

Bases fondamentales: Lymphocytes B

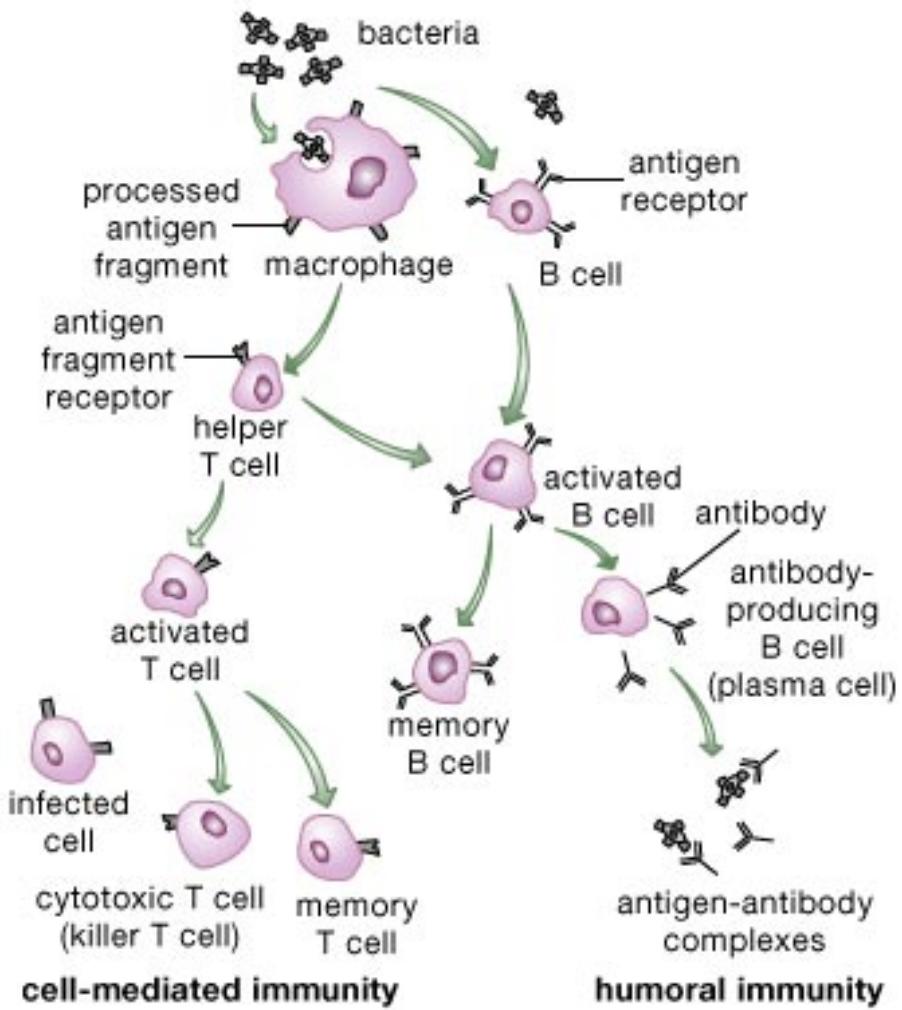
Chaigne Benjamin
12/10/2018

Objectifs

- Le BCR
- Un peu d'ontogénèse...
- Expliquer la diversité de la production d'anticorps
- Montrer qu'il y a plusieurs populations de lymphocytes B
- Donner quelques exemples de pathologies auto-immunes
- Introduction aux applications thérapeutiques: cibler le B...

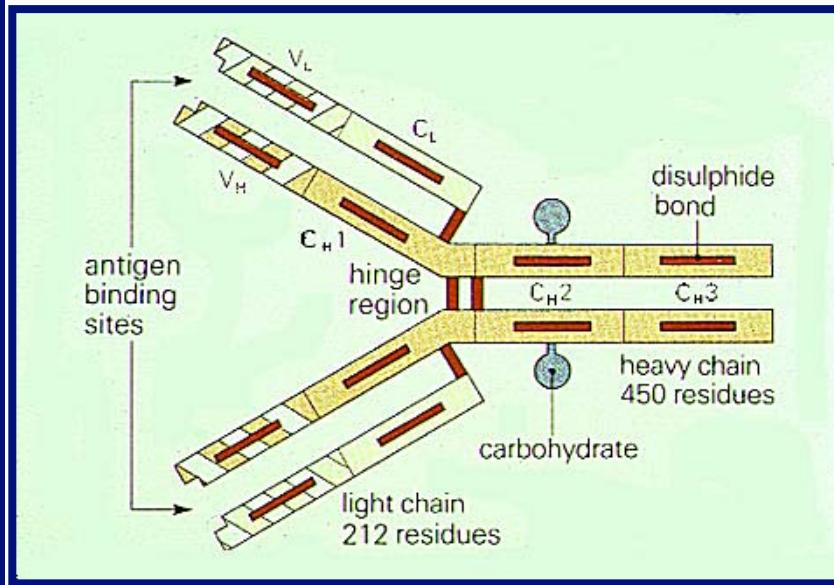
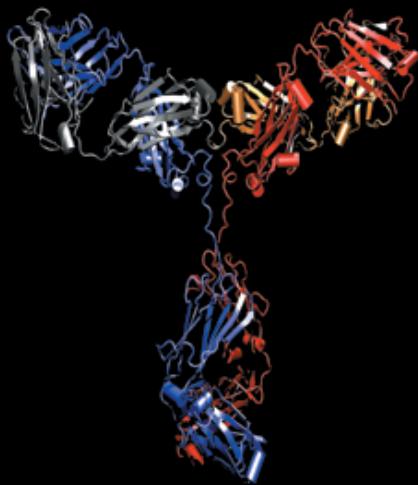
Immunité humorale

- Les lymphocytes B, stimulés spécifiquement par l'antigène, se multiplient et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.
- Ces anticorps, dont la structure est très proche de celle des récepteurs B, vont se lier à l'antigène.

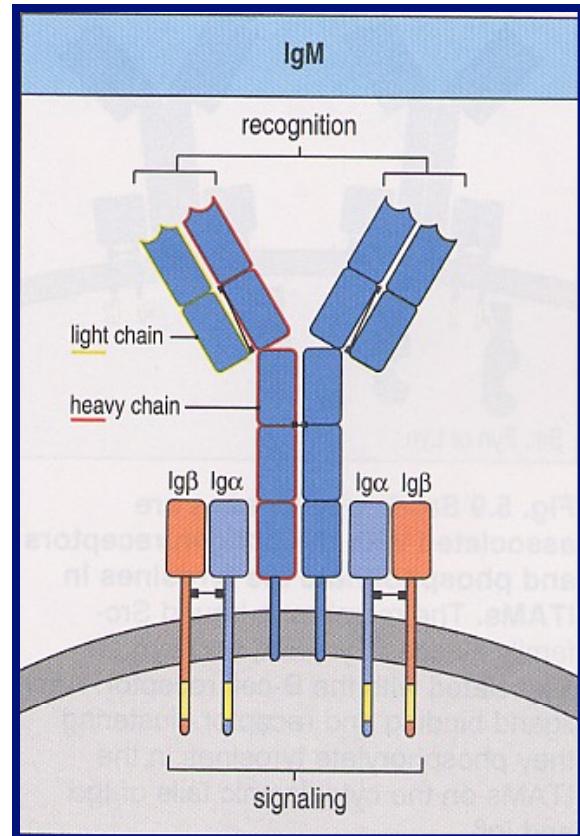
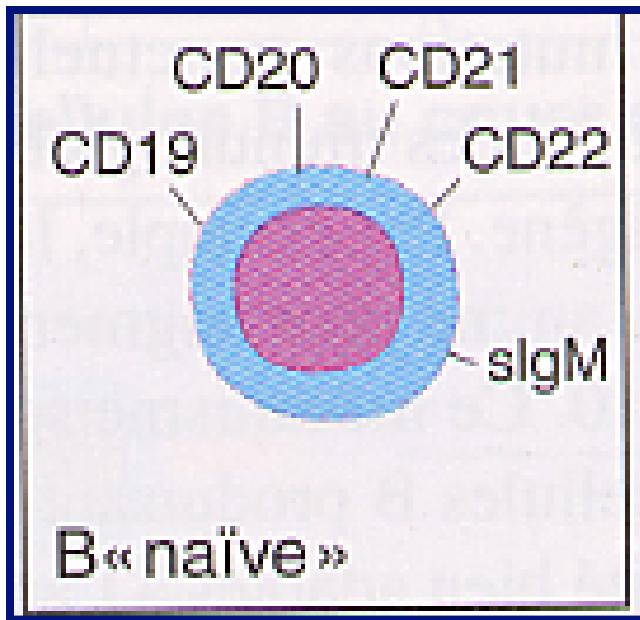


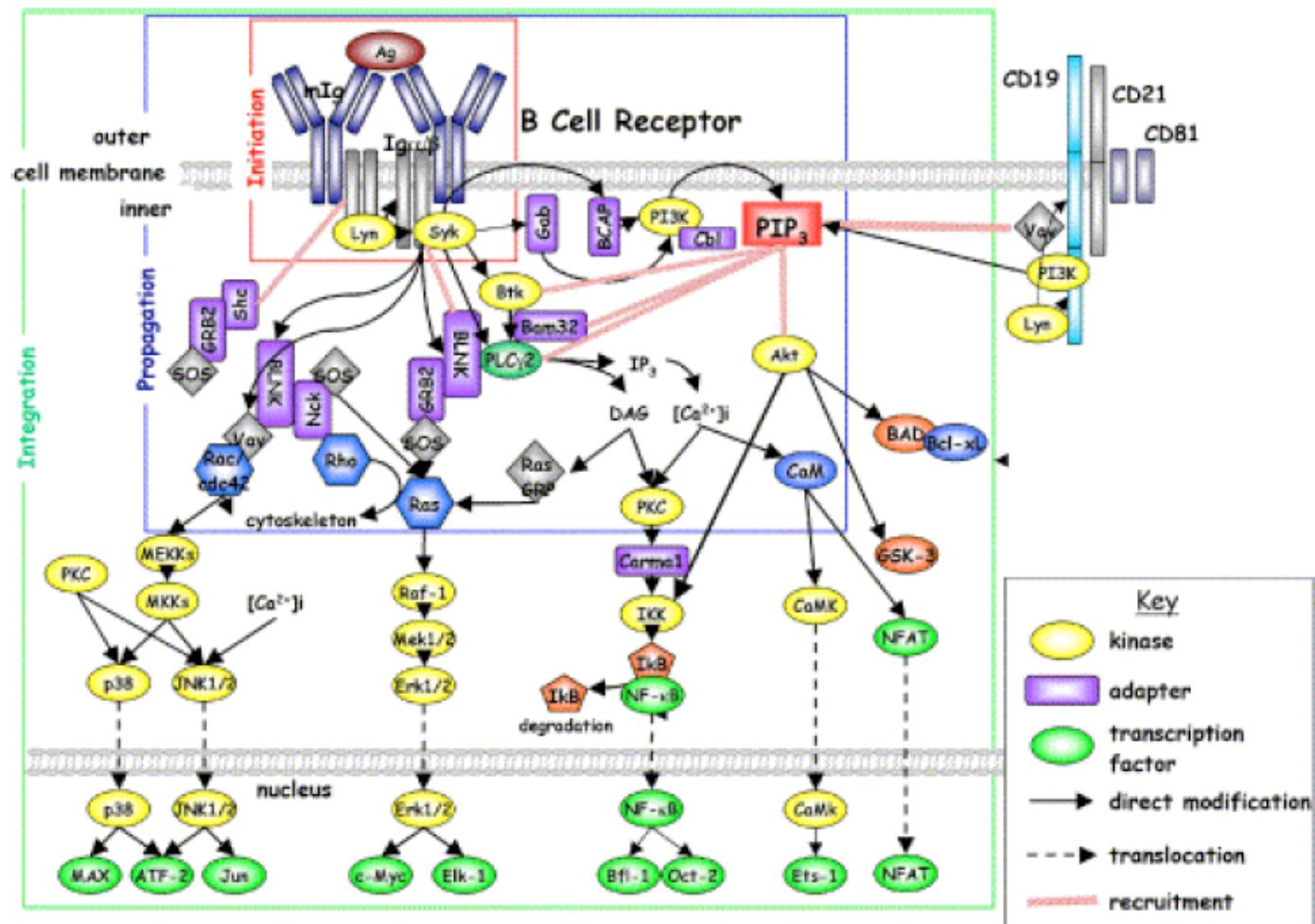
BCR

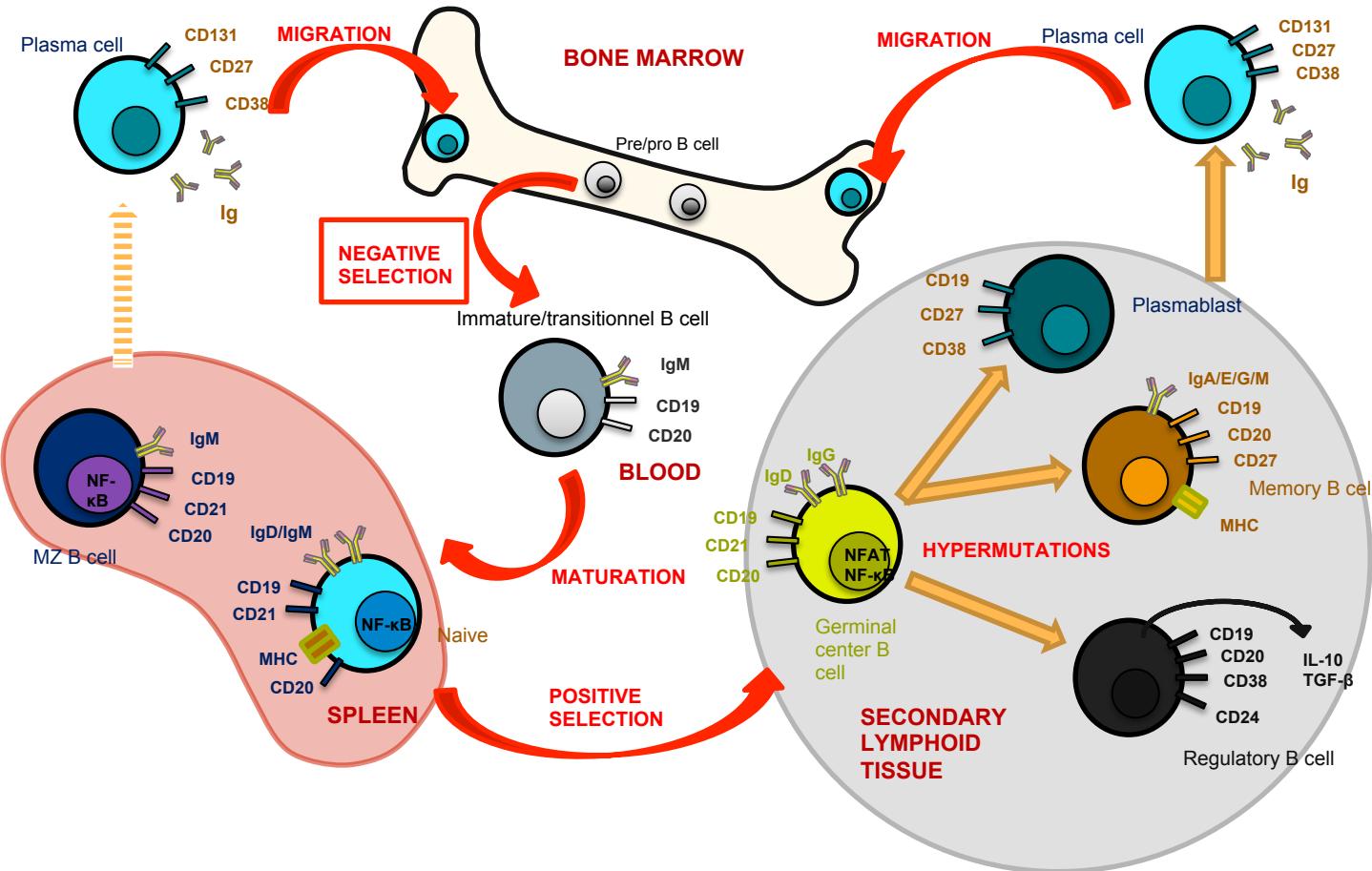
Immunoglobuline G



Lymphocyte B: récepteur, molécules de surface







Théorie de la sélection clonale

Burnet (1899–1985)

