



Bases génétiques de la résistance aux rhabdovirus et réponse cellulaire chez la truite arc-en-ciel : importance des mécanismes de défense innés

Eloi Verrier

► To cite this version:

Eloi Verrier. Bases génétiques de la résistance aux rhabdovirus et réponse cellulaire chez la truite arc-en-ciel : importance des mécanismes de défense innés. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0001 . pastel-00914894

HAL Id: pastel-00914894

<https://pastel.hal.science/pastel-00914894>

Submitted on 6 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

présentée et soutenue publiquement par

Eloi VERRIER

le 9 janvier 2013

Bases génétiques de la résistance aux rhabdovirus et réponse cellulaire chez la truite arc-en-ciel : importance des mécanismes de défense innés

Co-directrice de thèse : **Edwige QUILLET**

Co-directeur de thèse : **Pierre BOUDINOT**

Jury

Mme Sylvie QUINIOU, Senior scientist, USDA
M. Denis GERLIER, Directeur de recherche, CNRS
Mme Carole MORENO-ROMIEUX, Chargée de recherche, INRA
M. Thomas HEAMS, Maître de conférences, AgroParisTech
M. Jean JAUBERT, Senior scientist, Institut Pasteur
Mme Edwige QUILLET, Directeur de recherche, INRA
M. Pierre BOUDINOT, Directeur de recherche, INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Examinateur

Sommaire

Remerciements	5
Liste des abréviations	6
Introduction	7
Chapitre 1.....	10
Etudes des bases génétiques de la résistance aux virus.	10
1) Méthodes d'étude des bases génétiques de la résistance aux maladies.	12
2) Bases génétiques de la résistance aux virus chez l'Homme et la souris	19
3) Bases génétiques de la résistance aux virus chez les animaux de ferme.....	23
4) Bases génétiques de la résistance aux viroses chez les poissons téléostéens.	28
Chapitre 2.	33
Mécanismes de la réponse aux virus chez les mammifères et les poissons : un système conservé au cours de l'évolution des Vertébrés.	33
1) La réponse antivirale non spécifique chez les mammifères.....	35
2) Immunité adaptative et réponse antivirale chez les mammifères.....	44
3) Les réponses immunitaires dirigées contre les virus chez les poissons	48
Chapitre 3.	61
Les Rhabdovirus de la truite arc en ciel : un bon modèle hôte/pathogène pour l'étude de la réponse antivirale.....	61
1) La truite arc-en-ciel : un salmonidé modèle.....	63
2) Les virus de la SHV et de la NHI : deux Novirhabdovirus	68
3) Réponse de la truite arc-en-ciel aux infections à rhabdovirus.....	73
Objectifs de l'étude	78
Résultats	79
Chapitre 4.	80
Identification d'un QTL majeur de résistance au VSHV chez la truite arc-en-ciel.	80
Objectifs	81
Introduction.....	83
Material and methods.....	84
Results	91

Discussion	99
References	103
Acknowledgements	109
Abstract	109
Chapitre 5.....	111
Caractérisation du QTL de résistance au VSHV à l'aide de lignées isogéniques de truite arc-en-ciel.	111
Introduction.....	112
Matériel et méthodes.....	114
Résultats	117
Discussion et conclusions	129
Eléments complémentaires.....	132
Chapitre 6.	135
Développement d'un modèle cellulaire pour l'étude des mécanismes moléculaires de résistance au VSHV.	135
Objectifs	136
Introduction.....	138
Material and methods.....	141
Results	146
Discussion	158
Acknowledgements	161
References	161
Abstract	166
Chapitre 7.	167
Caractérisation de la réponse interféron dans les lignées <i>in vitro</i> à l'aide d'inducteurs de senseurs cellulaires.	167
Introduction.....	168
Matériel et méthodes.....	170
Résultats	172
Discussion et conclusions	179
Chapitre 8.	182
Analyse comparée entre résistance au VSHV et au VNHI chez la truite arc-en-ciel.....	182

Objectifs	183
Introduction.....	185
Material and methods.....	187
Results	190
Acknowledgement.....	202
References	202
Abstract	207
Eléments complémentaires.....	208
Discussion générale	211
Rappel des principaux résultats	212
Caractérisation du QTL SHV.....	214
L'apport du modèle <i>in vitro</i> à la compréhension des mécanismes de résistance	217
Faire le lien entre études positionnelles et analyses fonctionnelles	220
Perspectives.....	222
Conclusions.....	227
Annexes	229
Annexe 1 : Figures & Tables complémentaires	230
Annexe 2 : Revue.....	243
Early antiviral response and virus-induced genes in fish	243
Références.....	255
Formations suivies au cours de la thèse.....	278
Valorisation	278
Encadrement	280
Résumé.....	281

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les départements Génétique Animale et Santé Animale (par l'intermédiaire de Denis Milan et Thierry Pineau) de l'INRA pour avoir permis à ce projet d'exister.

J'adresse bien entendu mes plus sincères remerciements à Edwige Quillet et Pierre Boudinot, mes co-directeurs de thèse. Je n'aurais pu imaginer meilleurs encadrants pour ces trois années. Votre enthousiasme et votre patience, vos conseils et l'autonomie que vous m'avez accordée sont la base du succès de ces trois années. Au-delà de la science, J'ai beaucoup apprécié la qualité de nos échanges. Vous m'avez transmis votre passion de ce métier (sans m'en cacher les écueils !) et donné envie de poursuivre dans cette direction, ce qui est certainement le plus beau gage de réussite.

J'ai une pensée particulière pour tous ceux qui m'ont aidé au quotidien dans mon travail, Céline Corbel Ciobotaru, Caroline Hervet, Christelle Langevin, Corine Torhy, Nicolas Dechamp et Armel Houel ainsi que les stagiaires que j'ai pus encadrer dans le cadre de cette thèse, Aude Ehanno, Eugénie Juranville et Mathieu Besson. Votre aide (très) précieuse dans des situations qui semblaient parfois désespérées est pour beaucoup dans la réussite de ce projet.

Je n'oublie évidemment aucun des membres des deux équipes GenAqua et IIP : Martine Adriamanga, Aurélie Charlet, Mathilde Dupont-Nivet, Mekki Boussaha, Bernard Chevassus-au-Louis, René Guyomard, Marc Vandeputte, Brigitte Kerouault, Aurélie Lunazzi, Paul Barbier, Abdnenour Benmansour, Jean-François Bernardet, Eric Duchaud, Luc Jouneau et Christian Michel. Au-delà de l'apport scientifique, votre bonne humeur a contribué au bon déroulement de ces trois années.

Parmi ces membres, un remerciement très spécial à Francine Krieg, qui dut supporter ma colocation et mon covoiturage... Et à Carine Genêt pour toutes ses infos sur le génome !

Cette thèse est également le fruit de collaborations multiples et toutes enrichissantes. Je souhaite à ce titre remercier Diane Esquerré et Nathalie Marsaud (de PlaGe), Vincent Ducrocq et Pierre de Kinkelin pour leur aide et leurs conseils, Sirje Rüütel pour son accueil à Tallinn, Jean-Pierre Levraud et Laurent Schibler (membres du comité de thèse) ainsi que tous les membres des équipes des installations expérimentales de la PEIMA et de l'IERP. Je remercie enfin chaleureusement l'école doctorale ABIES pour m'avoir soutenu dans mes différents projets.

Cette page aurait pu être l'occasion de remercier ma famille, mais l'auteur déclare qu'il existe un conflit d'intérêt.

Liste des abréviations

ADN	:	acide désoxyribonucléique
Ag	:	antigène
ARN	:	acide ribonucléique
BAC	:	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BC	:	<i>back-cross</i>
BES	:	<i>BAC end sequence</i>
cM	:	centimorgan
CMH	:	complexe majeur d'histocompatibilité
EPC	:	<i>epithelioma papulosum cyprini</i>
EST	:	<i>expressed sequenced tag</i>
FAO	:	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FMDV	:	<i>foot-and-mouth disease virus</i>
GL	:	groupe de liaison
HSE	:	<i>herpes simplex encephalitis</i>
HSV	:	<i>herpes simplex virus</i>
IFN	:	interféron
Ig	:	immunoglobuline
IL	:	interleukine
IRF	:	<i>interferon regulatory factor</i>
ISAV	:	<i>infectious salmon anemia virus</i>
ISG	:	<i>interferon stimulated gene</i>
KHV	:	<i>koi herpesvirus</i>
LPS	:	lipopolysaccharide
LRR	:	<i>leucin-rich repeat</i>
MDV	:	<i>Marek disease virus</i>
MLV	:	murine leukemia virus
PCR	:	polymerase chain reaction
PKR	:	protéine kinase R
PKZ	:	protéine kinase Z
QTL	:	<i>quantitative trait locus</i>
RLR	:	<i>rig-like receptor</i>
SAM	:	sélection assistée par marqueur
SNP	:	<i>single nucleotid polymorphism</i>
TLR	:	<i>Toll-like receptor</i>
TRIM	:	<i>tripartite motif</i>
TTD	:	<i>time to death</i>
VIH	:	virus de l'immunodéficience humaine
vig	:	<i>VHSV-induced gene</i>
VMPS	:	virus de la maladie pancréatique du saumon
VNHI	:	virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse
VNPI	:	virus de la nécrose pancréatique infectieuse
VREFT	:	<i>replication in excised fin tissue</i>
VSHV	:	virus de la septicémie hémorragique virale
VSV	:	virus de la stomatite vésiculaire
μS	:	microsatellite

Introduction

L'étude des bases génétiques de la résistance aux virus est un sujet en plein essor. Les infections virales constituent un problème de santé publique majeur, leur issue étant souvent fatale pour un certain nombre d'entre elles. Des virus à haut pouvoir pathogène, très facilement transmissibles sont régulièrement à l'origine d'épidémies sévères dont l'expansion est accrue par l'intensité des échanges internationaux. La diversité des virus, leur haut potentiel évolutif, leur rapidité de transmission et leur nature de parasite intracellulaire en font des entités difficiles à combattre. Peu de médicaments antiviraux (perturbant le cycle viral) efficaces et raisonnablement bon marché existent aujourd'hui, et le développement des vaccins se heurte aux problèmes de distribution à grande échelle et de diversification des virus. Tous les hommes ne sont pas égaux devant les infections virales. Certains individus sont naturellement résistants aux infections à certains virus et il est aujourd'hui admis que les facteurs génétiques jouent un rôle important dans l'issue d'une infection virale. L'étude de ces différences permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires des réponses à ces infections, et donc potentiellement de développer de nouveaux moyens de lutte plus ciblés et plus efficaces.

Parce que les virus sont capables d'infecter tous les groupes d'eucaryotes et ont des spectres d'hôtes de diversité variable, la comparaison des différents mécanismes de défense contre les infections, et en particulier au sein des vertébrés peut se révéler utile. Afin de déterminer les mécanismes conservés entre espèces au cours de l'évolution, ou de découvrir certains mécanismes apparus spécifiquement dans des contextes écologiques déterminés, l'utilisation de modèles animaux, dont les poissons, peut donc être un outil très intéressant.

Parmi les animaux, la connaissance des mécanismes de la résistance aux agents pathogènes et en particulier aux virus chez les espèces d'intérêt agronomique représente un enjeu supplémentaire, car les maladies virales peuvent provoquer de lourdes pertes économiques dans les élevages, et affectent le bien-être des animaux. La question des moyens de lutte se pose également, et les bases génétiques de la résistance aux viroses ont été étudiées chez certaines de ces espèces pour leur intérêt dans la sélection d'individus naturellement résistants aux maladies. Si l'amélioration génétique des animaux d'élevage a longtemps eu pour but l'augmentation de la production, les caractères de robustesse dont la résistance aux maladies sont de plus en plus pris en compte dans les schémas de sélection. Les élevages aquacoles ne font pas exception à la règle. L'absence de moyen de confinement (élevage en milieu ouvert, en particulier la mer) est un risque supplémentaire de

propagation d'agents pathogènes. De plus, les populations sauvages représentent souvent de véritables réservoirs de pathogènes et la mise en œuvre des moyens de prévention contre ces infections est difficile. Les effectifs élevés et la nécessité de traiter de très jeunes individus (de petite taille) représentent une difficulté sérieuse pour la mise en œuvre de protocoles de vaccination économiquement viables.

Ces questions ont d'autant plus d'importance aujourd'hui, alors que la pisciculture est en pleine mutation. La consommation de poissons par l'Homme augmente (de 100 à 110 millions de tonnes de 2002 à 2006, FAO, 2009), mais les tonnages pêchés ont atteint aujourd'hui leurs limites, et les stocks de poissons diminuent dramatiquement dans certaines zones du globe. La différence correspond donc au développement de l'aquaculture, ce secteur ayant de fait connu une forte progression ces dernières années (environ 10% par an, FAO, 2009). Si elle s'est largement développée en Asie (près de 90% du volume mondial, FAO, 2009), elle est aussi présente en Europe et notamment en France. La pisciculture française (d'eau douce et marine) produit plus de 50000 tonnes de poisson par an et emploie aujourd'hui 2500 personnes sur plus de 600 sites de productions (FranceAgriMer, 2011). Avec près de 34000t produites par an, la France est le 4^{ème} éleveur mondial de truites d'eau douce, et notamment de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) (95% de la production, FranceAgriMer, 2011). Le fort développement de la filière est à mettre en parallèle avec l'évolution des contraintes, notamment les problèmes d'épizooties pouvant sévir dans les élevages. Ainsi, la question de la sélection pour la résistance aux maladies prend de plus en plus d'importance dans la filière aquacole.

L'étude des bases génétiques de la résistance aux virus répond donc à deux questions majeures : (1) elle représente une approche des mécanismes de la réponse antivirale, qui sont bien conservés chez les vertébrés. A ce titre, elle constitue une alternative pertinente et complémentaire aux approches classiques de l'immunologie. (2) Elle permet d'acquérir des connaissances pour développer la sélection en agronomie.

Chapitre 1.

Etudes des bases génétiques de la résistance aux virus.

Chez les animaux domestiques, le développement et l'intensification des systèmes d'élevage entraînent une augmentation de la pression des agents pathogènes et de la fréquence des épisodes infectieux. De plus, la circulation des animaux, des gamètes ou des œufs est un facteur important de propagation des maladies à travers le monde. Or la bonne santé des cheptels est un paramètre essentiel dans la gestion des filières animales. En effet, les maladies infectieuses, dont les infections virales, peuvent être la cause de sérieux dommages et de pertes économiques importantes dans les élevages. Le coût des pertes dues aux seules infections virales pour l'ensemble des filières animales est estimé à 17% du chiffre d'affaire dans les pays développés (Bishop *et al.*, 2002). Ces infections ont d'autre part des impacts sur la sécurité alimentaire des produits et sur le bien-être des animaux, une problématique croissante dans les élevages. Les stratégies de contrôle de ces maladies incluent des mesures prophylactiques (préventives), de traitement (antibiotiques pour les infections bactériennes), de vaccination ou plus drastiquement d'abattage des animaux infectés. Ces mesures sont parfois difficiles à mettre en place, dans des cadres réglementaires souvent très contraignants, et peuvent avoir des conséquences néfastes à long terme (sélection d'agents pathogènes résistants aux traitements). Dans les cas des maladies virales par exemple, peu de traitements antiviraux sont disponibles, les vaccins peuvent être coûteux à mettre au point et à utiliser, et l'utilisation de certains vaccins à base d'ADNc se heurte aux problèmes éthiques sur l'utilisation des OGMs. Enfin, la pharmacologie vétérinaire étant un petit marché, l'industrie investit peu dans ce domaine. Un autre moyen de lutter contre les maladies infectieuses est de sélectionner des animaux naturellement résistants. Depuis plus de 50 ans, les différences de résistances à différents agents infectieux dans les populations d'animaux d'élevage ont pu être associées à la variabilité génétique des individus (Bishop *et al.*, 2010). Avec le développement des outils de la génomique, le nombre d'études sur le contrôle génétique des interactions hôtes-pathogènes, et en particulier des virus, a considérablement augmenté, ce qui a permis l'intégration de ces problématiques dans les schémas de sélection. Un tel contrôle génétique est observé pour tous les types d'agents pathogènes (parasites, virus, bactéries), et la variation phénotypique observée peut être associée au polymorphisme d'un simple gène majeur ou à des polymorphismes au sein d'un modèle polygénique plus complexe. Il faut toutefois noter que la sélection pour la résistance à une maladie peut en contrepartie rendre les animaux plus sensibles à un autre agent pathogène ou encore à long terme conduire ces agents infectieux à évoluer et à

contourner la résistance sélectionnée (Bishop *et al.*, 2010). Parce qu'elles sont également un moyen de comprendre les mécanismes sous-jacents, les bases génétiques de la résistance aux agents pathogènes (dont les virus) ont été étudiées chez les animaux modèles (dont la souris *Mus musculus*) et chez l'Homme (*Homo sapiens*). Ce chapitre détaille les principes de base de l'analyse génétique des caractères ainsi que des exemples de résistance aux viroses chez l'Homme et les animaux d'élevage dont les poissons.

1) Méthodes d'étude des bases génétiques de la résistance aux maladies.

