Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Adrien Six (adrien.six@upmc.fr) IF-IVa
Université Pierre et Marie Curie février 2011

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

- Modèle de la différenciation T
- Analyse immunomique anticorps
- Signature transcriptionnelle "Mémoire"
- Modules transcriptionnels
- Analyse de répertoire

Conclusion

Biologie des systèmes ?

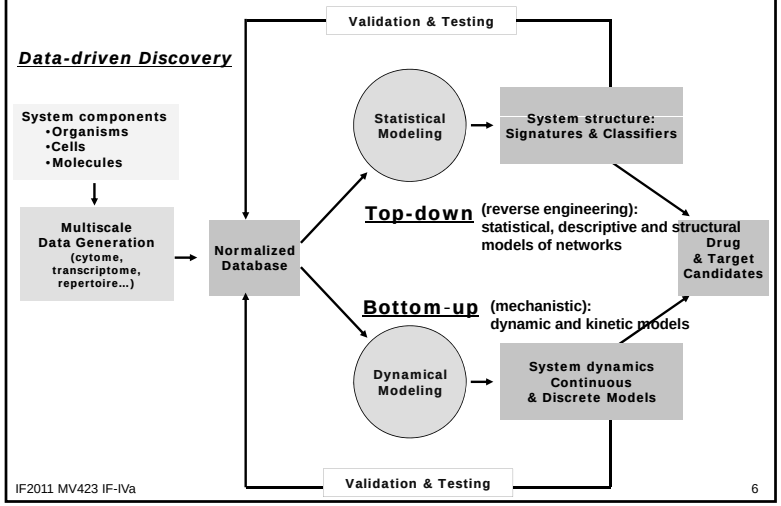
1. Discipline s'intéressant aux interactions quantitatives entre les éléments d'un système biologique.
2. Ensemble de méthodes multidisciplinaires impliquant un cycle itératif entre collection de données expérimentales et modélisation.
3. Approche intégrative alternative de l'approche réductionniste.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

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

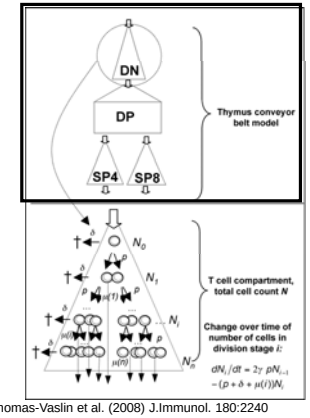
Introduction

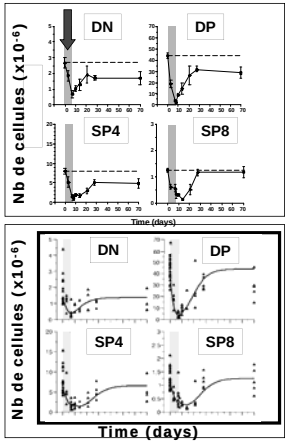
- **Modèle de la différenciation T**
- Analyse immunomique anticorps
- Signature transcriptionnelle "Mémoire"
- Modules transcriptionnels
- Analyse de répertoire

Conclusion

Modélisation de la différenciation T

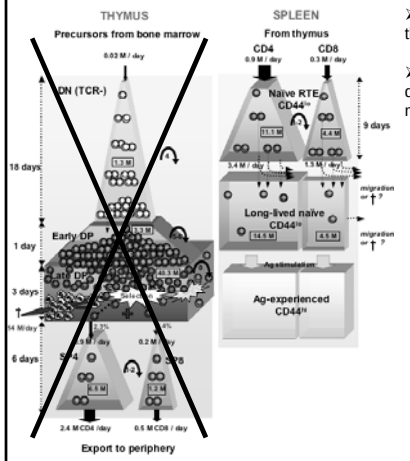
Données expérimentales obtenues après déplétion transitoire (7j) des cellules T en division



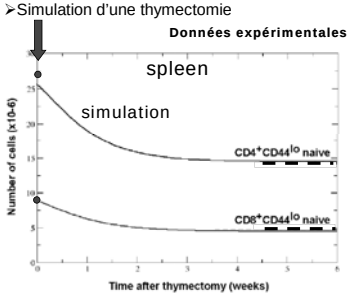


Thomas-Vaslin et al. (2008) J.Immunol. 180:2240

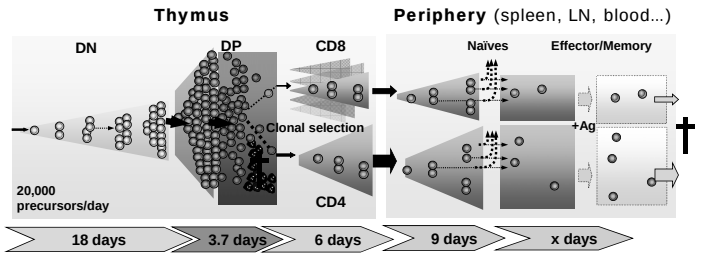
Modélisation de la différenciation T



- 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



Modèle de différenciation en tapis roulant



Ce modèle corrèle bien avec les données expérimentales

→ Application à d'autres fonds génétiques

→ Comportement au cours du vieillissement ?