- Chaque lymphocyte exprime un type unique de récepteur spécifique d'antigène
- Les lymphocytes exprimant un récepteur dirigé contre un antigène du soi sont éliminés lors de la différenciation
- La liaison avec une bonne affinité d'une molécule étrangère et d'un récepteur entraîne l'activation du lymphocyte
- Les cellules effectrices différencierées à partir d'un lymphocyte activé donné expriment des récepteurs de même spécificité



Un paradoxe génétique

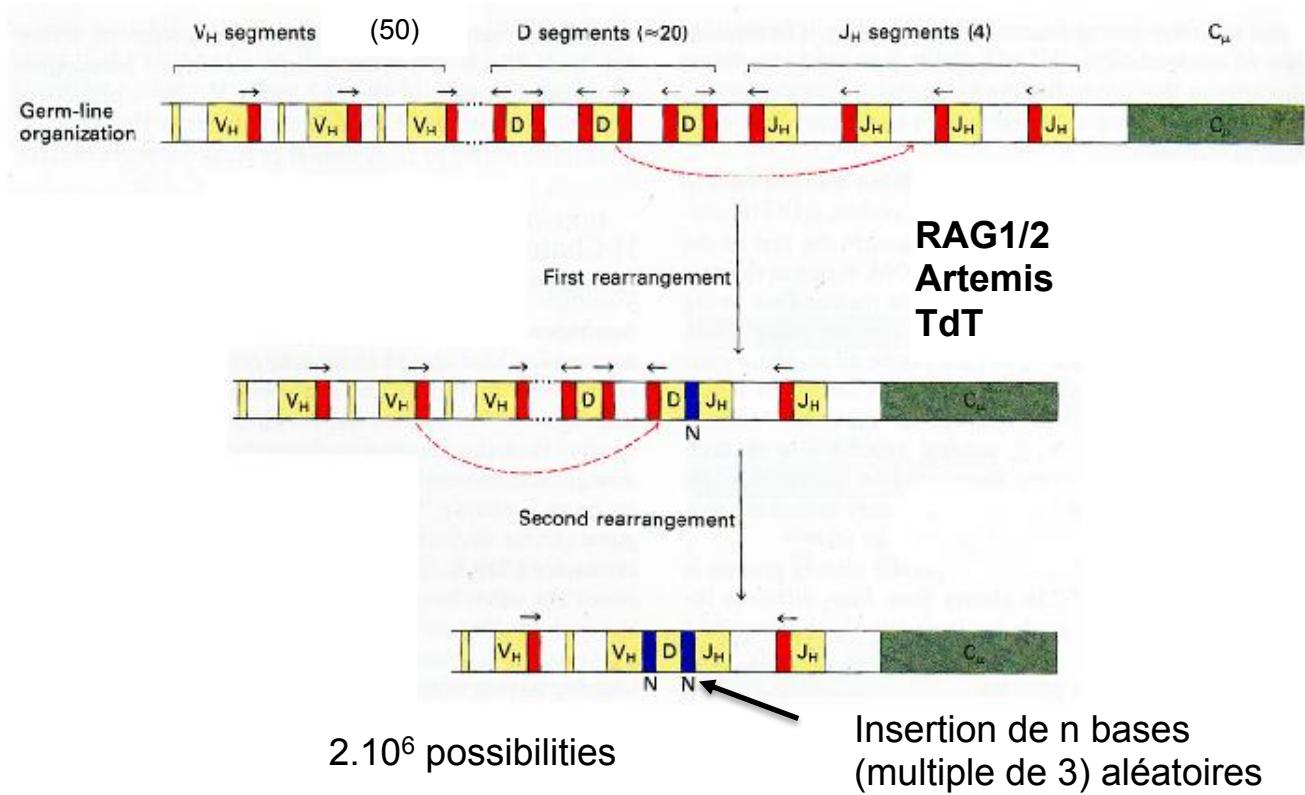
- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~20 000 gènes dans le génome humain

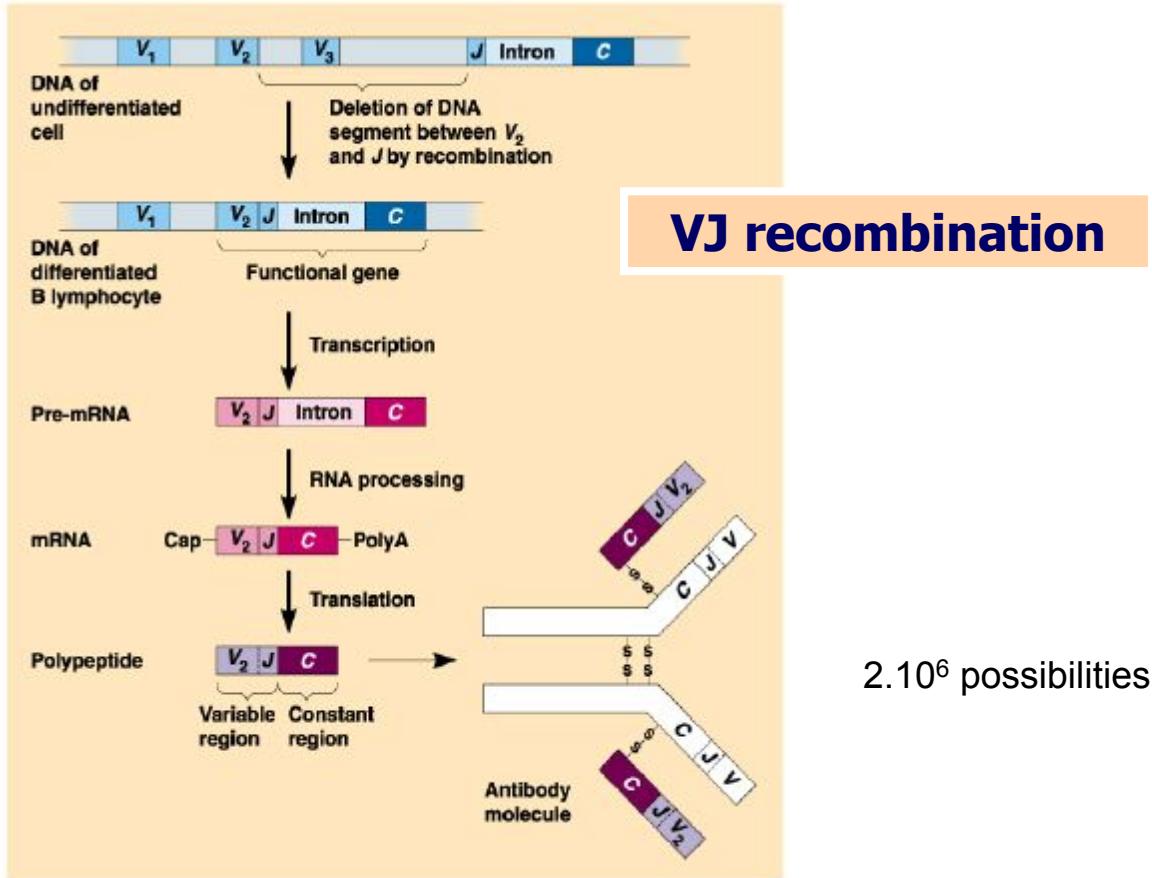
Mais...

- Capacité de production d'une variété « infinie » d'Ig et de TCR (cf. Landsteiner)
- Constance des domaines constants vs. Diversité dans les domaines variables (cf. Edelman, 1969)
- Combien de gènes doit-on considérer ?

=> Théorie des réarrangements somatiques
La recombinaison V(D)J (Tonegawa, 1976)

VDJ recombination

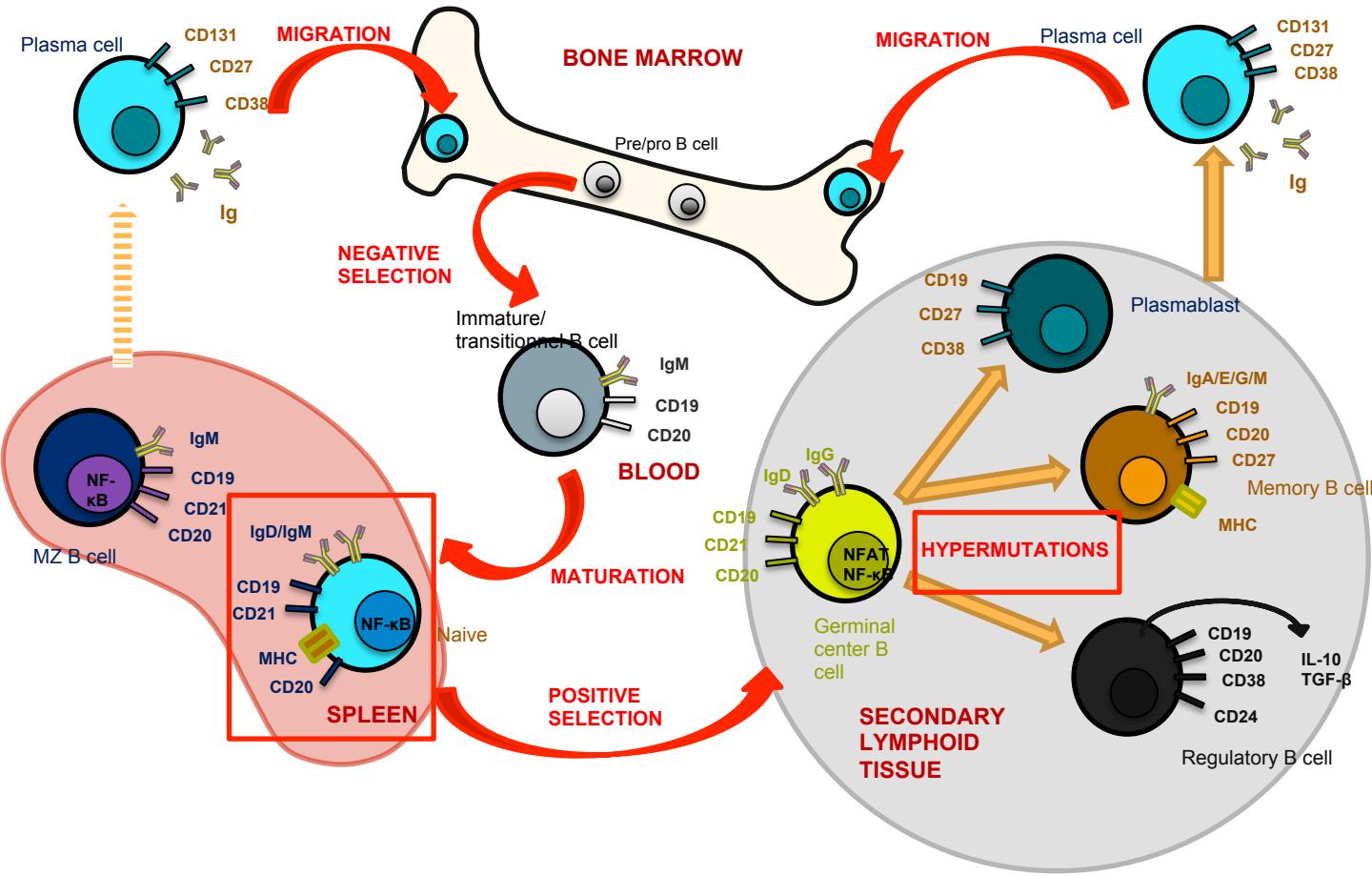




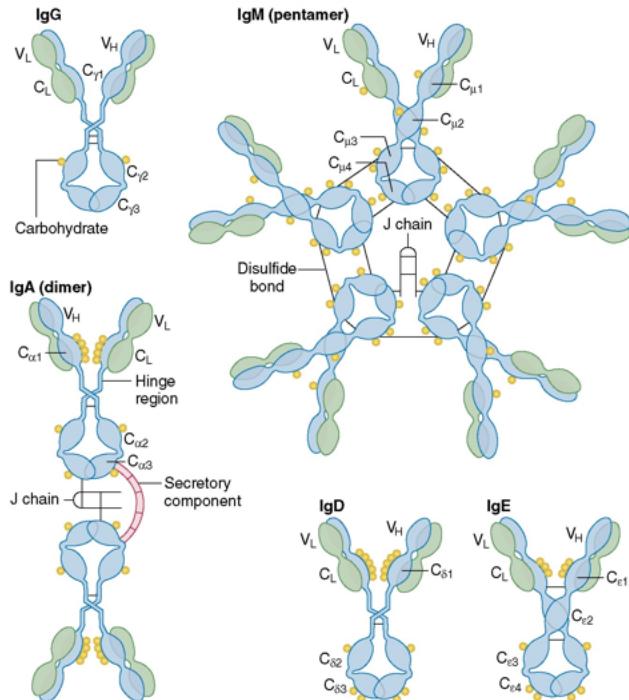
Ordered V(D)J recombination during B cell development

Figure 4.3

	Stem cell	Early pro-B cell	Late pro-B cell	Large pre-B cell pre-B-cell receptor	Small pre-B cell	Immature B cell	Mature B cell
H-chain genes	Germine	D-J rearranged	V-DJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged
L-chain genes	Germline	Germline	Germline	Germline	V-J rearrangement	V-J rearranged	V-J rearranged
Surface Ig	Absent	Absent	Absent	μ chain at surface as part of pre-B-cell receptor	μ chain in cytoplasm and at surface as part of pre-B-cell receptor	IgM expressed on cell surface	IgD and IgM made from alternatively spliced H-chain transcripts