L'efficacité de la sélection suppose l'existence d'une base génétique transmissible contrôlant le caractère d'intérêt. La valeur génétique des individus peut ensuite être prédite sans connaissance particulière sur son génome ni sur les gènes qui contrôlent ce caractère à partir de leurs performances ou de celles de leurs apparentés. On peut également rechercher du polymorphisme génétique associé aux variations du caractère étudié via l'utilisation de marqueurs moléculaires, puis s'en servir pour conduire la sélection. Ce chapitre s'inspire de (cours en ligne 1) et de (Falconer, 1981).

a) La résistance aux maladies : un caractère quantitatif

La génétique quantitative étudie la part génétique des variations de caractères quantitatifs. Ces caractères peuvent être contrôlés par un nombre important de gènes ayant un effet faible. C'est le modèle polygénique, postulat de base de la génétique quantitative. Dans certains cas cependant, ce modèle est faux et le ou les caractère(s) sont en fait contrôlés par un petit nombre de gènes (voire un seul) avec un effet fort. Les caractères quantitatifs sont mesurables (discrets ou continus) et on appellera performance ou valeur phénotypique (P) la mesure de ce caractère pour un individu. Cette performance se décompose en deux valeurs, une composante génétique (G) et une composante environnementale (E) et peut s'écrire de façon schématique :

$$P = G + E (+ G \times E)$$

La composante $G \times E$, parfois négligée, correspond aux effets d'interactions entre le génotype et l'environnement. La composante environnementale E peut dépendre du milieu dans lequel évolue l'individu (climat, pratique d'élevage...), de certaines caractéristiques de l'individu lui-même (son âge en particulier) et du système de mesure. La composante G peut elle-même se décomposer comme suit :

$$G = A + D + I$$

La composante A est appelée valeur génétique additive et correspond à la somme des effets moyens des gènes sur la valeur phénotypique. Cette valeur génétique additive représente la part directement transmissible des parents aux descendants. Ainsi, la valeur A des descendants vaut, en espérance, la moyenne des valeurs A des parents. La composante D est la composante dite de dominance, prenant en compte les interactions des différents allèles à un locus donné. La composante I est une composante d'interactions entre gènes (ou épistasie).

La résistance aux maladies peut être considérée comme un caractère quantitatif. Plusieurs paramètres peuvent être utilisés pour estimer la valeur de la résistance, en fonction de la définition que l'on donne au mot « résistance ». Le plus souvent, la résistance aux maladies est définie comme la capacité de l'individu à limiter l'infection et ses conséquences, c'est-à-dire à diminuer l'expansion de l'agent pathogène (en jouant sur son cycle de vie de par exemple) et à survivre aux perturbations induites par l'infection. Parfois, les termes de tolérance (se laisser infecter par le pathogène mais en limitant les effets délétères de l'infection) ou résilience (capacité de revenir à un état normal après un épisode infectieux) peuvent être également utilisés pour définir la résistance aux maladies (Bishop *et al.*, 2010). La durée de vie après infection, la charge de pathogène dans l'organisme, ou simplement le statut (mort/vivant) après l'épisode infectieux peuvent être autant de variables d'évaluation des performances des individus. L'estimation des valeurs phénotypiques pour la résistance aux maladies nécessite souvent des tests coûteux et lourds

à mettre en place¹. De plus dans un contexte d'amélioration génétique des animaux, il est préférable de ne pas sélectionner les futurs reproducteurs sur leur performance propre à cause des risques de transmission de la maladie d'une génération à l'autre. L'utilisation de caractères quantitatifs indirects (paramètres sanguins, répllication virale sur tissus *in vitro*...) peut être intéressante pour évaluer la résistance des individus à un agent pathogène donné, mais doit être parfaitement validée (Quillet, Boudry, *et al.*, 2007).

b) L'héritabilité.

Les paramètres G et E sont donc les deux sources de variation de la performance des individus. Pour sélectionner des individus pour un caractère donné, c'est la valeur G qui nous intéresse, puisque c'est celle qui détermine la transmission du caractère aux descendants. Au sein d'une population, il est possible de quantifier la part de la variation interindividuelle de performance qui est imputable au paramètre génétique G via l'héritabilité (ou H^2). L'héritabilité au sens large se définit comme le rapport entre la variance génétique (V_G) et la variance phénotypique (V_P).

$$H^2 = V_G / V_P$$

C'est un rapport (valeur comprise entre 0 et 1) qui représente la part de la variation de performance qui est d'origine génétique. Il existe une forme restreinte de l'héritabilité (ou h^2) dans laquelle la variance génétique est remplacée par la seule variance génétique additive (V_A). Cette forme restreinte permet d'estimer la part de la variance qui est transmise des parents aux descendants.

$$h^2 = V_A / V_P$$

¹ Une possibilité peut être de récupérer les données de terrain sous certaines conditions (prévalence, fiabilité, sensibilité des diagnostics)... Voir Bishop et Woolliams, 2010.

L'héritabilité restreinte est un paramètre pivot en amélioration génétique des plantes et des animaux, puisque qu'elle permet d'estimer le gain génétique (ΔG) attendu par sélection pour un caractère donné qui prend en compte l'intensité de sélection (i), l' h^2 et l'écart type phénotypique du caractère (σ_p) :

$$\Delta G = i \times h^2 \times \sigma_p$$

L'héritabilité est considérée comme élevée lorsqu'elle est supérieure à 0,4. En pratique, en connaissant la valeur phénotypique des individus et l'héritabilité du caractère, peuvent être mis en place des schémas de sélection massale qui consiste à sélectionner des reproducteurs parmi un ensemble d'individus en fonction de leurs propres performances sur un ou plusieurs caractères choisis. Cependant, ces schémas de sélection sont des « boîtes noires », puisqu'on ne sait absolument pas quel allèle à quel locus est sélectionné, et donc quel est le mécanisme mis en jeu.

c) Explorer les mécanismes à l'aide des marqueurs moléculaires.

Un autre moyen d'analyser la structure génétique des caractères quantitatifs est de rechercher des polymorphismes génétiques associés aux variations des performances individuelles. Si l'on connaît parfaitement les mécanismes moléculaires qui régissent le caractère étudié, on peut directement chercher à identifier les gènes susceptibles d'avoir un impact sur les variations de performance. Cette approche « gène candidat » consiste alors à chercher du polymorphisme au sein de ces gènes, de leurs promoteurs ou de leurs régions régulatrices et à l'associer aux variations de valeurs phénotypiques observées (polymorphisme causal).

Sans faire d'hypothèse sur les gènes responsables, il est possible de tester l'effet des différentes régions du génome sur la variabilité d'un caractère *via* l'utilisation de marqueurs moléculaires, traditionnellement des microsatellites. Les avancées technologiques en biologie moléculaire, et notamment la PCR (*polymerase chain reaction*) ont permis le développement de l'utilisation de ces marqueurs à grande échelle. Les microsatellites sont des séquences d'ADN formées de répétitions (le plus souvent de 10 à 100) de motifs

contenant de 2 à 10 nucléotides. Il peut y avoir plusieurs milliers de ces séquences dans les génomes des espèces eucaryotes. La longueur d'un microsatellite (le nombre de répétitions du motif de base) est très variable d'un individu à l'autre. Le polymorphisme de répétition de ces séquences peut alors être utilisé comme marqueur génétique. Les SNPs (pour *single-nucleotide polymorphism*) sont un autre type de marqueur génétique et correspondent aux variations d'une seule paire de base entre individus d'une même espèce. Les marqueurs sont des balises, bien réparties sur l'ensemble du génome, et leur utilisation permet entre autres la construction de cartes génétiques (marqueurs alignés sur le génome). L'association du polymorphisme de ces marqueurs avec la variabilité d'un caractère quantitatif définit une région du génome à l'intérieur de laquelle se trouvent le ou les facteurs responsables de la variation phénotypique observée. Ces zones sont appelées QTL (*quantitative trait locus/loci*), sont de taille variable et contiennent un ou plusieurs gènes. Le principe de détection des QTL est basé sur la coségrégation des allèles à un marqueur et à un QTL en fonction des valeurs de performance dans la descendance d'individus de performance connue. La performance des individus est modélisée comme une fonction des allèles au QTL qu'ils ont reçus. Des tests d'hypothèses permettent ensuite de confirmer ou d'infirmer la présence de QTL à une région donnée (voir Figure 1). Leur détection constitue une première étape dans l'identification du/des gène(s) et la/les mutation(s) responsable(s) d'un phénotype, en confinant la zone de recherche. Ces QTL peuvent être exploités dans des démarches de sélection assistée par marqueur (SAM). La SAM consiste à utiliser le génotype des individus aux marqueurs comme critère de sélection, en fonction des associations connues avec des QTL.

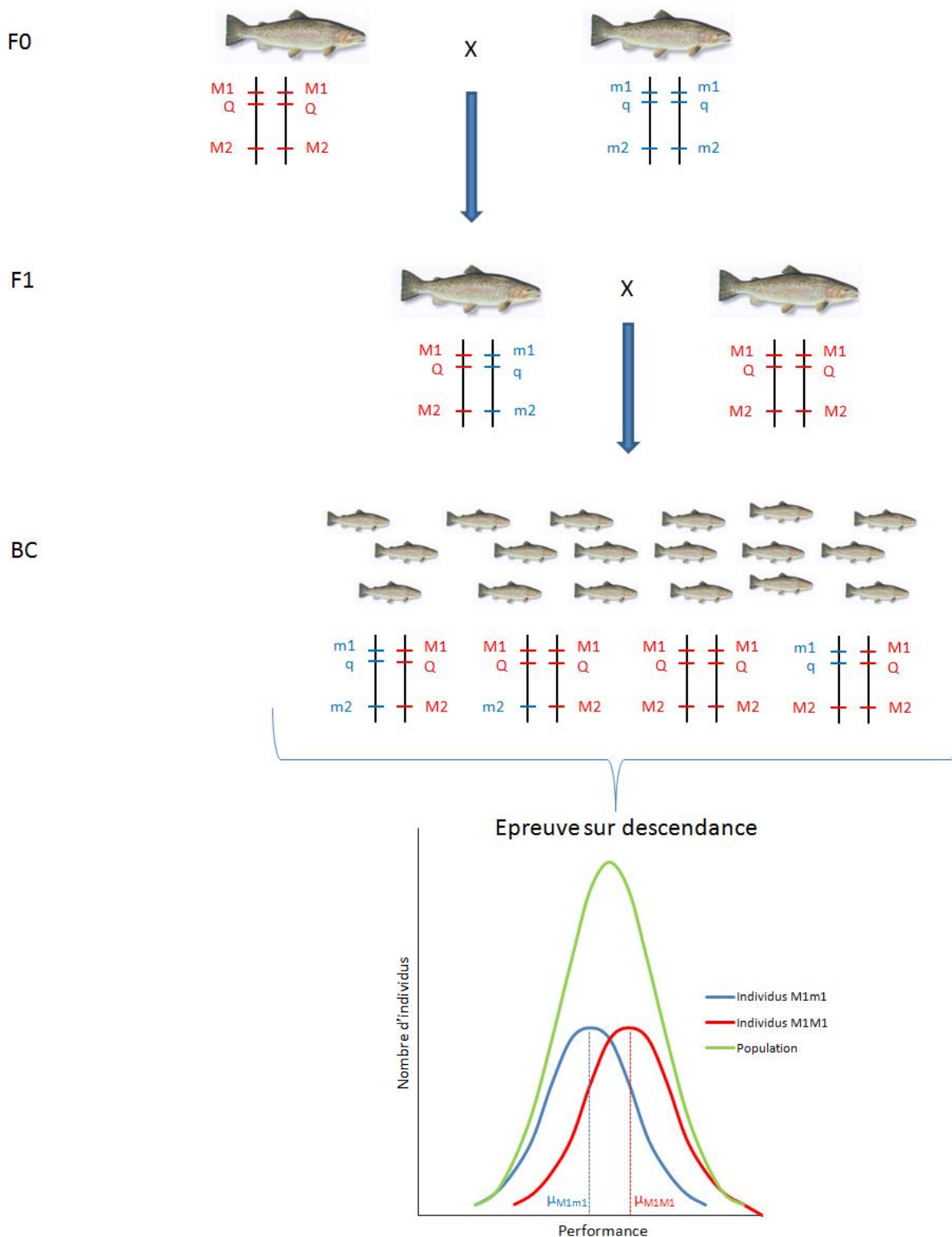


Figure 1 : Exemple de détection de QTL sur une famille de truites arc-en-ciel. Des parents de performance connue (F0) sont croisés. Un individu de la génération F1 ainsi obtenue est à son tour croisé avec un des parents F0 pour donner la génération BC (back-cross), permettant la ségrégation des allèles. La performance des individus F2 est ensuite mesurée et comparée aux allèles qu'ils ont reçus aux différents marqueurs du génome. Dans cet exemple, il existe un QTL (deux allèles, Q et q) pour le caractère mesuré en déséquilibre de liaison avec le marqueur M1. Des tests d'hypothèses basés sur la comparaison des moyennes des performances en fonction des allèles aux marqueurs (ici μ_{M1m1} et μ_{M1M1}) permet de conclure sur la présence ou non de QTL dans la région du marqueur. La distribution de la performance dans la population étant homogène, le génotype au marqueur est la seule information permettant de séparer les deux sous-populations.

d) « Nouvelles » générations de méthodes de séquençage.

L'apparition des nouvelles générations de séquençage à haut débit a permis de passer à un autre niveau d'analyse. Des génomes « complets » (en particulier dans les espèces d'intérêt agronomique) ont été séquencés et assemblés, même si les assemblages, souvent, ne sont pas encore très bons (Vignal, 2011). Dans un contexte de recherche de polymorphisme, c'est le reséquençage individuel qui est privilégié, pour identifier des SNPs et mutations causales. Dans l'idéal, le séquençage complet de tous les individus d'une population, donnerait accès à tout le polymorphisme disponible. Aujourd'hui, les coûts de séquençage sont encore trop importants pour permettre la banalisation de ce type d'analyse.

Au niveau expressionnel, les analyses de transcriptomes peuvent être menées à l'aide de puces permettant de quantifier par hybridation l'expression des transcrits que l'on veut étudier (transcriptome ciblé). Le développement du séquençage de transcriptomes permet la détection des variations dans l'expression des gènes à grande échelle (transcriptome global).

e) Chez l'Homme.

Les études de liaisons de ce type nécessitant plusieurs générations et un grand nombre d'individus, elles sont beaucoup plus difficiles à appliquer à l'Homme qu'aux animaux modèles. En revanche, le développement particulièrement important des outils de la génomique chez l'Homme a permis des approches beaucoup plus directes des bases génétiques de la résistance aux maladies, en particulier des approches d'association à l'échelle du génome entre phénotypes et génotype dans des populations d'individus malades et des populations d'individus sains à la recherche de déséquilibres de liaison. Le chapitre suivant donne un aperçu des principales études génétiques sur la réponse après infection virale réalisées chez l'Homme, ainsi que chez la souris, principal mammifère modèle.

2) Bases génétiques de la résistance aux virus chez l'Homme et la souris

L'importance des conséquences des infections virales en santé publique a motivé les recherches sur la compréhension des mécanismes de réponse à ces infections. Depuis les années 30, de nombreuses données ont montré l'importance des facteurs génétiques de l'hôte dans le contrôle des maladies infectieuses, et en particulier les infections virales (Alcaïs *et al.*, 2009). Les études sur la souris (comme mammifère modèle) ont permis d'élucider certains mécanismes sous-jacents expliquant les différences de résistance observées en fonction des génotypes.

a) Exemple de prédisposition mendélienne aux infections virales : les encéphalites à herpesvirus.

Les herpesvirus sont une grande famille de virus à ADN, qui représentent la deuxième source de maladies virales chez l'Homme après les virus de la grippe (Guénet, 2005). Parmi eux, le virus Herpès simplex (ou HSV) est responsable de l'encéphalite virale la plus commune dans les pays occidentaux, la HSE (pour *herpes simplex encephalitis*) (Alcaïs *et al.*, 2009). Depuis sa découverte en 1941, il avait été remarqué que seule une partie des individus exposés aux HSV-1 développaient l'HSE. Deux déficiences génétiques ont été identifiées comme responsables du phénotype de sensibilité aux infections à HSV-1 : tout d'abord, une déficience autosomale récessive dans la protéine intracellulaire UNC-93B a été identifiée chez deux enfants atteints de HSE (Casrouge *et al.*, 2006). En fait cette protéine se lie à TLR3 via son domaine transmembranaire et régule la localisation intracellulaire du TLR ; Il semble qu'un mauvais adressage du TLR3 explique dans ce cas la déficience observée (Tabeta *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2008). Une autre déficience génétique fut découverte un an plus tard : l'allèle délétère (dominant négatif) du gène codant pour le Toll-like receptor 3 (TLR3, senseur cellulaire capable de détecter la présence de virus dans une cellule infectée : voir chapitre 2) est également responsable de la sensibilité aux HSV-1 (Zhang, Jouanguy, *et al.*, 2007). Ces deux déficiences sont en fait à l'origine d'une mauvaise reconnaissance virale par le TLR3 tronqué ou absent, entraînant un défaut d'expression des Interférons (IFNs) de type I et III, et donc une mauvaise réponse antivirale cellulaire permettant au virus de mieux

se répliquer (Alcaïs *et al.*, 2009). Ces deux mécanismes constituent la première démonstration d'une maladie virale due à une déficience monogénique, au moins chez une partie des patients.

b) Résistance mendélienne aux infections virales.

