



Génomique/transcriptome et immunologie :

un exemple dans le domaine de l'immunologie comparée

Contexte (I):

- **Intérêt renouvelé pour l'«innate immunity » (non spécifique, cellulaire ou via des médiateurs solubles)**
- **Conservation de ces mécanismes dans le monde animal (différents niveaux)**

Contexte (II):

- **Intérêt de la démarche comparée pour appréhender les limites et la flexibilité d'un ensemble de mécanismes**
- **Conservation des récepteurs, médiateurs, types cellulaires du système immunitaire chez les Vertébrés**



Où a t on identifié les molécules clés du SI des Vertébrés?

(Igs, TCR, MHC, cytokines, IFNs, Lymphocytes)

@ chez aucun invertébré

@ cas particulier des agnathes
(TCR-like fixe)

@ dans tous les taxons
de Gnathostomes,
TCR et Igs

Aucune trace dans le
Génome de Ciona

Intérêt des modèles téléostéens (poissons osseux) pour l'immunologie comparée

- **Intérêt agronomique et « modèles »**
- **Vertébrés , lointains parents des mammifères**
- **Génomique des poissons :**
 - **Génomes complets : fugu, tétraodon (as), medaka, danio(zebrafish)(as)**
 - **Banques d'ESTs (truite plie saumon, catfish ..) -> outils**

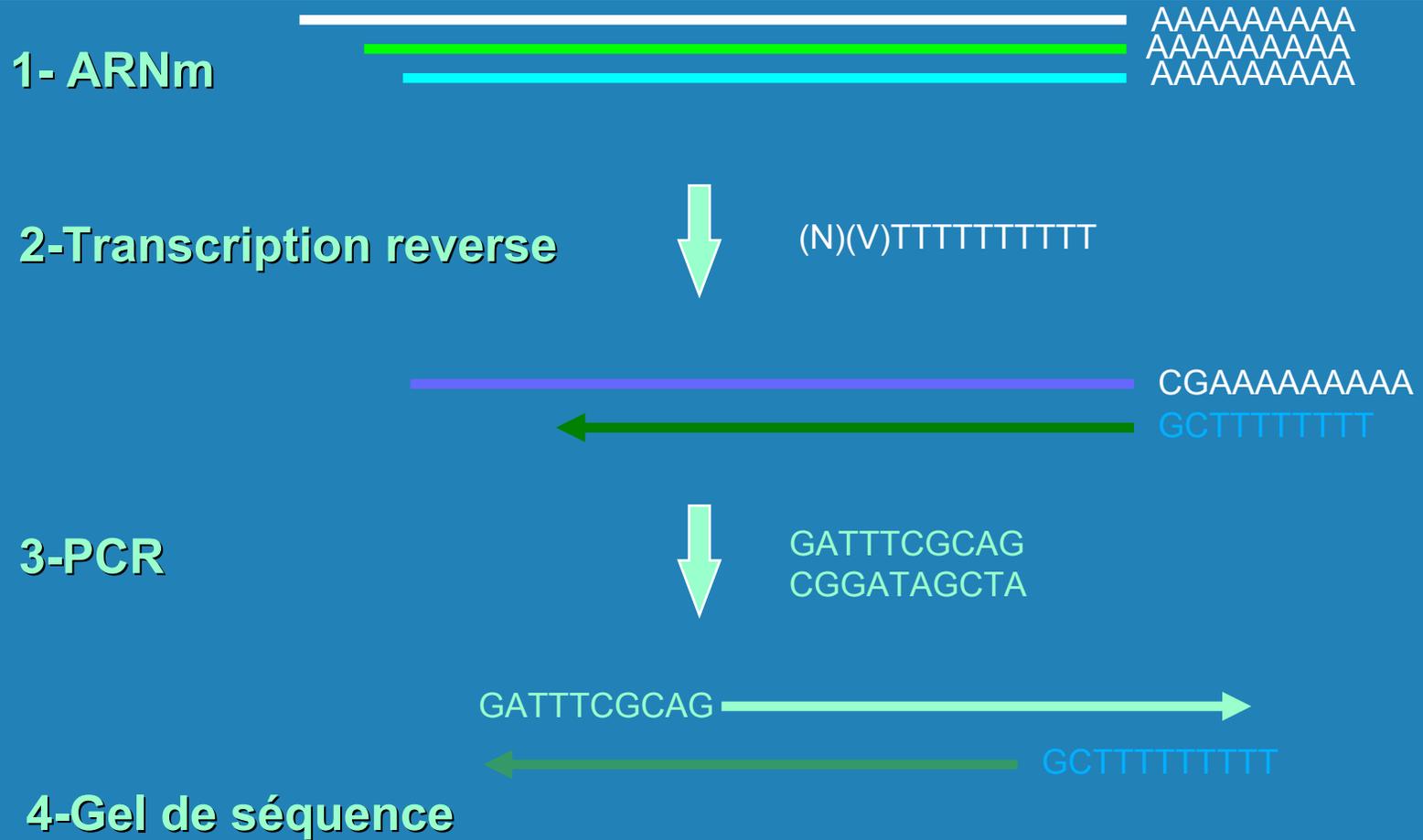
Passage d'une approche gène-candidat à une approche basée sur les outils et les apports de la génomique

- **Modèle** : truite arc-en-ciel et rhabdovirus de la SHV
- **Objectif**: établir le répertoire des gènes dont l'expression est modifiée par l'infection virale
- **Contexte**: recherche d'une compréhension globale des possibilités d'intégration des mécanismes disponibles chez les Vertébrés

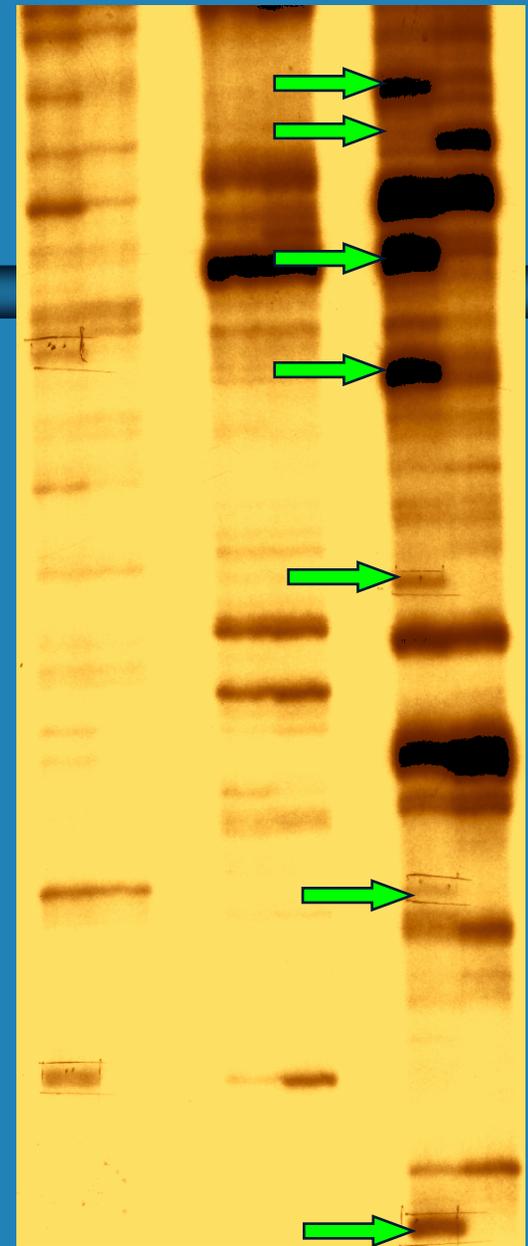
(I) «mRNA differential display »

- **Approche gène par gène**
- **Approche « exhaustive »**
- **Approche générant de nombreux faux-positifs**