Commutation de classe isotypique



Caractéristiques biochimiques des immunoglobuline

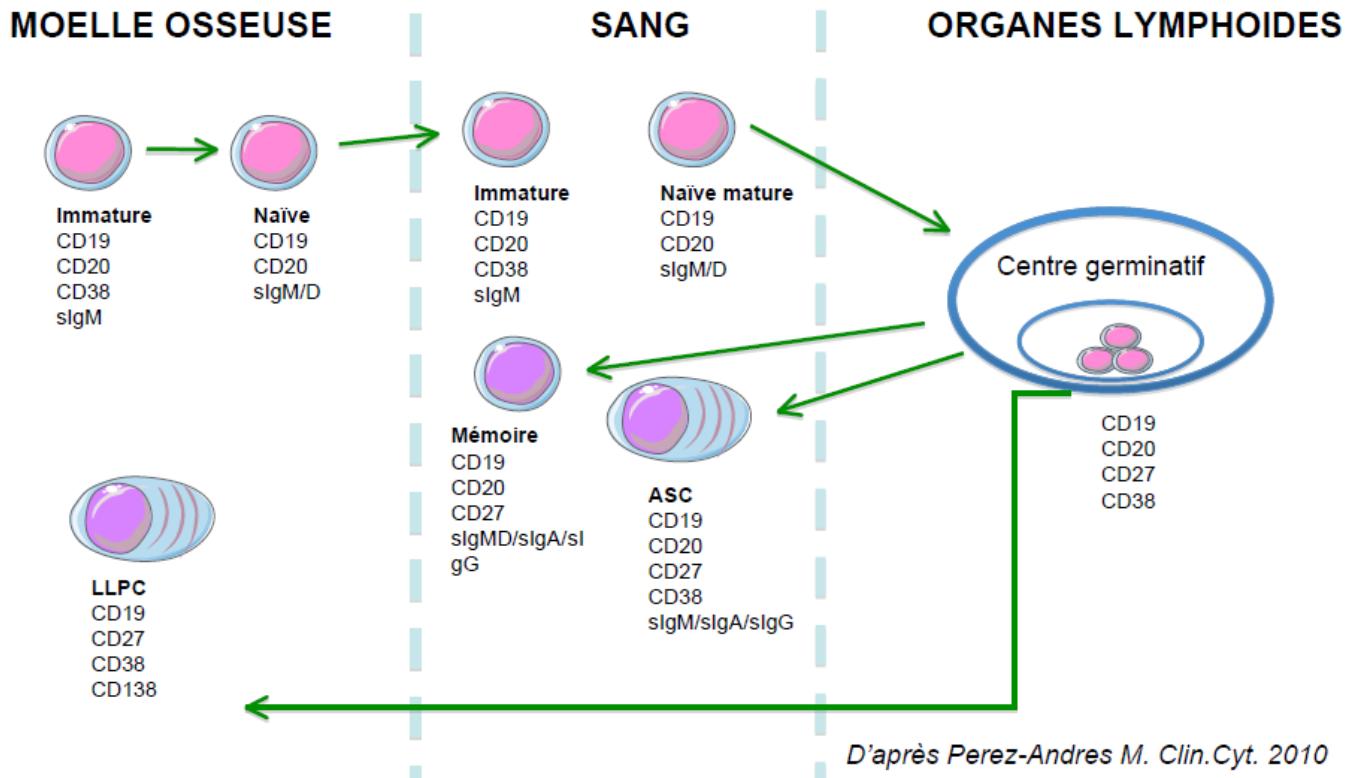
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Chaîne lourde PM (Kda)	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	E
	150	150	165	150	970	160	160	185	185
Sites fixation Ag	2	2	2	2	10	2/4	2	2	2
Conc (mg/ml)	9	3	1	0,5	1,5	3,0	0,5	0,03	5×10^{-5}
Demi-vie (jours)	21	21	7	21	10	6	6	3	2

Génération de la diversité des anticorps

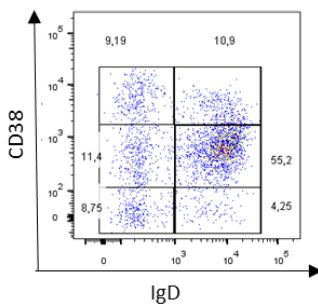
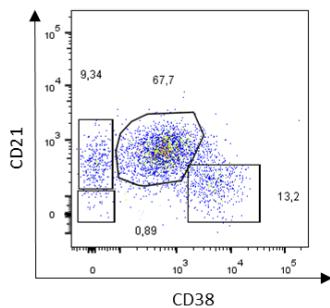
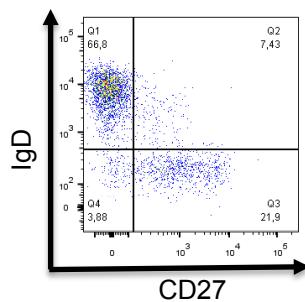
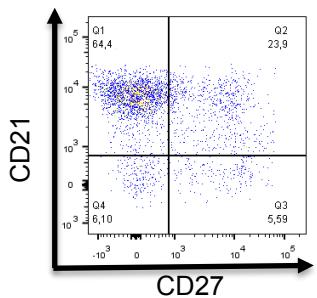
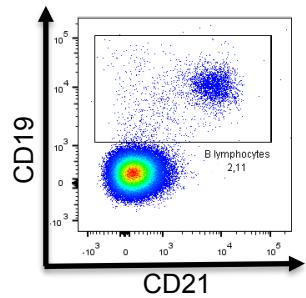
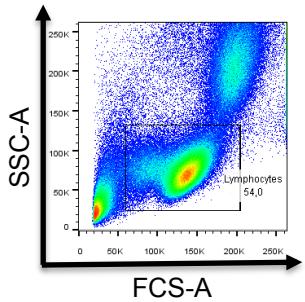
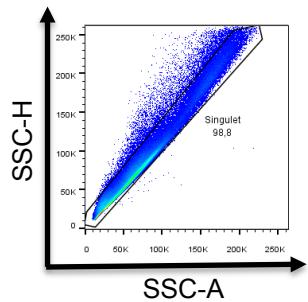
Diversité combinatoire	Assemblage des segments V et J (chaînes légères) et V, D et J (chaînes lourdes)
Assemblage chaîne légère/chaîne lourde	Assemblage aléatoire d'une chaîne lourde avec une chaîne légère
Diversité jonctionnelle	Insertion ou délétion de nucléotides à la jonction entre les segments de gènes
Maturation d'affinité	Hypermutations somatiques : au hasard sur les gènes réarrangés des régions variables lors de la stimulation par l'antigène. Les cellules B qui ont un récepteur muté qui fixe mieux l'antigène sont sélectionnées.

