



La naissance de l'immunologie systémique

7 mars	17H00	Qu'est ce que la biologie systémique ?
	18H00	Les outils de la biologie systémique.
14 mars	17H00	Les concepts de la biologie systémique.
	18H00	La robustesse dans les systèmes biologiques.
21 mars	17H00	Qu'est-ce que l'immunologie systémique?
	18H00	Conférence d'Ana Cumano, Prix Lacassagne 2005 « Développement des cellules hématopoïétiques chez l'embryon ».
28 mars	17H00	Les outils de l'immunologie systémique.
	18H00	Conférence d'Ana Cumano, Prix Lacassagne 2005 « Développement des précurseurs lymphoïdes dans le foie fœtal et dans la moelle osseuse » .
4 avril	17H00	Quelques résultats d'immunologie systémique.
	18H00	Enjeux et avenir de l'immunologie systémique.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Professeur Philippe Kourilsky

Année 2007

La naissance de l'immunologie systémique

- I. Qu'est ce que la biologie systémique ?**
- II. Les outils de la biologie systémique.**
- III. Les concepts de la biologie systémique.**
- IV. La robustesse dans les systèmes biologiques.**
- V. Qu'est-ce que l'immunologie systémique ?**
- VI. Les outils de l'immunologie systémique.**
- VII. Quelques résultats d'immunologie systémique.**
- VIII. Enjeux et avenir de l'immunologie systémique.**



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Les outils de l'immunologie systémique.

INTRODUCTION

- I. Les puces conventionnelles dédiées.
- II. La problématique CMH – peptides.
- III. L'analyse des répertoires.
- IV. Et bien d'autres outils...

CONCLUSION



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Les outils de l'immunologie systémique.

INTRODUCTION

- Les outils « conventionnels » de la biologie systémique sont évidemment utilisés tels quels en immunologie, surtout pour **l'immunologie systémique intracellulaire**.

Smith KD, Bolouri H. - Dissecting innate immune responses with the tools of systems biology. *Curr Opin Immunol*. 2005 Feb;17(1):49-54.

- D'autres outils ont été adaptés, spécialisés ou inventés :

Braga-Neto UM, Marques ET Jr. From functional genomics to functional immunomics: new challenges, old problems, big rewards. *PLoS Comput Biol*. 2006 Jul 28;2(7):e81.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Piccaluga, et al.
Gene expression
analysis of
peripheral T cell
lymphoma,
unspecified,
reveals distinct
profiles and new
potential
therapeutic
targets.
J Clin Invest.
2007 March 1;
117(3): 823–834.

