliqué, de l'état du cytosquelette intracellulaire d'actine, de la présence de protéine d'adhésion etc. C'est tout un ensemble d'interactions, qui, associé à la reconnaissance de l'Ag, aboutit à la transduction d'un signal d'activation²⁵. L'activation du BCR se traduit par l'établissement de voies de signalisation (Pi3 kinase, MAP-Kinases, voie de la phospholipase C) et la synthèse/activation de facteurs de transcriptions qui vont permettre l'expression de gènes intervenant dans la réponse immunitaire^{26,27}.

Toutefois l'activation de la cellule B-2 va également nécessiter le concours de cellules T auxiliaires folliculaires, ou T_{aux}, présents dans le paracortex des ganglions lymphatiques²⁰²⁸. Effectivement le LB-2 va devoir présenter aux LT_{aux}, préalablement activés, l'antigène qu'il a reconnu. Les cellules B et T vont former une **synapse immunologique**, grâce à des liaisons aux LT via leur **CMH de classe II**.

Si l'antigène présenté est reconnu par le récepteur ou **TCR** du LT_{aux} , celui-ci va émettre un **signal de costimulation activateur** et des **cytokines** (IL-2, IL-4, IL-10...) qui vont activer pleinement le LB et provoquer ensuite sa différenciation.

Il s'agit d'une étape de contrôle qui garantit que seul le LB efficace contre l'antigène responsable de l'infection puisse être activé.

L'activation des LB se produit à l'intérieur des follicules des organes lymphoïdes secondaires, plus précisément dans des structures particulières appelées **centres germinatifs** (figure 6). Suite à sa stimulation, le LB va entrer dans le cycle cellulaire et se diviser activement : cette phase correspond à l'**amplification clonale**. Seul le LB capable de reconnaître l'antigène de façon spécifique va pouvoir proliférer et produire une population suffisante pour constituer une défense. Dans le centre germinatif, la zone d'amplification contenant de nombreux LB en division ou **centroblastes**, apparaît sombre en imagerie : on l'appellera donc **zone sombre**. Durant cette phase d'amplification, le LB va pouvoir modifier son répertoire afin d'augmenter l'affinité de ses immunoglobulines pour l'Ag.

Pour ce faire, le LB dispose d'une enzyme capable d'induire des mutations dans les gènes V d'Ig. Il s'agit de la protéine **AID** pour **Activating-Induced cytidine Deaminase**²⁹. Elle va modifier les désoxycytidines en désoxyuraciles (modification de C-G en C-U) dans l'ADN, entraînant une élimination de la base ou une cassure du brin qui vont nécessiter l'intervention de systèmes de réparation de l'ADN^{30,31}. C'est au cours de ces réparations, qui seront non fidèles, qu'apparaîtront des mutations restreintes aux zones appelées domaines hypervariables dans les régions **CDR** (complementary determining region) des gènes V : on parle alors d'**hypermutation somatique**³².

Une fois sortie de leur phase de multiplication, les LB, qui prendront le nom de **centrocytes**, vont évaluer l'affinité de leur Igs néosynthétisées. Les LB vont reconnaître les Ags situés à la surface des CDFs et déterminer l'affinité de leur BCR vis-à-vis des ligands en appliquant des forces de tension sur la liaison Ag-Ac^{33,34}. En cas de forte affinité, l'Ag sera extrait, internalisé et présenté via un CMHII aux LT_{aux} . C'est uniquement dans cette configuration que les LT_{aux} vont pouvoir sentir indirectement l'affinité des LBs. Le nombre de LT_{aux} présents dans cette zone étant limité, la sélection se fera en faveur des LBs présentant la meilleure affinité pour leur Ag³⁵. Cette étape vise à éliminer tous les LB ayant peu ou pas d'affinité pour l'antigène à cibler et permet de conserver le répertoire le plus affin possible. Cette sélection a lieu en périphérie de la zone sombre et constitue la **zone claire folliculaire**³⁶⁻³⁸. Les LB non sélectionnés par les CFD peuvent bénéficier d'une nouvelle chance de murer leur Ac en retournant dans la zone sombre pour l'éditer.

Au cours de la réponse immunitaire, le LB a la possibilité d'effectuer un changement au niveau de la partie constante des chaînes lourdes d'Igs, sans altération de leur spécificité vis-à-vis de l'Ag : il s'agit de la **commutation de classe** ou **commutation isotypique**. Cette réaction se produit au niveau de la maturation folliculaire des LB et fait intervenir la protéine AID³⁹.

Chez l'homme, le changement de classe va se traduire par l'excision définitive des parties constantes C μ au profit d'une région constante de type γ , α , ϵ ou λ dans le but d'obtenir différentes fonctions effectrices^{31,40} :

- Les **IgM** sont les premières Ig exprimées par les LB. Elles présentent une faible affinité et sont polyréactives, ce qui leur permet d'établir une réponse rapide contre une assez grande variété d'Ags. Elles neutralisent les pathogènes par **opsonisation** et sont capables d'activer le complément en vue de leur élimination.
- Les **IgG** sont les Igs majoritaires du sérum et possèdent la demi-vie la plus longue. On note 4 sous classes d'IgG avec des propriétés différentes comme leur flexibilité ou leur affinité pour les différents FC γ Récepteurs. La reconnaissance des segments Fc par leurs récepteurs va induire la phagocytose du pathogène ou encore l'**ADCC** (Antibody-dependent-cell-mediated-cytotoxicity). Les IgG sont les seules capable de franchir la barrière placentaire et constituent la première défense du fœtus.
- Les **IgA** sont présentes dans le sérum mais surtout au niveau des muqueuses et des sécrétions comme la salive ou le lait maternel⁴¹. Les deux sous classes d'IgA, les IgA1 et IgA2 montrent une répartition distincte due à leur structure protéique. Les IgA2 sont très abondantes aux niveaux des muqueuses et sécrétions car elles neutralisent les toxines, les virus et les bactéries par activation du complément mais surtout par activation du processus de l'**ADCC** par les neutrophiles.
- Les **IgE**, quant à elles sont associées aux réactions allergiques, aux réactions d'hypersensibilité et aux réponses contre les parasites et les vers. Du fait de leur fort potentiel réactif, les IgE présentent une demi-vie plasmatique très courte. En effet en cas de réponse inflammatoire, les IgE vont activer les cellules de Langerhans, les basophiles et les éosinophiles par fixation sur leur FC ϵ RI.
- Le rôle des **IgD** est moins bien connu. Elles interviennent dans la maturation B conjointement aux IgM et peuvent même les substituer⁴². Elles sont présentes en faible quantité dans le sérum⁴³.

La nature de la partie constante déterminera donc à la fois les propriétés des Igs mais aussi l'affinité qu'elles auront pour leurs récepteurs Fc. Les récepteurs Fc activateurs ou inhibiteurs, interviennent dans la régulation et l'exécution de la réponse immune. Pour les cellules de l'immunité innée comme les mastocytes, les macrophages, les neutrophiles, les monocytes ou encore les cellules dendritiques, cela se traduit par une régulation des mécanismes tels que la dégranulation, la phagocytose et l'ADCC⁴⁴. Ils font donc le lien entre immunité innée et immunité adaptative. La régulation de la réponse se fait via les cytokines et les Igs qui vont influencer l'expression des récepteurs Fc à la surface des cellules. Par exemple, l'expression des récepteurs Fc activateurs à la surface des cellules de l'immunité innée peut être augmentée par des stimuli pro-inflammatoires (lipopolysaccharide...), des cytokines de type TH-1 (IFN γ ...) ou encore par la protéine C5a du complément⁴⁵⁻⁴⁷. À l'inverse, des cytokines de type TH-2 comme IL-4, IL-10 ou TGF β vont diminuer l'expression des récepteurs Fc activateurs tout en augmentant celle des récepteurs Fc inhibiteurs⁴⁸⁻⁵⁰.

Néanmoins, l'effet des différentes cytokines peut varier en fonction du type cellulaire considéré⁵¹.

Enfin le destin du LB va aboutir vers deux voies distinctes : la différenciation en cellule effectrice, sécrétrice d'immunoglobulines (plasmocyte) ou en cellule mémoire. Cette différenciation peut se produire à deux moments précis de la réponse antigénique. Au moment de la rencontre avec les LT_{aux} dans le paracortex, le LB peut soit choisir d'entrer dans le centre germinatif, soit se différencier en cellule effectrice ou cellule mémoire. Plus tard, dans le centre germinatif, les LB sélectionnés positivement par les CDF peuvent choisir d'interrompre leur cycle de maturation d'affinité pour quitter le centre germinatif et se différencier en plasmocytes ou LB mémoire. Des études ont montré que l'acquisition d'un phénotype plasmocytoïde était facilité par une haute affinité des anticorps, que ce soit au niveau de la zone T du follicule ou dans le centre germinatif^{52,53}.

Les mécanismes précédemment décrits sont autant de témoins de la complexité et de la finesse de la réponse immunitaire adaptative. Tous les moyens sont mis en œuvre par les différents types cellulaires pour garantir une réponse immunitaire efficace et durable prémunissant l'organisme de futures réinfections. Cette immunité, longue à se mettre en place, laisserai l'organisme vulnérable sans l'intervention d'une immunité innée. Il y a donc complémentarité d'action entre l'immunité innée et adaptative.

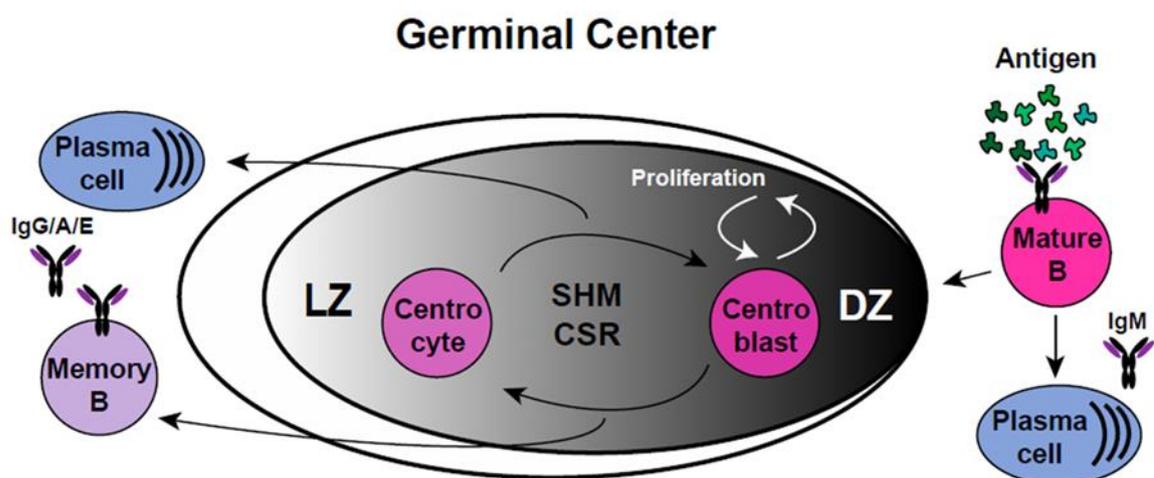


Figure 6 : Schéma récapitulatif de l'activation et maturation des LB suite à la rencontre d'un Ag dans les centres germinatifs où se produisent les phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation de classe (Bahjat 2017¹²).

Avant les années 1980, la population cellulaire B était uniquement rattachée à l'immunité adaptative. La découverte de la sous-population B-1 et de ses propriétés a permis d'élargir le potentiel de ce type cellulaire à un mode de fonctionnement proche de l'immunité innée⁵⁴.

Les LB-1 sont produits au stade embryonnaire et possèdent la capacité d'autorenouvellement. Ils sont capables de reconnaître aussi bien des antigènes de bactéries, virus et parasites que des antigènes du soi. Leur localisation principale se situe dans les cavités pleurale et péritonéale, mais on les retrouve aussi dans les tissus lymphoïdes secondaire, le sang et la moelle osseuse⁵⁵. Une grande proportion des IgM sériques présentes en l'absence de stimulation antigénique, est due aux cellules B-1 de la rate et de la moelle osseuse.

Ces IgM circulantes dites « naturelles », forment une barrière contre les pathogènes en inhibant leur réplication par fixation directe, tout en favorisant la mise en place de l'immunité adaptative grâce à l'utilisation des immunocomplexes comme support de maturation pour les LB-2 folliculaires. Les LB-1 concourent aussi au maintien de l'homéostasie tissulaire grâce à leur capacité de reconnaissance d'antigènes du soi tels que ceux issus des corps apoptotiques, des lipoprotéines de faible densité oxydées et exercent donc une fonction de ménage¹⁴. Aussi ils interviennent dans la maintenance du microbiote, la tolérance vis-à-vis de ce dernier et participent à la régulation de la réponse inflammatoire par leur sécrétion d'Il-10⁵⁶.

Ainsi, l'éventail des fonctions des LB ne cesse de s'élargir au fur et à mesure des recherches et de la découverte de sous-populations B. De nombreux mécanismes impliquant les cellules B doivent encore être mieux appréhendés et justifient l'utilisation de modèles originaux distincts de celui de la souris.

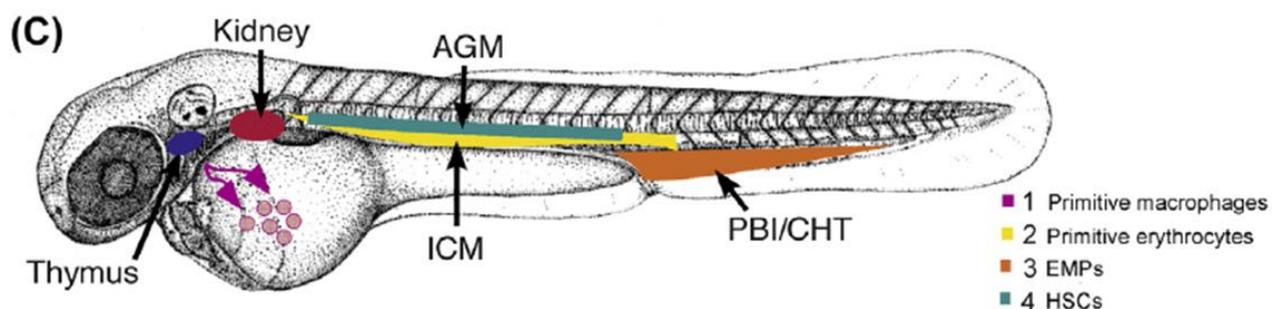
3) La lymphopoïèse B chez le *Danio rerio*

a) L'hématopoïèse et l'émergence des précurseurs lymphoïdes

Depuis les années 1980, le *Danio rerio* a su prouver son utilité comme support d'étude de mécanismes de l'hématopoïèse en situation physiologique et pathologique. En effet, bien que les différents sites de l'hématopoïèse soient distinct des mammifères, les processus de régulation génétique sont, eux, très conservés permettant des analogies avec la souris et l'homme⁵⁷⁻⁵⁹. À l'égal des mammifères, le *Danio* présente deux vagues successives d'hématopoïèse : **primitive** et **définitive**, responsables de la production des cellules et éléments figurés du sang chez l'embryon puis l'organisme adulte. L'hématopoïèse primitive se met en place très rapidement avec la formation de cellules souches érythroïdes primitives dans le mésoderme latéral postérieur dans une zone appelée **masse cellulaire intermédiaire** ou **ICM** (pour intermediate cell mass)⁵⁸ (figure 7). Elle permet l'établissement d'une circulation sanguine dès 24 heures post-fécondation (hpf)⁶⁰. Puis débute la vague définitive de l'hématopoïèse avec la formation de progéniteurs érythro-myéloïdes au niveau de **l'îlot sanguin postérieur** ou **PBI** (pour prosterior blood island).

Ces cellules n'ont ni la capacité d'autorenouvellement ni la possibilité de produire des lignés lymphoïdes. Le point culminant de l'hématopoïèse définitive est atteint avec l'émergence des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) dans la région dorsale de l'aorte ventrale équivalent de l'**AGM** (Aorte-Gonade-Mésonephros) des mammifères^{61,62}. Ces CSHs vont coloniser, par le biais de la circulation sanguine, le **CHT** (Caudal Hematopoietic Tissue) organe hématopoïétique primaire embryonnaire équivalent au foie fœtal chez les mammifères⁶¹, pour former le premier pool de cellules multipotentes capables de produire des cellules lymphoïdes. De là, les progéniteurs thymiques vont rejoindre le thymus pour former dès 3 jpf les LT^{61,63}.

Le CHT et le pronéphros vont occuper le rôle de sites primaires de l'hématopoïèse avant la formation complète du **rein**, organe définitif de l'hématopoïèse tout au long de la vie du *Danio*⁶⁴.



*Figure 7: Localisation des différents sites de l'hématopoïèse chez le *Danio rerio* (figure de Stachura et Traver 2016⁶⁵).*

Ainsi, l'émergence des progéniteurs lymphoïdes et le lieu de maturation des cellules de la lignée T ont pu être clairement déterminés. À l'inverse, le lieu de maturation des progéniteurs de la lignée B avant la formation du pronéphros reste encore à déterminer. Dans son article de 2002, Danilova utilise l'hybridation *in situ* pour localiser les différents sites d'expression de RAG et des IgM membranaires dans le but d'identifier les potentiels lieux de maturation de la lignée B. C'est ainsi qu'ils ont rapporté une expression de RAG dès 4 jpf au niveau du pancréas (expression conjointe de RAG et d'insuline par hybridation *in situ*)⁶⁶. Ils en ont conclu que le pancréas jouerait le rôle de site de maturation des LB avant la formation du pronéphros chez le *Danio*. Toutefois, aucune étude ultérieure portant sur l'identification des précurseurs B n'a confirmé cette observation^{67,68}.

b) La maturation et la réponse B

Les premières étapes du développement cellulaire B sont encore à préciser. En effet, l'absence de marqueurs spécifiques complique l'identification des différents stades cellulaires et mécanismes qui s'y rapportent comme par exemple, la présence de pré-BCR. À ce jour, aucun gène homologue de VpreB et de $\lambda 5$ n'a été identifié chez les téléostéens. Néanmoins chez le *Danio*, des transcrits de chaînes légères ne possédant pas de segment V ont été décrits⁶⁹. Ces transcrits JC, présents aussi chez l'homme^{70,71}, pourraient former des substituts de chaîne légère capables de remplacer $\lambda 5$ dans la formation d'un pré-BCR. Seule une analyse approfondie des chaînes légères d'immunoglobulines permettrait d'identifier un éventuel isotype jouant le rôle de SLC chez le *Danio*.

Le manque de données concernant les stades précoces de maturation B constitue un obstacle majeur pour la compréhension et la mise en place de l'immunité chez le *Danio rerio*. De nombreux gènes orthologues à ceux des mammifères⁷² comme les protéines RAG, ou encore des facteurs de transcriptions comme *Ikaros* se sont révélés pertinents pour l'étude de la différenciation lymphocytaire, permettant l'identification des différents sites de développement des lignées. La caractérisation des gènes RAG1 et RAG2 et de leur profil d'expression chez la larve et l'adulte ont permis à la fois de confirmer le rôle du rein et du thymus comme organes lymphoïdes primaires⁷³, mais aussi d'établir une lignée de poissons transgéniques RAG1⁷⁴. Par ailleurs les études portant sur le facteur de transcription *ikaros* ont montré un rôle similaire chez le poisson et les mammifères. Effectivement, il semble tenir un rôle primordial dans la lymphopoïèse car l'induction d'une mutation dans la partie C-terminale en doigt de zinc affecte négativement la maturation des LT et LB⁷⁵ : le réarrangement des gènes μ est retardé, les LB-IgM formés présentent un répertoire limité et les LB-IgZ sont totalement déplétés.