→ Réponse à des perturbations (traitement, infections…)

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

- Modèle de la différenciation T
- **Analyse immunomique anticorps**
- Signature transcriptionnelle "Mémoire"
- Modules transcriptionnels
- Analyse de répertoire

Conclusion

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"

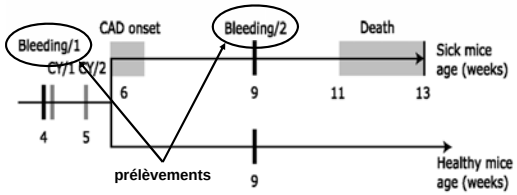
Objectifs de l'étude de Quintana *et al.*

- 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

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



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

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)

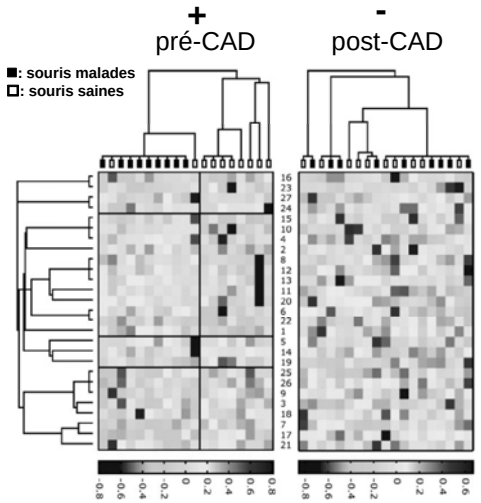
Bioinformatique & biostatistique

- Data normalisées analysées par clustering
- Test Wilcoxon (somme des rangs) pour chaque antigène pour déterminer s'il peut discriminer les souris Saines ou Malades

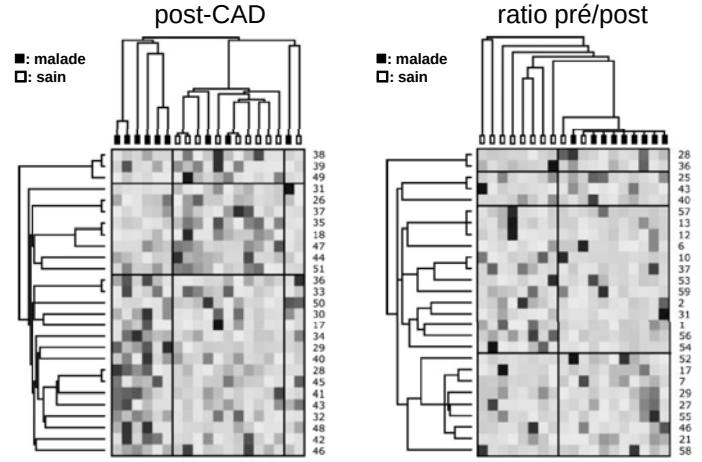
  →Aucun antigène ne permet cette discrimination

- 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

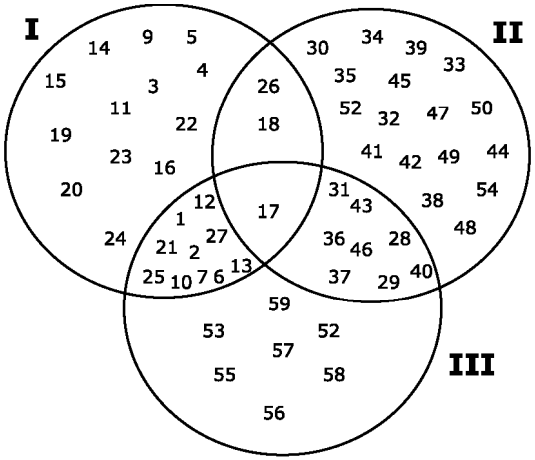
Résultats pour la liste d'antigènes I



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 représentants les cellules T autoimmunes
- Sélection stochastique de la diversité du répertoire → des souris génétiquement identiques développent un CAD ou non (~50/50)

