Perturbation du répertoire des lymphocytes Tαß
Application au neuropaludisme murin

Encarnita Ferrandiz
Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie
et Institut Pasteur, Paris

17 novembre 2004

Plan

1- Paludisme chez l'homme

2- Implication du SI- modèles murins

3- Objectifs de l'étude

4-Protocole expérimental

5- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

6- Résultats

7- Perspectives

Données Cliniques

2 milliards d'individus vivent dans les zones endémiques (à risque)

300-500 millions d'individus infectés par an

1-2 millions de décès annuels

Les enfants Africains de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les plus touchés

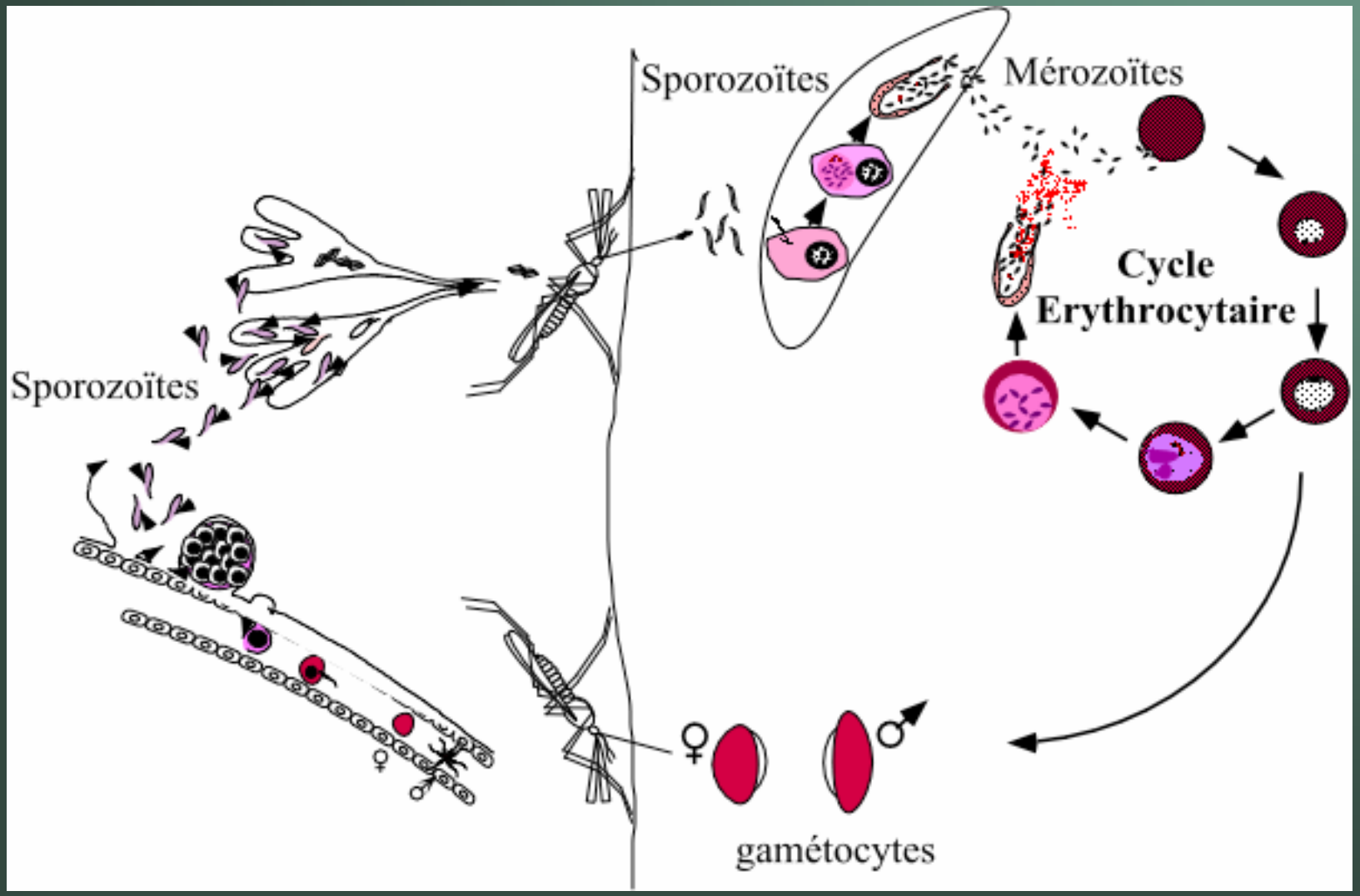
The Africa Malaria Report, WHO, 2003

Neuropaludisme

Complication liée à l'infection par *Plasmodium falciparum*

Mortalité: 10 à 30 % des cas

Cycle du parasite *Plasmodium*



Plan

1- Paludisme chez l'homme

2- Implication du SI- modèles murins

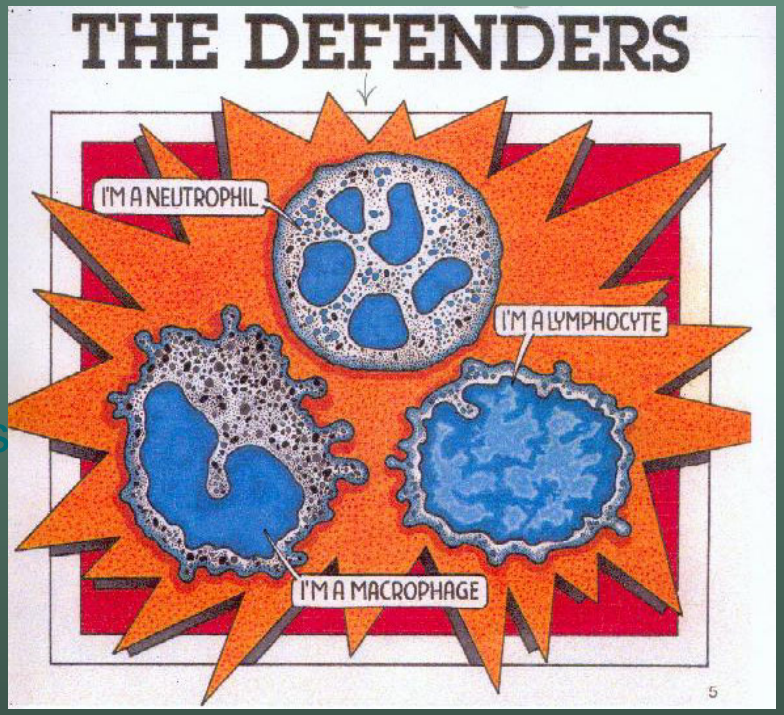
3- Objectifs de l'étude

4-Protocole expérimental

5- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

6- Résultats

8- Perspectives



Lymphocytes T et Neuropaludisme (NP):

- dépletion T$\alpha\beta$ $CD4^+$ et/ou $CD8^+$ protège contre le NP
- T$\alpha\beta$ $CD8^+$ observés au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral

Neuropaludisme expérimental chez la souris:

- infection de souris B10.D2 avec le clone 1.49 L de *P. berghei ANKA*
- similarités physiopathologiques avec l'infection chez l'homme par *P. falciparum*
- modification du répertoire des lymphocytes du sang chez les souris en neuropaludisme (CM+) par rapport aux souris non infectées ou ne développant pas de désordres neurologiques

Plan

1- Paludisme chez l'homme

2- Implication du SI- modèles murins

3- Objectifs de l'étude

4-Protocole expérimental

5- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

6- Résultats

8- Perspectives

3- Objectifs de l'étude :

→ Estimer la perturbation du répertoire dans sa globalité au cours de l'infection, avant la survenue du neuropaludisme

→Caractériser la nature de cette perturbation

→Comparer la perturbation entre NP+/NP-

=> pronostic de la survenue du NP ?