+ 10^9 possibilités

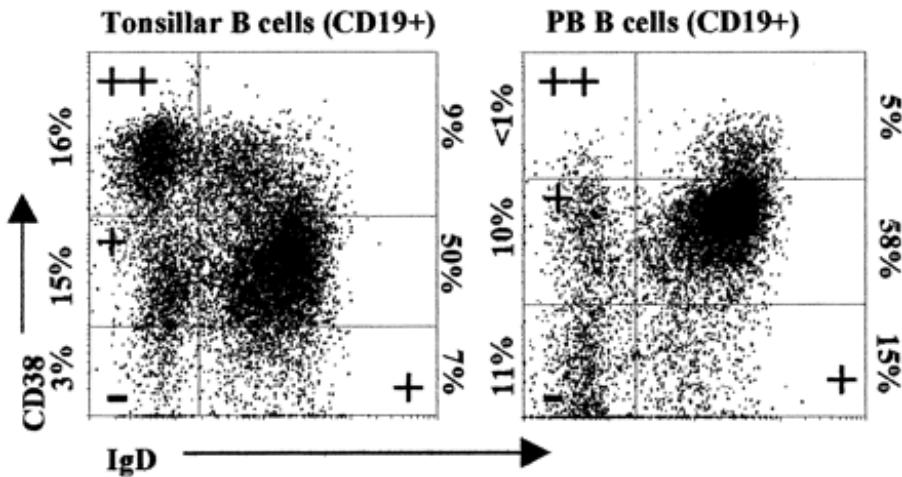
Différents phénotypes de LB

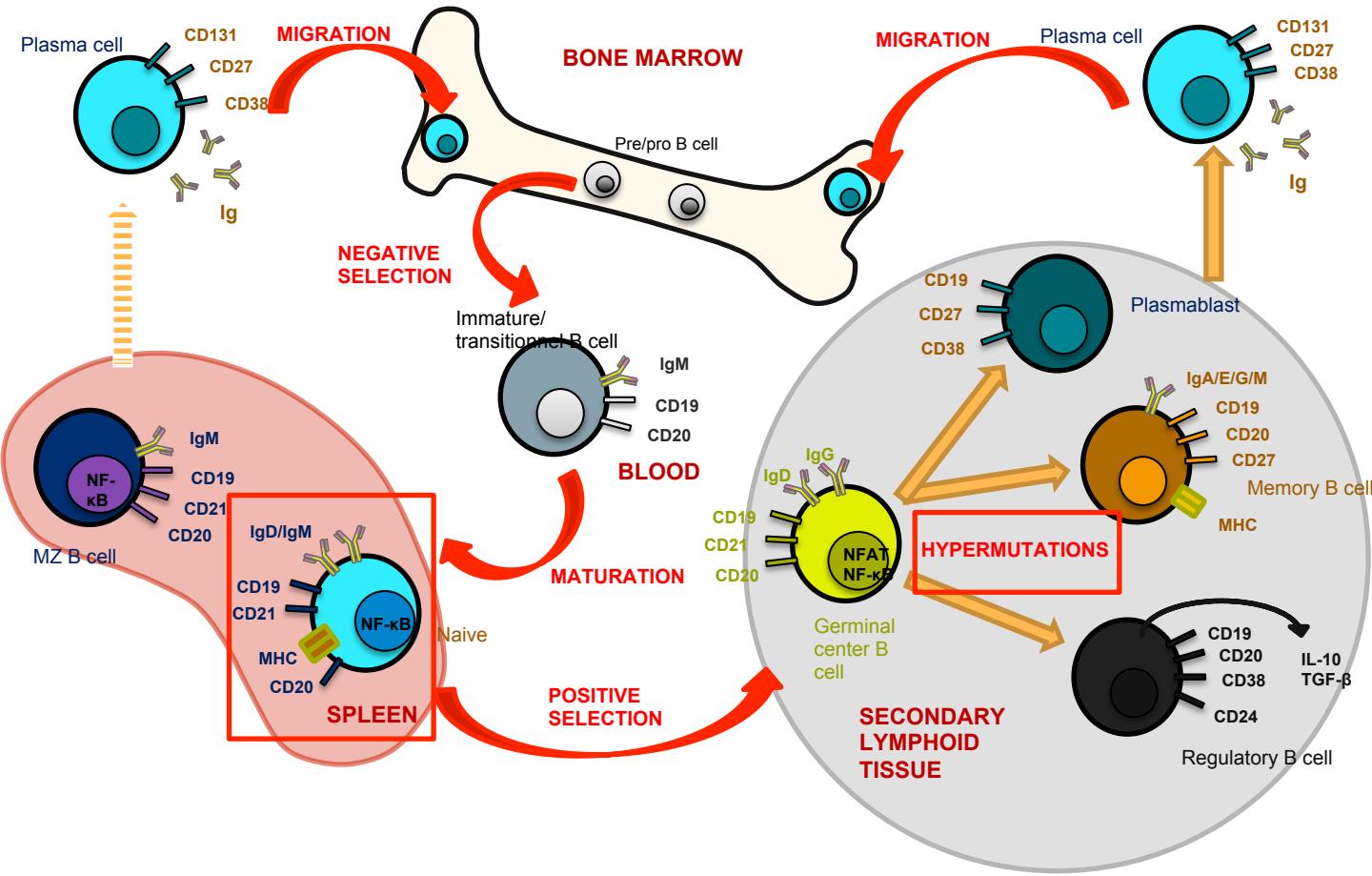


D'après Perez-Andres M. Clin.Cyt. 2010

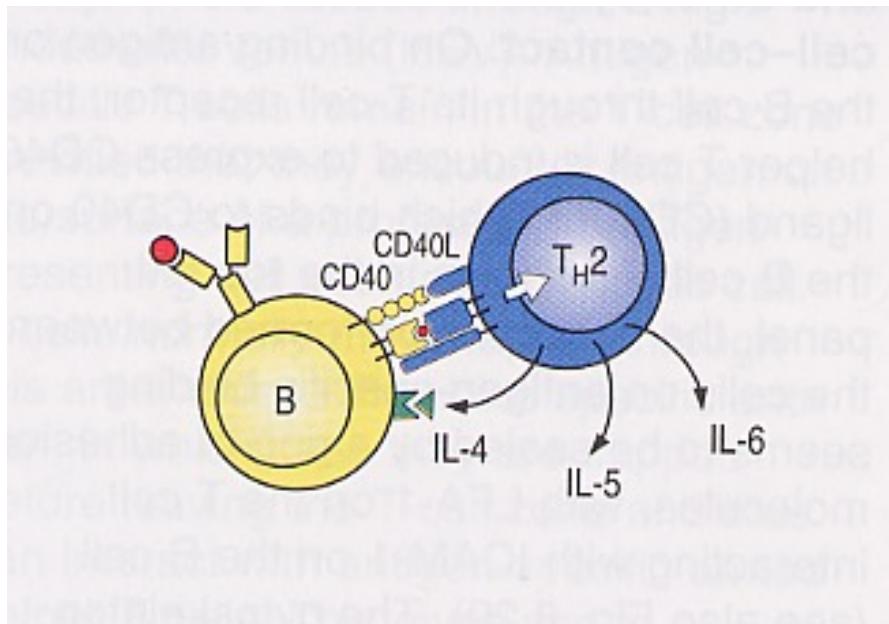


Différents phénotypes selon la localisation

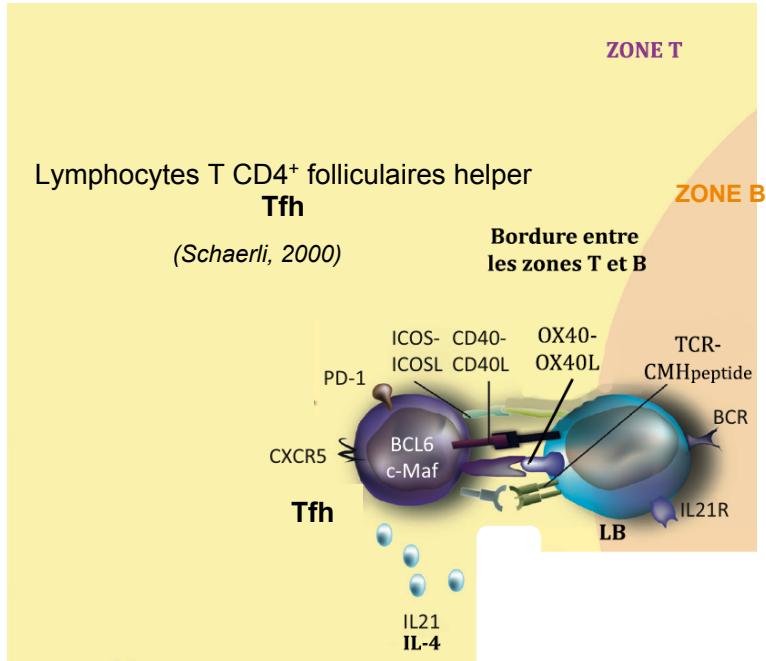




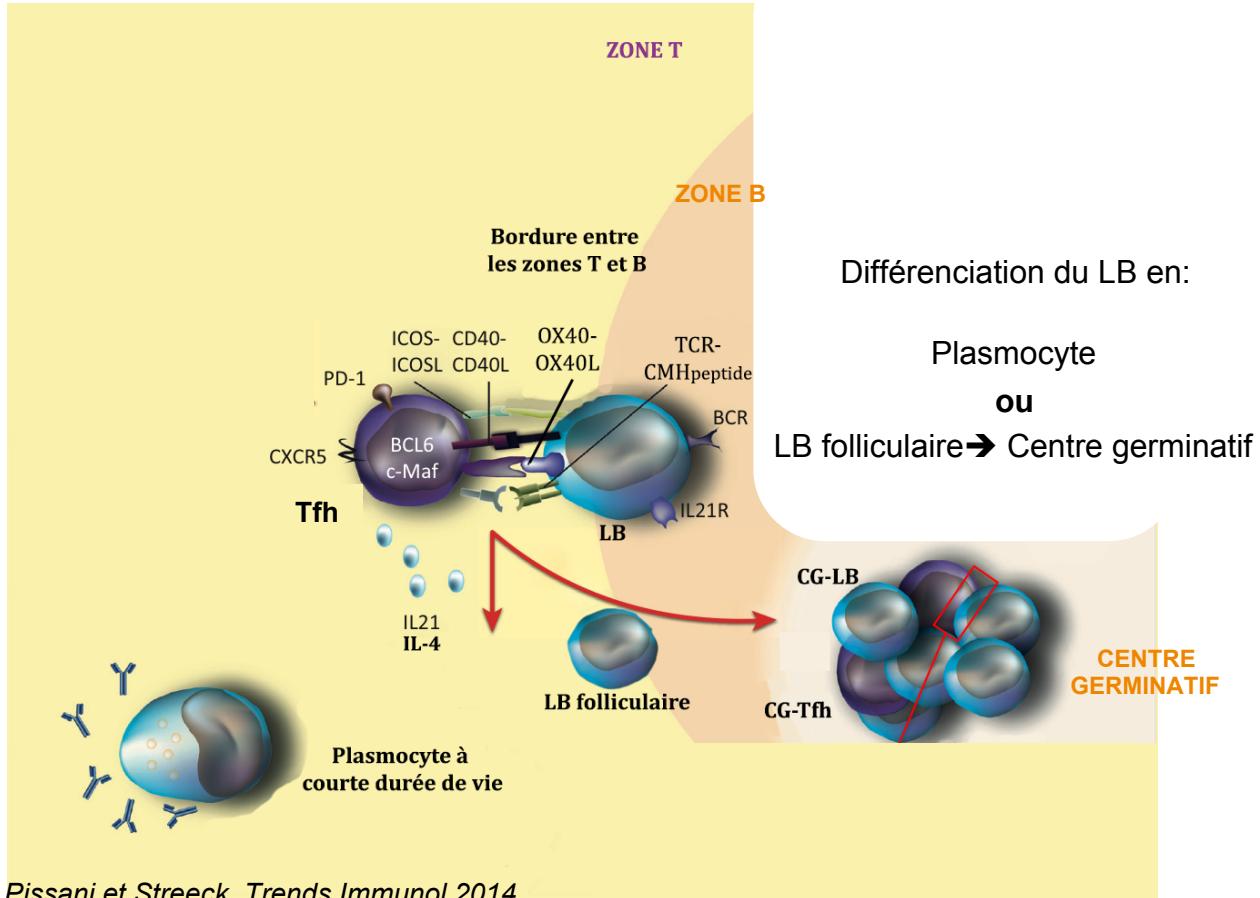
La reconnaissance de l'antigène induit l'expression de molécules effectrices par les LT, qui activent les lymphocytes B



Différenciation et maturation des LB dans les organes lymphoïdes secondaires



Différenciation et maturation des LB dans les organes lymphoïdes secondaires



Différenciation et maturation des LB dans les organes lymphoïdes secondaires

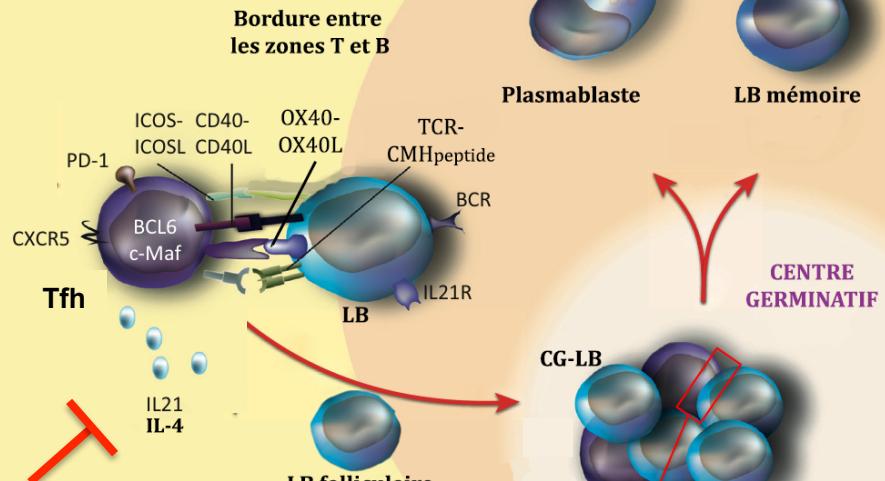
Maturation des anticorps

- Commutation de classe isotypique
 - Hypermutations somatiques

ZONE T

ZONE B

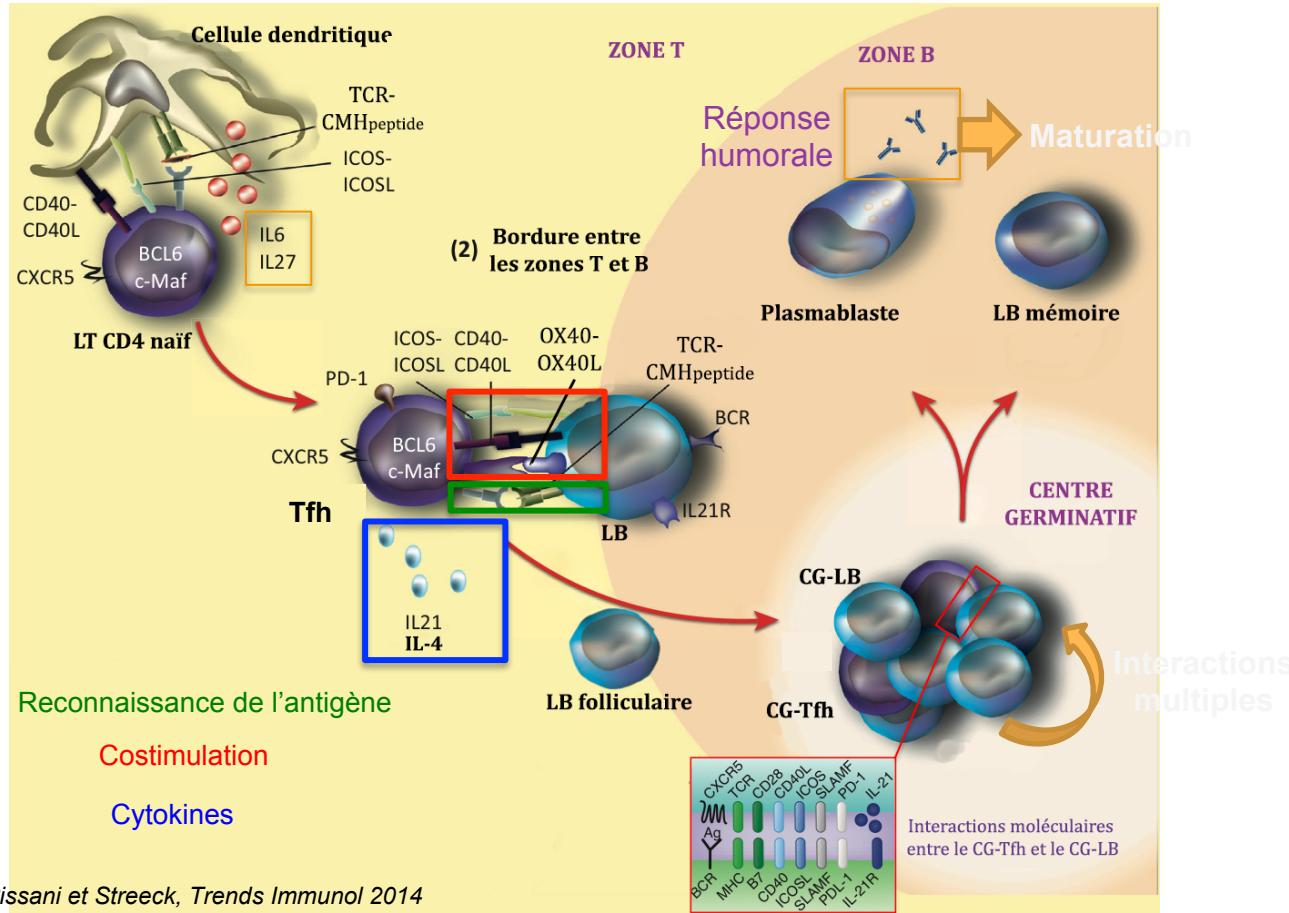
Production d'anticorps



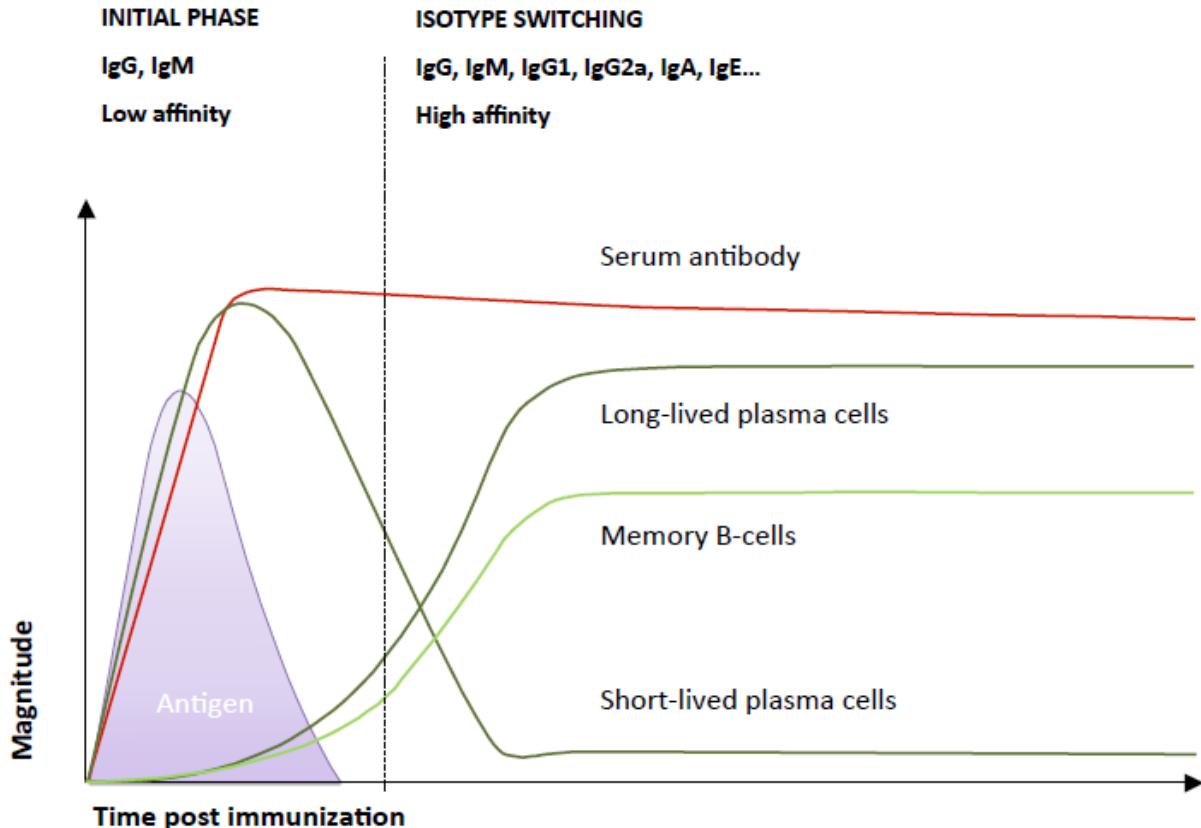
Régulation de la réaction du CG

- LT folliculaires régulateurs (Tfr)
- LT CD8 régulateurs et cytotoxiques
- LB régulateurs

Rôle des Tfh dans la maturation des anticorps

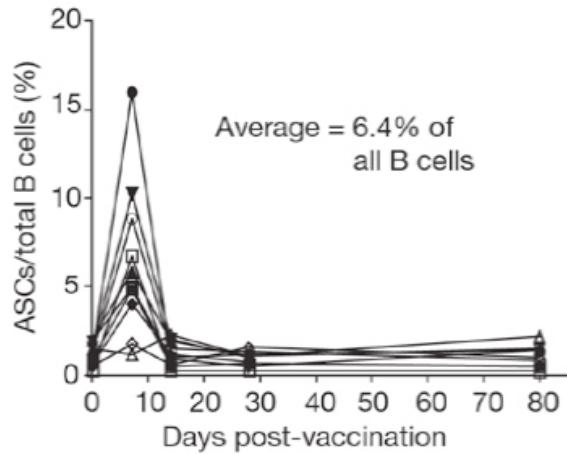
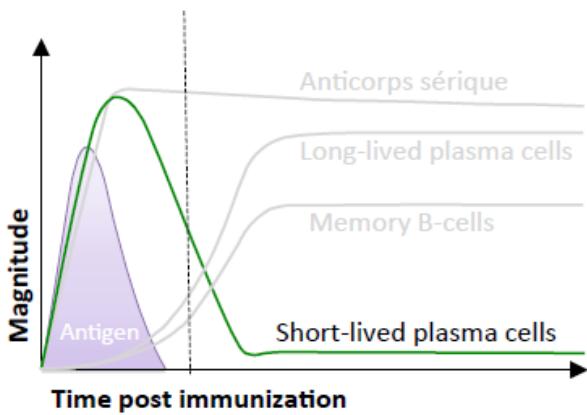