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

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

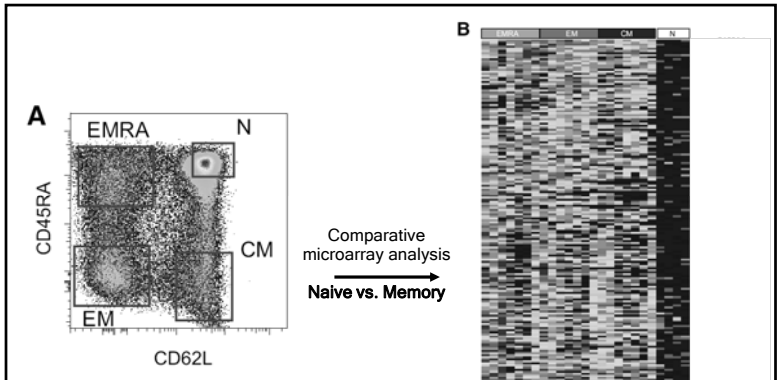
Introduction

- Modèle de la différenciation T
- Analyse immunomique anticorps
- **Signature transcriptionnelle "Mémoire"**
- Modules transcriptionnels
- Analyse de répertoire

Conclusion

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"

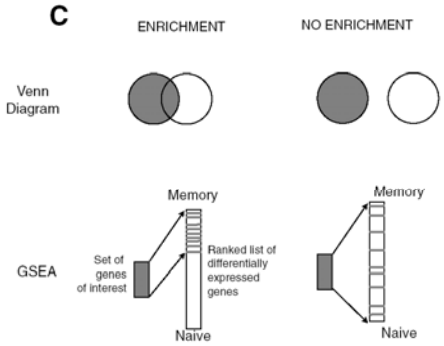


Human CD8+ PBMC sorted for:
-Naïve
-Central memory
-Effector memory
-Effector memory RA

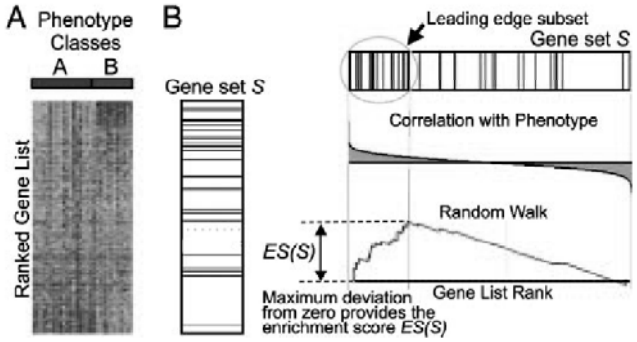
220 up-regulated genes
→ Human CD8 memory signature

Question → Signature specificity?
- vs. mouse CD8 memory T cells
- vs. CD4 memory T cells
- vs. memory B cells

Method → Gene-Set Enrichment Analysis (GSEA)