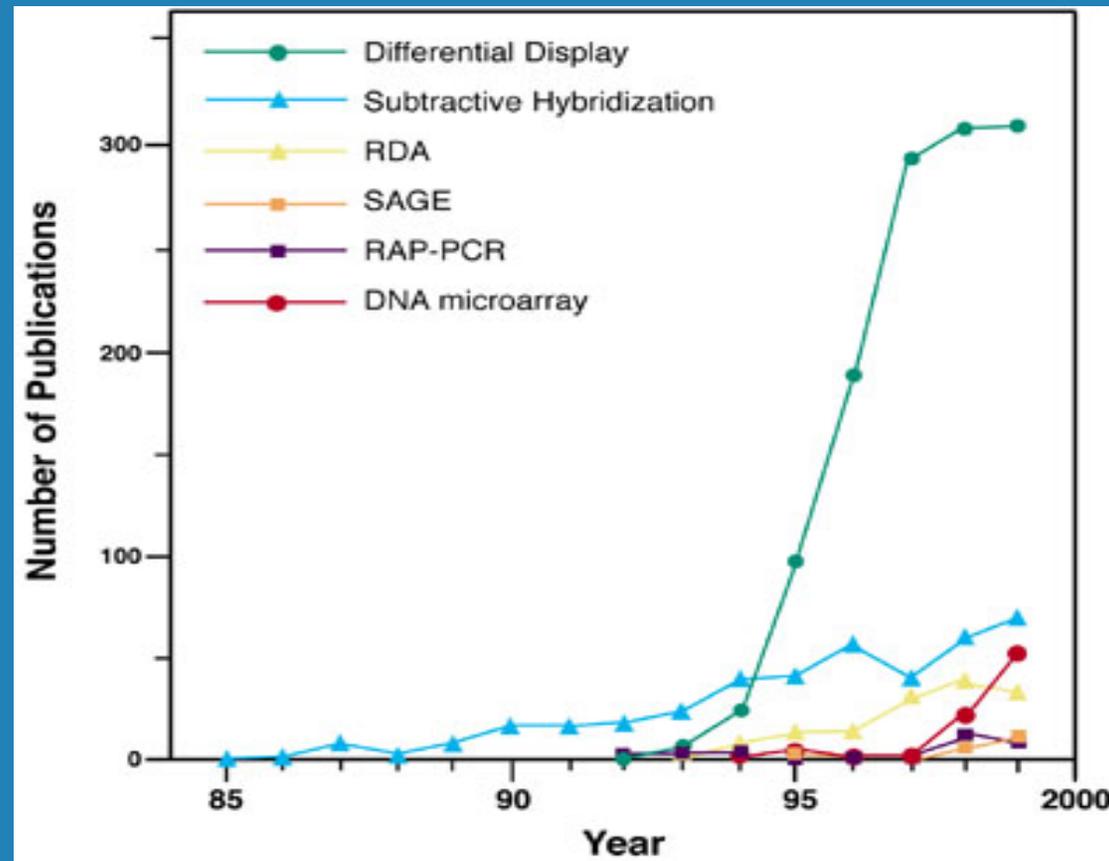
Principe

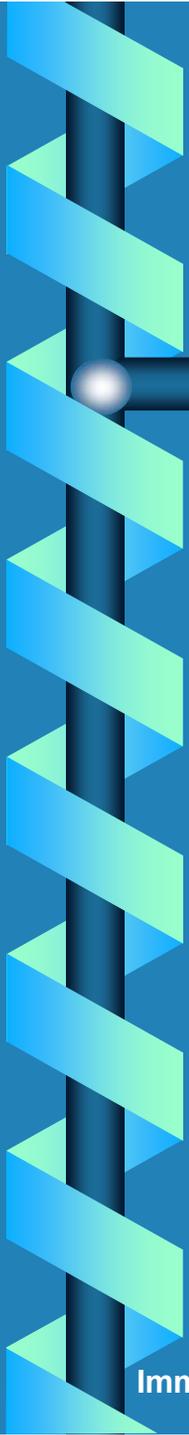


Gel mRNA-DD



(II) «mRNA differential display » : résultats...





Bilan mRNA-DD

Vig-1 et Vig-2, deux gènes nouveaux sur 60 bandes initiales

Vig-1, un nouveau gène viro-induit

- Induit par des virus, des glycoprotéines virales et l'IFN de type I
- Séquence et voies d'activation fortement conservées chez la truite et chez l'homme



***vig-1*, a New Fish Gene Induced by the Rhabdovirus Glycoprotein, Has a Virus-Induced Homologue in Humans and Shares Conserved Motifs with the MoxA Family**

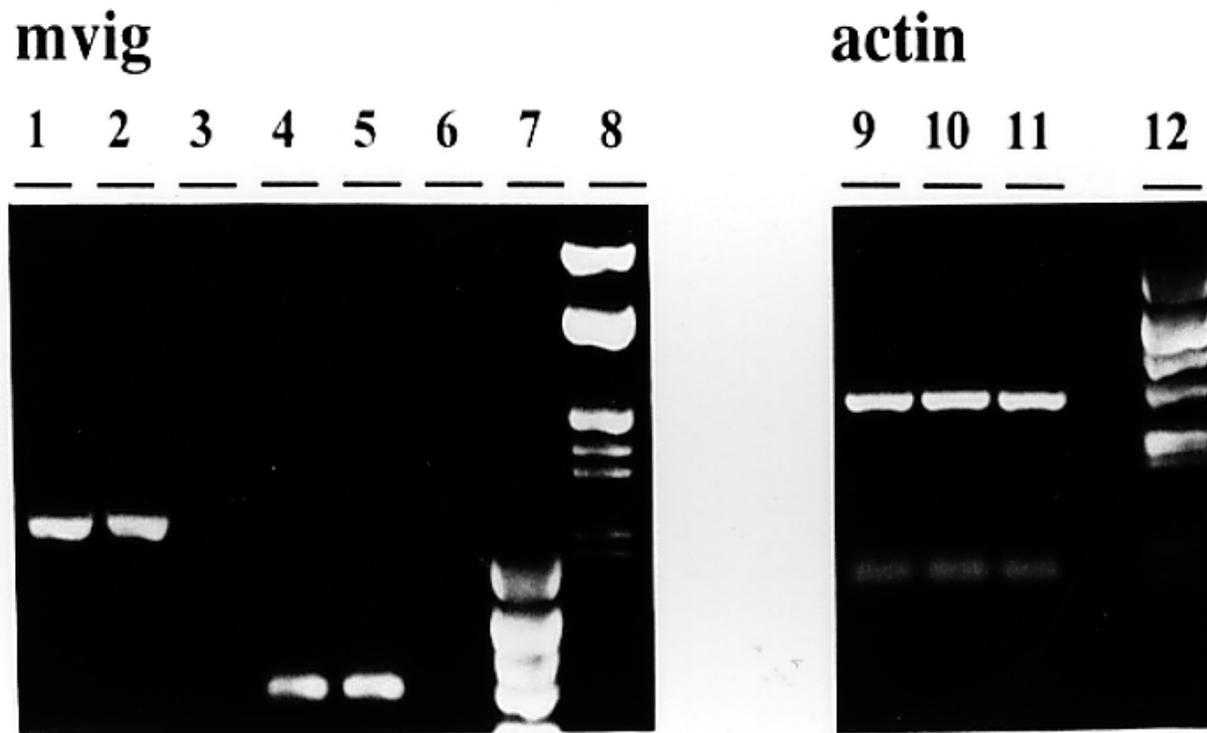
Pierre Boudinot, Pascale Massin, Mar Blanco, Sabine Riffault, and Abdenour Benmansour *Journal of Virology*, March 1999, p. 1846-1852, Vol. 73, No. 3

- • Jorgensen, J. B., Johansen, L.-H., Steiro, K., Johansen, A. (2003). CpG DNA Induces Protective Antiviral Immune Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L). *J. Virol.* 77: 11471-11479
- • Collet, B., Secombes, C. J. (2001). The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter: Structural and functional characterization. *Eur J Biochem* 268: 1577-1584
- • Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., Miller, N. E. (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* 29: 1097-1106