On parlera d'individus « génétiquement résistants » lorsqu'après infection par un agent pathogène donné, les autres composants, représentant la majorité de la population étudiée, développent les symptômes d'une maladie (la sensibilité génétique décrit la situation symétrique où la majorité des individus est résistante à l'agent pathogène, alors que quelques porteurs de déficiences génétiques sont atteints et qualifiés de sensibles). Des exemples de résistance génétique aux infections virales ont été décrits chez l'Homme. Le premier cas fut celui de la résistance au parvovirus B19, virus à ADN infectant les érythrocytes et responsable d'un érythème infectieux, une éruption cutanée le plus souvent bénigne chez l'enfant, mais aussi de symptômes plus graves comme une arthropathie par exemple (Kaufmann *et al.*, 2004). Via des études d'infection de globules rouges *in vitro*, il a été montré que les érythrocytes ne possédant pas l'antigène P, récepteur cellulaire connu du parvovirus B19, n'étaient pas infectés par le virus, et que les individus avec le phénotype p (dépourvus de récepteur) étaient naturellement résistants à l'infection (Brown *et al.*, 1994).

Des cas de résistance naturelle aux norovirus, principaux responsables des gastroentérites ont également été décrits (Le Pendu *et al.*, 2006). Ces cas de résistances sont associés à des mutations dans le gène *FUT2*, qui régule l'expression des antigènes ABH, qui sont des corécepteurs sur les cellules épithéliales des norovirus. Les porteurs de cette mutation ont le phénotype Se⁻, caractérisé par l'absence d'expression des antigènes ABH (Thorven *et al.*, 2005).

Enfin, une mutation affectant un gène de récepteur de chimiokine (*CCR5*) a été associée à la résistance naturelle à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 (Samson *et al.*, 1996). La protéine *CCR5* est le corécepteur (avec *CD4*) du virus VIH-1 sur les lymphocytes T *CD4+* (Arenzana-Seisdedos et Parmentier, 2006).

Ces trois exemples de résistance naturelle aux infections virales sont donc des mutations récessives conduisant à l'absence de récepteur effectif du virus, ne permettant

pas à celui-ci de rentrer et donc d'infecter la cellule. Les études des populations porteuses de ces mutations suggèrent leur sélection positive au cours de l'évolution humaine, sans que la nature ni l'intensité de sélection ne puissent être déterminées (Alcaïs *et al.*, 2009). Il est probable que d'autres mutations de ce type existent dans les populations humaines pour d'autres virus ou d'autres types d'agents pathogènes.

c) *Les facteurs de restriction des rétrovirus : apport du modèle murin.*

L'utilisation des lignées consanguines de souris est particulièrement intéressante pour les études génétiques. Elle permet de comparer des populations de génotypes connus exprimant des phénotypes différents et souvent contrastés. Historiquement, elles ont permis l'étude de facteurs mendéliens de restrictions aux flavivirus (Guénet, 2005), mais les plus étudiés furent les modèles de variations de résistance aux rétrovirus murins. Les infections de lignées par le rétrovirus de Friend (Fv) montrent des différences claires de résistance entre différentes lignées murines (Lilly 1967). Le locus *Fv1*, responsable de ces variations a rapidement été identifié, et est également impliqué dans la résistance à d'autres rétrovirus murins de la même famille (MLVs pour *murine leukemia viruses*) (Pincus *et al.*, 1971). Deux allèles majeurs de résistance aux virus ont été décrits à ce locus : *Fv1^b* bloque la réplication de certains MLVs dans les lignées de souris BALB/c (virus dits « de tropisme B »), tandis que l'allèle *Fv1ⁿ* a été décrit dans les lignées « swiss NIH » et bloque la réplication d'autres MLVs (appelés MLVs « de tropisme N »). Ces allèles sont dominants, les souris *Fv1^{n/b}* sont donc résistantes aux deux types de virus. Un troisième type de MLV « de tropisme NB », comme le virus de Moloney, est capable d'infecter les souris porteuses de *Fv1ⁿ* ou *Fv1^b* (Wolf et Goff, 2008). Avant l'identification du gène, des études mécanistiques ont montré que la résistance induite par ces allèles était due au blocage de la réplication après la transcription inverse de l'ARN viral, mais avant la translocation dans le noyau, et liée à la protéine virale Gag, en particulier sur le résidu 110 de la capsid (CA) (Wolf et Goff, 2008). Le gène *Fv1* a été cloné en 1996, et code pour une protéine Gag-like (Best *et al.*, 1996). Le mécanisme d'interaction entre protéines virales et *Fv1* est aujourd'hui encore inconnu.

Ces résistances aux rétrovirus via des facteurs de restriction sont devenues particulièrement intéressantes après la découverte chez l'homme d'une activité *in vitro*

similaire à Fv1 avec résistance aux MLVs, également *via* interaction avec le résidu 110 de la capsid CA (Besnier *et al.*, 2003). De plus, il fut montré que des cellules de singe non permissives au VIH-1 bloquaient la réplication du virus *via* interaction avec des protéines virales de type CA (Wolf et Goff, 2008). Le gène *TRIM5α* fut ainsi identifié comme susceptible de réprimer l'infection par le VIH-1 dans des cellules de Macaque Rhésus, sans homologie avec *Fv1* (Stremlau *et al.*, 2004). La protéine TRIM5α appartient à la famille des protéines TRIM (pour *tripartite motif*), caractérisées par 3 domaines principaux : le domaine RING, le (ou les) domaine(s) B-box et un domaine coiled-coil (Nisole *et al.*, 2005). *TRIM5α* a été cloné chez de nombreuses espèces, dont l'Homme, chez qui il peut réprimer l'infection par certains MLVs de tropisme N, mais pas VIH1 (Wolf and Goff, 2008). Il semblerait que TRIM5α bloque la réplication virale après l'entrée du virus mais avant la rétrotranscription (Shibata *et al.*, 1995; Himathongkham et Luciw, 1996), même si le mécanisme d'action reste encore à élucider complètement. On sait néanmoins que TRIM5α interagit avec la capsid via son domaine B30.2 (Stremlau *et al.*, 2006). Malgré l'absence d'homologie, *Fv1* et TRIM5α semblent interagir avec la même partie polypeptidique de la capsid, suggérant l'importance de cette capsid dans les stades précoces de réplication des rétrovirus.

d) Résistance liée au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Le CMH est un complexe génétique de plus de 4 mégabases chez l'homme contenant une centaine de gènes dont la moitié a des fonctions liées à l'immunité (Trowsdale, 2011). Ce complexe fonctionne en particulier comme une unité d'apprêtage et de présentation des antigènes protéiques de manière conservée chez tous les vertébrés. Ainsi, il contient en plus des gènes de classe I et de classe II, les gènes codant pour les composants inductibles du protéasome et les transporteurs de peptides nécessaires à la présentation de l'antigène. Cependant de nombreux autres gènes importants pour les mécanismes de défense sont aussi présents dans cette région (TNF, C4, Facteur B, HSP70, en particulier dans la sous-région de classe III) (Flajnik et Kasahara, 2001). Même si peu de travaux le décrivent, quelques études ont montré le lien évident entre polymorphisme des gènes du CMH et résistance au VIH-1 ou au virus de l'hépatite C (Khakoo *et al.*, 2004; Fellay *et al.*, 2007). En particulier, il existe un lien très fort entre le polymorphisme des locus du CMH de classe I sur

le chromosome 6 humain et un effet protecteur contre l'infection au VIH-1, qui pourrait expliquer au moins 15% de la variance phénotypique observée chez les individus étudiés (Fellay *et al.*, 2007).

Ces études génétiques chez l'homme ont permis de mettre en évidence un certain nombre de mécanismes impliqués dans la réponse aux virus, et ont surtout confirmé l'existence de bases génétiques héréditaires impliquées dans la défense contre les infections. Certains allèles de résistance (comme des mutations dans les récepteurs cellulaires aux virus) ont sans doute été positivement sélectionnés au cours de l'évolution. D'autres formes de résistance sont directement liées à la réponse cellulaire contre le virus (CMH, TRIM5 α). Chez les animaux d'élevage, ces investigations ont aussi été menées dans le but de sélectionner les individus porteurs d'allèles de résistance aux virus, mais avec des méthodes différentes autorisées par les caractéristiques de ces populations.

3) Bases génétiques de la résistance aux virus chez les animaux de ferme.

*a) Chez le poulet (*Gallus gallus*)*

Les infections virales, qu'elles soient classiques, nouvelles ou ré-émergentes, constituent un des plus gros problèmes que connaît aujourd'hui l'industrie aviaire. Grippe aviaire, virus de Newcastle, et maladie de Marek, sont les principales infections virales touchant les poulets d'élevage, pouvant conduire à de lourdes pertes économiques directes (morts des oiseaux), ou indirectes (pertes de marché via les restrictions commerciales ou encore perte de confiance du public) (Cheng, 2010). Même si l'émergence des vaccins a permis d'améliorer la situation, les recherches sur les facteurs de résistance à ces maladies chez le poulet restent très soutenues. Depuis les années 90 et l'établissement des premières cartes génétiques chez le poulet, de nombreuses études sur l'identification des régions génomiques (QTL) impliquées dans les variations de résistance à ces maladies ont été réalisées, et peuvent être utilisées dans des schémas de sélection assistée par marqueurs (SAM). Le séquençage complet du génome du poulet en 2004 a permis d'étudier les bases

génomiques de la résistance aux principales maladies (Hillier *et al.*, 2004). Ce chapitre traite des études relatives à deux virus principaux infectant le poulet : le virus de la maladie de Marek et le virus de la grippe aviaire.

La maladie de Marek (MD pour *Marek disease*) est causée par un virus de la famille des alphaherpesvirus, le MDV (*Marek disease virus*), et entraîne chez l'animal infecté une immunosuppression et des lymphomes capables de métastaser dans différents organes (Cheng, 2010). C'est certainement maladie la plus importante touchant les élevages de poulets, même si avec l'introduction des vaccins vivants au début des années 70, les pertes associées ont largement baissé (Witter, 2001). Cependant, de nouvelles souches très virulentes de MDV sont apparues. De plus, si les vaccins préviennent efficacement les tumeurs, les effets immunosuppresseurs du virus conduisent à des surinfections par d'autres pathogènes. Pour compléter les approches vaccinales, étudier la résistance génétique des oiseaux à ce virus était une possibilité. Dès la fin des années 70, il avait été observé que la résistance à la MD était liée au polymorphisme de gènes du CMH (Briles *et al.*, 1977). Le CMH du poulet (localisé sur le chromosome 16) est plus simple que celui des mammifères et le polymorphisme au sein de ces régions est souvent associé aux résistances à des maladies infectieuses (Kaufman *et al.*, 1999). Il a été montré que la résistance au virus de Marek variait en fonction des haplotypes, B*21 étant l'haplotype le plus résistant (Cheng, 2010).

Beaucoup de recherches de QTLs de résistance au MDV à l'aide de familles plus ou moins sensibles ont également été menées. Des lignées consanguines résistantes (MD-6) et sensibles (MD-7) portant le même haplotype B*21, ont ainsi été croisées (Cheng, 2010). Des populations commerciales ont également été utilisées. De nombreux QTLs ont été identifiés, dont beaucoup ne sont pas retrouvés d'une étude à l'autre, indiquant la complexité des mécanismes de résistance à ce virus, avec de probables variations entre fonds génétiques différents et/ou souches de virus. Afin de faciliter la recherche de gènes candidats, des études d'expression de gènes à l'aide de puces hautes densités ont également été menées. Certains gènes et certaines voies moléculaires ont ainsi pu être associés à la maladie, et il semblerait que celle-ci affecte plus les animaux dont le système immunitaire est très stimulé par l'infection virale (Cheng, 2010).

La grippe aviaire n'est pas un problème récent de l'industrie avicole. Mais même si les premiers cas ont été rapportés dès la fin du XIX^{ème} siècle, leur incidence sur la filière avicole était limitée. La caractérisation de la souche H5N1 en 1997 a changé considérablement la

dimension du problème. Avec de nombreuses pertes dans les élevages, mais surtout la transmission du virus à l'espèce humaine (6 morts recensés à Hong-Kong en 1997), elle est devenue une véritable menace pour l'industrie avicole (Thomas et Noppenberger, 2007). Beaucoup de recherches ont été menées sur le gène *Mx1*, connu pour être impliqué dans la résistance aux myxovirus chez la souris. Cependant, aucune preuve aujourd'hui ne semble établir l'implication de ce gène dans la variabilité de la résistance à la grippe aviaire (Cheng, 2010), montrant ainsi les limites de la démarche « gènes candidats ».

b) Chez le bovin (Bos taurus)

Les maladies virales chez les bovins sont aussi une source de pertes dans les élevages. Là encore, le développement de vaccins est aujourd'hui le moyen le plus efficace pour lutter contre les infections, même si ils ne sont pas disponibles pour tous les virus connus. Dans certains pays, le vide sanitaire a montré son efficacité dans l'éradication des virus et la disparition des maladies, telles que la leucémie bovine virale ou encore la fièvre aphteuse (Glass *et al.*, 2010). Néanmoins, de nombreux virus restent aujourd'hui dangereux, sans solution de traitement, ni vaccinal ni curatif. Sélectionner pour la résistance pourrait être un bon moyen de limiter les dégâts dus à un virus donné. De nombreuses études ont montré le rôle des facteurs génétiques impliqués dans la résistance à certains virus bovins.

Pour le virus de la leucémie bovine par exemple, il a été trouvé une héritabilité de 0,48 pour la sensibilité à l'infection (Burridge *et al.*, 1979). La résistance au développement de la lymphocytose induite par le virus est semble-t-il fortement liée au polymorphisme du gène *DBR3*, gène classique du CMH de classe II (Xu *et al.*, 1993), même si d'autres facteurs génétiques indépendants du MHC (mais inconnus) sont aussi impliqués (Wu *et al.*, 1989).

De légères différences de sensibilité pour la maladie respiratoire bovine (qui peut être provoquée par différents virus) entre races ont également été décrites. L'incidence de l'infection est forte dans les troupeaux de races Simmental et Limousine. Des héritabilités faibles ont été rapportées pour la sensibilité à cette maladie (de 0,04 à 0,08 $\pm$ 0,01) (Glass *et al.*, 2010), indiquant le peu d'intérêt de sélectionner pour la résistance dans ce cas là. Récemment, de nombreux QTLs ont été identifiés pour la résistance à deux virus

responsables de cette maladie, le BVDV (pour *bovine viral diarrhea virus*) et le virus respiratoire syncytial bovin (Neibergs *et al.*, 2011; Leach *et al.*, 2012), suggérant des facteurs de résistance polygéniques. Il est à noter que ces deux études récentes sont les deux seules études de balayage du génome à la recherche de QTLs pour la résistance aux maladies virales chez les bovins.

Enfin, il semble clair que des facteurs génétiques peuvent contrôler les infections au virus de la fièvre aphteuse (FMDV pour *foot-and-mouth disease virus*), et des cas de résistances naturelles, en particulier chez une vache de race charolaise (pourtant en contact avec des animaux infectés), ont été rapportés. Parmi les descendants de cette vache, 6 animaux n'ont pas développé la maladie 14 ans plus tard lors d'un épisode infectieux de FMDV (Glass *et al.*, 2010). Mais le rôle des facteurs génétiques dans la résistance à cette maladie n'a pas été quantifié.

Il reste encore de nombreuses étapes à franchir avant de pouvoir sélectionner les bovins pour la résistance aux maladies. Le développement récent de nombreuses puces SNPs à haut débit associé à un meilleur recueil des phénotypes de résistance devrait permettre une accélération des recherches de polymorphismes.

*c) Chez le porc (*Sus scrofa domesticus*)*

Les deux virus touchant majoritairement les élevages porcins sont le virus du syndrome dysgénésique respiratoire porcin (VSDRP) et le circovirus porcin de type 2, responsables tous les deux de nombreuses pertes dans les élevages (Lunney, 2010).

Il existe clairement des différences de résistance au VSDRP entre les races porcines. Les porcs Duroc par exemple sont plus sévèrement atteints par la maladie que les porcs Meishan (Halbur *et al.*, 1998), et un faible taux de réplication virale a été mesuré dans les alvéoles pulmonaires des porcs Landrace par rapport aux autres races (Ait-Ali *et al.*, 2007). Il semblerait également que les lignées de porcs sélectionnées pour la croissance soient plus sensibles à ces infections que les lignées sélectionnées pour des caractères reproductifs (Petry *et al.*, 2005). Il est possible que le VSDRP puisse avoir des effets plus graves sur des porcs au métabolisme plus performant, dont on imagine schématiquement qu'ils sont capables de montrer des réponses inflammatoires plus violentes causant des dégâts rapides

et plus importants. Récemment, un QTL majeur associé à la résistance au VSDRP a été mis en évidence à l'aide de la puce porcine Illumina 60k (60 000 SNPs) dans des croisements de populations commerciales infectées avec le virus (Boddicker *et al.*, 2012). Une région d'1 mégabase (Mb) sur le chromosome 4 explique plus de 15% de la variance génétique de la charge virale après 21 jours d'infection. C'est le premier pas vers de la SAM en industrie porcine pour la résistance à cette maladie, et vers l'identification du ou des gènes responsables de la résistance.

Le circovirus porcin de type 2 (CVP2) est l'agent responsable du syndrome de dépérissement post-sevrage multisystémique (SDPM). Le rôle de la variabilité génétique de l'hôte dans l'issue de l'infection par ces virus a également été établi. La mortalité chez des porcelets issus de croisements Large White x Duroc était bien supérieure (plus de 26%) à celle de porcelets issus de croisements Large White x Piétrain (environ 6%), alors que chez les descendants purs Piétrain, on observe une faible mortalité de l'ordre de 2% (López-Soria *et al.*, 2004). Mais aucune étude pour l'instant n'a mis en évidence l'existence de polymorphisme associé à la résistance.

d) Chez les petits ruminants.