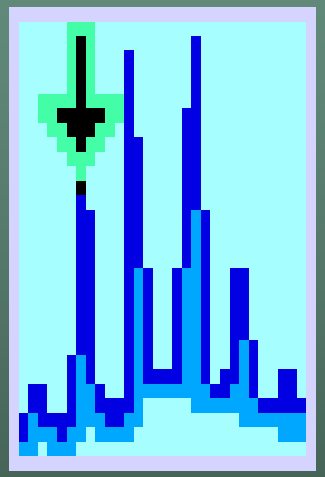
Plan

1- Paludisme chez l'homme

2- Implication du SI- modèles murins

3- Objectifs de l'étude

4- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks



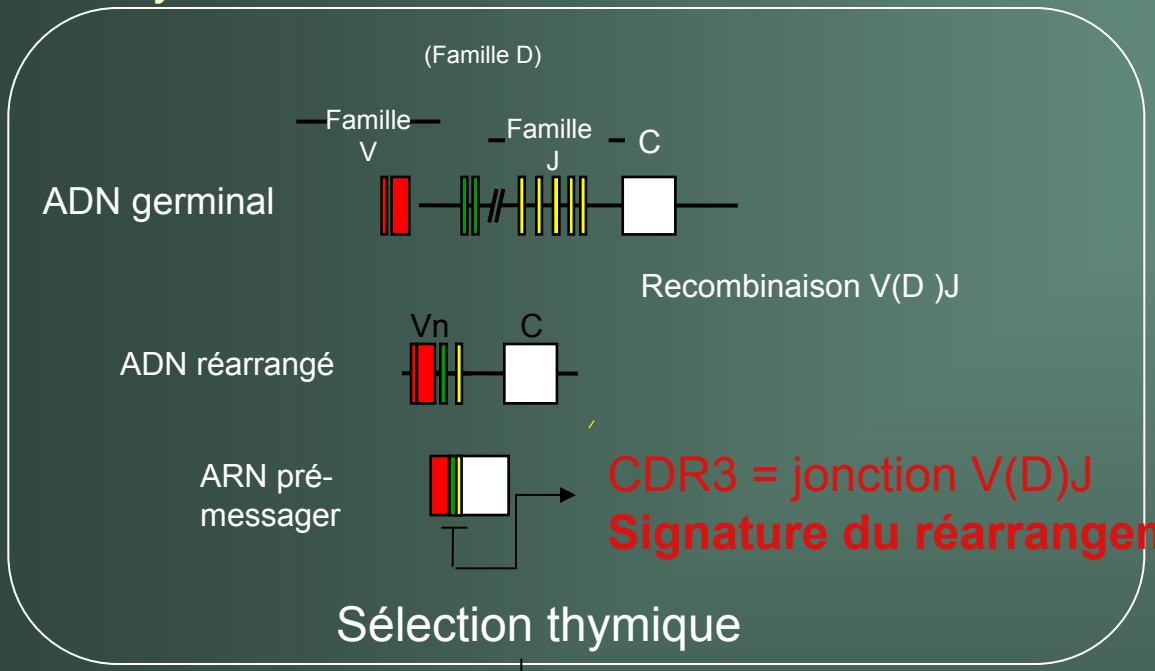
5-Protocole expérimental

6- Résultats

8- Perspectives

5- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

Thymus



périphérie

répertoire disponible

Sélection

répertoire effecteur

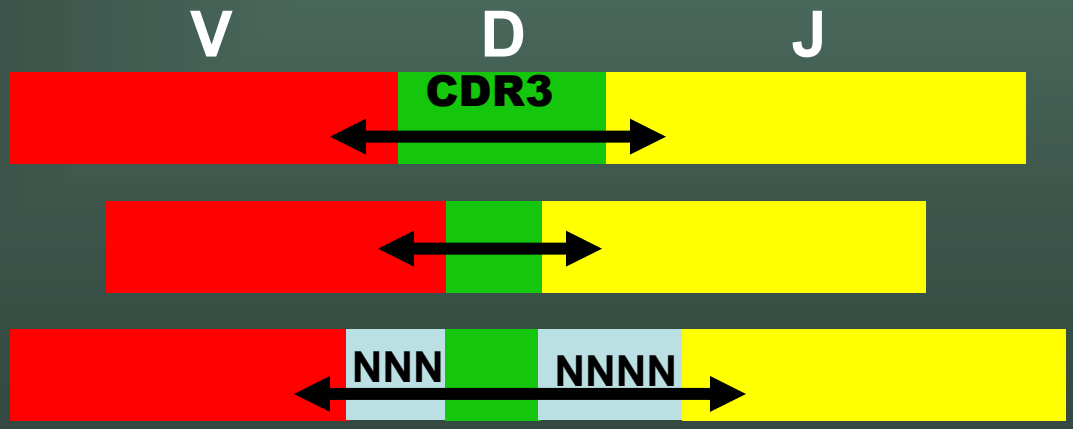
Protéines plasmodiales
- Antigène
- Superantigène
- Mitogène

Le CDR3 concentre la majorité de la diversité

Diversité du TcR

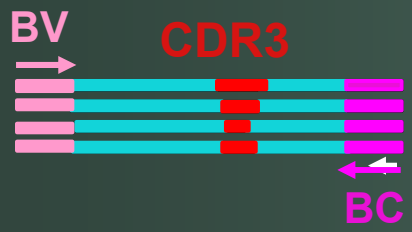
- Diversité combinatoire = combinaison des segments V(D)J
- Diversité d'appariement = TCRα/TCRβ, TCRγ/TCRδ
- Diversité jonctionnelle = addition aléatoire de nucléotide au niveau de la jonction V(D)J

→ la région CDR3 est ainsi variable en séquence et en taille; *signature du réarrangement*



Variable en taille

Analyse du répertoire : Stratégie

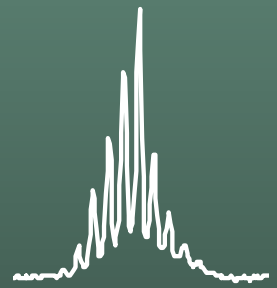


série **PCR TCR BV-BC**
Produits PCR marqués

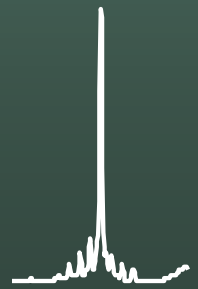
Elèctrophorèse en gel d'acrylamide
(séquenceur automatique)

