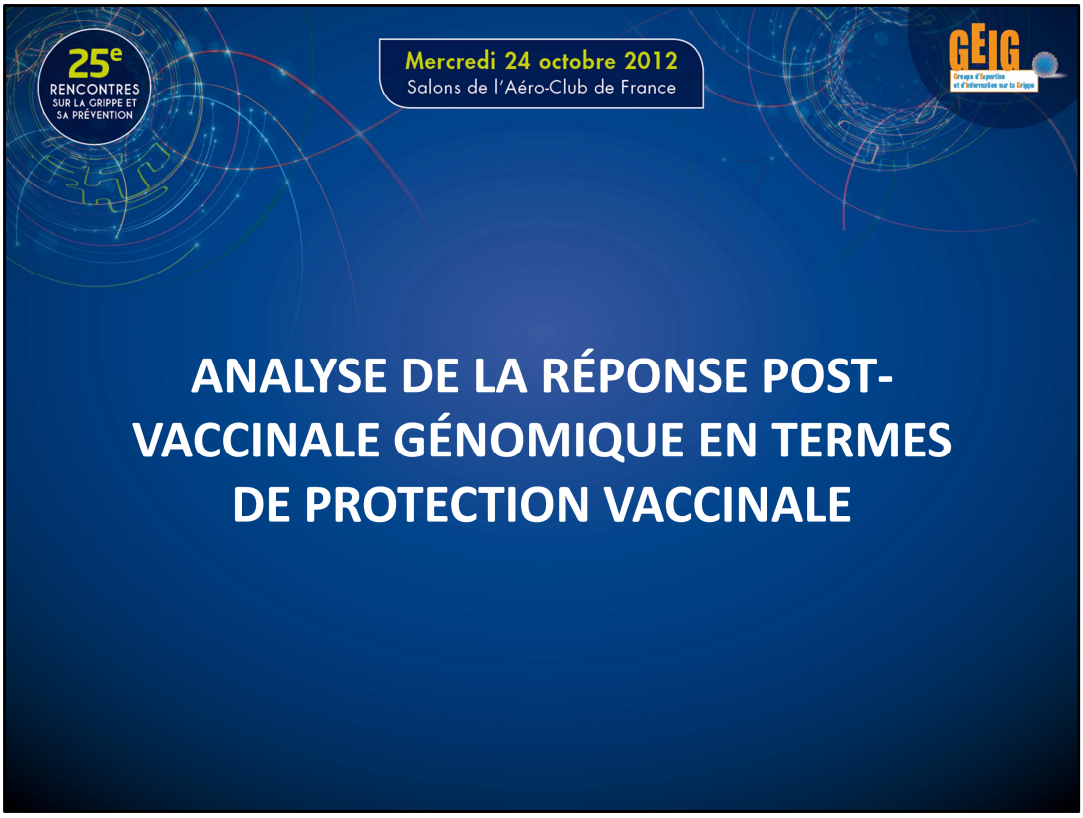
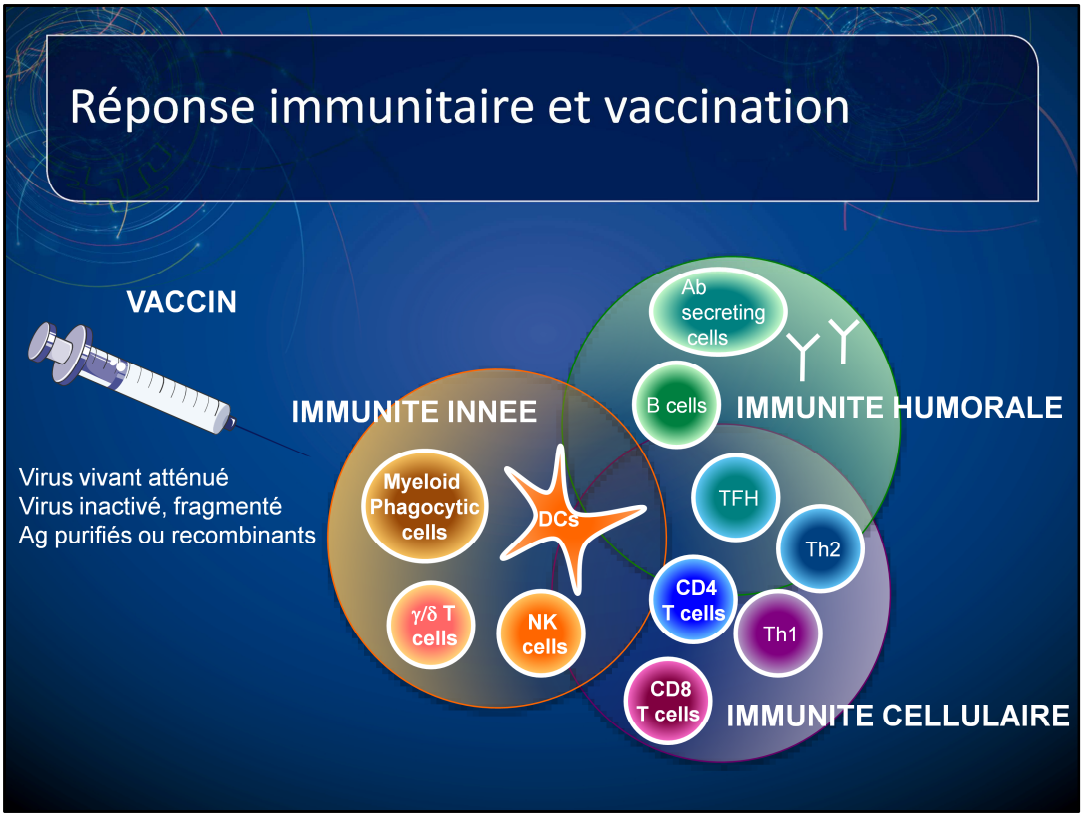
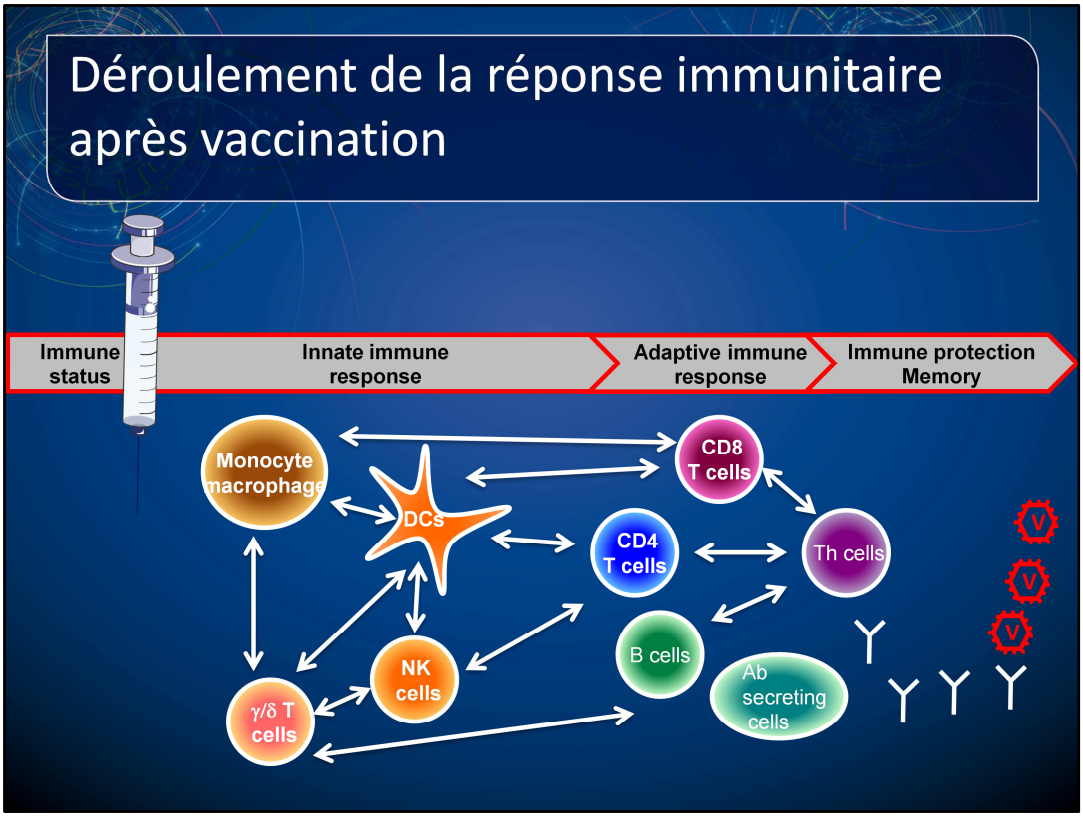
GEIG
Groupe d'Expertise
et d'Information sur la Grippe
Mercredi 24 octobre 2012
Salons de l'Aéro-Club de France
6, rue Galilée, 75116 Paris
25e
RENCONTRES
SUR LA GRIPPE ET
SA PRÉVENTION