Diversité d'une réponse anticorps normale



Diversité d'une réponse anticorps normale

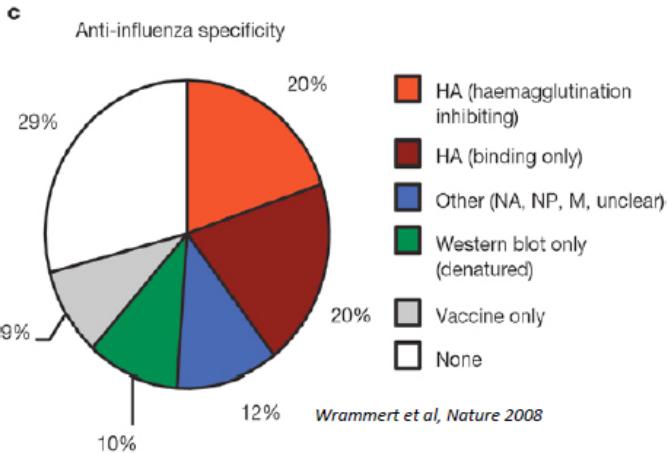
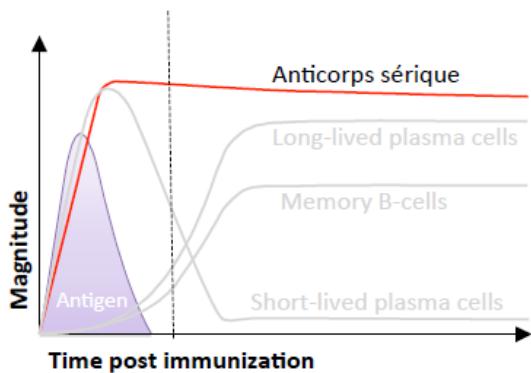
Étude de la réponse B spécifique dirigée contre un vaccin influenza (Wrammert et al, Nature 2008)



- Prolifération précoce des ASC (6,4% des cellules B)
 - Pic à 7 jours

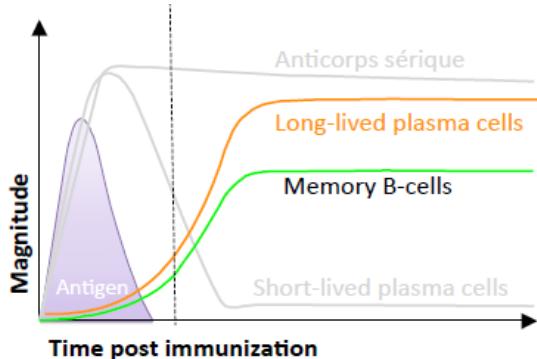
Diversité d'une réponse anticorps normale

Étude de la réponse B spécifique dirigée contre un vaccin influenza (Wrammert et al, Nature 2008)

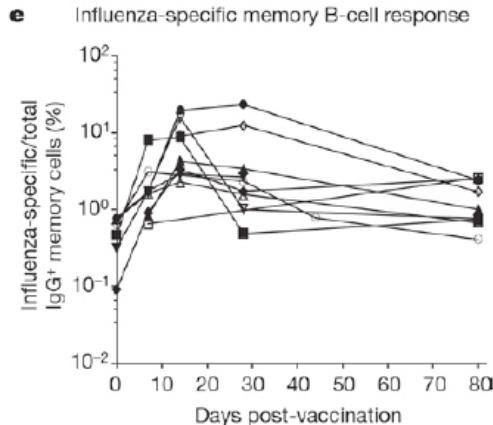
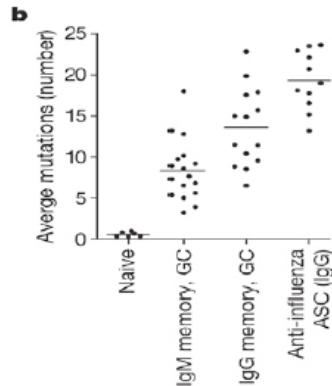


- 60% des IgG produites sont spécifiques de la protéine hémagglutininne
- 20% d'entre eux ont une activité inhibitrice.

Diversité d'une réponse anticorps normale



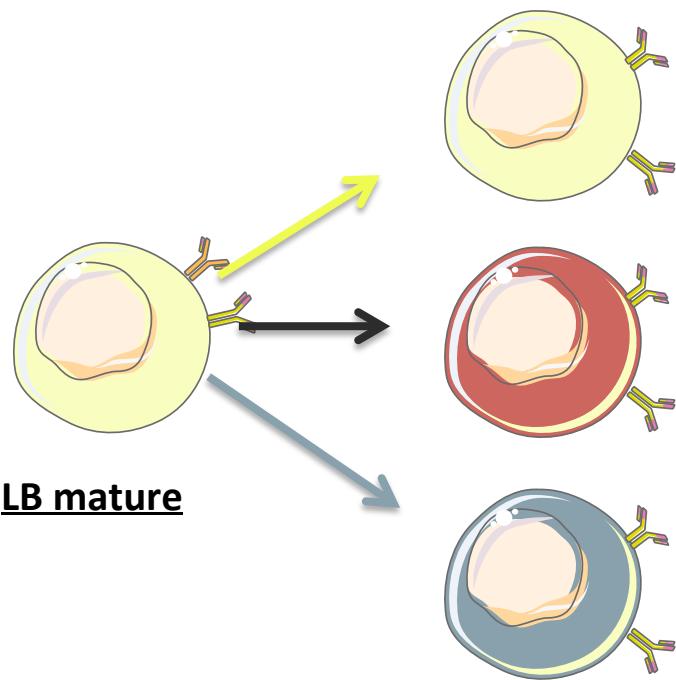
Étude de la réponse B spécifique dirigée contre un vaccin influenza (Wrammert et al, *Nature* 2008)



Wrammert et al, *Nature* 2008

Perturbations et applications pathologiques

Exemples de sous-populations de lymphocytes B



LB mémoire circulants:

CD19+
CD27+
CD38-

LB autoréactifs:

CD5+ (PR)
CD19++
CD27++ (SLE)
TLR9++ (SLE)

LB régulateurs:

CD19+
CD24++
CD38++
IL-10+

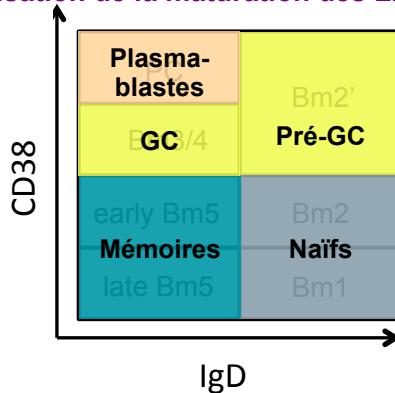
R é p a r t i o n
modifiées dans
p l u s i e u r s
pathologies auto-
immunes (PR,
SLE...)

VIH

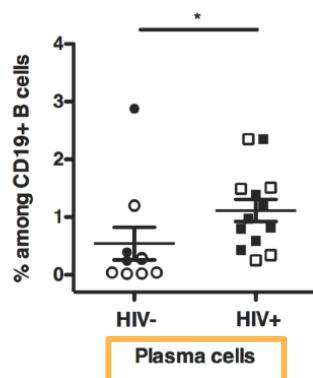
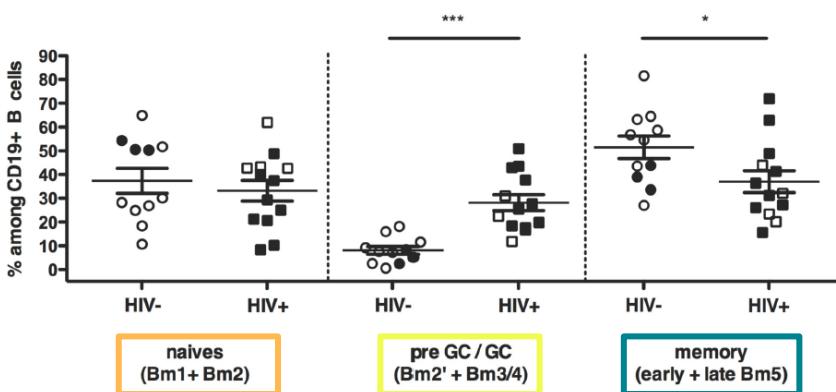


Cytométrie en flux
(Pascual, 1994)

Caractérisation de la maturation des LB dans la rate



Collineau, Rouers et al.,
Plos One 2015

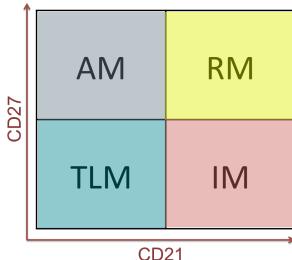


Maturité des LB altérée dans les rates VIH+ → Diminution des LB mémoires

Caractérisation des populations de LB ex vivo

 Cytométrie en flux

(Moir et al., 2008)



AM : Activated memory : **cellules épuisées**

RM : Resting memory : **maintien de la réponse humorale**

TLM : Tissue like memory : **cellules anergiques**

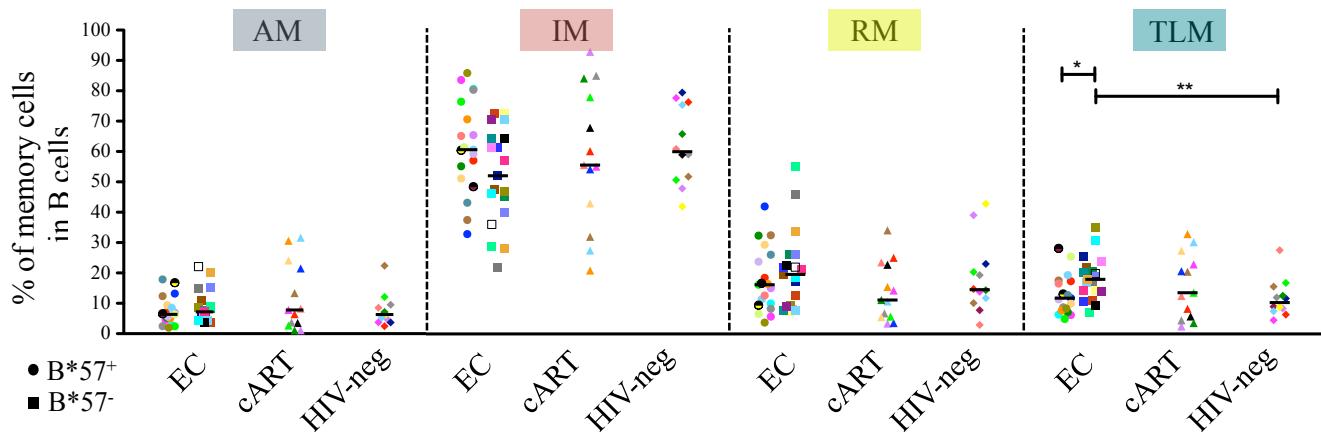
IM : Intermediate memory

EC : Elite Controller

cART : VIH⁺ traités

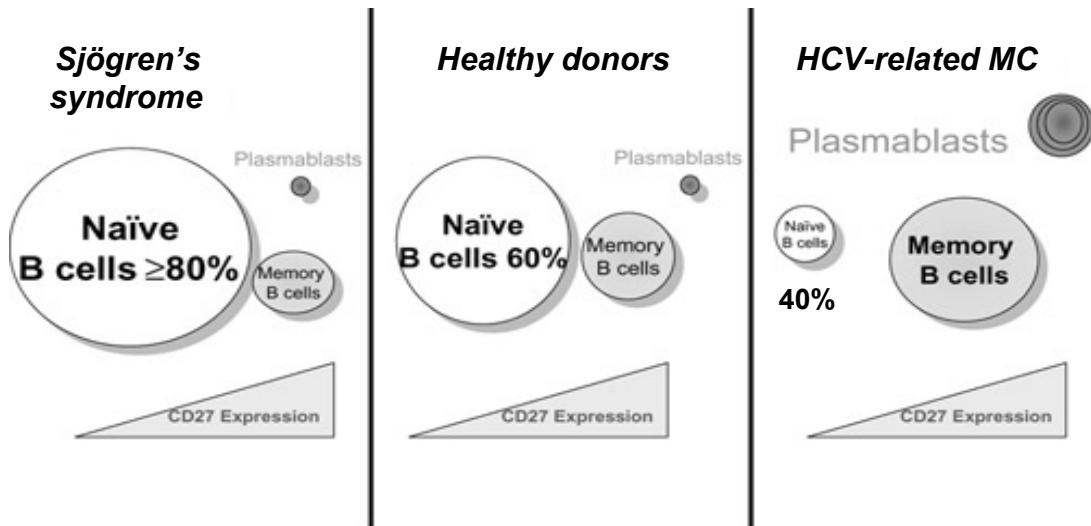
HIV-neg : VIH⁻ (EFS)