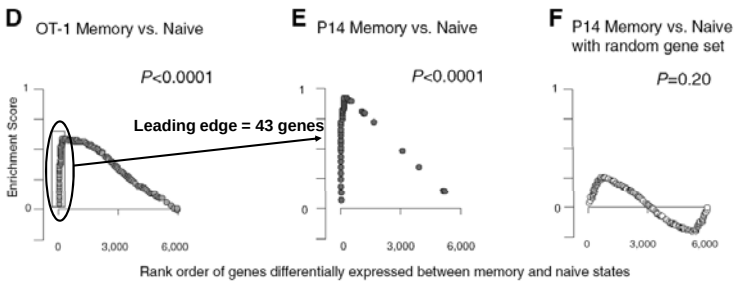


GSEA enrichment score calculation

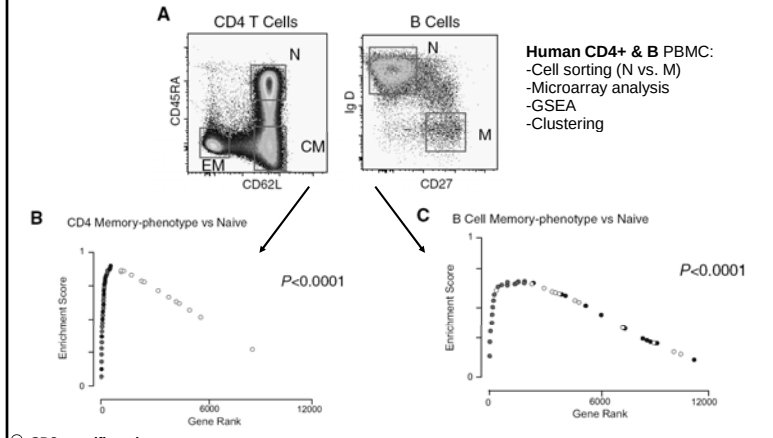


Definition of a CD8 memory signature conserved in mouse and human

→ Test the 220-gene human CD8 memory signature on mouse memory T cells



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

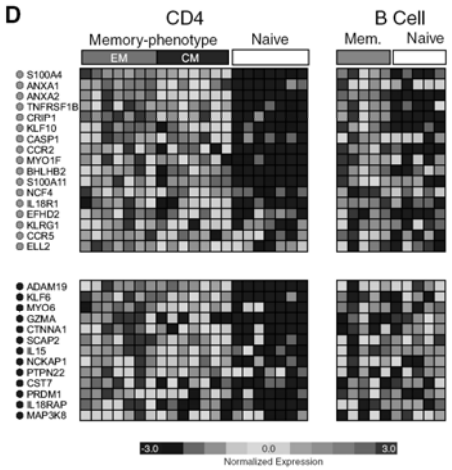


Human CD4+ & B PBMC:
-Cell sorting (N vs. M)
-Microarray analysis
-GSEA
-Clustering

○ **CD8-specific only**
● **CD8/CD4-specific**
● **CD8/CD4/B-specific**

→ **Cross-species CD4/CD8/B memory signature**

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



○ **CD8-specific only**
● **CD8/CD4-specific**
● **CD8/CD4/B-specific**

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

- Modèle de la différenciation T
- Analyse immunomique anticorps
- Signature transcriptionnelle "Mémoire"
- **Modules transcriptionnels**
- Analyse de répertoire

Conclusion

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

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

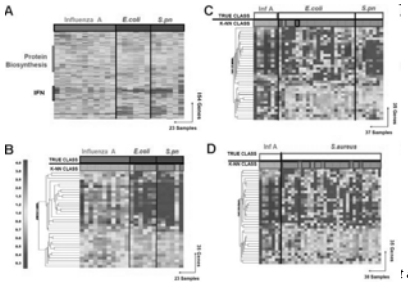
Contexte

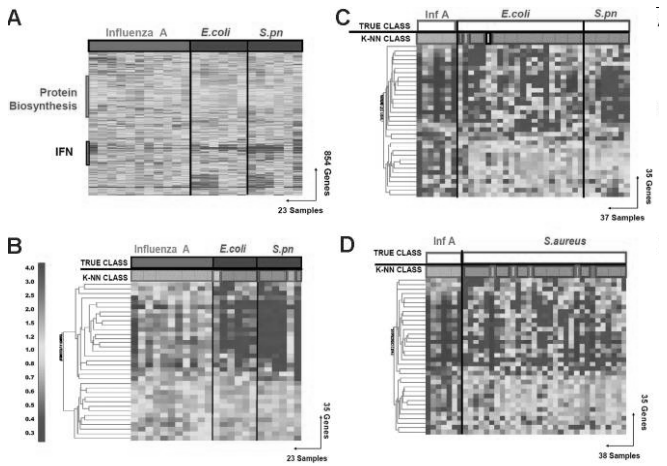
Ramilo, O. et al. (2007). *Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections*. Blood 109, 2066–2077

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.





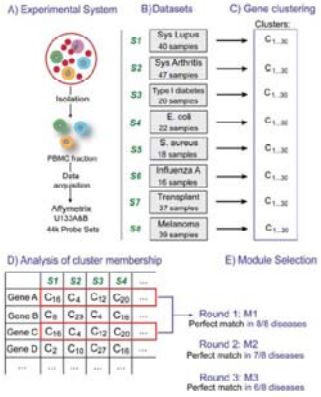
Rationnel

- 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

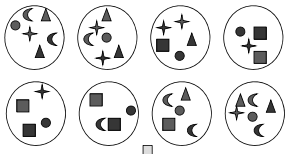
→ Description de la démarche
→ Identification des modules
→ Validation de l'approche

Démarche de construction des modules

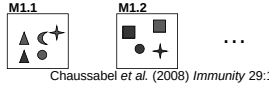


239 échantillons PBMC totaux
MicroArray *Affymetrix*
8 pathologies

Pour chaque groupe,
30 clusters de gènes regroupés selon niveau d'expression (signal d'hybridation)