Je vais présenter une nouvelle approche en immunologie, la biologie intégrative ou biologie des systèmes, appliquée à la vaccination antigrippale,
nous verrons plus particulièrement les études sur les profils d'expression génique associé à la protection vaccinale

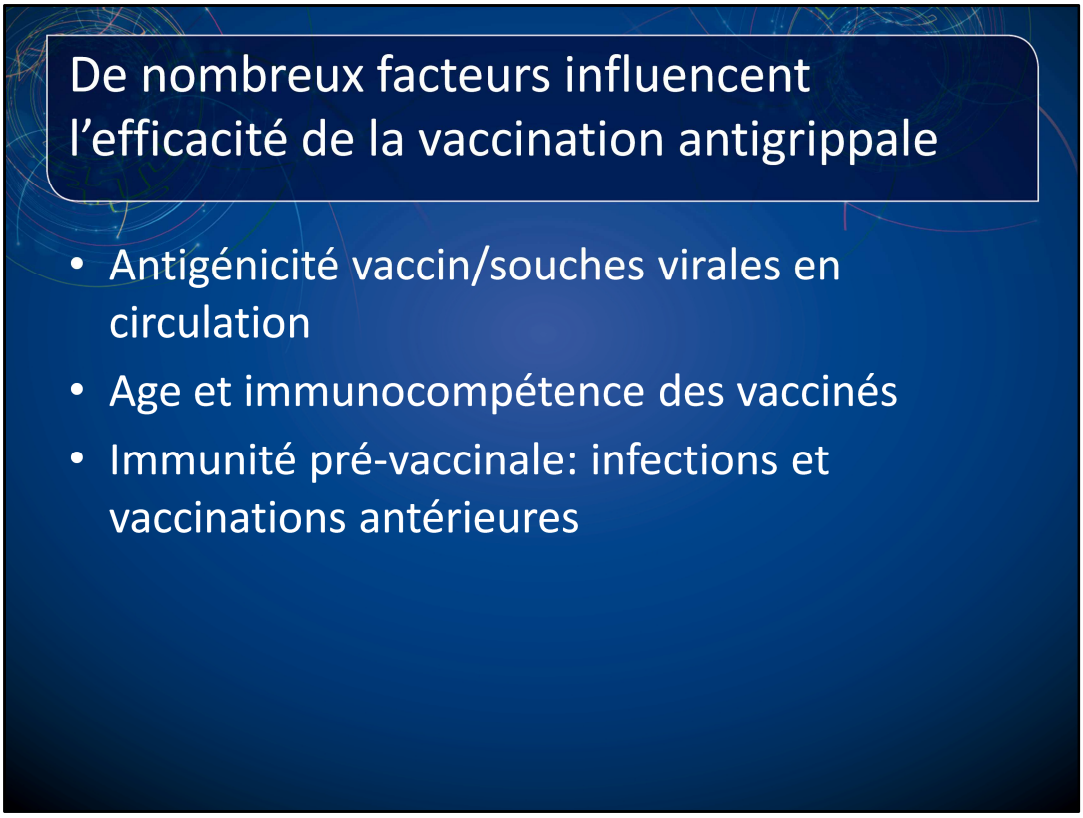


Une réponse efficace et protective suite à la vaccination implique la mise en place d'une réponse polyfonctionnelle dans laquelle interagissent de nombreux facteurs et cellules de l'immunité innée et adaptative, cellulaire et humorale.
L'utilisation de virus vivants atténués représentent Les vaccins les plus efficaces à ce jour,
capables d'activer de multiples armes de la réponse innée, une présentation Agq efficace, conduisant à une réponse lymphocytaire T et B capable de se maintenir à très long terme,
C'est le cas par exemple de la fièvre jaune contre laquelle on peut détecter des anticorps spécifiques plus de 30 ans après la vaccination.
mais, pour la plupart des virus, ce type de vaccin n'est pas utilisable
on utilise alors des formes virales inactivées, fragmentées ou encore des Ag recombinants,
l'activation de la réponse immunitaire est alors moins efficace, mm avec l'ajout d'adjuvants,
Et
Le développement de nouvelles stratégies de vaccination restent aujourd'hui encore freiné par notre manque de connaissance des mécanismes immunitaires et surtout de corrélats de protection bien défini.

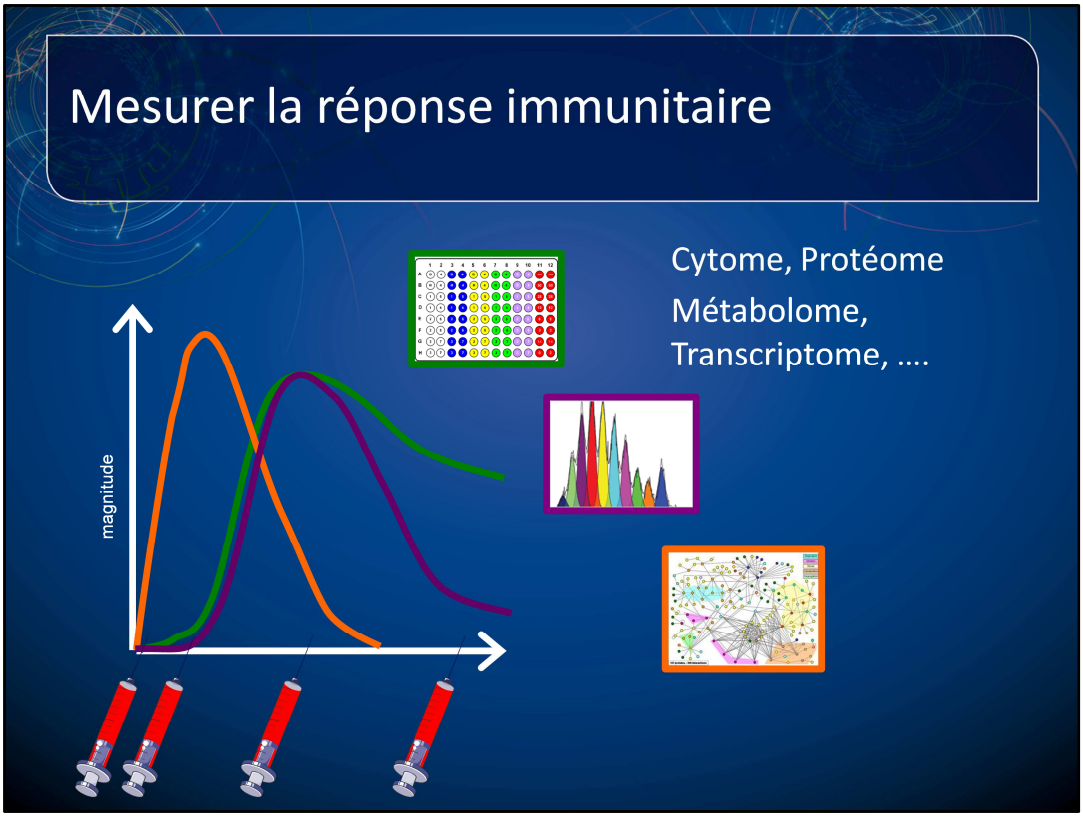


La réponse immunitaire suite à la vaccination résulte de mécanismes complexes et réseaux d'interactions entre cellules et molécules de l'immunité qui s'organisent dans le temps et dans l'espace.

Après l'injection d'un vaccin, il y a d'abord une réponse immunitaire innée impliquant plusieurs types cellulaires tels que les macrophages et les cellules dendritiques qui vont devenir matures et migrer vers le ganglion drainant pour présenter les Ag vaccinaux aux Lymphocytes, induisant l'activation et l'expansion clonale des LT CD8 et CD4 spécifiques, les LT CD4 auxiliaires vont aussi permettre la différentiation des LB et cellules sécrétrices d'Ac.
L'immunité à long terme repose sur la génération et la persistance de cellules spécifiques d'Ag, T et B mémoires et plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle osseuse
qui vont permettre de neutraliser le virus rapidement en cas d'infection.