Ainsi l'activité de RAG et *Ikaros* associée à l'expression de la chaîne γc du récepteur à l'IL-2 chez l'embryon de *Danio* témoignent d'une mise en place précoce de la lymphopoïèse⁷⁶. Toutefois la formation d'une immunité complète ne se fait qu'au bout de 4 à 6 semaines post-fécondation (spf) dans les conditions décrites par l'équipe de Lam⁶⁷. Cela suggère que l'embryon est capable de produire rapidement des cellules B mais celles-ci demeurent « inachevées », ne fournissant qu'une réponse sommaire. Ces résultats sont confirmés par l'analyse des répertoires immunitaires. Effectivement une étude menée chez des poissons de 2 semaines a montré un répertoire stéréotypé avec un petit nombre de combinaisons VDJ utilisés pour l'expression des Igs⁷⁷. À l'inverse, chez des poissons adultes, l'analyse des répertoires a révélé qu'une grande part du potentiel de combinaison V, D, J était effectivement utilisé, portant le nombre d'IgM différentes entre 1200 et 3500 environ par individu⁷⁸. Ainsi le répertoire se diversifie avec l'âge et certaines séquences présentes auparavant aux stades précoces semblent disparaître à l'âge adulte⁷⁷. Cette diversification du répertoire suggère une maturation d'affinité des Igs associée à une sélection clonale. Cette hypothèse est confirmée par l'observation de l'accumulation de cellules B exprimant

des Igs hypermutées chez les poissons adultes^{79,80}. Mais l'absence de centres germinatifs et de ganglions lymphatiques chez le *Danio* pose la question du lieu où se produit cette maturation d'affinité. Car il est bien capable d'effectuer la maturation d'affinité, comme le témoigne l'expression de la protéine AID, indispensable pour cette fonction. La protéine AID des poissons est structurellement et fonctionnellement différente de celle des mammifères. Elle est plus robuste et catalyse ses réactions à des températures plus basses⁸¹. Elle effectue l'hypermutation somatique en catalysant la déamination des désoxycytidine en désoxyuracile, mais ne peut effectuer la commutation de classe chez les poissons^{82,83}.

C'est d'ailleurs en utilisant AID comme marqueur que des sites d'hypermutation somatique, que des ébauches de centres germinatifs ont pu être révélées chez le poisson chat (autre téléostéen)⁸⁴.

Ces structures s'articulent autour de groupements de cellules mélano-macrophagiques, qui jouent le rôle de cellules dendritiques folliculaires, de cellules T CD4+ et de cellules B AID+. La persistance des Ag à la surface des cellules mélano-macrophagiques favoriserait la rencontre avec les LB AID+, leur permettant de sélectionner les Igs après maturation⁸⁵.

La mise en évidence de ces structures n'a cependant pas levé le mystère entourant la maturation d'affinité chez les téléostéens. En effet, les modalités de formation de ces structures demeurent inconnues. Ces sites de maturation d'affinité ont été révélés chez la carpe et le poisson chat mais pas encore chez le *Danio*, même si leur présence est fortement supposée. Néanmoins, le gène AID étant parfaitement caractérisé chez le *Danio*, il est tout à fait envisageable de mener une telle étude.

c) Les différents isotypes d'Ig

Les téléostéens se distinguent par l'expression d'un isotype de chaîne lourde spécifique nommé **T**⁸⁶ pour téléostéens (ou **Z** chez les cyprinidés⁸⁷). C'est l'un des trois isotypes exprimés par les LB avec les IgM et les IgD. L'expression du gène μ entraîne la délétion du gène ζ . Un LB ne peut donc exprimer ces deux Igs en même temps. Ce mécanisme résulte d'une recombinaison alternative et ne constitue pas une commutation de classe. L'expression de l'IgT se fait donc dès les premiers stades de maturation B, sans passage à un stade récepteur de type IgM.

Malgré une découverte en 2005, ce n'est qu'en 2010 que les caractéristiques biochimiques et les fonctions des IgT sont décrites⁸⁸. L'IgT est une Ig spécifique des muqueuses. On la retrouve majoritairement au niveau des intestins, des branchies et de la peau sous forme de polymères (4 à 5 monomères). Elle est présente également au niveau du sang mais en plus faible quantité et sous forme monomérique. Elle est responsable de l'immunité des muqueuses tandis que les IgM garantissent une immunité systémique en cas d'infection.

En 2000, l'équipe de Robert N. Haire amplifie et caractérise **trois isotypes de chaînes légères** d'Igs (figure 8) ⁶⁹. Une particularité du *Danio* par rapport à la truite et au poisson chat qui n'en possèdent que deux.

Au cours de ces analyses, ils ont dû faire face à un nombre impressionnant de transcrits germinaux stériles au sein des ADN complémentaires (ADNc) traités. L'autre fait marquant a été la mise en évidence de sites cryptiques d'épissage conduisant à la formation de transcrits non réarrangés de type 2. La présence de ce type de transcrits atypiques a été reportée pour les gènes κ humains ⁷⁰. Ces transcrits sont notamment présent dans les précurseurs B dans les premières étapes de réarrangement des gènes.

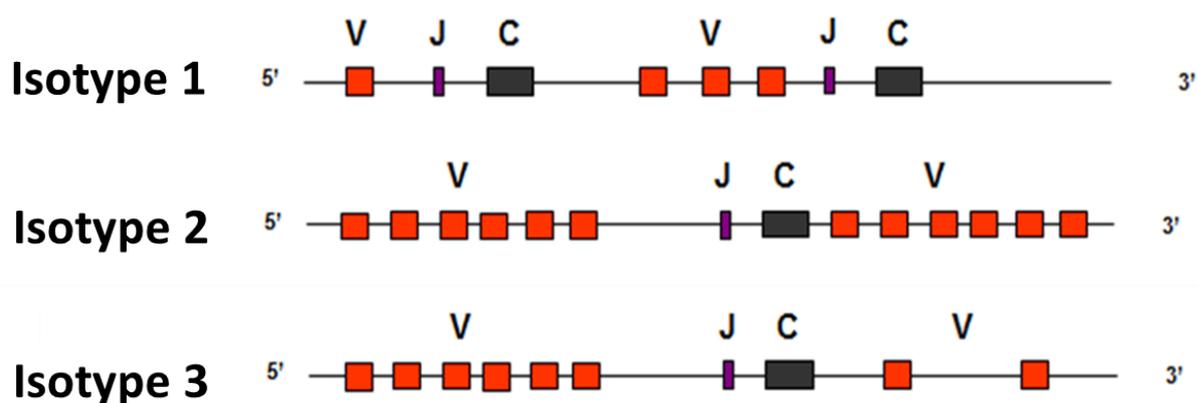


Figure 8 : Schéma de l'organisation des gènes des trois isotypes de chaînes légères de *Danio rerio*.

La première description des loci de chaînes légères a été réalisée par l'équipe d'Ellen Hsu ⁸⁹. Ils ont décrit l'organisation des gènes VJC ainsi que les modalités de recombinaisons.

Ainsi pour l'isotype 2, tous les gènes sont dans la même orientation transcriptionnelle. Le réarrangement VJ peut se faire avec ou sans délétion de la région C du cluster comme décrit dans les figures 10a et 10b.

Un locus de l'isotype 3 a été identifié sur le chromosome 5. Il comprend huit gènes V, six en amont et deux en aval d'un gène J et d'un gène C. Parmi les huit gènes V, sept sont en orientation transcriptionnelle inverse des gènes J et C. La recombinaison se fera donc par inversion des gènes J et C pour les gènes V situés en aval tandis que les gènes V situés en amont seront inversés pour se lier au gène J (figure 10c et 10d).

Pour l'isotype 1, on note trois locus sur le chromosome 19, un sur le chromosome 1 et un dont le chromosome n'a pas encore été identifié (figure 9). L'isotype 1 présente une organisation de type **cluster** avec un nombre de gènes V plus restreint pour chaque cluster par rapport aux isotypes 2 et 3 (figure 8 et 9).

Les trois isotypes présentent une organisation et des caractéristiques non retrouvées chez les autres poissons osseux suggérant une relative plasticité des gènes de chaînes légères⁹⁰.

Type 1

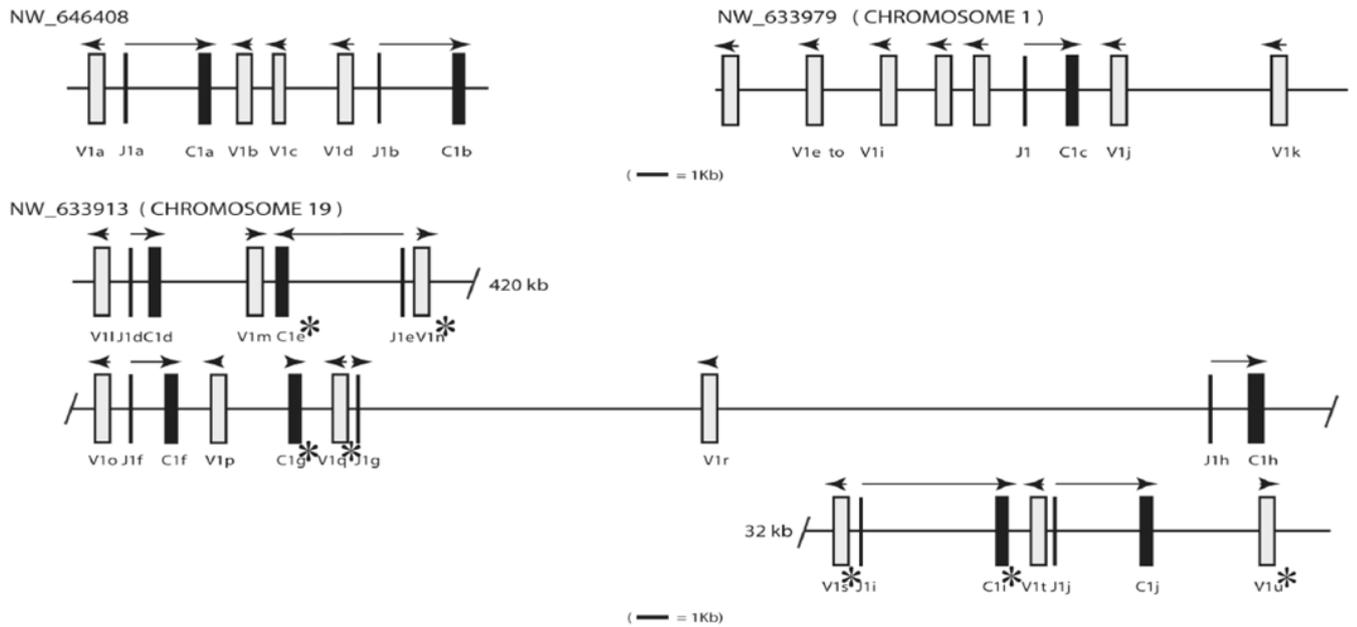


Figure 9: Schéma de l'organisation des gènes de l'isotype 1 des chaînes légères de *Danio rerio* (image modifiée de Hsu 2006⁸⁹).

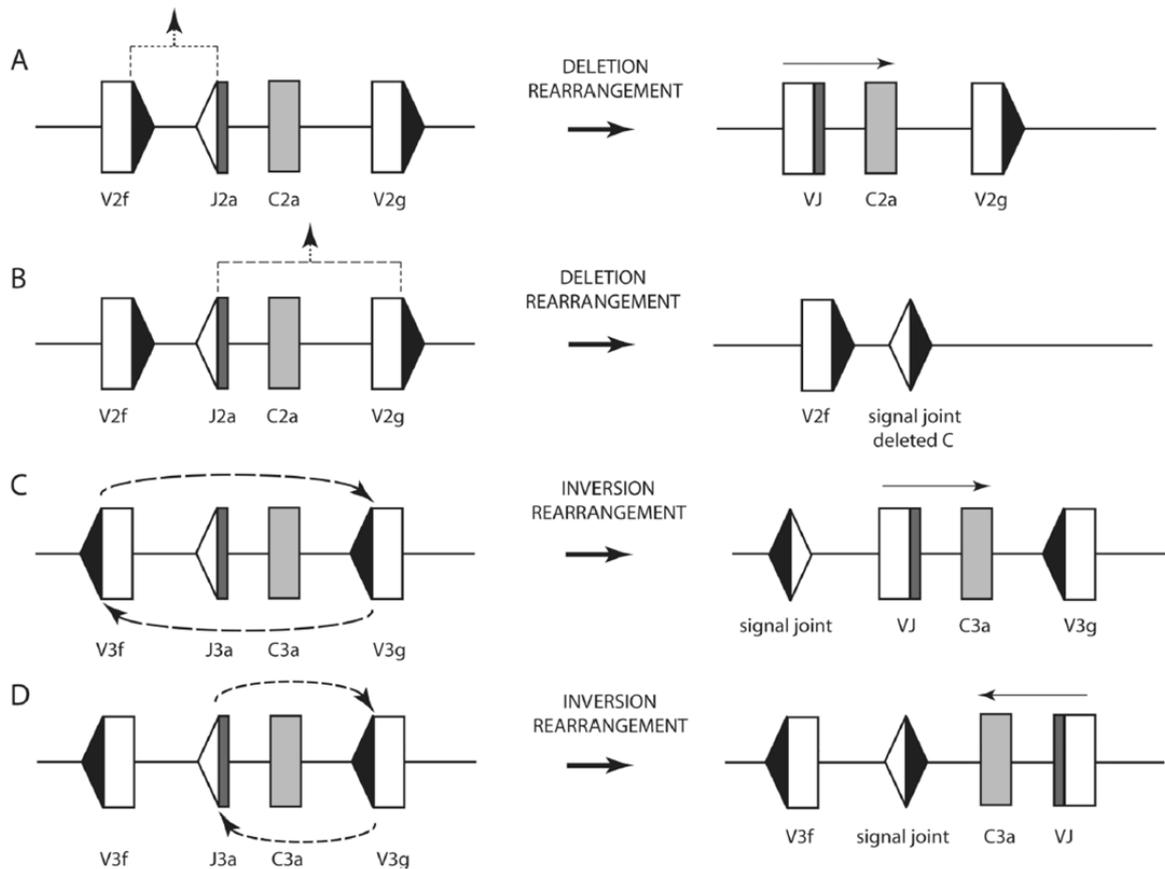


Figure 10 : Représentation schématique des différentes recombinaisons possibles pour les trois isotypes de chaînes légères de *Danio* (image de Hsu 2006⁸⁹).

Cependant, l'identification des différents loci chromosomiques des chaînes légères est remise en question deux ans plus tard par l'analyse de l'équipe d'Anastasia Zimmerman⁹¹. Effectivement, les 84 segments de gènes de chaînes légères identifiés chez le *Danio* ont été localisés sur cinq chromosomes distincts : le chromosome 1, le 12, le 19, le 24, le 25, et le chromosome 5 mentionné précédemment ne l'est plus. Ainsi ils décrivent des loci de l'isotype 1 sur les chromosomes 1, 19 et 24, des loci l'isotype 2 sur le chromosome 12 et des loci de l'isotype 3 sur le chromosome 25. Le nombre de gènes et l'orientation de chaque loci sont alors décrits (figure 10). Le *Danio* est donc capable de générer des chaînes légères d'Ig à partir de cinq chromosomes différents, soit au total 10 autosomes portant des loci fonctionnels avec chacun plusieurs gènes V et J. Les mécanismes d'exclusion allélique et de silencing mis en place doivent être suffisamment conséquents pour pouvoir limiter l'expression d'un aussi grand nombre de gènes éparpillés dans tout le génome.

Bien que phylogénétiquement éloignés des chaînes Kappa et Lambda (Annexe 1), la découverte de séquences de type RSS heptamer et nonamer dans les régions introniques JC suggère un mécanisme de réarrangement similaire à celui des mammifères.

Le travail d'identification et de compréhension des réarrangements des chaînes légères de *Danio* n'en est qu'à ses débuts. Les remises en question d'un article à l'autre compliquent relativement les choses, bien qu'une harmonisation des données tende à émerger. La stéréotypie observée aux stades précoces de développement des poissons laisse à penser d'une utilisation préférentielle d'un gène V par rapport aux autres. Dans quelle mesure ce phénomène se produit-il ? Cette sélection se limite-t-elle à un isotype ou s'effectue-t-elle sur certains gènes V ? Cela doit encore être déterminé. Autre élément qu'il serait intéressant d'analyser est la contribution de la vague primitive d'hématopoïèse à la composition du répertoire immunitaire précoce. Cela permettrait peut-être l'identification d'une sous-population B, à l'instar des cellules B-1 présentes chez la souris. Mais il ne s'agit là que de suppositions.

Finalement, il y a de nombreuses zones d'ombres qui persistent tout au long de la maturation B chez le *Danio*. Mais le déchiffrement du génome et l'accessibilité de techniques de pointes tend à réduire de plus en plus ces interrogations. Il est clair que la contribution des études chez les autres téléostéens apporte un éclairage et un fil conducteur à celles menées chez le *Danio*. Cependant chaque espèce étant unique, la découverte de processus propre au *Danio* n'est pas à négliger.

II. L'étude des répertoires anticorps chez le *Danio rerio*

L'étude des répertoires immunitaires s'est imposée comme une évidence avec l'avènement du séquençage. À partir d'un répertoire au départ unique et stéréotypé, un individu est capable de lutter contre la plupart des pathogènes de son environnement. L'analyse de l'évolution des répertoires au cours de la vie d'un organisme est le reflet de son adaptation à son environnement. Elle a permis de mettre en exergue l'organisation des gènes d'Ig, les modalités régissant leur expression, mais aussi des phénomènes tels que l'hypermutation somatique qui permet d'augmenter l'affinité d'un Ac vis-à-vis d'un Ag donné.

Aujourd'hui l'analyse des répertoires immunitaires s'est simplifiée avec l'avènement des outils de Next Generation Sequencing permettant d'obtenir une description complète ou quasi complète des séquences produites par PCR⁹². Cela s'est traduit par une accumulation de plus en plus considérable de données informatiques à analyser et à interpréter constituant un nouveau défi à relever pour les chercheurs. Néanmoins l'alimentation des bases de données disponibles en libre accès contribue à simplifier l'identification de séquences inconnues par simple comparaison. C'est sur ce principe que nous nous sommes appuyés pour entamer l'analyse du répertoire B du *Danio* aux stades précoces de son développement. Nous nous sommes plus précisément attardés sur les modalités d'expressions des chaînes légères chez le *Danio*.

1) Matériels et méthodes

a) Élevage des poissons et extraction des ARN totaux

Les poissons sont élevés dans des aquariums individualisés dans des conditions extrêmement contrôlées. L'eau filtrée est maintenue à une température constante de 28°C avec une salinité strictement contrôlée pour un maintien du pH à 7,2. Ils sont quotidiennement nourris à base de nourriture synthétique spécifique à raison de trois rations par jour⁹³. Pour la reproduction, qui a généralement lieu le matin, les poissons sont placés dans un bac de ponte dans lequel le mâle dépose sa semence sur les œufs pondus par la femelle. Ces bacs présentent une grille au fond permettant le passage des œufs, empêchant que ces derniers ne soient dévorés par les adultes. Les œufs pourront alors être récupérés et placés dans des boîtes de Pétri, plus simples à manipuler. Ainsi les premiers stades de développement sont directement observables : des divisions cellulaires successives à la formation de l'embryon, de l'éclosion jusqu'à l'âge adulte. Le développement jusqu'au stade adulte dure environ 120 jours pour une vie totale du poisson d'approximativement 18 mois.

Afin de garantir un bon développement des larves, des tetrahymenas, protozoaires ciliés, sont ajoutés dans le milieu. Elles servent à la fois de nourriture aux poissons et de barrière antibactérienne en limitant le développement de celles-ci.

Pour l'analyse des répertoires anticorps, nous avons extrait et purifié les ARN totaux des larves à différents jours post fécondation (jpf). Les larves ont été anesthésiées avec de la Tricaïne, rincées au PBS (Phosphate Bufferd Saline) froid puis disposées dans une solution de Tripure® durant un quart d'heure avant un passage dans un homogénéiseur Polytron. Les ARN ont été isolés dans la phase aqueuse par extraction liquide/ liquide : phénol puis chloroforme. Enfin ils ont été précipités en éthanol à -20°C, rincés à l'éthanol 70% et conservés dans une solution 5 mM TRIS à pH 8. La densité optique des échantillons d'ARN purifiés a été mesurée afin de déterminer leur concentration.

b) PCR et clonage des séquences

Une fois les ARN totaux récupérés, nous avons synthétisés les ADNc correspondant par Reverse Transcription (RT). Ensuite nous avons amplifié par PCR les ADNc de trois types de chaînes légères (LC) grâce aux oligonucléotides amorces choisis (tableau 1) après analyse des séquences AF246185 (type 1), AF246162 (type 2), AF246193 (type 3)⁶⁹. Les oligonucléotides sens ont été placés dans les régions charpentes (framework) de la région V, tandis que les oligonucléotides anti-sens ont été disposés au début de la région C. Nous avons utilisé deux

couples d'oligonucléotides primers pour chaque type de LC : un des couples se situant à l'intérieur du premier comme décrit dans la figure ci-après (figure 11).

