



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 : la révolution de la fluorescence.

V. Les techniques propres à l'immunologie.



A. Gain de sensibilité et de résolution dans les analyses structurales

1. Détermination de structures par cristallographie et RMN

- **Grosses protéines.**
- **Glycoprotéines et protéines membranaires.**
- **Agrégats organisés de protéines**
 - **Ribosomes, protéasomes.**
 - **Virus.**

2. Progrès de l'imagerie moléculaire.

Cheng Y. Toward an atomic model of the 26S proteasome. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Apr;19(2):203-8.

Nickell S, et al. Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 21;106(29):11943-7

- **Accumulation de données structurales (nombreuses techniques).
Aperçus sur processus dynamiques.**
 - **Ouverture de la porte du 20S.**
 - **Module ATPase et récepteur des ubiquitines.**



3. Prédications de structure.

- **Lien avec les bases de données.**

4. Représentation et visualisation 3D.

Arnold K, et al. The Protein Model Portal. J Struct Funct Genomics. 2009 Mar;10(1):1-8.

- **7.6 millions de modèles de structure.**



B. Gains de sensibilité et de résolution dans les analyses biochimiques

1. Spectrométrie de masse : peptides, métabolites.

- **HUPO Plasma Proteome Project (entré en phase II en 2008).**

7(th) HUPO World Congress of Proteomics: launching the second phase of the HUPO Plasma Proteome Project (PPP-2) 16-20 August 2008, Amsterdam, The Netherlands. *Proteomics*. 2009 Jan;9(1):4-6.

2. Nombreux nouveaux tests fondés sur la fluorescence.

- **Gains de sensibilité souvent liés aux analyses à haut débit.**



C. L'ingénierie des anticorps monoclonaux

1. Production des anticorps monoclonaux

- **Immortalisation de cellules B de souris.**
 - **puis « humanisation » éventuelle.**
- **Immortalisation de cellules B humaines à partir de souris « humanisées ».**
- **Immortalisation directe de cellules B humaines.**
- **Bibliothèques de phages (levures) recombinants.**
- **Anticorps de camélidés (monocaténaires).**

etc.



2. Optimisation en fonction des objectifs.

- Amélioration de la spécificité *in vitro* (maturation d'affinité).

- Réactifs de laboratoire et de diagnostic.
 - Stabilité.
 - Compatibilité avec les conditions d'usage (résistance à la température, etc.).

- Imagerie *in vivo*.



■ **Thérapie.**

- **Agrégation.**
- **Modifications post-translotionnelles.**
- **Résistance à la dégradation, demi-vie in vivo.**
- **Taille / diffusion / pénétration.**

etc.



3. Nano-anticorps, etc.

- **Domaines d'anticorps (12-15 k Da vs 150 k Da pour IgG1)**
- **Ingenierie de domaines CH2.**

Dimitrov DS. Engineered CH2 domains (nanoantibodies). MAbs. 2009 Jan;1(1):26-8.

- **Nanobodies, Intrabodies, diabodies, etc.**

Kirchhofer A, et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. Nat Struct Mol Biol. 2010 Jan;17(1):133-8.

Seo MJ, et al. Engineering antibody fragments to fold in the absence of disulfide bonds. Protein Sci. 2009 Feb;18(2):259-67.

Wu C. Diabodies: molecular engineering and therapeutic applications. Drug News Perspect. 2009 Oct;22(8):453-8.

Chen W, et al. A large human domain antibody library combining heavy and light chain CDR3 diversity. Mol Immunol. 2010 Jan;47(4):912-21.



Vercruyse T, et al. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 REV prevents viral production. J Biol Chem. 2010 Apr 20.

Cardinale A, Biocca S. The potential of intracellular antibodies for therapeutic targeting of protein-misfolding diseases. Trends Mol Med. 2008 Sep;14(9):373-80.

Kirschning CJ, et al. Generation of anti-TLR2 intrabody mediating inhibition of macrophage surface TLR2 expression and TLR2-driven cell activation. BMC Biotechnol. 2010 Apr 13;10(1):31.