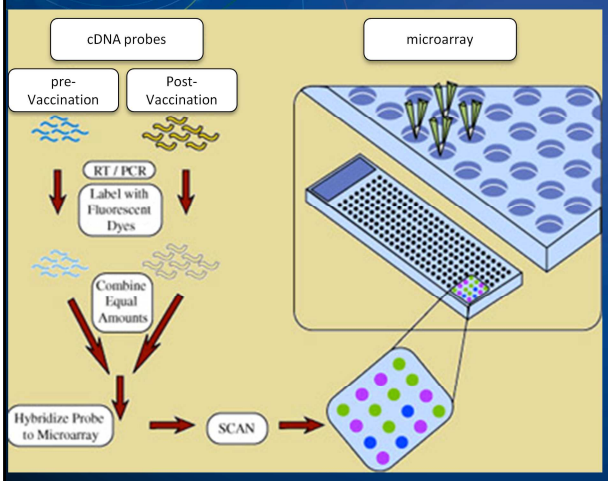


Dans le cas de la grippe, la variablité des souches virales impose une vaccination annuelle,
l'efficacité de cette vaccination va dépendre de la corresponsdance entre les Ag vaccinaux et les Ag portés par les virus en circulation.
De nombreux autres facteurs vont aussi influencer l'efficacité de la vaccination,
En effet, à chaque saison, une partie de la population et en particulier les personnes âgées ne répondent pas ou faiblement à la vaccination antigrippale.
L'immunocompétence de l'individu au moment de la vaccination est un paramètre très important.
De plus, Les infections grippales et vaccinations antérieures vont aussi influencer la réponse au vaccin, en particulier les taux d'anticorps pre-existant vont modifié l'induction d'une réponse immunitaire suite à la vaccination.



La réponse immunitaire est mesuré principalement à partir des prélevement de sang qui peut être recueilli chez des volontaires à difts temps après vaccination
Ce qui nous permet de suivre la spécificité et les taux d'Ac au cours du temps
Les diverses populations de cellules de l'immunité innée, sous-population de lymphocytes T et B effecteurs et mémoires peuvent être étudiés, par cytométrie en flux multiparamétrique qui est un outils très utilisé en immunologie,
De nbreuses techniques se sont développés ces dernières années pour apporter des mesures de + en + précises et une gde qtité de données
Portant sur le dosage des protéines, les réactions métaboliques dans les cellules, ou les acides nucléiques, en particulier l'étude du transcriptome qui nous intéresse particulierement ici

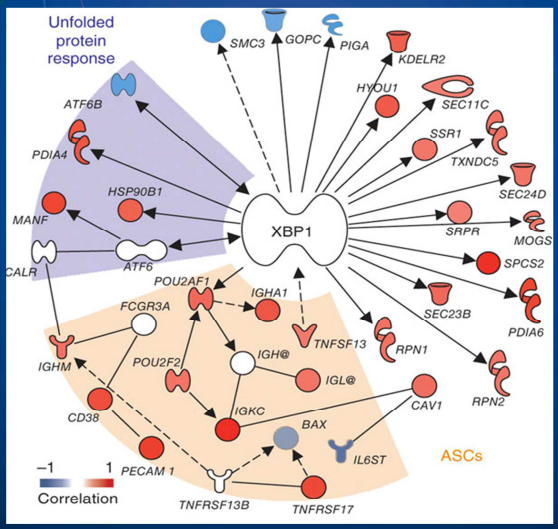
Mesure de l'expression génique



- Sang total, cellules du sang
- Profils post-vaccination vs pré-vaccination
- Transcriptome: microarrays, RNA-sequencing
- Analyses bioinformatiques: Modifications statistiquement et biologiquement relevantes

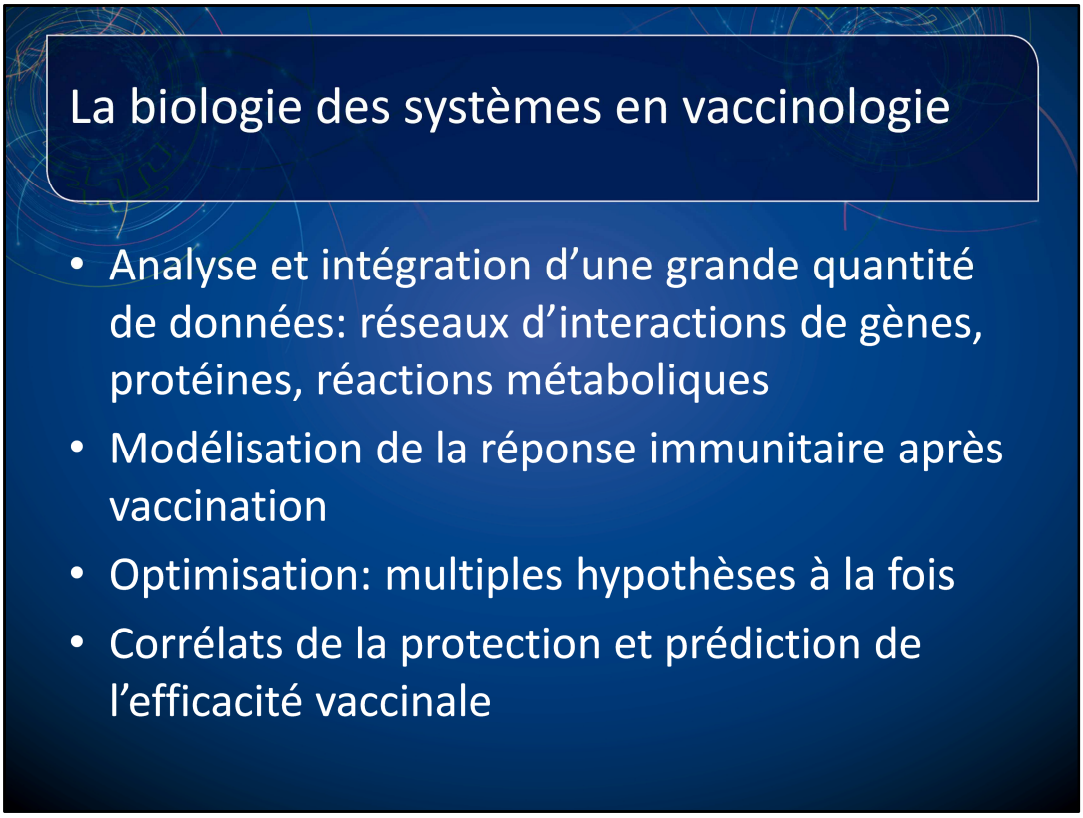
Les analyses des profils transcriptionnels sont des outils essentiels dans une approche de biologie des système.
Les mesures de l'expression des gènes peuvent se faire sur sang total ou sur des cellules purifiés du sang,
Les techniques de microarrays permettent de mesurer les taux d'expression de milliers de gènes
Et leur taux de variations induits après la vaccination, toujours en comparaison au statut basal, c à d à ll' intensité d'expression pré-vaccination.
Plus récemment le séquençage de nouvelle génération apportent une énorme quantité de données.
Le défi est d'analyser ces données pour définir les modifications d'expression statistiquement et biologiquement relevantes.