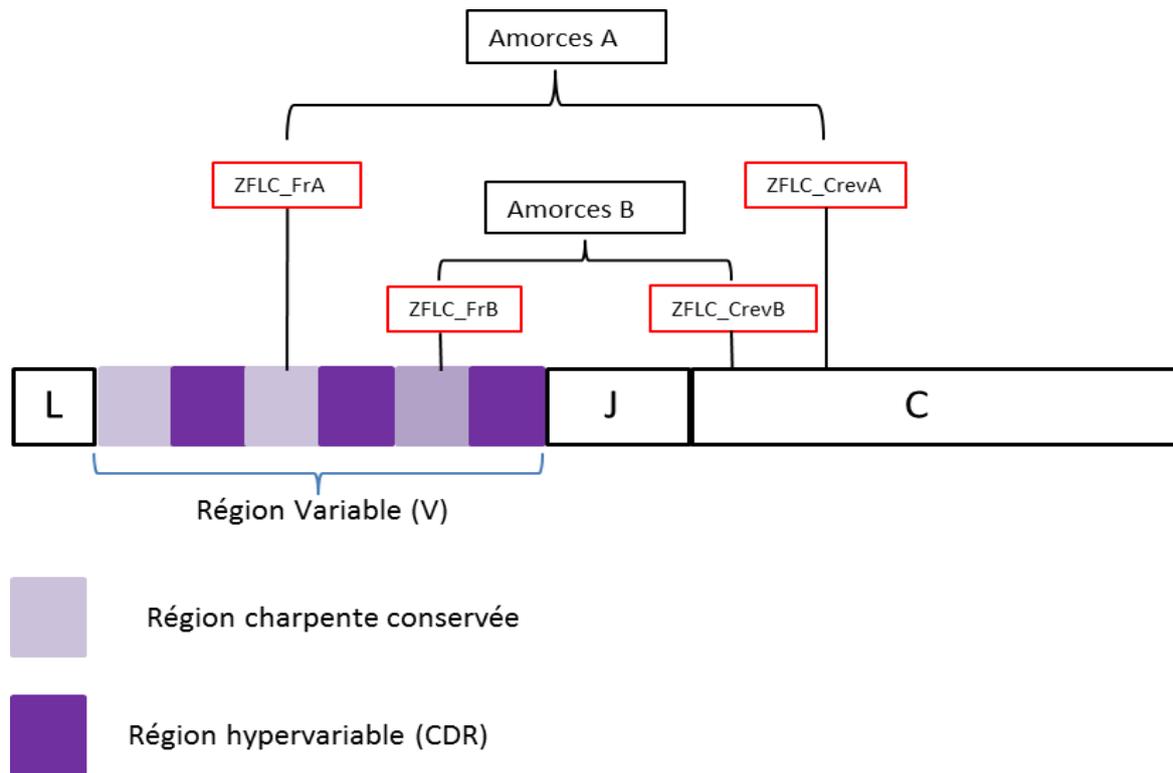


Figure 11 : Représentation schématique de la séquence d'une chaîne légère (LC) et position des oligonucléotides primer sens (ZFLC_FrA / ZFLC_FrB) et anti-sens (ZFLC_CrevA / ZFLC_CrevB) utilisés pour l'amplification des LC de *Danio rerio*. La position des primers varie en fonction du type de chaîne considérée ; les tailles attendues sont donc différentes pour chaque type de chaîne.

N° Accession	Type de LC	Nomenclature	Orientation	Séquence (5'-3')
AF246185	Type 1	ZFLC1_FrA	Amorce 1 sens	AGTGCTGCTCTCTGAACCTG
		ZFLC1_CRevA	Amorce 1 anti-sens	TGCTGCTCAGTGAGAGTCAG
		ZFLC1_FrB	Amorce 2 sens	TGGTACTTACAGAGACCTGGA
		ZFLC1_CRevB	Amorce 2 anti-sens	TGTACAGACCGTCCTTCTC
AF246162	Type 2	ZFLC2_FrA	Amorce 1 sens	ACAAACCGCTCAACTGGAC
		ZFLC2_CRevA	Amorce 1 anti-sens	TAACCGAGTTCCCGTTCAC
		ZFLC2_FrB	Amorce 2 sens	ATGGTACAAACAGACTTCAGC
		ZFLC2_CRevB	Amorce 2 anti-sens	TCTTCTCTGGATGATGGACG
AF246193	Type 3	ZFLC3_FrA	Amorce 1 sens	CAGAGTCCTGCTGGAAAAATG
		ZFLC3_CRevA	Amorce 1 anti-sens	TCGCTTCTCCATTCTTCTC
		ZFLC3_FrB	Amorce 2 sens	GGAGAAGCTCCTAAACTCCTG
		ZFLC3_RevB	Amorce 2 anti-sens	TCTCTTGAGCTTCAGGACGC

Tableau 1 : Séquences amorces utilisées pour l'amplification des LC de type 1, 2 et 3.

Les PCR utilisant la Taq polymérase ont été réalisées suivant le protocole ci-après :

- Matrice ADNc : 1 µL
- Amorce sens (10 pmol/l) : 2,5 µL
- Amorce anti-sens (10 pmol/mL) : 2,5 µL
- dNTP : 2 µL
- Tampon Taq polymérase : 5 µL
- Solution MgCl₂ : 1,5 µL
- Enzyme Taq polymérase : 0,5 µL
- H₂O : QSP 50 µL soit 35 µL

Les conditions de la réaction de PCR sont :

10 min à 94°C
42 sec à 94°C
30 sec à 55°C
1min 30sec à 70°C
10 min à 70°C.

} 32 cycles

Pour chaque réaction, des contrôles positifs (actine) et négatif (matrice ADNc substitués par de l'eau) ont été réalisés.

En fin de PCR on obtient les produits présentés (figure 12) dont les tailles attendues pour chaque couple sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 2).

Couples amorces	Taille (pb)
LC1_FrA/LC1_RevA	566
LC1_FrB/LC1_RevB	438
LC2_FrA/LC2_RevA	447
LC2_FrB/LC2_RevB	304
LC3_FrA/LC3_RevA	581
LC3_FrB/LC3_RevB	434
Actine	397

Tableau 2 : Tailles attendues des produits d'amplification fonctionnels des chaînes légères (LC) de type 1, 2 et 3 en fonction des différents couples d'amorces utilisés.

Afin de déterminer si les transcrits des LC1, LC2 et LC3 étaient fonctionnels ou non, nous avons clonés les séquences amplifiées à l'aide du kit TOPO®TA Cloning® (pCR TOPO-II vector voir annexe 2)⁹⁴ en vue d'un séquençage.

Pour ce faire, les séquences ont été insérées dans les plasmides, transfectés par la suite dans des bactéries électro-compétentes par électroporation. Les colonies d'intérêt ont été sélectionnées grâce au système Xgal. La substance Xgal ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, est un galactoside lié à un noyau indol qui peut être hydrolysé par la β -galactosidase, libérant sa partie indolique qui bleuit par oxydation. Le vecteur utilisé possède une séquence codante pour la β -galactosidase comportant en son sein un site de clonage. L'insertion d'une séquence d'intérêt dans le vecteur va inhiber la synthèse de la galactosidase qui ne pourra donc pas être exprimée pour hydrolyser la substance Xgal présente dans le milieu. Ainsi les colonies dont le plasmide a intégré une séquence seront de couleur blanche, car la substance Xgal ne sera pas hydrolysée, contrairement aux colonies bleues témoignant d'un vecteur demeuré intact. Ce système facilite grandement l'identification des colonies d'intérêt à analyser. Les plasmides ont été purifiés et, après vérification de la présence d'un insert par digestion avec l'enzyme de restriction EcoR1, envoyés à séquencer. L'extraction des plasmides a été réalisée à l'aide du kit d'extraction NucleoSpin de MACHEREY-NAGEL®.

c) Analyse des séquences

Le traitement et l'annotation des séquences a été fait à l'aide du logiciel Accelrys gene®. Nous avons vérifié que les produits amplifiés correspondaient bien à des séquences de chaînes légères par confrontation avec les bases de données (**Blast**®⁹⁵ et **IMGT**®⁹⁶).

2) Résultats

a) Profil d'expression des chaînes légères d'immunoglobulines

Après avoir vérifié que les couples d'amorces synthétisés étaient fonctionnels (figure 12), nous avons voulu analyser le profil d'expression des trois types de LC. Des études antérieures menées au laboratoire avaient montré une expression des transcrits de chaînes lourdes d'Ig λ dès 7jpf (données non publiées). Ne sachant pas si les chaînes lourdes réarrangent avant les chaînes légères chez le *Danio*, nous avons choisi, dans un premier temps, de débiter les analyses de 7 jpf à 30 jpf. Nous avons obtenus les résultats présentés (figure 13 a et b).

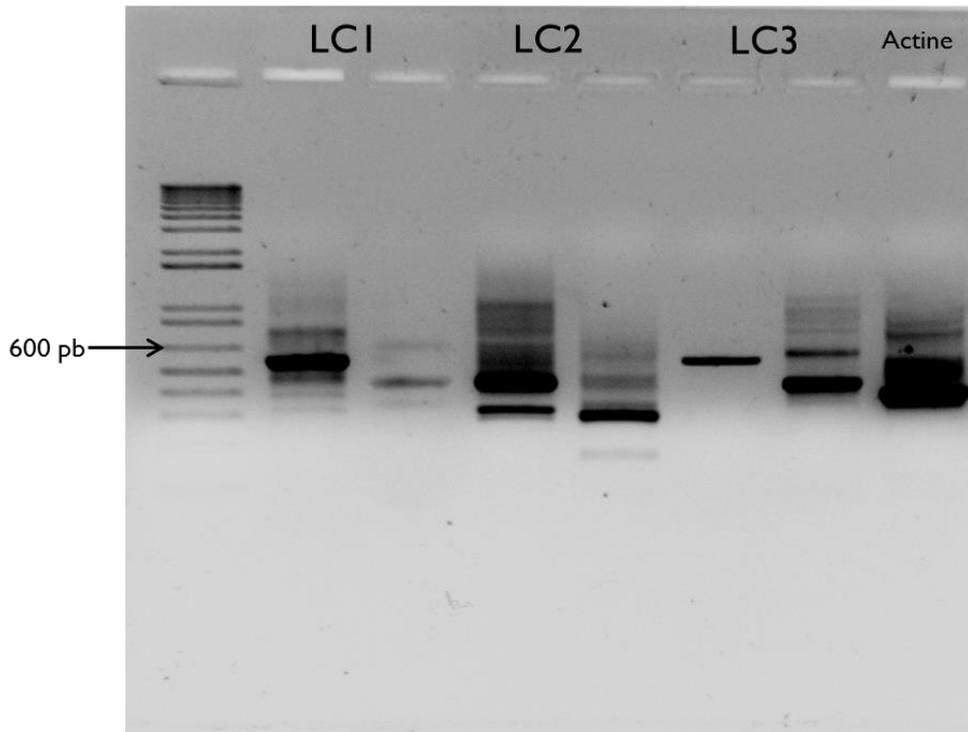


Figure 12 : Gel électrophorèse présentant les produits d'amplification des LC 1,2 et 3 avec les différents couples d'amorces chez des poissons de 30 jpf.

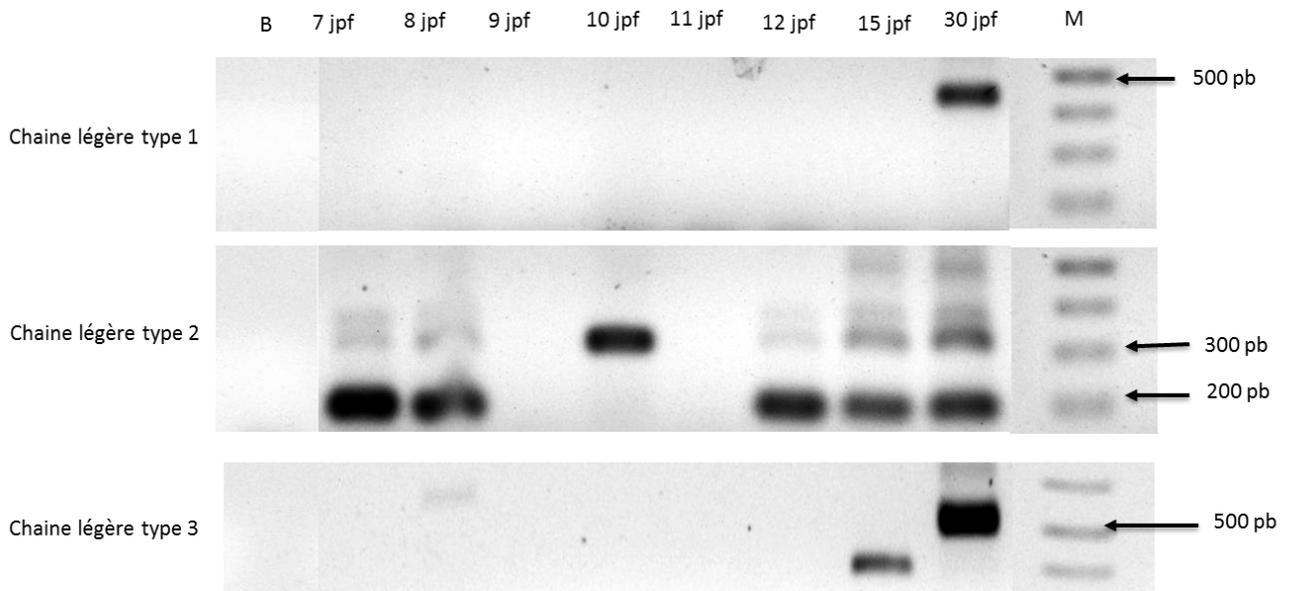


Figure 13a : Gel électrophorèse présentant les produits d'amplification des LC 1, 2 et 3 obtenus avec les amorces B chez des poissons de 7 à 30 jpf.

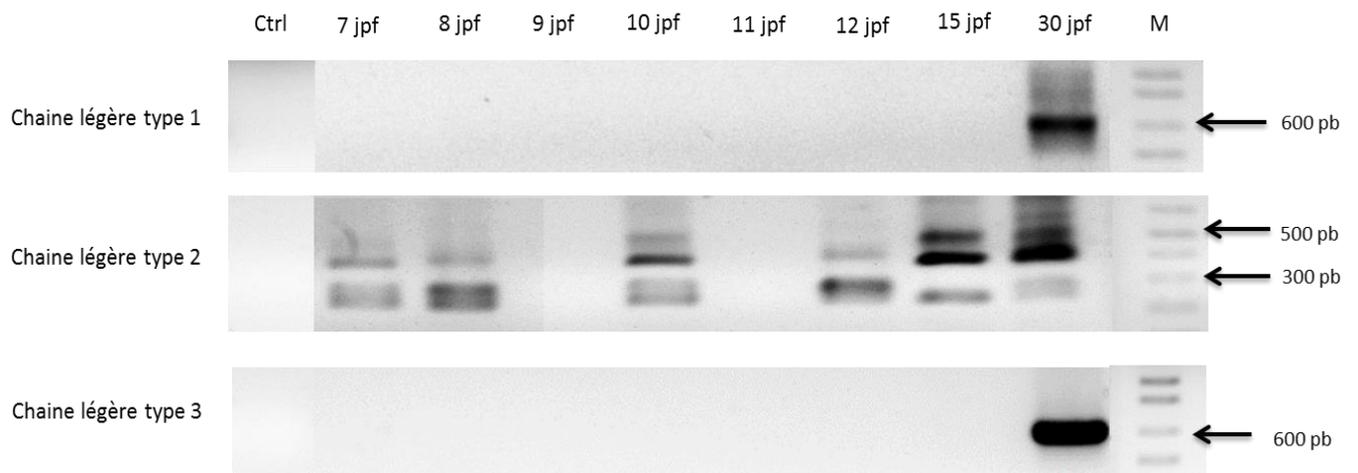


Figure 13b : Gel électrophorèse présentant les produits d'amplification des LC 1, 2 et 3 obtenus avec les amorces A chez des poissons de 7 à 30 jpf.

L'analyse des gels nous révèle une expression précoce des LC de type 2, dès 7 jpf avec une interruption à 9 et 11 jpf. Par rapport aux autres LC qui sont produites à 15 jpf pour le type 3 et 30 jpf pour le type 1. Il y aurait donc une expression restreinte aux LC de type 2 (LC2) dans les stades précoces de développement. Pour conforter ces observations, nous avons ré-effectué l'expérience sur les LC2 avec un autre échantillon d'ADNc, de 6 à 30 dpf, et nous avons obtenu le même profil d'expression (figure 14). À savoir une expression des LC 2 dès 6 jpf avec une interruption cette fois-ci à 8 et 9 jpf.

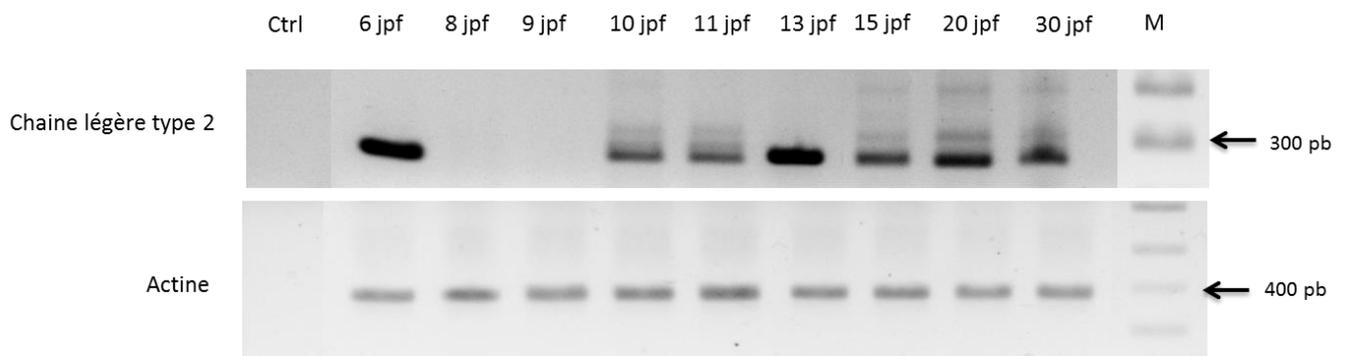


Figure 14 : Gel d'électrophorèse présentant les produits d'amplification des LC2 avec le couple d'amorces B chez des poissons de 6, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 20 et 30 jpf.

Concernant les bandes intenses de 200pb observées pour les LC2, il est difficile de conclure à ce stade. La taille ne correspond ni à une hybridation des amorces, ni au produit attendu. Seul le clonage et le séquençage permettront d'y voir plus clair.

Nous avons donc cloné les transcrits des LC2 produits à 6, 13 et 30 jpf. Puis nous avons vérifié la bonne intégration des séquences dans les plasmides par digestion avec l'enzyme de restriction EcoRI avant de les envoyer à séquencer.

Nous avons débuté l'analyse des séquences amplifiées en vérifiant qu'il s'agissait de séquences d'Igs par confrontation avec les bases de données grâce à l'outil **Blast**⁹⁵. Les séquences analysées présentaient une homologie de 99% avec des séquences partielles ou complètes de chaînes légères de *Danio*. Puis par alignement, nous avons réussi à identifier les séquences V, J et C pour chaque clone séquencé. Les transcrits des LC1 et LC3 étaient tout à fait fonctionnels, avec une phase de lecture ouverte aboutissant à la synthèse complète d'une chaîne légère d'Ig. Il en est de même pour les transcrits des LC2 dès 15 jpf. Toutefois les séquences produites avant 15 jpf sont des séquences non fonctionnelles, formées grâce à l'utilisation de sites donneurs d'épissage cryptique au sein des régions variables et d'un site accepteur d'épissage situé légèrement en amont des signaux de recombinaison (RSS) de la région de jonction (J) (voir figure 15). La présence de ces transcrits, appelé **transcrits germinaux**, est une étape normale de la production de transcrits de chaîne légère fonctionnelle et témoigne d'un engagement des cellules dans un processus de différenciation B. Le processus de maturation des ARNm des chaînes légères de *Danio* semble subir le même parcours que celui décrit chez la souris.