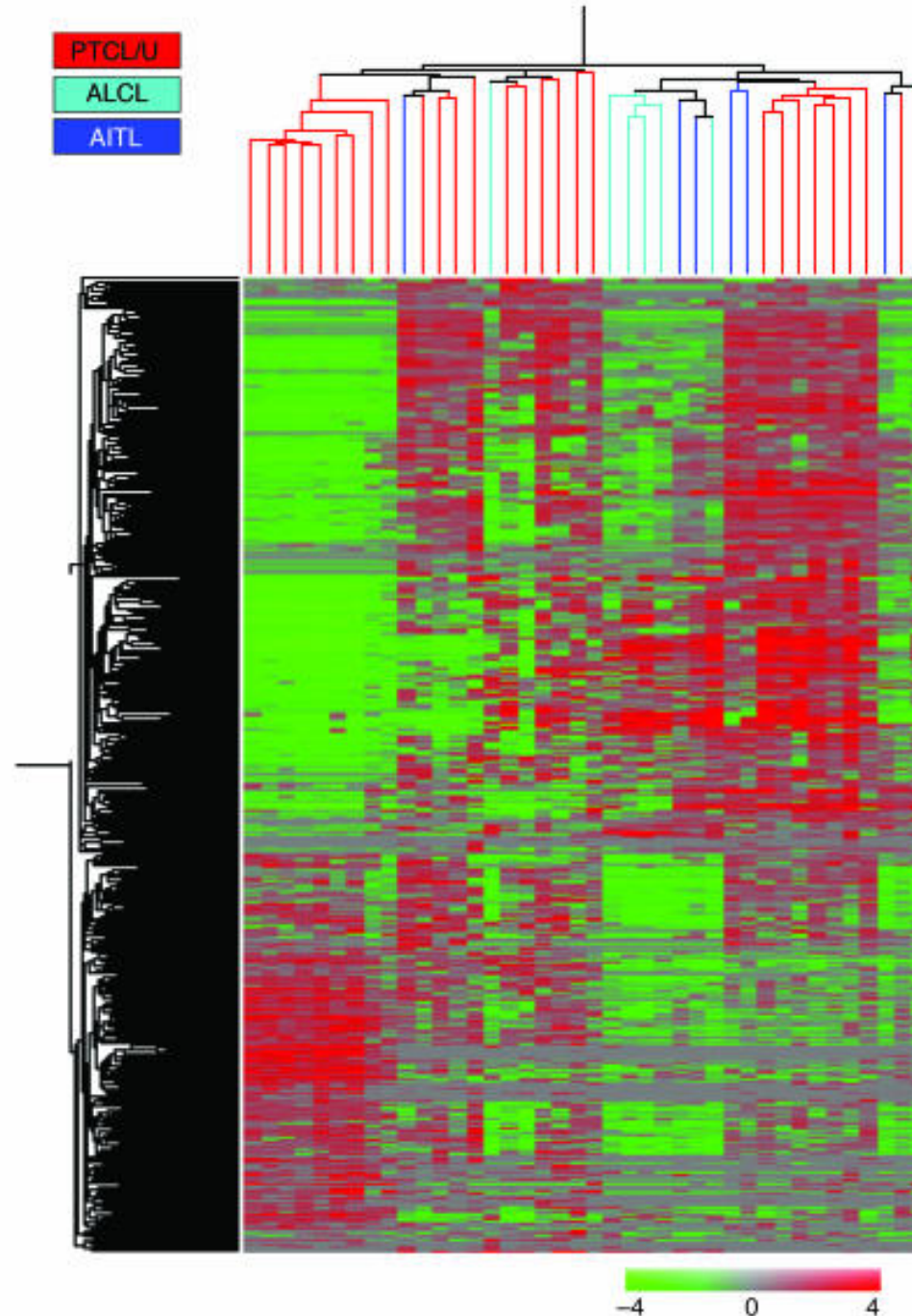


Figure 1:
Unsupervised
hierarchical
clustering of
PTCL/U, AITL,
and ALCL



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

I. LES PUCES CONVENTIONNELLES DEDIEES.

A. Mesure des réactions antigène-anticorps.

1. Puces à anticorps.

- Utiles pour la protéomique en général.
 - Pour profiler l'expression d'antigènes associés à des tumeurs.
 - Pour la génomique fonctionnelle impliquant des modifications post-transcriptionnelles.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

- Pistes d'amélioration variées.

- **Transposer dans le plan tout ce qui peut l'être, y compris des réactions apparemment complexes.**

Delehanty JB, et al. Transfected cell microarrays for the expression of membrane-displayed single-chain antibodies. Anal Chem. 2004 Dec 15;76(24):7323-8.

- **Techniques de normalisation.**

Olle EW, et al. : Development of an internally controlled antibody microarray. Mol Cell Proteomics. 2005 Nov;4(11):1664-72.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

- **Automatisation.**

Knecht BG, et al. Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Anal Chem.* 2004 Feb 1;76(3):646-54.

- **Quid des anticorps synthétiques (« clic »).**

- **Amplification des signaux.**

Zhou H, et al. Two-color, rolling-circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum-protein measurements. *Genome Biol.* 2004;5(4):R28.



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Chaire d'Immunologie Moléculaire

2. Les puces à antigènes (protéines ou peptides).

Balboni I, et al. : Multiplexed protein array platforms for analysis of autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:391-418.

a). Diagnostic :

- Anti-dsDNA, etc.
- Monitorage des IgE.
