



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Année 2009-2010

Professeur Philippe Kourilsky

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Les technologies motrices de l'immunologie



Professeur Philippe Kourilsky
Année 2009-2010

Introduction



1. La problématique générale

- **Technologie : Techniques & méthodes d'utilisation.**
- **Dialectique entre les connaissances et les techniques :**
 - **Variation selon les domaines de la science.**
 - **Instrumentation & modalités d'usage.**
 - **Conditions pratiques d'exercice de la recherche.**
- **Technologies « motrices » :**
 - **Requiert que les technologies nouvelles soient utilisables.**
 - **Coût.**
 - **Acceptabilité sociale (OGM) et problèmes d'éthique.**



2. Le cas de l'immunologie :

- **Immunologie séparée (séparable ?) du reste de la biologie ?**
- **Problématique variable dans différents champs de l'immunologie :**
 - **Recherches sur les animaux, sur l'homme.**
 - **Recherches fondamentales, vaccins, diagnostics.**



Marc Bajenoff and Ronald N. Germain Time line diagram of the technical developments and biological advances described in this feature. Eur. J. Immunol. 2007. 37: S18–33.

Trois phases :

I. L'ère de la spécificité.

II. La montée de l'immunité innée.

III. La période de l'analyse dynamique (Depuis 2001) : imagerie.

Molécules ➤ Cellules ➤ Organisme ➤ Populations d'organismes.

Mais, ajouter phase III Bis :

Analyses moléculaires fondées sur l'acquisition massive de données en parallèle.



3. Objectifs du cours :

- **Meilleure compréhension de la discipline.**

- **Projection vers l'avenir.**

- ▶ **Choix : description d'expériences techniquement impossibles à réaliser il y a 5-10 ans.**

- ▶ **Pas un cours « sur » les techniques, mais sur ce que l'on peut faire « avec ».**



Les technologies motrices de l'immunologie

PLAN GENERAL

1^{ère} Partie : Développements techniques et méthodologiques récents

2^{ème} Partie : Imagerie des cellules et molécules immunitaires en action.

3^{ème} Partie : Applications à l'homme.

Conclusion : Immunologie analytique, systémique, synthétique.



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Professeur Philippe Kourilsky
Année 2009-2010

1^{ère} Partie :

Développements techniques et méthodologiques récents



1^{ère} Partie :

Développements techniques et méthodologiques récents

Introduction :
Les racines technologiques de l'immunologie contemporaine.

- I. Séquençage des acides nucléiques.
- II. Les applications générales du séquençage.
- III. Autres techniques moléculaires.
- IV. L'imagerie.
- V. Les techniques propres à l'immunologie.



I. Introduction :

Les racines technologiques de l'immunologie contemporaine.

A. L'immunologie cellulaire.

1. La concentration des modèles animaux sur la souris.

- **Abandon relatif du lapin, du rat, du hamster.**
- **Lignées génétiquement homogènes de souris.**
- **Lignées congéniques.**
- **Lignées transgéniques (KO, KI, conditionnelles).**
- ▶ **Recherches sur l'homme (populations hétérogènes)**



2. Le clonage des cellules :

- **Immortalisation de divers types cellulaires.**
- **Immortalisation des cellules B : anticorps monoclonaux**
 - **Source de réactifs extrêmement importants.**
 - **Anticorps humains ou humanisés en thérapeutique.**



3. La séparation et la purification des cellules:

- **Caractéristiques physiques des cellules (taille, adhérence).**
- **Déplétion par anticorps + complément.**
- **Marqueurs spécifiques (CD et molécules de surface) et anticorps monoclonaux.**
- **Séparation magnétique.**
- **Cytométrie de flux :**
 - **Identification et/ou séparation (mais forces de cisaillement).**
 - **Multi-critères (paramètres physiques et marqueurs).**
 - **Critères d'expression quantitative des marqueurs.**
 - **Analyse statistique.**



4. L'imagerie: Statique → Dynamique.

➤ **Depuis Elie Metchnikoff.**

Gordon S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. Eur J Immunol. 2008 Dec;38(12):3257-64.