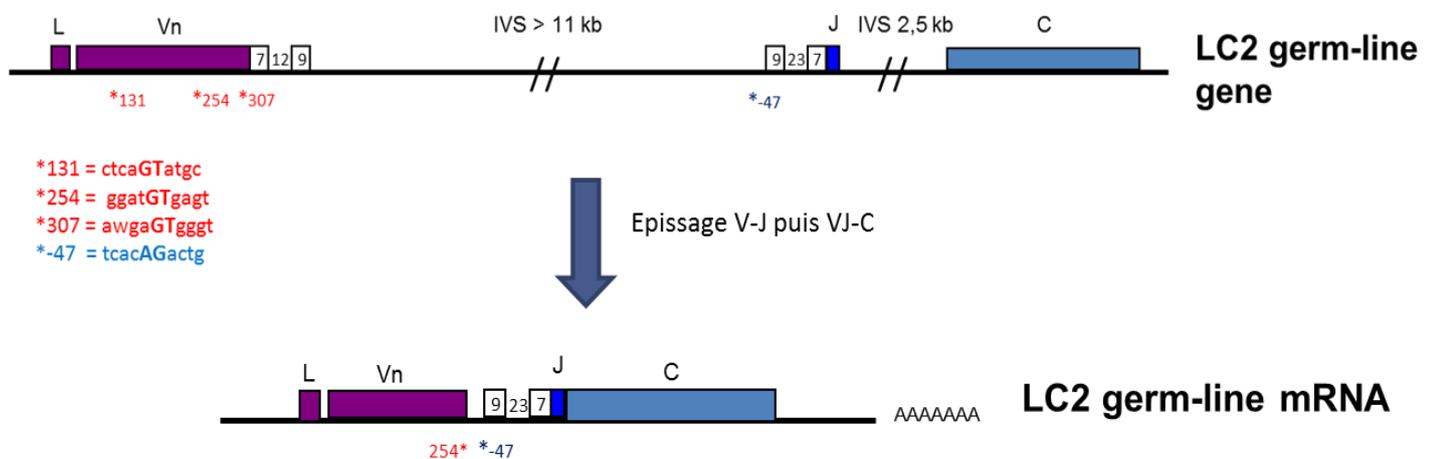


Figure 15 : représentation schématique de la séquence génomique LC2 et d'un ARNm LC2 génomique résultant de l'utilisation du site cryptique d'épissage de la région variable *254.

En alignant les différentes séquences clonées, nous avons constaté que peu des gènes VJC différents étaient utilisés. Les régions charpentes des régions V, les régions J et C étaient souvent les mêmes d'un clone à l'autre pour un même type de chaîne, supposant une utilisation préférentielle des certains gènes par rapport aux autres (Annexe 2).

Peut-être qu'il existe un ordre de réarrangement des gènes des LC. C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer les positions des différents gènes V J et C mentionnés dans la littérature sur les séquences génomiques des chromosomes correspondant afin de mieux appréhender l'expression de ce derniers.

A l'aide d'une PCR nichée, nous avons voulu savoir si d'autres séquences, trop faible pour donner un signal observable, pouvaient être amplifiées. Nous avons donc un premier temps réalisé une PCR avec le couple d'amorce ZFLC2_FrA / ZFLC2_CRevA, puis en utilisant la première PCR comme matrice, nous avons lancé la seconde PCR avec le couple ZFLC2_FrB / ZFLC2_CRevB.

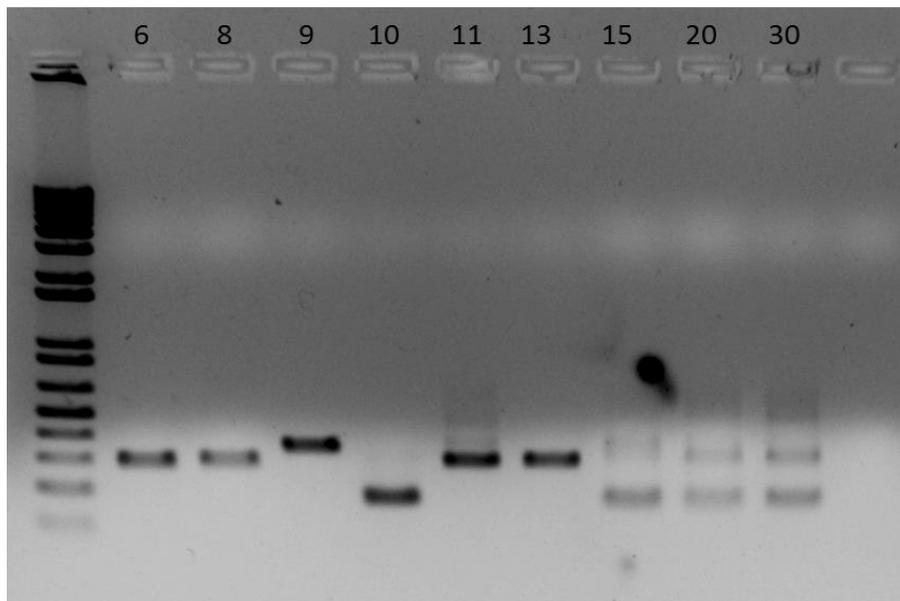


Figure 16: Gel d'électrophorèse présentant les produits d'amplification des LC2 obtenus après la PCR nichée chez des poissons de 6, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 20 et 30 jpf.

Nous avons constaté que l'interruption des transcrits à 8 et 9 jpf n'était plus visible (figure 16). Nous avons donc clonés et séquencés les jours 6, 8, 9 et 11 pour en savoir plus. En analysant les séquences, nous avons découvert que les transcrits amplifiés à 8 et 9 jpf étaient tronqués et non fonctionnels.

Par la suite, nous avons poussé la réflexion plus loin en essayant de déterminer plus précisément le début des réarrangements des LC. Nous avons donc étudié l'expression des LC2 plus tôt, dès 3 jpf, tout en gardant LC1 et LC3 comme témoins positifs (figure 17).

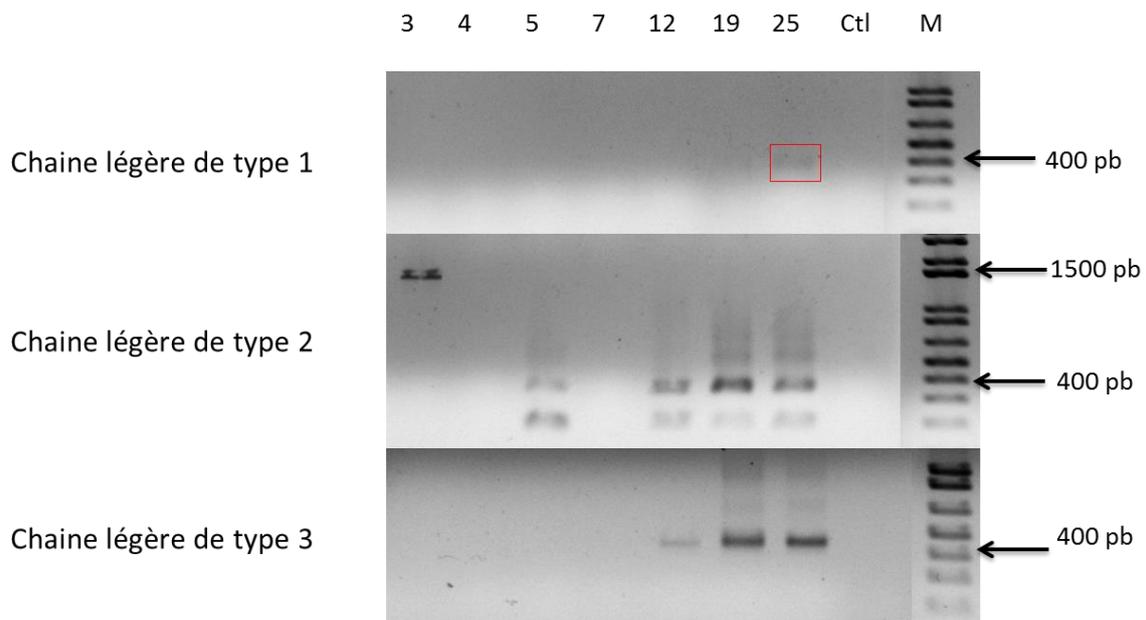


Figure 17: Gel d'électrophorèse présentant les produits d'amplifications des LC2 avec le couple d'amorces B chez des poissons de 3, 4, 5, 7, 12, 19 et 25 jpf.

La synthèse de transcrits de chaînes légères semble débuter dès 5 jpf pour ce set d'ADNc avec une interruption autour de 7 jpf. Une analyse plus détaillée à propos des 15 premiers jours de développement de l'alluvion fournirait des données plus précises à ce sujet.

b) Analyse de l'organisation des gènes des chaînes légères d'Ig

Comme mentionné précédemment, nous avons entamé l'identification des gènes V, J et C utilisés pour les transcrits précoces. Pour ce faire, nous nous sommes reposés sur les informations fournies par la base de données IMGT repertoire® ainsi que sur les séquences identifiées par Haire⁶⁹, Zimmerman⁹¹ et Marianes⁷⁹. Toutefois nous nous sommes retrouvés confrontés à une nomenclature différente de celle que nous avons mise en place pour désigner les différents gènes. Afin de faire le tri et de clarifier les choses, nous avons récupéré les séquences fournies par IMGT®, nous les avons resituées sur les séquences génomiques (figure 18) et nous avons synthétisé plusieurs couples d'amorces (tableau 3).

Les gènes V, J et C nommés IG6S1 sont les gènes d'immunoglobulines de type 1 issu de la séquence AF246185 précédemment étudié dans notre système. De même pour les gènes V, J et C nommés IG7S1 (AF246162) correspondant au type 2, et les gènes V, J, C nommés IG8S1 (AF246193) correspondant au type 3. Ils n'ont donc pas été ré-analysés.

BX571825

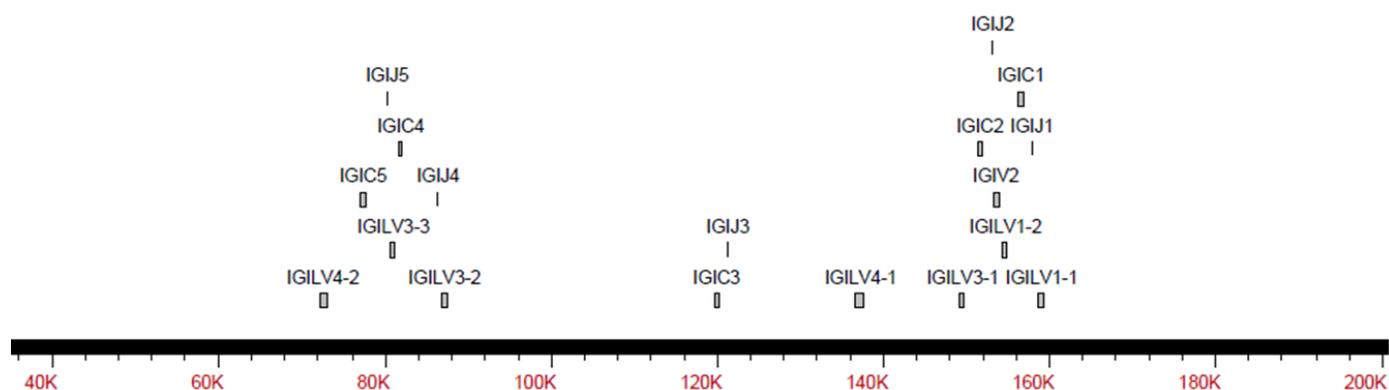


Figure 18: Position des différents gènes d'Igs provenant d'IMGT® sur la séquence d'ADN génomique BX571825 du chromosome 19.

Gènes (Nomenclature IMGT®)	Amorces	Orientation	Séquences 5'-3'	Taille (pb)
IGIV1	IGIV1Fr1	Sens	CAAACAGTCTCTATWRACTGTAA	23
IGIV2	IGIV2Fr2	Sens	GCTGGTGTGGCAGAAACCC	20
IGIV3	IGIV3Fr1	Sens	TTCATCAAGAGGTTCACTCT	21
	IGIV3Fr2	Sens	ATGAGCTGGTATTTGCAGAAAC	22
IGIV4	IGIV4Fr1	Sens	ACTGTGCTGCCTGATCAGACTG	22
	IGIV4Fr2	sens	TCTATTACACWTCAAACAGAGC	22
Chromosome 19	IGICCH19rev1	Anti-sens	CCTGCAGCTCACTGGGACTCA	21
	IGICCH19rev2	Anti-sens	GCTCCAGCTRTACAGTCCATC	20
	IGICCH19rev3	Anti-sens	GCTCAGGCTGCTGCTCCAGC	20
IGIV6S2	IGIV424Fr1	Sens	CTGACTCAGAGTCCGTCAGTG	21
	IGIV424Fr2	sens	AGCCTGGTATCAGAAGAGACC	21
IGIC6S2	IGIC424rev1	Anti-sens	TCACCTCCAGCTCAGCTTCCA	22
	IGIC424rev2	Anti-sens	GAAAGCCCTCGTGGCCACAC	21
IGIV7S2	IGIV430Fr1	Sens	GTGCTCACTCAGAAACCTCC	21
	IGIV430Fr2	Sens	CAGCTGGTATAAACAGACTCC	21
IGIC7S2	IGIC430rev1	Anti-sens	TGTCCAGCTGACGTCAAGCAG	21
	IGIC430rev2	Anti-sens	GCCAGACACACCAGTGTAGCA	21

Gènes (Nomenclature IMGT®)	Amorces	Orientation	Séquences	Taille (pb)
IGIV7	IGIV7	Sens	TGACTGTAGTGACTCAGAGTCC	22
IGIC5	IGIC5	Anti-sens	TGTACAGTCCATCCTC	16

Tableau 3 : Différents couples d'amorces synthétisés pour amplifier les différents gènes d'IV.

Parmi les nouvelles séquences recueillies, seuls les gènes fonctionnels ont été étudiés. Nous les avons testés par PCR sur des ADNc de poissons de 30 jpf dans les mêmes conditions décrites précédemment. Au total, 24 PCR ont été réalisées pour tester les différents couples d'amorces.

PCR	Amorce sens	Amorce anti-sens
1	IGIV1Fr1	IGICCH19Rev1
2	IGIV1Fr1	IGICCH19Rev2
3	IGIV1Fr1	IGICCH19Rev3
4	IGIV2Fr2	IGICCH19Rev1
5	IGIV2Fr2	IGICCH19Rev2
6	IGIV2Fr2	IGICCH19Rev3
7	IGIV3Fr1	IGICCH19Rev1
8	IGIV3Fr1	IGICCH19Rev2
9	IGIV3Fr1	IGICCH19Rev3
10	IGIV3Fr2	IGICCH19Rev1
11	IGIV3Fr2	IGICCH19Rev2
12	IGIV3Fr2	IGICCH19Rev3
13	IGIV4Fr1	IGICCH19Rev1
14	IGIV4Fr1	IGICCH19Rev2
15	IGIV4Fr1	IGICCH19Rev3
16	IGIV4Fr2	IGICCH19Rev1
17	IGIV4Fr2	IGICCH19Rev2
18	IGIV4Fr2	IGICCH19Rev3
19	IGIV424Fr1	IGIC424Rev1
20	IGIV424Fr2	IGIC424Rev2
21	IGIV430Fr1	IGIC430Rev1
22	IGIV430Fr2	IGIV430CRev2

PCR	Amorce sens	Amorce anti-sens
23	IGIV7	IGIC5
24 (Ctl)	IgMCH2 02A5	VH9 cons 801

Tableau 4 : Récapitulatif des réactions de PCR tests des différentes amorces synthétisées.

Le résultat des PCR est présentés dans la (figure 19) ci-contre.

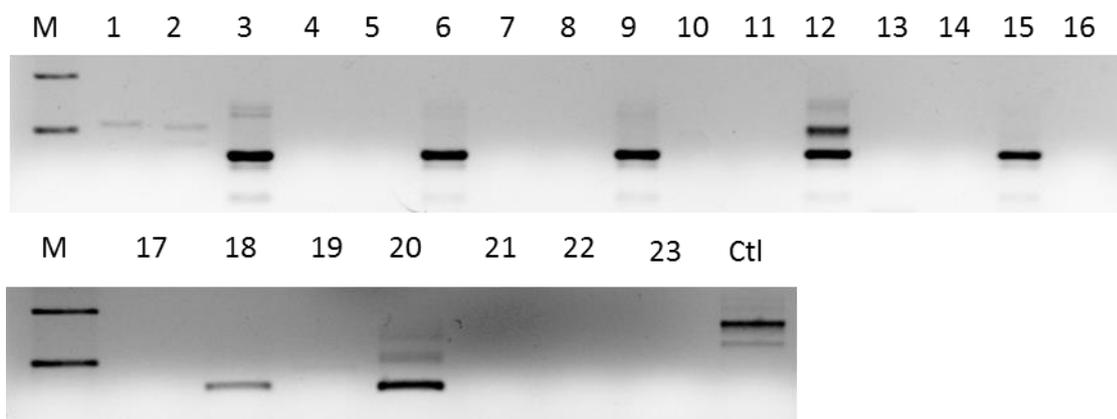


Figure19 : Gels d'électrophorèse représentant les produits d'amplifications des gènes d'Igs obtenus après les tests des différentes amorces.

Les PCR 3, 6, 9, 12, 15, 18 et 20 se sont révélées fonctionnelles. Ces couples d'amorces permettent, à priori, d'amplifier des transcrits d'Ig de poisson de 30 jpf. La suite logique d'une telle observation est le clonage et le séquençage des produits de PCR afin de savoir si les transcrits amplifiés sont fonctionnels ou non.

Mon stage s'étant terminé au même moment, je n'ai pas eu l'occasion d'analyser les séquences obtenues après séquençage. J'ai toutefois réalisé un tableau récapitulatif des différents locus de gènes d'Ig connus, en mentionnant le chromosome porteur s'il est identifié (Annexe 3).

3) Bilan de l'analyse des chaines légères d'Ig

L'analyse des chaines légères de *Danio* a révélé une expression précoce de l'isotype 2, presque conjointe à l'expression des transcrits de chaines lourdes utilisées comme contrôles. Cela suggère que le timing de réarrangement des chaines lourdes et légères est assez proche au cours de la maturation B. L'expression des chaines légères débute par la formation de transcrits germinaux obtenus après l'utilisation de sites cryptiques d'épissage présents en aval des régions V et en amont des séquences RSS des gènes J. Bien que non fonctionnels, ces transcrits témoignent d'un engagement des cellules dans un processus de différenciation B ; processus également observé chez la souris. Le *Danio* semble faire appel à des mécanismes connus pour le réarrangement de ses gènes. Néanmoins l'organisation relativement complexe des locus de gènes d'Ig, laisse à penser d'une régulation fine et minutieuse de l'expression des chaines. Notre analyse servait surtout à recueillir une première vision de l'expression des chaines légères. Elle ne tient pas compte des subtilités qu'il pourrait exister entre les différents LB (IgM et IgZ). Effectivement, on peut se demander si l'utilisation d'une chaine lourde ζ au lieu d'une chaine lourde μ au cours de la différenciation B, a un impact sur les mécanismes cellulaires impliqués. De même, il serait intéressant d'évaluer la contribution des deux populations B au répertoire immunitaire du *Danio*.

Mais pour ce faire, la compréhension de l'organisation des gènes d'Igs doit être mieux appréhendée. La multiplicité des nomenclatures complique fortement les analyses car elle est source de confusion. Cela représente un travail colossal et fastidieux mais tout à fait nécessaire. Le travail sur les chaines avancera rapidement. Grâce aux techniques de séquençage au débit et aux analyses en Single Cell, il est désormais possible d'étudier spécifiquement le transcriptome d'une cellule à un instant t. Il ne fait aucun doute que ces techniques seront employées chez le *danio*.

III. Exemples de modèles d'étude de la lymphopoïèse B chez le *Danio rerio*

Par rapport à son homologue T, le LB a été beaucoup moins étudié chez le *Danio*^{73,97,98}. En cause, l'absence de marqueurs cellulaires spécifiques et précoces qui permettraient d'observer les premiers stades de développement de la lignée. En effet mise à part les marqueurs Rag et IgM1⁶⁸, il n'y a pas d'autres lignées transgéniques caractérisées pour les LB. Les stades pré-B et pro-B n'ont pas encore été clairement identifiés, il en est de même pour l'existence d'une chaîne légère de substitution de type VpréB / λ5 présente chez les mammifères. C'est pourquoi la constitution d'une telle lignée représente un enjeu crucial dans l'étude de la lymphopoïèse B.

1) Marquage de la lignée B à l'aide de CD79

a) Caractérisation de CD79a et CD79b et établissement de la lignée transgénique

Afin d'étudier les premiers stades de développement B, l'équipe de Liu et Hardy a établi une lignée de poissons zèbres transgénique **CD79**⁹⁹. La présence de CD79 dans les LB de *Danio* a été démontrée par single-cell quantitative PCR¹⁰⁰ mais n'a pas été caractérisée dans le contexte de la maturation B. Ils ont donc utilisé les séquences de CD79a et CD79b des bases de données (respectivement XM_001339187 et XM_001339187) et ont synthétisé des amorces spécifiques. Après amplification, clonage et séquençage, ils ont pu valider leurs amorces en comparant les séquences amplifiées aux bases de données. Les séquences CD79a et CD79b du *Danio* contiennent un domaine ITAM homologue au poisson chat, à la souris et à l'homme. Cela suggère que les protéines CD79a et CD79b du *Danio* exercent la même fonction que chez les autres vertébrés. Chez le poisson adulte, l'expression de CD79a et CD79b est fortement détectée par hybridation in situ (HIS) dans le rein, expression semblable à ce qui est observé avec le marquage par IgH-μ (figure 20a). L'analyse des autres tissus par PCR révèle une coexpression systématique de CD79a/CD79b et IgH-μ dans la rate, le foie et les intestins (figure 20 b). Cela prouve une expression prépondérante de CD79a et CD79b dans les sites connus de maturation B.