- Serodiagnostic des maladies infectieuses.

b) Biosignatures.

c) Monitorage de la progression de la pathologie.

d) Découvertes d'auto-antigènes.



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

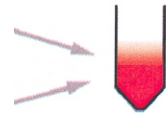
Chaire d'Immunologie Moléculaire

Cultured cell lines
or
purified primary cells

Fluorescent image



Green (Cy3) - phosphorylation level
Red (Cy5) - beta-actin level

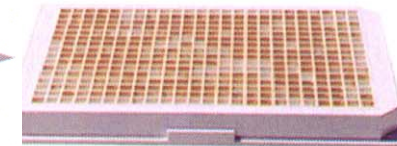


Cell stimulation

- antibodies
- cytokines
- +/- kinase inhibitors

Lysate preparation

- time course
- stimulation conditions



Lysates in 384-well plates

1. Probe with
phosphospecific antibodies

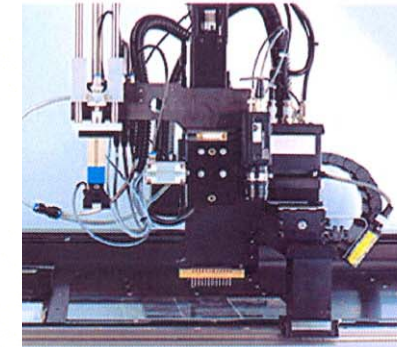
2. Increase signal intensity
using tyramide-based
amplification technology

Microarray printing of lysates

- high throughput (126 slides)
- high density (>2000 spots/slide)
- low sample volume (<10 nl/spot)



FAST slides



BioRad Chipwriter Pro system



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Hueber W, et al. - Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2005 Sep;52(9):2645-55.

Janzi M, et al. - Serum microarrays for large scale screening of protein levels. Mol Cell Proteomics. 2005 Dec;4(12):1942-7. Epub 2005 Aug 29.

Cherif B, et al. - Clinically related protein-peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips by surface plasmon resonance imaging. Clin Chem. 2006 Feb;52(2):255-62.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

B. Puces à cytokines.

1. Premiers systèmes = extensions d'ELISA.

2. RCA = Rolling Circle Amplification.

Shao W, et al. Optimization of Rolling-Circle Amplified Protein Microarrays for Multiplexed Protein Profiling. J Biomed Biotechnol. 2003;2003(5):299-307.