➤ **Améliorations permanentes.**

Bajénoff M, Germain RN. Seeing is believing: a focus on the contribution of microscopic imaging to our understanding of immune system function. Eur J Immunol. 2007 Nov;37 Suppl 1:S18-33.

Sarris M, Betz AG. Shine a light: imaging the immune system. Eur J Immunol. 2009 May;39(5):1188-202.



B. L'immunologie moléculaire

1. La génétique moléculaire après la biologie moléculaire et la biochimie.

- **Le tournant des années 1975.**
- **L'intrusion des approches moléculaires dans l'immunologie.**

2. Le clonage et le séquençage de l'ADN et de l'ARN (cADN)

3. La PCR



4. Les techniques (massivement) parallèles :

- **Séquençage massif.**
- **Puces.**

5. Les progrès de la biochimie

- **Protéines :**
- **Structure des protéines.**
- **Lipides, polysaccharides, métabolites.**

6. Les réactifs spécifiques : anticorps (aptamères)



C. Conclusions

1. La boîte à outils des immunologistes est en pleine expansion.

2. Les dynamiques les plus fortes concernent :

- **Les techniques moléculaires « massives ».**
- **L'imagerie.**



3. L'ère des « ...omes » et des « ...omiques »

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| ➤ Génome | Génomique. |
| ➤ Transcriptome | Transcriptomique. |
| ➤ Protéome | Protéomique. |
| ➤ Lipidome | Lipidomique. |
| ➤ Métabolome | Metabolimique |
| ➤ etc. | etc. |



1^{ère} Partie :

Développements techniques et méthodologiques récents

Introduction :

Les racines technologiques de l'immunologie contemporaine.

I. Séquençage des acides nucléiques.

II. Les applications générales du séquençage.

III. Autres techniques moléculaires.

IV. L'imagerie.

V. Les techniques propres à l'immunologie.



I. Le séquençage des acides nucléiques

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010 Jan;11(1):31-46.

A. Avec amplification par PCR

1. 454 FLX (Roche)

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:387-402.



- **Population d'adaptateurs et de billes complémentaires.**
- **Amplification ~ 1 million de fragments /bille.**
- **1 bille par puits (~ 500.000 puits).**
- **Copie par DNA-polymérase. Incorporation d'un nucléotide**
→ relargage de PP → émission de lumière → caméra CCD.
- **Capillaires Lecture moyenne (8h) : 250 nucléotides et 100 Mégabases**
750 nucléotides x 96



2. SOLEXA (Illumina)

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:387-402.

- **Amplification directe de fragments fixés aléatoirement à la surface.**
- **Plusieurs millions de « buissons » de ~ 1 million de molécules.**
- **Copie par DNA-polymérase : 4 nucléotides avec 4 fluorescences spécifiques et extrémités 3' bloquées.**
- **Image couleur, déblocage, etc.**



3. SOLID (Applied Biosystems)

- **Principes similaires (billes magnétiques), mais autre chimie de séquençage.**
- **Autre système de contrôle des erreurs.**
- **Système à 4 couleurs.**
- **Lecture moyenne : 25 à 35 nucléotides, 2000 à 4000 Mégabases.**



4. La PCR Digitale

White RA 3rd, et al. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. BMC Genomics. 2009 Mar 19;10:116.

- **Dilution limite de sorte que la plupart des puits n'ont pas d'ADN et les puits positifs ont une seule molécule.**

- **Quantification précise avec des traces de matériels.**



B. Séquençage de molécules uniques sans amplification

1. Hélicos

- **Plusieurs milliards de molécules d'ADN séquencées simultanément
100 millions / cm² .**
- **Prévu pour livrer 1000 Mégabases par heure.**



2. Pacific Biosciences SMRT (Single Molecule Real Time)

Eid J, , et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.
Science. 2009 Jan 2;323(5910):133-8

- **Phospholinked nucleotides avec marqueur fluorescent 5' clivé pendant la synthèse.**
- **Chambre de 70 nm (20 x 10⁻²¹ litre).
Eclairs successifs 10n / seconde).**
- **Jusqu'à 10.000 nucléotides par synthèse. 1 génome humain en 4 minutes ?**



3. Nanopores

Branton D, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing. Nat Biotechnol. 2008 Oct;26(10):1146-53.