Immunoscope
Extraction des données

Profil de réarrangements en phase dit "Gaussien" ou ***polyclonal***

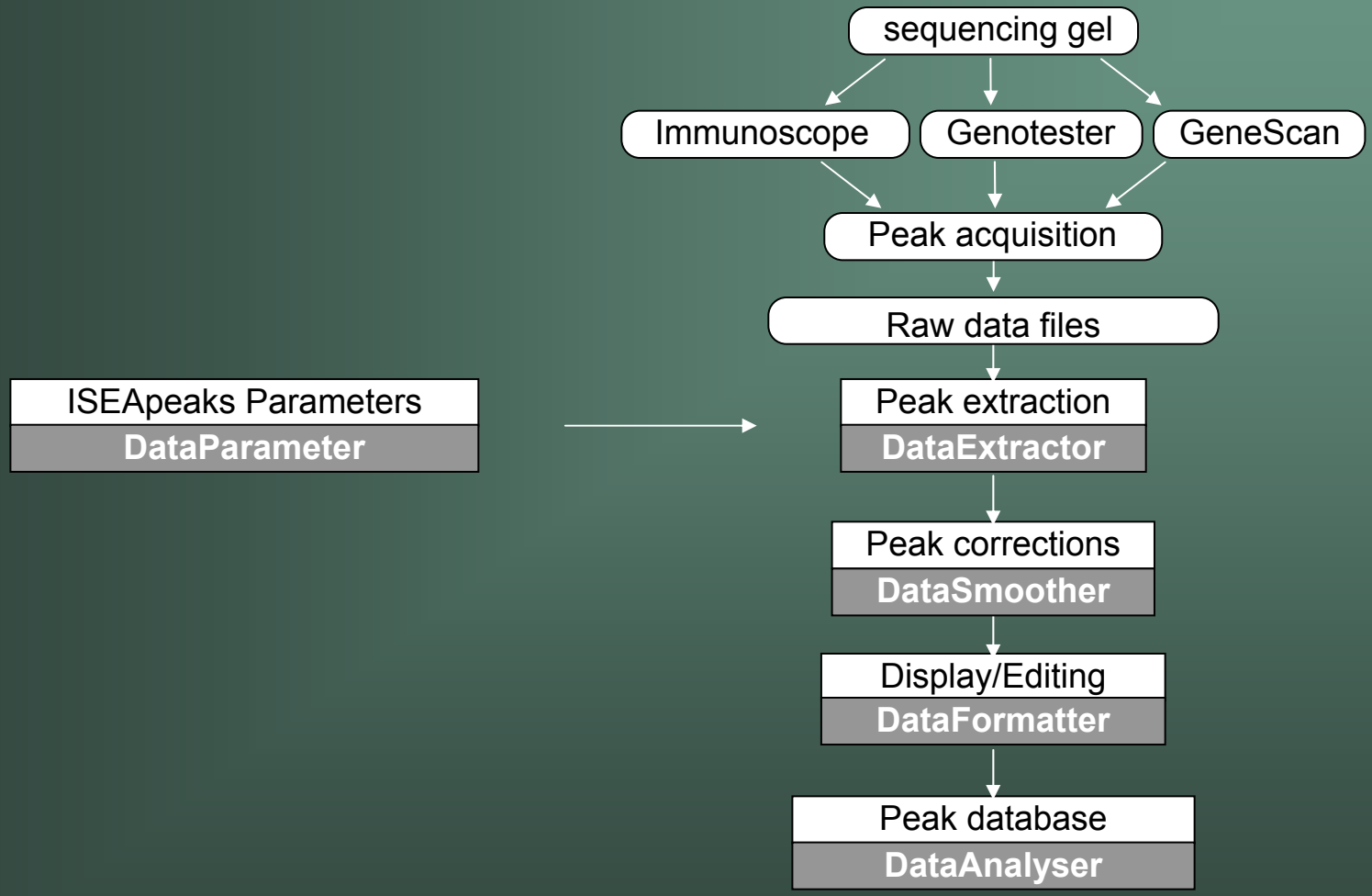


Profil de réarrangements en phase Irrégulier ou ***oligoclonal***



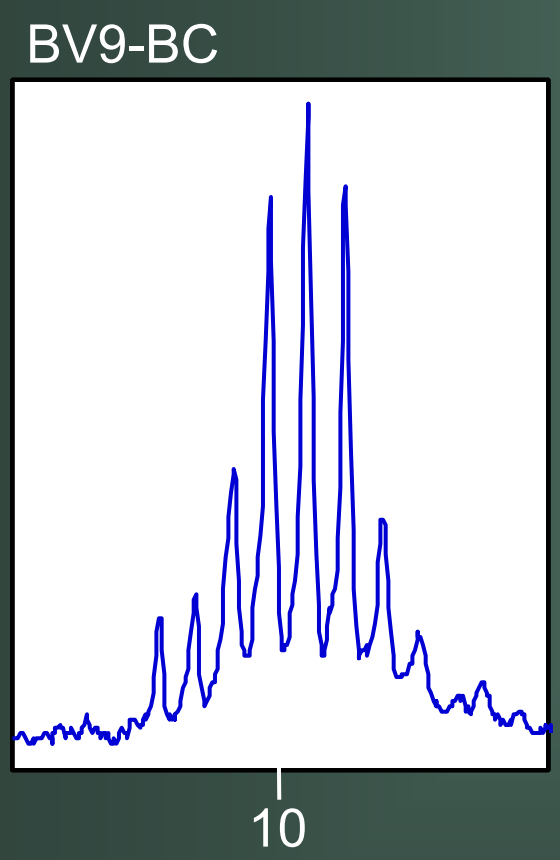
From Pannetier et coll., 1995 *Trends Immunol.*