Construction des modules de pattern d'expression



Obtention de 28 modules

Table 1. Functional Interpretation of Transcriptional Modules

Module I.D.	Number of Probe Sets	Keyword Selection	Interpretation
M 1.1	76	Ig, Immunoglobulin, Bone, Marrow, PreB, IgM,Mu,	Plasma cells. Includes genes coding for immunoglobulin chains (e.g., IGHM, IGJ, IGLL1, IGKC, IGHD) and the plasma cell marker CD38.
M 1.2	130	Platelet, Adhesion, Aggregation, Endothelial, Vascular	Platelets. Includes genes coding for platelet glycoproteins (ITGA2B, ITGB3, GP9, GP1A/B) and platelet-derived immune mediatores such as PPBP (pro-platelet basic protein) and PF4 (platelet factor 4).
M 1.3	80	Immunoreceptor, BCR, B cell, IgG	B cells. Includes genes coding for B cell surface markers (CD72, CD79A/B, CD19, CD22) and other B cell-associated molecules: early B cell factor (EBF), B cell linker (BLNK), and B lymphoid tyrosine kinase (BLK).
M 1.4	132	Replication, Repression, Repair, CREB, Lymphoid, TNF-alpha	Undetermined. This set includes genes encoding regulators and targets of the cAMP-signaling pathway (JUND, ATF4, CREM, PDE4, NR4A2, VIL2) and repressors of TNF-alpha mediated NF-KB activation (CYLD, ASK, TNFAIP3).
M 1.5	142	Monocytes, Dendritic, MHC, Costimulatory, TLR4, MYD88	Myeloid lineage. Includes genes encoding molecules expressed by cells of the myeloid lineage (CD86, CD163, FCGR2A), some of which are involved in pathogen recognition (CD14, TLR2, MYD88). This set also includes TNF-family member (TNFRS2, BAFF).
M 1.6	141	Zinc, Finger, P53, RAS	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.
M 1.7	129	Ribosome, Translational, 40S, 60S, HLA	MHC/Ribosomal proteins. Almost exclusively formed by genes encoding MHC class I molecules (HLA-A,B,C,G,E)+ Beta 2-microglobulin (B2M) or ribosomal proteins (RPLs, RPSs).
M 1.8	154	Metabolism, Biosynthesis, Replication, Helicase	Undetermined. Includes genes encoding metabolic enzymes (GLS, NSF1, NAT1) and factors involved in DNA replication (PURA, TERF2, EIF2S1).

...

Les modules construits forment des unités transcriptionnelles et fonctionnelles cohérentes.

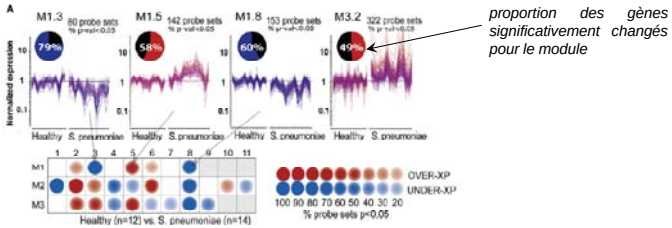
Comportement des modules

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.

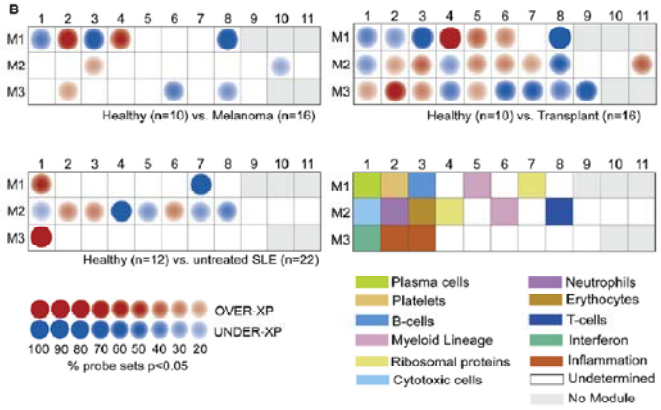
Une ligne correspond à un transcrit à travers les multiples conditions.



Les modules sont représentés sous forme de grille.

L'intensité des spots indiquent la proportion des gènes significativement changés.

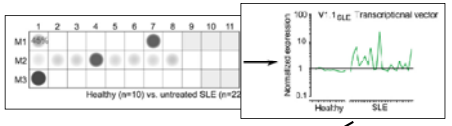
Profils transcriptionnels de PBL



Identification de biomarqueurs

Stratégie de sélection de biomarqueurs basée sur les modules

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

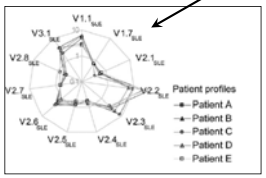


Pour chaque patient,

Pour chaque module,

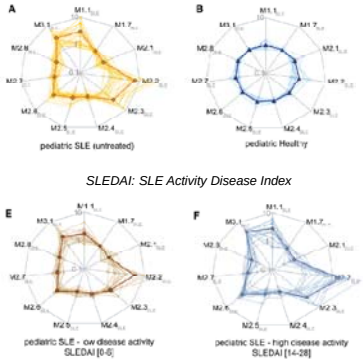
Calcule de la moyenne arithmétique des valeurs d'expression des gènes significativement sous- ou surexprimés.