D. Les aptamères

1. Sélection des aptamères.

- **Molécules d'ARN ou ADN sélectionnées in vitro pour haute affinité et spécificité vs cible (1990).**
- **SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment"),**
- **Aptamère identifié → synthèse chimique**
- **Perfectionnement : modifications → résistance aux nucléases etc.**



Lou X, et al. Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 3;106(9):2989-94.

- **Collection de 10^{14} ss DNA 20 + 60 (aléatoire) + 20.**
- **Microbilles avec 10^4 molécules de toxine botulinique.**
- **Dispositif microfluidique.**
- **Isolement d'aptamères ($K^d = 35 - 85$ nM) en une étape.**



2. Les aptazymes

Lam BJ, Joyce GF. Autocatalytic aptazymes enable ligand-dependent exponential amplification of RNA. *Nat Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):288-92.

- Aptamères dotés d'une activité ARN – ligase.
- R3C (évolution in vitro) capable d'autoréplication (croisée).
- Amplification sans protéine.



3. Applications des aptamères

a) Substituts d'anticorps comme biosenseurs et biomarqueurs et dans les dosages :

Sefah K, et al. Nucleic acid aptamers for biosensors and bio-analytical applications. *Analyst*. 2009 Sep;134(9):1765-75.

Cerchia L, et al. Differential SELEX in human glioma cell lines. *PLoS One*. 2009 Nov 24;4(11):e7971.

Chen X, et al. Using Aptamer-Conjugated Fluorescence Resonance Energy Transfer Nanoparticles for Multiplexed Cancer Cell Monitoring. *Anal Chem*. 2009 Jul 2.

b) Applications thérapeutiques potentielles → cf. 3^{ème} partie



E. La protéomique à haut débit

1. La robotisation de la cristallisation pour la détermination des structures par cristallographie.

Sauder MJ, et al. High throughput protein production and crystallization at NYSGXRC. *Methods Mol Biol.* 2008;426:561-75

2. Analyses bio-informatiques à haut débit

- **Génome → séquence des protéines → structure ?**
 - **Chaperonnes ?**
 - **RNA (5S et Dna K)**



3. La protéomique par séparation des mélanges de protéines.

■ Le multiplexage par cytométrie de flux

Krishnan VV, et al. Multiplexed microbead immunoassays by flow cytometry for molecular profiling: Basic concepts and proteomics applications. Crit Rev Biotechnol. 2009;29(1):29-43.

■ La spectrométrie de masse

Picotti P, et al. High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. Nat Methods. 2010 Jan;7(1):43-6.

- Application aux kinases et phosphatases de la levure.**



■ **Sites de coupure des protéines**

Xu G, Shin SB, Jaffrey SR. Global profiling of protease cleavage sites by chemoselective labeling of protein N-termini. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 17;106(46):19310-5.

- **Purification de peptides avec extrémité N ("N-Terminalomique ") par marquage PITC (phenyl isothiocyanate) et spectrographie de masse.**

Vögtle FN, et al. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. Cell. 2009 Oct 16;139(2):428-39.

- **Extrémité N de 615 protéines (levure).**
- **Peptidase intermédiaire Lep55 (mutant).**
 - **retire 1 aa.**
 - **stabilité.**



4. La protéomique par puces

Borrebaeck CA, Wingren C. Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *J Proteomics*. 2009 Aug 20;72(6):928-35.

- Protéomique : séparation (ex : MS) vs détection.

- Puces à anticorps (émergence : 2000)
 - ~ 1 cm²
 - < 500 anticorps différents (fmole, pL).
 - Spots ~ 200 µL
 - Incubation avec µL d'échantillon (ex plasma).
 - Durée du test ~ 3 h.
 - Lecture habituelle : fluorescence.



a) Contenu des puces

- **Comment produire des (dizaines) de milliers de spécificités ?**
- **Sondes (anticorps) compatibles ?**
 - **Anticorps recombinants.**
 - **Librairies de 10^{10} et plus.**
 - **Anticorps monocaténaires**
 - **Ingénierie (températures, etc.)**
 - **Mais connaissance préalable du protéome**
 - **Puces à protéines (ex < librairies de cDNA).**