Collineau, Rouers et al.,
Plos One 2015

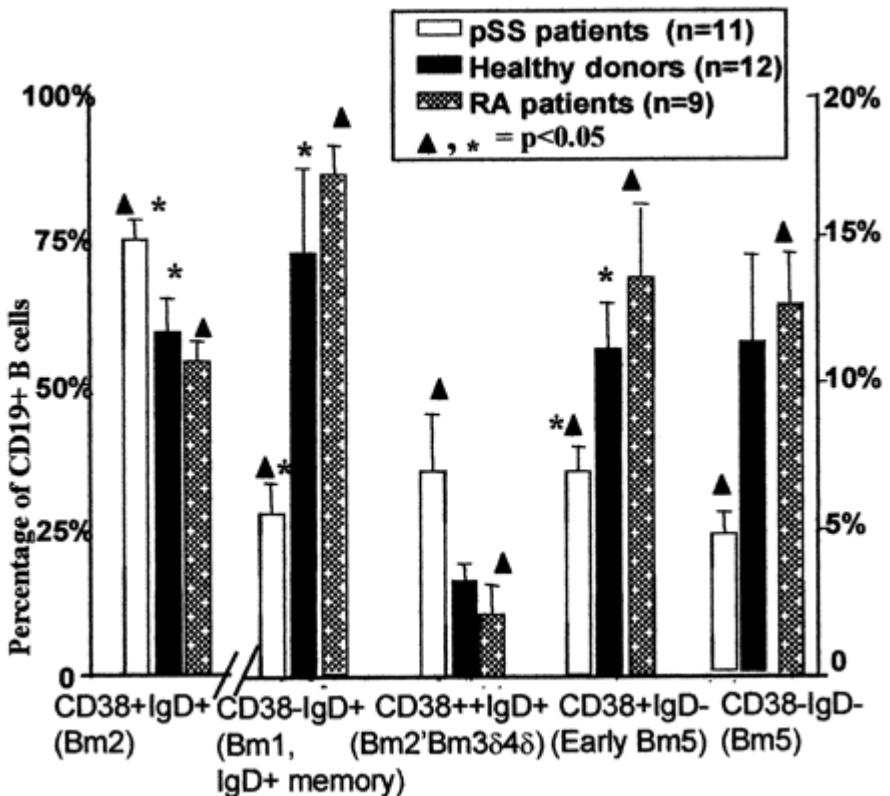


Les EC préservent naturellement leur compartiment B mémoire

Perturbations in B cell homeostasis in autoimmune disorders

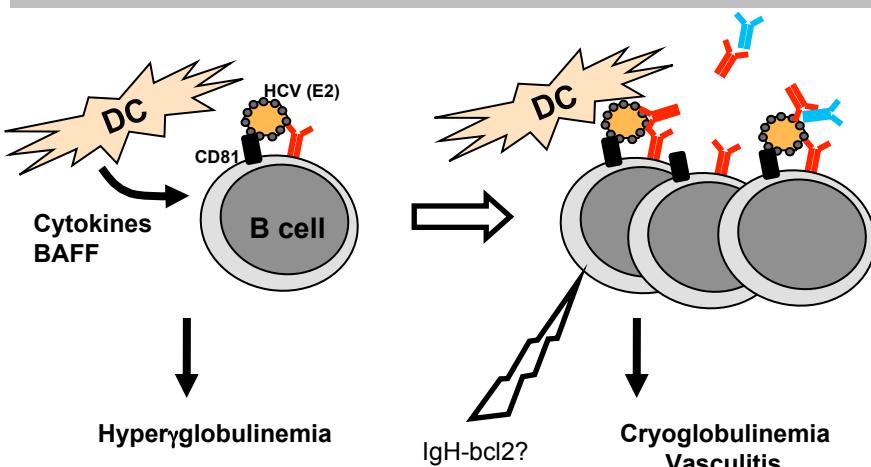


Perturbations in B cell homeostasis in autoimmune disorders

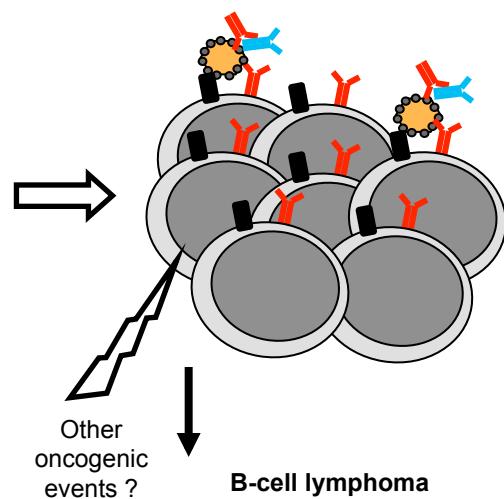


HCV

Antigen-sensitive B cell proliferation

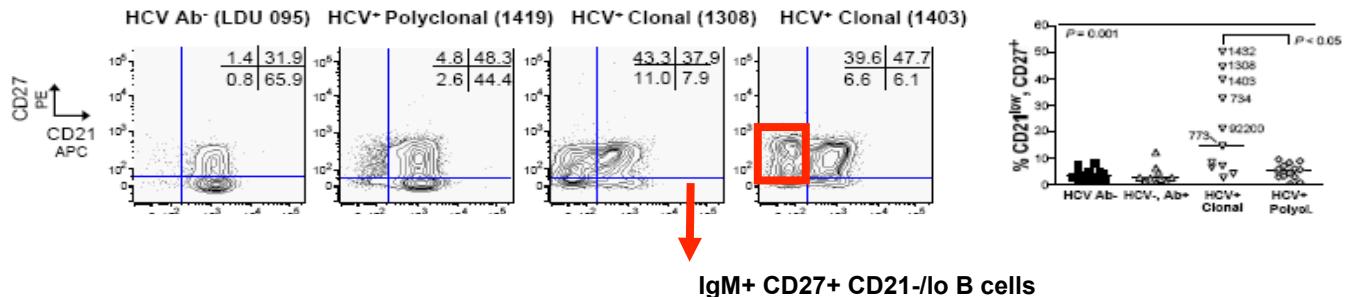


Antigen-insensitive B cell proliferation



Anti-E2 IgM/Rheumatoid factor
 IgG

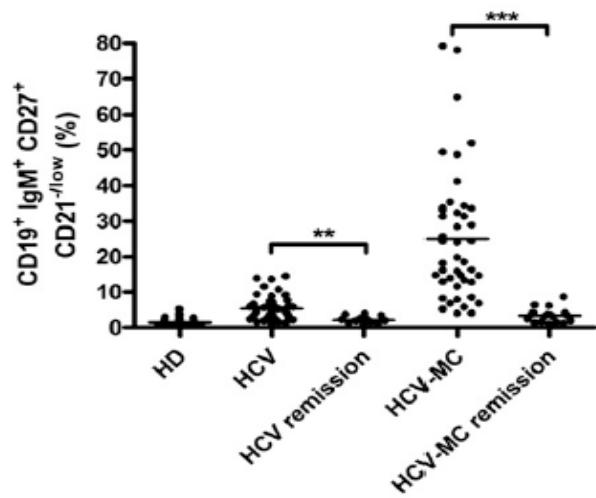
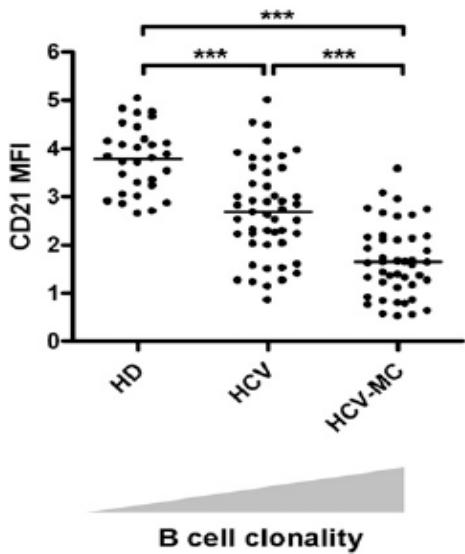
Clonal expansion of IgM+ CD27+ marginal zone B cells in HCV-MC patients



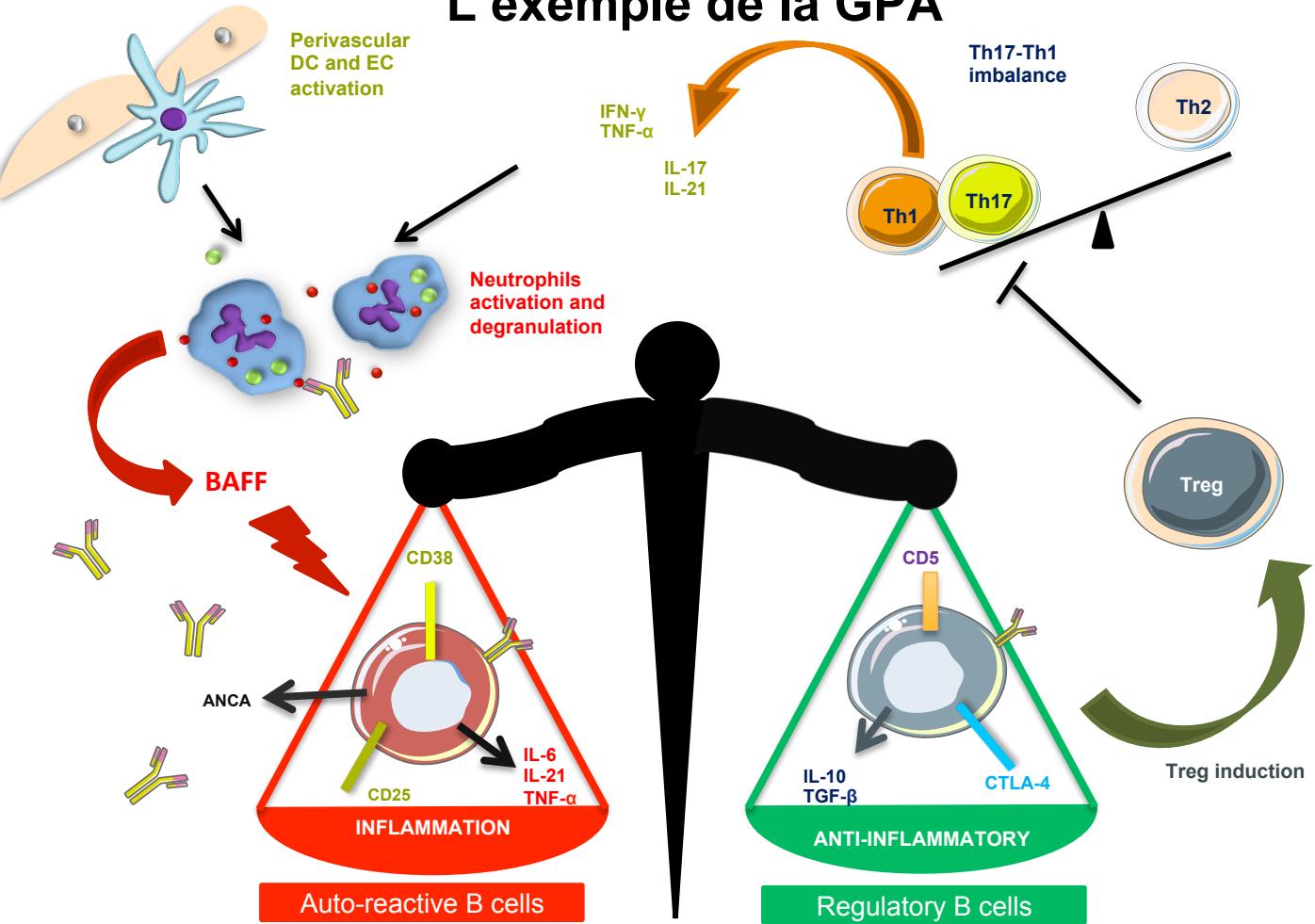
Group	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ cells, %						% CD5 ⁺
	κ ⁺ , λ ⁻ , %	κ ⁺ , CD27 ⁺ , %	IgM ⁺ , CD27 ⁺ , %	IgM ⁺ , IgD ^{low/-} , %	CD21 ^{low} , CD27 ⁺ , %		
HCV Ab-, n = 16	14.74 ± 5.82	47.42 ± 11.30	17.23 ± 9.78	13.43 ± 7.59	8.21 ± 6.20	3.41 ± 2.29	22.18 ± 5.82
HCV-, Ab+, n = 10	13.75 ± 6.02	52.07 ± 4.98	17.33 ± 6.47	10.12 ± 4.66	5.61 ± 4.41	3.47 ± 3.41	13.75 ± 6.02
HCV+ clonal, n = 11	18.55 ± 6.73	65.23 ± 20.84*	42.40 ± 22.16†	35.90 ± 25.53*	23.85 ± 19.85	20.94 ± 17.64*	18.55 ± 6.73
HCV+ polyclonal, n = 14	20.14 ± 8.17	51.72 ± 6.53	19.22 ± 15.33	15.61 ± 13.03	9.73 ± 9.92	4.86 ± 2.80	20.14 ± 8.17

Bias in the repertoire of clonal MZ B cells:
VH1-69, JH4 and Vkappa 3-20 gene segment restriction

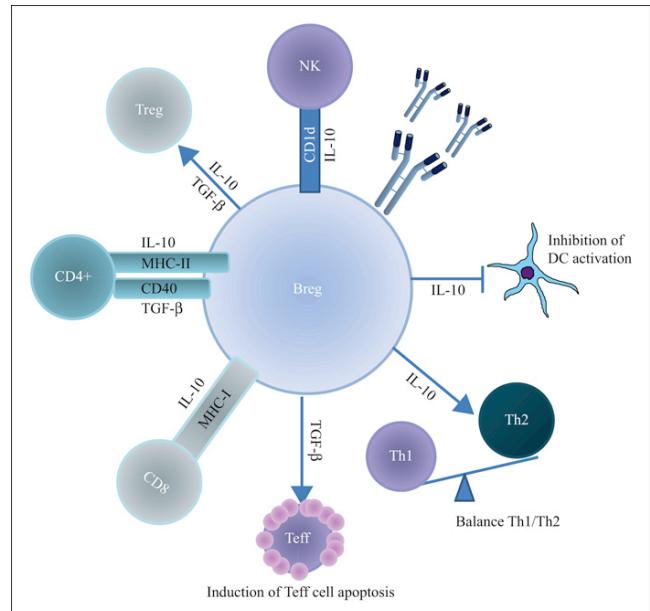
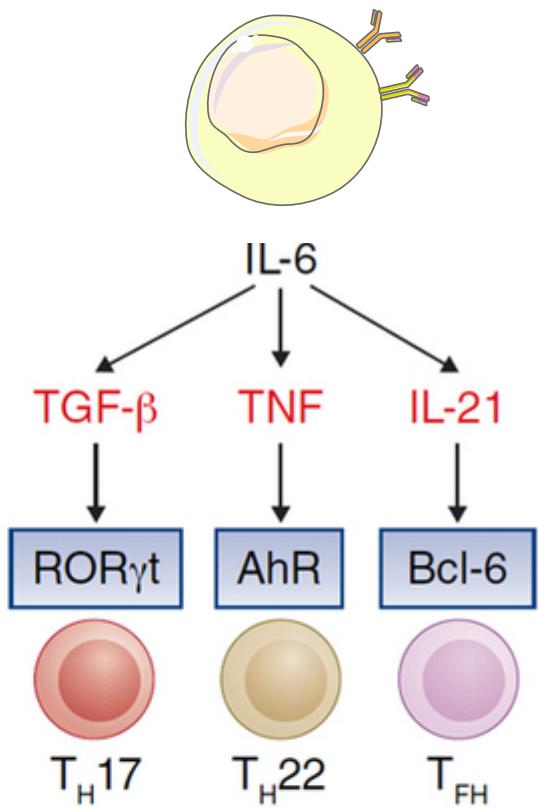
Expansion of an unusual CD21^{-/low} marginal zone B cell population in HCV-MC patients