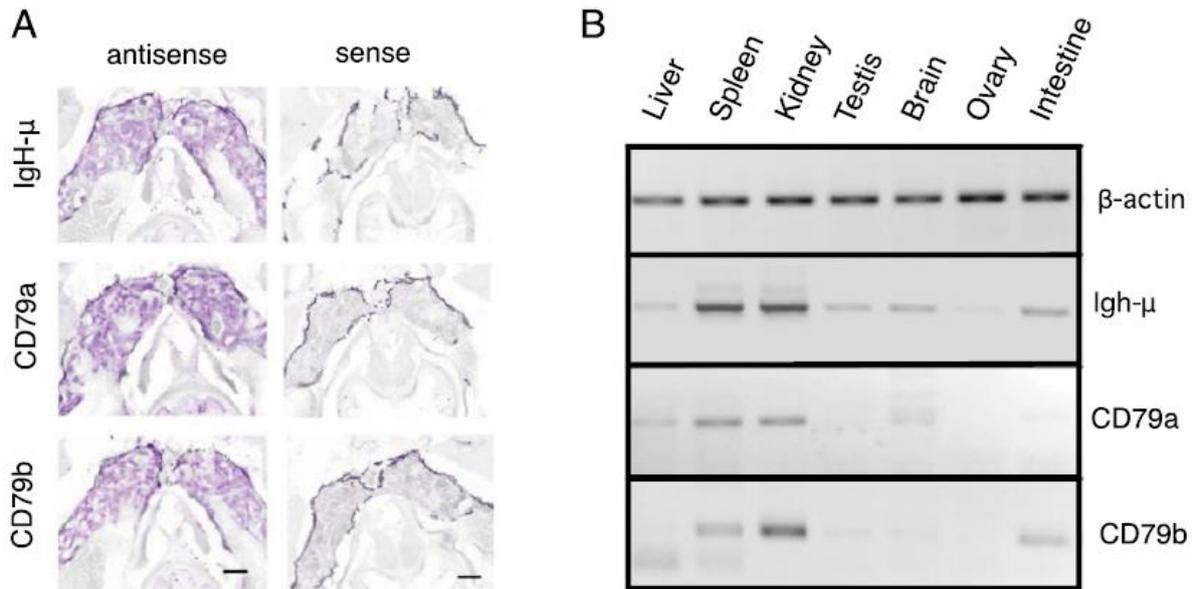


Figure 20 : Caractérisation de l'expression tissulaire de CD79a CD79b et IgH-μ chez le *Danio* par A) hybridation *in situ* et B) PCR.

Pour la construction du transgène, ils ont conservé une portion de la région située en amont du premier exon de la protéine d'intérêt et substitué ce dernier par un segment EGFP-PolyA. Le transgène a été construit à l'aide du système **BAC** (bacterial artificial chromosome) contenant les gènes d'intérêts (CD79a et CD79b) ainsi que les séquences génomiques situées en amont.

Les BAC sont des chromosomes artificiels dont le fonctionnement repose sur les propriétés de réplication du facteur F d'*Escherichia coli*. Le **facteur F** code à la fois pour des gènes essentiels à sa propre réplication (*oriS* et *repE*) mais aussi pour des gènes limitant à un ou deux le nombre de copie par cellule (*parA* et *parB*). Le vecteur BAC comprend donc les gènes du facteur F, des gènes de résistance aux antibiotiques et un segment de clonage pouvant intégrer une séquence allant jusqu'à 300kb (figure 21)¹⁰¹. Ces propriétés en font un support de choix pour le séquençage génomique ou pour la réalisation de lignées transgéniques^{102,103}. De plus les techniques de modification des séquences du BAC ou **recombineering** font appel, le plus souvent, aux mécanismes de recombinaison homologue. De nombreux laboratoires exploitent ce système pour induire des knock-ins et/ou knock-outs conditionnels ou non dans le génome de souris.

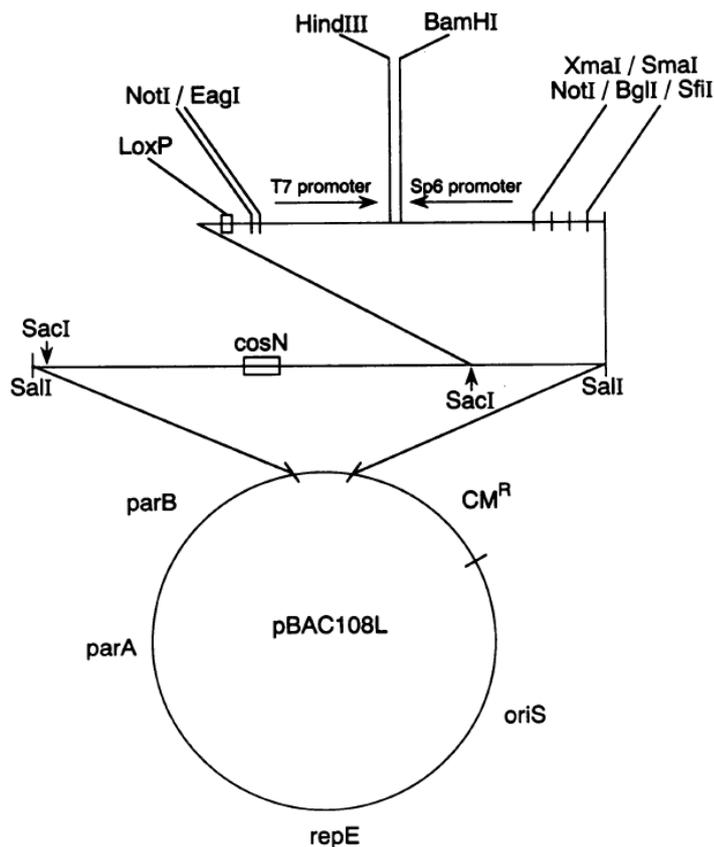
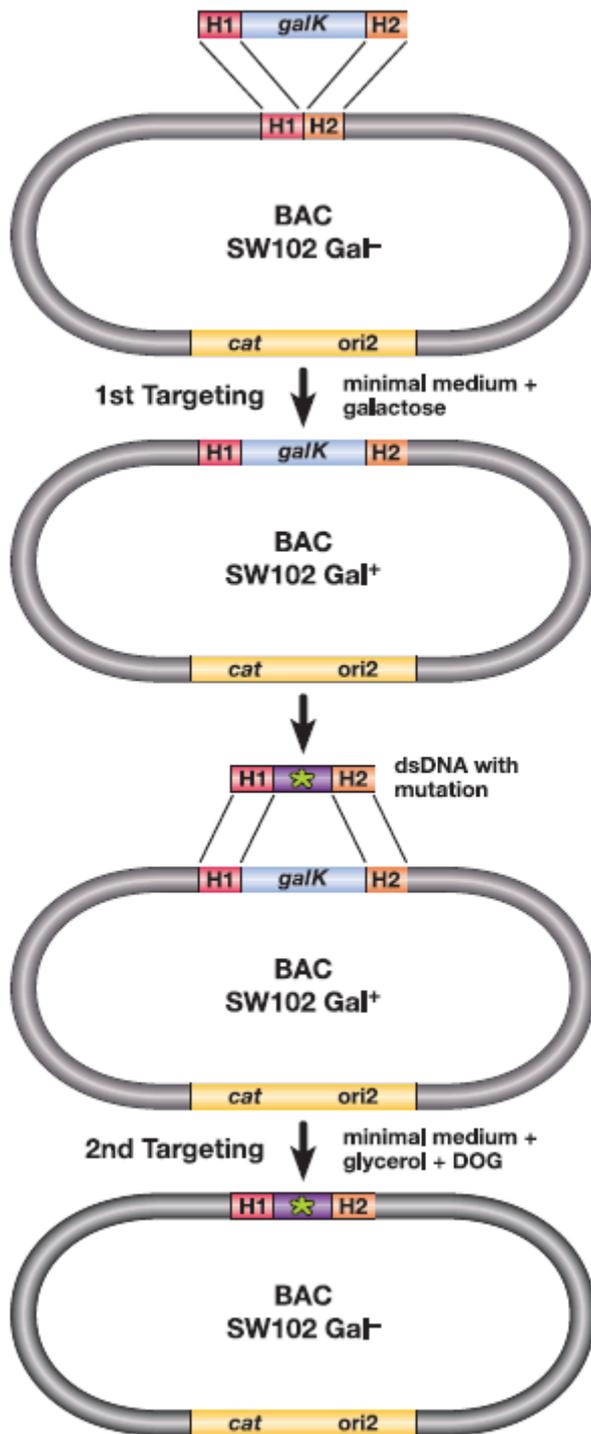


Figure 21 : Représentation schématique du plasmide BAC 108L avec comme marqueur de sélection un gène de résistance au chloramphénicol.

Le recombineering s'appuie sur l'utilisation de trois gènes : *exo*, *bet* et *gam*¹⁰⁴. Le gène *exo* code pour une 5'-3' exonucléase produisant des coupures d'ADN double brin d'extrémités 3' cohésives sur des cassettes spécifiques. Le gène *bet*, lui, code pour une protéine qui se fixe aux extrémités 3' cohésives et intervient dans les mécanismes de recombinaison homologue. En parallèle le gène *gam*, qui code pour un inhibiteur de l'exonucléase RecBCD d'*e. coli*, protège la cassette d'ADN d'intérêt (linéaire) de la dégradation, permettant son intégration dans le BAC. Ces gènes sont généralement exprimés à partir de nombreuses copies d'un plasmide, grâce à un promoteur phage puissant (promoteur pL) inducible par la chaleur. Les mécanismes de recombinaisons homologues peuvent ainsi être déclenchés par une simple élévation de température.

Pour la sélection des clones d'intérêt, plusieurs stratégies sont possibles. La sélection du transgène CD79, fait appel au système de sélection *galk* (figure 22).



Le gène *galK* code pour une galactokinase qui catalyse la première étape de la dégradation du galactose. Cette kinase est aussi capable de phosphoryler le 2-deoxy-galactose (DOG), un analogue du galactose, toxique sous sa forme phosphorylée.

La première étape consiste à insérer, dans une position bien définie, une séquence codante *galK* constitutivement active. La bonne insertion de la séquence *galK* dans le BAC permettra la pousse des bactéries sur un milieu sélectif galactose⁺/chloramphénicol⁺.

Puis la cassette *galK* sera remplacée par la séquence d'ADN d'intérêt, encadrée par les mêmes séquences homologues utilisées précédemment (H2/H2). La sélection se fera en milieu restrictif DOG⁺/glycérol⁺/chloramphénicol⁺, le glycérol servant de source de carbone. Les BAC ayant conservé la séquence *galK* seront éliminés.

Figure 22: Détail du mécanisme de sélection galK. (cat : chloramphenicol acetyl-transferase gene ; H1/H2 : séquences de recombinaison homologue).

Enfin le transgène a été purifié puis injecté dans des œufs de *Danio* au stade 1 à 2 cellules. Les larves ne montrant pas d'expression de la GFP ont été éliminées. Le marquage cellulaire CD79:GFP⁺ montre une répartition similaire à ce qui a été préalablement observé par HIS (figure 23). Toutefois le marquage non spécifique de tissus, ou bruit de fond, est fortement présent chez des poissons femelles CD79:GFP transgéniques à cause d'une diffusion des ARNm de la GFP. C'est pourquoi des poissons mâles CD79:GFP⁺ ont été préférentiellement utilisés pour les croisements.

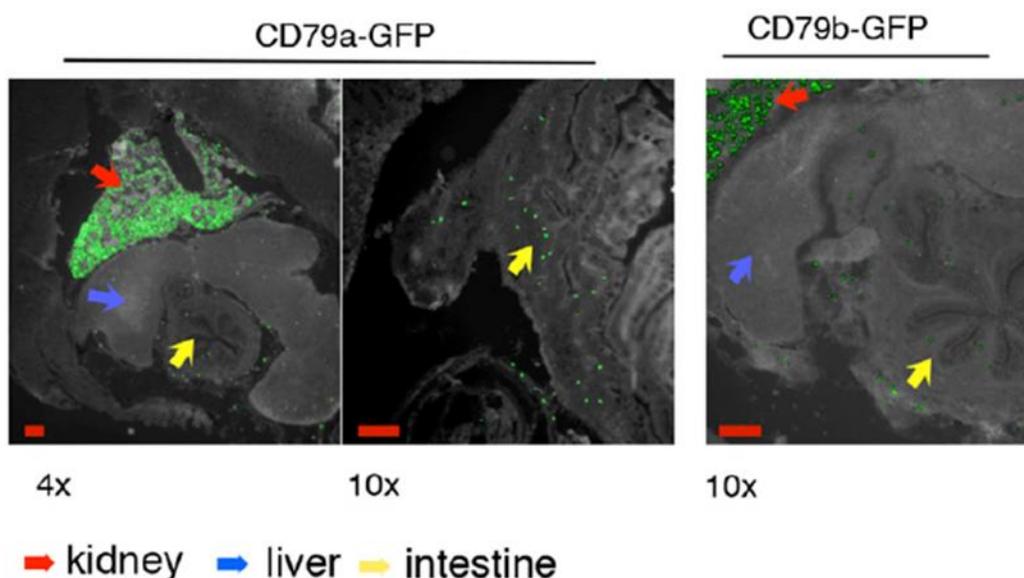


Figure 23: Localisation des cellules CD79a:GFP⁺ et CD79b:GFP⁺ chez un poisson adulte.

Pour l'analyse détaillée des étapes de maturation B, les lignées CD79:GFP ont été croisées avec une lignée RAG2:mCherry. Cependant, dans les stades larvaires précoces (<3 spf), le marquage de CD79a:GFP était particulièrement important, présentant un taux de cellules GFP⁺ 5 à 10 fois plus important que celui observé chez les larves CD79b:GFP⁺ et la plupart des cellules CD79a⁺ étaient RAG2⁻. C'est pourquoi l'analyse des cellules CD79:GFP/RAG2:mCherry n'a débuté qu'à partir de 21 jpf.

b) Etude de la maturation B à l'aide des lignées transgéniques CD79

L'objectif principal de l'étude est la découverte de l'existence d'un stade pré-B CD79⁺μ⁺ chez le *Danio*. Les cellules rénales GFP⁺ de larves de 21 jpf ont montré une faible coexpression d'IgH-μ et IgL-k mais pas d'expression d'IgH-μ seule (figure 24).

Ils ont triés les cellules de rénale en fonction de l'expression de CD79:GFP et RAG:mCherry puis ont analysé le profil d'expression des gènes d'Ig dans les différentes fractions (figure 24).

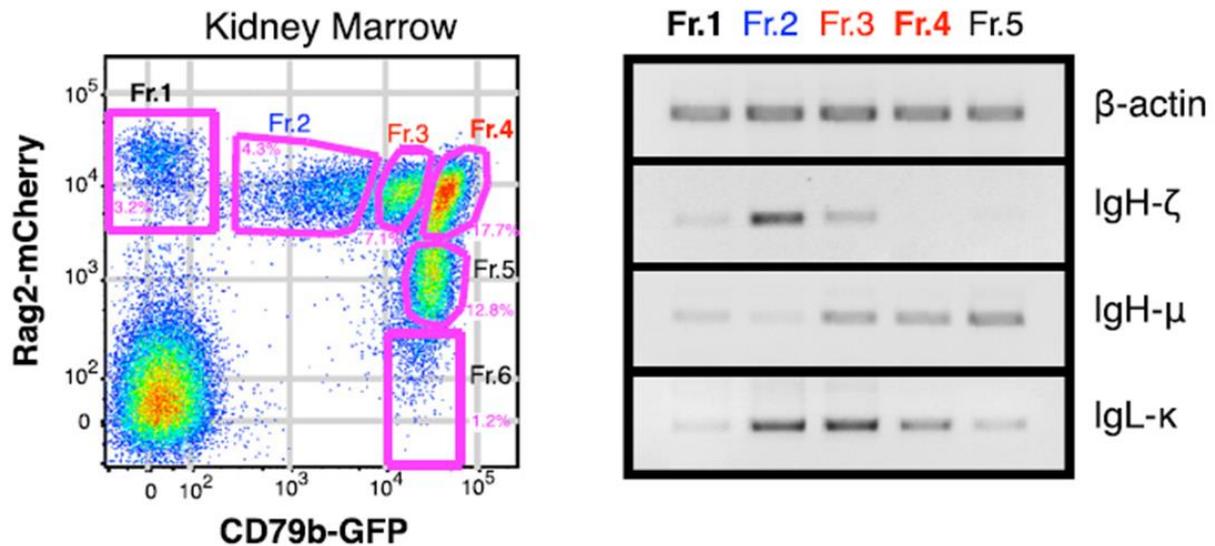


Figure 24 : Présentations des différentes fractions de cellules rénales obtenues par cytométrie en flux en fonction de l'expression de RAG et CD79b chez des poissons adultes. Profil d'expression des différents gènes d'Ig dans 5 des 6 fractions isolées.

Cette analyse révèle que les cellules RAG2:mCherry⁺, avec un faible marquage CD79:GFP⁺, exprimaient à la fois IgH-ζ (ou IgZ) et IgL-κ (fraction 2). D'ailleurs, IgZ est majoritairement exprimé dans les fractions présentant un faible taux de GFP comme la fr.2 ; la fr.3 montrant, elle, une expression équivalente d'IgH-μ et IgH-ζ. Le fait le plus marquant de cette analyse est la présence quasi systématique de l'IgL-κ dans toutes les fractions CD79b:GFP⁺ coexprimé avec une chaîne lourde d'Ig. Profil d'expression totalement différent de ce qui est observé chez la souris, où les chaînes lourdes réarrangent avant les chaînes légères formant le stade pré-B (IgH-μ⁺).

La fr.3 correspond à des cellules en division active coexprimant une IgH et IgL-κ. À partir de la fr.4, les cellules ne sont plus en division (PI<0,5%) et parviennent à un stade quiescent. Il s'agit peut-être de cellules issues de la fr.3 ayant atteint le stade mature.

Pour CD79a:GFP les fractions identifiées présentent le même profil d'expression des gènes d'Igs que ce qui a été décrit pour CD79b:GFP. Dans ce système, l'expression de CD79a et b augmente de façon significative après le stade de la fr.1.

Pour eux cela corrobore l'absence d'un possible stade pré-B RAG^{hi}CD79^{hi}IgH-μ^{hi}.

L'analyse quantitative de l'expression de RAG1 et RAG2 montrent une chute brutale de leur expression entre les fr.1 et 2 jusqu'à être indétectable dans la fr.5 (figure 25).

À l'inverse, l'expression de CD79a, CD79b et IgH- μ est minimale dans la fr.1 puis augmente au fur et à mesure.

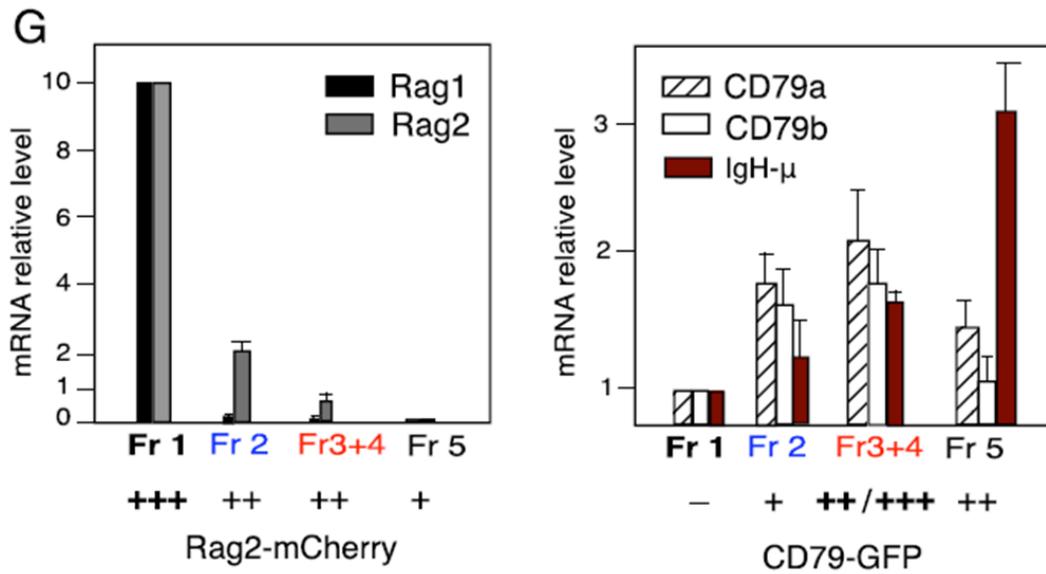


Figure 25: Profil d'expression de RAG1, RAG2, CD79a, CD79b et IgH- μ dans les différentes fractions par qRT-PCR.

