

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Adrien Six (adrien.six@upmc.fr)
Université Pierre et Marie Curie

IF-IVa
février 2010

IF2010 BMC423 IF-IVa

1

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

1. Modèle de la différenciation T
2. Analyse immunomique anticorps
3. Signature transcriptionnelle "Mémoire"
4. Modules transcriptionnels
5. Analyse de répertoire

Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IVa

2

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

1. Modèle de la différenciation T
2. Analyse immunomique anticorps
3. Signature transcriptionnelle "Mémoire"
4. Modules transcriptionnels
5. Analyse de répertoire

Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IVa

3

Biologie des systèmes ?

1. Discipline s'intéressant aux interactions quantitatives entre les éléments d'un système biologique.
2. Ensemble de méthodes multidisciplinaires impliquant un cycle itératif entre collection de données expérimentales et modélisation.
3. Approche intégrative alternative de l'approche réductionniste.
4. Démarche organisationnelle consistant à regrouper des scientifiques de différents champs disciplinaires (biologistes, informaticiens, mathématiciens, ingénieurs...).
5. Toutes les propositions à la fois...

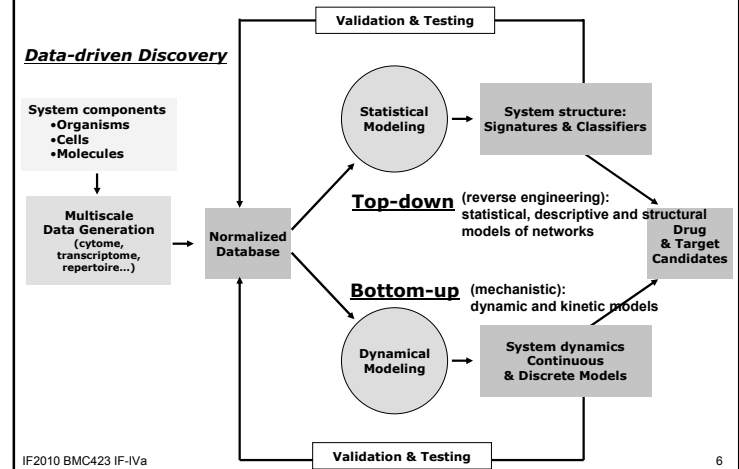
IF2010 BMC423 IF-IVa

4

Biologie des systèmes

- Production de données expérimentales à haut débit: transcriptome, cytométrie, protéomique...
 - Intégration des données, base de données
 - Modélisation des données:
 - modèles mathématiques
 - modèles informatiques
 - modèles statistiques
- Simulations, Prédictions, Signatures...

Cycles de modélisation



Système immunitaire = Système complexe

- Les systèmes complexes sont des systèmes multi-échelle: *écosystème, réseau social, marché financier, système biologique*
- Réseaux auto-organisés (modules); interactions intra- et inter-niveaux *voie de transduction, processus infectieux*
- Étude de données collectées décrivant:
 - Composant du système *cellules, molécules*
 - Structure du système *interactions, voies, réseaux*
 - Dynamique du système *réponse vs. temps, perturbation...*
- Analyse de données et modélisation pour identifier des propriétés fonctionnelles, signatures, nouvelles hypothèses à tester *transcriptome Treg vs. Teff*

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

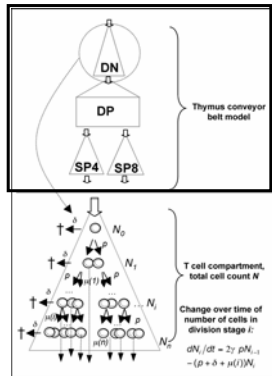
Introduction

1. **Modèle de la différenciation T**
2. Analyse immunomique anticorps
3. Signature transcriptionnelle "Mémoire"
4. Modules transcriptionnels
5. Analyse de répertoire

Conclusion

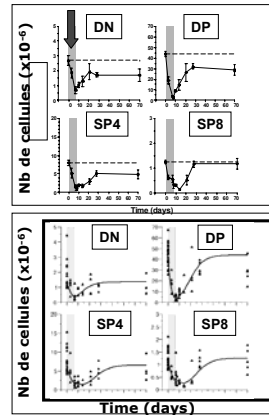
Modélisation de la différenciation T

Données expérimentales obtenues après déplétion transitoire (7j) des cellules T en division



Thomas-Vaslin et al. (2008) J.Immunol. 180:2240

IF2010 BMC423 IF-IVa



9

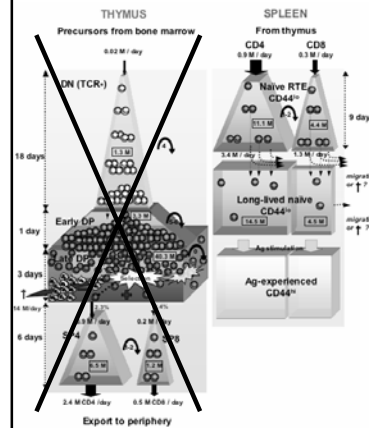
Modélisation de la différenciation T

➤ Modèle quantitatif de la dynamique cellulaire des thymocytes et des splénocytes à l'homéostasie

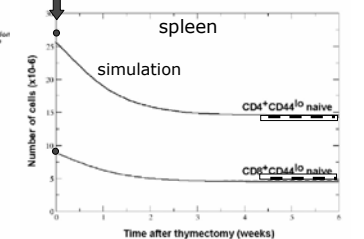
➤ 56 paramètres quantitatifs: flux cellulaires, temps de résidence, export, import, prolifération, mortalité, temps & espace, sélection, expansion

➤ Simulation d'une thymectomie

Données expérimentales



IF2010 BMC423 IF-IVa



Thomas-Vaslin et al. (2008) J.Immunol. 180:2240 10

Modélisation de la différenciation T

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

1. Modèle de la différenciation T
2. **Analyse immunomique anticorps**
3. Signature transcriptionnelle "Mémoire"
4. Modules transcriptionnels
5. Analyse de répertoire

Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IVa

11

IF2010 BMC423 IF-IVa

13

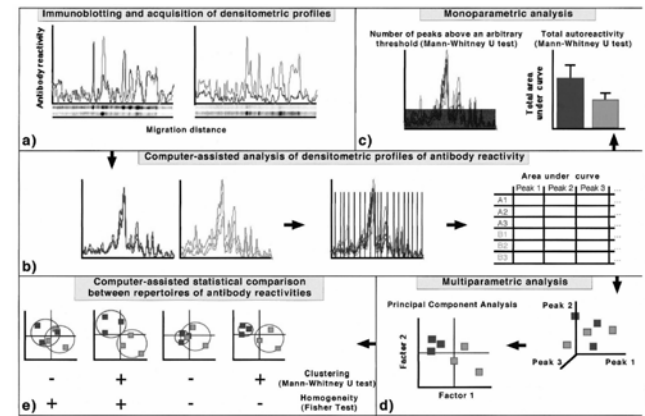
Quintana, F.J., *et al.*
PNAS 101, 14615-14621, 2004.

“Functional immunomics: Microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes”

IF2010 BMC423 IF-IVa

14

Panama-blot



IF2010 BMC423 IF-IVa

D. Stahl *et al.* (2000) *J. Immunol. Methods* 240:1. 15

Objectifs de l'étude de Quintana *et al.*

- Mettre au point une puce à antigènes
- Analyser les réactivités anticorps dans un modèle de diabète de type 1
- Effectuer une analyse bioinformatique pour établir des signatures spécifiques

IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14621. 16

Model de CAD

Cyclophosphamide-Accelerated Diabetes

- Souris NOD mâles (~50% diabète à 9 mois)
- Apparition accélérée par le traitement au cyclophosphamide (toxicité pour les Tregs)
- Injection i.p. à 4 & 5 semaines
- Apparition synchronisée du diabète à 6 semaines



IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14621. 17

Rationnel de l'approche

- Comparer les réactivités anticorps du sérum de souris NOD mâles, avant et après traitement au cyclophosphamide
 - Rechercher des différences de réactivité chez les souris développant un CAD (malades) ou non (sains)
 - Identifier des patterns de réactivité associés à la sensibilité ou résistance pour prédire ou diagnostiquer le CAD
- Approche microarray globale avec analyse bioinformatique & biostatistique

IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14621. 18

Schéma expérimental

- 266 antigènes différents déposés sur la puce
 - Collection de sérum de 19 souris avant et après CAD
 - 9 souris traitées au cyclophosphamide développant un diabète (malade) et 10 sans diabète (sain)
 - Incubation des sérum sur la puce à antigènes
 - Détection du signal de réactivités Ac; traitement image (transformation log-2, moyenne 8 replicats, normalisation du signal)
- Matrice de réactivités IgG: 266 lignes et 57 colonnes (pré- & post-CAD + ratio)

IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14621. 19

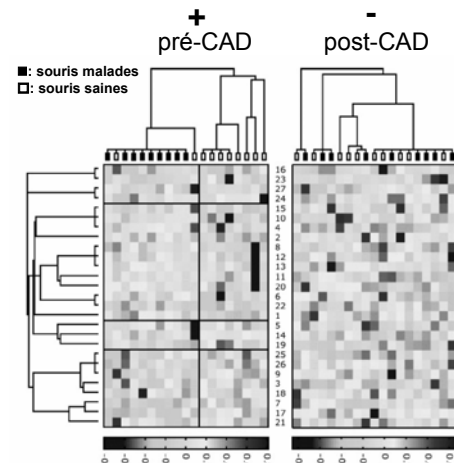
Bioinformatique & biostatistique

- Data normalisées analysées par clustering
- Test Wilcoxon (somme des rangs) pour chaque antigène pour déterminer s'il peut discriminer les souris Saines ou Malades
- Aucun antigène ne permet cette discrimination
- Sélection des 10% d'antigènes (27) ayant la plus faible *p-value* au test de rang de Wilcoxon
- Test de discrimination collective par clustering à 2 voies
- Les clusters d'échantillons sont évalués pour leur stabilité, spécificité (%M/cluster M) et sensibilité (%M/S cluster vs. Total M)
- Test de randomisation pour vérifier la signification des clusters identifiés

IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14621. 20

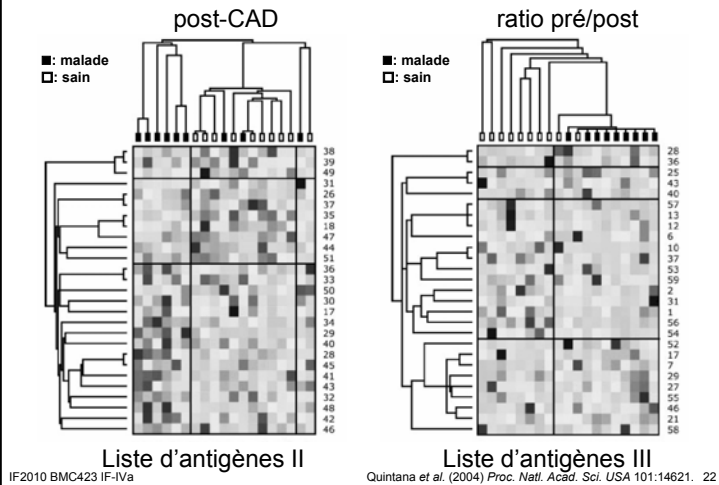
Résultats pour la liste d'antigènes I



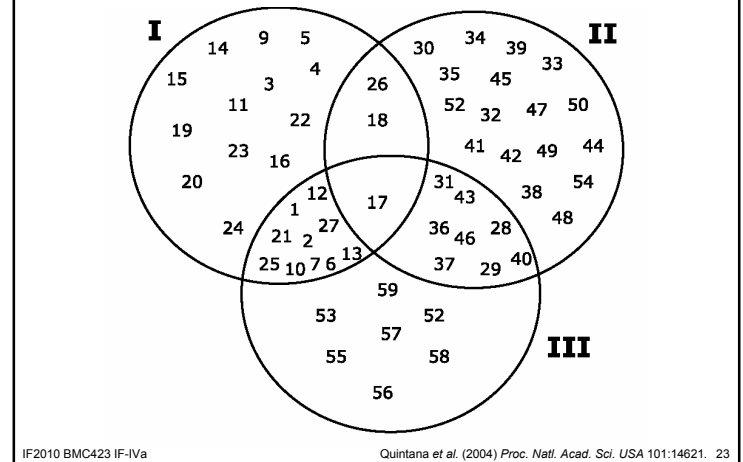
IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14621. 21