- **Hémolysine (toxine de S. aureus).**
- **remarquablement stable**
- **pelote d'acide nucléique + translocation séquentielle**
- **avec champ électrique : 50 kb**
- **nucléase + cyclodextrine.**

4. La course au séquençage

Check Hayden E. Genome sequencing: the third generation. Nature. 2009 Feb 12;457(7231):768-9.



Drmanac R, et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. Science. 2010 Jan 1;327(5961):78-81.

- **3 génomes humains (45 à 87 x).**
- **3,2 à 4,5 millions de différences.**
- **Taux d'erreur : 1 pour 100 kb (10^{-5}).**
- **Coûts des réactifs de séquençage : 4 400 \$.**

C. L'ARN

1. Séquençage direct de l'ARN

Ozsolak F, et al. Direct RNA sequencing. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):814-8

- Hybridation d'ARN poly A+ à une surface oligo-dT.
- Polymérase modifiée.
- VT (Virtual Terminator) nucléotides.
- ARN poly A+ de la levure (femtomoles) .



2. Transcriptome (cDNA) d'une seule cellule

Tang F. et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):377-82.

- 1 blastomère de souris → mRNA → cDNA
- Séquençage SOLID : 100 millions de lectures de 35 à 50 bp.
- Détection de transcrits supplémentaires (60 %) ou épissés différemment vs microarray.

3. Transcriptome d'un seul noyau isolé par microdissection au laser

Paulsen SJ, et al. Gene expression profiling of individual hypothalamic nuclei from single animals using laser capture microdissection and microarrays. *J Neurosci Methods*. 2009 Feb 15;177(1):87-93.



D. De l'acquisition à la gestion et à l'interprétation des séquences.

- **Instruments informatiques d'analyse.**
- **Taux d'erreurs, standards, etc.**
- **Le fossé (croissant ?) entre acquisition et exploitation des données.**

McPherson JD. Next-generation gap. Nat Methods. 2009 Nov;6 (11 Suppl):S2-5.

Medvedev P, et al. Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing. Nat Methods. 2009 Nov;6(11 Suppl):S13-20.

Chain PS, et al. Genomics. Genome project standards in a new era of sequencing. Science. 2009 Oct 9;326(5950):236-7.



1^{ère} Partie :

Développements techniques et méthodologiques récents

Introduction :

Les racines technologiques de l'immunologie contemporaine.

I. Séquençage des acides nucléiques.

II. Les applications générales du séquençage.

III. Autres techniques moléculaires.

IV. L'imagerie.

V. Les techniques propres à l'immunologie.



II. Applications générales du séquençage

A. Evolution des espèces.

Haussler D, et al. (Genome 10K Community of Scientists) Genome 10K: a proposal to obtain whole-genome sequence for 10,000 vertebrate species. J Hered. 2009 Nov-Dec;100(6):659-74.

- **43 institutions.**
- **Mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens, poissons (60.000 espèces vivantes)**
- **Spécimens de 16.203 espèces.**
- **Analyse des innovations majeures : immunité adaptative, dents.**
- **Evolution du système immunitaire : immunité adaptative, etc.**



B. Analyse des populations humaines

Kaiser J. DNA sequencing. A plan to capture human diversity in 1000 genomes. Science. 2008 Jan 25;319(5862):395.

Druley TE, et al. Quantification of rare allelic variants from pooled genomic DNA. Nat Methods. 2009 Apr;6(4):263-5.

Li B, Leal SM. Discovery of rare variants via sequencing: implications for the design of complex trait association studies. PLoS Genet. 2009 May;5(5):e1000481.

- **Nature et fréquence des erreurs de séquençage.**
- **Calculs de probabilité, statistiques.**



Biesecker LG, et al. The ClinSeq Project: piloting large-scale genome sequencing for research in genomic medicine. *Genome Res.* 2009 Sep;19(9):1665-74.