Très peu de travaux ont été menés chez les ovins et les caprins sur les bases génétiques de la résistance aux viroses. Les recherches sont surtout ciblés sur la résistance aux parasites, bactéries ou aux maladies à prions dans le cas des ovins (Bishop *et al.*, 2010).

Si les études montrent très clairement qu'il existe une base génétique au contrôle de nombreuses maladies virales chez les animaux de fermes, certaines zones d'ombre persistent encore aujourd'hui. Peu d'études de balayage complet du génome à la recherche de QTL sont disponibles, même si leur nombre a augmenté ces dernières années. Le nombre croissant de puces SNPs à haut débit et l'accès à des assemblages des génomes de meilleure qualité devrait faciliter la recherche de gènes candidats et de polymorphismes associés à la variation phénotypique. Ces études ouvrent la voie de possibles SAM dans les élevages pour la résistance aux viroses.

4) Bases génétiques de la résistance aux viroses chez les poissons téléostéens.

Comme les autres filières animales, l'aquaculture doit faire face à des infections virales qui touchent les différentes espèces de poissons. Le développement des vaccins n'a pour le moment connu qu'un relatif succès. Ils sont souvent très compliqués à utiliser et trop coûteux quand le mode d'administration est l'injection individuelle aux jeunes animaux. Les vaccins à base de virus atténué posent des problèmes de virulence résiduelle dans l'environnement, et bien que les vaccins à ADN semblent particulièrement efficaces pour un certain nombre de pathogènes (Adams et Thompson, 2006), leur utilisation reste assez expérimentale et se heurte à la perception négative des OGMs par les populations et les médias. Comme dans les autres filières, les traitements antiviraux sont inexistants. Une voie possible est donc la sélection d'individus naturellement résistants aux infections. L'analyse de la variabilité génétique des caractères en général (et donc de la résistance aux maladies en particulier) est largement facilitée chez les poissons par leur fort taux de fécondité et la fécondation externe. Cela permet une large flexibilité dans les plans de croisements et la conception des expérimentations. Par exemple, les œufs d'une même femelle peuvent être fécondés par plusieurs mâles. Ceci permet une combinaison optimale de la taille et du nombre de familles, ce qui minimise l'erreur standard de l'estimation de la variance génétique du caractère (Lynch et Walsh, 1997). Cependant, ces animaux sont de petites tailles ce qui peut entraîner des problèmes dans le marquage individuel. De plus, la connaissance des généalogies étaient souvent partielle jusqu'à l'avènement des marqueurs microsatellites. Ce chapitre résume les principaux travaux d'estimation de la variabilité génétique sous-tendant la résistance aux viroses chez les poissons d'élevage, de la simple observation de variabilité interspécifique aux schémas de sélection assistée par marqueurs.

a) Différences de sensibilité aux virus entre espèces

C'est la première échelle d'étude de la variabilité génétique des caractères. Chez les salmonidés, le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV) est par exemple capable

d'infecter différentes espèces de salmonidés de façon plus ou moins agressive en fonction de la souche virale (voir Chapitre 3). Par exemple, certains sérotypes sont très virulents contre la truite arc-en-ciel, chez qui ils peuvent entraîner de lourdes pertes d'effectifs y compris à la taille commerciale, alors qu'une espèce voisine, le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) est résistant à ces souches virales. L'hybridation entre ces deux espèces ne donne que quelques descendants viables, mais qui conservent la résistance du saumon coho aux souches de VSHV virulentes contre la truite arc-en-ciel (Ord *et al.*, 1976). Cependant leur croissance est médiocre, et leur statut d'hybride rend difficile leur commercialisation. Ils sont néanmoins la preuve d'une variabilité génétique transmissible de la résistance aux virus entre espèces apparentées au sein des salmonidés.

b) Variabilité génétique entre populations d'une même espèce

Au sein d'une même espèce, il peut exister certaines disparités génétiques entre différentes populations isolées génétiquement l'une de l'autre, soit à cause d'une origine géographique différente, soit à cause des conséquences de la domestication. L'infection expérimentale de plusieurs souches domestiques et de leurs croisements avec une souche de Koi herpès virus isolée d'une carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) a montré de grandes disparités de survie après infection (Shapira *et al.*, 2005). Cependant ce type d'analyse ne prend pas en compte la variabilité génétique au sein de chaque groupe, qui est parfois bien supérieure à la variabilité observée entre les groupes, ce qui relativise la portée des résultats obtenus dans certaines études (Quillet, Boudry, *et al.*, 2007).

c) Variabilité génétique au sein des populations.

La variabilité génétique de sensibilité aux viroses au sein des populations a été montrée chez de nombreuses espèces, et des héritabilités significatives identifiées pour la résistance à différents virus. Une liste de ces valeurs est représentée Table 1.

Table 1 : Héritabilité de la résistance aux viroses chez les poissons.

Virus	Hôte	Phénotype	h^2	Références
VSHV	Truite arc-en-ciel	Survie	0,63	Dorson <i>et al.</i> , 1995
VSHV	Truite arc-en-ciel	Survie, DS ^a	0,57 ; 0,21	Henryon <i>et al.</i> , 2005
VNHI	Truite arc-en-ciel	Survie	0,05 – 0,51	Yamamoto <i>et al.</i> , 1991
VNHI	Saumon sockeye	Survie	0,27 – 0,38	McIntyre et Amend, 1978
VNPI	Saumon atlantique	Survie	0,15 – 0,5	Midtlyng <i>et al.</i> , 2001
VNPI	Morue de l'Atlantique	Survie	0,43 – 0,75	Ødegård, Sommer, <i>et al.</i> , 2010
ISAV	Saumon atlantique	Survie	0,13	Gjøen <i>et al.</i> , 1997
VMPS	Saumon atlantique	Survie	0,21	Norris <i>et al.</i> , 2008
KHV	Carpe commune	Survie à 50% ^b	0,79	Ødegård, Olesen, <i>et al.</i> , 2010
Morue de l'Atlantique : <i>Gadus morhua</i> L.			Saumon sockeye : <i>Oncorhynchus nerka</i>	
^a DS : durée de survie après infection				
^b survie (oui/non) du poisson lorsque la mortalité du lot atteint 50%				
VSHV : virus de la septicémie hémorragique virale				
VNPI : virus de la nécrose pancréatique infectieuse				
VMPS : virus de la maladie pancréatique du saumon			KHV : <i>koi herpesvirus</i>	

Cette variabilité génétique a pu être mise en évidence par sélection expérimentale, comme chez la truite arc-en-ciel, où les descendants de femelles résistantes au VSHV sont également résistants (Dorson *et al.*, 1995). Toujours chez la truite arc-en-ciel, les poissons rescapés d'une infection au virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) dans une pisciculture au Japon ont engendré une lignée de plus en plus résistante aux cours des générations suivantes, avec une mortalité d'environ 5% lors d'infection au VNPI, alors que la mortalité de la souche de référence est de presque 100% (Okamoto *et al.*, 1993). Chez la carpe commune enfin, après neuf générations de sélection massale pour la résistance à l'hydropisie infectieuse (en partie due au *Rhabdovirus carpio*), on retrouve une héritabilité modérée (environ 0,2) (Quillet, Boudry, *et al.*, 2007). Il y a donc chez les poissons une forte variabilité génétique pour la résistance aux viroses et cette variabilité est utilisable en sélection.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes et mieux comprendre l'origine de cette variabilité génétique, la recherche de polymorphismes associés aux variations de résistance (et donc la recherche de QTL et de gènes candidats) peut-être être un outil intéressant. Les ressources et outils génomiques étant arrivés plus tardivement chez

les poissons que chez les autres espèces d'intérêt agronomique, les travaux de primolocalisation de QTL dans les espèces piscicoles sont encore assez peu nombreux. Cependant, ils sont en forte augmentation ces dernières années, et la majorité des travaux de détection de QTL se concentre sur la résistance aux maladies, confirmant le fort intérêt de la filière et de la recherche pour ces aspects sanitaires (Quillet, Boudry, *et al.*, 2007).

L'exemple de QTL le plus détaillé publié à ce jour est sans doute celui de la résistance au VNPI chez le saumon atlantique (*Salmo salar*). Identifié par deux équipes (norvégienne et écossaise) indépendamment à partir de populations commerciales, ce QTL majeur contrôlant la résistance aux infections à ce virus (en eau douce comme en eau de mer) explique jusqu'à 83% de la variance génétique observée (Houston *et al.*, 2008; Moen *et al.*, 2009). Ce résultat suggère l'existence d'un gène (ou d'un cluster) majeur contrôlant la résistance à cette infection. Si les recherches s'intensifient dans ce sens, la mutation causale est aujourd'hui toujours inconnue. Chez la truite arc-en-ciel, des QTL pour la résistance au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (VNHI) et au VNPI ont également été identifiés (Palti *et al.*, 1999; Ozaki *et al.*, 2001). Enfin, chez le cardeau hirme (*Paralichthys olivaceus*) un locus majeur responsable de 50% de la survie des poissons après infection par un iridovirus a été détecté (Fuji *et al.*, 2006).

Sans passer par la primolocalisation de QTL, on peut directement rechercher du polymorphisme dans des gènes candidats. Par exemple, des variations dans la séquence du gène *Mx* impliqué dans la réponse antivirale cellulaire (voir Chapitre 2) ont été corrélées à des niveaux de résistance différents à l'infection par VNHI chez la truite arc-en-ciel (Trobridge *et al.*, 2000). De même les résistances au virus de l'anémie infectieuse du saumon (ISAV pour *infectious salmon anemia virus*) et au VNHI sont liées au polymorphisme des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), indiquant probablement un rôle important de l'immunité spécifique à lymphocytes T dans la sensibilité à ces infections (Grimholt *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004).

Ces travaux montrent clairement l'existence de bases génétiques contrôlant la résistance aux infections virales. La découverte de QTL ouvre directement la voie de programmes de sélection assistée par marqueurs (SAM).

d) Exploiter la variabilité génétique

Chez les poissons, les programmes de sélection mis en place historiquement ont prioritairement pour but l'amélioration de la croissance, objectif commun de toutes les filières d'élevage (Quillet, Boudry, *et al.*, 2007). Les autres critères de sélection (résistance aux maladies, qualité de chair...) sont ensuite apparus progressivement. Le QTL de résistance au VNPI est aujourd'hui le seul utilisé dans des schémas de SAM chez les poissons pour la résistance aux maladies. Il est utilisé dans deux programmes de sélection, en Norvège et en Ecosse (Moen, 2010). L'utilisation de ce QTL est très efficace en sélection car il explique une très grande part de la résistance à l'infection. Son utilisation comme marqueur de sélection est amenée à avoir une vie courte puisque l'allèle de résistance sera vite fixé dans la population sélectionnée. L'inconvénient de ce type de sélection est que si le virus évolue et contourne la résistance, ce qu'il peut sans doute faire dans la mesure où il mute beaucoup et où les poissons sauvages représentent un réservoir non contrôlable, toutes les lignées de saumons sélectionnés peuvent devenir vulnérables aux infections par la nouvelle souche virale surtout si elles sont par ailleurs trop homogènes génétiquement.

L'analyse de la variabilité génétique de la résistance aux maladies et de ses composantes chez les poissons est donc un domaine en plein essor. Motivées par l'importance économique de certaines espèces de poissons d'élevage et le coût associé aux épisodes infectieux, les recherches sur les facteurs génétiques responsables de ces variations sont en forte progression depuis quelques années. De plus, la recherche de QTL n'a pas uniquement pour aboutissement la mise en place de programmes de SAM. Parce qu'ils sont un premier pas vers la localisation génomique de la/des mutation(s) causale(s) induisant des variations de résistance, ils permettent aussi de réduire le champ de recherche de gènes candidats, et ainsi d'avancer dans la compréhension des mécanismes de la réponse antivirale du modèle et des vertébrés plus généralement.

Chapitre 2.

**Mécanismes de la réponse aux virus
chez les mammifères et les poissons :
un système conservé au cours de
l'évolution des Vertébrés.**

Les virus sont une classe particulière de parasites qui infectent tous les groupes d'êtres vivants. En tant que parasites obligatoires, ils doivent utiliser la machinerie cellulaire de l'hôte pour se répliquer. Leur génome de petite taille codant peu de gènes et la simplicité de leur structure en font des pathogènes à première vue moins complexes et au fonctionnement plus simple que les autres pathogènes. Cependant leurs actions sur les cellules entraînent des modifications importantes de la dynamique de celles-ci (modifications de cycle cellulaire, d'expression de gènes) pouvant aboutir à la mort cellulaire. Des bactéries aux vertébrés supérieurs, les organismes ont développé des systèmes de défenses pour contrer ces infections. Chez les mammifères comme chez les poissons, ces systèmes peuvent se classer en deux catégories de mécanismes, inné/non spécifiques et adaptatifs/spécifiques, en plus des barrières anatomiques à l'infection que sont la peau et les muqueuses. La première ligne de défense contre les virus est non spécifique. La cellule infectée possède des protéines de reconnaissance des protéines et des génomes viraux qui, après interaction avec des composants viraux, induisent l'expression de gènes et la synthèse de protéines à action directement antivirale. Parmi ces gènes, des cytokines à action paracrine et autocrine – en particulier les interférons de type I - jouent un rôle clé dans l'activation de cellules non infectées, qui peuvent être les cellules voisines ou des cellules du système immunitaire (NK, macrophages...), conduisant à l'inflammation, à l'activation du complément et d'autres voies effectrices. Plus tardivement, des réponses spécifiques du virus se mettent en place. La reconnaissance d'antigènes viraux par les récepteurs spécifiques de l'Ag des lymphocytes B et T induit des réponses contre les épitopes reconnus puis à une mémoire. Ces réponses nécessitent une prolifération/différentiation finale des clones B et T spécifiques de ces antigènes et requièrent des délais plus longs pour se mettre en place (typiquement une semaine chez l'Homme ou la souris). Les mécanismes de ce système de défense sont relativement bien conservés entre poissons et mammifères. Ils sont bien décrits chez ces derniers, qui ont servi de cadre de référence pour l'étude des autres vertébrés, dont les poissons.

1) La réponse antivirale non spécifique chez les mammifères

L'immunité non spécifique peut être divisée en deux types : (1) l'immunité innée fait référence aux mécanismes liés à des gènes qui ne sont pas modifiés au cours de la vie de l'individu, et codant des médiateurs du système de défense. Ces mécanismes ne sont pas spécifiques de l'antigène et n'assurent pas de défense à long terme (*i.e.* de mémoire spécifique de l'antigène) ; ils sont présents chez les plantes et les animaux. (2) l'immunité intrinsèque désigne un ensemble de mécanismes antiviraux, en général non inductibles, et en tous cas exprimés à un niveau basal opérationnel dans une large diversité de types cellulaires de l'organisme, qui constituent un arsenal de restriction immédiate des pathogènes. Dans la suite de ce manuscrit, on considérera l'immunité intrinsèque comme un cas particulier de l'immunité innée. Ce chapitre présente les principaux acteurs de la réponse antivirale innée chez les mammifères.

a) Les interférons

L'existence de mécanismes de défenses cellulaires contre l'infection virale est établie depuis de nombreuses années. Dès le milieu du XX^e siècle, Isaac et Lindenmann décrivent une substance produite par les cellules et capable de les protéger contre l'infection, qu'ils appellent « interféron » (Isaacs et Lindenmann, 1957). Les interférons (ou IFNs) - les premières cytokines décrites - sont les médiateurs d'une réponse rapide et non spécifique des cellules à l'infection virale. Leurs structures tridimensionnelles riches en hélices alpha en font des membres de la famille des cytokines de classe II (Renauld, 2003). De nombreux IFNs ont depuis été décrits par la suite chez les mammifères de sorte qu'ils sont aujourd'hui divisés en trois catégories en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles, et de leurs récepteurs (Pestka *et al.*, 2004) (voir Table 2) : les IFNs de type I, eux même divisés en sept classes (α , β , ϵ , κ , ω , δ et τ) sont des gènes monoexoniques situés sur le chromosome 9 chez l'Homme ayant une activité antivirale et antibactérienne. Ils sont directement induits par l'infection virale. L'IFN de type II (ou IFN- γ) est un unique gène de quatre exons situé sur le chromosome 12 chez l'homme. Il code pour une protéine glycosylée ayant de nombreuses fonctions de régulation immunitaire comme l'activation des NK et des macrophages (Pestka

et al., 2004). Le troisième type d'IFN (IFN de type III) a été décrit au début du 21^e siècle seulement et comprend trois gènes codant les IL-28A, IL-28B et IL-29 (Sheppard *et al.*, 2003; Uze, 2007). Ils ont comme les IFN de type I une activité antivirale et antibactérienne mais comportent 5 exons et sont localisés sur le chromosome 12 humain (Pestka *et al.*, 2004).

Table 2 : Classification des Interférons de mammifères.