Résultats pour les listes d'antigènes II & III



Intersection des listes d'antigènes I, II & III



Conclusions

- Les patterns de réactivités IgG pré-CAD chez les souris mâles NOD permettent de déterminer la sensibilité/résistance à l'induction CAD postérieure (100% sensibilité; 80% spécificité)
- Les antigènes discriminants pré-CAD et post-CAD sont différentes (pronostic vs. diagnostic)
- Les anticorps IgG ne sont pas des agents inducteurs mais des marqueurs représentant les cellules T autoimmunes
- Sélection stochastique de la diversité du répertoire → des souris génétiquement identiques développent un CAD ou non (~50/50)

IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:14621. 24

Conclusions

- Perspective en médecine préventive
→ immunomique fonctionnelle:
L'état fonctionnel du système immunitaire est inscrit dans ses patterns de molécules et cellules immunitaires
- Signification biologique du répertoire autoimmun:
→ Liste des antigènes discriminants ne contient pas l'insuline
→ La mesure des auto-Ac contre quelques antigènes (relevance?) n'apporte pas la même information qu'un pattern global
→ Relevance fonctionnelle: 3 antigènes associés aux souris saines (p277, peptide 22 de HSP60 & peptide 1 de GroEl); vaccination avec HSP60/p277 protège contre le diabète

IF2010 BMC423 IF-IVa

Quintana et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:14621. 25

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

1. Modèle de la différenciation T
2. Analyse immunomique anticorps
3. **Signature transcriptionnelle "Mémoire"**
4. Modules transcriptionnels
5. Analyse de répertoire

Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IVa

26

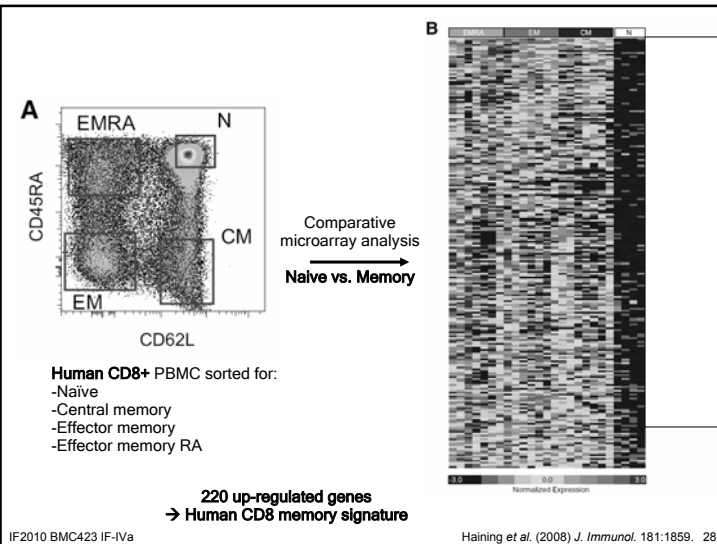
Haining, W. N., *et al.*

J. Immunol. 181, 1859-1868, 2008.

"Identification of an evolutionarily conserved transcriptional signature of CD8 memory differentiation that is shared by T and B cells"

IF2010 BMC423 IF-IVa

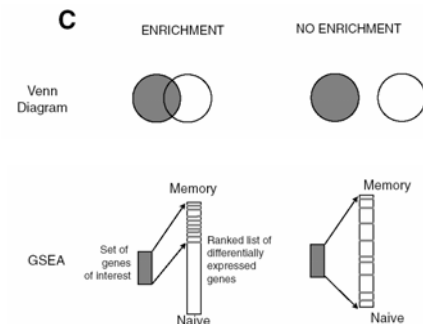
27



Question → Signature specificity?

- vs. mouse CD8 memory T cells
- vs. CD4 memory T cells
- vs. memory B cells

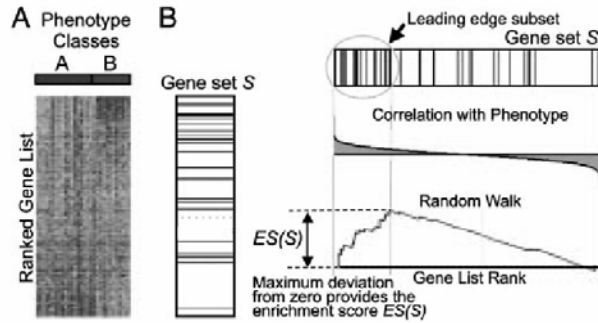
Method → Gene-Set Enrichment Analysis (GSEA)



IF2010 BMC423 IF-IVa

Haining *et al.* (2008) *J. Immunol.* 181:1859. 29

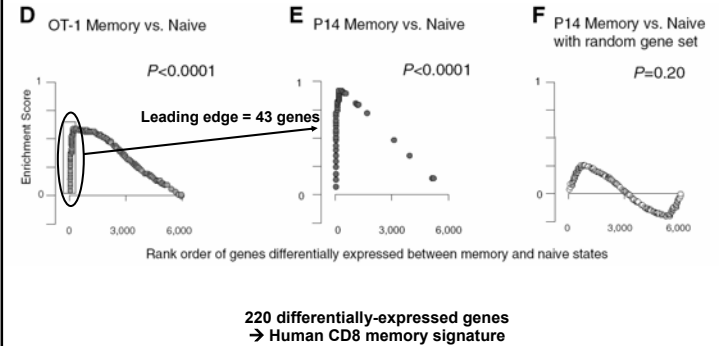
GSEA enrichment score calculation



IF2010 BMC423 IF-IVa

from Subramanian et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15545. 30