The ISEApeaks software

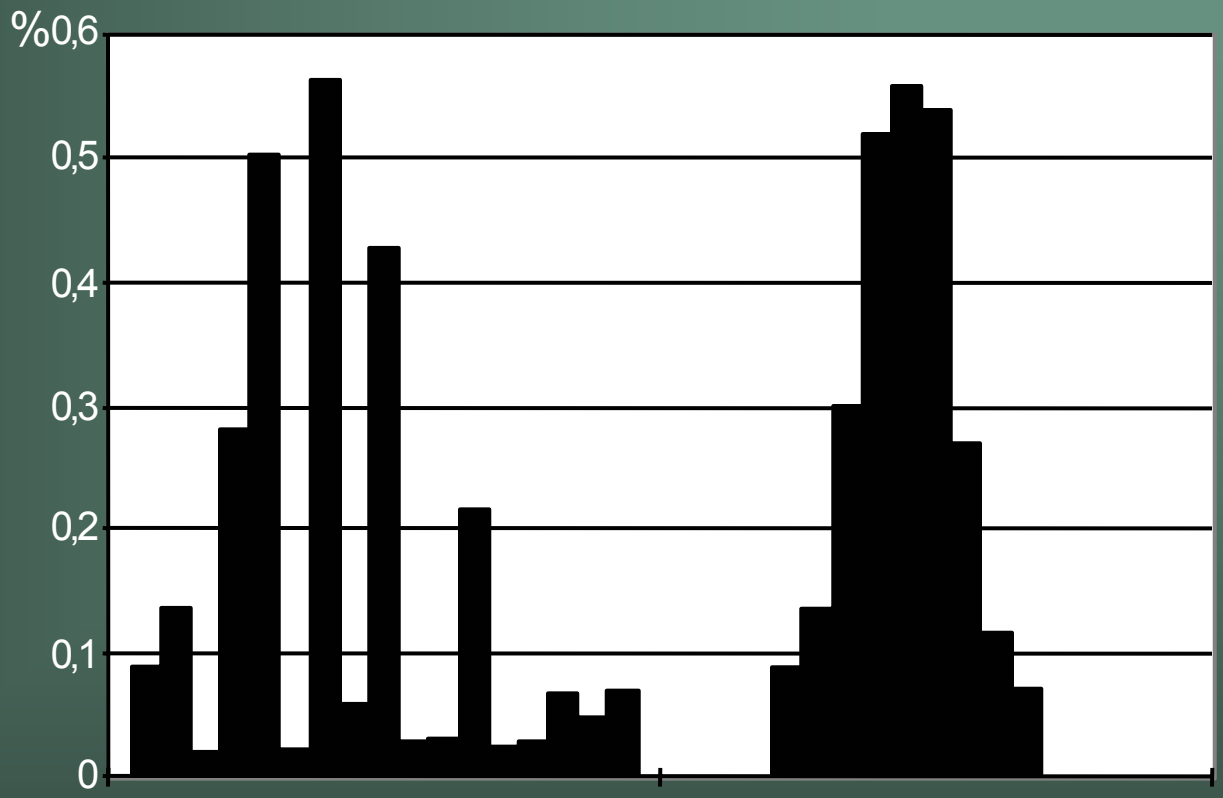


Collette et Six, 2002 *Bioinformatics*

Extraction and smoothing



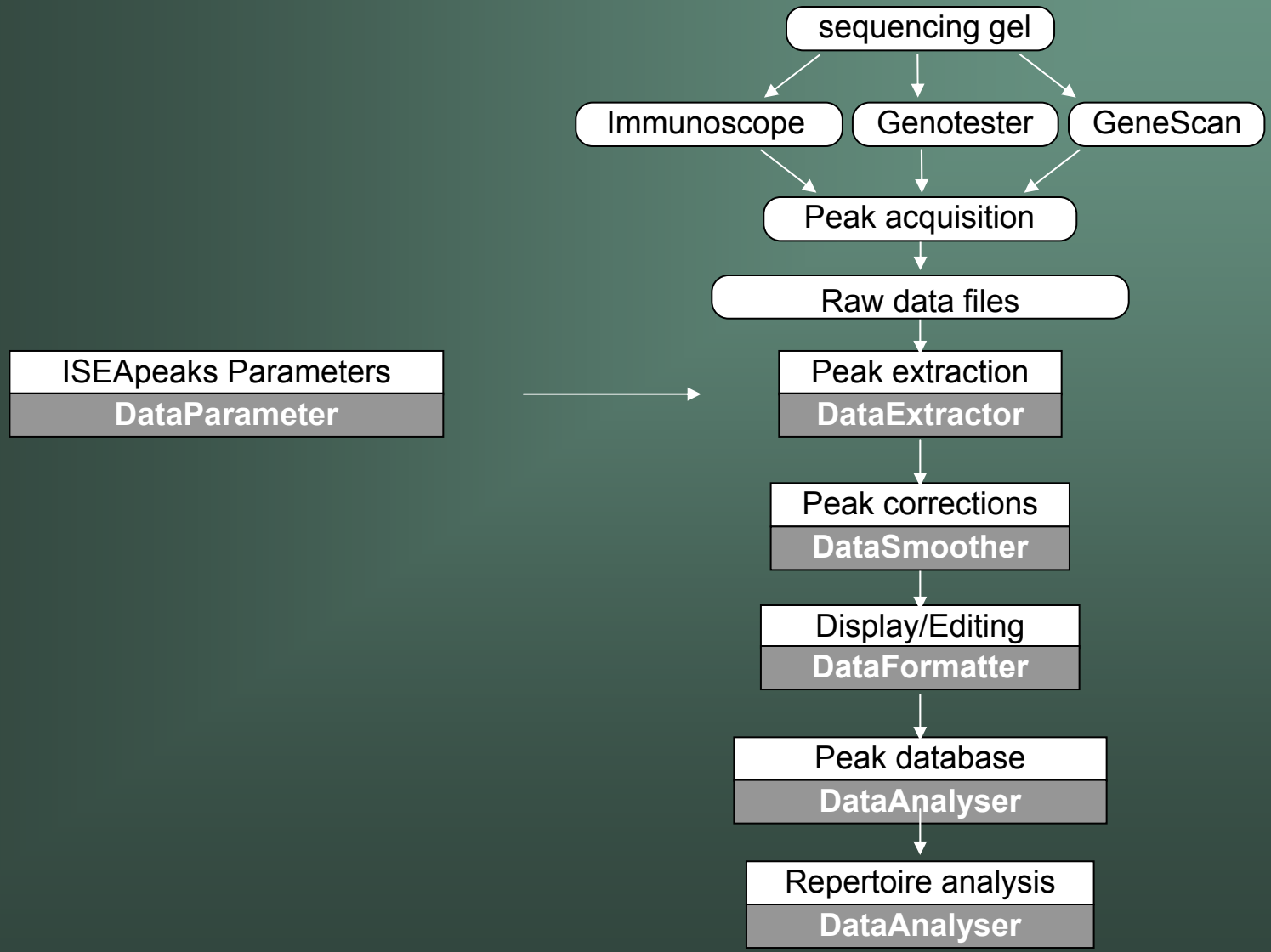
Immunoscope profile



Before smoothing

After smoothing

The ISEApeaks software



Collette et Six, 2002 *Bioinformatics*

Repertoire analysis methods

Global repertoire analyses

- Principal component analysis followed by Discriminant Analysis (PCA/DA)
- Distance-based perturbation index
  => ANOVA/MANOVA and clustering

Identification of oligoclonal expansions

- Mean repertoire
- Relative Index of Stimulation (RIS)
- Public and private arms of the immune response
  => OligoScore

OligoScore (1)

Determination of the public repertoire directed against the immunoglobulin κ light chain:

BV-BC repertoire analysis of $\kappa^{-/-}$ mice immunized with κ light chain
=> selection of BV10, 11, 13, 15 and 18 segments for BV-BJ analysis

Only BV13-BJ2.3 happens to be relevant
BV6-BJ1.4 chosen from another experiment

Faure *et al.*, 1999 *J. Immunol.*

OligoScore (2)

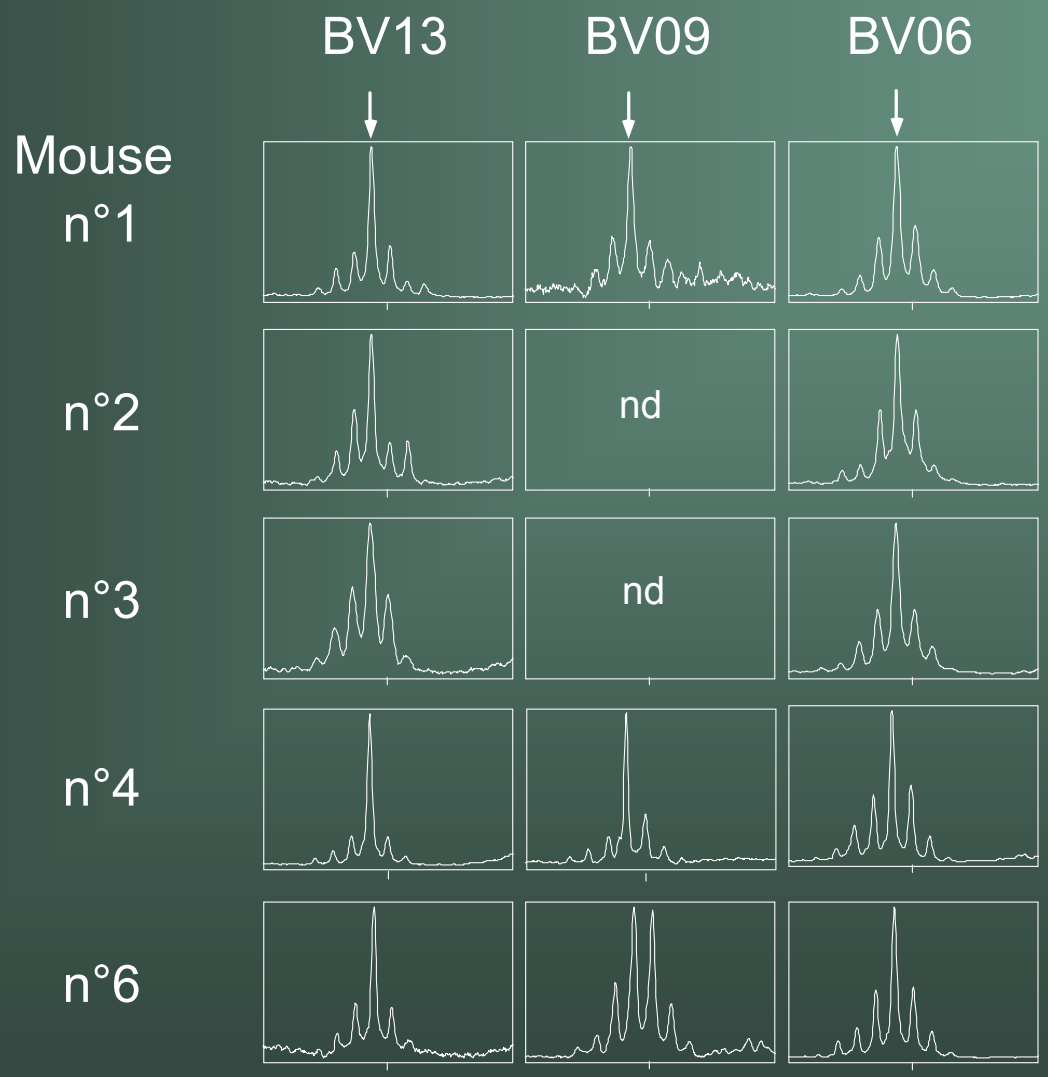
Faure et coll.