Dans la fr.5 on note une augmentation massive de l'expression d'IgH- μ associée à une diminution de l'expression de CD79. L'expression de CD79 semble diminuer dans les LB matures.

Cette observation est confirmée lors de l'étude des LB lors d'une réponse immunitaire à *Pseudomonas aeruginosa*. Durant l'infection, le nombre de cellules B augmente mais elles présentent un taux plus faible de CD79:GFP. Plus la cellule B mature et se différencie en cellule sécrétrice d'anticorps, plus son taux de CD79a diminue (figure 26).

Chez le *Danio*, comme chez les mammifères, l'expression de CD79 diminue tout au long de la différenciation B mature en cellule sécrétrice d'Ac.

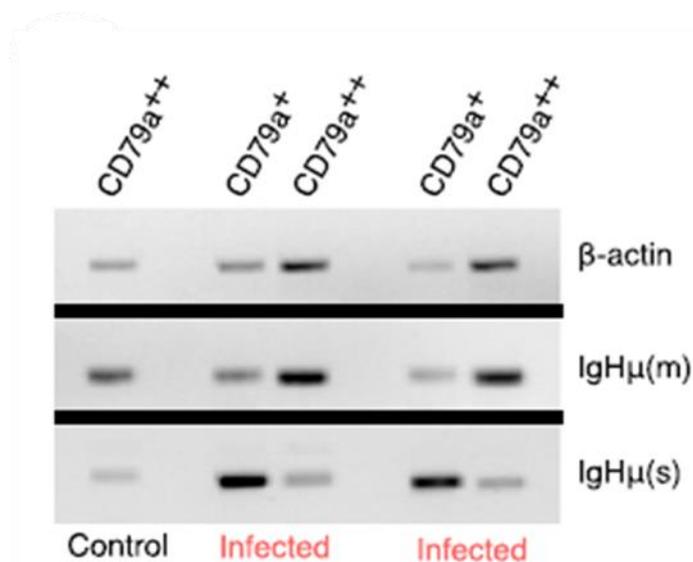


Figure 26: profil d'expression d'IgH- μ membranaire et sécrétée dans les cellules CD79a⁺ et CD79a⁺⁺ chez des individus sains ou infectés par *P. aeruginosa* RFP Tomato Red.

c) Discussion et critique

L'établissement de cette lignée transgénique CD79 a permis de recueillir des informations inédites sur le développement cellulaire B chez le *Danio*. L'absence de SLC chez le *Danio*⁶⁷ associée à l'absence de cellule B RAG^{hi}CD79^{hi}IgH- μ ^{hi} dans ce système, appelle fortement à la conclusion de l'absence de stade pré-B chez le *Danio*. Toutefois peuvent-ils être aussi catégoriques ? La première étude visant à élucider les étapes de maturation B chez le poisson zèbre avait pourtant conclu à l'existence d'un stade pré-B⁶⁸. Utilisant les reporter transgéniques IgH/RAG2, ils avaient pu démontrer la présence de cellules B rénales IgM⁻, IgM^{lo} et IgM⁺ associée à un niveau d'expression constant de RAG⁺, suggérant l'existence d'un stade pré-B RAG2⁺IgM⁺. On peut se questionner sur l'obtention de ces deux résultats contradictoires. Une des hypothèses expliquant ces contradictions serait que le passage par le stade pré-B ne concerne que les cellules B IgM et pas les LB IgZ. Ces 2 populations étant conjointement analysées dans le cas du système mis en place par l'équipe de Liu, ils n'ont peut-être pas pu faire la nuance à ce niveau. Tout au long de leur vie, les LB IgZ n'expriment jamais d'IgM, on peut donc supposer que leur processus de maturation présente des spécificités par rapport aux IgM. L'expression du gène Z doit donc affecter dans une certaine mesure inconnue à ce jour, l'expression du gène RAG responsable des réarrangements. C'est à mon sens une théorie plausible au vu des premiers éléments recueillis au sujet de la lignée B IgZ qui semble suivre un parcours distinct des IgM. Néanmoins seule une analyse en Single cell serait à même d'apporter un éclairage suffisant pour résoudre cette question.

Il est important de noter que l'analogie faite entre les chaînes légères de *Danio* et les chaînes kappa est clairement une erreur scientifique dans la mesure où, comme mentionné précédemment, ces gènes sont phylogénétiquement éloignés. Il aurait été plus approprié d'utiliser les nomenclatures propres au *Danio*.

L'autre information majeure apportée par l'équipe de Liu est une première démonstration du réarrangement simultané des chaînes lourdes et légères d'Ig chez le *Danio*. Bien que les analyses que nous avons mené au DIMNP sur les chaînes légères soit incomplètes, ce résultat abonde dans le sens de nos résultats. L'analyse de l'expression des chaînes légères devrait sans nul doute aboutir à cette conclusion. Reste à savoir si là encore, les LB IgM et IgZ suivent le même processus.

Contrairement à ce qui était attendu, les lignées transgéniques CD79a et b ne permettent pas d'étudier la maturation B dans les stades précoces de développement larvaire. Effectivement, le bruit de fond est relativement important chez les larves rendant les analyses difficilement exploitables avant 21 jpf. Ils imputent cet inconvénient à la large diffusion des ARNm dans la larve mais cet argument est difficilement convainquant à ce stade. Néanmoins, le *Danio* dispose désormais d'un nouveau marqueur spécifique englobant la totalité des cellules B, même si celui-ci n'est utilisable que chez les individus adultes.

D'autres types de marqueurs pourraient pallier ce manque, comme par exemple le marqueur IgBP-1 développé au DIMNP, permettant de recueillir des informations sur la lymphopoïèse B larvaire.

2) Marquage de la lignée B à l'aide du promoteur IgBP-1 ou Alpha-4

a) Expression d'IgBP-1 chez le *Danio* et construction du transgène

L'Immunoglobuline-Binding Protein 1 (IgBP-1) ou Alpha-4 est une protéine associée au BCR initialement découverte dans les cellules B¹⁰⁵. Elle interagit comme régulateur des protéines phosphatases (PP) 2A, 4 et 6, seconds messagers intervenant dans le cycle cellulaire et la mobilité cellulaire¹⁰⁶. Elle interagit avec les PP via son domaine N-terminal, les protégeant de la dégradation par polyubiquitination. L'expression d'alpha-4 est fortement augmentée dans de nombreux cancers et sa mutation entraîne une diminution des capacités migratoires et prolifératives des cellules cancéreuses^{107,108}.

IgBP-1, qui est une protéine très conservée, a été séquencée chez le *Danio*¹⁰⁹. Cependant elle n'a pas été étudiée dans le contexte du développement B. Il serait donc intéressant d'évaluer si ses fonctions sont conservées chez le poisson. De plus, elle pourrait être utilisée comme potentiel marqueur cellulaire B en fonction de sa spécificité. C'est pourquoi la lignée transgénique IgBP-1 a été réalisée au sein du laboratoire.

Pour la construction du transgène, la séquence régulatrice située en amont du premier exon a été amplifiée et associée à une protéine fluorescente reportrice (EGFP ou mCherry) dans un vecteur. Deux vecteurs ont ainsi pu être produits (figure 27). Les vecteurs comprennent un gène de résistance à l'ampicilline, des séquences facilitant l'intégration du vecteur dans le génome hôte et un polylinker.

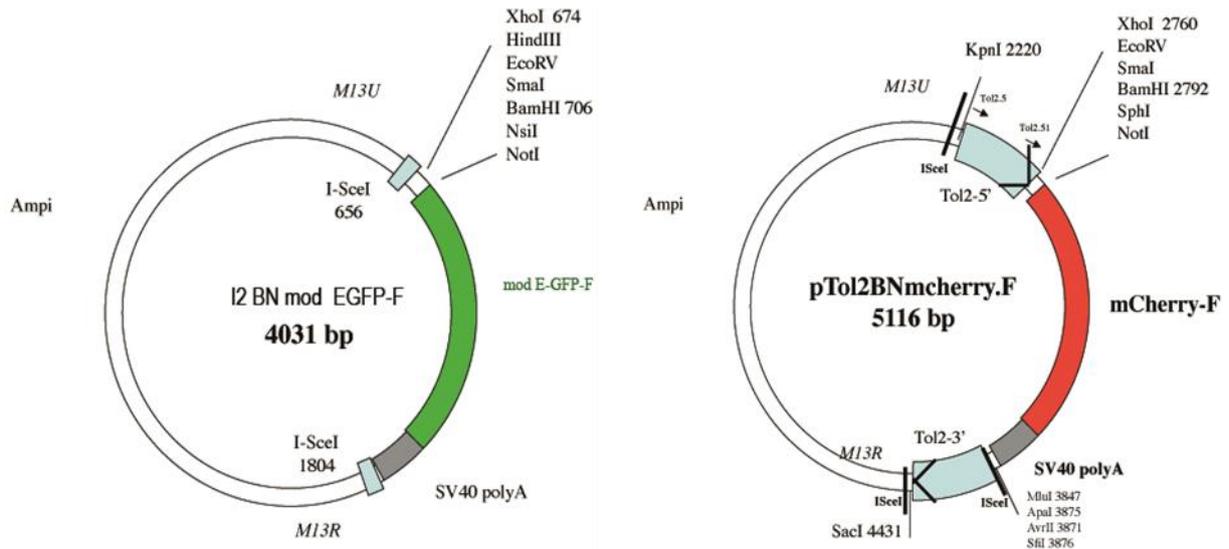


Figure 27: Schéma des vecteurs circulaires *I*₂BN:EGFP et *Tol*₂BN:mCherry utilisés pour la construction du transgène *IgBP-1*.

Une fois les transgènes obtenus, ils ont été injectés dans des œufs de *Danio* au stade 1 à 2 cellules. Il est à noter que dans ces conditions, l'intégration du plasmide dans le génome est aléatoire. Il va donc falloir sélectionner les embryons dans lesquels le plasmide a été intégré de façon productive, sans altérer la viabilité de l'embryon. La préparation des poissons et larves pour la microscopie se déroule comme suit. Pour l'imagerie vitale, les individus sont placés dans une pètri avec de l'eau de l'aquarium supplémentée d'un anesthésique (Tricaïne). Cet anesthésique permet de maintenir les poissons pendant toute la durée de l'acquisition, dans la position de référence (poisson disposé sur le flanc avec la tête orientée vers la gauche).

b) Résultats

Les larves de *Danio* transgéniques *IgBP-1*:mCherry présentent un marquage intense sur des cellules de petites tailles, rondes localisées majoritairement au niveau du rein (figure 28A et 28B). Le marquage du rein, organe hématopoïétique primaire du *Danio*, est attendu. La morphologie des cellules ainsi que leur localisation suggèrent un marquage de cellules lymphoïdes.

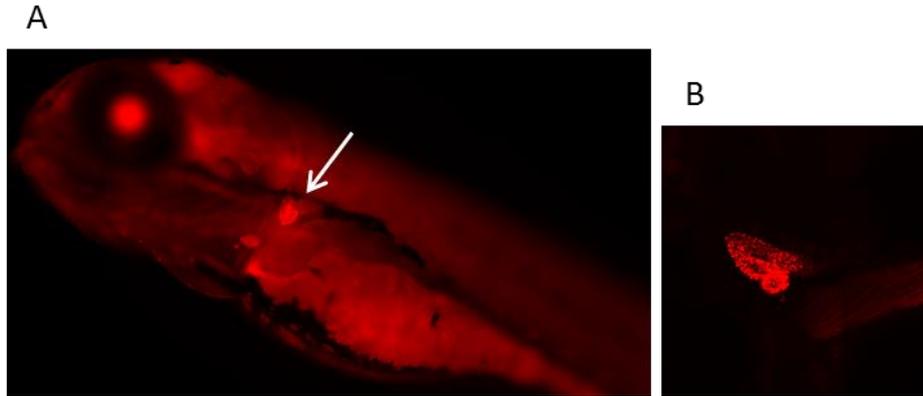


Figure 28: Marquage in vivo des cellules-IgBP-1:mCherry⁺ rénaux A) par microscopie à fluorescence (10x) chez une larve de 4 jpf et B) par imagerie confocale (20x) chez une larve de 4 jpf.

On retrouve aussi ces cellules IgBP-1:mCherry⁺ au niveau du CHT et des branchies (figure 29 A et B), respectivement site hématopoïétique primaire embryonnaire et site préférentiel des LB-IgZ. Cependant le thymus, organe lymphoïde primaire des LT, n'est pas marqué.

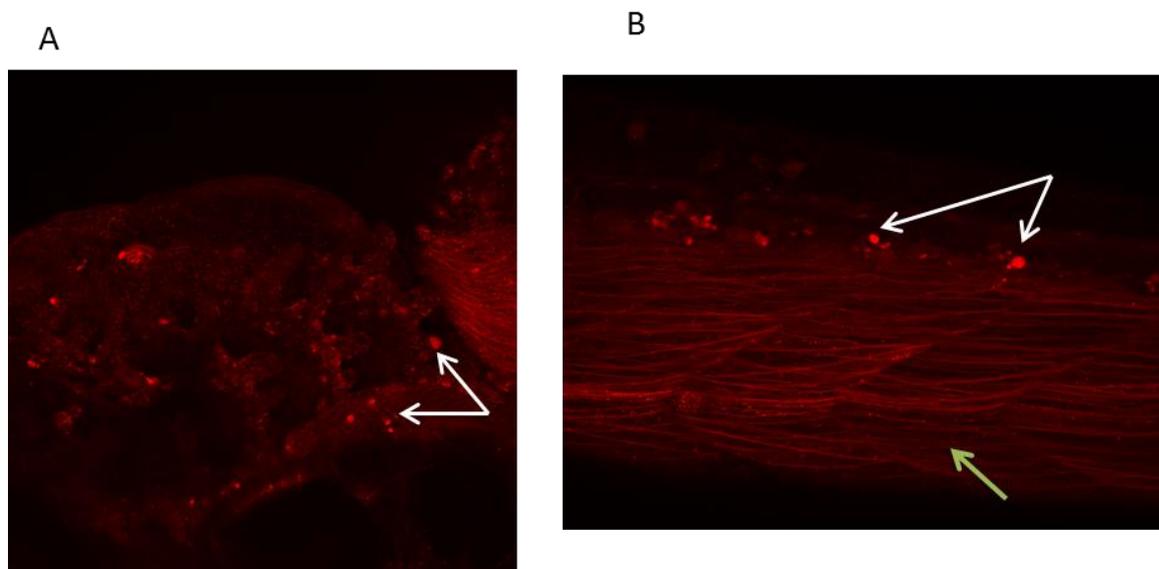


Figure 29: Marquage in vivo des cellules-IgBP-1:mCherry⁺ A) des branchies par microscopie à confocale (20x) chez une larve de 10 jpf et B) du CHT par microscopie à fluorescence (10x) chez une larve de 10 jpf; marquage non spécifique des cellules musculaires striées indiqué par la flèche verte.

Tous ces éléments tendent à prouver que les cellules IgBP-1:mCherry⁺ sont des LB. Cela a été confirmé par la mise en évidence d'une expression conjointe de Rag2 et IgBP-1 en absence de signal Lck chez ces cellules par des croisements RAG2:mCherry x IgBP-1:EGFP et

IgBP-1:mCherry x Lck:EGFP (données du laboratoire). Les cellules IgBP-1:mCherry⁺ sont donc bien des LB.

Dans cette lignée cellulaire, le bruit de fond est relativement important mais il n'empêche pas la visualisation des cellules même en microscopie à fluorescence. D'autres sites de résidences des LB : ont ainsi pu être révélés. Effectivement on retrouve des LB au niveau de la peau, des intestins et au niveau para-cardiaque. La prise d'image au niveau intestinale est particulièrement délicate à cause bruit de fond intense et du péristaltisme. Les LB présents dans cette zone sont plus facilement observables en vision directe.

IgBP-1 semble donc marquer les LB chez le *Danio* et permet de les visualiser facilement en imagerie. De ce fait, les chercheurs du laboratoire ont utilisé cette lignée pour essayer de visualiser les progéniteurs lymphoïdes ainsi que leur profil migratoire.

Des poissons de 48 hpf ont été sélectionnés et filmés durant 12h au niveau du sac vitellin. Le film a révélé un passage de cellules B au niveau du sac vitellin en direction du rein (figure 30).

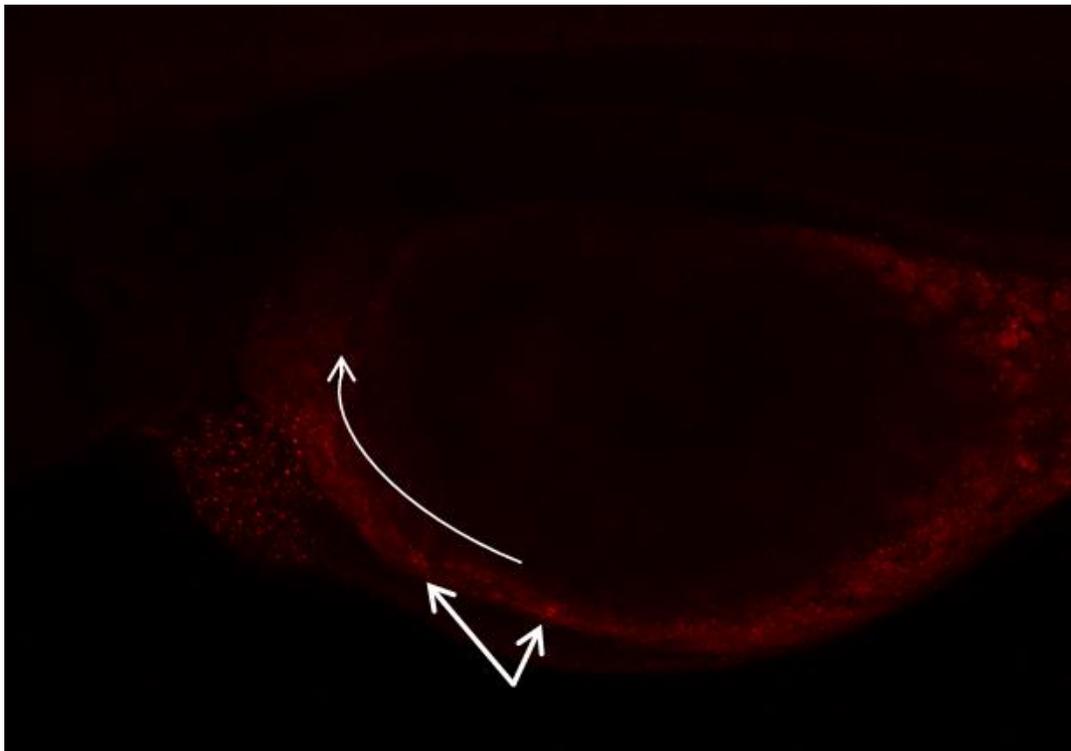


Figure 30 : Imagerie in vivo des précurseurs du sac vitellin et de leur trajectoire au microscope confocal (10x) dans une larve de 48 hpf.

À ce stade de développement, on peut se poser la question de la nature des LB observés. Les chercheurs du laboratoire ont avancé l'hypothèse qu'il s'agisse de précurseurs B. La croissance des embryons n'étant pas totalement synchrone, il faut donc pouvoir sélectionner la bonne larve au bon moment.

Néanmoins, il est possible d'observer relativement facilement un marquage cellulaire B dans les stades larvaires, stades correspondant à la mise en place de l'immunité.

Par ailleurs, nous avons tenté de trier des LB IgBP-1:mCherry⁺ de larves entières par cytométrie en flux. Malheureusement, le protocole d'extraction n'a permis de recueillir qu'un faible échantillon de cellules. Sans compter que l'analyse de cellules de *Danio* en cytométrie en flux n'a pas encore été standardisée. Nous n'avons donc pas pu exploiter ces données.

c) Discussion et critique

La lignée de poissons transgéniques IgBP-1:mCherry⁺ permet un marquage spécifique des LB des différents tissus aussi bien chez la larve que chez le *Danio* adulte. Il est même possible que ce marquage s'étende aux précurseurs B. De plus le tri des larves se fait rapidement au microscope à fluorescence. Les possibilités d'exploitation de cette lignée sont donc multiples et variées.