⇒ « Vecteur transcriptionnel »



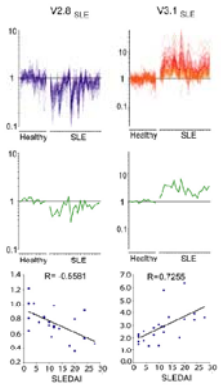
Le « spider » graphe connecte tous les vecteurs obtenus pour chacun des modules.

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.

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

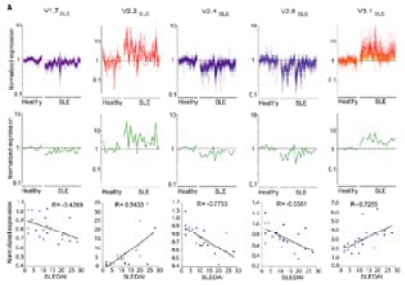


12 volontaires sains et
22 patients SLE pédiatriques non traités.

Exemple:
Le module V3.1 (« interferon-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

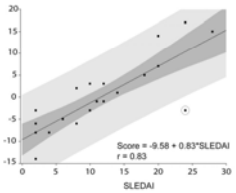
Corrélation de Spearman entre les vecteurs transcriptionnels et l'index d'activité de la maladie (SLEDAI)



5 vecteurs significativement corrélés avec SLEDAI

⇩

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



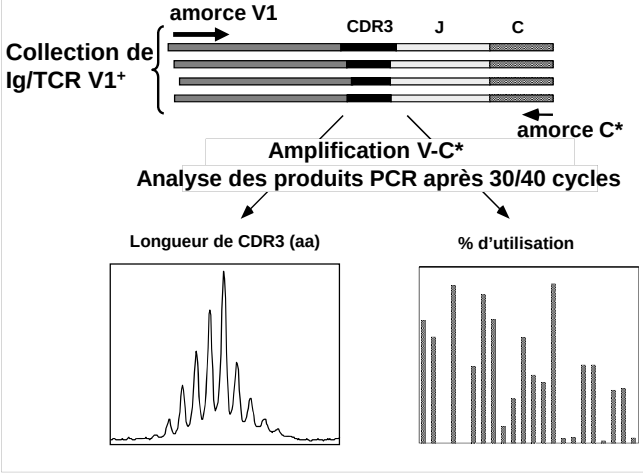
Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

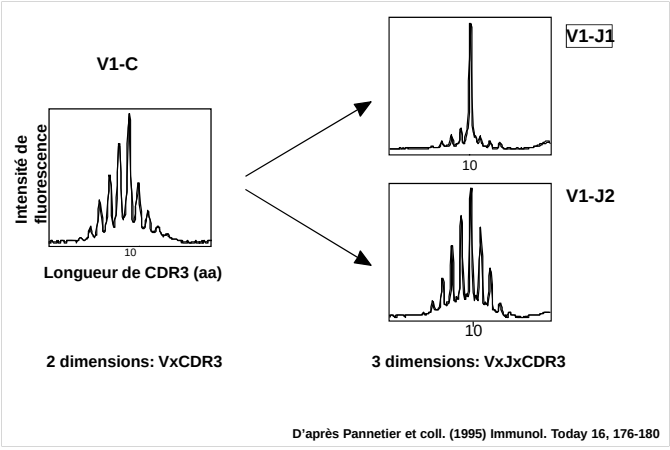
- Modèle de la différenciation T
- Analyse immunomique anticorps
- Signature transcriptionnelle "Mémoire"
- Modules transcriptionnels
- **Analyse de répertoire**

Conclusion

La technique Immunoscope (1)

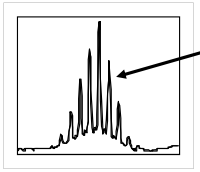


La technique Immunoscope (2)

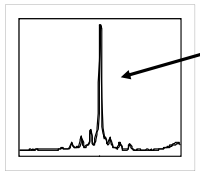


D'après Pannetier et coll. (1995) Immunol. Today 16, 176-180

La technique Immunoscope (3)