	A	B	C	D	E
22					
23	**OligoScore**				
24	**mDescription**	**CDR3 (aa)**	**Length**	**OligoScore**	**Nb**
25	BV13	9	168	0,52	5
26	BV09	9	147	0,30	3
27	BV06	9	146	0,20	5
28	BV14	9	158	0,19	5
29	BV13	8	165	0,18	5
30	BV13	10	171	0,16	5
31	BV05.1	9	225	0,15	3
32	BV09	10	150	0,15	3
33	BV14	8	155	0,14	5
34	BV20	8	149	0,13	2

para | Peaks | New OligoScore

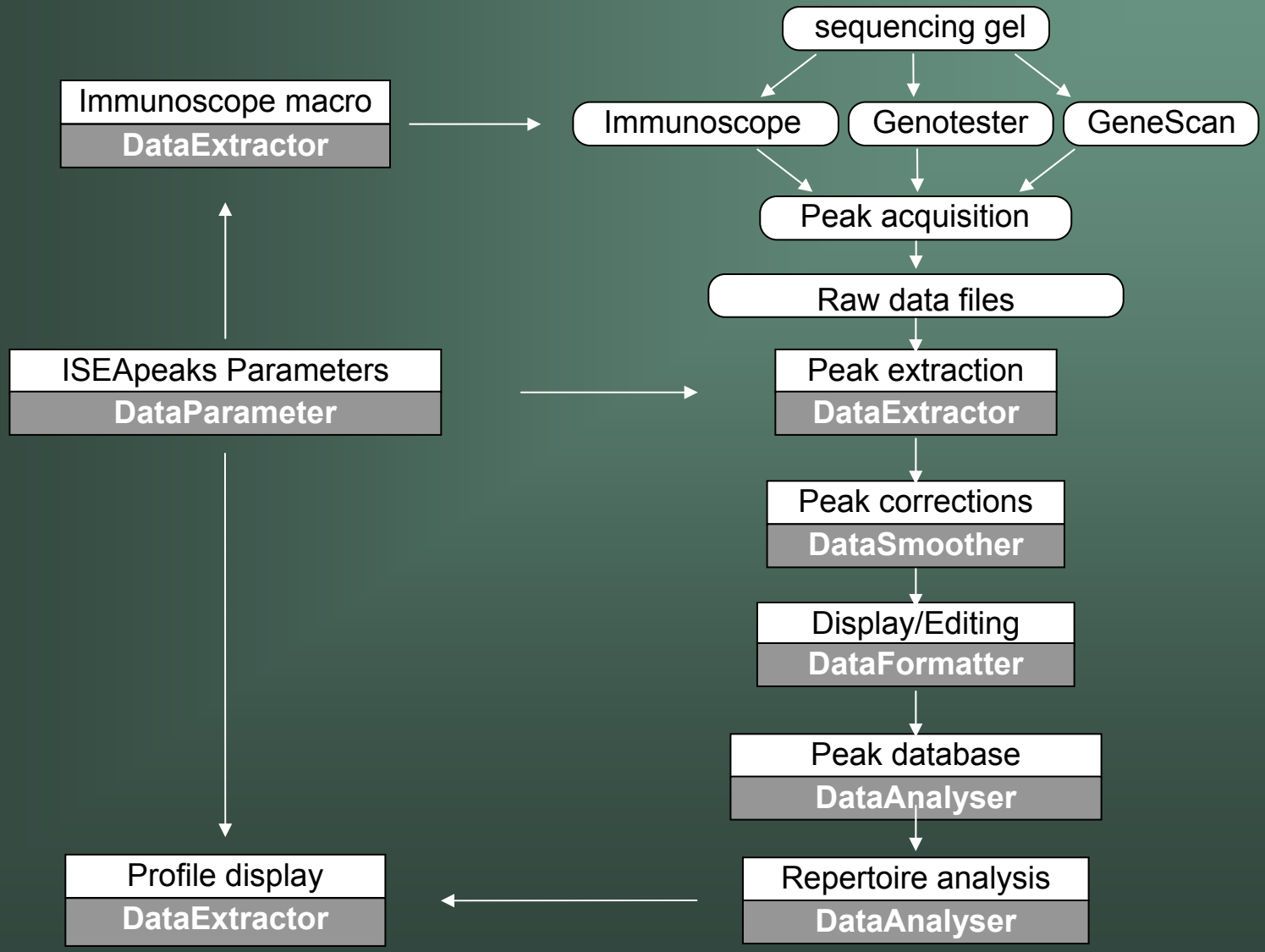
Collette et Six, 2002 *Bioinformatics*
Original data from Faure *et al.*, 1999 *J. Immunol.*

OligoScore (3)



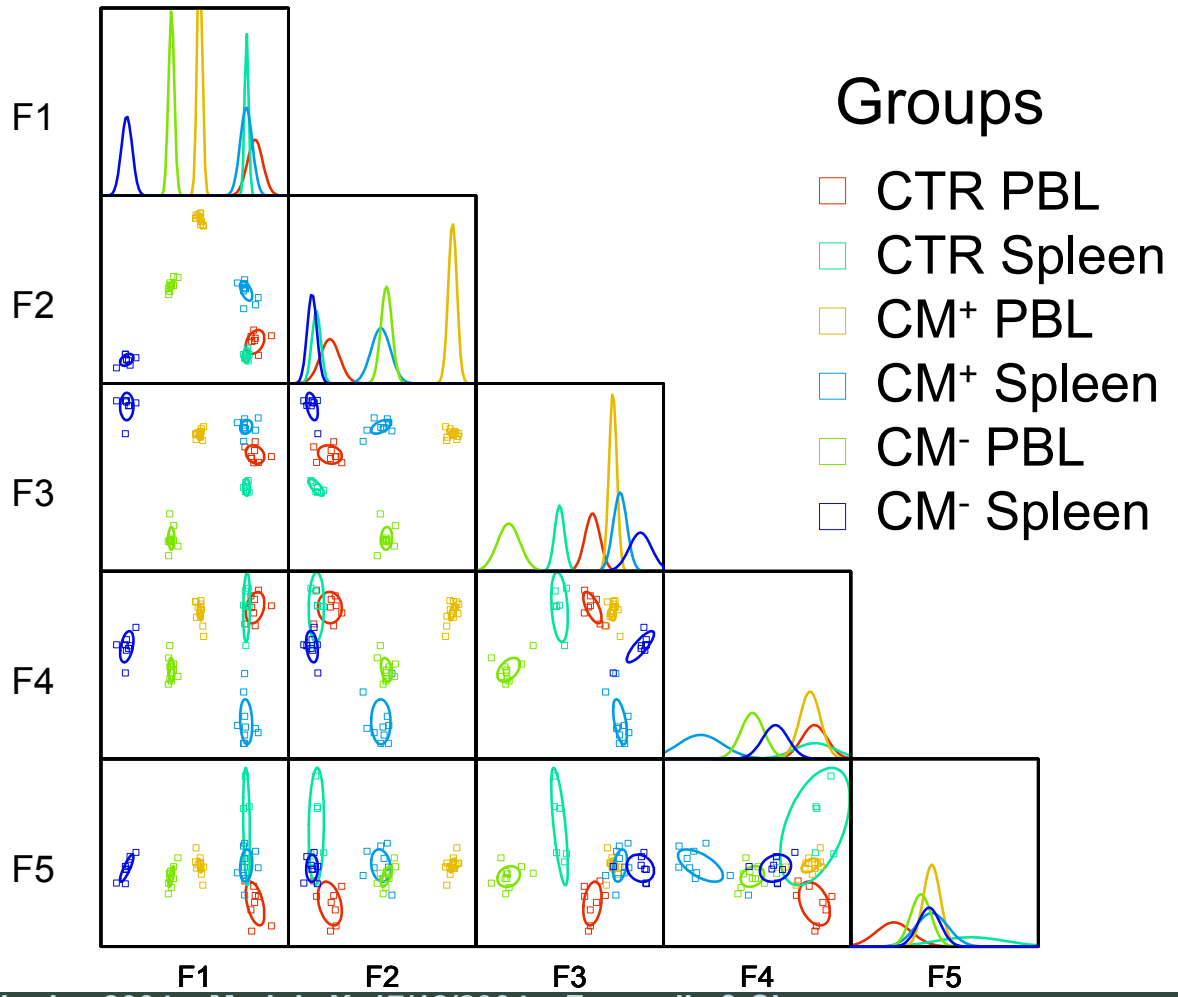
Original data from Faure *et al.*, 1999 *J. Immunol.*