3. Microsphères à codage optique.

4. Les essais « de proximité ».

Gullberg M, et al. - Cytokine detection by antibody-based proximity ligation PNAS USA. 2004 Jun 1;101(22):8420-4.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

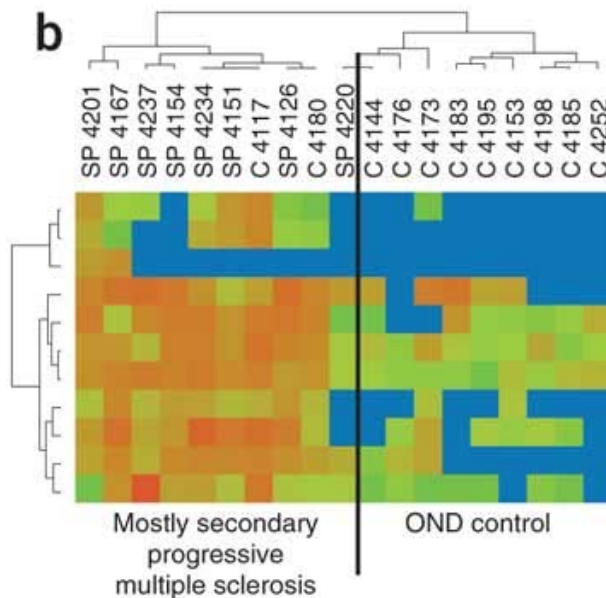
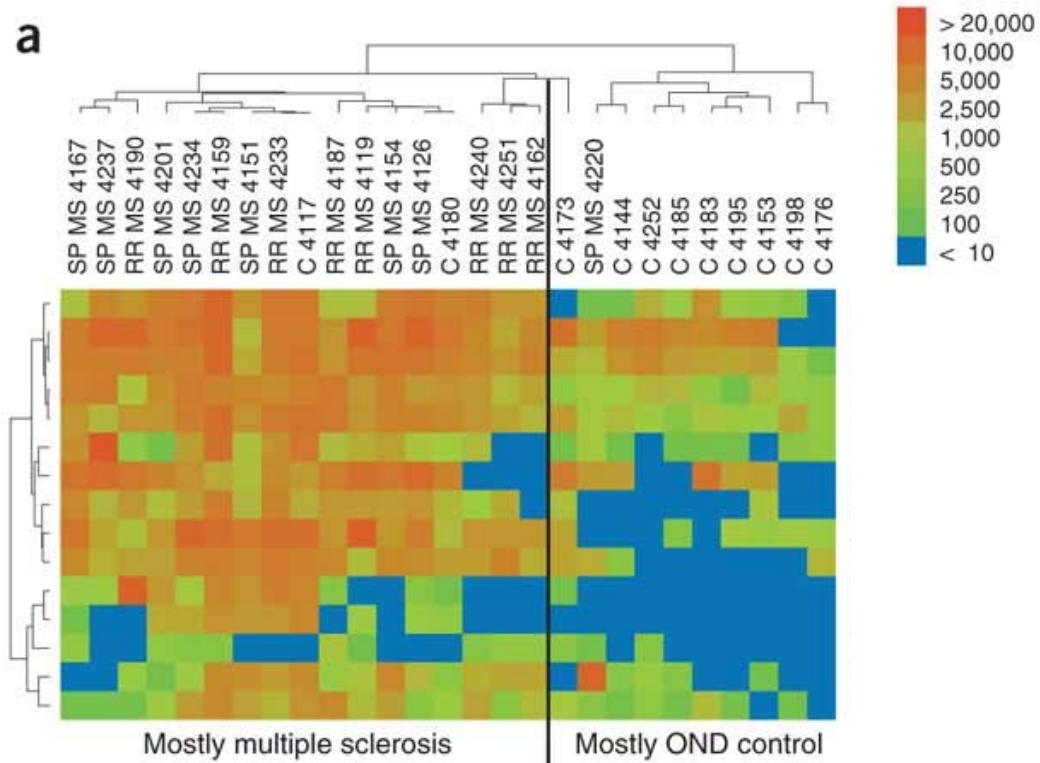
Chaire d'Immunologie Moléculaire

C. Puces à lipides.

Kanter JL, et al. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. Nat Med. 2006 Jan;12(1):138-43..

- Des anticorps spécifiques de plusieurs lipides (sulfatides, sphingo-myeline et certains lipides oxydés) sont identifiés par ce moyen dans le liquide cerebro-spinal de patients atteints de sclérose multiple.

Ci-après, figure 2. Individuals with multiple sclerosis have increased lipid-specific antibodies.



Kanter, J.L. et al. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation - *Nature Medicine* 12, 138 - 143 (2005)

Figure 2. Individuals with multiple sclerosis have increased lipid-specific antibodies.