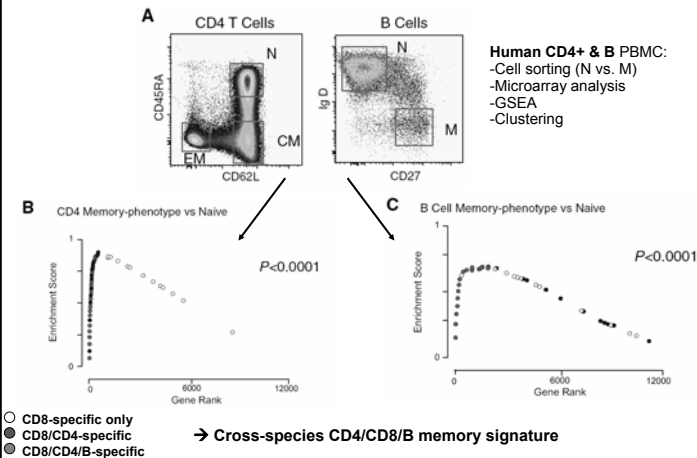
Definition of a CD8 memory signature conserved in mouse and human



IF2010 BMC423 IF-IVa

Haining et al. (2008) *J. Immunol.* 181:1859. 31

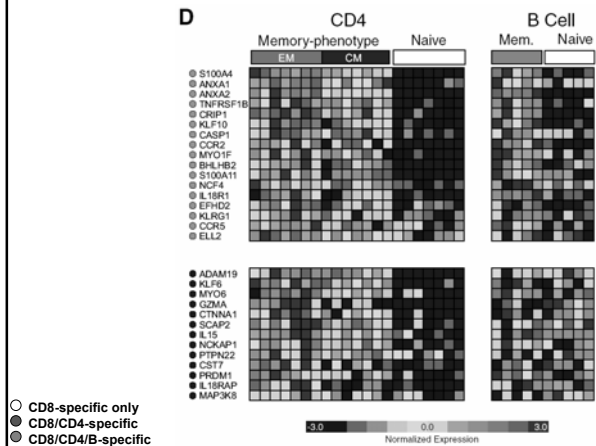
The “CD8 memory signature” is conserved in memory CD4 and B



IF2010 BMC423 IF-IVa

Haining et al. (2008) *J. Immunol.* 181:1859. 32

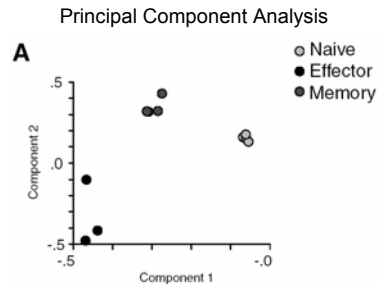
The “CD8 memory signature” is conserved in memory CD4 and B



IF2010 BMC423 IF-IVa

Haining et al. (2008) *J. Immunol.* 181:1859. 33

The “CD8 memory signature” separates Memory vs. Effector cells



IF2010 BMC423 IF-IVa

Haining et al. (2008) J. Immunol. 181:1859. 34

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

1. Modèle de la différenciation T
2. Analyse immunomique anticorps
3. Signature transcriptionnelle "Mémoire"
- 4. Modules transcriptionnels**
5. Analyse de répertoire

Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IVa

35

Chaussabel, D., et al.
Immunity 29, 150-164, 2008.

“A modular analysis framework for blood genomics studies: application to Systemic Lupus Erythematosus”

IF2010 BMC423 IF-IVa

36

Contexte

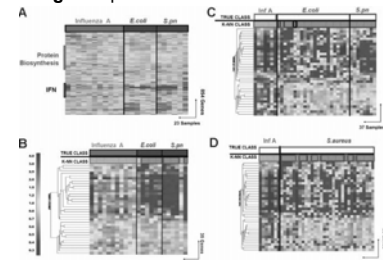
Ramilo, O. et al. (2007). *Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections*. Blood 109, 2066–2077

Analyse d'expression (*Affymetrix*) de 23 échantillons PBMC:

- 11 patients atteints du virus Influenza A
- 12 patients infectés par une bactérie (*E. coli* ou *S. pneumoniae*)

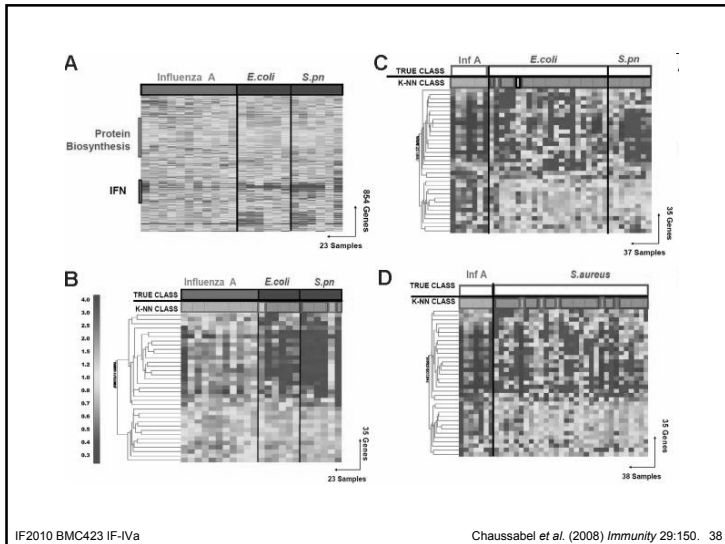
Objectif: Identifier une **signature transcriptionnelle** caractéristique de chacune des infections afin de pouvoir les discriminer.