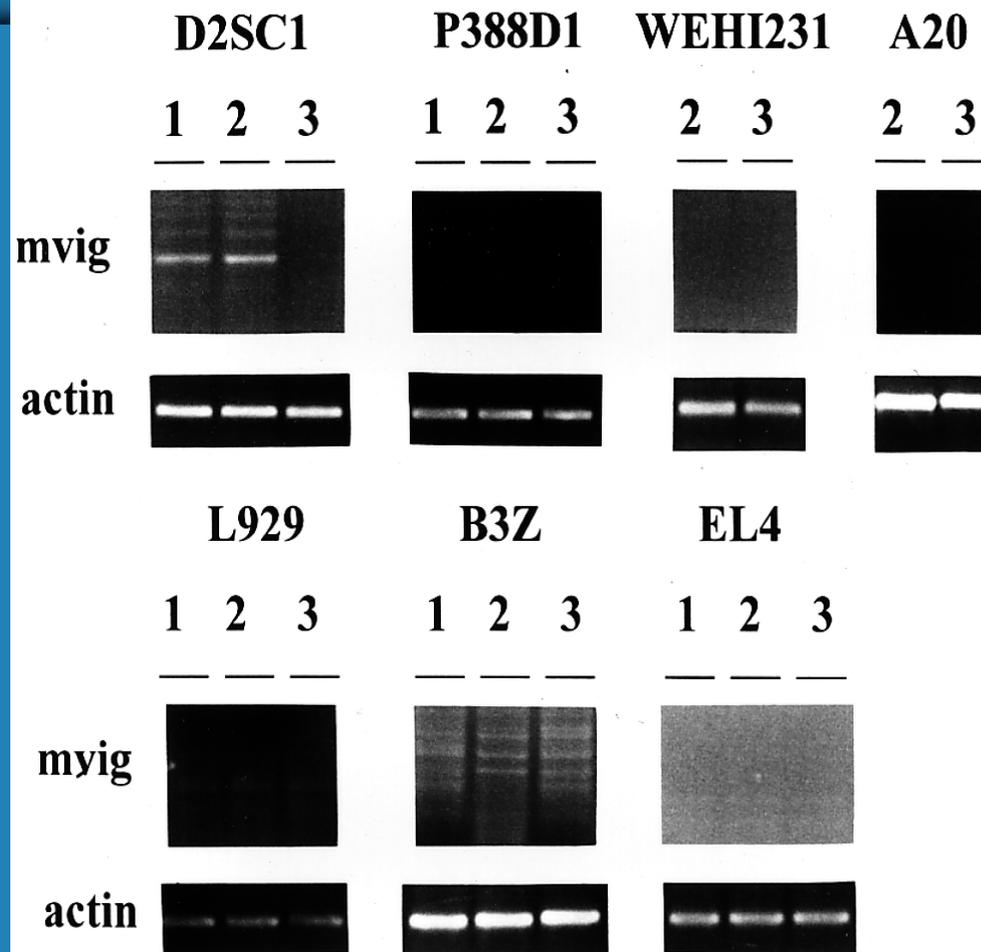
Vig-1, de la truite à la souris

- Identification de l'homologue murin de *vig1*
- Confirmation du caractère viro-induit
- Restriction apparente aux cellules dendritiques

Mvig est induit par le VSV ou le PrV dans les cellules de la rate



Mvig est induit dans une lignée dendritique





Vesicular stomatitis virus and pseudorabies virus induce a *vig1/cig5* homologue in mouse dendritic cells via different pathways Pierre Boudinot, Sabine Riffault, Samia Salhi, Charles Carrat, Christine Sedlik, Nassira Mahmoudi, Bernard Charley and Abdenour Benmansour *Journal of General Virology* (2000), **81**, 2675-2682.

K.-C. Chin and P. Cresswell Inaugural Article: Viperin (*cig5*), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus PNAS, December 18, 2001; 98(26): 15125 - 15130.