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Chaire d'Immunologie Moléculaire

II. LA PROBLEMATIQUE CMH-PEPTIDE.

A. Découverte et prédiction d'épitopes T.

1. Rappels.

- Le polymorphisme du CMH (HLA) I et II.
- La présentation des peptides.
- Les peptides du soi et les autres.
- Les tetramères CMH-peptide.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

2. L'après 11 septembre aux Etats-Unis.

Sette A, et al. - A roadmap for the immunomics of category A-C pathogens. *Immunity*. 2005 Feb;22(2):155-61.

cf. tables ci-après.

**Summary of Discovery Methods and Laboratories
Involved in the Large-Scale Antibody and T Cell Epitope Discovery Program
(1/2)**

Epitope Types	Epitope Sources	Main Discovery Method(s)	Institution	Investigators
B	Clostridium botulinum neurotoxins	Phage display	TSRI	Kim Janda
T-I	Various	Development of predictive algorithms for MHC class I binding	Univ. of Copenhagen	Soren Buus (UC)
T-I	15 different A-C pathogens	Predictive algorithms and MHC class I binding assays	Technical Univ. of Denmark (DTU)	Ole Lund (DTU), Morten Nielsen (DTU), Claus Lundegaard (DTU), Mikkel Harndahl (UC), Soren Buus (UC), Mogens Claesson (UC), Soren Brunak (DTU)
T-I	Ebola virus and Mycobacterium tuberculosis	MHC class I binding assays	Duke Univ.	Kent Weinhold (Duke), Georgia Tomaras (Duke), Scott Pruitt (Duke), Tina Kuus-Reichel (Beckman Coulter)
T-I	Influenza virus, West Nile virus and Coxiella burnetii	Elution and sequencing of naturally processed peptides	Univ. of Oklahoma	William Hildebrand
T-I	Vaccinia virus	Elution and sequencing of naturally processed peptides	Vanderbilt Univ.	Sebastian Joyce
T-I, T-II	Arenaviruses	HLA transgenic mice, and MHC binding assays	LIAI	Alessandro Sette (LIAI) Michael Buchmeier (TSRI) Jason Botten (TSRI)
T-I, T-II	Flavi, arena, hanta, hepatitis A, yellow fever and rabies viruses	Predictive algorithms, HLA transgenic mice and human clinical cohorts	Johns Hopkins Univ.	J. Thomas August (JHU), Vladimir Brusic (I2R), Romulo Maciel (FIOCRUZ), Ernesto Marques (FIOCRUZ)

**Summary of Discovery Methods and Laboratories
Involved in the Large-Scale Antibody and T Cell Epitope Discovery Program
(2/2)**

Epitope Types	Epitope Sources	Main Discovery Method(s)	Institution	Investigators
T-I, T-II	Tularemia bacterium	Bacterial expression of random genomic fragments, T cell hybridoma readout	Univ. of North Carolina	Jeffrey Frelinger (UNC), Tom Kawula (UNC), Lucinda Hensely (UNC), John Frelinger (U. Rochester)
T-I, T-II	Vaccinia virus	HLA transgenic mice, MHC binding assays and PBMCs from immunized donors	LIAI	Alessandro Sette
T-I, T-II	Vaccinia virus	T-cell clones derived from immunized donors and combinatorial peptide libraries	TPIMS	Clemencia Pinilla
T-I, T-NC	Mycobacterium tuberculosis	Identification and cloning of pathogen specific CD8+ T-cells	Oregon Health & Science U.	David Lewinsohn
T-II	Bacillus anthracis and Yersinia pestis	HLA transgenic mice, and MHC binding assays	Imperial College, London, England	D. Altmann (ICL), S. Sriskandan (ICL), J. Robinson (U. Newcastle), D. Williamson (Dstl, Porton Down), L. Baillie (UMBI)
T-II	Influenza A and B viruses, Clostridium tetani, and Bacillus anthracis	Tetramer Guided Epitope Mapping	Benaroya Research Inst. at Virginia Mason	William Kwok

T-I = MHC class I restricted T-cell epitopes; T-II= MHC class II restricted T-cell epitopes; T-NC = nonclassically restricted T-cell epitopes; and B = B-cell / antibody epitopes.
 TSRI = The Scripps Research Institute, La Jolla, CA; LIAI = La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA; TPIMS = Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA; I2R = Institute for Infocomm Research, Singapore; FIOCRUZ = Oswaldo Cruz Foundation, Brazil; and UMBI = University of Maryland Biotechnology Institute.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Kudva IT, et al. Identification of a protein subset of the anthrax spore immunome in humans immunized with the anthrax vaccine adsorbed preparation. Infect Immun. 2005 Sep;73(9):5685-96.

Delvecchio VG, et al. - Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis. Appl Environ Microbiol. 2006 Sep;72(9):6355-63.

Kudva IT, et al. - Proteomics-based expression library screening (PELS): a novel method for rapidly defining microbial immunoproteomes. Mol Cell Proteomics. 2006 Aug;5(8):1514-9. Epub 2006 May 31.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

3. Des méthodes de prédiction de plus en plus sophistiquées

Tenzer S, et al. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell Mol Life Sci.* 2005 May;62(9):1025-37.