The ISEApeaks software

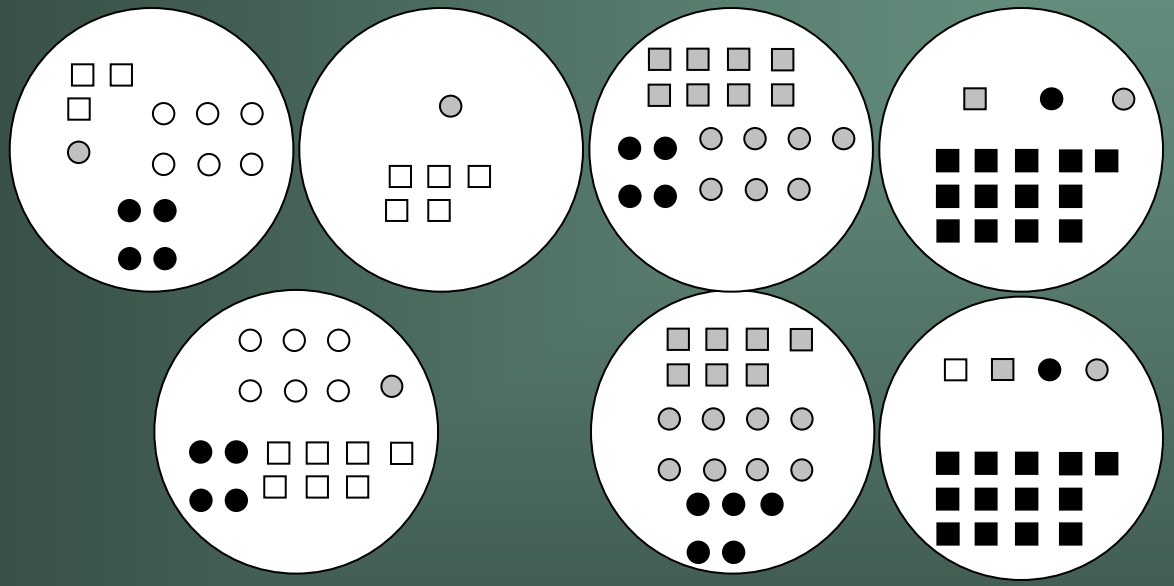


Collette et Six, 2002 *Bioinformatics*

Discriminant Analysis



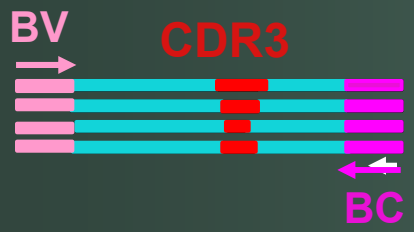
k-mean clustering



CTR PBL
CTR spleen
CM- PBL
CM- spleen
CM+ PBL
CM+ spleen

5- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

Analyse du répertoire : Stratégie



série **PCR TCR BV-BC**
Produits PCR marqués

Elèctrophorèse en gel d'acrylamide
(séquenceur automatique)

Immunoscope
Extraction des données

Stratégie ISEApeaks

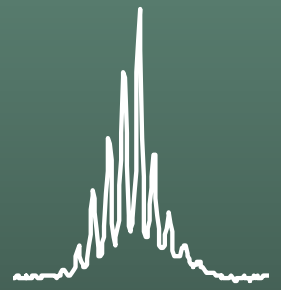
Base de données de pics

Estimation de la perturbation:

- Index **Gorochov** -> perturbation globale
- Index **Oligoscore** -> récurrence oligoclonale

Analyse Statistique
(ANOVA, Test de Fischer, …)

Profil de réarrangements en phase dit "Gaussien" ou ***polyclonal***



Profil de réarrangements en phase Irrégulier ou ***oligoclonal***

From Pannetier et coll., 1995 *Trends Immunol.*

Plan

1- Paludisme chez l'homme

2- Implication du SI- modèles murins

3- Objectifs de l'étude

4- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

5-Protocole expérimental

6- Résultats

7- Perspectives

5- Protocole expérimental

10^6 Globules rouges parasités par PbA

jour 0 **B10.D2** | **jour 3 p.i. (j3)** | **j4** | **j5** | **j6** | **j7⇒j11 NP+** | **Control**

rate, sang et cerveau

Isolement des lymphocytes
Extraction des ARN
Synthèse des ADNc
Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

Plan

1- Paludisme chez l'homme

2- Implication du SI- modèles murins

3- Objectifs de l'étude

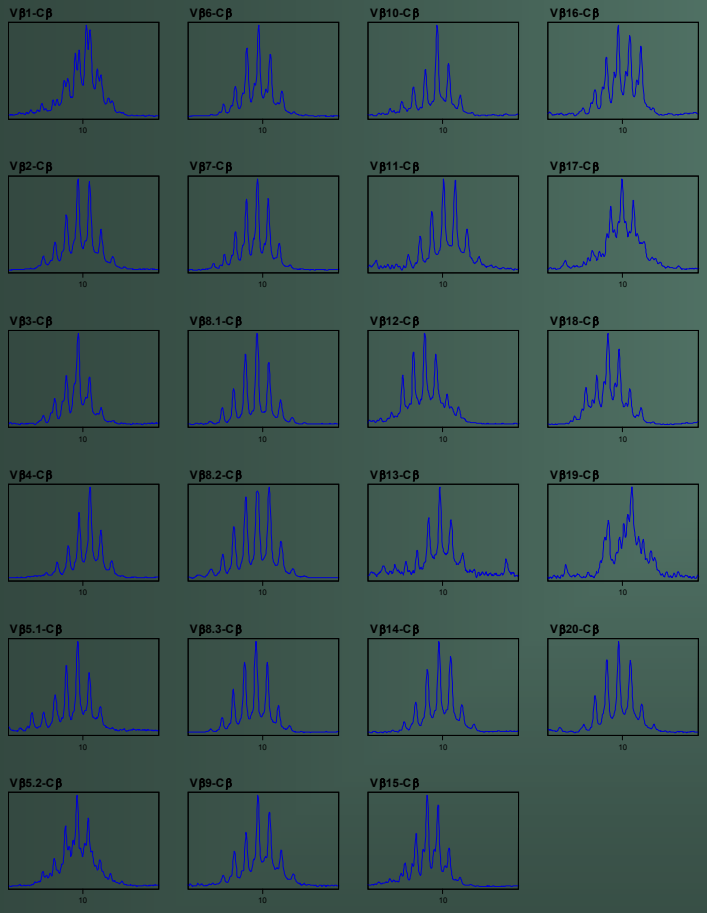
4- Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