Viperin homologue humain de Vig-1

```

human Viperin 1  MWLTPAAFA  GELLSVERQP  LESLNRSQVP  LFCMLRATFY  LLATYRRNCC
mouse Viperin 1  --KLTPATA  RELLSERQQ  ILELNQLLA  LFCMLRATLQ  WLDPG--KSC
Best5 1  --KLTPATA  RELLSERQQ  ILELNQLLA  LFCMLRATLQ  WDDPG--KSC
Vig-1 1  MFLCPC---  -----  MSF  LQCFAAVLA  WIGVQ  |

human Viperin 51  LVLRG-PDET  KRRRDRPL-  -ET-----  FHSVNVHPT  RQSNY
mouse Viperin 47  FCVRGELEET  RHTQEDNST  QST-----  FHSVNVHPT  RQSNY
Best5 47  FVVRGEPKKT  QRTHEDEHRA  QET-----  FHSVNVHPT  RQSNY
Vig-1 58  FVGCASQPSST  QRYNRETIKY  QNYVLSQASA  FHSVNVHPT  RQSNY

human Viperin 91  FHTAKTSPVL  PLRBAKRGLL  LLKQDLEK  NPSGSEPTLQ  DRGEY
mouse Viperin 90  FHTAKTSPVL  PLRBAKRGLL  LLKQDLEK  NPSGSEPTLQ  DRGEY
Best5 90  FHTAKTSPVL  PLRBAKRGLL  LLKQDLEK  NPSGSEPTLQ  DRGEY
Vig-1 78  FHTAKTSPVL  PLRBAKRGLL  LLKQDLEK  NPSGSEPTLQ  DRGEY

human Viperin 141  RFCRVELRLP  SVSIVSNGSL  ILEKRFQNYG  EYLDLAISS  DPFDS
mouse Viperin 140  RFCRVELRLP  SVSIVSNGSL  ILEKRFQNYG  EYLDLAISS  DPFDS
Best5 140  RFCRVELRLP  SVSIVSNGSL  ILEKRFQNYG  EYLDLAISS  DPFDS
Vig-1 128  RYKVELRLP  SVSIVSNGSH  ILEKRFQNYG  EYLDLAISS  DPFDS

human Viperin 191  ICRGCKKSH  VENLQKLRW  CRDYKVAFK  NSVLRNFV  EUMNS
mouse Viperin 190  ICRGCKKSH  VENLQKLRW  CRDYKVAFK  NSVLRNFV  EUMNS
Best5 190  ICRGCKKSH  VENLQKLRW  CRDYKVAFK  NSVLRNFV  EUMNS
Vig-1 178  ICRGCKKSH  VENLQKLRW  CRDYKVAFK  NSVLRNFV  EUMNS

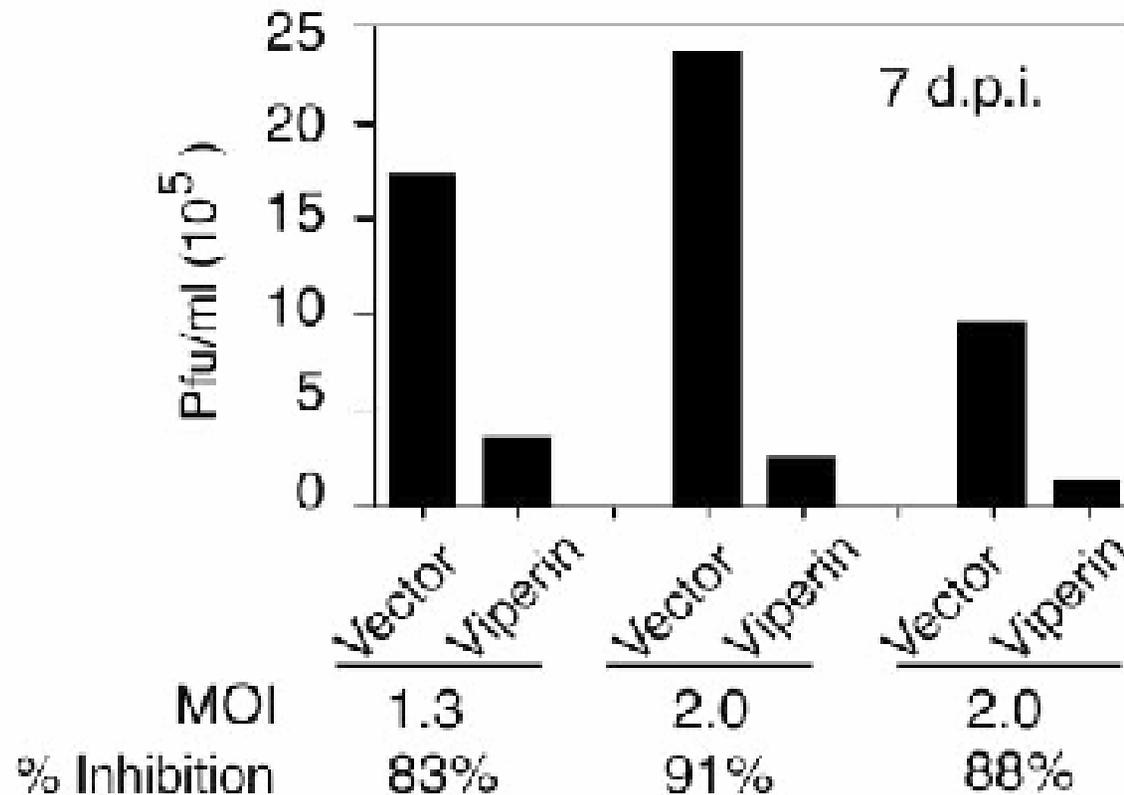
human Viperin 241  NFRWKVPQC  LLIEGNSGE  DALRBAERFL  CSHEEFERFL  BRKKT
mouse Viperin 240  NFRWKVPQC  LLIEGNSGE  DALRBAERFL  CSHEEFERFL  BRKKT
Best5 240  NFRWKVPQC  LLIEGNSGE  DALRBAERFL  CSHEEFERFL  BRKKT
Vig-1 228  NFRWKVPQC  LLIEGNSGE  NSLRBAERFL  CSHEEFERFL  BRKKT

human Viperin 291  FESRQMKDS  YLILDEYNRF  LNCRGRKNDP  SKSILDVGV  BAIRK
mouse Viperin 290  FESRQMKDS  YLILDEYNRF  LNCRGRKNDP  SKSILDVGV  BAIRK
Best5 290  FESRQMKDS  YLILDEYNRF  LNCRGRKNDP  SKSILDVGV  BAIRK
Vig-1 278  FESRQMKDS  YLILDEYNRF  LNCRGRKNDP  SKSILDVGV  BAIRK

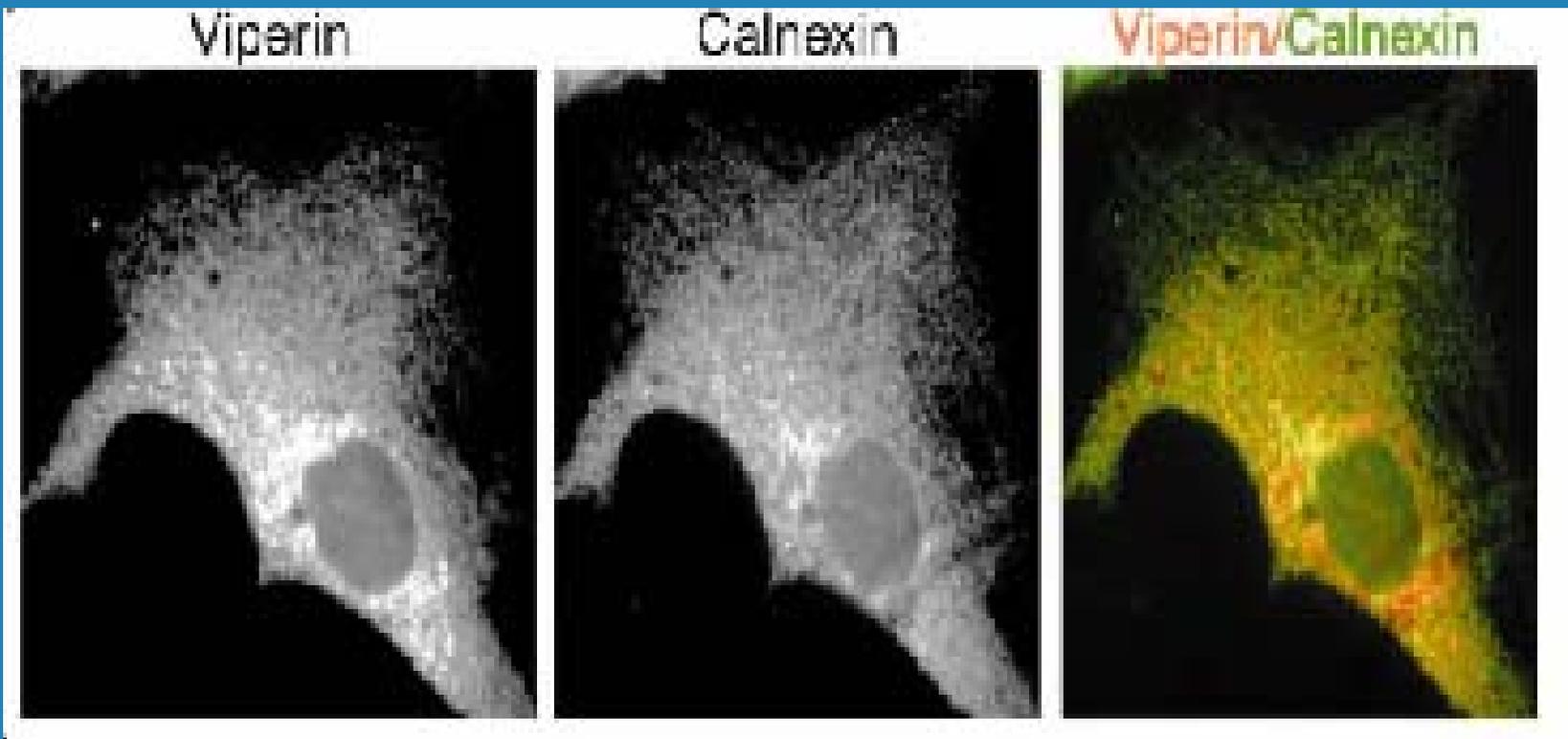
human Viperin 341  SNFLKRGSKY  WNSKADLKD  W
mouse Viperin 340  SNFLKRGSKY  WNSKADLKD  W
Best5 340  SNFLKRGSKY  WNSKADLKD  W
Vig-1 328  SNFLKRGSKY  WNSKADLKD  W

```

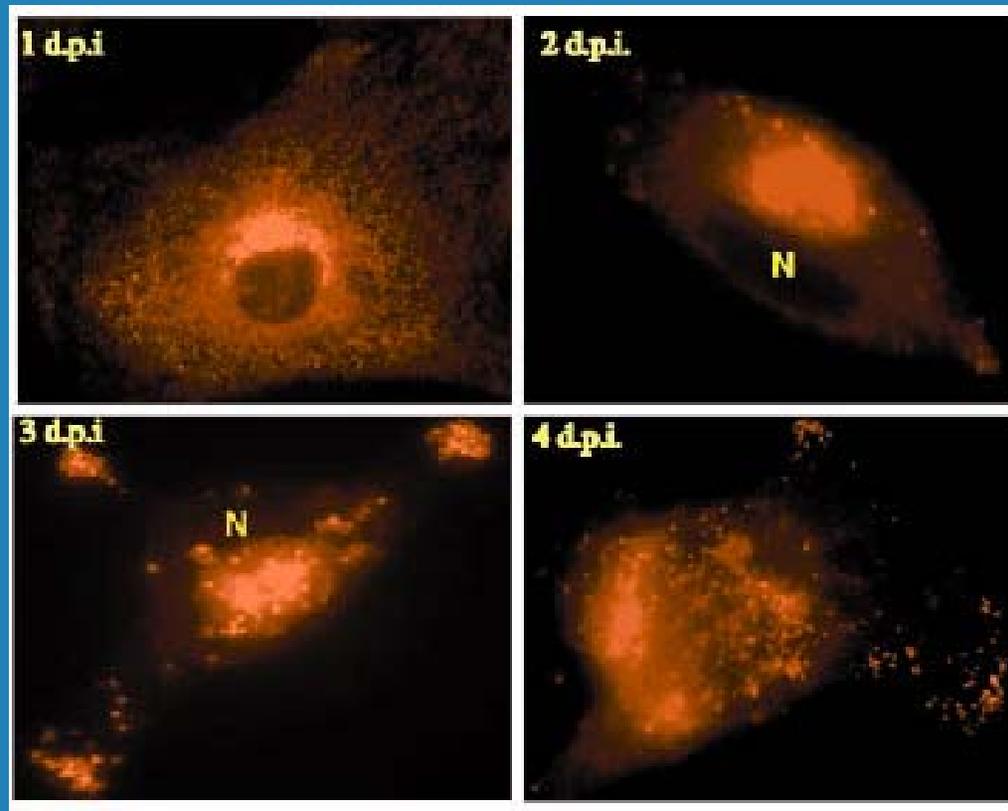
Expression de Viperin inhibe HCMV



Viperin induite par l'IFN localisée dans le RE



HCMV induit une redistribution au golgi et dans des vacuoles cytoplasmiques



A l'issue de cette démarche:

- **Viperin a un effet antiviral si elle est déjà présente**
- **En absence de virus, elle se localise à la face cytoplasmique du RE**
- **HCMV induit une co-localisation de gB et de viperin au Golgi (évasion?) et à des vacuoles cyt**

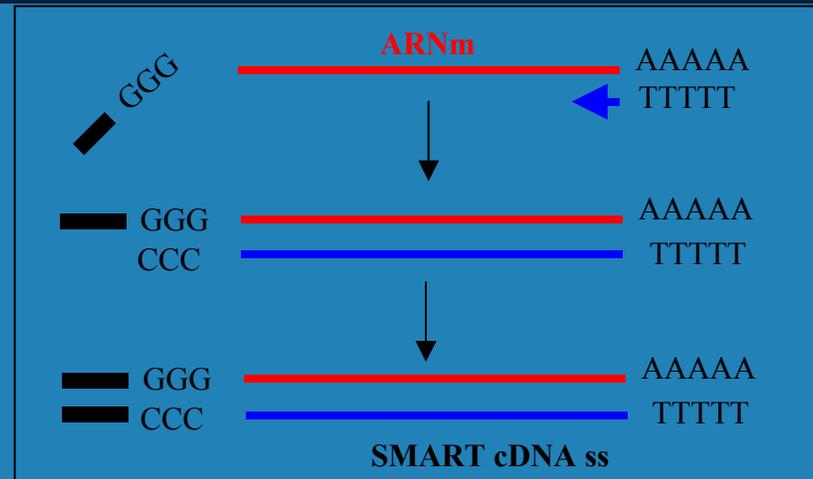


(II) « Subtractive Suppressive Hybridization »

- **Approche semi-globale**

SSH : Suppression Subtractive Hybridization

ARN total → Synthèse de cDNA (SMART)



Adaptateur 1



Digestion du cDNA par *RsaI*

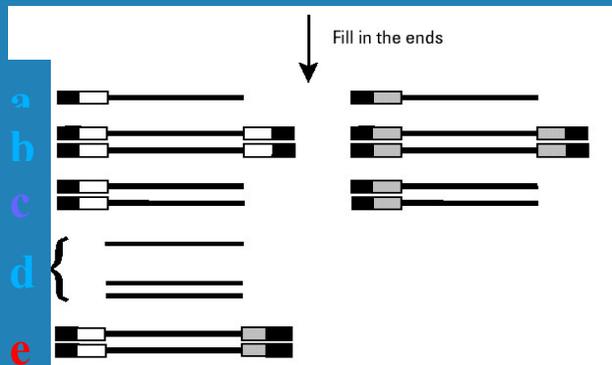
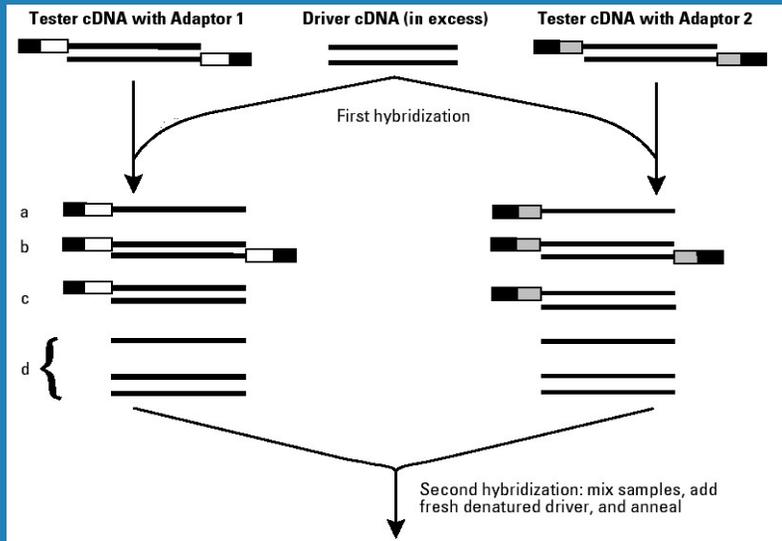
cDNA tester (virus)

cDNA driver (contrôle)

Ligation aux adaptateurs



SSH



Add primers
Amplify by PCR

a- no amplification

b- no amplification



c- linear amplification

d- no amplification

e- exponential amplification



Clone purified
PCR



Première banque SSH

- **Leucocytes de truite**
- **Infectés in vitro par VSHV**



☞ **350** clones obtenus de la banque de cDNA soustraite



Criblage différentiel de la banque par hybridation avec des sondes complexes issues de 4 lots de cDNA

☞ cDNA soustrait réverse (Contrôle -Virus)

☞ cDNA non soustrait Contrôle

☞ cDNA non soustrait Virus

☞ cDNA soustrait direct (Virus - Contrôle)



100 clones sélectionnés
et séquencés

RT-PCR semi-quantitative des gènes identifiés



Actine B29 Vig-2 B44 B6 A83 A14



B32 B312 B305 B126 vig-1 Mx-3 B153



B68 B17 B225 B12 B203 B88 B51



B319 B21 B160 B124 B324 B191

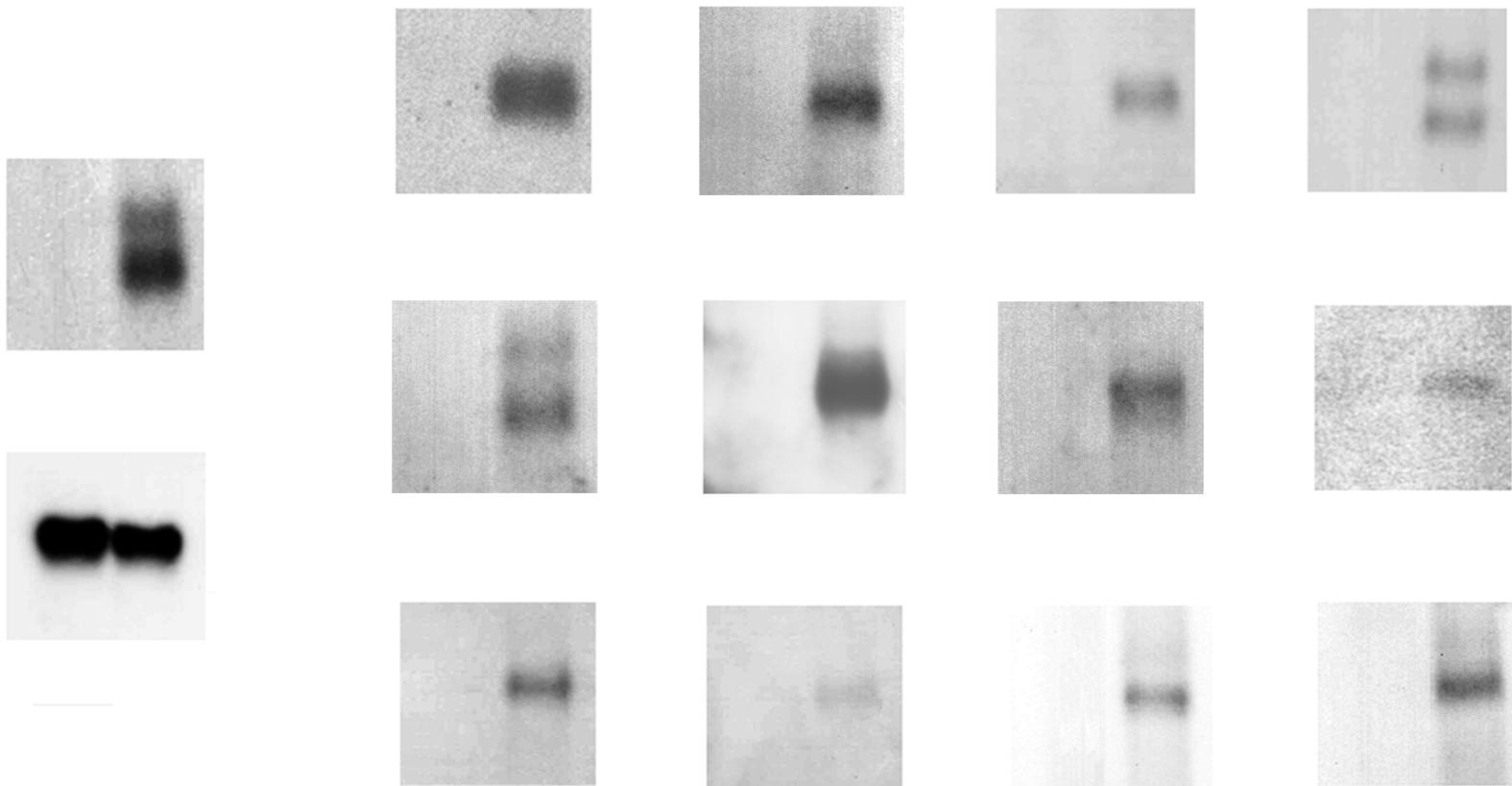
11 gènes choisis pour une analyse approfondie