Type	Famille	Nbe de gènes	Caractéristiques
Type I	Interféron- α	au moins 20	monoexoniques activité antivirale et antibactérienne
	Interféron- β	1	
	Interféron- ω	1	
	Interféron- τ	nombreux	
	Interféron- δ	1	
	Interféron- ϵ	1	
	Interféron- κ	1	
	limitine ^a	1	
Type II	Interféron- γ	1	pluriexonique protéine glycosylée activation des macrophages et des NK nombreuses fonctions immunorégulatrices
Type III	Interféron- λ	3 (IL29, IL28A, IL28B)	pluriexoniques activité antivirale et antibactérienne dans les cellules épithéliales

^a chez la souris uniquement
NK : *natural killer*

b) Induction des interférons

Les IFNs sont constitutivement exprimés à un faible niveau dans toutes les cellules. Leur expression augmente drastiquement dans un contexte d'infection virale (Tovey *et al.*, 1987), ce qui indique l'existence d'un système cellulaire susceptible de détecter la présence du virus dans la cellule et/ou dans le milieu extracellulaire. Ce système de reconnaissance est complexe et peut cibler les glycoprotéines virales ou les acides nucléiques (ADN ou ARN). Interviennent en particulier des protéines membranaires localisées sur la membrane plasmique ou sur les membranes internes: les *Toll-Like Receptors* (ou TLRs) ; d'autre part les

acides nucléiques viraux peuvent être reconnus par des hélicases cytoplasmiques comme RIG-I (les RLRs pour *RIG like receptors*). Ces deux types de récepteurs peuvent ainsi jouer le rôle de *Pattern Recognition Receptor* (PRRs).

Les TLRs doivent leur nom à la similarité structurelle qu'ils présentent avec le récepteur Toll décrit au milieu des années 90 par le groupe de J. Hoffmann chez *Drosophila melanogaster* (Hoffmann *et al.*, 1996). Le premier TLR humain a été décrit en 1996 par Taguchi sous le nom de TIL (Taguchi *et al.*, 1996). Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par deux domaines structuraux : un domaine extracellulaire contenant de nombreuses répétitions de leucines ou LRRs (*Leucin-Rich repeats*) responsables de la reconnaissance et un domaine intracellulaire TIR (*Toll/IL-1 receptor*) de signalisation (pour une revue : O'Neill *et al.*, 2003). En réalisant que ce domaine du Toll de la mouche était similaire au domaine de signalisation du récepteur de l'IL1, C. Janeway a initié un changement de paradigme en immunologie, donnant à l'immunité innée la place qu'elle a aujourd'hui (Medzhitov *et al.*, 1997). Il existe 10 TLRs chez l'homme qui se différencient par leur localisation cellulaire, le type de motifs moléculaires qu'ils sont capables de reconnaître et les voies de transduction du signal (Zhu et Mohan, 2010). Parmi ces récepteurs, certains sont capables de reconnaître des motifs moléculaires d'origine virale : par exemple, TLR3 reconnaît l'ARN double brin viral. Il est localisé à la surface des endosomes (voir Figure 2) (Vercammen *et al.*, 2008).

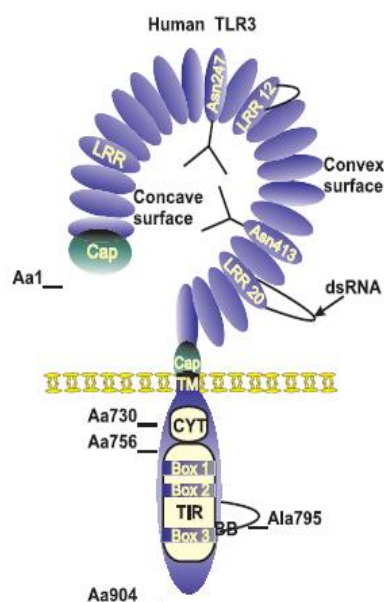


Figure 2 : Représentation schématique du TLR3 humain (Vercammen *et al.*, 2008). Le TLR3 est capable de reconnaître les ARN double brin (dsRNA) *via* des séquences riches en leucine (LRR pour *leucin-rich repeats*) dans l'endosome. Le domaine effecteur cytoplasmique TIR permet la transduction du signal après reconnaissance des ARNs viraux.

L'activation de TLR3 par fixation de l'ARN viral induit la phosphorylation des facteurs de transcription IRF-3, IRF-7 et NF- κ B via l'adaptateur TRIF, conduisant à l'induction des trois types d'IFNs et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Vercammen *et al.*, 2008) (Figure 3).

TLR4 est un récepteur activé par les lipopolysacharrides (LPS) bactériens mais aussi par certaines glycoprotéines virales dont celle du virus respiratoire syncytial (RSV) (Kurt-Jones *et al.*, 2000). L'activation de TLR4 entraîne également l'induction d'IFNs via l'adaptateur TRIF selon le même principe que pour TLR3 (Fitzgerald *et al.*, 2003) mais aussi par l'intermédiaire d'un autre adaptateur, Myd88, responsable également de l'activation de NF- κ B et IRF-7 (Barton and Medzhitov, 2003).

TLR7/8 et TLR9 sont des récepteurs endosomaux activés respectivement par l'ARN simple brin viral et par les motifs ADN CpG bactériens ou viraux (Perry *et al.*, 2005). Ils induisent l'expression des IFNs via l'adaptateur Myd88 (voir Figure 3).

Les TLRs vont donc induire la production de cytokines via deux voies principales. L'induction des IFNs *via* les TLRs est biphasique. La fixation des acides nucléiques viraux sur leur récepteur entraîne un réarrangement des domaines TIR qui peuvent alors fixer des protéines adaptatrices (Myd88 ou TRIF pour TLR3). La fixation de Myd88 entraîne le recrutement et l'activation des kinases de la famille IRAK, qui vont-elles mêmes activer TRAF6 (une E3 ubiquitine ligase). En formant un complexe avec TAB2 et TAB3, TRAF6 active la kinase TAK1, ce qui entraîne l'activation de la voie de signalisation IKK. La transduction de ce signal conduit à la translocation des facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 et IRF-7, induisant respectivement l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF ou IFN de type II par exemple) et de l'IFN β (Kawai et Akira, 2007) dans un premier temps. La production d'IFN β induit fortement l'expression d'IRF7 qui lui même stimule la production d'IFN α et des IFNs de type III dans un second temps (voir Figure 3).

L'activation de TRIF induit la formation d'un complexe composé de TRAF6, TBK1 et IKK, conduisant à la phosphorylation d'IRF-3 et à l'expression d'IFN β . TRIF peut également activer TAK1 et ainsi induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire de NF- κ B (Kawai et Akira, 2007). Les cellules dendritiques plasmacitoides (possédant un taux d'IRF7 constitutif très élevé) peuvent produire massivement et rapidement l'IFN α , sans que cette boucle de rétroaction positive ne soit requise.

Les TLRs ne sont pas les seules sentinelles cellulaires capables de détecter la présence de résidus viraux dans la cellule. Les hélicases cytoplasmiques, MDA5, RIG-I, LGP2 ou encore DHX9 ont récemment été identifiées comme récepteurs d'ARN de différents virus (Yoneyama *et al.*, 2004; Andrejeva *et al.*, 2004; Kawai et Akira, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Ces hélicases sont caractérisées par un domaine DEAD Box et un domaine CARD. Les DBX (*DEAD-box proteins*) sont une famille de plusieurs dizaines de protéines (Linder et Jankowsky, 2011) dont une partie a une activité antivirale démontrée. Les voies de signalisation des RLRs conduisent à l'induction d'IFN via les IRFs et NF- κ B par l'intermédiaire d'IPS-1 (également connu sous les noms de MAVS ou VISA), un adaptateur mitochondrial (voir Figure 3).

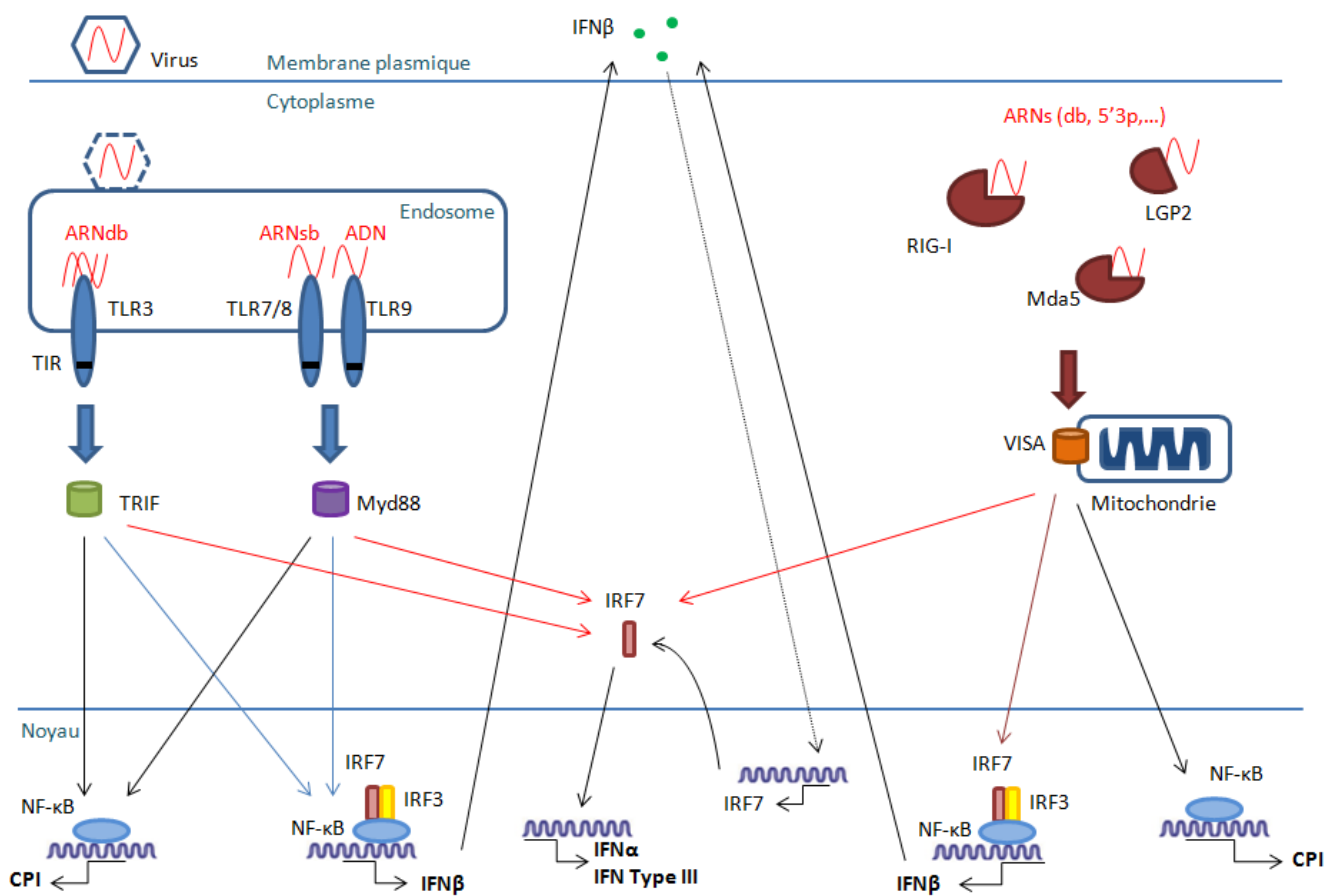


Figure 3 : Représentation schématique des principales voies d'induction de l'interféron par les senseurs antiviraux cellulaires chez les mammifères. Une fois dans la cellule, le virus décapsule son acide nucléique. Il est reconnu par certains senseurs en fonction de sa nature : dans l'endosome, TLR3 reconnaît l'ARN double brin (ARNdb), TLR7/8 l'ARN simple brin (ARNsb) et TLR9 certaines formes d'ADN. La transduction du signal (via le domaine effecteur TIR des TLRs) implique les adaptateurs TRIF et Myd88. Les facteurs de transcription ainsi activés induisent l'expression du gène IFN β (via IRF3/IRF7/NF- κ B) et de cytokines pro-inflammatoires (CPI) dont l'Interféron de type II (via NF- κ B). La production d'IFN β induit l'expression d'IRF7 qui active la production d'IFN α et des IFNs de type III. Les hélicases cytoplasmiques telles RIG-I, LGP2 ou Mda5 reconnaissent les ARNs (double brin ou 5'3p). La transduction du signal via l'adaptateur mitochondrial VISA active les facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B induisant l'expression des Interférons de type I et III et de CPI.

c) Récepteurs des IFNs et transduction du signal associée

Les IFNs de type I humains se fixent tous sur le même récepteur membranaire, hétérodimère composé de 2 sous-unités (IFNAR1 et IFNAR2). Si IFNAR1 a été cloné dès 1990 (Uzé *et al.*, 1990), il a fallu attendre 5 ans pour caractériser la deuxième sous-unité du récepteur (Domanski *et al.*, 1995). Les gènes de ces récepteurs sont localisés sur le chromosome Hs21 (dans le cluster des récepteurs de cytokines). Les deux gènes sont soumis à épissage alternatif (Lutfalla *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1996), IFNAR2 produisant deux transcrits, un court non fonctionnel (IFNAR2b, codant pour une protéine intracellulaire de 55kDa) et un long fonctionnel (IFNAR2c codant pour une protéine de 100kDa) (Mogensen *et al.*, 1999). Le récepteur est présent à la surface de toutes les cellules (Vanden Broecke et Pfeffer, 1988). Comme tous les récepteurs de cytokines de classe II (ou CRFBs), IFNAR1 et II ne présentent aucune activité kinase (de Weerd *et al.*, 2007). Chacune des sous unités du récepteur est associée à une kinase de la famille des Janus Kinases (JAKs, IFNAR1 est lié à Tyk2 et IFNAR2 à Jak1) ainsi qu'à des protéines de la famille des STAT (voir Figure 4) (de Weerd *et al.*, 2007). La fixation des IFNs de type I sur leur récepteur induit la phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2. Les protéines STAT phosphorylées forment un hétérodimère se liant au facteur de transcription IRF-9 (Schindler *et al.*, 2007). Ce complexe se lie à des régions régulatrices bien spécifiques de l'ADN génomique appelées ISRE (*IFN-stimulated response element*). Le ciblage des ISREs dans les promoteurs de nombreux gènes induit leur expression ; ces gènes sont appelés ISGs (*IFN stimulated genes*) (Schindler *et al.*, 2007) (voir Figure 4).

Le récepteur des IFN de type II est également composé de 2 sous unités, IFNGR1 cloné en 1988 (Aguet *et al.*, 1988) et IFNGR2 identifié 6 ans plus tard (Soh *et al.*, 1994) La fixation du dimère IFN- γ /IFN- γ sur son récepteur induit une transduction du signal via une voie Jak/Stat propre (Boehm *et al.*, 1997). Les dimères de STAT1 se lient aux séquences régulatrices GAS, induisant l'expression de nombreux gènes non toujours induits par les IFNs de type I. Parmi ces gènes figurent des facteurs de transcription comme IRF-1 mais aussi de nombreux gènes de la réponse immunitaire tels que des ISGs ou des gènes de régulation immunitaires (*IL-12* par exemple) (Schroder *et al.*, 2004) (voir Figure 4).

Le récepteur des interférons de type III est également un hétérodimère, composé d'une partie spécifique aux IFNs de type III- IFNLR1 - et d'une chaîne accessoire IL-10R2, qui

est aussi un composant des récepteurs des IL-10, IL-22 et IL-26 (Li *et al.*, 2009). La transduction du signal fait intervenir les mêmes éléments Jak/Stat que pour les IFNs de type I, conduisant à l'expression d'ISGs.

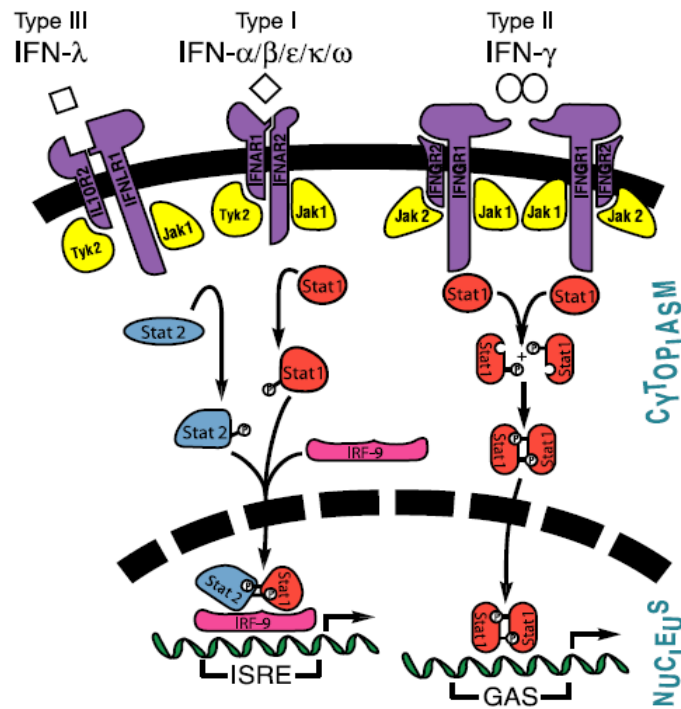


Figure 4 : Transduction du signal interféron (Samuel, 2007). La fixation des IFNs sur leur récepteur active la phosphorylation des protéines Stat1 par les kinases de la famille JAK. Le complexes de protéines Stat phosphorylées migrent vers le noyau et peuvent se fixer à des facteurs de transcription (IRF-9). La fixation de ces complexes sur des régions spécifiques de l'ADN (ISRE pour *interferon stimulated response element* ou GAS pour *gamma interferon activation site*) induit l'expression des ISGs (*interferon stimulated genes*) et des gènes IFNs.