5-Protocole expérimental

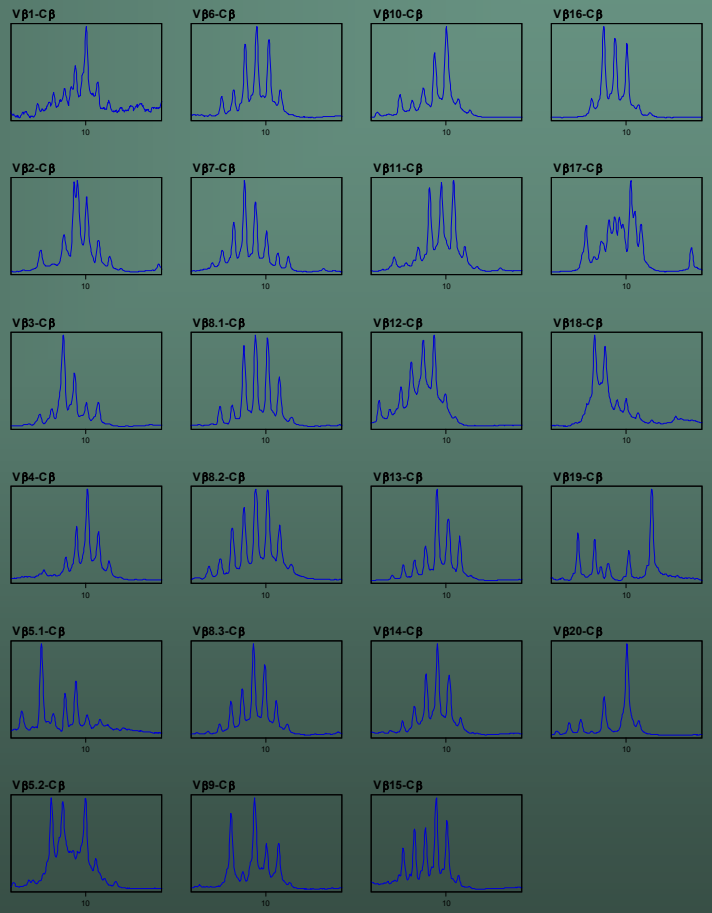
6- Résultats

7- Perspectives

Répertoires des PBL B10.D2

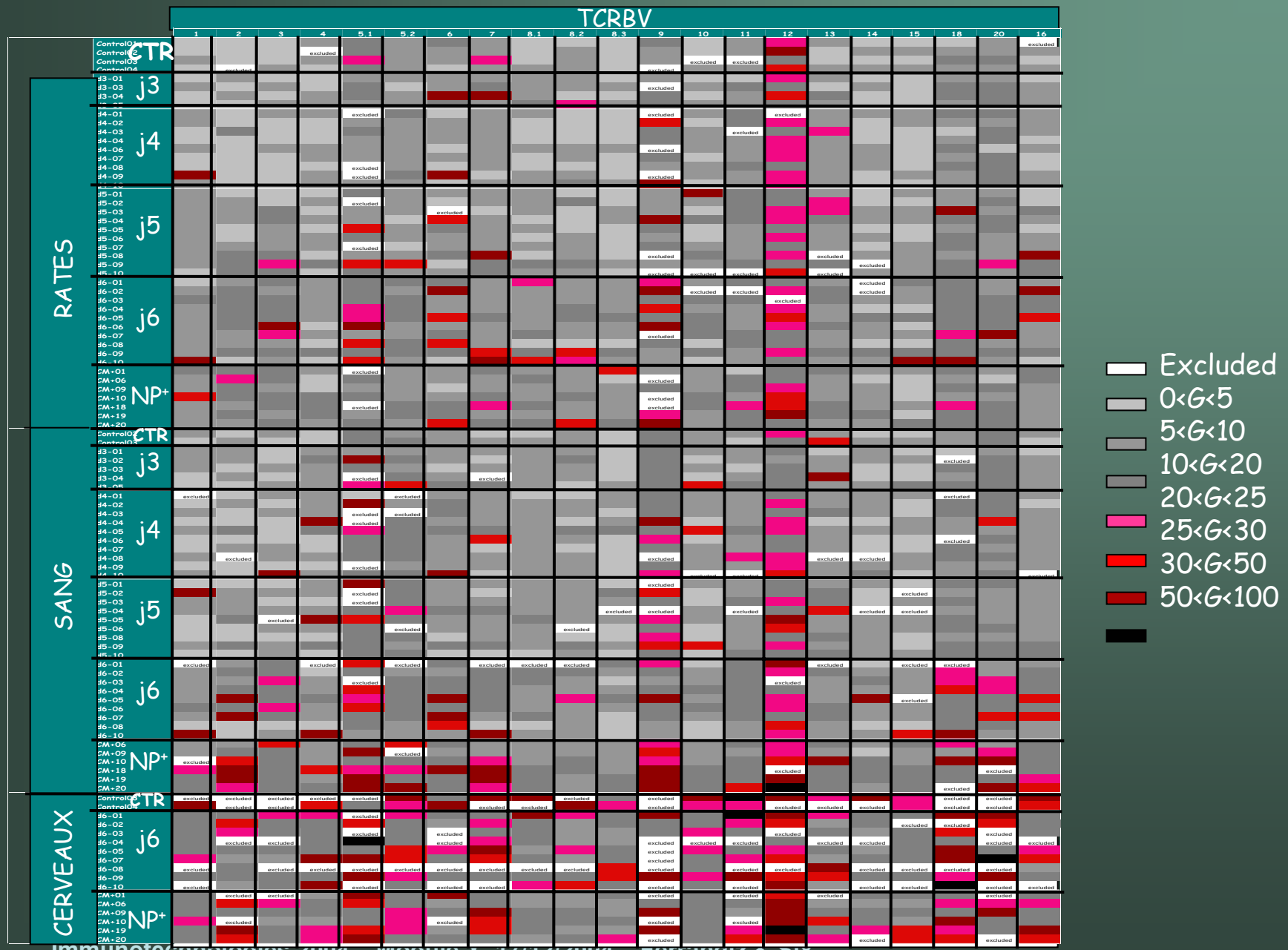


contrôle

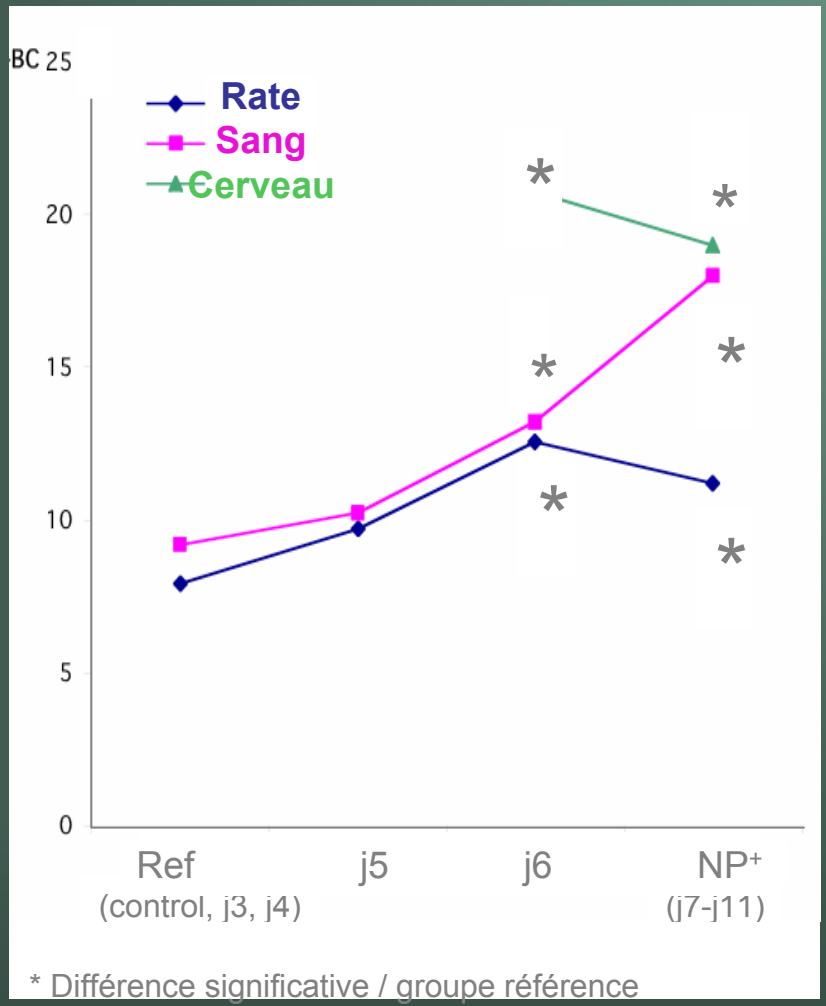


NP+

Draw Array

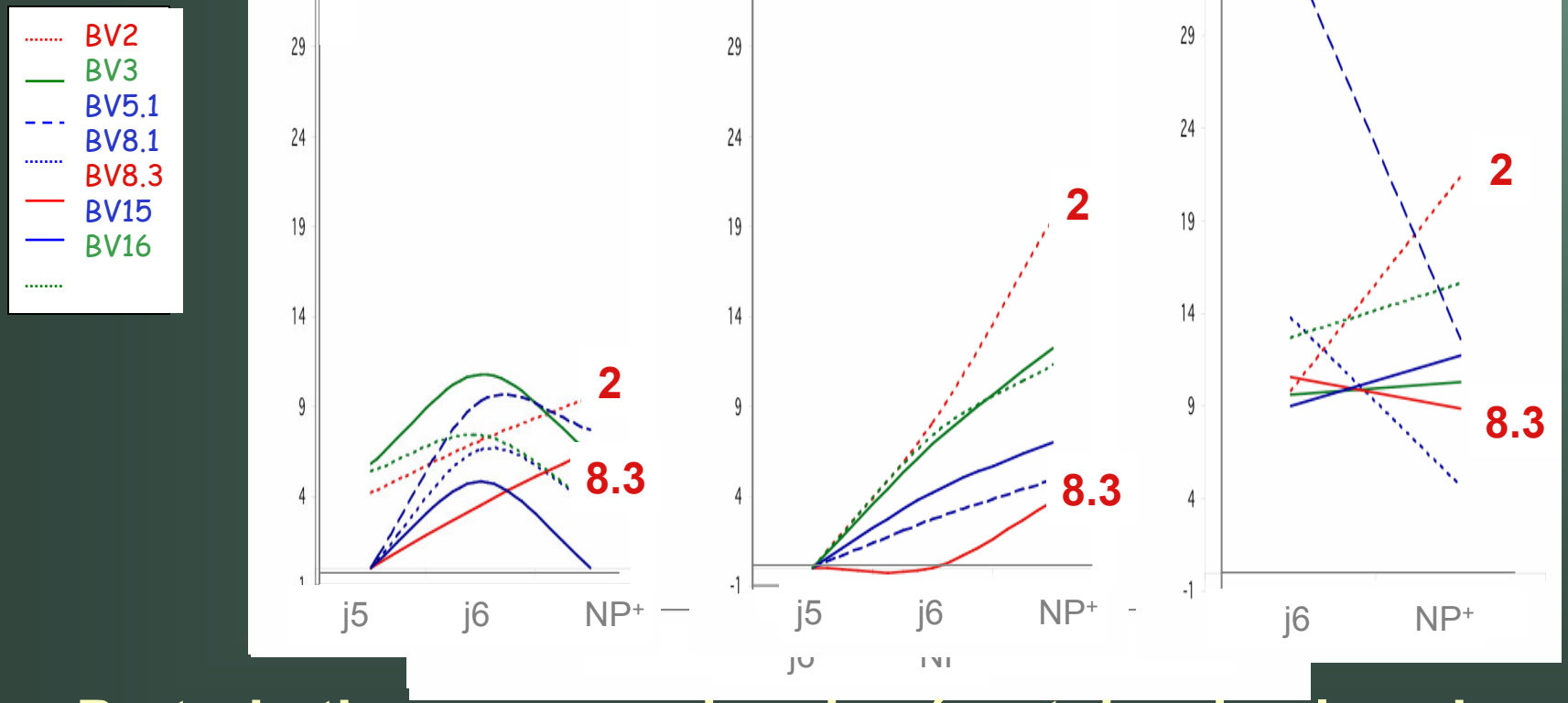

TCRBV
1
2
3
4
5.1
5.2
6
7
8.1
8.2
8.3
9
10
11
12
13
14
15
18
20
16
CERVEAUX
SANG
RATES
CTR
j3
j4
j5
j6
NP+
Excluded
0<G<5
5<G<10
10<G<20
20<G<25
25<G<30
30<G<50
50<G<100

% de la perturbation globale Gorochov



⇒ Perturbation significative à j6 & confirmation de nos observations précédentes pour les groupes contrôles et NP+.

% de la perturbation Gorochov par Vβ



⇒ **Perturbation progressive du répertoire des lymphocytes T au cours du temps et en fonction des compartiments**

Plan

1- Paludisme chez l'homme

2- Implication du SI- modèles murins

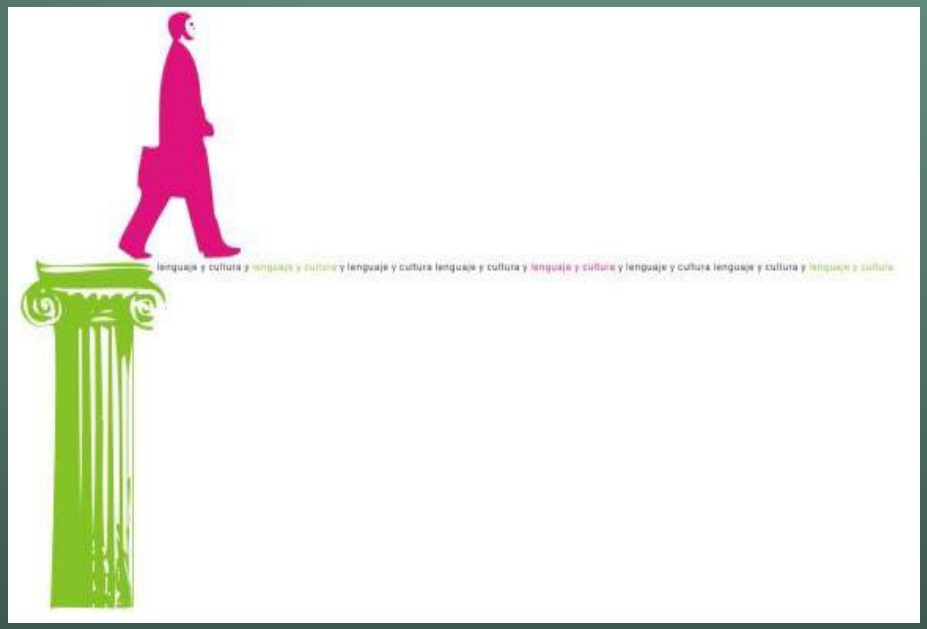
3- Objectifs de l'étude