Clone	Similarité	Espèce
A29	Ubiquitin-like protein	<i>Carassius auratus</i>
B6	Retinoic acid- and interferon-inducible protein (58kD)	<i>Homo sapiens</i>
B17	Transmembrane protein 7	<i>Homo sapiens</i>
	28kD interferon alpha resp. pr.	<i>Mus musculus</i>
B126	Transmembrane pr. (6 TM regions)	<i>Mus musculus</i>
A14	CXC-Chemokine #1	<i>Lampetra fluviatilis</i>
B68	CXC-Chemokine #2	<i>Sus scrofa</i>
A83	Galectin like protein	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
B32	Estrogen responsive finger protein	<i>Homo sapiens</i>
B51	Coatomer subunit complex	<i>Mus musculus</i>
B12	Unnamed protein product	<i>Homo sapiens</i>
B203	KIAA1769 protein	<i>Homo sapiens</i>

Sur ces gènes:

- ☞ Validation définitive du caractère différentiel par **Northern blot**
- ☞ Obtention du **cdNA complet** : 5 ' et 3 ' RACE
Puis nouvelle recherche de similarité
- ☞ Etude de l'induction :
 - * *in vivo*
 - * **Par l'activité IFN-like**

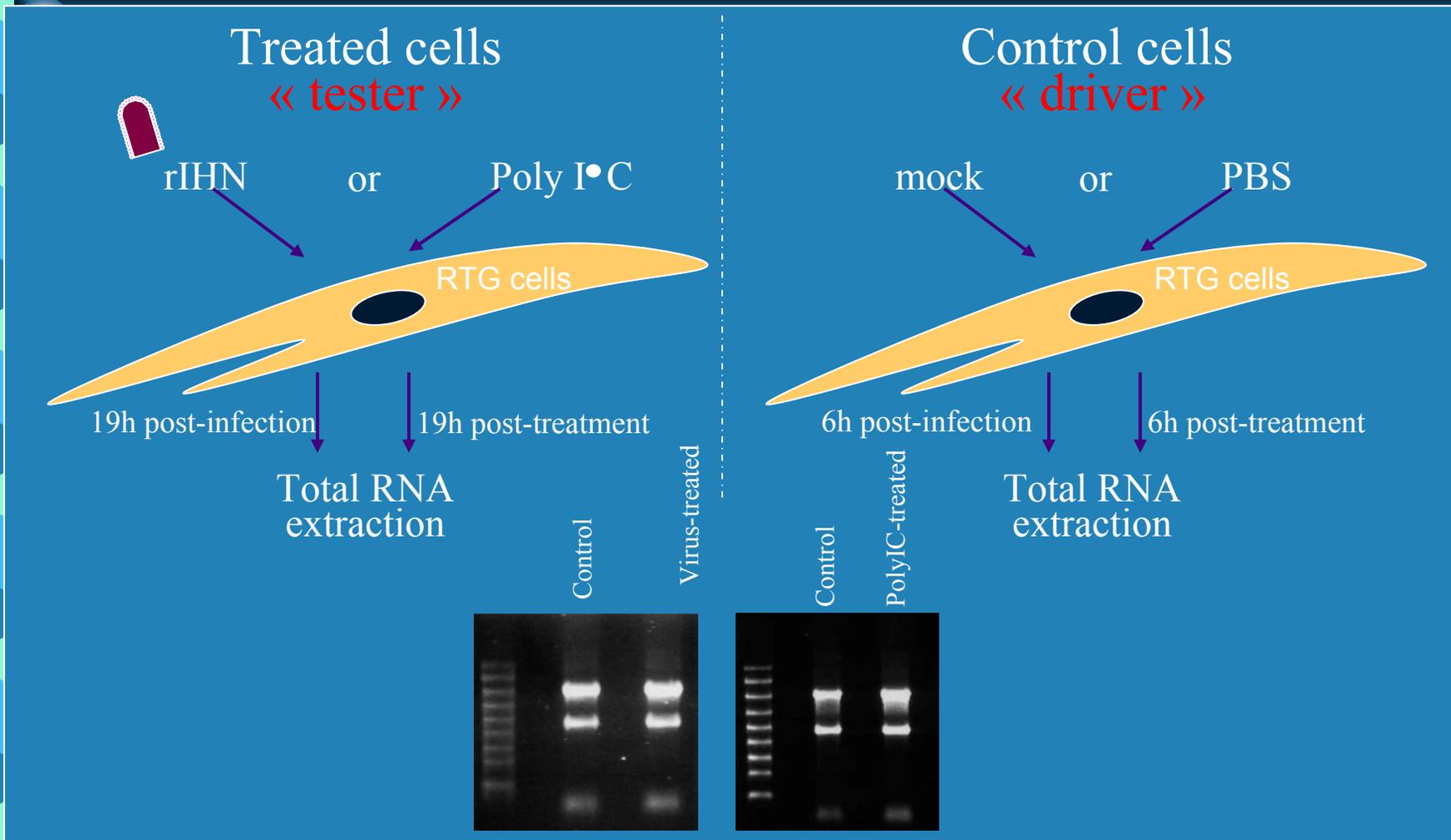
Northern Blot



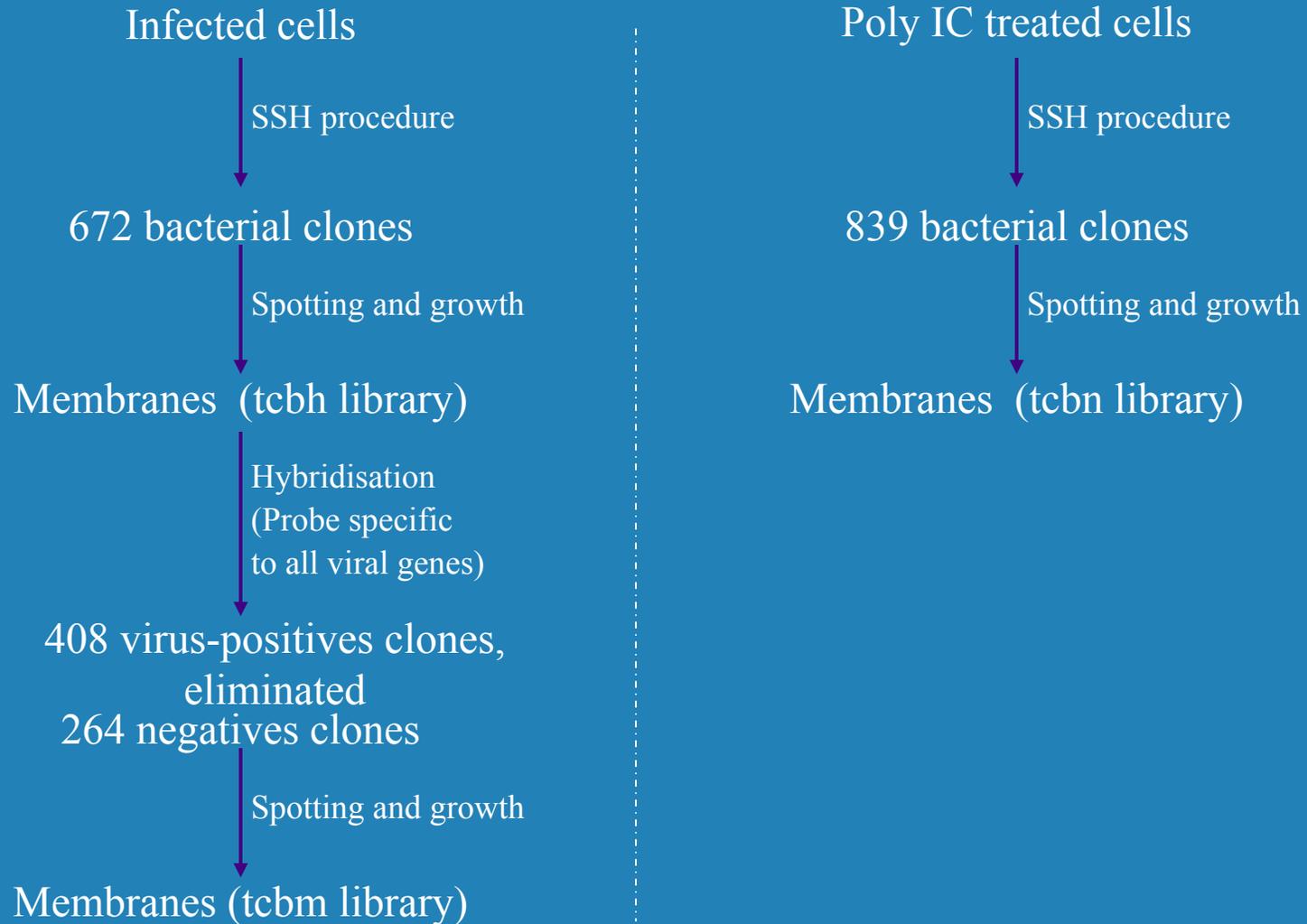
Nouveaux gènes décrits: Classes fonctionnelles