■ **Une option : Global Proteome Survey (GPS)**

- **Motifs de 4 à 6 aa.**
- **Chaque motif est présent dans 5 à 100 protéines.**
- **200 anticorps x 50 cibles = 10.000 protéines.**
- **Analyse subséquente par MS.**

➤ **Quid des aptamères ?**



b) Micro vs nano

- **Plans, micro-puits, micro fluidique, mais limites.**
 - **Technologies d'impression, compatibilité avec les réactifs.**
 - **Sensibilité et échelle dynamique.**
 - **Détection des nano-spots (scanners conventionnels > 1 μm).**
- **Réduction de la taille des spots à 1-10 μm vs. nano.**



c) Fabrication des puces

- **Imprimantes à jet d'encre.**

- **Etiquettes ADN**
 - **Anticorps couplés à des séquences codes-barres.**
 - **Hybridation sur puce ADN.**
 - **Fabrication des protéines étiquetées.**

- **Auto-assemblage de la puce.**
 - **Synthèse de l'anticorps in situ (cDNA).**
 - **PISA, NAPPA, DAPA.**



d) Détection avec ou sans marquage.

- **Problèmes liés au marquage avec traceurs fluorescents.**
 - **Perte d'activité ?**
 - **Marquage représentatif d'un échantillon complexe.**

- **Autres techniques, notamment :**
 - **Résonance plasmonique de surface.**
 - **Spectrométrie de masse.**
 - **AFM, etc.**

5. La protéomique avec détection des modifications post-traductionnelles (cf. imaging)

Song EH, Pohl NL. Carbohydrate arrays: recent developments in fabrication and detection methods with applications. Curr Opin Chem Biol. 2009 Dec;13(5-6):626-32.

- **Glycome.**
- **Palmitoylation.**
- **Oxydation des thiols.**

Laughlin ST, Bertozzi CR. Imaging the glycome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 6;106(1):12-7.

Seo YH, Carroll KS. Profiling protein thiol oxidation in tumor cells using sulfenic acid-specific antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 22;106(38):16163-8.

Martin BR, Cravatt BF. Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. Nat Methods. 2009 Feb;6(2):135-8.



6. Micro-Protéomique

Waanders LF, et al. Quantitative proteomic analysis of single pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 10;106(45):18902-7.

- Chromatographie d'échantillons (< 400 mg) (8h) interfacée à MS.
- Glomérules rénaux (souris) isolés par laser : 2400 protéines.
- Ilots de Langherans (2000 ilots par pancréas) : 7000 protéines.
- 1 Ilot
 - 2000 protéines (15.000 séquences).
 - changement dans le protéome + glucose (77 ↗ 65 ↘).
- L'analyse de quelques centaines de cellules est possible.



F. Analyse des interactions : réseaux de protéines

1. Méthodes de purification rapide des protéines.

Shen A, et al. Simplified, enhanced protein purification using an inducible, autoprocessing enzyme tag. PLoS One. 2009 Dec 2;4(12):e8119.

- **Domaine cystéine protéase de la toxine du choléra A.**
- **Activation spécifique par un dérivé de l'inositol absent des bactéries.**



Bieniossek C, et al. Automated unrestricted multigene recombineering for multiprotein complex production. Nat Methods. 2009 Jun;6(6):447-50.

- **Système de production dans *E-coli* de complexes.**
- **Plasmides donneurs et accepteurs (protéine pir).**
- **Système cre-lox.**
- **Génération de toutes les combinaisons possibles in vitro par construction et déconstruction.**

2. Analyse des interactions.

■ Méthodes in vivo (2 hybrides)

- **Levure.**
- **Cellules de mammifères.**

Chen HY, et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 25;106(34):14496-501.

Lievens S, et al. Mammalian two-hybrids come of age. Trends Biochem Sci. 2009 Nov;34(11):579-88.



■ **Méthodes in vitro**

- **Spectro de masse.**
- **Microfluidique.**

Wepf A, et al. Quantitative interaction proteomics using mass spectrometry. at Methods. 2009 Mar;6(3):203-5.