Parmi les ISGs, on retrouve de nombreux gènes qui ont été beaucoup étudiés chez les mammifères. Une activité antivirale a pu être confirmée pour certains d'entre eux. Les principales protéines antivirales connues chez les mammifères sont décrites dans le paragraphe suivant.

d) Principaux ISGs antiviraux

La protéine kinase R ou PKR est une des mieux connues des molécules induites par les IFNs. L'activité kinase d'une protéine induite par l'interféron dépendante de l'ARN double brin avait d'ailleurs été montrée depuis de nombreuses années avant sa caractérisation en 1993 (Roberts *et al.*, 1976; Clemens *et al.*, 1993). Dans un contexte d'infection virale, la PKR est capable de détecter l'ARN double brin. Activée, elle forme un homodimère capable de phosphoryler le facteur d'initiation eIF-2 α , induisant une diminution drastique de la traduction protéique et donc de la production de virions (Sadler et Williams, 2008). De nombreux virus ont été décrits comme inducteurs de la PKR, tels le virus de la grippe, de l'hépatite C ou encore VIH-1.

Les protéines Mx (pour *orthomyxovirus resistance gene*) ont été décrites dès le début des années 60 comme un facteur protégeant les souris contre les orthomyxovirus (Lindenmann, 1964). Caractérisées 20 ans plus tard (Haller *et al.*, 1980), on sait aujourd'hui qu'il s'agit de protéines à activité GTPases impliquées dans la répression de nombreux virus (tels les orthomixovirus, les bunyavirus, le virus de LaCrosse, le virus de l'hépatite B...) via la formation de copolymères avec les capsides virales, bloquant ainsi l'assemblage du virus (Sadler et Williams, 2008).

La viperin / vig1 / cig5 a été initialement identifiée comme un gène induit par le HCMV chez l'homme (Zhu 1997) et par le rhabdovirus VSHV chez la truite (Boudinot *et al.*, 1999). L'analyse de la protéine de truite a montré que la séquence de Vig1/viperin est très conservée chez les vertébrés ; elle est en fait un membre de la superfamille des enzymes SAM (Sofia *et al.*, 2001). La viperin semble impliquée dans la répression de nombreux virus via différents mécanismes. Ainsi, cette protéine peut réprimer l'infection par le HCMV en réprimant l'expression de protéines virales (Chin et Cresswell, 2001) ou encore empêcher la sécrétion du virus de la grippe en modifiant les caractéristiques de fluidité de la membrane cellulaire (Wang *et al.*, 2007).

Il a été montré que le cytomegalovirus humain était directement capable d'induire la vipérine, sans passer par l'IFN (Seo *et al.*, 2011). Plus intéressant encore, la vipérine est elle-même capable d'induire la production d'IFN via TLR7 et TLR9, jouant le rôle d'initiateur d'une boucle de rétroaction positive des IFNs (Saitoh *et al.*, 2011).

ISG15 (ou Interferon stimulated gene 15) fut identifiée comme une protéine de 15kDa induite par l'IFN (Korant *et al.*, 1984). ISG15 est une protéine proche de l'ubiquitine capable de se conjuguer avec d'autres protéines selon un mécanisme similaire à l'ubiquitination : l'ISGylation (Sadler et Williams, 2008). ISG15 est également sécrétée par la cellule, jouant alors le rôle d'une cytokine impliquée dans la production d'IFN- γ par les cellules T CD3+ (Knight and Cordova, 1991; Recht *et al.*, 1991). L'ISGylation peut concerner des protéines virales ou cellulaires et ISG15 est impliquée dans la réponse à de nombreux virus comme HIV, Ebola ou encore le virus B de la grippe (Künzi et Pitha, 1996; Malakhova et Zhang, 2008; Lai *et al.*, 2009).

Parmi les gènes induits par l'IFN, on retrouve également l'IFN lui-même. On trouve en effet des ISRE dans les séquences régulatrices du facteur de transcription IRF-7, dont l'expression est donc induite par l'IFN. La synthèse d'IRF-7 entraîne en retour l'expression d'IFN (Bonjardim *et al.*, 2009). Ce type de boucle de rétroaction positive n'est pas restreint à la voie IRF-7 et la structure de régulation des gènes IFN de type I est sans doute encore plus complexe qu'on ne l'appréhende aujourd'hui.

Si les gènes ci dessus sont bien décrits et documentés, il a été montré que les IFNs de type I peuvent induire plus de 200 ISGs (de Veer *et al.*, 2001) dont la plupart ont encore une fonction inconnue. En parallèle de leur action directe contre l'infection virale, les interférons peuvent induire l'expression de nombreuses cytokines impliquées dans l'activation des cellules du système immunitaire innée ou adaptatif. Ainsi, les IFNs participent à l'activation et au recrutement de cellules du système immunitaire.

e) IFNs et immunité antivirale innée à médiation cellulaire

L'IFN- γ aussi appelé IFN immunorégulateur, module un certain nombre de mécanismes immunitaires, de l'immunité innée (Schroder *et al.*, 2004). Il est en particulier capable d'induire l'activation des macrophages, sans laquelle ceux-ci ne peuvent phagocyter les cellules infectées (Adams et Hamilton, 1984; Stark *et al.*, 1998).

Les IFN- γ - α et - β sont également responsables de l'activation des cellules Natural Killer (ou NK), qui sont des lymphocytes circulants particuliers découverts à l'origine pour leur capacité à détruire des cellules cancéreuses *in vitro* (Cerwenka and Lanier, 2001),

reconnues par des mécanismes impliquant les molécules CMH de classe I ou plutôt leur absence (Kärre *et al.*, 1986). L'importance des NKs dans la réponse antivirale innée a été montrée pour certains virus comme les herpesvirus, les papillomavirus ou les poxvirus (Brandstadter et Yang, 2011). L'expression des IFNs de type I entraînent l'activation des NK et leur recrutement sur le site de l'infection (Borden *et al.*, 2007). Les cellules NK reconnaissent les cellules infectées via des récepteurs activateurs de la cytotoxicité comme NKG2D ou NKp46 ou des récepteurs capables de détecter la répression des molécules de classe I exercée par certains virus pour échapper à l'immunité adaptative (Cerwenka and Lanier, 2001). L'activation de ces cellules NK entraînent la destruction de la cellule infectée ciblée et la sécrétion de cytokines, notamment d'IFN- γ par la cellule NK (Cerwenka and Lanier, 2001). Dans le modèle murin, l'importance des cellules NK dans la défense contre les infections virales a été bien établie par des expériences de déplétions *in vivo* ou chez des souris modifiées génétiquement et ne possédant plus de cellules NK (Yokoyama, 2008). Les virus ont développé de nombreux mécanismes d'interférence avec la réponse NK : activation des récepteurs inhibiteurs reconnaissant le CMH de classe I exprimés par les NK, inhibition des récepteurs d'activation des NKs reconnaissant des protéines cellulaires (comme NKG2D) ou des protéines virales comme Ly49 (Yokoyama, 2008).

Les IFNs sont également des acteurs de la mise en place des réponses spécifiques à l'infection virale. En effet les IFNs de types I & II augmentent l'expression des molécules du CMH de classe I, favorisant la reconnaissance des molécules virales par les lymphocytes T. L'IFN- γ intervient dans la maturation des cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigène, ainsi que des lymphocytes B et T (Borden *et al.*, 2007).

2) Immunité adaptative et réponse antivirale chez les mammifères

L'immunité adaptative permet la mise en place d'une réponse spécifique à l'antigène et d'une mémoire assurant une protection durable contre l'agent pathogène ciblé. Elle est divisée en deux grandes catégories : la réponse à médiation humorale via les lymphocytes B et la réponse à médiation cellulaire via les lymphocytes T. Dans les deux cas, la réponse nécessite la reconnaissance spécifique de l'agent infectieux via un déterminant antigénique appelé épitope par le site de reconnaissance (paratope) du récepteur de l'antigène d'un

lymphocyte. La spécificité de la réponse fut modélisée par la théorie de la sélection clonale des lymphocytes, proposée dès 1955 par Jerne et achevée par Burnet deux ans plus tard (Jerne, 1955; Burnet, 1957). Ce cadre requiert l'existence d'un paratope pour chaque épitope de chaque pathogène/antigène. La notion de « répertoire immunitaire » fut ainsi proposée pour expliquer l'énorme diversité des récepteurs des lymphocytes. On sait depuis les découvertes de S. Tonegawa que cette diversité est due à la diversification somatique des gènes de récepteurs des lymphocytes B (Igs) ou des lymphocytes T (TCRs), pendant la différenciation de ces cellules (Tonegawa, 1983). Les réarrangements des gènes des récepteurs de l'Ag, via l'action des enzymes RAG (Bleyzac *et al.*, 2005), et d'autres mécanismes de diversification assurent l'énorme diversité requise pour des réponses spécifiques de l'Ag sans impliquer pour autant un nombre démesuré de gènes présents dans le génome de l'individu. Les Igs reconnaissent directement l'antigène natif, alors que les TCRs reconnaissent des peptides présentés par les molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (ou CMH) à la surface de cellules spécialisées. Les deux paragraphes qui suivent présentent succinctement les deux types de réponses B et T (d'après Paul, 2008).

a) Les réponses antivirales à médiation humorale

Les lymphocytes B représentent environ 15% des lymphocytes circulants. Ils mûrissent dans la moelle osseuse chez l'homme et la souris. Leurs récepteurs sont les Igs (ou anticorps). Les cellules B naïves expriment la forme membranaire de l'IgM, associée à des chaînes de signalisation Ig α et β . Le complexe IgM/ Ig α ou β est aussi appelée BCR (pour *B cell receptor*). La forme soluble des anticorps est sécrétée par le lymphocyte après activation et induction d'une forme alternative de transcrit ne codant pas pour l'ancre membranaire. Lors d'une infection (virale), la reconnaissance des antigènes de l'agent pathogène par les BCRs spécifiques entraîne l'activation et la prolifération des clones qui les expriment, leur différenciation en plasmocytes et la sécrétion des anticorps spécifiques. La différenciation en plasmocytes, qui sécrètent beaucoup d'Igs s'accompagne d'une différenciation de quelques cellules du clone en cellules B mémoires à vie longue, qui pourront répondre rapidement en cas d'infection ultérieure par le même pathogène. Le type d'Ig produit, l'isotype

correspondant à un type de chaîne lourde d'anticorps, est déterminé par une autre recombinaison génomique, qui connecte la région codant le domaine variable à une région constante codant la chaîne lourde des IgG, A et E. Ce processus est régulé par différentes cytokines, et assure à la réponse les propriétés associées aux différentes classes d'anticorps. Les anticorps sécrétés se lient aux antigènes viraux, et neutralisent l'agent pathogène en masquant les sites par exemple nécessaires à la fusion, ou en bloquant l'accès de la protéine d'attachement à son récepteur cellulaire. Ils favorisent aussi son élimination par phagocytose via opsonisation. Un certain nombre de vaccins antiviraux assurent une protection qui est strictement dépendante de la sécrétion d'anticorps (neutralisants) spécifiques des antigènes du virus. Les 3 types d'IFNs de mammifères sont par ailleurs impliqués dans le développement, la prolifération des cellules B et la sécrétion des Igs (Borden *et al.*, 2007).

b) Les réponses antivirales à médiation cellulaire

Les lymphocytes T effectuent leur différenciation dans le thymus. Leurs récepteurs spécifiques des antigènes sont les TCRs (pour T cell receptor), qui ne peuvent pas directement reconnaître l'antigène sous sa forme native, mais uniquement lorsque celui-ci est lié sous forme de peptides à des protéines du CMH à la surface des cellules présentatrices de l'Ag comme les macrophages ou les cellules dendritiques. Les lymphocytes B peuvent endocyter les pathogènes et devenir eux-mêmes cellules présentatrices d'antigène. La reconnaissance de l'antigène par le TCR entraîne la prolifération du lymphocyte et sa différenciation, soit en cellule T mémoire, soit en plusieurs types de cellules effectrices selon la nature de la cellule T naïve :

- Les T auxiliaires, ou Th (pour *helper*), qui portent majoritairement le marqueur CD4 et produisent un grand nombre de cytokines lorsqu'elles reconnaissent un antigène lié aux protéines du CMH.

- Les T cytotoxiques ou Tc, qui portent majoritairement le marqueur CD8, ont une activité cytotoxique conduisant à la destruction de la cellule infectée.

- les T régulateurs qui ont des effets modulateurs des réponses et expriment en général le marqueur CD25.

Les IFNs de type I et II augmentent l'expression des molécules du CMH de type I, promouvant la reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes T. De plus, l'IFN- γ induit l'activation des lymphocytes T, jouant notamment un rôle important dans la différenciation des cellules Th1 CD4⁺ (Borden *et al.*, 2007).

Dans un contexte d'infection virale, le rôle des réponses T CD8⁺ est important à la fois pour le contrôle des infections à virus hautement cytopathogènes et pour la destruction des cellules infectées par des virus peu cytopathogènes comme les rétrovirus (Hertl, 2008). Les infections persistantes peuvent d'ailleurs se traduire par l'épuisement des clones T CD8⁺ spécifiques de l'agent pathogène.

Les infections virales peuvent induire à la fois des cellules Th1 (sécrétant IL2, IFN de type II, TNF α) et des cellules Th2 (produisant IL4, IL5, IL10 et IL13). Les cellules T CD4⁺ sont requises pour la formation des centres germinatifs dans lesquels les cellules B productrices d'Ac effectuent leur différenciation terminale (Hertl, 2008). Le rôle primaire des cellules CD4⁺ dans la réponse antivirale est indirect : il se traduit par une facilitation de l'activation des T CD8⁺ naïves et de l'émergence des T CD8⁺ mémoires, et par la promotion des réponses Ac.

Ces deux modes de défense aux caractéristiques différentes mais complémentaires, permettent une lutte efficace contre les pathogènes chez les mammifères et en particulier contre les virus. Comme ces derniers sont des pathogènes intracellulaires, la voie T CD8 joue un rôle crucial dans la réponse à ces infections. L'importance de la lutte contre les pathogènes pour la valeur sélective est telle que la question de la conservation de ces mécanismes entre les différentes lignées de métazoaires et en particulier chez les vertébrés se pose naturellement. En ceci, les poissons téléostéens, de par l'extraordinaire diversité des espèces et leur position dans l'arbre phylogénétique des vertébrés, occupent une position d'intérêt stratégique. L'importance de certaines espèces en agriculture a naturellement accéléré les travaux de compréhension des mécanismes de réponses aux pathogènes chez les poissons. En partant de ce qui était connu chez les mammifères ou en développant des approches *de novo*, les recherches sur ce sujet ont commencé à révéler points communs et différences essentielles entre les différents systèmes immunitaires des vertébrés.

3) Les réponses immunitaires dirigées contre les virus chez les poissons

a) Les IFNs viro-induits de poissons (IFN ϕ).

La première réponse aux virus chez les poissons est également non spécifique. La première démonstration de la présence d'un médiateur évoquant les IFNs de type I des mammifères date du début des années 1970 (de Kinkelin et Dorson, 1973). Cependant, les premières séquences d'un gène *IFN* viro-induit ne furent publiées que 30 ans plus tard chez le saumon atlantique (Robertsen *et al.*, 2003), le poisson zèbre *Danio rerio* (Altmann *et al.*, 2003) et le Fugu *Takifugu rubripes* (Lutfalla *et al.*, 2003). Des séquences de gènes d'IFNs ont aujourd'hui été retrouvées dans de nombreuses espèces de poissons téléostéens (voir Figure 5) qui possèdent (comme les mammifères) plusieurs copies de ces gènes (Zou et Secombes, 2011). Ces gènes, induits par le Poly(I:C) (analogue synthétique des ARNs double brin) et les infections virales, ont souvent été assimilés à des équivalents des IFNs de type I chez les mammifères (Robertsen, 2006), alors qu'ils possèdent certaines caractéristiques qui justifient une distinction. En effet, ils ont la particularité d'être composés de 5 exons, ce qui évoque plus les interférons de type III (Lutfalla *et al.*, 2003; Levraud *et al.*, 2007). On retrouve cette structure de gène à 5 exons chez les poissons cartilagineux et les amphibiens, suggérant que les *IFNs* de type I monoexoniques des mammifères dérivent de ces gènes pluriexoniques (Zou et Secombes, 2011). L'expression des *IFNs* de poissons (ou « IFN- ϕ s ») est de plus sujette à un niveau supplémentaire de régulation : il a été montré chez le saumon atlantique, le poisson-zèbre et la truite arc-en-ciel que l'infection virale induisait l'expression d'un transcrit alternatif (par utilisation alternative de promoteur) pourvu d'un peptide signal et donc fonctionnel, contrairement au transcrit original exprimé constitutivement, et dépourvu de peptide signal (Bergan *et al.*, 2006; Levraud *et al.*, 2007; Purcell *et al.*, 2009). Les IFN- ϕ s sont divisés de plus en deux groupes en fonction de leur composition en cystéine : le groupe I comprend les *IFNs* contenant 2 cystéines, ce groupe étant conservé entre poissons cartilagineux et mammifères. Le groupe II contient des *IFNs* possédant 4 cystéines. Ce groupe est spécifique des poissons et diffère du groupe des *IFNs* de mammifères par la position de ces acides aminés (Zou *et al.*, 2007) (voir Figure 5).