Réponse immunitaire: réseaux d'interactions moléculaires

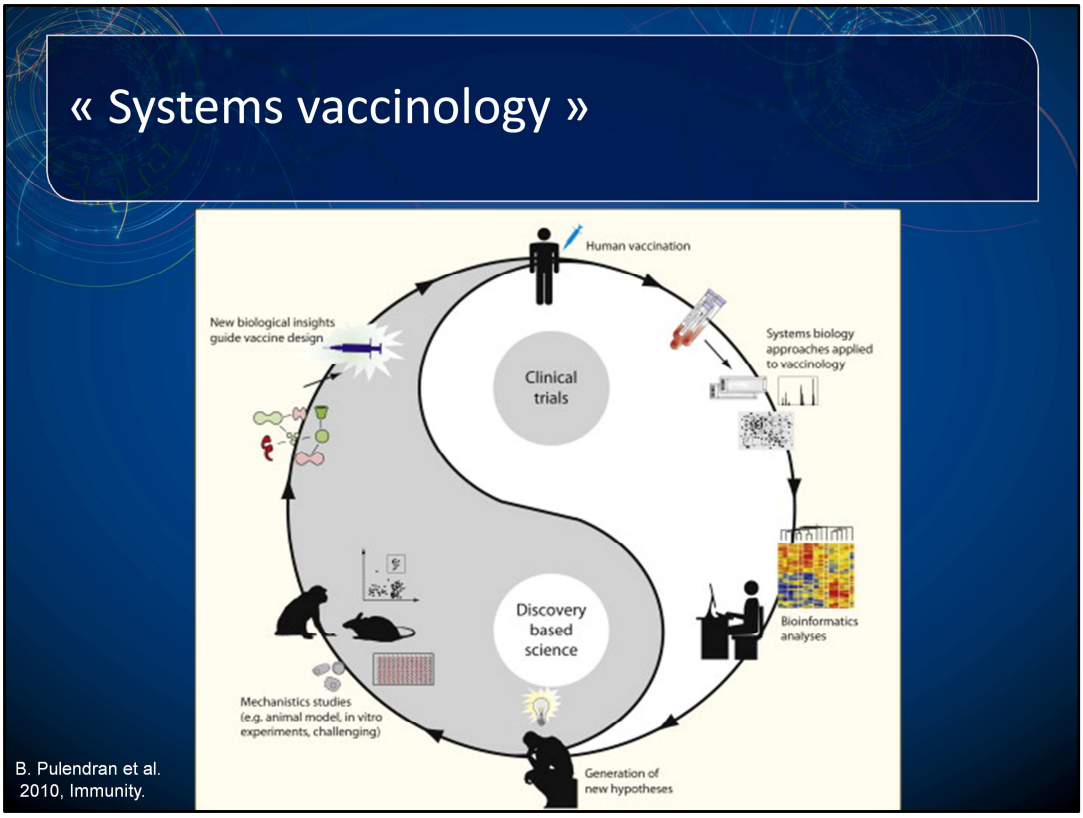


Les outils bioinformatiques sont essentielles

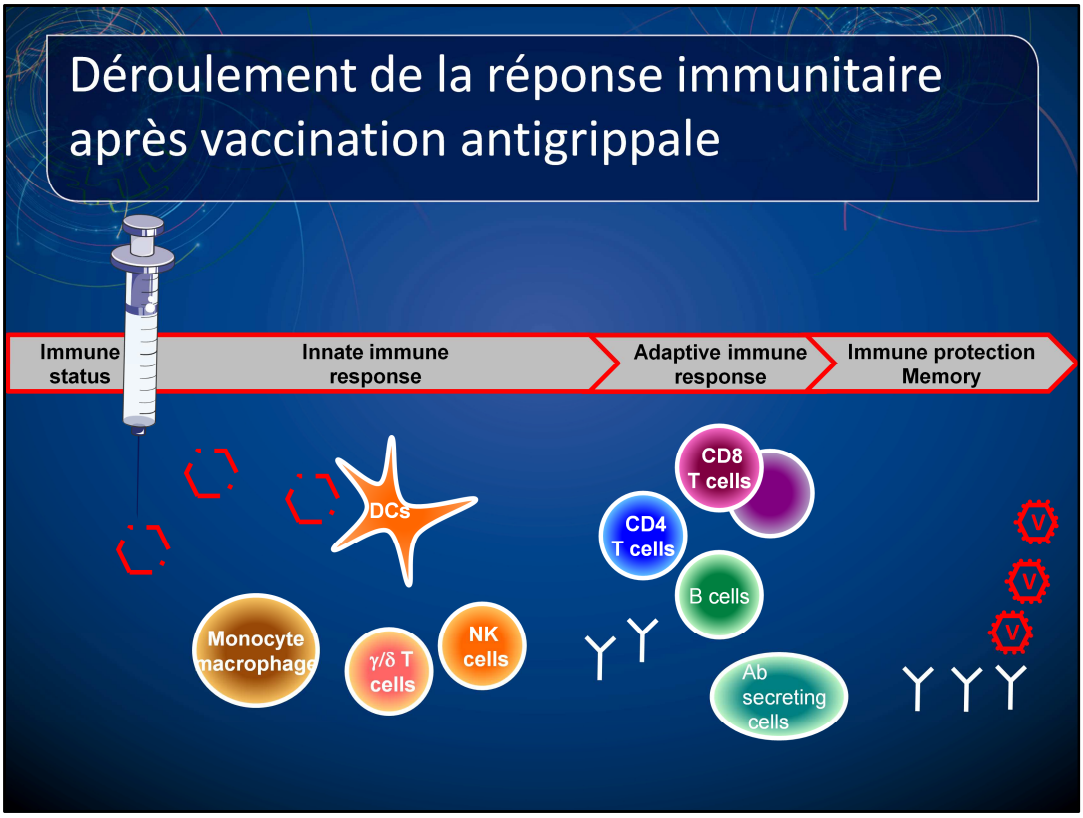
Ils permettent de construire les réseaux d'interactions de gènes,
dont la transcription est Significativement modulé par la vaccination,
Des logiciels utilisant les données issues des publications et diverses bases de données vont permettre de construire ces réseaux et ainsi comprendre les mécanismes moléculaires associés à la réponse immunitaire.



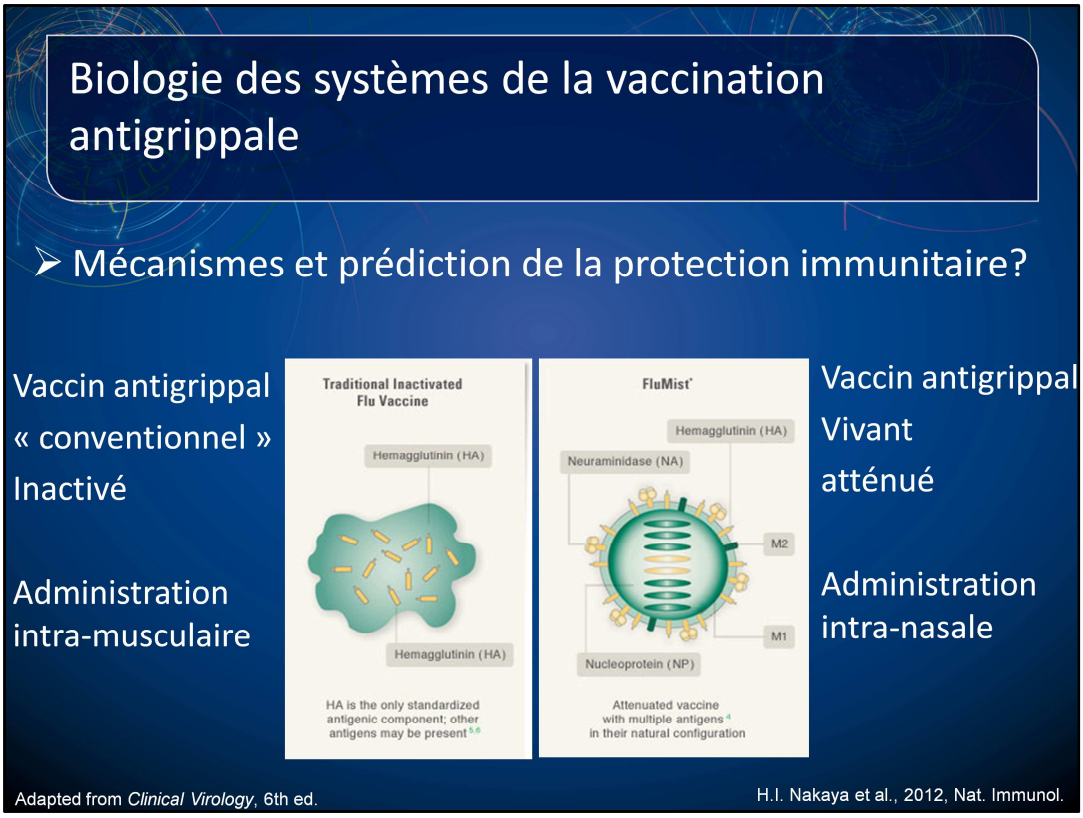
La biologie des systèmes ou biologie intégrative est une approche associant biologie, physique, mathématique, multiples disciplines,
La biologie intégrative permet d'avoir une vision global d'un système biologique, dans notre cas la réponse immunitaire,
en intégrant de grandes quantités de données qui sont disponibles aujourd'hui grâce au développement de nouvelles méthodes de mesure à grande échelle de l'expression des gènes, des protéines et des réactions métaboliques,
À l'aide d'outils mathématiques et bioinformatiques, ces données peuvent être intégrées afin de visualiser les réseaux d'interaction et comprendre les mécanismes qui se mettent en place au cours de la réponse immunitaire.
Cette approche permet de tester de multiples hypothèses à la fois et de générer de nouvelles hypothèses, elle permet ainsi une optimisation maximale des essais cliniques,
La biologie intégrative est un outils exceptionnel en vaccinologie pour définir des corrélats de protection et facteurs prédictifs de l'efficacité vaccinale comme nous allons le voir par la suite,



on peut suivre ici une schématiqation de l'approche de biologie des syst appliqué à la vaccinologie,
A partir des donnéesexpérimentale, (protéines, cellules, gènes), les analyses mathématiques et la modelisation bioinformatique permet de générer de nouvelles hypothèses,
Qu'ils faut ensuite vérifiés in vitro, étudier les mécanismes in vivo dans des modèles animaux,
Ce qui peut conduire à la génération de nouvelles stratégies vaccinales, comme le développement de nouveaux adjuvants , dont l'efficacité pourra être tester dans des essais cliniques.