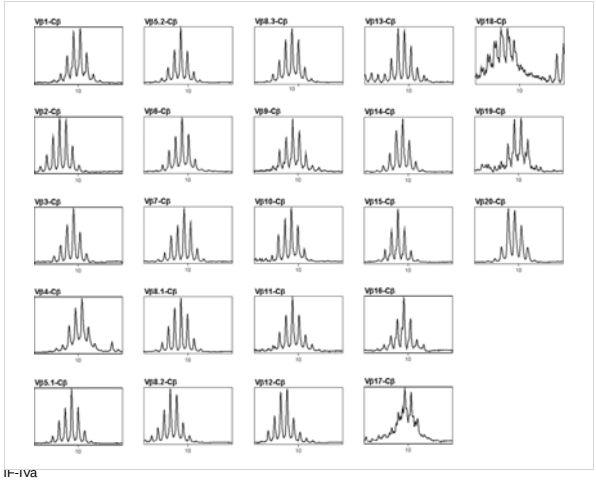
Courbe en cloche régulière: indicatif d'une *population polyclonale*



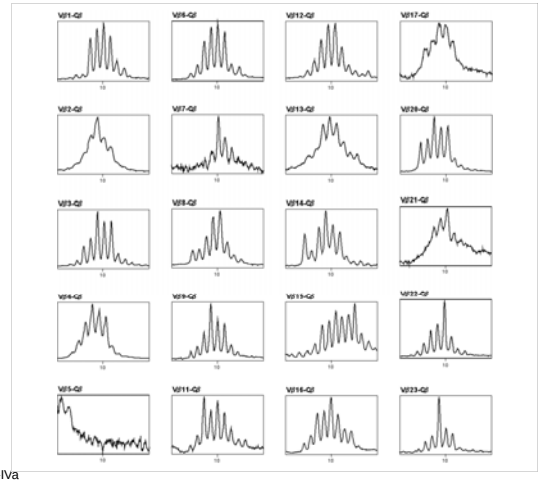
Pic proéminent: indicatif d'une *population oligoclonale* ou *clonale*

➔ *expansion clonale*

Répertoire TCRβ naïf de la souris

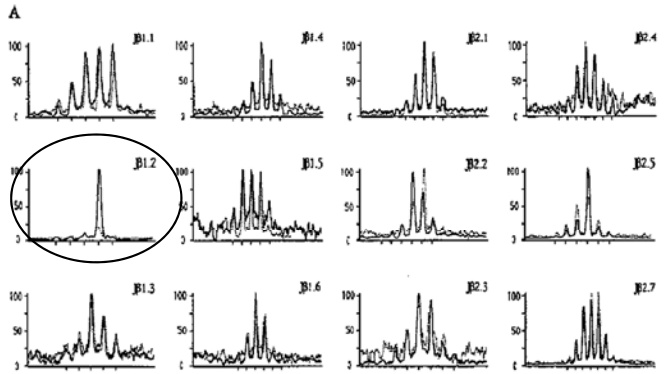


Répertoire TCRβ chez l'homme sain



Suivi d'une réponse *ex vivo*

Suivi de la réponse canonique contre le cytochrome C de pigeon chez la souris B10.A → TCRβ Vβ3-Jβ1.2



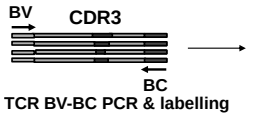
Cochet, M. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2639.

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 TCRβ repertoire diversity
  - Immunoscope technique
  - ISEApeaks strategy