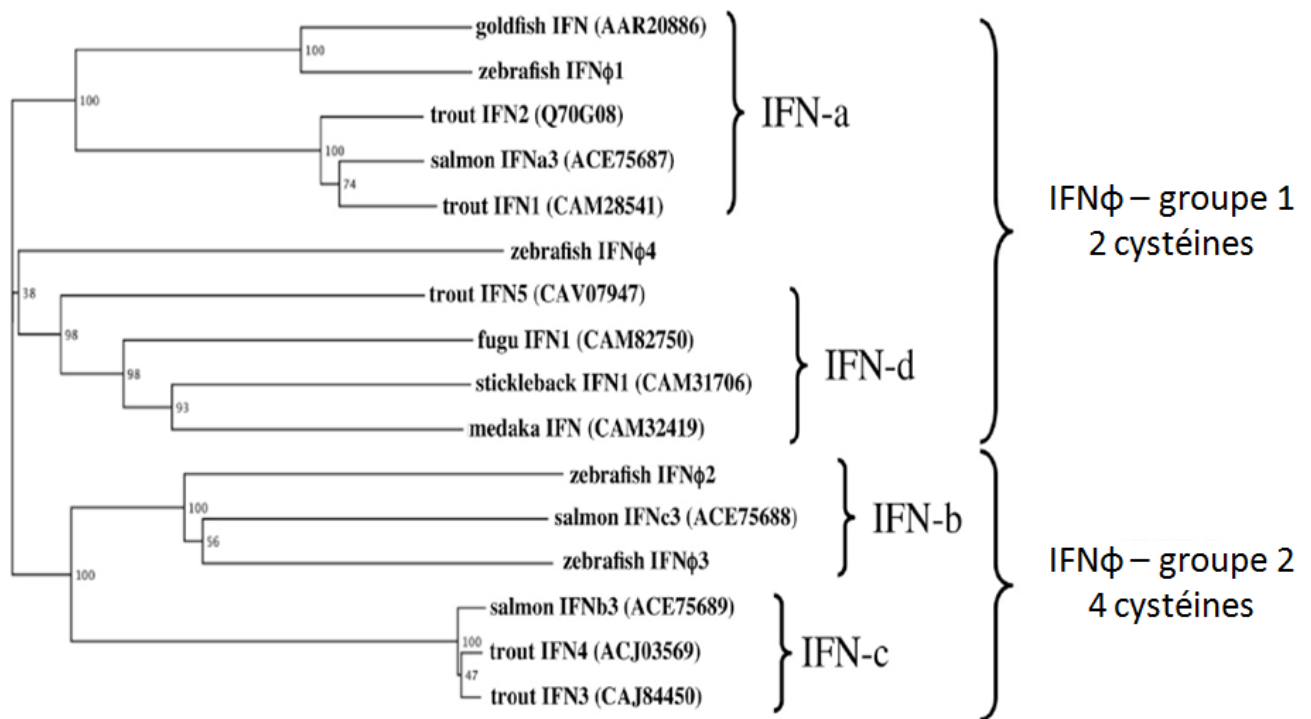


Figure 5 : Diversité des IFNφs (adapté de Aggad *et al.*, 2009). Les IFNφs du groupe 1 sont caractérisés par 2 cystéines conservées, alors que les IFNφs du groupe 2 possèdent 4 cystéines conservées. Trout : truite arc-en-ciel. Salmon : saumon atlantique. Zebrafish : poisson zèbre. Goldfish : poisson rouge. Stickleback : épineche (*Gasterosteus aculeatus*).

Les récepteurs des IFNs de poissons évoquent par ailleurs des récepteurs d'IFNs de type III mammaliens. Des membres de la famille des *crfbs* ont d'abord été identifiés chez le Tétraodon (*Tetraodon nigroviridis*) et le poisson zèbre à partir des séquences génomiques de ces espèces (Lutfalla *et al.*, 2003). Au moins 17 membres de cette famille ont été caractérisés depuis chez les poissons téléostéens (Zou and Secombes, 2011). Le récepteur des IFNs a été identifié chez le poisson zèbre comme un hétérodimère de CRFB1 et CRFB5 (Levraud *et al.*, 2007), grâce à une approche basée sur des KDs (pour *knock down*) par morpholinos. En fait, il existe deux récepteurs différents pour les IFN-φs en fonction du groupe auxquels ils appartiennent : ainsi, le récepteur des IFN-φs de groupe II (possédant 4 cystéines) est un hétérodimère de CRFB2 et CRFB5 (Aggad *et al.*, 2009) alors que les IFN-φs du groupe I ont pour récepteur un complexe CRFB1 /CRFB5. Ceci marque une différence importante avec les IFNs de type I des mammifères qui ne possèdent qu'un seul récepteur malgré la grande diversité de gènes connue. Les récepteurs des IFN-φs sont d'ailleurs structuralement plus proches des récepteurs des IFNs mammaliens de type III (voir Figure 6).

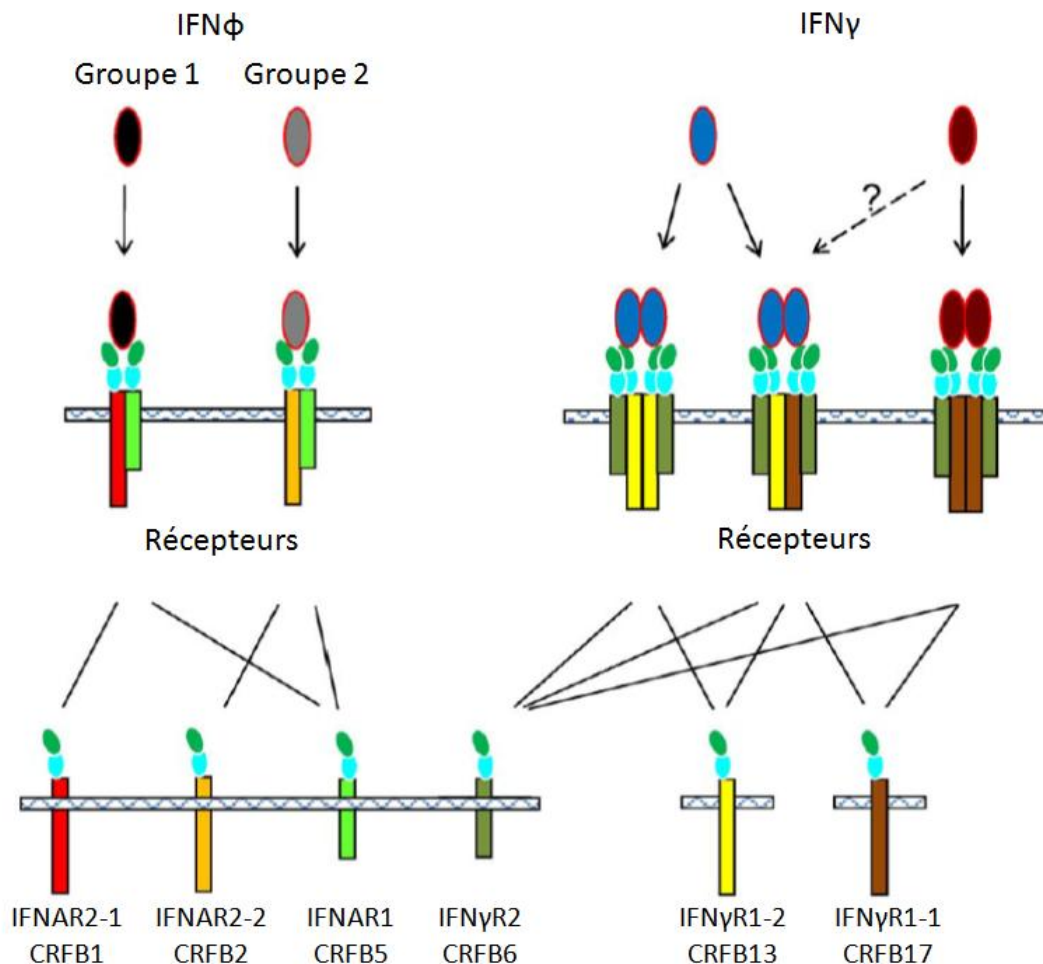


Figure 6 : Les récepteurs des IFNs de poissons (adapté de (Zou et Secombes, 2011)). Le récepteur des IFN-φs de groupe II (possédant 4 cystéines) est un hétérodimère de CRFB2 et CRFB5 alors que les IFN-φs du groupe I ont pour récepteur un complexe CRFB1 /CRFB5. Le récepteur des IFN-γs est également composé de deux sous-unités, IFN-γR1 et IFN-γR2, membres de la famille des CRFBs, mais deux types de IFN-γR1 ont été identifiés : CRFB13 et CRFB17. Le récepteur d'IFN-γ peut exister sous deux formes différentes : une constituée d'un dimère de CRFB6 et d'un dimère de CRFB13, et une également constituée d'un dimère de CRFB6 et d'un hétérodimère de CRFB13 et CRFB17.

En revanche, la structure tridimensionnelle de ces cytokines est clairement similaire à celle des IFNs de type I des mammifères (Hamming *et al.*, 2011).

La nomenclature de ces gènes chez les téléostéens est donc encore aujourd'hui sujette à débat. Suivant la nomenclature établie par Stein, nous préférons appeler les IFNs viro-induits de 5 exons chez les poissons « IFN-φ » (Stein *et al.*, 2007).

L'existence de gènes IFNs viro-induits chez les poissons laissait supposer l'existence d'un système de détection de virus régulant l'expression de ces gènes comparable à celui des mammifères. Le promoteur de l'IFN5 de truite possède d'ailleurs les motifs de site de fixation de certains facteurs de transcription tels des IRFs, STAT, NF-κB et BLIMP (Chang *et al.*, 2009).

b) TLRs et RLRs de poissons

Afin de caractériser le système IFN des poissons, de nombreuses études ont été menées en utilisant des inducteurs des IFNs chez les mammifères. Ainsi le Poly(I:C), ligand de TLR3 et Mda5 chez les mammifères, est capable d'induire la production d'IFN- ϕ et les facteurs de transcription IRF-1 et IRF-2 dans de nombreuses espèces de poissons incluant les salmonidés (Robertsen, 2008). Les CpG ODNs, équivalents des ADN CpG induisent une activité IFNs dans les leucocytes de saumon atlantique (Strandskog *et al.*, 2007) et une réponse immunitaire qui protège les poissons contre l'infection à l'IPNV (Jørgensen *et al.*, 2003). De même, toujours chez le saumon atlantique, certaines Imidazoquinolines, ligands de TLR7 et TLR8 chez les mammifères sont capables d'induire la synthèse d'IFNs (Robertsen, 2008). Ces résultats montrent une certaine conservation du système de reconnaissance des virus par PRRs capables d'induire la synthèse d'IFN dans les cellules de poissons. Le premier membre de la famille des IL-1/*Toll-like receptors* fut cloné chez la truite arc-en-ciel en 2000 (Sangrador-Vegas *et al.*, 2000). On compte aujourd'hui au moins 17 TLRs dans plus d'une douzaine d'espèces de poissons, dont des TLRs originaux (au moins 6) non présents chez les mammifères comme TLR22 (Palti *et al.*, 2010). Il est à noter que tous les TLRs ne sont pas retrouvés dans les espèces de poissons décrites (Rebl *et al.*, 2010) (voir Table 3). Le TLR4 semble par exemple perdu dans beaucoup d'espèces de poissons. On retrouve également de nombreux TLRs en plusieurs copies dans les génomes, comme TLR8a chez la truite arc-en-ciel ou TRL22 chez le saumon atlantique (Palti *et al.*, 2010).

Cette diversité est à mettre en relation non seulement avec les épisodes de duplication complète du génome qu'ont subis les espèces de téléostéens, mais aussi avec la multiplicité des espèces de poissons, qui en fait le groupe le plus diversifié des vertébrés (Venkatesh, 2003). Ces homologues des TLRs mammaliens sont capables de détecter la présence de virus dans la cellule.

Ainsi, un TLR3 a été décrit chez la truite arc-en-ciel et son expression augmente dans des leucocytes de truite arc-en-ciel stimulés par le Poly(I:C) ou après infection par le virus de la NHI (Rodriguez *et al.*, 2005), mais également chez le méné *Gobiocypris rarus* après infection par un réovirus de carpe (Su *et al.*, 2008), et chez le poisson zèbre après infection par un rhabdovirus (Phelan *et al.*, 2005).

Des homologues des TLR7/8 et TLR9 ont également été identifiés chez différentes espèces de téléostéens. Chez le saumon atlantique, TLR8 dont l'expression est induite par l'IFN- α recombinant a ainsi été identifié (Skjaeveland *et al.*, 2009). TLR7 et 8 furent également identifiés chez la truite arc-en-ciel et localisés sur le groupe de liaison 31 (Palti *et al.*, 2010). On retrouve aussi un homologue de TLR9 chez le saumon atlantique et le cardeau hirame et leur expression augmente après induction par certains oligonucléotides CpG (Takano *et al.*, 2007; Skjaeveland *et al.*, 2008).

Le cas de TLR4 est particulier. Connu chez les mammifères pour être le principal senseur du LPS bactérien (Lu *et al.*, 2008), aucune séquence homologue ne fut retrouvée dans le premier génome de poisson séquencé, celui du Fugu (Oshiumi *et al.*, 2003). De plus, les poissons semblent beaucoup moins sensibles que de nombreux vertébrés terrestres aux effets toxiques du LPS, et la reconnaissance de ce motif bactérien se fait sans doute de façon différente chez les poissons et les vertébrés terrestres (Swain *et al.*, 2008). On crut alors que les poissons avaient perdu le TLR4 après la séparation de la lignée avec les autres lignées de vertébrés. Cependant, deux séquences de TLR4 furent finalement identifiées et publiées chez le poisson zèbre (EU551724 et NM_212813) et un TLR4 potentiel, dont l'expression est régulée par l'infection virale ou bactérienne a également été décrit chez la carpe commune (Su *et al.*, 2009).

Parmi les TLRs spécifiques des poissons, TLR22 a la particularité de se lier à l'ARN double brin. Il semble être exprimé à la surface des cellules, et des cellules RTG2 de truite arc-en-ciel transfectées avec le TLR22 du Fugu sont résistantes à l'infection par le VNPI, *via* l'induction d'*IFN- ϕ s* après détection de l'ARN double brin par le TLR22. (Matsuo *et al.*, 2008).

Table 3 : diversité des TLRs de poissons (adapté de Palti, 2011).

TLR	Espèces	Ligands connus
TLR1	Fugu, poisson zèbre	-
TLR2	Fugu, poisson zèbre, carpe commune	Lipopeptides
TLR3	Fugu, poisson zèbre	ARNdb, Poly(I:C)
TLR3a/b	Carpe commune	-
TLR4	Poisson zèbre	-
TLR5M/S	Fugu, truite arc-en-ciel	Flagelline
TLR5	Poisson zèbre	-
TLR7	Fugu, poisson zèbre, truite arc-en-ciel	-
TLR7a/b	Carpe commune	-
TLR8a1/a2	Truite arc-en-ciel	-
TLR8a/b	Poisson zèbre	-
TLR8	Fugu	-
TLR9	Fugu, poisson zèbre	-
TLR14*	Fugu, poisson zèbre	-
TLR19*	Poisson zèbre	-
TLR20a*	Poisson zèbre, poisson chat	-
TLR21*	Fugu, poisson zèbre	-
TLR22*	Fugu, poisson zèbre	ARNdb, Poly(I:C)
TLR22a/b*	Saumon atlantique	-
TLR23*	Fugu	-

* : TLRs non décrits chez les mammifères.

Poisson chat : *Ictalurus punctatus*

Ces nombreuses découvertes sur les TLRs de poissons ont bien évidemment encouragé la recherche des transducteurs du signal. On pouvait alors supposer que les homologues des molécules mammaliennes des voies induisant l'expression d'IFN après activation des TLRs pourraient être trouvés. Ainsi, des séquences de l'adaptateur Myd88 sont décrites chez la truite arc-en-ciel (Rebl *et al.*, 2010), le Fugu (Purcell *et al.*, 2006), le saumon atlantique (Skjaeveland *et al.*, 2009) et d'autres espèces de téléostéens (Rebl *et al.*, 2010). De plus, l'expression de Myd88 est accrue après stimulation par le Poly(I:C) chez le cardeau hirme (Takano *et al.*, 2006). De même, un adaptateur TRIF, capable d'induire l'expression d'IFN- ϕ s a été décrit chez le poisson zèbre (Fan *et al.*, 2008). Par ailleurs, des orthologues des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 ont été caractérisés chez la truite arc-en-ciel (Holland *et al.*, 2008) et le turbot (Hu *et al.*, 2011). IRF7 est surexprimé en présence d'IFN- ϕ ou de LPS. Ces résultats montrent une relative similarité et donc conservation des mécanismes de reconnaissance de virus via les TLRs. De nombreux autres IRFs impliqués

dans la réponse antivirale ont récemment été décrits chez le saumon atlantique (Sun *et al.*, 2011; Iliev *et al.*, 2011).

Comme les TLRs, les RLRs orthologues de RIG-I et MDA5 ont été retrouvés chez les poissons téléostéens, ce qui indique leur origine ancienne au sein des vertébrés. L'adaptateur mitochondrial MAVS ou VISA a été identifié chez les salmonidés et les cyprinidés. Associé à RIG-I, il induit une forte réponse IFN et une activation de Nf- κ B. Il est également localisé dans la mitochondrie, et induit une forte protection contre les infections virales dans les cellules EPC (Zou *et al.*, 2009; Biacchesi *et al.*, 2009; Lauksund *et al.*, 2009).