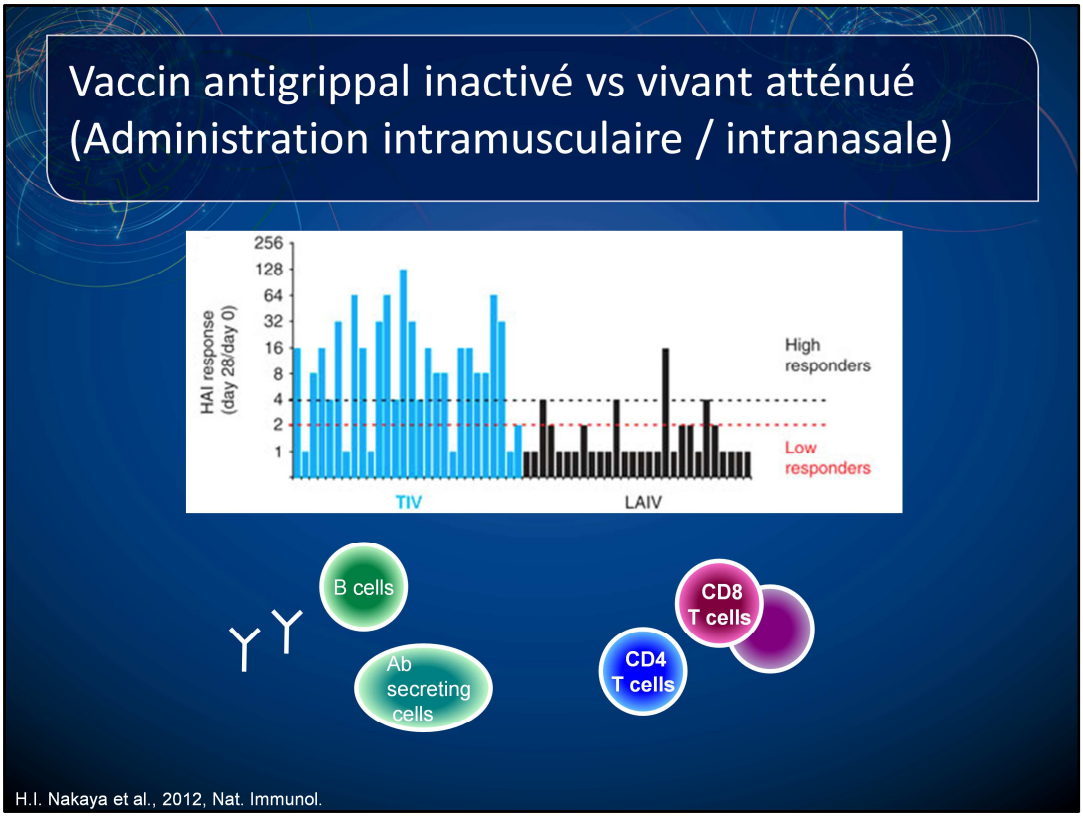


Les 1eres études de biologioe intégrative suite à la vaccination, ont mis en évidence l'importance des évennements précoces qui interviennent dans les 1ers jours après l'administartion du vaccin.
En effet, on sait aujourd'hui que L'intensité de la réponse inflammatoire et la nature des mécanismes de l'immunité innée mis en jeu rapidement après vaccination,
ont un rôle crucial
vont définir l'intensité, la nature et la qualité de la réponse adaptative T et B spécifique à l'origine de la génération des cellules mémoires capable de maintenir une protection à plus long terme.
La pré-existance d'Ac spécifiques capables de neutraliser les Ag vaccinaux, le statut immunitaire et inflammatoire prévacination vont avoir un impact important sur ces événements précoces et donc sur le déroulement de tous les évennements suivant dans la réponse vaccinale.
Dans le cas de la vaccination antigrippale, je vais vous présenter principalement les travaux du laboratoire de B. Pulendran, mais également RPS. Qui ont appliqué cette approche à la vaccination antigrippale,



Dans le but de définir les corrélats et facteurs prédictifs d la protection immunitaire contre le virus grippal.

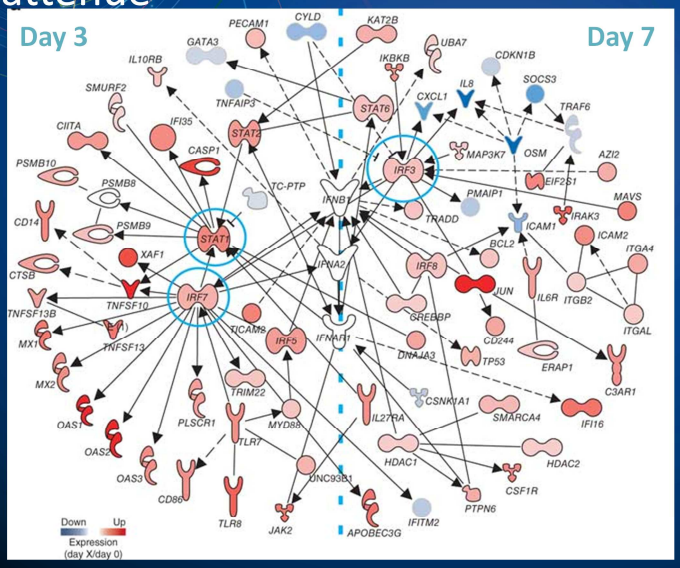
Dans leur publication, paru cette année dans le journal Nat Immunol, l'équipe de B; Pulendran a étudié la réponse immunitaire et particulièrement les profils transcrptionnels chez des vaccinés ayant reçu soit le vaccin antigrippal conventionnel, inactivé, par voie IM
Soit le vaccin flumist, où les virus vivants atténués sont administrer par voie intranasale.



La mesure des titres d'Ac présentés ici, à jour 28 post vaccination, en comparaison aux taux pré-vaccination,
Permettent de définir des "mauvais ou faible répondeurs au vaccin, et des bons ou forts répondeurs, Dans le groupe ayant reçu le vaccin conventionnel inactivé, en bleu,
On voit que les ind; ayant reçu le vaccin vivant atténué, en barre noires, n'ont pas ou peu d'Ac anti HA à 1 mois post vaccination.
La mesure d e l'expression des gènes réalisésdans ces deux groupes corèlent avec ces données et montrent un profil transcriptionnel orienté ver une réponse lymphocytaire B et humorale dans le 1er groupe avc le vacin atténué,
Alors q das le cas de la vaccination avec les virus vivant atténué, le profil transcriptionnel est plutôt orienté vers des gènes spécifiquement associés à la réponse cellulaire T .
Le taux d'expression de gènes associés à l'immunité innée à été mesuré chez ces individus à jour 3 et 7 post vaccination, revelant l'existance de mécanismes innés communs induits par les 2 vaccins, et spécififique,

HAI titers in plasma on day 28 after vaccination with TIV or LAIV, relative to baseline (day 0); results are the highest HAI response among all three influenza strains in the vaccine: low responders, no increase above twofold; high responders, fourfold or more above baseline. $P < 0.0001$, mean HAI response, TIV versus LAIV (*t*-test). (**b**) ELISPOT assay of influenza-specific IgG–secreting plasmablasts among PBMCs from all vaccinees at 0 and 7 d after vaccination. Each symbol represents an individual donor; small horizontal lines indicate the median (numbers adjacent median values); dotted lines are the limit of detection. (**c**) Flow cytometry analysis of plasmablasts in the plasmablast gate ($CD3^{-}CD20^{lo-neg}CD19^{+}CD27^{hi}CD38^{hi}$) in blood from subjects vaccinated with TIV or

Signatures moléculaires induites par la vaccination intranasale avec le virus vivant atténué