4-Stratégie Immunoscope/ISEApeaks

5- Protocole expérimental

6- Résultats

7- Perspectives



Perspectives

Finaliser cette étude

- Analyse du répertoire BV-BJ repertoire
- Caractérisation de la nature des perturbations
- Séquençage

Préciser les résultats dans le cerveau

- Focalisation sur certains Vß
- Méthodes alternatives

=> Caractérisation des récurrences identifiées

Caractérisation des différences entre NP^+/NP^-

- lignée B10.D2 -> augmenter le nombre de souris par groupe
- Envisager une combinaison alternative du couple clone parasite/lignée de souris

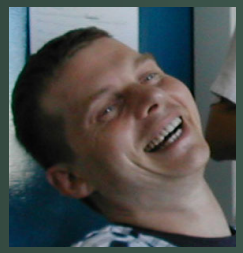
Remerciements

Immunophysiopathologie infectieuse
Institut Pasteur (Paris)

Directeur: Pierre-André Cazenave

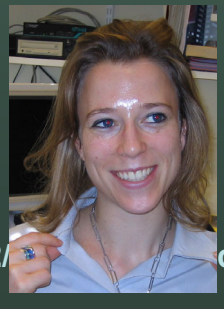
Responsable de thèse : Adrien Six

Olivier Gorgette



Sylviane Pied

Valérie Soulard



Sophie Dulauroy Anne-Laurence Blanc