3) Utilisation de la protéine AID comme marqueur de sites de maturation d'affinité

a) Construction du transgène AID

La protéine AID est responsable des phénomènes d'hypermutation somatique et joue un rôle dans la commutation de classe chez les mammifères. Elle est activée dans les structures spécialisées de la maturation B appelés centres germinatifs. Elle est aussi présente chez le *Danio* où elle n'effectue que l'hypermutation somatique lors de réponses immunitaires. Toutefois, l'absence de centres germinatifs et de ganglions lymphatiques chez le *Danio* soulève la question du lieu de maturation d'affinité des LB. C'est pour tenter de résoudre cette question que nous avons choisi d'établir une lignée transgénique AID (EGFP ou mCherry).

Le gène AID est constitué d'une séquence promotrice, de 4 exons et de 3 introns (figure 31). Le premier intron contient une séquence régulatrice de l'expression du gène AID dans les différentes cellules. En effet cet intron joue le rôle de répresseur dans tous les types cellulaires à l'exception des LB dans lesquels il joue, à certains stades de leur développement, un rôle d'enhancer afin de favoriser la production d'anticorps.

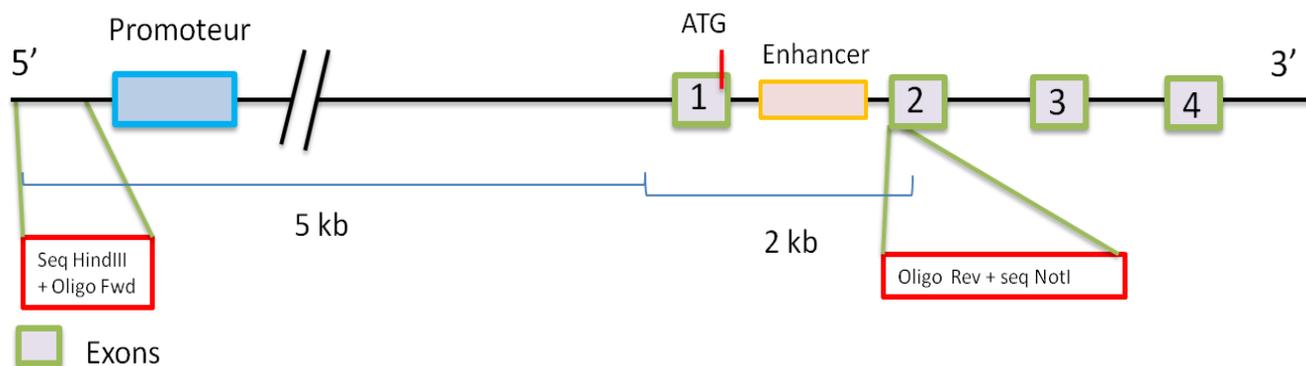


Figure 31 : représentation schématique du gène AID et emplacement des oligonucléotides primer utilisés lors des PCR pour l'amplification de la séquence à intégrer dans le vecteur.

Pour l'amplification du gène AID, nous avons inséré des séquences de restrictions EcoRV¹¹⁰ et Not1¹¹¹ aux amorces afin de faciliter l'insertion de la séquence d'intérêt dans le vecteur lors de la ligation. Les amorces sens ont été placées en amont de la région promotrice et les amorces anti-sens ont été positionnées au tout début du deuxième exon (figure 31). Nous avons synthétisé un certain nombre d'amorces (tableau 6) afin de pouvoir sélectionner la meilleure combinaison possible pour la ligation.

Amorces	Orientation	Séquence 5'-3'
ZFAID_Pr3	sens	ACAAACCTGTACACCACCAGGG
ZFAID_Pr4	sens	TGGCAACATCAACAGCCTGAGG
ZFAID_Pr5	sens	ACCCATATTAACACACCTGC
ZFAID_Pr6	sens	ATGTCGCTCTCAGCAGCTTC
ZFAID_Pr7	sens	AAATGAAGGAGCGTGCGGCACA
ZFAIDExon2_Not1Rev1	antisens	TAATGCGGCCGCTCTGGGTCATGAGCACACTGGAGC
ZFAIDExon2_Not1Rev2	antisens	TAATGCGGCCGCTCTGGGTCATGAGCACACTGGA
ZFAIDExon2_Not1Rev3	antisens	TAATGCGGCCGCTCTTCTGGGTCATGAGCACACT

Tableau 5 : Détail des amorces utilisées pour amplifier le gène AID chez le Danio.

Les PCR utilisant la polymérase Q5 ont été réalisées suivant le protocole ci-après :

- Matrice ADN *Danio* : 2 μL
- Amorce sens (10 pmol/l) : 2,5 μL
- Amorce anti-sens (10 pmol/mL) : 2,5 μL
- dNTP : 2 μL
- Tampon Q5 : 10 μL
- Enhancer Q5 : 10 μL
- Enzyme Q5 polymérase : 0,5 μL
- H₂O : QSP 50 μL soit 20,5 μL

Les conditions de la réaction de PCR sont :

3 min à 95°C
20 sec à 95°C
20 sec à 65°C
11 min à 72°C
10 min à 75°C.

} 30 cycles

Le produit d'amplification est sous la forme suivante (figure 32), la taille des fragments amplifiés dépend du couple d'amorce utilisé.



Figure 32 : Représentation schématique du produit d'amplification du gène AID.

Le test des amorces a fourni le résultat suivant (figure 33) :

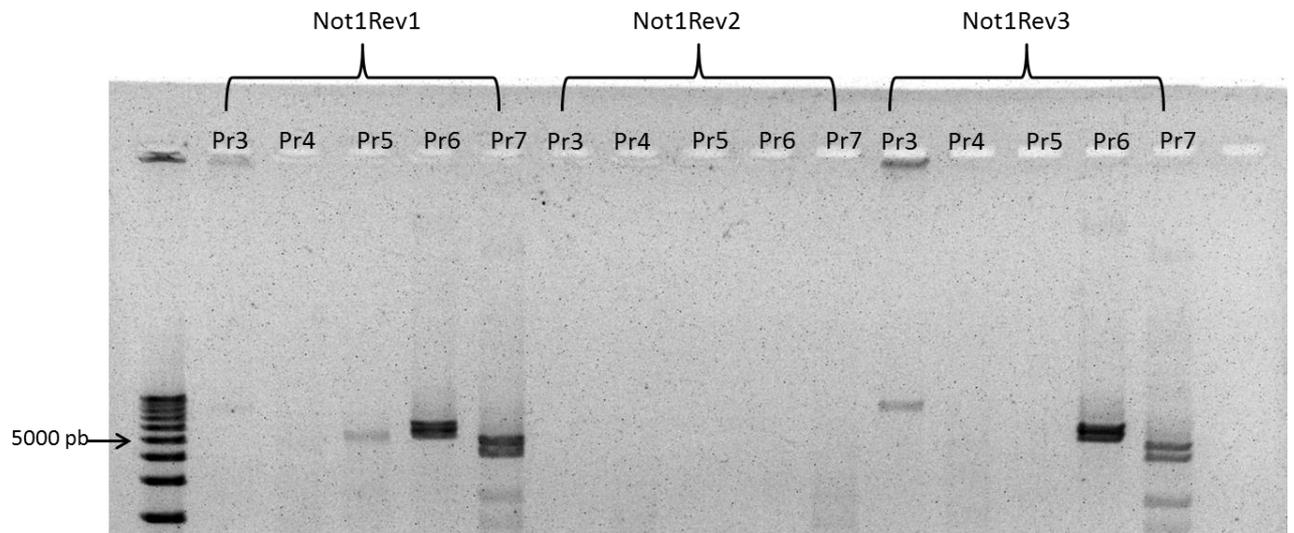


Figure 33 : Gel d'électrophorèse présentant les produits d'amplification du gène AID en fonction des différents couples d'amorces.

Au vu de ces résultats, nous avons sélectionné le couple ZFAID_Pr6 / ZFAIDExon2_Not1Rev3 formant un produit d'amplification de 6624 pb, pour la ligation.

Nous avons donc récupéré le produits de PCR, nous l'avons purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR clean-up de MACHEREY-NAGEL^{®112}, pour enfin le digéré avec l'enzyme de restriction Not1-HF.

En parallèle, nous avons digéré deux vecteurs, l'un possédant la protéine fluorescente reportrice EGFP, l'autre mCherry, avec les enzymes de restriction EcorRV-HF et Not1-HF. Il s'agit des mêmes vecteurs utilisé pour le transgène IgBP-1 (figure 27).

Ainsi, nous avons amorcé la réaction de phosphorylation puis de ligation d'après le protocole suivant :

- Segment d'intérêt : 11,5 µL
- Vecteur (I₂BN:EGFP ou Tol2BN:mCherry) : 2 µL
- Tampon Ligase T4 : 2 µL
- Kinase PNK T4 : 0,5 µL
- H₂O : 4,5 µL

Le mélange réactionnel a été mis en incubation pendant 30 min à 37°C pour la réaction de phosphorylation puis 0,5 µL de ligase T4 ont été ajouté pour catalyser la ligation. Le mélange réactionnel a été placé à 16°C durant environ 12h.

Une fois la ligation effectuée, le transgène présentera une structure comme indiqué dans la figure ci-après (figure 34). Les constructions ont été conçues de telle sorte qu'après épissage, le codon d'initiation provenant du gène AID soit en phase avec la séquence codante de la protéine reportrice.



Figure 34 : Représentation schématique linéarisée du vecteur ayant intégré la séquence AID d'intérêt.

Les plasmides ont été transfectés par électroporation dans des bactéries électro-compétentes, puis les bactéries ont été étalées et mises en culture sur milieu riche contenant de l'ampicilline. Les cartes de restriction des plasmides vide ou ayant intégré le segment d'intérêt sont présentées dans le tableau suivant (tableau 6).

Plasmide	enzyme	Nombre de coupure	Taille des fragments
I ₂ BN:EGFP-ZFAID_Pr6_Not1Rev3	PvuII	4	3281
			2837
			2514
			1995
I ₂ BN:EGFP	PvuII	2	2514
			1517

Plasmide	enzyme	Nombre de coupure	Taille des fragments
Tol ₂ BN:mCherry-ZFAID_Pr6_Not1Rev3	Pst1	3	7803
			3082
			826
Tol ₂ BN:mCherry	Pst1	3	3895
			826
			395

Tableau 6: Carte de restriction des plasmides Tol₂BN:mCherry, Tol₂BN:mCherry - ZFAID_Pr6_Not1Rev3, I2BN:EGFP et I2BN:EGFP-ZFAID_Pr6_Not1Rev3 pour les enzymes de restriction PvuII et PstI.

b) Résultats et discussion

Malgré de nombreux efforts, nous n'avons pas pu construire le transgène avant la fin de mon stage. Les différentes stratégies de traitement des vecteurs et fragments n'ont pas suffi à résoudre les différents problèmes rencontrés. Cependant la facilité d'amplification du gène AID du *Danio* assure la réalisation d'une lignée transgénique AID dans un avenir proche.

CONCLUSION

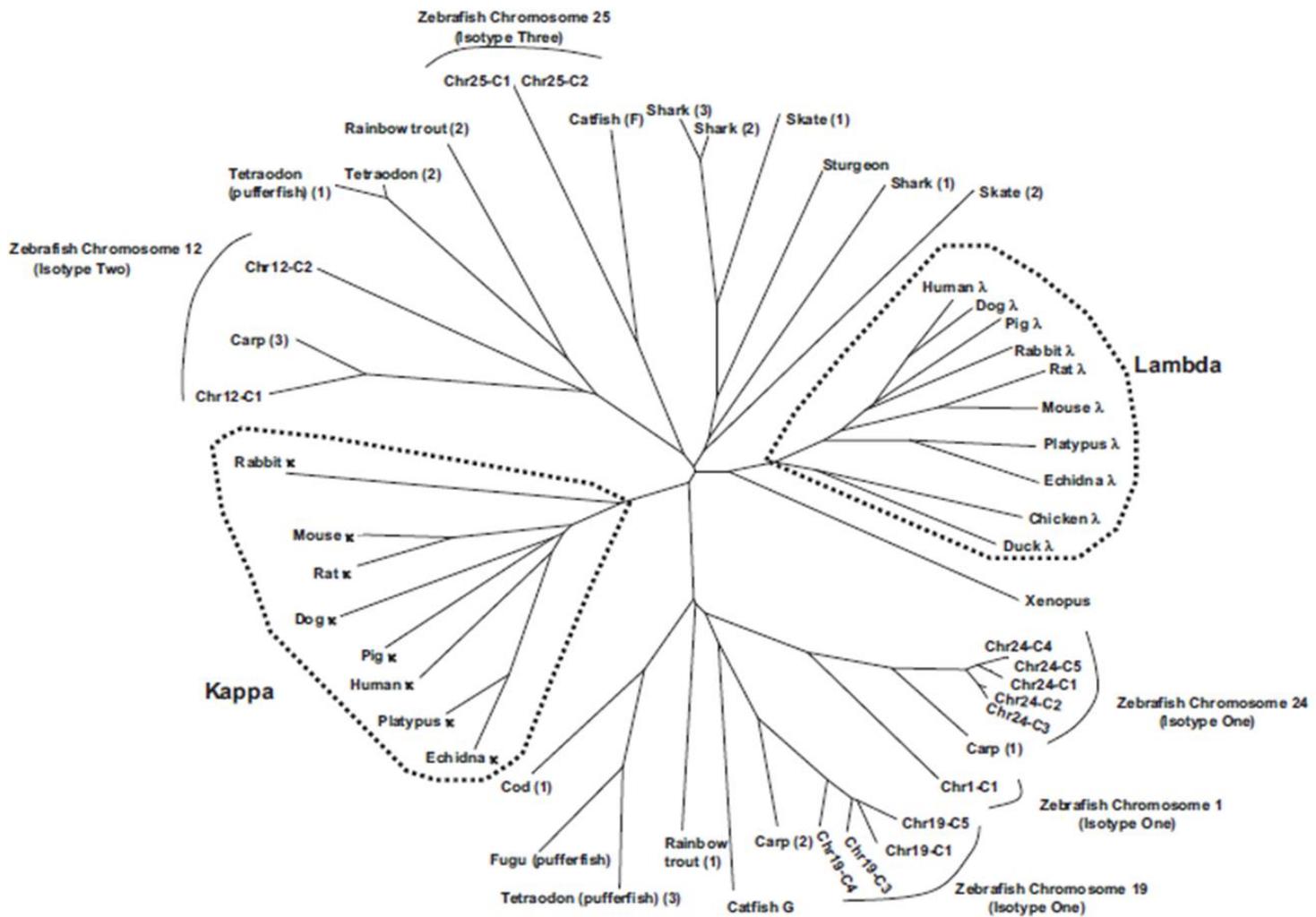
Les connaissances concernant la lymphopoïèse B chez le *Danio* s'étoffent d'années en années. Avec l'amélioration des techniques de séquençage et la constitution de lignée transgéniques spécifiques des LB, les avancées sont nombreuses. Pour exemple, l'établissement des lignées CD79a et CD79b a pu apporter un éclairage important sur les premières étapes de différenciation B en étudiant le profil d'expression des gènes RAG, IgH- μ et IgL- κ . Ils sont les premiers à évoquer un réarrangement simultané des chaînes lourdes et légères chez le *Danio*. Bien que leur conclusion concernant l'absence de stade pré-B soit discutable, elle soulève des pistes de recherche visant à éclairer ce point. De plus, l'analyse de l'expression des chaînes légères chez les larves, tout en confirmant le réarrangement précoce de celles-ci, nous informe de la présence de transcrits germinaux faisant intervenir des sites cryptiques d'épissage, similaires à ceux observés chez la souris.

Cependant beaucoup reste encore à faire. Effectivement, l'étude de la lymphopoïèse B embryonnaire est difficilement envisageable dans l'état actuel des connaissances et outils à disposition. De même, bien que les lieux de la lymphopoïèse B soient bien connus, les premières étapes de maturation des LB présentent encore des zones d'ombres. Parmi elles, l'influence de l'expression du gène IgH- ζ durant la lymphopoïèse ou encore les règles régissant l'expression des chaînes légères d'Ig. La découverte des sites de maturation d'affinité constitue aussi un enjeu majeur pour la compréhension de la mise en place de la réponse adaptative chez le *Danio*. Il ne s'agit là que de quelques pistes sur les nombreuses à explorer.

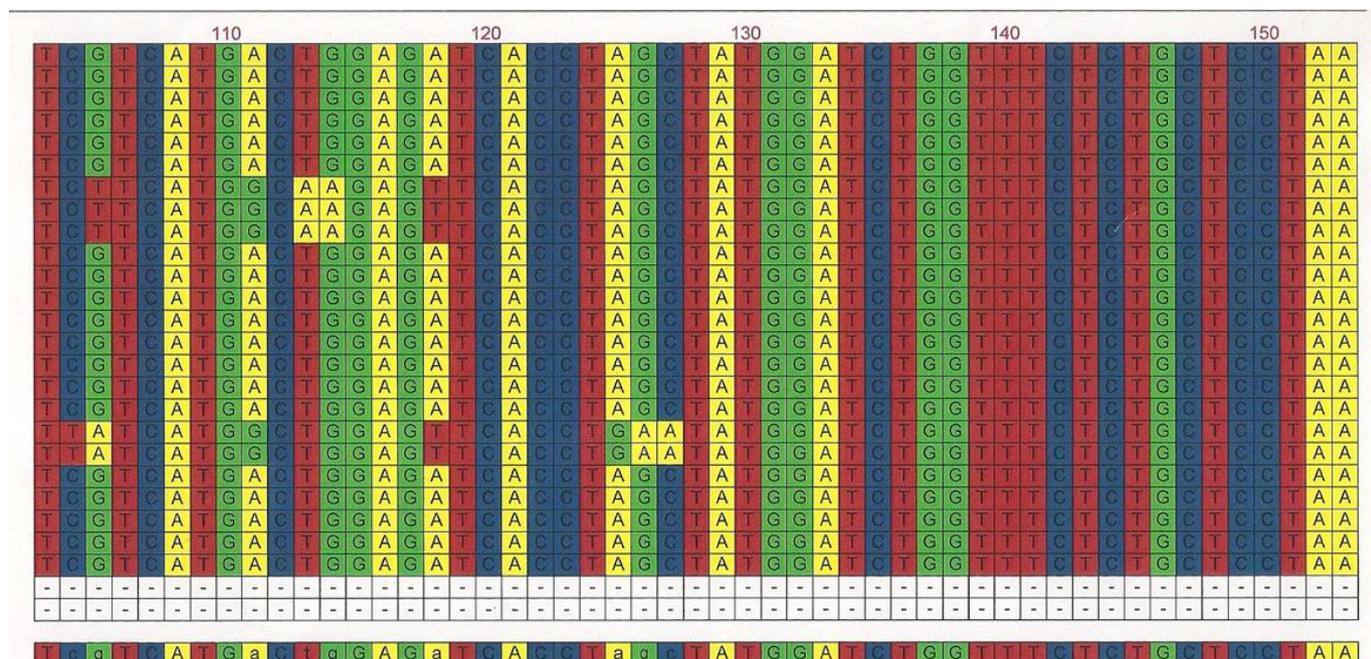
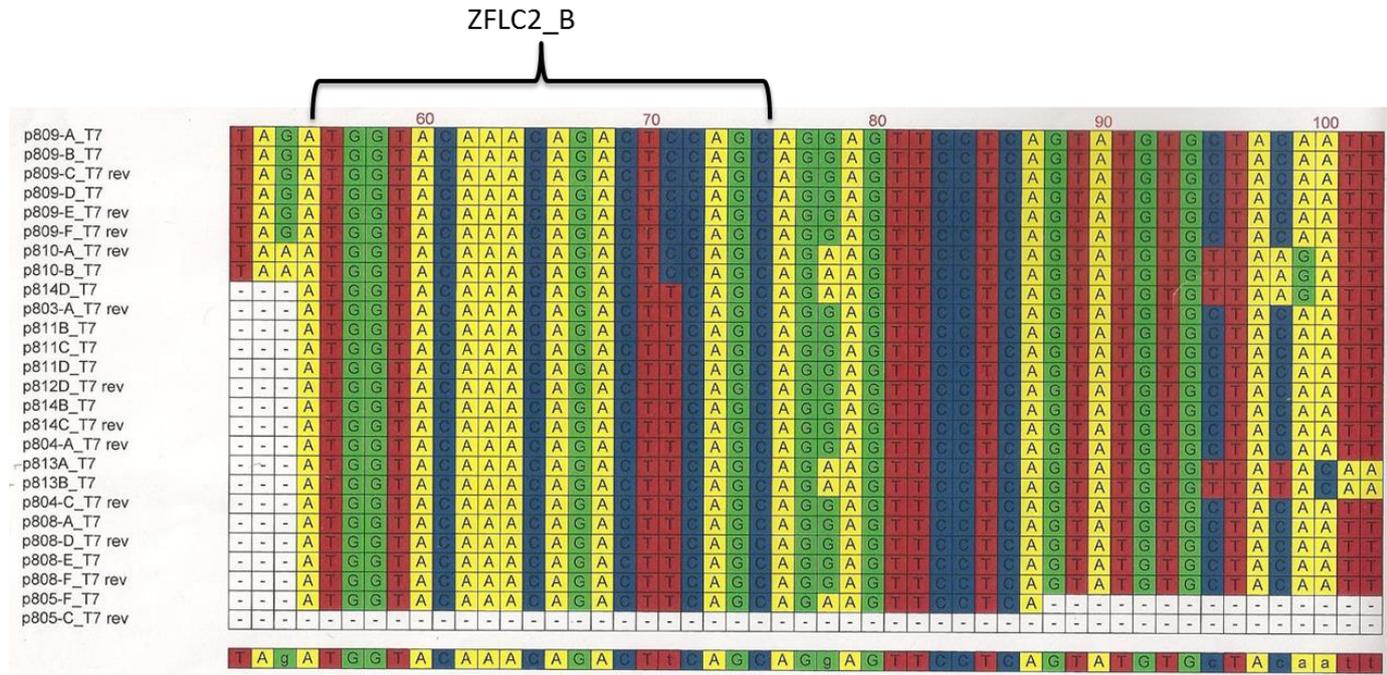
La maîtrise des phénomènes immunitaires chez le *Danio* renforcerait son influence au sein de la recherche immunologique. Il apporte, de par sa relative simplicité de manipulation, une alternative viable au modèle souris dans les études. C'est d'ailleurs le cas pour la mise au point et les tests de vaccins¹¹³⁻¹¹⁵.