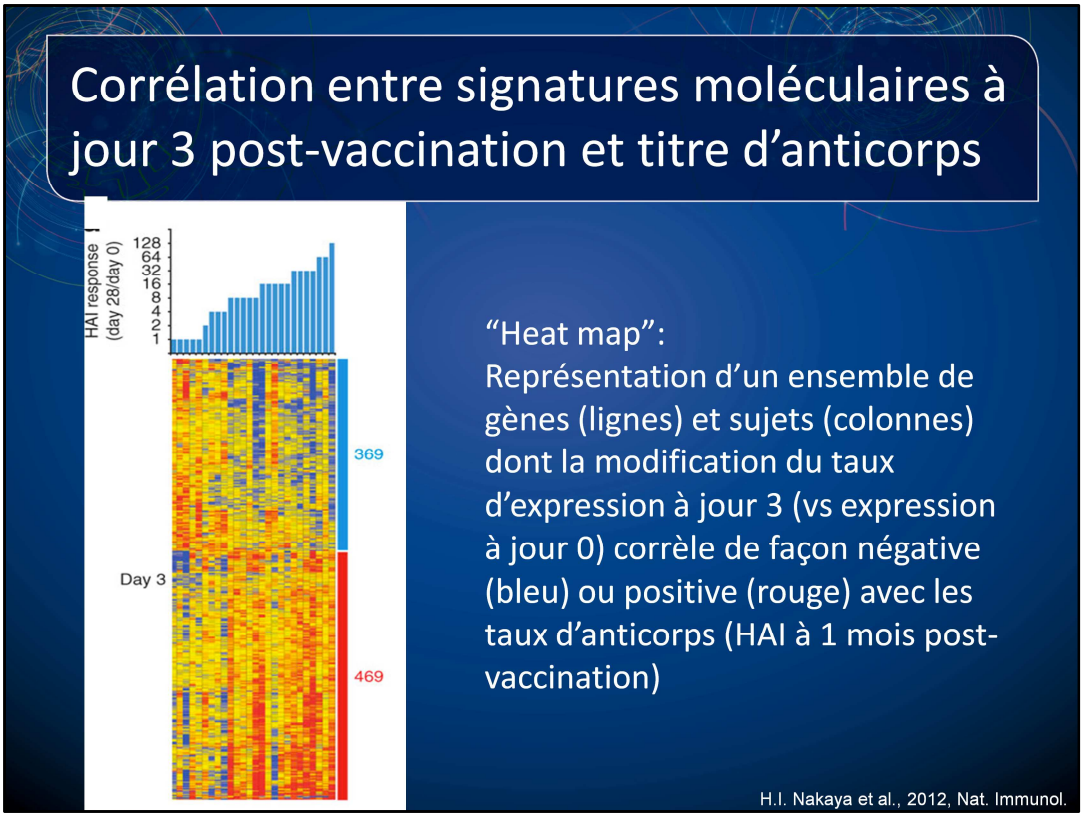
Réseau d'interactions entre gènes associés à la réponse Interféron exprimés 3 et 7 jours après vaccination utilisant le vaccin vivant atténué.

H.I. Nakaya et al., 2012, Nat. Immunol.

Les moyennes des taux d'expression des gènes par rapport à jour

sont représentés Par des couleurs rouge lorsqu'il y a une amplification de la transcription par rapport à jour 0,
et en bleu lorsque ce gene est régulé négativement par rapport a sa transcription basale
L'intensité des couleurs représentent l'intensité de cette modification par rapport à jour 0.
On voit apparaitre des facteurs clés, comme IRF7, IRF3, STAt 1 qui sont des noeuds dans ces réseaux consensus, associés à la réponse IFN de type,
Ces mêmes facteurs clés ont été retrouvés par cette approche dans d'autres études portant sur la réponse au vaccin de la fièvre jaune,
Et peuvent reveler la capacité replicative du virus vivant atténué utilisé pour la vaccination ,

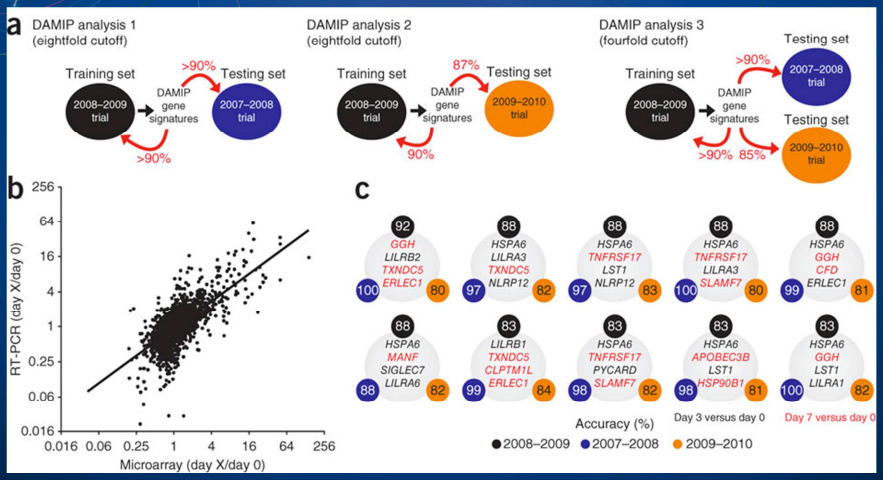
Interferon-related genes upregulated (Up) or downregulated (Down) on day 3 or 7 ('X' in key) after vaccination with LAIV relative to their expression at day 0 (colors in key): solid lines indicate direct interactions; dashed lines indicate indirect interactions. (**b**) Quantitative RT-PCR confirmation of the induction of key interferon-related genes (*OAS1*, *IRF7*, *MX2* and *STAT1*) in PBMCs obtained from healthy subjects and left unstimulated (Medium) or stimulated for 24 h *in vitro*



Chez les individus ayant reçu le vaccin conventionnel inactivé;
L'intensité d'espression des gènes a été mesurés par microarrays à jour 3 post vaccination et comparé à leur expression basale, pré-vaccination,
Les taux de variation pour différents gènes sont ici représentés par des intensité de couleur rouge à bleu, une ligne correspondant à 1 gène,
Ces variations d'expression génique à jour 3 ont pu être corrélé aux taux d'Ac anti HA mesuré à jour 28 chez ces mm individus,
les colonne correspondent aux volontaires, classé selon leur taux d'Ac, du plus faible au plus fort répondeur.
Et on voit apparaitre en rouge, un ensemble de gènes don't l'expression corrèle de façon positive avec une bonne réponse humorale, et des gènes pour lesquels la corrélation est négative, en bleu.
Plusieurs de Ces gènes modulés sont associés à la réponse inflammtoire, macrophages, cell NK, et aussi des molecules associés à la réponse lympho T.

(**a**) Heat map of probe sets (rows) and subjects (columns) whose baseline-normalized expression at day 3 (top) or day 7 (bottom) correlated with baseline-normalized antibody response at day 28 after vaccination with TIV (colors in map indicate gene expression at day 3 or 7 relative to expression at day 0). Right margin, number of probe sets with negative correlation (blue) or positive correlation (red). Probe sets that correlated with the HAI response on both day 3 and day 7 were considered 'day 7'. $P < 0.05$ (Pearson). (**b**) HAI response–correlated genes associated with the unfolded protein response (purple shading) or ASC differentiation (tan shading) and/or regulated by XBP-1 (solid and dashed lines as in **Fig. 2a**). $P < 0.05$ (Pearson). (**c**) Enrichment for genes (among those with high expression in any PBMC subset) whose expression on day 3 or 7 after

Prédiction de la réponse humorale par les signatures moléculaires

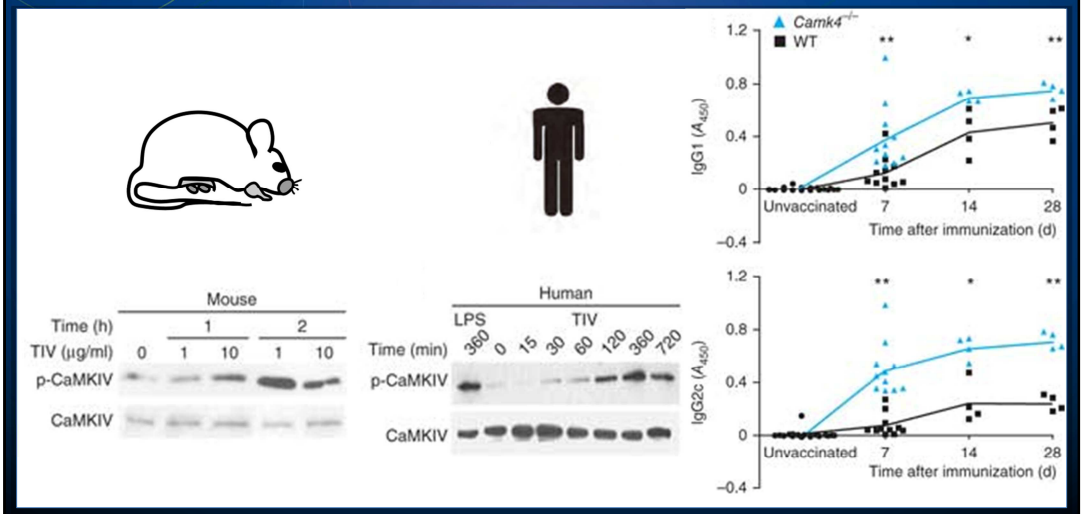


H.I. Nakaya et al., 2012, Nat. Immunol.