L'exemple de la GPA



Les lymphocytes B balancent également la réponse immunitaire



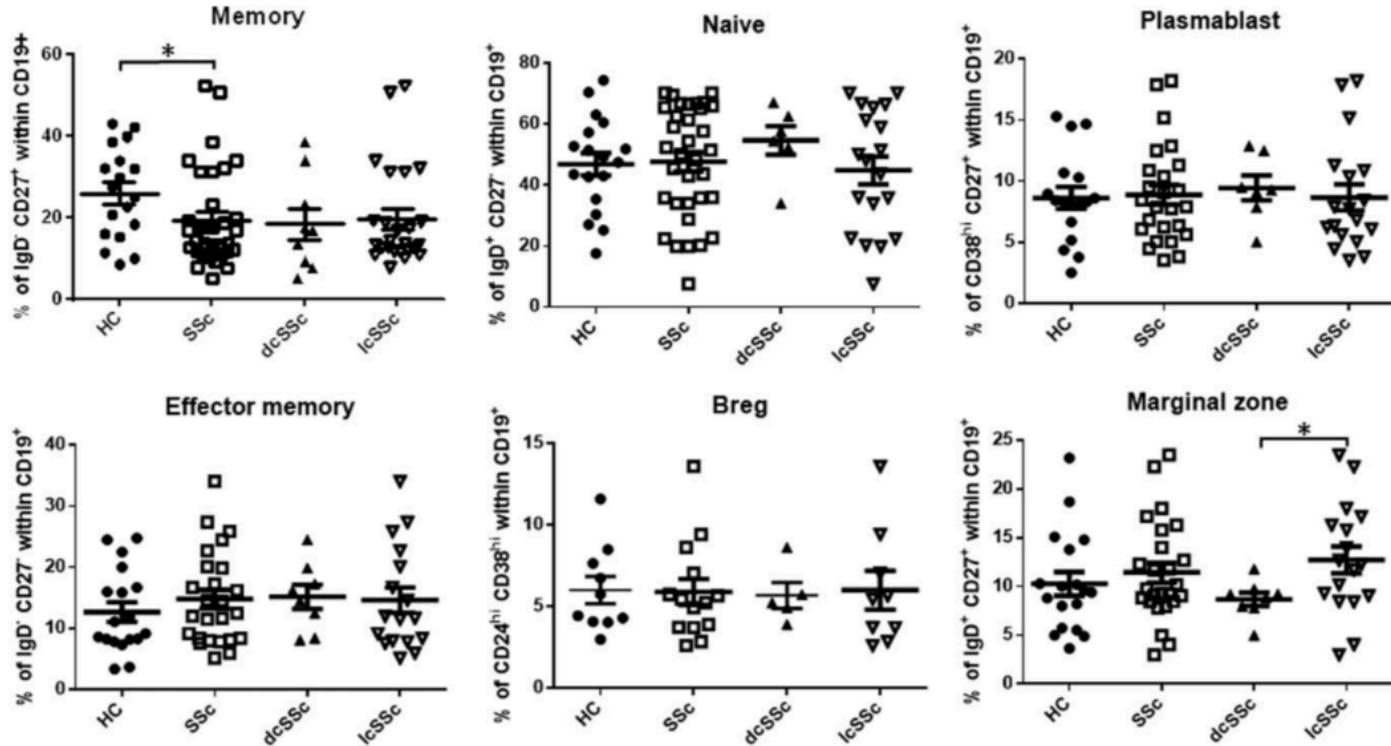
Systemic sclerosis

- To identify a potential B lymphocytes dysregulation that could correlate with disease severity in patients with systemic sclerosis
- To investigate the role of B lymphocytes in the pathogenesis of systemic sclerosis

Patients and Methods

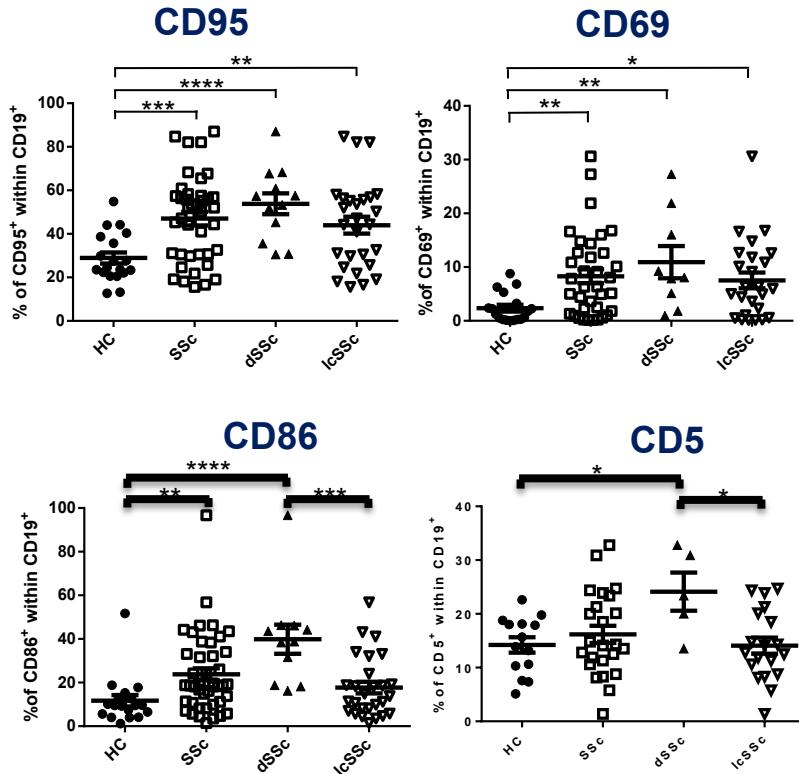
- 80 untreated patients (9 males) with SSc fulfilling the ACR/EULAR criteria
 - 22 diffuse SSc (dSSc)
 - 58 limited cutaneous SSc (ISSc)
 - 21 healthy controls (HC)
- Phenotyping of peripheral blood B cell subpopulations, activating and inhibitory receptor expressions, IL-6 and TGF- β production: flow cytometry and multiplex assay
- Fibroblasts proliferation rate & collagen production upon incubation with supernatants of B cells from patients or HC were assessed using XTT, BrdU, Ki67 staining and collagen assay

B lymphocyte maturation status in patients with SSc



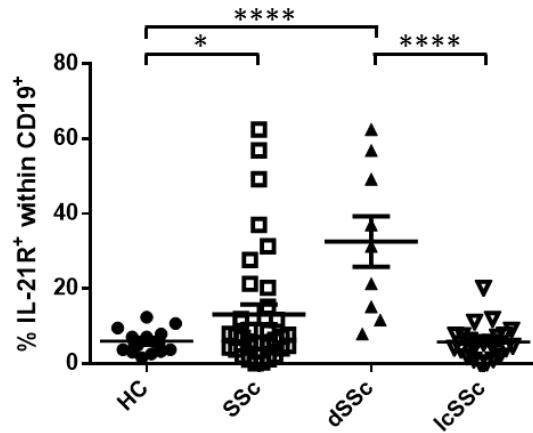
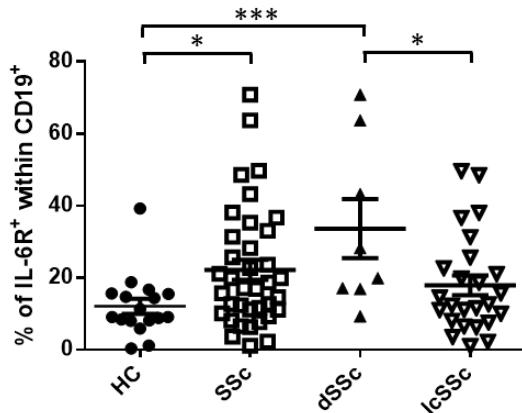
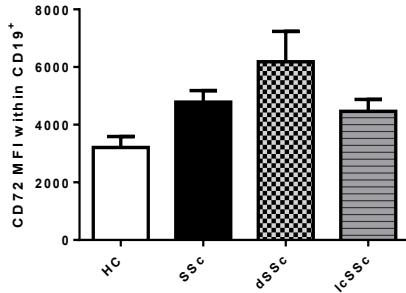
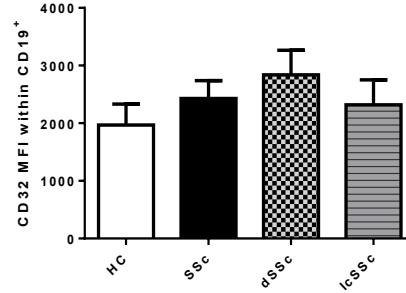
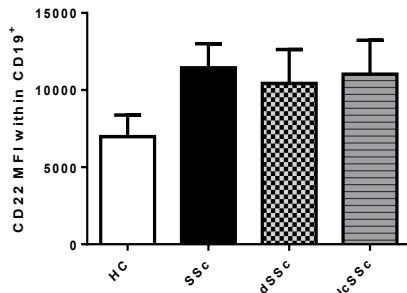
HC: Healthy controls; SSc: systemic sclerosis; dSSc: diffuse SSc; IcSSc: limited SSc

Increased expression of activation markers at the surface of B cells from patients with SSc

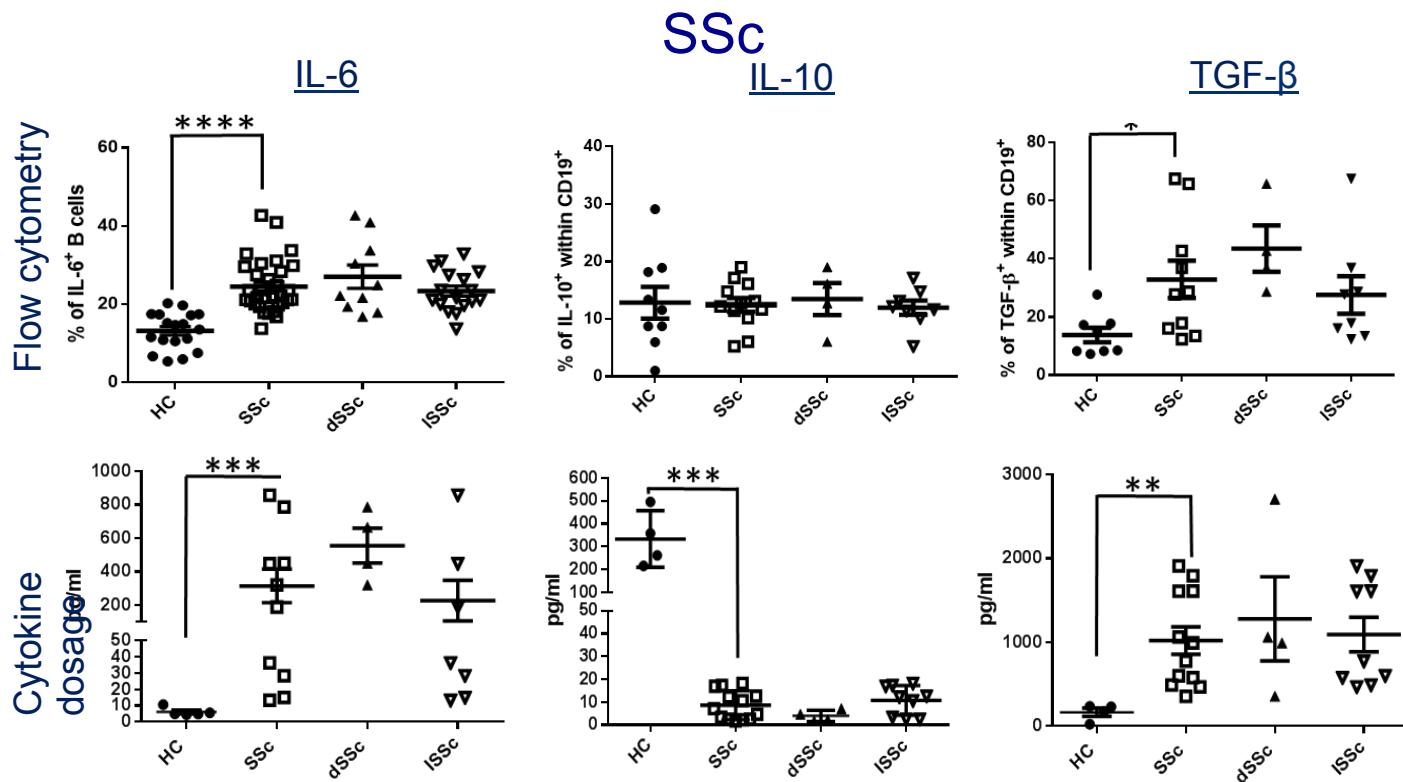


HC: Healthy controls; SSc: systemic sclerosis; dSSc: diffuse SSc; lSSc: limited SSc

Inhibitory markers and increased expression of IL6R and IL21R at the surface of B lymphocytes in patients with diffuse SSc

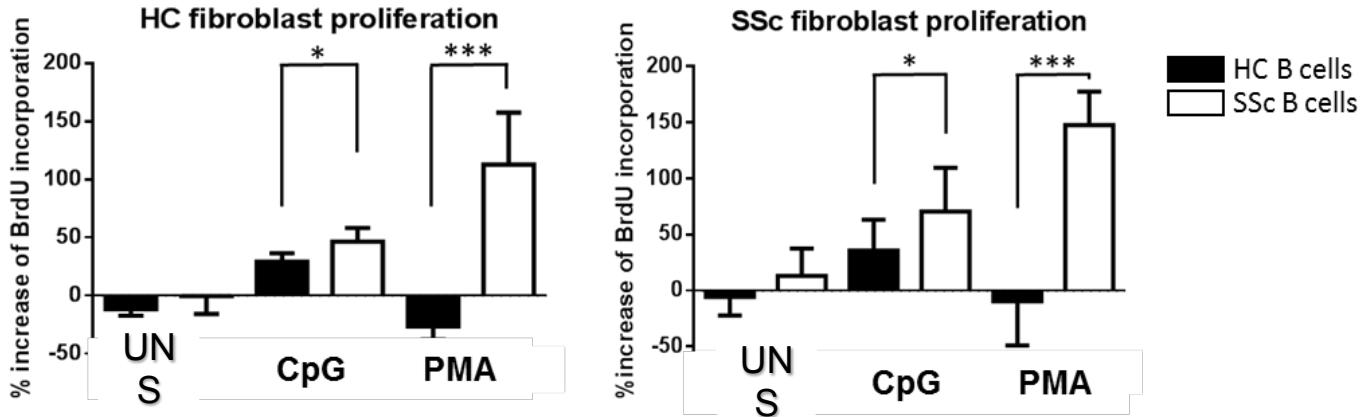


Increased IL-6 and TGF- β secretion and decreased IL-10 secretion by B lymphocytes in patients with SSc



HC: Healthy controls; SSc: systemic sclerosis; dSSc: diffuse SSc; lSSc: limited SSc

Increase proliferation and collagen production by fibroblasts after stimulation with B cell supernatant from patients with SSc