- **Acquisition des séquences et contrôle de qualité.**
 - **Architecture génétique des phénotypes humains.**
 - **Plateforme ouverte pour la médecine génomique.**
 - **Modalités adéquates pour le consentement éclairé et le partage des informations.**
 - **Athérosclérose et pathologie cardiaque : 1.000 sujets enrôlés.**
- **De nouvelles approches scientifiques : hypothèses et tests.**



Medvedev P, et al. Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing. Nat Methods. 2009 Nov;6(11 Suppl):S13-20.

- **Polymorphismes non ponctuels : insertions, délétions, inversions.**
 - **Hybridations sur puces (génomique-entier ou SNP) (variants connus).**
 - **Jointure d'extrémité pour séquençage, repérage, sans assemblage.**
- **Différences de tailles, etc.**



C. Architecture du génome

Lieberman-Aiden E, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009 Oct 9;326(5950):289-93.

Ho L, Crabtree GR. Chromatin remodelling during development. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):474-84.

- **Ligation, purification, séquençage massif. Contacts > 20 Mb.**
- **Cartographie (résolution 1 Mb).**
- **Proximité spatiale des régions riches en gènes.**
- **Ségrégation spatiale de la chromatine ouverte et fermée.**



D. Modifications de l'ADN

1. Editing (Adenosine → Inosine)

Li JB, et al. Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing. *Science*. 2009 May 29;324(5931):1210-3

- **A → I Lu comme G. Processus critique dans le cerveau (mémoire ?)**
- **Comparaison focalisée génome vs. transcriptome.**
- **13 sites connus → plus de 200 nouveaux sites (hors sites Alu).**



2. Méthylation

Estécio MR, Issa JP. Tackling the methylome: recent methodological advances in genome-wide methylation profiling. *Genome Med.* 2009 Nov 16;1(11):106.

Lister R, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009 Nov 19;462(7271):315-22.

- Méthylation des îlots CpG associés à des promoteurs,
→ perte d'expression des gènes.
- Notamment : gènes suppresseurs de tumeurs et cancers.
- Séquençage (14x) ($>10^9$ lectures / 2 lignées : cellules souches et fibroblastes :
 - Traitement par bisulfite de sodium C → U / pas Méthyl C.
 - $62 \cdot 10^6$ et $45 \cdot 10^6$ Méthyl C.
 - Contexte non CpG dans les cellules souches.



E. Structure de la chromatine vs. Facteurs de transcription

Hesselberth JR, et al. Global mapping of protein-DNA interactions in vivo by digital genomic footprinting. Nat Methods. 2009 Apr;6(4):283-9.

Goren A, et al. Chromatin profiling by directly sequencing small quantities of immunoprecipitated DNA. Nat Methods. 2010 Jan;7(1):47-9.

- **Ch IP-chip vs Ch IP-Seq (Cellules embryonnaires de souris).**
- **Cellules vivantes traitées par le formaldéhyde, fragmentation et immunoprécipitation.**
- **5 ng ADN (Illumina) vs 50 pg (Helicos) / $20 \cdot 10^6$ lectures.**



F. Analyse de la transcription et de la traduction.

- **Regions codantes (protéines) chez l'homme : 1 % du génome (30 Mb)
180.000 exons.**

Core LJ, et al. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science*. 2008 Dec 19;322(5909):1845-8.

Ng SB, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009 Sep 10;461(7261):272-6.

- **Capture d'ADN génomique sur microarrays.**



Heiman M, et al. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. Cell. 2008 Nov 14;135(4):738-48.

Ingolia NT, et al. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. Science. 2009 Apr 10;324(5924):218-23.

- **Séquençage des fragments d'ARN protégés par les ribosomes,
→ définition des séquences traduites dans diverses contributions.**

He Y, Vogelstein B, et al. The antisense transcriptomes of human cells. Science. 2008 Dec 19;322(5909):1855-7.



G. Analyse des petits ARN

Hackenberg M, et al. miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul 1;37(Web Server issue):W68-76

Jacquier A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat Rev Genet.* 2009 Dec;10(12):833-44.

- **Au-delà des gènes connus et annotés : de très nombreux transcrits (inter-géniques, anti-sens).**
 - nouvelles annotations,
 - nouveaux mécanismes.

H. Application à la génétique microbienne

MacLean D. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Apr;7(4):287-96.