ANNEXES

Annexe 1 : Arbre phylogénétique de différents isotypes de chaînes légères de vertébrés (Zimmerman *et al.* 2007).



Annexe 2 : Alignement annoté des séquences de transcrits de chaînes légères de type 2 amplifiées par PCR sur différentes matrices d'ADNc et tableau descriptif des clones séquencés.



Annexe 3: Tableau récapitulatif des informations relatives aux gènes V, J et C de chaînes légères d'Ig analysées.

Gènes	IMGT sub-group	IMGT allèle name	Fonctionnel	Isotype	Numéro accession	Chromosome
V	IGIV1	IGIV1-1	ORF	?	BX571825	19
		IGIV1-2	F	?		
	IGIV2	IGIV2-1	P	?		
	IGIV3	IGIV3-1	F	?		
		IGIV3-2	P	?		
		IGIV3-3	F	?		
	IGIV4	IGIV4-1	ORF	?		
		IGIV4-2	P	?		
	IGIV6	IGIV6 S1	F	1	AF246185	24
		IGIV6 S2	F	?	EF222424	?
	IGIV7	IGIV7S1	F	2	AF246162	24
		IGIV7 S2	F	?	EF22430	?
IGIV8	IGIV8 S1	F	3	AF246193	?	
J	IGIJ1	X	F	?	BX571825	19
	IGIJ2		ORF	?		
	IGIJ3		F	?		
	IGIJ4		P	?		
	IGIJ5		F	?		
	IGIJ6		(F)	1	AF246185	24
	IGIJ7		(F)	2	AF246162	24
	IGIJ8		(F)	3	AF246193	?

Gènes	IMGT sub-group	IMGT allèle name	Fonctionnel	Isotype	Numéro accession	Chromosome
C	IGIC1		F	?	BX571825	19
	IGIC2		P	?		
	IGIC3		F	?		
	IGIC4		P	?		
	IGIC5		F	?		
	IGIC6S1		(F)	1	AF246185	24
	IGIC6S2		(F)	?		?
	IGIC7S1		(F)	2	AF246162	24
	IGIC7S2		(F)	?		?
	IGIC8S1		(F)	3	AF246193	?

Légende : F (fonctionnel) ; P (pseudogène) ; ORF (cadre de lecture ouvert) ; (F) ADN génomique réarrangé ou ADNc dont la séquence génomique n'a pas encore été isolée.

Bibliographie

1. Roessler, S. & Grosschedl, R. Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. *Semin. Immunol.* **18**, 12–19 (2006).
2. Aguilera, R. J., Akira, S., Okazaki, K. & Sakano, H. A pre-B cell nuclear protein that specifically interacts with the immunoglobulin V-J recombination sequences. *Cell* **51**, 909–917 (1987).
3. Akira, S., Okazaki, K. & Sakano, H. Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* **238**, 1134–1138 (1987).
4. Ramsden, D. A., Baetz, K. & Wu, G. E. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1785–1796 (1994).
5. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 959–971 (2013).
6. Kitamura, D. *et al.* A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* **69**, 823–831 (1992).
7. Jumaa, H., Hendriks, R. W. & Reth, M. B cell signaling and tumorigenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 415–445 (2005).
8. Grawunder, U. *et al.* Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* **3**, 601–608 (1995).
9. Parker, M. J. *et al.* The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *EMBO J.* **24**, 3895–3905 (2005).
10. Herzog, S. *et al.* SLP-65 regulates immunoglobulin light chain gene recombination through the PI(3)K-PKB-Foxo pathway. *Nat. Immunol.* **9**, 623–631 (2008).

11. Surova, E. & Jumaa, H. The role of BCR isotype in B-cell development and activation. *Adv. Immunol.* **123**, 101–139 (2014).
12. Bahjat, M. & Guikema, J. E. J. The Complex Interplay between DNA Injury and Repair in Enzymatically Induced Mutagenesis and DNA Damage in B Lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
13. Hardy, R. R. & Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 595–621 (2001).
14. Berland, R. & Wortis, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 253–300 (2002).
15. Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A. & Tedder, T. F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* **23**, 7–18 (2005).
16. Gowans, J. L. & Knight, E. J. THE ROUTE OF RE-CIRCULATION OF LYMPHOCYTES IN THE RAT. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **159**, 257–282 (1964).
17. Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 127–159 (2005).
18. Cyster, J. G. *et al.* Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* **176**, 181–193 (2000).
19. Katakai, T. *et al.* Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 6189–6200 (2008).
20. Batista, F. D. & Harwood, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27 (2009).
21. Cyster, J. G. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat. Immunol.* **11**, 989–996 (2010).

22. Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A. & Clynes, R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* **23**, 503–514 (2005).
23. Tolar, P., Sohn, H. W. & Pierce, S. K. The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Immunol.* **6**, 1168–1176 (2005).
24. Schamel, W. W. & Reth, M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5–14 (2000).
25. Treanor, B. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* **136**, 21–27 (2012).
26. Harwood, N. E. & Batista, F. D. New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity* **28**, 609–619 (2008).
27. Kurosaki, T. Regulation of BCR signaling. *Mol. Immunol.* **48**, 1287–1291 (2011).
28. Okada, T. *et al.* Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* **3**, e150 (2005).
29. Muramatsu, M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553–563 (2000).
30. Honjo, T., Muramatsu, M. & Fagarasan, S. AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* **20**, 659–668 (2004).
31. Choudhary, M. *et al.* AID Biology: A pathological and clinical perspective. *Int. Rev. Immunol.* 1–20 (2017). doi:10.1080/08830185.2017.1369980
32. Neuberger, M. S. *et al.* Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**, 357–360 (2000).

33. Natkanski, E. *et al.* B cells use mechanical energy to discriminate antigen affinities. *Science* **340**, 1587–1590 (2013).
34. Batista, F. D. & Neuberger, M. S. B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *EMBO J.* **19**, 513–520 (2000).
35. Mesin, L., Ersching, J. & Victora, G. D. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* **45**, 471–482 (2016).
36. Victora, G. D. *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* **143**, 592–605 (2010).
37. Takahashi, Y., Onodera, T., Adachi, Y. & Ato, M. Adaptive B Cell Responses to Influenza Virus Infection in the Lung. *Viral Immunol.* **30**, 431–437 (2017).
38. Meyer-Hermann, M. E., Maini, P. K. & Iber, D. An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centers. *Math. Med. Biol. J. IMA* **23**, 255–277 (2006).
39. Manis, J. P., Tian, M. & Alt, F. W. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* **23**, 31–39 (2002).
40. Torres, M. & Casadevall, A. The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. *Trends Immunol.* **29**, 91–97 (2008).
41. Woof, J. M. & Mestecky, J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol. Rev.* **206**, 64–82 (2005).
42. Geisberger, R., Lamers, M. & Achatz, G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* **118**, 429–437 (2006).
43. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–52 (2010).
44. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* **96**, 179–204 (2007).

45. Guyre, P. M., Morganelli, P. M. & Miller, R. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* **72**, 393–397 (1983).
46. Nimmerjahn, F. Activating and inhibitory FcγRs in autoimmune disorders. *Springer Semin. Immunopathol.* **28**, 305–319 (2006).
47. Shushakova, N. *et al.* C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγRs in immune complex–induced lung disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 1823–1830 (2002).
48. Pricop, L. *et al.* Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 531–537 (2001).
49. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **310**, 1510–1512 (2005).
50. Okayama, Y., Kirshenbaum, A. S. & Metcalfe, D. D. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-γ. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 4332–4339 (2000).
51. Rudge, E. U., Cutler, A. J., Pritchard, N. R. & Smith, K. G. C. Interleukin 4 reduces expression of inhibitory receptors on B cells and abolishes CD22 and Fc gamma RII-mediated B cell suppression. *J. Exp. Med.* **195**, 1079–1085 (2002).
52. Paus, D. *et al.* Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* **203**, 1081–1091 (2006).
53. Phan, T. G. *et al.* High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* **203**, 2419–2424 (2006).

54. Duan, B. & Morel, L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **5**, 403–408 (2006).
55. Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 34–46 (2011).
56. O’Garra, A. *et al.* Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* **22**, 711–717 (1992).
57. de Jong, J. L. O. & Zon, L. I. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 481–501 (2005).
58. Detrich, H. W. *et al.* Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10713–10717 (1995).
59. Burns, C. E. *et al.* Isolation and characterization of runxa and runxb, zebrafish members of the runt family of transcriptional regulators. *Exp. Hematol.* **30**, 1381–1389 (2002).
60. Avagyan, S. & Zon, L. I. Fish to Learn: Insights into Blood Development and Blood Disorders from Zebrafish Hematopoiesis. *Hum. Gene Ther.* **27**, 287–294 (2016).
61. Murayama, E. *et al.* Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* **25**, 963–975 (2006).
62. Bertrand, J. Y. *et al.* Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* **464**, 108–111 (2010).
63. Willett, C. E., Cortes, A., Zuasti, A. & Zapata, A. G. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **214**, 323–336 (1999).
64. Bertrand, J. Y., Kim, A. D., Teng, S. & Traver, D. CD41⁺ cmyb⁺ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Dev. Camb. Engl.* **135**, 1853–1862 (2008).

65. Stachura, D. L. & Traver, D. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods Cell Biol.* **133**, 11–53 (2016).
66. Danilova, N. & Steiner, L. A. B cells develop in the zebrafish pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13711–13716 (2002).
67. Lam, S. H., Chua, H. L., Gong, Z., Lam, T. J. & Sin, Y. M. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 9–28 (2004).
68. Page, D. M. *et al.* An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish. *Blood* **122**, e1-11 (2013).
69. Haire, R. N., Rast, J. P., Litman, R. T. & Litman, G. W. Characterization of three isotypes of immunoglobulin light chains and T-cell antigen receptor alpha in zebrafish. *Immunogenetics* **51**, 915–923 (2000).
70. Francés, V. *et al.* A surrogate 15 kDa JC kappa protein is expressed in combination with mu heavy chain by human B cell precursors. *EMBO J.* **13**, 5937–5943 (1994).
71. Rangel, R. *et al.* Assembly of the kappa preB receptor requires a V kappa-like protein encoded by a germline transcript. *J. Biol. Chem.* **280**, 17807–17814 (2005).
72. Hansen, J. D. & Zapata, A. G. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol. Rev.* **166**, 199–220 (1998).
73. Willett, C. E., Zapata, A. G., Hopkins, N. & Steiner, L. A. Expression of zebrafish rag genes during early development identifies the thymus. *Dev. Biol.* **182**, 331–341 (1997).
74. Petrie-Hanson, L., Hohn, C. & Hanson, L. Characterization of rag1 mutant zebrafish leukocytes. *BMC Immunol.* **10**, 8 (2009).

75. Schorpp, M. *et al.* Conserved functions of Ikaros in vertebrate lymphocyte development: genetic evidence for distinct larval and adult phases of T cell development and two lineages of B cells in zebrafish. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 2463–2476 (2006).
76. Sertori, R. *et al.* Conserved IL-2R γ c Signaling Mediates Lymphopoiesis in Zebrafish. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 135–143 (2016).
77. Jiang, N. *et al.* Determinism and stochasticity during maturation of the zebrafish antibody repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5348–5353 (2011).
78. Weinstein, J. A., Jiang, N., White, R. A., Fisher, D. S. & Quake, S. R. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. *Science* **324**, 807–810 (2009).
79. Marianes, A. E. & Zimmerman, A. M. Targets of somatic hypermutation within immunoglobulin light chain genes in zebrafish. *Immunology* **132**, 240–255 (2011).
80. Ye, J., Kaattari, I. M. & Kaattari, S. L. The differential dynamics of antibody subpopulation expression during affinity maturation in a teleost. *Fish Shellfish Immunol.* **30**, 372–377 (2011).
81. Dancyger, A. M. *et al.* Differences in the enzymatic efficiency of human and bony fish AID are mediated by a single residue in the C terminus modulating single-stranded DNA binding. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 1517–1525 (2012).
82. Barreto, V. M. & Magor, B. G. Activation-induced cytidine deaminase structure and functions: a species comparative view. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 991–1007 (2011).
83. Barreto, V. M. *et al.* AID from bony fish catalyzes class switch recombination. *J. Exp. Med.* **202**, 733–738 (2005).
84. Saunders, H. L., Oko, A. L., Scott, A. N., Fan, C. W. & Magor, B. G. The cellular context of AID expressing cells in fish lymphoid tissues. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 669–676 (2010).

85. Lamers, C. H. J. Histophysiology of a primary immune response against *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Zool.* **238**, 71–80 (1986).
86. Hansen, J. D., Landis, E. D. & Phillips, R. B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6919–6924 (2005).
87. Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K. & Steiner, L. A. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* **6**, 295–302 (2005).
88. Zhang, Y.-A. *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* **11**, 827–835 (2010).
89. Hsu, E. & Criscitiello, M. F. Diverse immunoglobulin light chain organizations in fish retain potential to revise B cell receptor specificities. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 2452–2462 (2006).
90. Hsu, E., Pulham, N., Rumpf, L. L. & Flajnik, M. F. The plasticity of immunoglobulin gene systems in evolution. *Immunol. Rev.* **210**, 8–26 (2006).
91. Zimmerman, A. M., Yeo, G., Howe, K., Maddox, B. J. & Steiner, L. A. Immunoglobulin light chain (IgL) genes in zebrafish: Genomic configurations and inversional rearrangements between (V(L)-J(L)-C(L)) gene clusters. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 421–434 (2008).
92. Six, A. *et al.* The past, present, and future of immune repertoire biology - the rise of next-generation repertoire analysis. *Front. Immunol.* **4**, 413 (2013).
93. ZFIN: Zebrafish Book: Contents. Available at: https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
94. Invitrogen TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, with pCR4-TOPO Vector, One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli, and PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit. Available at: <https://www.fishersci.com/shop/products/topo-ta-seq-top10-prep-25/k457502>.

95. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (Accessed: 31st October 2017)
96. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 209–212 (1999).
97. Langenau, D. M. *et al.* In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7369–7374 (2004).
98. Danilova, N. *et al.* T cells and the thymus in developing zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 755–767 (2004).
99. Liu, X. *et al.* Zebrafish B Cell Development without a Pre-B Cell Stage, Revealed by CD79 Fluorescence Reporter Transgenes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **199**, 1706–1715 (2017).
100. Moore, F. E. *et al.* Single-cell transcriptional analysis of normal, aberrant, and malignant hematopoiesis in zebrafish. *J. Exp. Med.* **213**, 979–992 (2016).
101. Shizuya, H. *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8794–8797 (1992).
102. Yang, X. W., Model, P. & Heintz, N. Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* **15**, 859–865 (1997).
103. Antoch, M. P. *et al.* Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* **89**, 655–667 (1997).
104. Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* **33**, e36 (2005).

105. Inui, S. *et al.* Molecular cloning of a cDNA clone encoding a phosphoprotein component related to the Ig receptor-mediated signal transduction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 2714–2723 (1995).
106. Chen, J., Peterson, R. T. & Schreiber, S. L. Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 827–832 (1998).
107. Liu, J. *et al.* $\alpha 4$ contributes to bladder urothelial carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of E-cadherin and is a predictor of outcome in bladder urothelial carcinoma patients. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **50**, 840–851 (2014).
108. Chen, L.-P. *et al.* $\alpha 4$ is highly expressed in carcinogen-transformed human cells and primary human cancers. *Oncogene* **30**, 2943–2953 (2011).
109. Pasquier, J. *et al.* Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics* **17**, 368 (2016).
110. EcoRV-HF® | New England Biolabs. Available at: <http://international.neb.com/products/r3195-ecorv-hf>.
111. NotI-HF® | New England Biolabs. Available at: <http://international.neb.com/products/r3189-noti-hf>.
112. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Available at: <http://www.mn-net.com/tabid/1452/default.aspx>.
113. Embregts, C. W. E. & Forlenza, M. Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Dev. Comp. Immunol.* **64**, 118–137 (2016).
114. Howlader, D. R. *et al.* Zebrafish as a novel model for non-typhoidal Salmonella pathogenesis, transmission and vaccine efficacy. *Vaccine* **34**, 5099–5106 (2016).
115. Myllymäki, H. *et al.* Identification of novel antigen candidates for a tuberculosis vaccine in the adult zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One* **12**, e0181942 (2017).

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maitres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle a leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la sante publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai a utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle a mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprise(e) de mes confrères si j'y manque.

TITRE

La lymphopoïèse B chez le *Danio rerio*

RESUME

La lymphopoïèse B est l'ensemble des processus biologiques nécessaires à la formation d'un lymphocyte B (LB) mature. De l'hématopoïèse embryonnaire à l'hématopoïèse adulte, de la rencontre avec l'antigène à la phase effectrice et la constitution d'une mémoire immunitaire, les thématiques entrant dans la maturation B sont diverses et complexes. Pour ces études, la souris s'est révélée comme modèle de référence, mais la contribution des autres espèces n'est pas à négliger. Parmi elles, le *Danio rerio* ou poisson zèbre, vertébré présentant de nombreux gènes orthologues aux mammifères, s'est montré tout à fait pertinent pour l'étude des LB. L'analyse des répertoires anticorps ou encore l'utilisation de marqueurs de surfaces telles que CD79 sont autant d'approches visant à élucider les zones d'ombres persistant dans le développement chez le *Danio* comme par exemple la présence ou non d'un stade pré-B.

DISCIPLINE

Pharmacie

MOTS-CLES

Lymphopoïèse B ; *Danio rerio* ; Immunoglobulines ; Répertoire anticorps ; CD79.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R.

UFR des Sciences Pharmaceutiques
Université de Bordeaux – Collège Sciences de la Santé
146 Rue Leo Saignat
33076 BORDEAUX

Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques
Université Montpellier II
Place E. Bataillon – Bât. 24 cc 107
34095 MONTPELLIER Cedex 5

Title

B lymphopoiesis in *Danio rerio*

Abstract

B lymphopoiesis is the set of biological processes of mature B cell (LB) formation. From embryonic hematopoiesis to adult hematopoiesis, from antigen meeting to effector stage and immune memory creation, B maturation themes are various and complicated. Mouse is actually the main support for immunologic studies, but other species show specific and unique advantages. *Danio rerio* or zebrafish is one of them. This vertebrate presents many orthologous genes with mammals and proves its utility. Tools like Immunoglobulin repertoire analysis or target surface cell markers like CD79 are different ways to clarify zebrafish B cell development, for example demonstrate existence of pre-B cell stage.