L'Utilisation des données issues de plusieurs cohortes d différentes saisons de vaccination antigrippale, permet ainsi de définir des facteurs prédictifs de la réponse humorale.
La cohorte Recrutée en 2008-2009 (28 TIV) a été utilisée pour identifier des gènes qui corrèlent avec les taux d'Ac, comm nous l'avons vu sur la diapo précédente,
Ces ensembles de gènes ont ensuite été testé pour leur capacité à prédire la réponse humorale de la cohorte recrutée en 2007-2008,
Les taux d'expression de ces gènes ont été vérifié par PCR quantitative (B)
Puis une 3eme cohorte indépendante recrutée en 2009 2010 a permis de confirmer la qualité des signatures prédictives.
Les chiffres représentent le nombre de sujets correctement classifiés dans bons/mauvais répondeurs Ab dans chacune des cohortes pour chacun des groupes de gènes.

(**a**) Experimental design used to identify the early gene signatures that can be used to predict antibody responses to vaccination with TIV: the 2008–2009 trial was used as a training set to identify predictive signatures with the DAMIP model; those signatures were then tested on the data from the 2007–2008 trial (the testing set). The expression of a subset of genes in the DAMIP predictive signatures of the 2007–2008 and 2008–2009 trials was then quantified by RT-PCR in a third independent trial (2009–2010 trial); the DAMIP model was again used to confirm the predictive signatures. (**b**) RT-PCR confirmation of the expression of a subset of genes in the predictive signatures generated by the DAMIP model. Each symbol represents a single gene at a given time point. $P < 10^{-11}$, microarray versus RT-PCR (Pearson); $r = 0.68$; $n = 2{,}897$ XY pairs. Data are

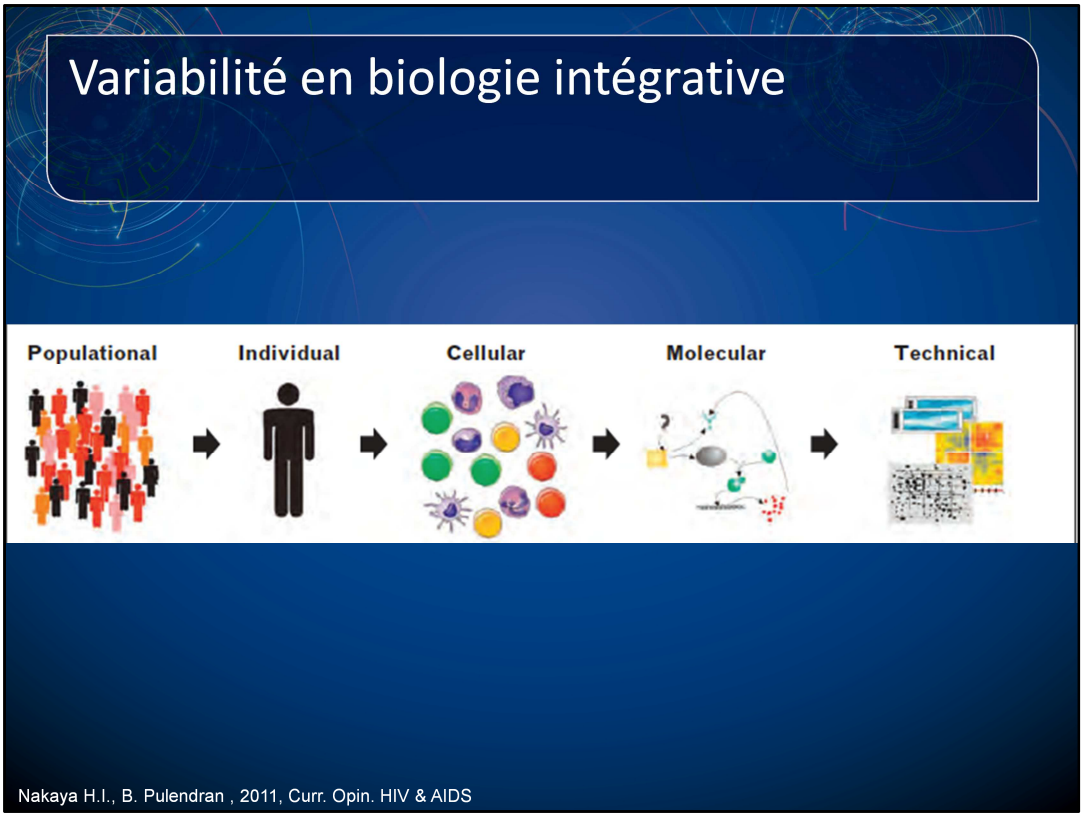
Validation: exemple d'étude fonctionnelle d'un gène prédictif de la réponse humorale



H.I. Nakaya et al., 2012, Nat. Immunol.

Ce travail montre aussi un exemple de validation du rôle d'un de ces gènes prédictifs de la réponse humorale, ils ont choisit d'une prot kinase, don't l'expression correle negativement avec la réponse humorale mais pour lequel aucun rôle dans la réponse humorale n'est connu.
Calcium/calmodulin dpdt protein kinase IV, CaMK 4 regulates the antibody response to vaccines anti grrippal.
Les WB présentés ici montrent l'expression cette fois au niveau protéique de cette molécule, chez la souris et chez l'homme o
n peut voir l'amplification de la quantité de protéine phosphorylée après vaccination antigrippale suggérent une activation de CamK IV.
Le suivi des taux d'Ac spécifiques induits après vaccination chez des souris déficiente pour le gène de cette protéine kinase en bleu, montrent le rôle régulateur de cette molécule sur la génération d'IgG spécifique au cours de a réponse anti grippale.

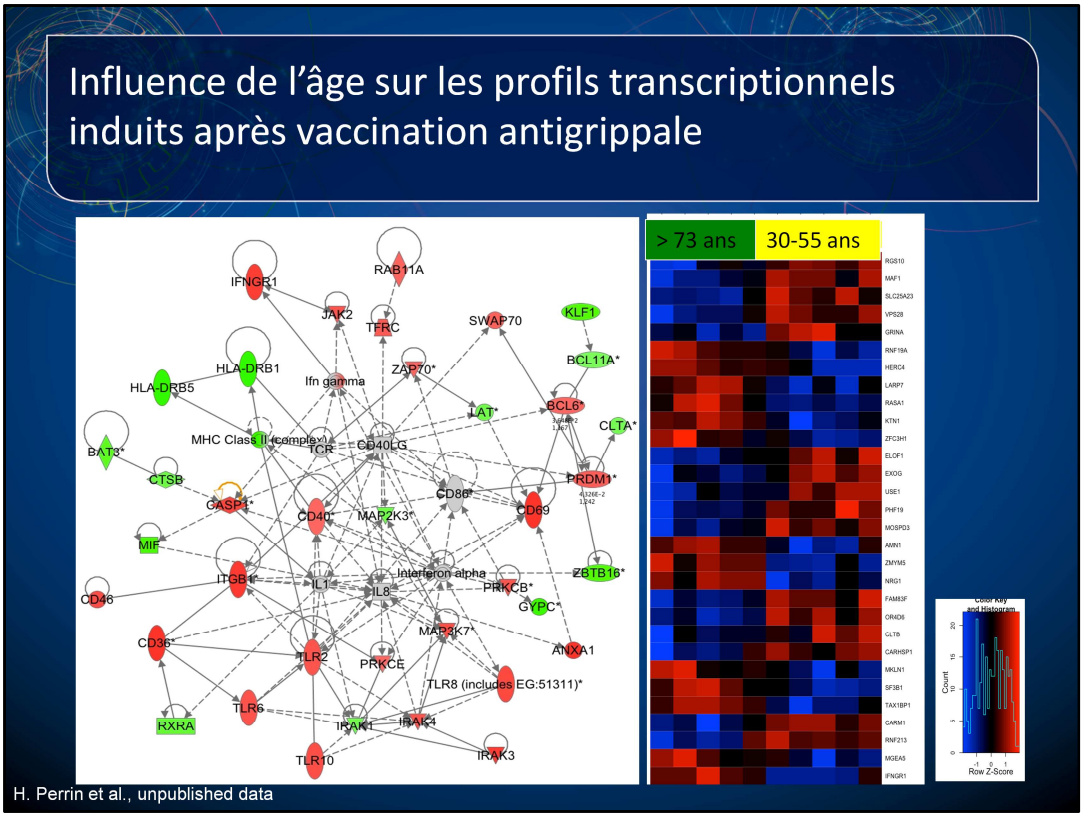
(a) HAI response at day 28 versus microarray analysis of *CAMK4* mRNA in PBMCs at day 3 after vaccination with TIV in the 2008–2009 trial (left; $r = -0.47$ (Pearson); $P = 0.016$ (for Pearson correlation; two-tailed test) or the 2007–2008 trial (right; $r = -0.73$ (Pearson); $P = 0.024$ (for Pearson correlation; two-tailed test). (**b**) ELISPOT analysis of influenza-specific IgG–secreting plasmablasts at day 7 versus microarray analysis of *CAMK4* mRNA on PBMCs at day 3 after vaccination with TIV. (**c**)
(b) Immunoblot analysis of the phosphorylation (p-) of mouse CaMKIV after *in vitro* stimulation of splenocytes for 1 or 2 h with various doses of TIV (above lanes). (**d**) Immunoblot analysis of the phosphorylation of CaMKIV after *in vitro* stimulation of human PBMCs for 0–720 min with lipopolysaccharide (LPS) or TIV. (**e**) Serum antigen-specific IgG1 (top) and IgG2c (bottom)