Gerber D, et al. An in vitro microfluidic approach to generating protein-interaction networks. Nat Methods. 2009 Jan;6(1):71-4.

■ **14 792 interactions mesurées dans un dispositif microfluidique.**

➤ **Réseau de 157 interactions entre 43 protéines de Streptococcus pneumoniae.**



G. Le métabolome

Sugimoto M, et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 2010 Mar;6(1):78-95.

- **215 sujets (cancéreux et témoins).**
- **57 métabolites (sur plusieurs milliers).**
- **prédiction de la probabilité d'être affecté par tel ou tel cancer.**



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 : la révolution de la fluorescence → 2^{ème} partie

V. Les techniques propres à l'immunologie.



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 : la révolution de la fluorescence.

V. Les techniques propres à l'immunologie.



A. Les organismes modèles et la souris

1. Les organismes « modèles »

- **Souris, rat, lapin, cobaye, furet, macaque, chimpanzé, etc.**
- **Mais aussi : poulet, poisson-zèbre, lamproie, etc.**
- **Modèles de quoi ?**
 - **Connaissances utiles pour cibler la recherche chez l'homme.**

**Ex : réponses B et T
modèles infectieux, immunopathologie.
études évolutives.**



- **Modèles prédictifs pour l'homme ?**
 - **Médicaments et vaccins.**

- **Potentiel génétique**
 - **Lignées « inbred » vs populations « outbred ».**
 - **Capacité de transgénése knock-out (KO)
knock-in (KI)**
 - **Utilisation des ARN interférents chez la souris.**



2. La génétique chez la souris

- **Des souris KO par milliers, avec des problèmes d'élevage, de stockage, d'échanges (transferts entre animaleries, purification).**
- **KO et KI conditionnels (ex : système Cre-Lox), méganucléases.**
- **Conception d'expériences fondées sur des hypothèses critiques.**
- **KI avec marqueurs fluorescents intégrés dans des gènes spécifiques de types cellulaires particulières → imagerie.**



3. Les limites de la transgénèse conventionnelle.

- **Lenteur, coûts, infrastructures, etc.**
- **Gènes à fonctions plurielles.**
- **Redondance fonctionnelle.**
- **Rééquilibrage fonctionnel au cours du développement.**

Saveliev A, Tybulewicz VL. Lymphocyte signaling: beyond knockouts. Nat Immunol. 2009 Apr;10(4):361-4.



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Professeur Philippe Kourilsky

Année 2009-2010

4. Les souris « humanisées »

Manz MG, Di Santo JP. Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology. Nat Immunol. 2009 Oct;10(10):1039-42.

Racki WJ, et al. NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. Transplantation. 2010 Mar 15;89(5):527-36.

- **Production d'anticorps monoclonaux humains.**



5. Le couplage avec la génétique cellulaire

- **Souris transgénique, KO, KI : sources de cellules mutantes.**
- **Utilisation de l'interférence ARN:**
 - **KO partiel de l'expression d'un ou plusieurs gènes.**
 - **Différents types d'administration et de vectorisation.**
 - **Efficace sur lignées et cellules primaires.**
 - **Utilisation de mélanges.**
- **Plus difficile sur l'organisme entier.**

Sharma S, Rao A. RNAi screening: tips and techniques. Immunol. 2009 Aug;10(8):799-804.



B. La cytométrie de flux

Chattopadhyay PK, et al. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology*. 2008 Dec;125(4):441-9.

1. Les bases de l'analyse multiparamétrique

1969 : Herzenberg L. 1 seul laser (cellules B)

1982 : 2 lasers, sous-populations B/IgM et IgD
Cellules T, CD4⁺, CD8⁺, etc.

- Mesures de fonctions cellulaires (production de cytokines) ou de l'apoptose au niveau individuel.

- 5 (1995) puis 13 (2001) puis 18 couleurs (2006).