Clone	Similarité la plus élevée	Espèce	probabilité, % d'homologie x/y acides aminés
Interferon responsive genes			
A29	ubiquitin-like protein	<i>Carassius auratus</i>	2e-39, 55 % 86/156
B6	retinoic acid- and interferon-inducible protein (58kD)	<i>Homo sapiens</i>	3e-34, 31 % 106/335
B17	transmembrane protein 7	<i>Homo sapiens</i>	4e-22, 35% 58/164
	28kD interferon alpha responsive protein	<i>Mus musculus</i>	2e-17, 30% 50/163
B126	Transmenbrane protein	<i>Mus musculus</i>	5e-44, 41% 99/238
Chemo-attractants			
A14 (CXC1)	LFCA-1 protein	<i>Lampetra fluviatilis</i>	1e-11, 36% 33/90
B68 (CXC2)	platelet basic protein	<i>Susscrofa</i>	8e-12, 47% 36/76
A83	galectin like protein	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	4e-63, 47 % 122/259
Subcellular compartments			
B32	estrogen responsive finger protein	<i>Homo sapiens</i>	7e-37, 40% 75/183
B51	coatomer	<i>Mus musculus</i>	2e-42, 85% 82/96
Nucleic acid bindingprotein			
B12	Unnamed protein product	<i>Homo sapiens</i>	2e-59, 45% 124/273
B203	KIAA1769 protein	<i>Homo sapiens</i>	8e-85, 47% 164/348

Nouvelles banques soustraites



Banques soustraites:



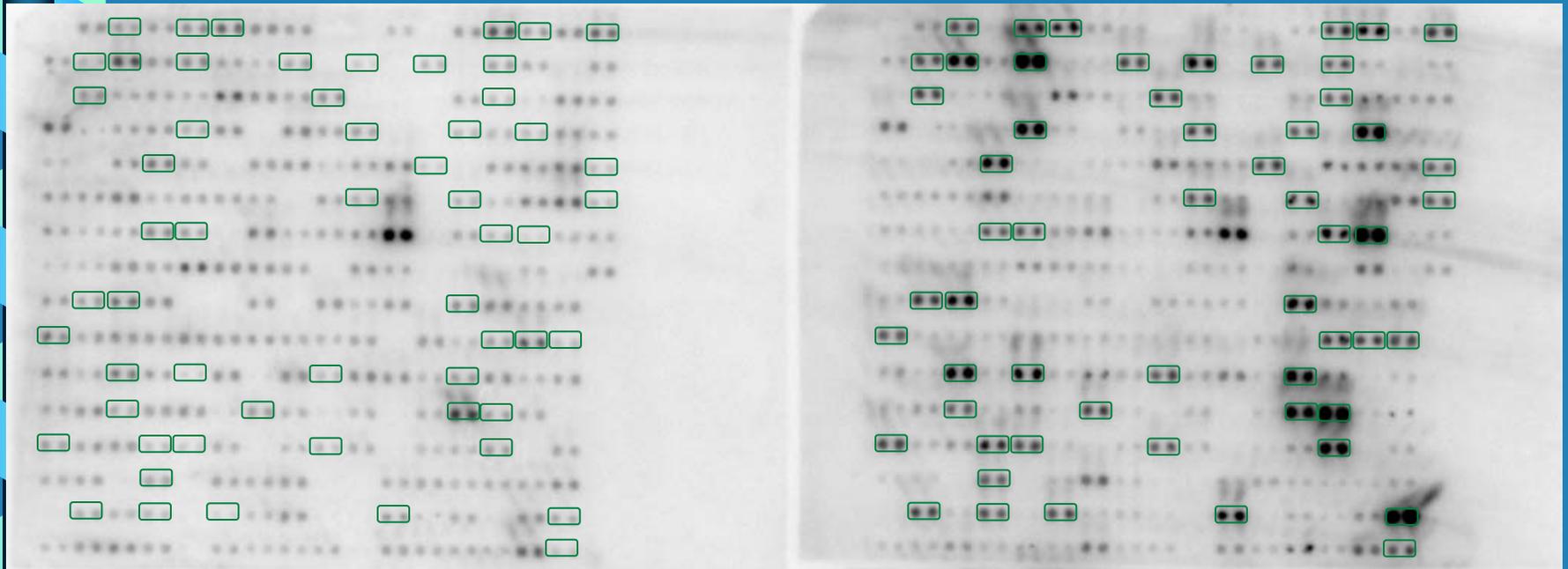
Sondes

- Hybridation sondes ^{32}P
 - a) direct subtracted cDNA (“treated - control”)
 - b) non subtracted virusd-cDNA
 - c) reverse subtracted cDNA (“control - treated”)
 - d) control cDNA

Criblage « macro array »

Reverse subtracted cDNA probe
« control cells »

Direct subtracted cDNA probe
« virus-treated cells »





(III) « macro-arrays »