→ Identification de **35 gènes** permettant une forte discrimination des 2 populations.



IF2010 BMC423 IF-IVa

! al. (2008) *Immunity* 29:150. 37



Rationnel

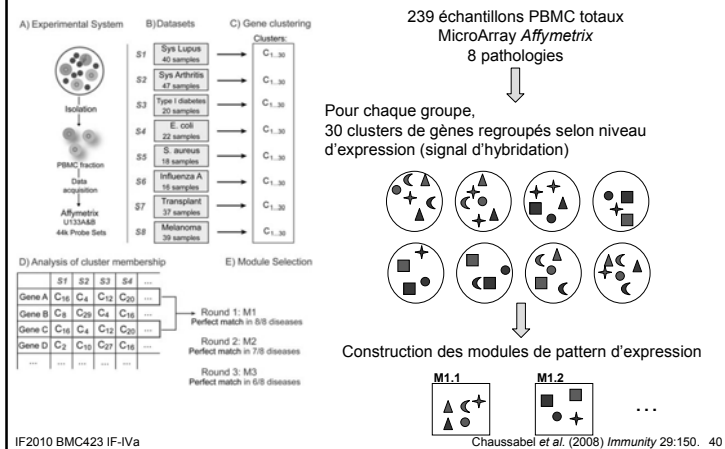
- Analyse globale de transcriptome de PBMC humains
- Recherche de signatures caractéristiques d'états physiopathologiques
- Approche système définissant des modules d'expression capable de discriminer des situations physiopathologiques

- Description de la démarche
- Identification des modules
- Validation de l'approche

IF2010 BMC423 IF-IVa

Caussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 39

Démarche de construction des modules



Obtention de 28 modules

Module ID	Number of Probe Sets	Keyword Selection	Interpretation
M1.1	76	Ig Immunoglobulin, Bone, Marrow, PreB, IgM, IgA	Plasma cells. Includes genes coding for immunoglobulin chains (e.g., IGHM, IGHJ, IGHK, IGHG) and the plasma cell marker CD38.
M1.2	130	Platelet, Adhesion, Aggregation, Endothelial, Vascular	Platelets. Includes genes coding for platelet glycoproteins (ITGA2B, ITGB3, GPIIb/IIIa, GPIIb/IIIa) and platelet-derived immune modulators (such as PPF1B (pro-platelet basic protein) and PPF4 (platelet factor 4)).
M1.3	80	Immunoreceptor, BCR, B cell, IgG	B cells. Includes genes coding for B cell surface markers (CD72, CD19A, CD19B, CD22) and other B cell-associated molecules: early B cell factor (EBF1), B cell linker (SLF), and B lymphoid tyrosine kinase (BLK).
M1.4	132	Replication, Repressor, CREB, Lymphoid, TNF-alpha, TNF-alpha	Undetermined. This set includes genes encoding regulators and targets of the cAMP signaling pathway (JUNB, ATF4, CREM, PDE4, MIA2, VIL2) and repressors of TNF-alpha mediated NF-kB activation (IIL2, ADA, TNFAIP3).
M1.5	142	Macrophage, Dendritic, MHC, Costimulatory, TLR4, MHC	Myeloid lineage. Includes genes encoding molecules expressed by cells of the myeloid lineage (CD86, CD183, FCGR2A), some of which are involved in pathogen recognition (CD14, TLR2, MD2, MD4). The set also includes TNF family members (TNFR2, BAFF).
M1.6	141	Zinc Finger, P53, IKK	Undetermined. This set includes genes coding for signaling molecules, e.g., the zinc finger-containing inhibitor of activated STAT (PIAS1 and PIAS2) or the nuclear factor of activated T cells, NFATC3.
M1.7	129	Ribosome, Translational, 40S, 60S, HLA	MHC/Ribosomal proteins. Almost exclusively formed by genes encoding MHC class I molecules (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-I, HLA-J, HLA-K, HLA-L, HLA-M, HLA-N, HLA-O, HLA-P, HLA-Q, HLA-R, HLA-S, HLA-T, HLA-U, HLA-V, HLA-W, HLA-X, HLA-Y, HLA-Z) and factors involved in DNA replication (PURA, TERF2, ERCC1).
M1.8	154	Metabolism, Biosynthesis, Replication, Helicase	Undetermined. Includes genes encoding metabolic enzymes (GLS, NQF1, NAT1) and factors involved in DNA replication (PURA, TERF2, ERCC1).

Les modules construits forment des unités transcriptionnelles et fonctionnelles cohérentes.

IF2010 BMC423 IF-IVa

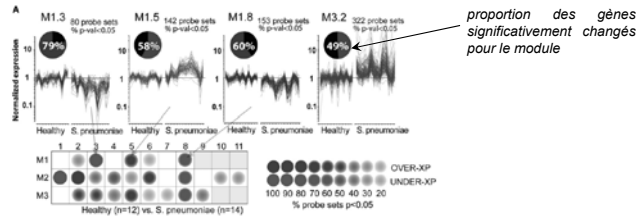
Caussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 41

Comportement des modules

Analyse des profils transcriptionnels des leucocytes sanguins de patients infectés par *S.pneumoniae* (N=28)

Comparaison entre niveaux d'expression génique des patients et celui de volontaires sains ($p < 0.05$, test U de Mann-Whitney).

Les graphes représentent les profils d'expression des gènes significativement changés. Une ligne correspond à un transcrit à travers les multiples conditions.