En biologie des systèmes, Le travail sur de si grandes quantités de données très précises, est forcément associé à une grande variabilité,
La collaboration de statisticiens, informaticiens, cliniciens et scientifiques est essentiel, des consortium entre plusieurs laboratoires ont été créés pour une meilleure normalisation des techniques .
Surtout, l'approche de biologie des sytèmes met en évidece l'importance de l'environnement et les variations interindividuelle,

Dealing with the large amount of data generated from high-throughput technologies represents a critical technical issue. By measuring the outputs of entire transcriptomes, proteomes or metabolomes, there will inevitably be errors, noise and biases that, if not corrected, may affect downstream analyses [15–18] (Fig. 1). Even if different systems biology studies measure the same biological output, they will obtain variable results, which will reflect the differences in protocols, experimental design, probes used to detect the expression of genes, statistical tests, data normalization and detection methods [19–21].

One critical requirement lies in the experimental design itself. In addition to an appropriate sample size [27,28], factors such as age, sex, ethnicity,

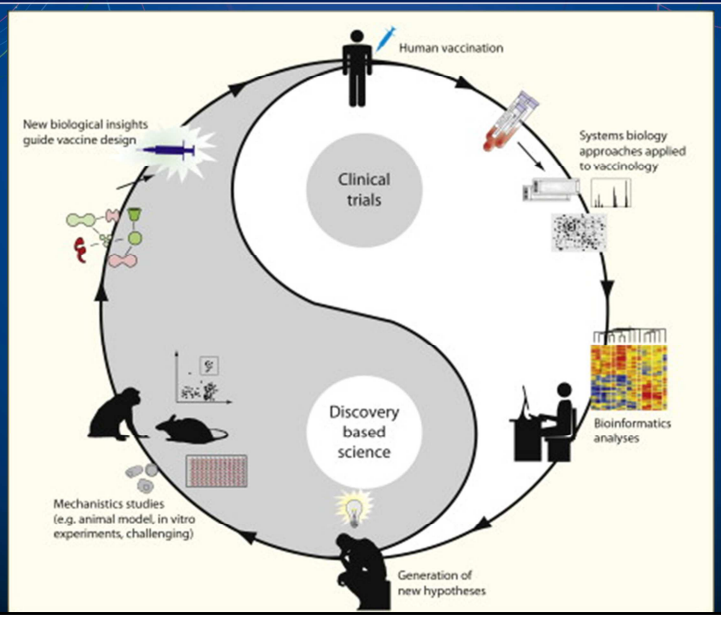


Par exemple, on peut voir ici l'impact de l'age sur la réponse au vaccin antigrippale.
Les profils transcrptionnels mesurés à à jour 3 post vaccinations, sont significativement différent entre des personnes âgées ici de plus de 73 ans et des pers agé de 30 à 55 ans.
Ce réseau d'interaction représente un ensemble de gènes, parmi les plus significativement modulé à jur 3 chez les personnes agé en comparaison aux moins de 55 ans,
On peut voir **une amplification de la signalisation associé à CTLA-4 dans les cell T, aux IFNs, TLR**

Et une diminution de certains gène,s en particulier associé aux CMH de classe 2 révélant une plus forte inflammation et une présentation Agq moins éfficace avec le vieillissemnet

In the course of this study, we also recruited subjects from different age groups as elderly individuals represent one of the most susceptible populations to influenza virus infections. It is thus critical to understand the defects in the innate immune response observed in these subjects with the aim of identifying the innate immune response dendritic cells that appear to be defective. In 2009-2010, we recruited 6 elderly individuals, over 73 years of age, who received the seasonal Flu vaccine. Compared to 6 adults (33 to 55 years old) who received the same vaccine, the gene expression profiles of 1139 and 1143 genes were found to be significantly

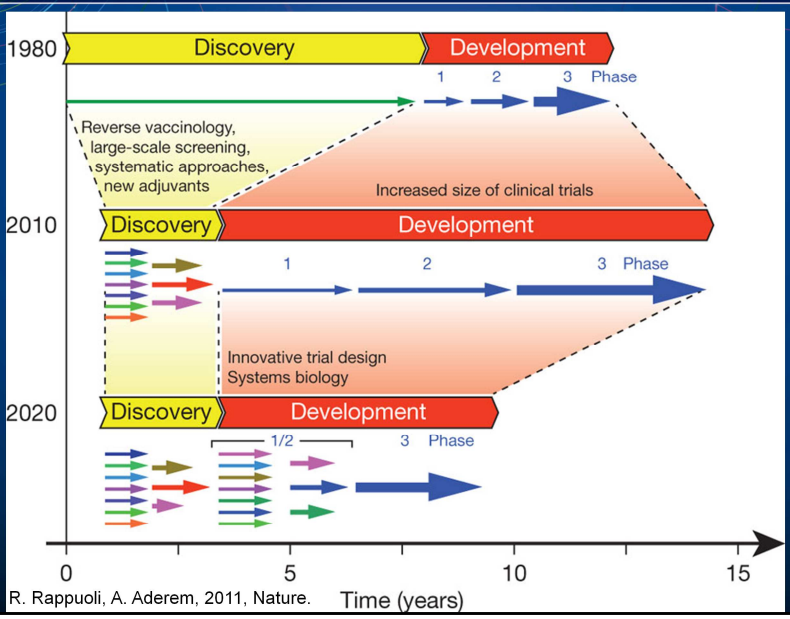
« Systems vaccinology »



B. Pulendran et al. 2010, Immunity.

Je viens de vous présenter ici différentes étapes dans l'approche de biologie des syst appliqué à la vaccination antigrippale
A partir des données expérimentale, la modelisation bioinformatique a permis permet de définir des modèles et des hypothèses sur les mécanismes immunitaires,
et par l'expérimentation in vitro et dans des modèles murins
Afin de metre en évidence des facteurs clés capables de prédire l'efficacité vaccinale et qui pourront être des cibles pour de nouvelles stratégies vaccinales qui pourront être adapté aux différents types de population , comme les pers agées, pour aller vers des stratégies plus adaptée et plus personalisée..

Développement de nouvelles stratégies vaccinales



Le développement des nouvelles technologies ces dernières décennies a permis d'accélérer les découvertes dans le domaine de la vaccination,
Cependant tester les potentiels stratégies et vaccins candidats représentent des budgets et des nombre de sujets pour des essais cliniques trop importants.
La biologie des systèmes avec une optimisation des essais cliniques, pourraient permettre de limiter ces besoins et accélérer le développement de nouvelles stratégies vaccinales
Cette nouvelle approche apparait comme un outils essentiel pour le futur en vaccinologie

La biologie intégrative est un outils exceptionnel en vaccinologie pour définir des corrélats de protection et facteurs prédictifs de l'efficacité vaccinale comme nous allons le voir par la suite,

In the 1980s discovery was the major obstacle to vaccine development. The limited technologies available allowed the development of killed, live-attenuated, toxoid, or polysaccharide vaccines only. Development used to be fast with registration requiring a few hundred subjects in clinical trials. During the 1990s, recombinant DNA technologies, conjugation and the availability of the genome sequences allowed the acceleration of the discovery phase and subsequently the discovery of vaccines against diseases that were previously impossible. High-throughput methods allowed parallel testing of multiple approaches, markedly shortening the identification of the best candidate vaccines and formulations.