- **Approche quasi-globale**

Banque cDNA truite multi-tissus

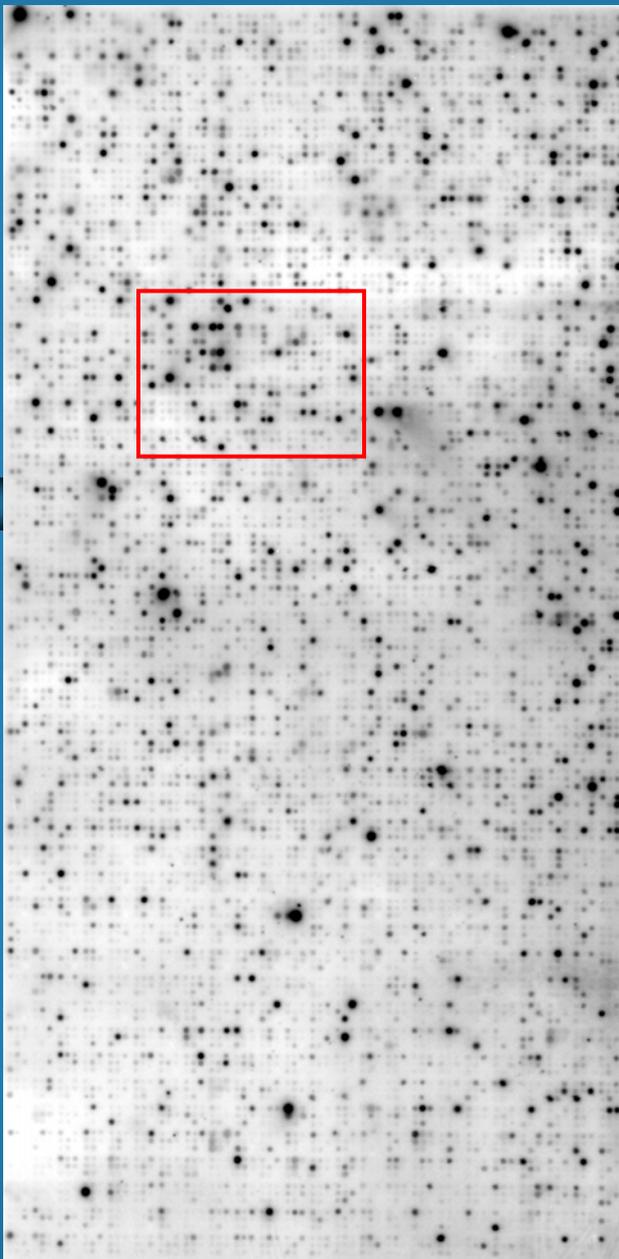
- **Tissus**
 - **Foie**
 - **Cerveau**
 - **Muscle**
 - **sang**
 - **Intestin**
 - **Testicule et ovaire**
 - **Tissu adipeux**
 - **hypophise**
 - **rein**
- **Situations physiologiques**
 - **Stress**
 - **VHSV**

Essai d'Hybridation sur filtres primitifs

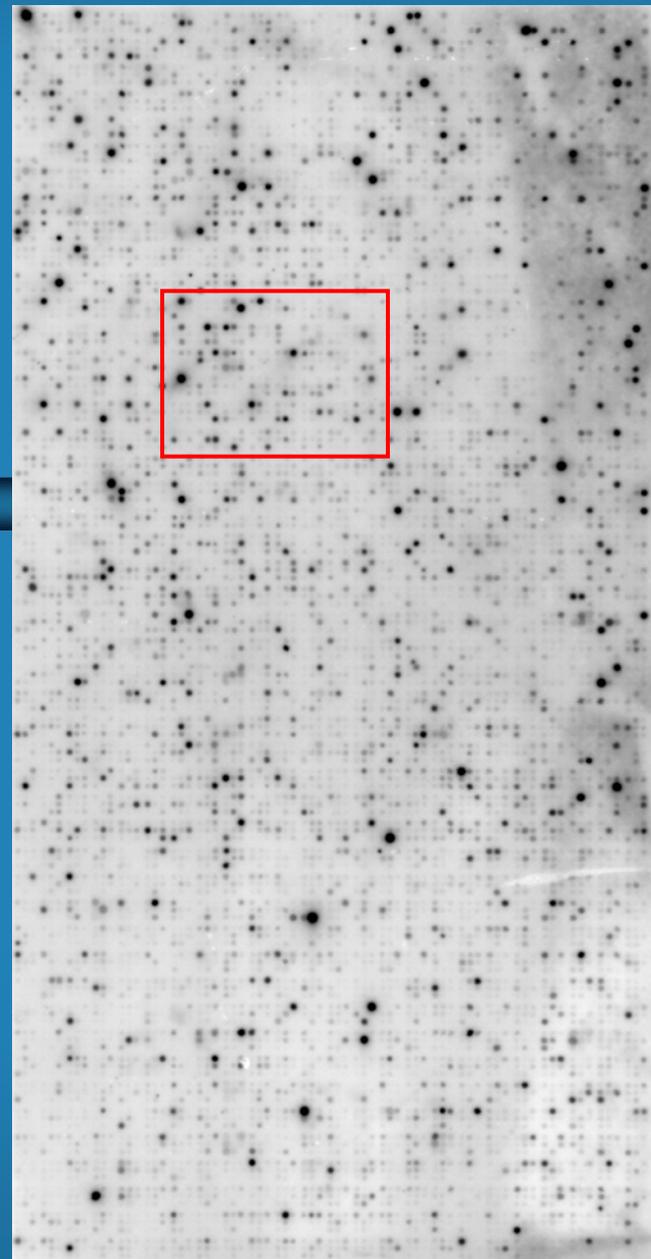
Banque multi(n) normalisée
(~ 10 000 clones)

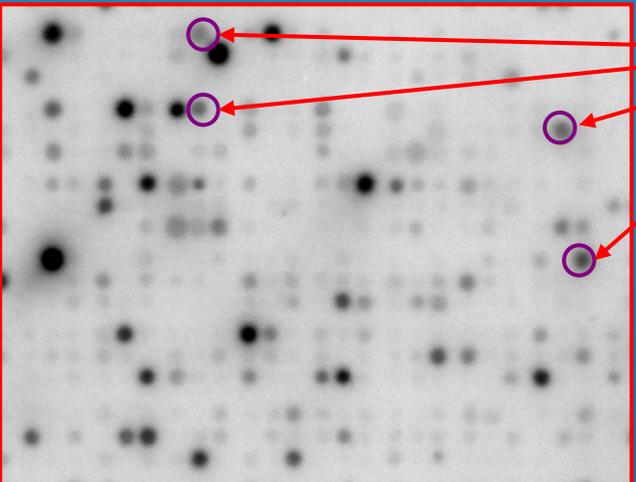
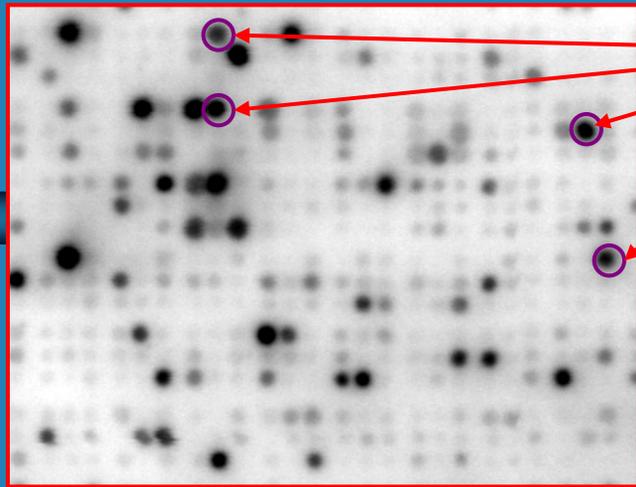
- spottée à haute densité au CRB
- hybridation avec sondes ^{32}P
 - Plasmid probe (P)
 - Control cDNA probe (C)
 - VHSV-induced cDNA probe (V)
- Acquisition et traitement des données

C



V





Clones à suivre

Conclusion

- **Préparation de filtres de bonne qualité (10000 gènes)**
- **Utilisation systématique avec des sondes de différents tissus infectés/non infectés**

(III) « Chips et génome »?

- **Approche globale**
- **Exemples : Hs, souris, Danio, ...**

Etape suivante: génome de la truite?

- Apports d'un génome de Salmonidé
Vers un « Immunome / résistome » ?
- Développement de matériel génétique homogène
- Recherche parallèle des QTLs de résistance au virus

Approches de génomique comparée

- **Complémentarité entre modèles (méthodes et diversité)**
- **Utilisation des données génomiques des autres espèces**
- **Intérêt d'une validation croisée**



Identification et caractérisation de gènes viro-induits chez la truite et le danio

- **SSH /morpholinos/RNAi**
- **Gènes candidats : approches « en bloc » par comparaison de banques de données**

Conclusions

- **Changement de méthodes -> changement de perspective**
- **Nécessité de navettes entre:**
 - modèles (à div échelles)
 - disciplines
 - niveaux d'analyse (gène, voie, réseau fonctionnel)
- **Idée d'intégration fonctionnelle et nécessité de nouvelles méthodes**



Production des données, mais aussi gestion et publication des données, comparaison et compréhension des données ...

« Ce qu'il nous faut ... , ce ne sont pas des perspectives, mais des perspectives à propos des perspectives » H. Bateson



Abdenour Benmansour
Pierre Boudinot

Post docs:

Mar Blanco (Es)

Caroline O'Farrell (EU)

Nikta Vaghefi (Ir)

Pascale massin

Infections et Immunité des Poissons
Virologie et Immunologie Moléculaires
INRA , JOUY EN JOSAS