Larsen MV, et al. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur J Immunol.* 2005 Aug;35(8):2295-303.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

4. Des bases de données de plus en plus nourries.

Peters B, et al. A community resource benchmarking predictions of peptide binding to MHC-I molecules. PLoS Comput Biol. 2006 Jun 9;2(6):e65.

Sette, A. et al. : A Roadmap for the Immunomics of Category A–C Pathogens
Vol. 22, 155 (February 2005)

→ Some useful website addresses

	URL
RNAi Codex	http://katahdin.cshl.org/scripts/main.pl
The Alliance for Cellular Signaling	http://www.afcs.org
The Signaling Gateway	http://www.signaling-gateway.org/
Biocarta	http://www.biocarta.com/genes/index.asp
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	http://www.genome.ad.jp/kegg/
The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base	http://www.pharmgkb.org/
BioCyc	http://www.biocyc.org/
Database of Interacting Proteins	http://dip.doe-mbi.ucla.edu/
Biomolecular Interaction Database	http://bind.ca
Human Protein Reference Database	http://www.hprd.org
Cytoscape	http://www.cytoscape.org/
Osprey	http://biodata.mshri.on.ca/osprey/
VisANT	http://visant.bu.edu/
Gene Ontology	http://www.geneontology.org
Systems Biology Markup Language	http://sbml.org/



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

B. Un nouveau type de puces.

1. Les premières puces CMH-peptides.

Soen Y, et al. Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. PLoS Biol. 2003 Dec;1(3):E65.

- Les puces couvertes de tetramères permettent de détecter des cellules T spécifiques marquées. Sensibilité : 0.1 %.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

2. Vers des cellules (APC) « synthétiques ».

Jennifer D. Stone, et al. : HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC–peptide and costimulatory microarrays PNAS 2005 102: 3744-3749;

- La puce comprend des éléments de cellules présentatrices synthétiques :
 - CMH-peptide.
 - Molécules co-stimulatrices.
 - Anticorps pour capture de cytokines.
- Environ 1000 spots / lame.

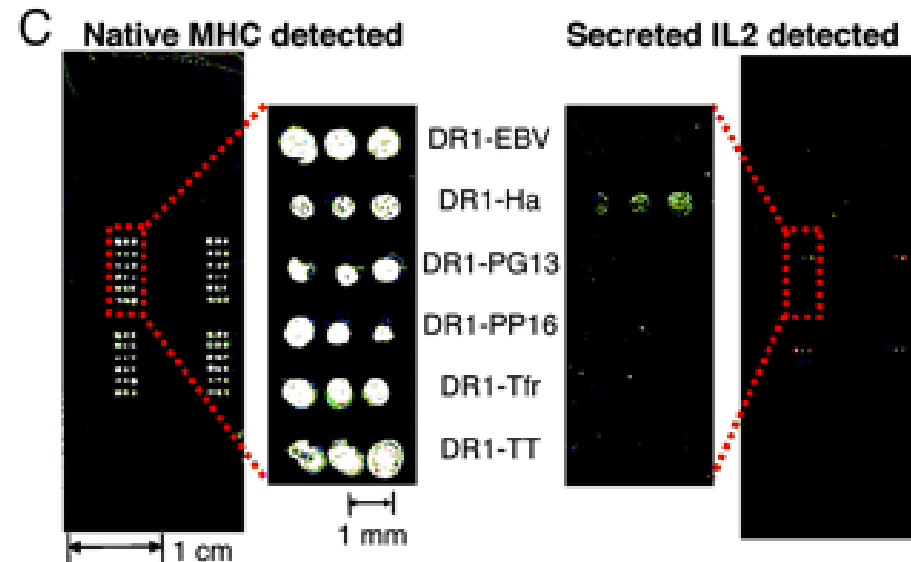
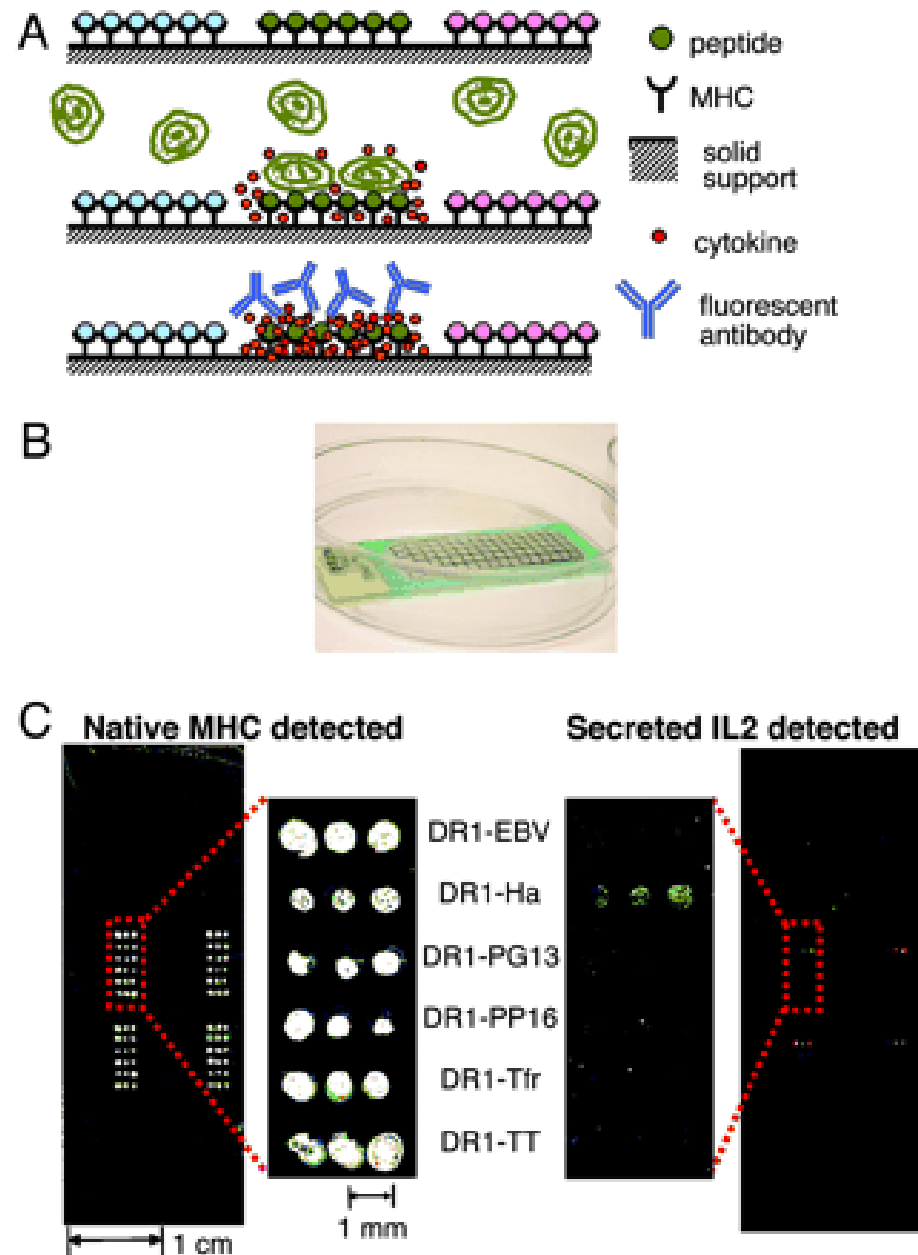


COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Stone J.F., et al.
HLA-restricted epitope
identification and
detection of functional T
cell responses by using
MHC-peptide and
costimulatory
microarrays –
PNAS March 8, 2005 vol.
102.10 3744-9

Fig. 1. Artificial antigen
presentation chips.





COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

III. L'ANALYSE DES REPERTOIRES.

A. Cellules T.

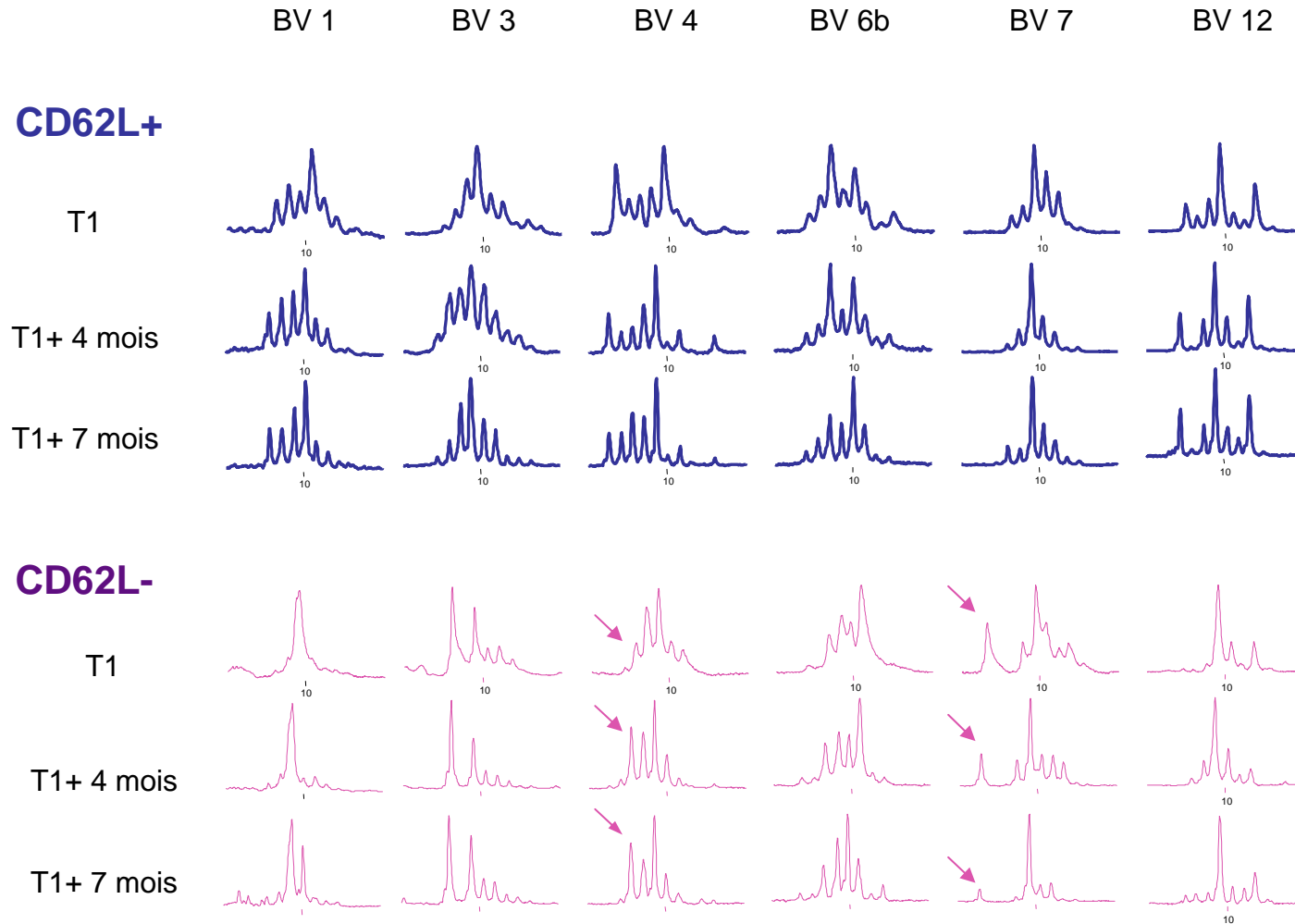
- L'Immunoscope T

Lim A, et al. - Combination of MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the Immunoscope permits sensitive ex vivo quantitation and follow-up of human CD8+ T cell immune responses. *J Immunol Methods*. 2002 Mar 1;261(1-2):177-94.

cf. figure ci-après

Bonarius HP, et al. Monitoring the T-cell receptor repertoire at single-clone resolution. *PLoS ONE*. 2006 Dec 20;1:e55.

Evolution of the repertoire over a 7 months period



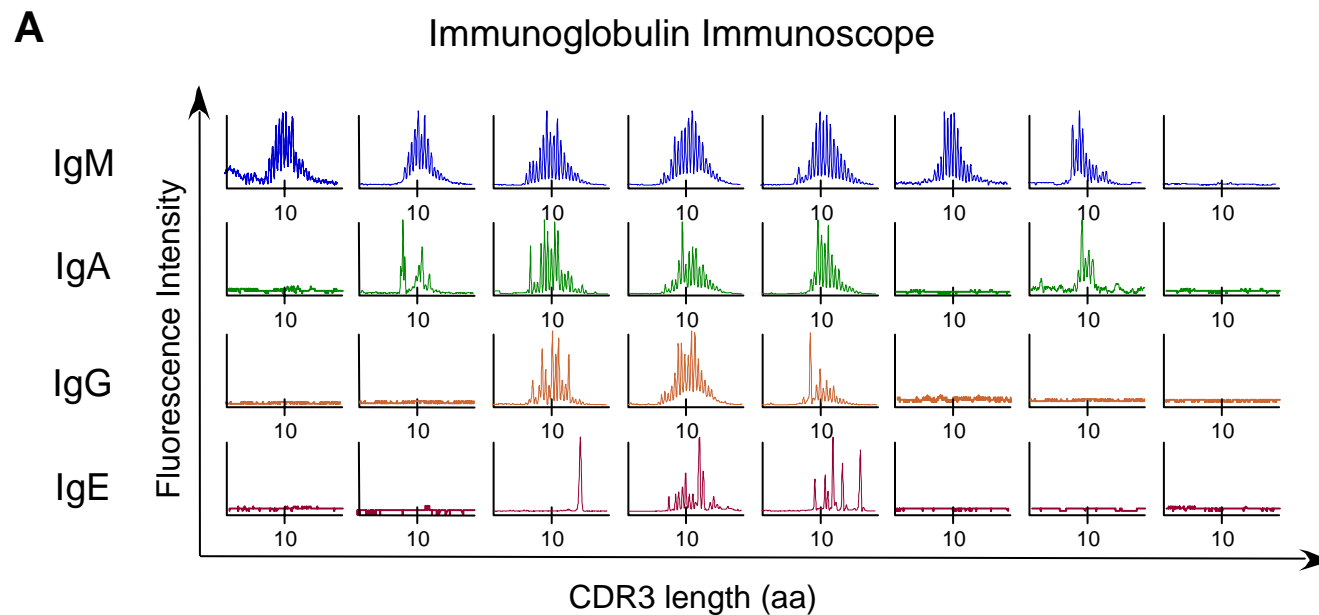
→ Relative stability of the both repertoires