2. L'instrumentation

- Lasers typiques : bleu (488 nm) et rouge (633 nm).
- Permettent d'exciter un large éventail de fluochromes (FITC, APC, PE etc.)
- Lasers verts (532 nm)
- Lasers peu onéreux (150 \$) → développement d'instruments portables « bon marché » → travail de terrain.
- Autres lasers (UV, jaunes, oranges).

3. Analyse et tri automatisés de séries d'échantillons (centaines ou plus).

- **importance pour la clinique (calibration, contrôle de qualité).**
- **screening de molécules**



4. Les molécules fluorescentes

- **Fluorochromes usuels**
- **QD = Quantum dots = nanocristaux semiconducteurs**
 - **Spectres d'excitation larges.**
 - un seul laser peut suffire QD 525-QD800
 - **Spectres d'émission plus étroits.**
 - protéines fluorescentes.

5. L'analyse des données

- **En principe :**

- 18 couleurs → identification de 262 144 sous-populations cellulaires**

- **Nombre d'événements comptés, statistiques.**

- Visualisation, graphes polychromes etc.**

- Données brutes (problèmes analogues aux micro-arrays).**



6. Les réactifs spécifiques des récepteurs B et T

- **Anticorps monoclonaux** . Anti BCR
. Anti TCR (très difficile).
- **Tetramères (pentamères) de CMH-I et CMH-II avec peptide.**

Dimopoulos N, et al. Combining MHC tetramer and intracellular cytokine staining for CD8(+) T cells to reveal antigenic epitopes naturally presented on tumor cells. J Immunol Methods. 2009 Jan 1;340(1):90-4

Vollers SS, Stern LJ. Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. Immunology. 2008 Mar;123(3):305-13.

Chattopadhyay PK, et al. Techniques to improve the direct ex vivo detection of low frequency antigen-specific CD8+ T cells with peptide-major histocompatibility complex class I tetramers. Cytometry A. 2008 Nov;73(11):1001-9.



C. Miniaturisation et microfluidique

1. Les mesures d'activité des cellules T cytolytiques

Malyguine A, et al. New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials. Adv Exp Med Biol. 2007;601:273-84.

Stern E, et al. Label-free immunodetection with CMOS-compatible semiconducting nanowires. Nature. 2007 Feb 1;445(7127):519-22.

Stern E, Steenblock ER, et al. Label-free electronic detection of the antigen-specific T-cell immune response. Nano Lett. 2008 Oct;8(10):3310-4.



- **NW – FET = Nanwire-field effect transistor.**
- **Fabrication de bio-senseurs par les techniques de lithographie conventionnelles.**
- **Courant électrique fonction des charges voisines.**
- **Surface silicone-OH : changements de pH.**
- **Activation $T \rightarrow$ acidification locale.**

- **Addition d'acide : détection 1s**
- **Activation par anti-CD3 : 8s**
- **Clones de CTL spécifiques d'un peptide : 40s**
- **Sensibilité maximum ~ 200 cellules**



2. Les applications de la microfluidique

Brouzes E, et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 25;106(34):14195-200.

- **2 phases : phase aqueuse (microgoutte) enveloppée d'huile.**
- **2 canaux :**
 - **cellules individuelles encapsulées.**
 - **réactifs (mitomycine) avec codage coloré encapsulé.**
- **Contrôle électrique de la fusion.**
- **Mesure de la viabilité.**

McWhirter JL, et al. Flow-induced clustering and alignment of vesicles and red blood cells in microcapillaries. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 14;106(15):6039-43

- **Globules rouges dans micro-capillaires.**
- **Analyse de la déformabilité, viscosité résultante, etc.**
- **Rôle dans la malaria.**

Handayani S, et al. High deformability of Plasmodium vivax-infected red blood cells under microfluidic conditions. J Infect Dis. 2009 Feb 1;199(3):445-50.

Conclusion

- L'alliance de la biologie et de la physique.
- Tout aussi manifeste dans les progrès de l'imagerie.

Prochain cours : Mardi 18 mai

Le cours de Mardi prochain portera sur l'imagerie dynamique.

- **17h-18h Les progrès de l'imagerie.**
- **18h-19h Philippe Bousso : cellules et molécules immunitaires en action.**



Institut Pasteur Paris