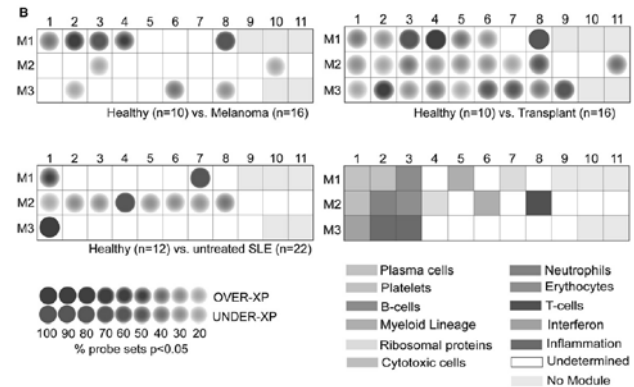


Les modules sont représentés sous forme de grille. L'intensité des spots indiquent la proportion des gènes significativement changés.

IF2010 BMC423 IF-IVa

Chaussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 42

Profils transcriptionnels de PBL



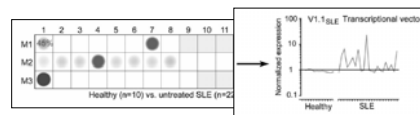
IF2010 BMC423 IF-IVa

Chaussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 43

Identification de biomarqueurs

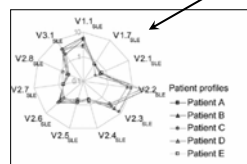
Stratégie de sélection de biomarqueurs basée sur les modules

Sélection des modules présentant au moins 15% gènes différemment exprimés entre les patients SLE et les patients sains => 11 modules (628 gènes)



Pour chaque patient,
Pour chaque module,
Calcule de la moyenne arithmétique des valeurs d'expression des gènes significativement sous- ou surexprimés.
=> « Vecteur transcriptionnel »

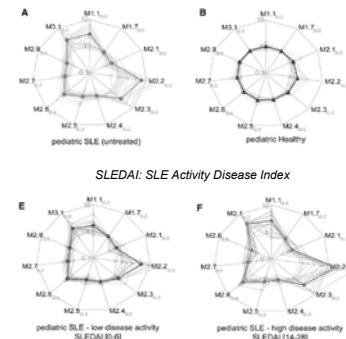
Le « spider » graphe connecte tous les vecteurs obtenus pour chacun des modules.



IF2010 BMC423 IF-IVa

Chaussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 44

Biomarqueur transcriptionnel « SLE »

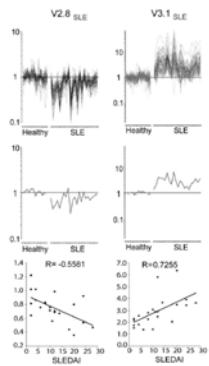


Les vecteurs de transcription identifiés chez les patients SLE semblent être associés à la sévérité de la maladie et avoir un potentiel comme biomarqueurs.

IF2010 BMC423 IF-IVa

Chaussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 45

Corrélation de Spearman entre les vecteurs transcriptionnels et l'index d'activité de la maladie (SLEDAI)



12 volontaires sains et
22 patients SLE pédiatriques non traités.

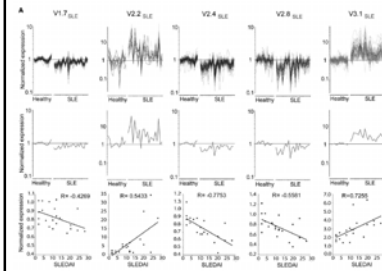
Exemple:
Le module V3.1 (« interféron-inducible ») est corrélé positivement avec l'activité de la maladie
V2.8 (« T-cells ») est corrélé négativement

Validation de ces différences d'expression par RT-PCR

IF2010 BMC423 IF-IVa

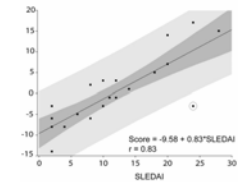
Chaussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 46

Corrélation de Spearman entre les vecteurs transcriptionnels et l'index d'activité de la maladie (SLEDAI)



5 vecteurs significativement
corrélés avec SLEDAI

Construction d'un score de rang
combiné à travers les valeurs
d'expression pour chaque vecteur.



IF2010 BMC423 IF-IVa

Chaussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 47

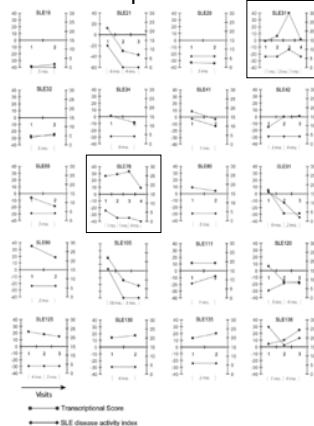
Utilisation des Scores Transcriptionnels Multivariés pour suivre la progression de la maladie chez des patients SLE.

20 patients pédiatriques SLE
- 2 à 4 points de contrôle par patient
- 1 à 18 mois entre chaque point

Progression parallèle U-score et SLEDAI
→ Définition d'un modèle statistiquement stable associant ces indices

Sauf 6 patients (U-score >> SLEDAI)
- SLE31: détérioration puis rémission
→ U-score détecte la détérioration 2 mois avant SLEDAI

- SLE78: sévère hypertension pulmonaire
→ Critère non pris en compte par SLEDAI
→ U-score plus sensible ?



IF2010 BMC423 IF-IVa

Chaussabel et al. (2008) *Immunity* 29:150. 49

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

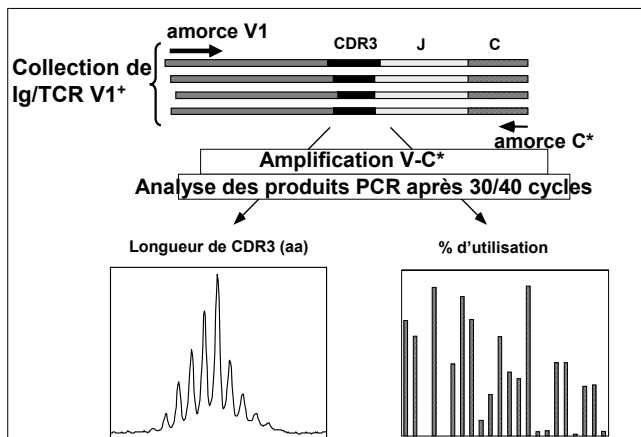
1. Modèle de la différenciation T
2. Analyse immunomique anticorps
3. Signature transcriptionnelle "Mémoire"
4. Modules transcriptionnels
5. Analyse de répertoire

Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IVa

52

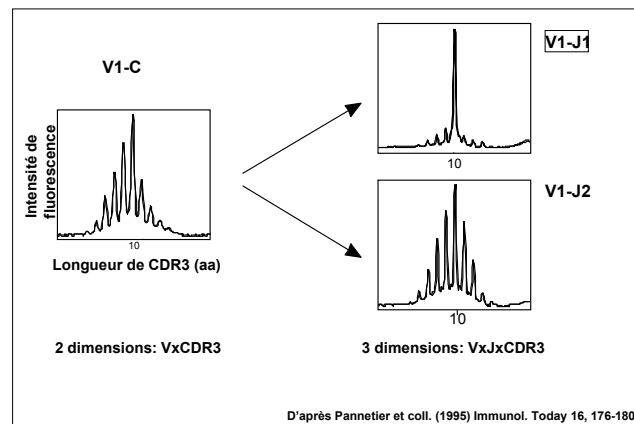
La technique Immunoscope (1)



IF2010

53

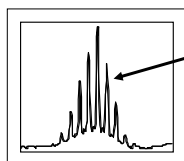
La technique Immunoscope (2)



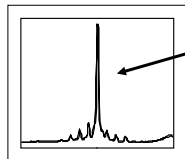
IF2010 BMC423 IF-IVa

54

La technique Immunoscope (3)



Courbe en cloche régulière:
indicatif d'une
population polyclonale

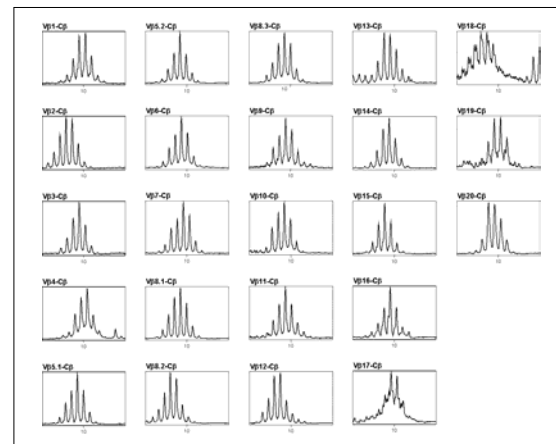


Pic proéminent:
indicatif d'une *population oligoclonale ou clonale*
→ *expansion clonale*

IF2010 BMC423 IF-IVa

55

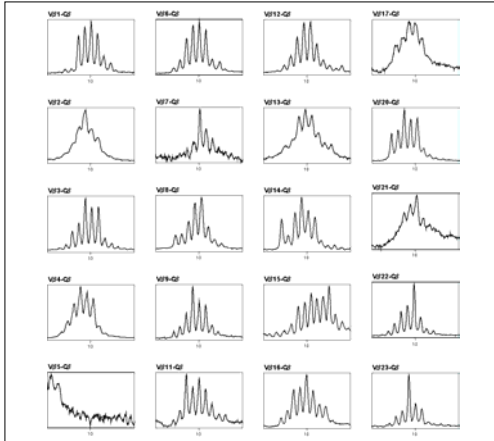
Répertoire TCRβ naïf de la souris



IF2010 BMC423 IF-IVa

56

Répertoire TCR β chez l'homme sain

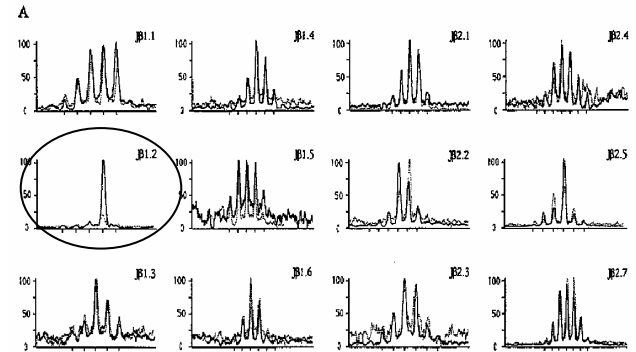


IF2010 BMC423 IF-IVa

57

Suivi d'une réponse *ex vivo*

Suivi de la réponse canonique contre le cytochrome C de pigeon chez la souris B10.A → TCR β V β 3-J β 1.2



IF2010 BMC423 IF-IVa

Cochet, M. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2639. 58

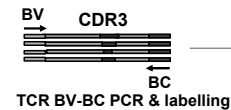
Experimental cerebral malaria

- Malaria
 - Complex disease : interactions pathogen/host/vector
 - Different forms of disease & complication
 - >1 million death linked to *P. falciparum* infection
 - Cerebral malaria (CM)
 - 30% of mortality associated to *P. falciparum* infection
 - Implication of pathogen T lymphocytes
 - Experimental model of cerebral malaria
 - Infection of B10.D2 or C57BL/6 mice with *P. berghei* ANKA
 - Development (CM+) or not (CM-) of cerebral malaria
- Global analysis of TCR β repertoire diversity
- Immunoscope technique
 - ISEapeaks strategy