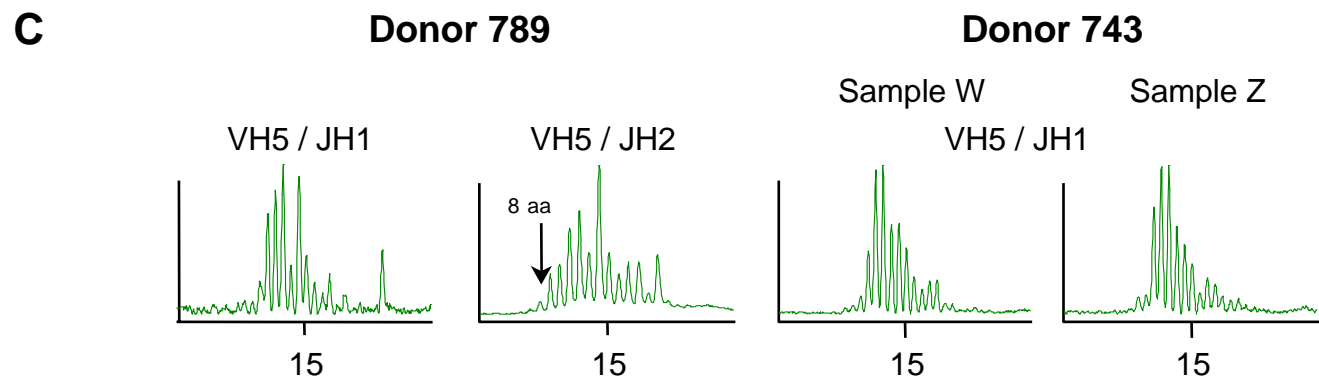
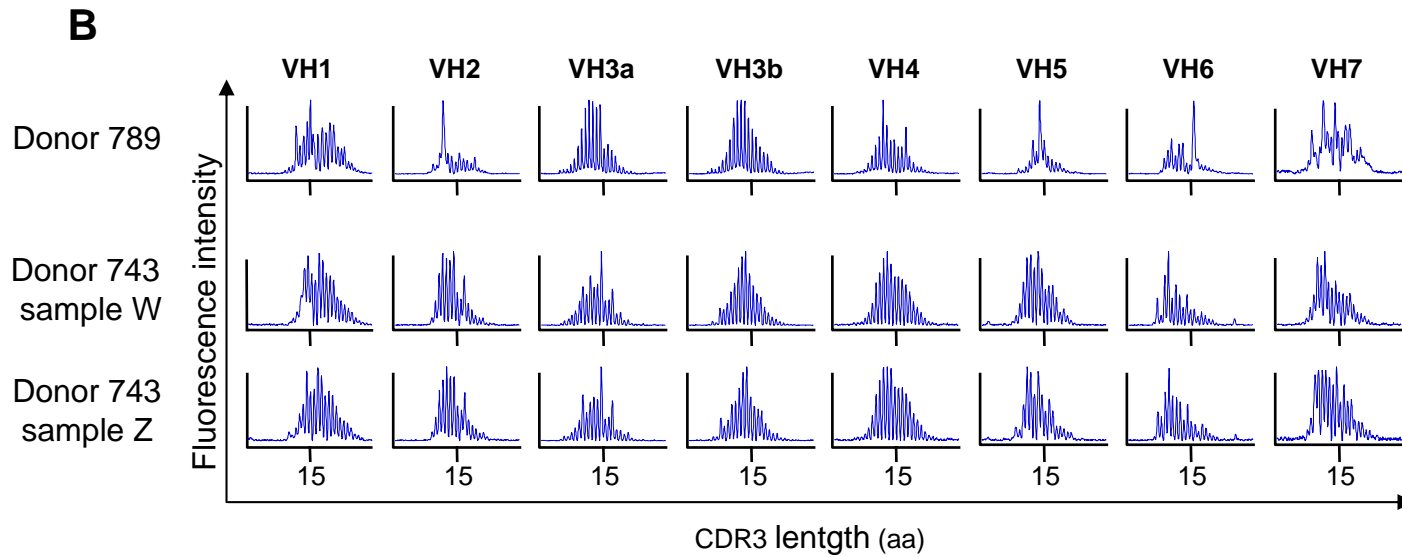


B. Cellules B.

- L'Immunoscope B

Lim A, et al. - Most human peripheral blood B cells display a unique heavy chain rearrangement (soumis pour publication).





VH/C μ Immunoscope profiles of two healthy donors



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Chaire d'Immunologie Moléculaire

IV. ET BIEN D'AUTRES OUTILS...

A. La cytofluorométrie

B. La spectrométrie de masse.

C. L'imagerie.



La naissance de l'immunologie systémique

7 mars	17H00	Qu'est ce que la biologie systémique ?
	18H00	Les outils de la biologie systémique.
14 mars	17H00	Les concepts de la biologie systémique.
	18H00	La robustesse dans les systèmes biologiques.
21 mars	17H00	Qu'est-ce que l'immunologie systémique?
	18H00	Conférence d'Ana Cumano, Prix Lacassagne 2005 « Développement des cellules hématopoïétiques chez l'embryon ».
28 mars	17H00	Les outils de l'immunologie systémique.
	18H00	Conférence d'Ana Cumano, Prix Lacassagne 2005 « Développement des précurseurs lymphoïdes dans le foie fœtal et dans la moelle osseuse » .
4 avril	17H00	Quelques résultats d'immunologie systémique.
	18H00	Enjeux et avenir de l'immunologie systémique.