Strategy for repertoire analysis

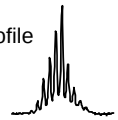


TCR BV-BC PCR & labelling

Separation on automated sequencer

Immunoscope
Data Extraction

"Gaussian" profile
→ ***polyclonal***



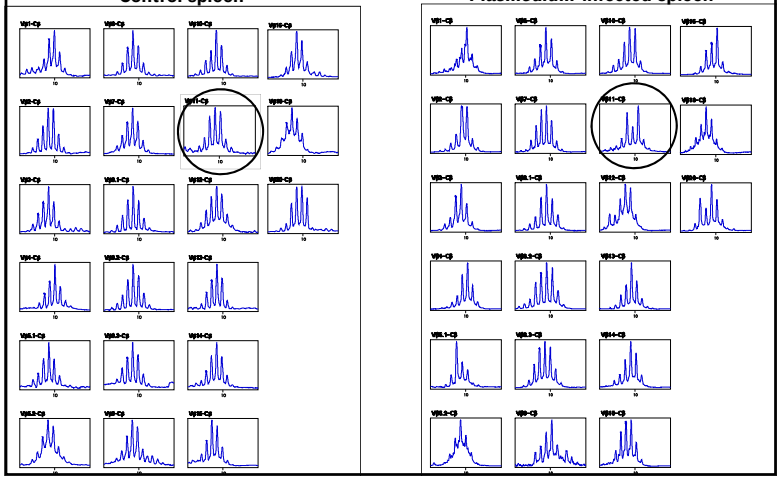
Irregular profile
→ ***oligoclonal***

Pannetier et coll., 1995 *Trends Immunol.*

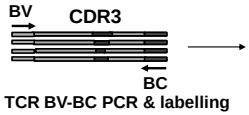
Repertoire & immunological signature

Immunoscope TCRβ

Control spleen | ***Plasmodium*-infected spleen**



Strategy for repertoire analysis



TCR BV-BC PCR & labelling

Separation on automated sequencer

Immunoscope Data Extraction

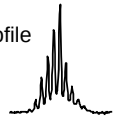
ISEApeaks Strategy

Peak database

Estimation of perturbation
- Global perturbation index
- Recurrent oligoclonality index

Statistical analysis & classification

"Gaussian" profile → ***polyclonal***

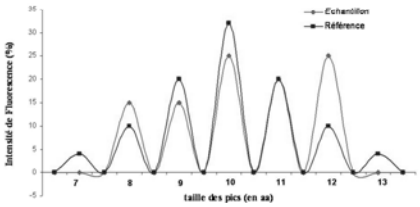


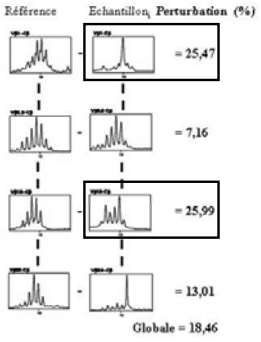
Irregular profile → ***oligoclonal***

Pannetier et coll., 1995 *Trends Immunol.*

Repertoire diversity index

- Global perturbation : "Gorochov" index





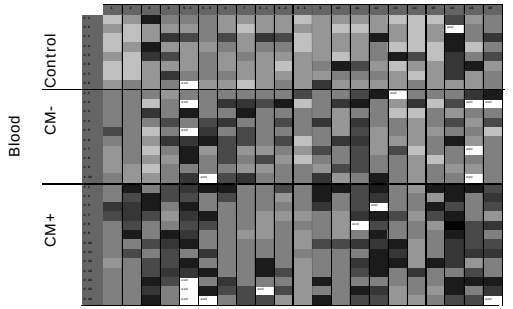
$$D_j^k = 100 \cdot \sum_i \left| p_j^k(i) - p_c^k(i) \right| / 2$$

Gorochov et coll., 1998 *Nat. Med.*

Repertoire & Immunological signature

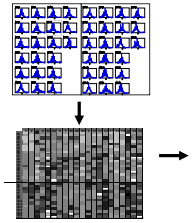
→ **ISEApeaks** strategy for global TCRβ perturbation analysis.

Vβ Perturbation index

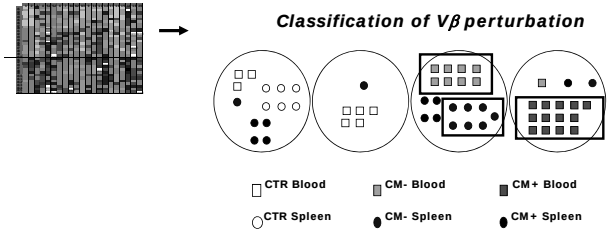


Cerebral malaria model: B10.D2 mice infected with *P. berghei* ANKA

Repertoire & Immunological signature



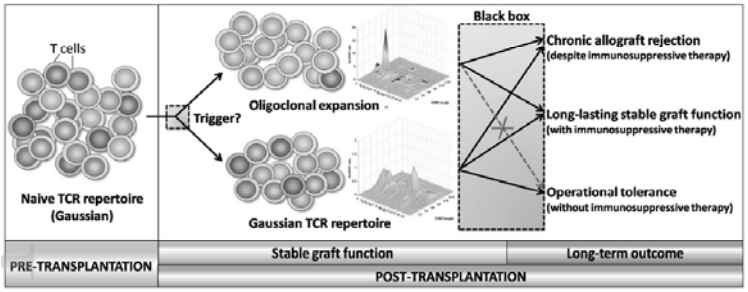
→ **ISEApeaks** strategy for global TCRβ perturbation analysis.



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

→ Association of perturbation with cerebral malaria
→ Diagnostic value of TCRβ diversity data
→ Repertoire diversity perturbations are informative of the immunophysiopathological status

Application au suivi de greffe



Naesens and Sarwal (2010) *Eur. J. Immunol., in press.*

Immunologie Intégrative & Biologie des Systèmes

Introduction

- Modèle de la différenciation T
- Analyse immunomique anticorps
- Signature transcriptionnelle "Mémoire"
- Modules transcriptionnels
- Analyse de répertoire

Conclusion

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…