IF2010 BMC423 IF-IVa

59

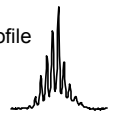
Strategy for repertoire analysis



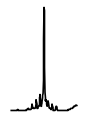
Separation on
automated sequencer

**Immunoscope
Data Extraction**

"Gaussian" profile
→ **polyclonal**



Irregular profile
→ **oligoclonal**

Pannellier et coll., 1995 *Trends Immunol.* 60

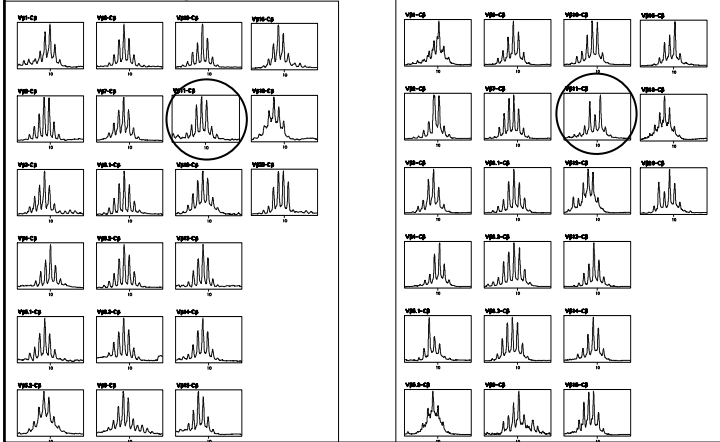
IF2010 BMC423 IF-IVa

60

Repertoire & immunological signature

Immunoscope TCR β

Control spleen

Plasmodium-infected spleen

Strategy for repertoire analysis

BV CDR3
BC
TCR BV-BC PCR & labelling

Separation on
automated sequencer

Immunoscope
Data Extraction

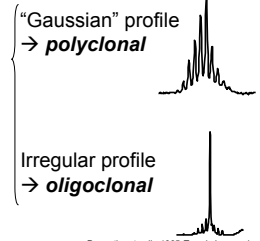
ISEApeaks Strategy

Peak database

Estimation of perturbation

- Global perturbation index
- Recurrent oligoclonality index

Statistical analysis & classification

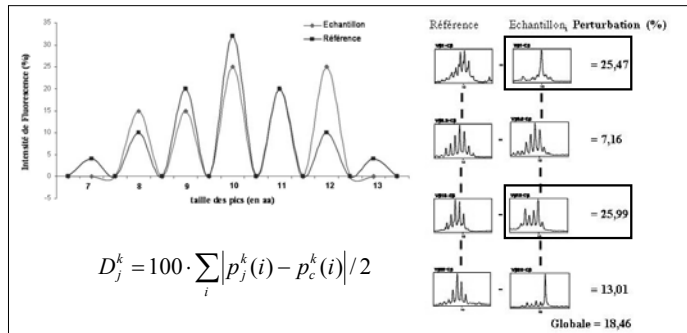


IF2010 BMC423 IF-IVa

Pannellier et coll., 1995 Trends Immunol. 62

Repertoire diversity index

- Global perturbation : "Gorochov" index



Gorochov et coll., 1998 Nat. Med. 63

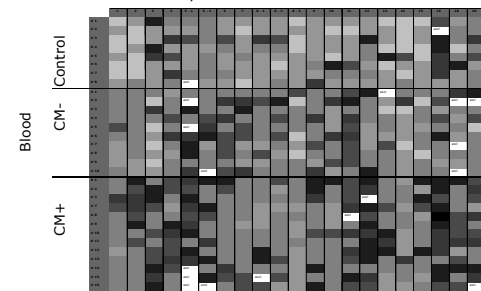
IF2010 BMC423 IF-IVa

Repertoire & Immunological signature

→ ISEApeaks strategy for global TCR β perturbation analysis.



Vβ Perturbation index



Cerebral malaria model: B10.D2 mice infected with *P. berghei* ANKA

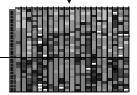
IF2010 BMC423 IF-IVa

65

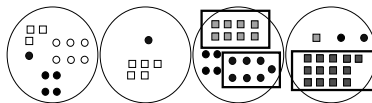
Repertoire & Immunological signature



→ **ISEApeaks** strategy for global TCR β perturbation analysis.



Classification of V β perturbation



□ CTR Blood ■ CM- Blood ■ CM+ Blood
○ CTR Spleen ● CM- Spleen ● CM+ Spleen

Collette et al. (2004) *J.Immunol.*

- Association of perturbation with cerebral malaria
- Diagnostic value of TCR β diversity data
- Repertoire diversity perturbations are informative of the immunophysiopathological status

IF2010 BMC423 IF-IVa

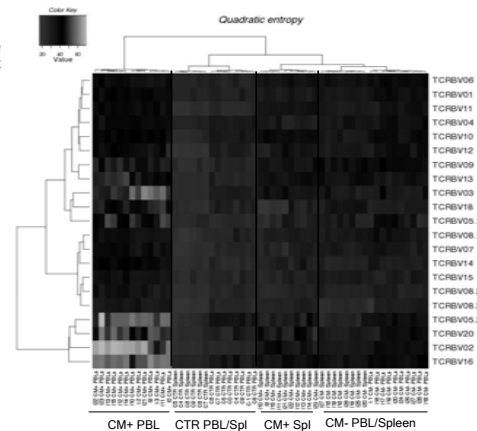
66

Hierarchical classification for diversity repertoire data from Cerebral Malaria model

- Relative abundance indices, like Shannon index, are the most widespread indices.
- But these indices do not take into account the difference between categories.
- Quadratic entropy measures the differences expected between two entities randomly drawn from the set.

$$H_D(P) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n p_i p_j d_{ij}$$

$$H_D(P) = P' D P$$



IF2010 BMC423 IF-IVa

67

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

1. Modèle de la différenciation T
2. Analyse immunomique anticorps
3. Signature transcriptionnelle "Mémoire"
4. Modules transcriptionnels
5. Analyse de répertoire

Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IVa

79

Conclusion & Perspectives

- Virage de l'immunologie systémique amorcé
- Les approches systémique et réductionniste sont complémentaires
- Enjeux de la standardisation et de l'intégration des données multi-paramétriques (« omics »)
- Technologies applicables à l'homme, mais...
... pb polymorphisme & accès échantillons
- Nécessite synergie multidisciplinaire entre biologistes, statisticiens, informaticiens, mathématiciens, ingénieurs...

IF2010 BMC423 IF-IVa

80