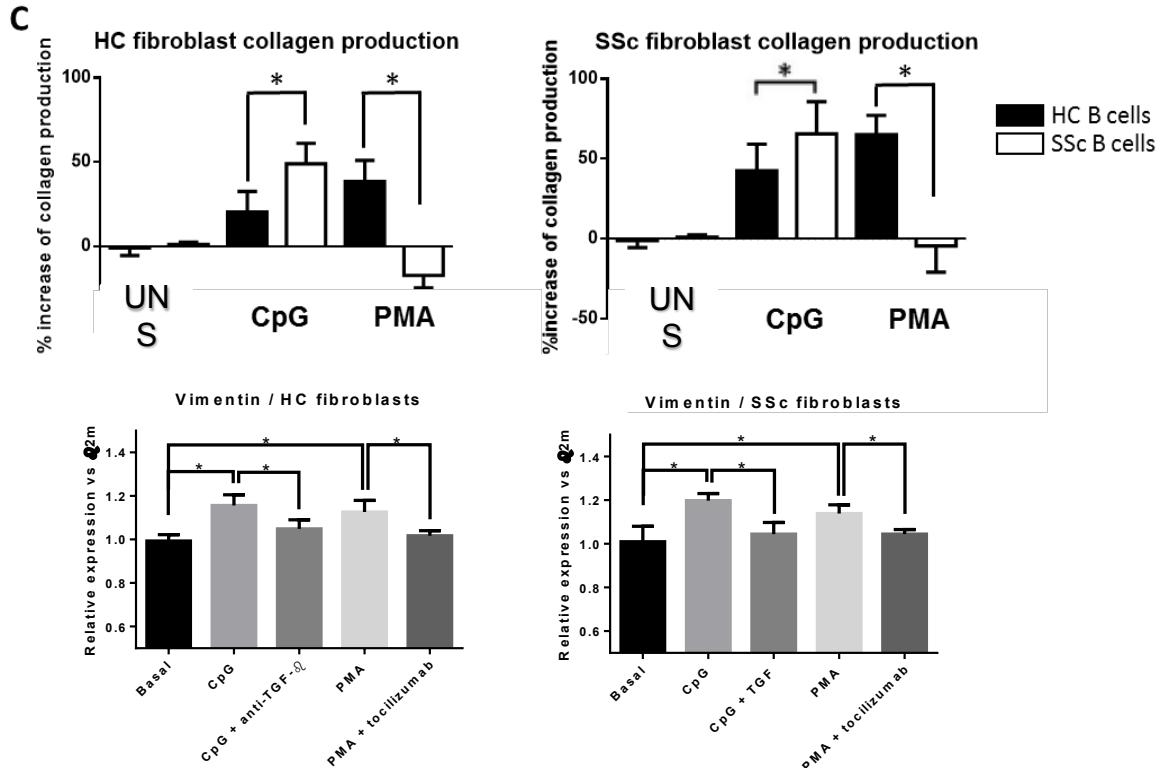


CpG stimulation: high TGF- β secretion

PMA/ionomycin stimulation: high IL-6 secretion

UNS: unstimulated B cell; CpG: 3 days stimulation with CpG; PMA: 4h stimulation with PMA/ionomycin

« Myofibroblast phenotype-like » after stimulation with B cell supernatant from patients with SSc



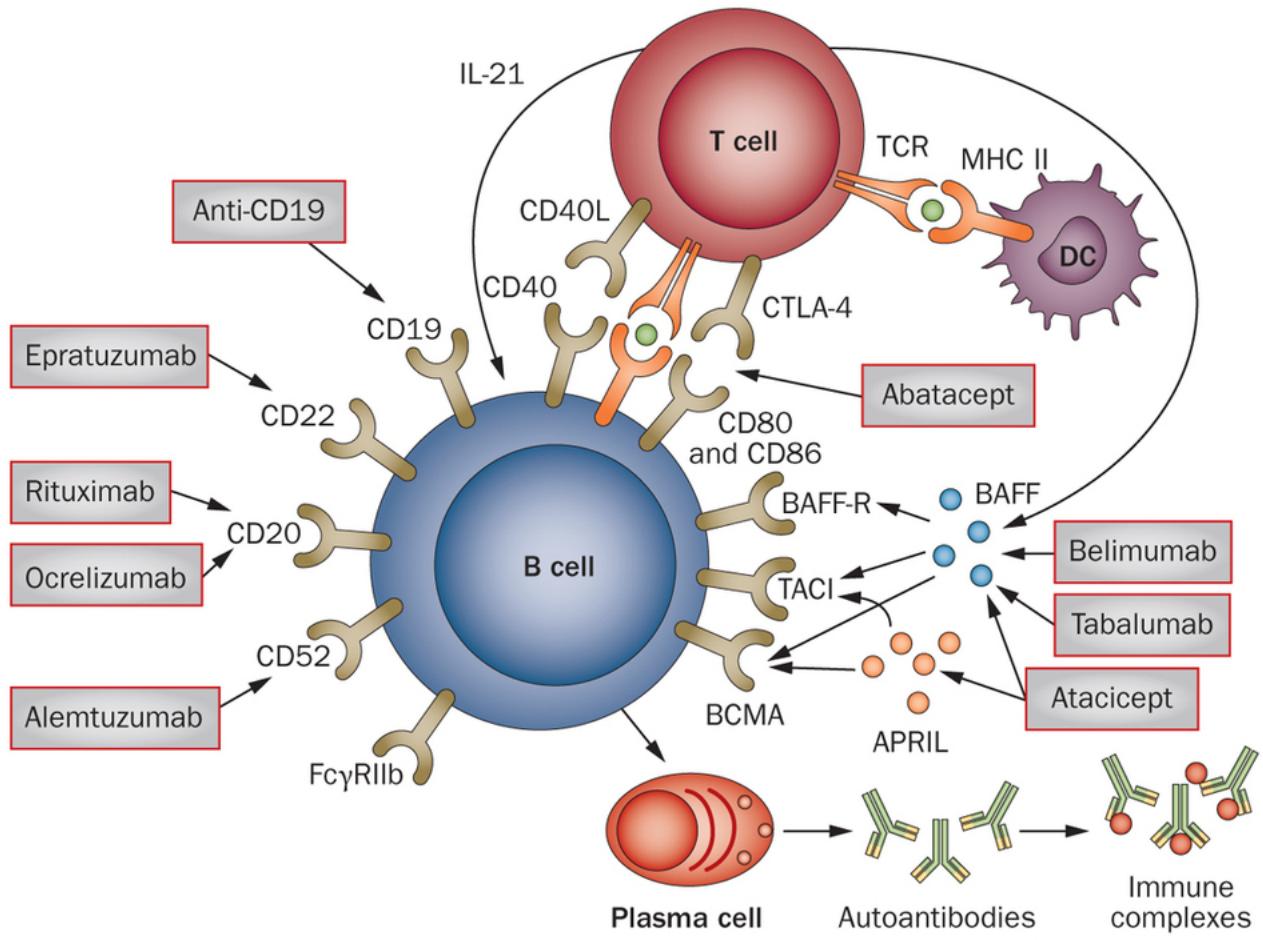
UNS: unstimulated B cell; CpG: 3 days stimulation with CpG; PMA: 4h stimulation with PMA/

B cell and SSc: conclusions

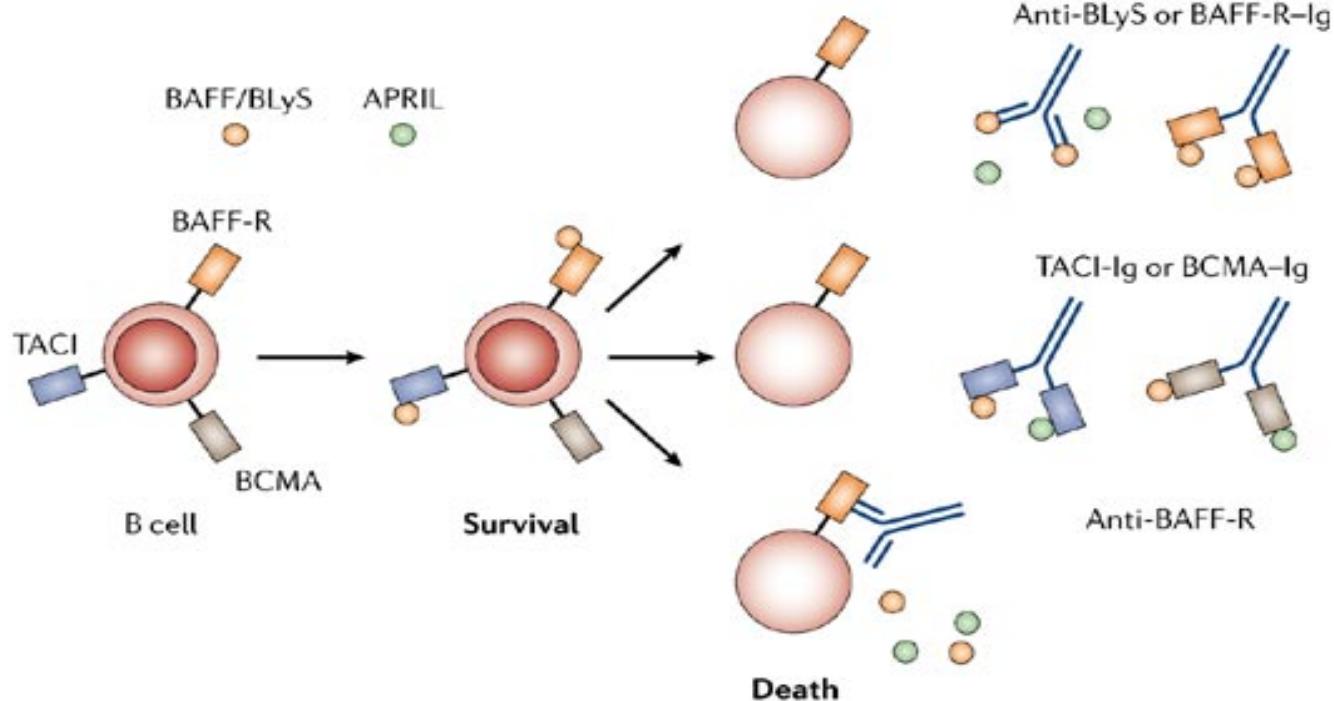
- B lymphocytes from patients with SSc
 - Increased expression of activation markers
 - Increased membrane expression of IL-6R and IL-21R
 - Increased intracellular staining and release of IL-6 and TGF- β
- B cell supernatants from patients with SSc
 - Increase proliferation of fibroblasts
 - Increase collagen production of fibroblasts (after treatment of B cells with CpG)

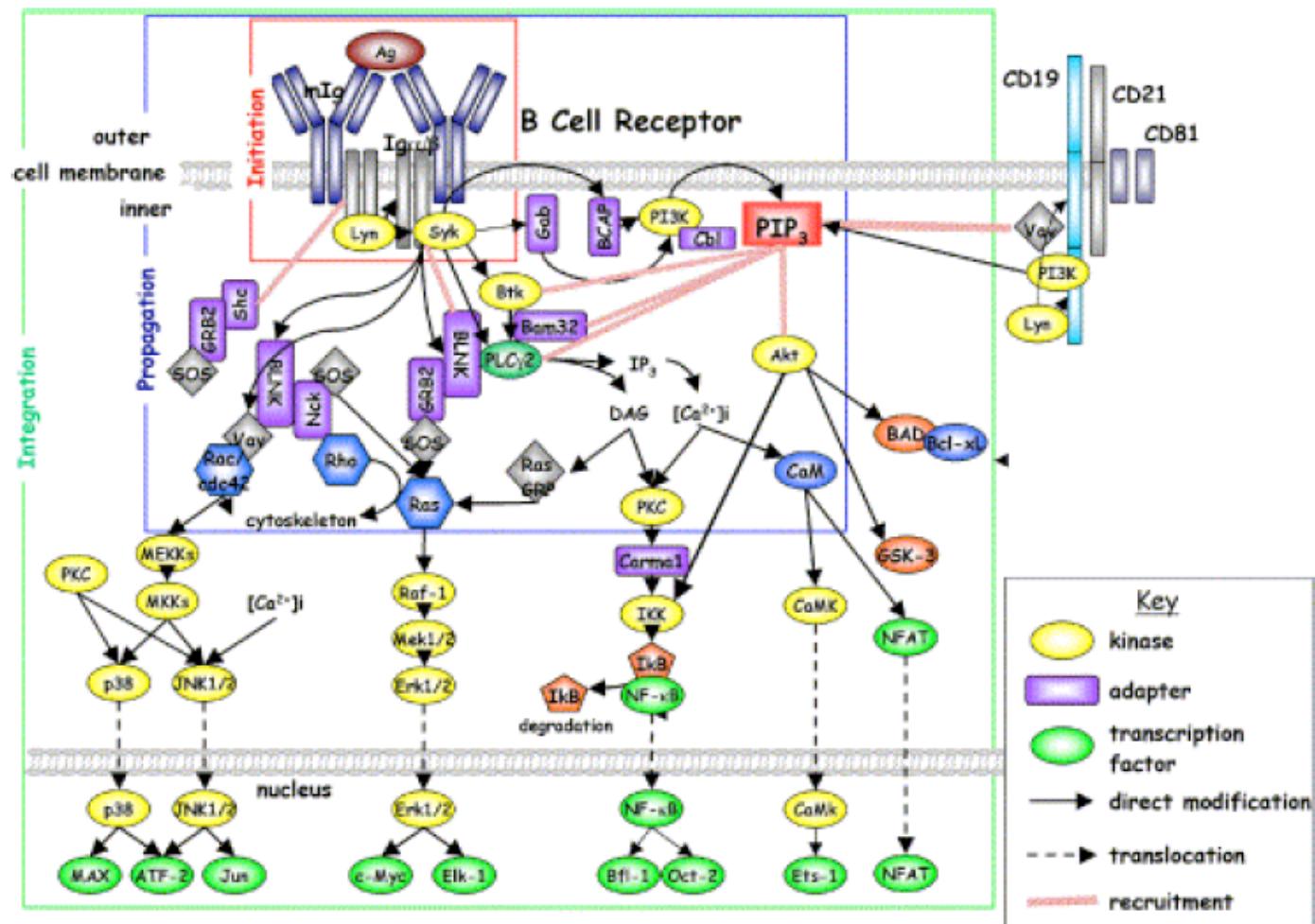
Cibler le B.....

Quelle cible à quel interface?



BAFF



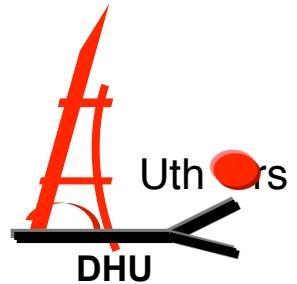


Conclusions

- Grande diversité d'anticorps chez le sujet sain
- Mécanismes multiples à l'origine de l'émergence d'autoanticorps ou de dérégulation des lymphocytes B
- Lymphocytes B: se différencient en plasmocytes, présentent l'antigène, produisent des cytokines pro- et anti-inflammatoires.
- Sous populations émergentes : B autoréactifs, B régulateurs.



Hôpital Cochin
Paris



The logo for the French Vasculitis Study Group features a large blue circle on the left. To its right, the words "French Vasculitis Study Group" are written in blue, bold, sans-serif capital letters.