La conservation de ces mécanismes de reconnaissance des pathogènes et en particulier des virus par les cellules entre poissons et mammifères montre l'importance de ces systèmes dans la lutte contre les infections, et l'émergence avec les vertébrés d'un système intégré qui ne comprend pas seulement les acteurs de l'immunité adaptative. Le médiateur principal de l'immunité innée, l'IFN, est sécrété par les cellules de poissons et jouent également un rôle de cytokine auto- et paracrine en se fixant sur son récepteur. La transduction du signal après fixation de l'IFN sur son récepteur fait intervenir les mêmes acteurs chez les poissons que chez les mammifères, la voie principale étant la voie Jak/STAT (Collet et Secombes, 2002). Il en résulte la synthèse de gènes induits par l'IFN, les ISGs, dont un nombre significatif sont orthologues chez les poissons et chez les mammifères et donc dérivent de gènes anciens présents chez l'ancêtre commun.

c) ISGs chez les poissons téléostéens

Les premiers gènes IFN-induits chez les poissons ont été identifiés par PCR en utilisant des oligonucléotides dérivés des séquences connues de ces gènes chez les mammifères (Trobridge et Leong, 1995). Cependant, pour beaucoup de ces gènes, les divergences étaient trop fortes pour espérer les identifier de cette manière. Une autre approche, sans *a priori*, consiste à rechercher les gènes surexprimés dans des cellules infectées par un virus. Une des méthodes de comparaison, le *mRNA differential display*, fut appliquée sur des leucocytes de truites arc-en-ciel infectées au virus de la SHV et permis la caractérisation de nouveaux gènes viraux-induits non connus chez les mammifères *vig-1*

(pour *VHSV-induced gene 1*, qui n'est autre que la *vipérine* décrite ci-dessus) et *vig-2* (Boudinot *et al.*, 1999).

L'utilisation de banques soustractives (SSH pour *soustractive suppressive hybridization*) a permis de mettre en évidence un certain nombre des gènes viraux induits chez la truite arc-en-ciel comme *Mx*, *isg15* ou *vig2* (O'Farrell *et al.*, 2002). La même technique fut par la suite beaucoup utilisée dans les différentes espèces de téléostéens, et a permis entre autres l'identification de deux *isg15* et deux *Mx* chez le poisson rouge (*Carrassius auratus*) (Zhang *et al.*, 2004; Zhang, Wang, *et al.*, 2007) et d'*isg15* chez la morue de l'Atlantique (Seppola *et al.*, 2007).

Ces dernières années, la multiplication des données génomiques (ESTs, banque de BACs...) , la généralisation des méthodes d'étude du transcriptome à haut débit, ainsi que la séquence complète de certains génomes ont ouvert la voie à la recherche et à l'identification globale des ISGs de poissons (Altmann *et al.*, 2003; Lutfalla *et al.*, 2003; Robertsen *et al.*, 2003).

On sait aujourd'hui que la plupart des ISGs antiviraux chez les mammifères ont des homologues chez les poissons, et qu'ils sont également viro-induits. Mais peu d'études fonctionnelles existent sur les mécanismes antiviraux mis en jeu par la cellule lors d'une infection.

Pour une revue sur les ISGs de poisson , voir Verrier *et al.*, 2011 à la fin de ce manuscrit (Annexe 2, p243).

d) IFN- γ chez les poissons

La première séquence d'IFN- γ chez les poissons a été identifiée chez le Fugu, par une approche de synténie conservée (Zou *et al.*, 2004). Des séquences d'IFN- γ de poissons ont ensuite été décrites chez la truite arc-en-ciel (Zou *et al.*, 2005), le saumon atlantique (Robertsen *et al.*, 2006), le poisson chat (Long *et al.*, 2006), la carpe commune (Stolte *et al.*, 2008) et d'autres espèces de téléostéens (Zou et Secombes, 2011). Malgré des divergences de séquences, la structure des gènes est bien conservée entre les espèces, la taille des exons étant en particulier très proche (Zou et Secombes, 2011). La particularité des IFN- γ de poissons est qu'on en trouve une deuxième copie dans un certain nombre d'espèces, parfois

appelé IFN- γ rel (pour *related molecule*). Cette particularité semble spécifique des téléostéens, et n'est pas seulement observée pour les IFN- γ s mais aussi pour de nombreux autres gènes, dérivant de la duplication génomique globale mise en évidence à la base de l'arbre des téléostéens, ou de duplications postérieures, locales ou globales (Jaillon *et al.*, 2004). IFN- γ rel provient d'une duplication ancestrale d'IFN- γ spécifique à la lignée des téléostéens (Savan *et al.*, 2009). Il est retrouvé par exemple chez le Fugu, le poisson chat et le poisson zèbre (Zou et Secombes, 2011).

Le cas des salmonidés est un peu différent. IFN- γ est présent chez la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique en deux copies d'un gène dupliqué récemment, appelés IFN- γ 1 et d'IFN- γ 2, résultant sans doute de l'épisode de duplication spécifique des salmonidés (Robertsen *et al.*, 2006; Purcell *et al.*, 2009). L'IFN- γ rel n'est pas décrit dans ces espèces.

Le récepteur des IFN- γ fut identifié chez le poisson zèbre en utilisant la même technique que pour l'identification du récepteur des IFN- ϕ s (Aggad *et al.*, 2010). Il est également composé de deux sous-unités, IFN- γ R1 et IFN- γ R2, membres de la famille des CRFBs, mais deux types de IFN- γ R1 ont été identifiés : CRFB13 et CRFB17. Le récepteur d'IFN- γ peut exister sous deux formes différentes : une constituée d'un dimère d'IFN- γ R2 et d'un dimère de CRFB13, et une également constituée d'un dimère d'IFN- γ R2 et d'un hétérodimère de CRFB13 et CRFB17. Le récepteur d'IFN- γ rel semble lui être composé d'un dimère d'IFN- γ R2 et d'un dimère de CRFB17. IFN- γ R2 est aussi appelé CRFB6 chez le Fugu et le poisson zèbre (Zou et Secombes, 2011) (voir Figure 6). Les fonctions des IFN- γ s de poisson ont également été étudiées. En particulier, l'IFN- γ induit la réponse phagocytaire des macrophages (Grayfer et Belosevic, 2009). Les IFN- γ s sont également capables d'induire des ISGs antiviraux, tels *Mx*, la *vipérine* ou *isg15*, mais semblent avoir une efficacité plus faible que certains IFN- ϕ s (Zou et Secombes, 2011). Ils induisent également la synthèse de cytokines proinflammatoires comme IL6, IL12 et le TNF (Grayfer *et al.*, 2010). Une étude chez la carpe commune a montré que les 2 IFN- γ s semblent avoir des fonctions immunitaires différentes, de part leurs différents profils d'expression (Stolte *et al.*, 2008). Un an plus tard, des recherches sur les embryons de poisson zèbre semblaient cependant montrer le contraire, les 2 IFN- γ s ayant la même fonction (Sieger *et al.*, 2009).

La conservation du système IFN entre les poissons et les mammifères illustre l'importance de ces mécanismes dans la résistance aux pathogènes et en particulier aux virus. L'absence d'IFNs de type I monoexoniques, si diversifiés sans doute par rétroposition

chez les mammifères semble être compensée par un très large nombre de gènes d'IFN- ϕ s dont une partie sans doute n'est pas encore décrite. Ainsi, les mécanismes de diversification du répertoire des IFNs ont été différents, mais ont abouti à des configurations assez similaires dans les deux groupes.

Le nombre croissant de séquences génomiques de poissons quasi-complètes devrait donner une idée plus complète de la diversité des IFNs de poissons. La diversité observée entre les groupes de poissons est significative: tous les gènes de TLRs ou d'IFNs ne sont pas présents dans toutes les espèces décrites. L'histoire évolutive des espèces et leur dynamique génomique propre, et la cohabitation avec des pathogènes différents exerçant des pressions plus ou moins fortes sur leurs hôtes, sont certainement à l'origine de ce phénomène.

La réponse antivirale innée n'est pas la seule voie de défense contre les virus chez les poissons. L'immunité adaptative basée sur les domaines Igs, présente chez tous les vertébrés à l'exception des agnathes (Du Pasquier, 2009) joue aussi un rôle critique dans la lutte contre les pathogènes chez les téléostéens.

e) Réponse spécifique contre les virus chez les poissons.

L'efficacité de la vaccination de nombreuses espèces de poissons contre différents pathogènes (bactéries, virus) démontre sans ambiguïté l'existence et l'importance des réponses immunitaires spécifiques et d'une mémoire (Winton, 1997). L'importance de l'immunité adaptative dans la réponse aux infections chez les poissons est admise depuis bien longtemps maintenant. Il avait été observé par exemple que des populations de poissons ayant survécu à des infections virales étaient protégées contre les attaques futures de ce même virus, mais pas contre celles d'un virus proche (de Kinkelin et Bearzotti, 1981). L'obtention de vaccins efficaces à l'aide de virus atténué contre les virus de la SHV et de l'IHN chez les salmonidés engendrant une forte protection contre ces infections confirma ces hypothèses (Winton, 1997). La mise au point de vaccins ADN en utilisant l'ADNc des glycoprotéines G de ces virus chez la truite arc-en-ciel, démontra une efficacité surprenante de la vaccination génétique chez cette espèce. Les transferts adoptifs de protection par les anticorps du sérum des poissons vaccinés confirma l'importance d'une réponse humorale protectrice via les anticorps anti-glycoprotéine, neutralisants et facilitants, suffisante pour

lutter contre l'infection (Boudinot *et al.*, 1998). On connaît aujourd'hui chez les poissons deux lignages de lymphocytes B : la population majoritaire dans les organes lymphoïdes centraux exprime les Immunoglobulines IgM et IgD, alors que l'autre population exprime un autre isotype (appelé IgT ou IgZ selon les espèces), et est spécialisée dans la protection des muqueuses. (Danilova *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Les rôles respectifs des IgM et IgT dans l'immunité protectrice contre les virus restent à déterminer précisément, ainsi que le rôle des anticorps naturels. L'importance et les modalités de la réponse humorale antivirale spécifique sont certainement variables avec les virus, mais aussi avec les espèces de poissons. Ainsi, la morue, qui ne possède pas de CMH de classe II - et donc pas de système de T helper classique - et qui semble exprimer un haut niveau d'anticorps naturels sériques, possède très certainement des stratégies de réponse anticorps particulières (Star *et al.*, 2011).

La réponse cellulaire chez les poissons fut d'abord étudiée à travers des systèmes expérimentaux de greffes d'écaillés (Desvaux and Charlemagne, 1983) et de manière très élégante chez le *Channel catfish* dans des systèmes d'aide à la production d'anticorps (Miller *et al.*, 1985). Le clonage des gènes du TCR confirma l'existence d'une immunité à médiation cellulaire basée sur des cellules T - le premier gène de TCR de poisson fut cloné chez la truite arc-en-ciel en 1994 (Partula *et al.*, 1994) - mais les modalités des réponses T ne furent décrites que plus tardivement (Boudinot *et al.*, 2001, 2002, 2004). La résistance au virus de l'ISAV associée au polymorphisme des gènes du CMH chez le saumon atlantique plaide également pour l'implication des réponses T dans la réponse aux virus (Grimholt *et al.*, 2003).

Même si les populations de cellules T sont encore mal connues, les apports des bases de données d'ESTs ont permis d'identifier des marqueurs clés des cellules T, tels CD4, CD8, CD3, CD28, CTLA4, suggérant l'existence de cellule Th1 semblables à celles des mammifères (Castro *et al.*, 2011). Les cellules T de poissons peuvent induire une cytotoxicité et l'expression de cytokine après activation, et leur développement ainsi que celui du thymus semblent conservés des poissons au mammifères (Langenau and Zon, 2005). Cependant, de nombreuses questions restent en suspens, comme par exemple la part de l'implication des cellules T dans la protection contre les infections (Castro *et al.*, 2011).

f) Particularités du CMH de poissons : un système conservé mais éclaté.

La principale différence entre le CMH des tétrapodes (et des chondrichthyens) et celui des téléostéens est lié aux épisodes de duplication intervenus dans l'évolution du groupe : le « CMH » des poissons est en effet éclaté (ne formant donc plus un complexe unique), les gènes codant les protéines de classe I et II n'étant en général plus localisés dans le même groupe de liaison (Kuroda *et al.*, 1996; Bingulac-Popovic *et al.*, 1997; Sunyer *et al.*, 1998). Les gènes *tap* et *tapbp* sont liés aux molécules classe I et non de classe II (Flajnik et Kasahara, 2001). Chez les salmonidés, il existe un gène principal de classe I classique correspondant à un lignage ancien (*UBA*) (Hansen *et al.*, 1996; Shum *et al.*, 2001). Cependant, de nombreux autres gènes de classe I de ce lignage plus ou moins polymorphes ont été décrits : *UCA*, *UDA*, *UEA*, *UAA*, *UDA*, *UEA*, *UCA*, *UFA*, *ULA*, *UHA* et *UZA* (Shiina *et al.*, 2005; Dijkstra *et al.*, 2006). Ces gènes codent sans doute pour des protéines classiques et non classiques mais leurs fonctions sont encore inconnues. Deux autres lignages de CMH de classe I ont été découverts, Z et S, qui présentent également un certain niveau de polymorphisme (Lukacs *et al.*, 2007). La complexité du système est variable d'une espèce à une autre (Lukacs *et al.*, 2007).

Une autre différence réside dans la multiplicité des gènes codant pour la B2 microglobuline chez la truite arc-en-ciel (Shum *et al.*, 1996; Magor *et al.*, 2004).

Le système immunitaire de réponse aux virus est donc relativement bien conservé entre poissons et mammifères. Des IFNs aux lymphocytes T, tous les acteurs d'une réponse innée et adaptative sont bien présents dans les différentes lignées. Cette conservation montre que ces mécanismes constituent un système de défense intégré contre les pathogènes (dont les virus). Les différences observées entre les espèces de poissons sont un témoin de la diversité de ce groupe et des évolutions particulières des lignées. Il est donc important de noter que seule l'étude exhaustive des différents groupes de téléostéens permettra de conclure sur l'ensemble des mécanismes impliqués dans la réponse antivirale chez les poissons, et que les groupes économiquement importants devront être étudiés en tant que tels. D'autre part, une large part de cet édifice conceptuel est bâtie sur des extrapolations de ce qui était déjà décrit chez les mammifères. Si les structures des gènes sont bien connues, les mécanismes, les voies, et les fonctions de ces gènes sont plus ou

moins déduites de celles des mammifères (en particulier pour les fonctions des protéines antivirales, voir la revue sur les ISGs de poissons Verrier *et al.*, 2011). Cette approche ne permet pas d'être exhaustif quant à la description des mécanismes de réponse antivirale chez les poissons. Peu d'études *de novo* existent, alors qu'elles ont permis par le passé la découverte de gènes et de mécanismes inconnus, y compris chez les mammifères (Boudinot *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006). Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ces mécanismes chez les poissons, et permettre la comparaison entre les différents groupes de téléostéens, de bon modèles d'interaction poissons/virus peuvent se révéler très utiles.

Chapitre 3.

Les Rhabdovirus de la truite arc en ciel : un bon modèle hôte/pathogène pour l'étude de la réponse antivirale.

Parmi les différentes espèces de poissons étudiées (poisson zèbre, fugu, Tétrodon, tilapia *Oreochromis niloticus*, épinoche, saumon atlantique...), la truite arc-en-ciel est l'une des mieux caractérisées dans un grand nombre de disciplines de recherche. Son importance en aquaculture et en pêche sportive ont catalysé le développement des connaissances biologiques à son sujet (Wolf et Rumsey, 1985). Même si elle est plus coûteuse à maintenir dans une structure expérimentale que certaines espèces d'aquarium, elle est relativement simple à élever. Le fait qu'elle soit de plus grande taille que les poissons modèles comme le poisson zèbre ou le médaka (y compris aux jeunes stades de développement) n'est pas forcément un inconvénient : il est ainsi plus simple de prélever des organes, des tissus, et d'isoler certains types cellulaires pour des études biochimiques ou immunologiques par exemple. Sa reproduction est de plus bien maîtrisée, et les œufs peuvent être fertilisés *in vitro* (Thorgaard *et al.*, 2002). Enfin, les populations naturelles de truite arc-en-ciel ont également été largement étudiées, faisant de cette espèce un bon sujet d'étude pour certaines questions d'évolution, en particulier celles relatives à la domestication (Hershberger, 1992). La truite arc-en-ciel est utilisée comme animal modèle dans de nombreux domaines comme la cancérologie, la toxicologie, l'écologie, la physiologie, l'évolution et – comme cela a été précédemment mentionné dans ce manuscrit – l'immunologie (Thorgaard *et al.*, 2002). Dans le cadre de l'étude de la réponse antivirale, la truite arc-en-ciel est un modèle particulièrement pertinent : d'une part, sa position taxonomique en fait un animal intéressant pour la comparaison des réponses antivirales inter espèces au sein des vertébrés et des poissons. D'autre part, la maîtrise de la reproduction a permis le développement de lignées isogéniques (Quillet *et al.*, 2007; Komen et Thorgaard, 2007) pertinentes pour l'étude de certains caractères quantitatifs complexes, incluant la résistance aux pathogènes et pour la caractérisation des réponses associées à des haplotypes particuliers. Enfin, l'importance économique de certains virus, capables de causer de sérieux dommages dans les élevages piscicoles, a conduit à une étude approfondie des principaux virus infectant la truite arc-en-ciel, et de la réponse de celle-ci aux infections.

Je m'attacherai dans ce chapitre à décrire les caractéristiques de notre modèle d'étude, des deux rhabdovirus et de l'hôte truite arc-en-ciel.

1) La truite arc-en-ciel : un salmonidé modèle

a) Des salmonidés

La truite arc-en-ciel appartient à la famille des salmonidés. En taxonomie classique, cette famille est la seule du super ordre des salmoniformes. Au sein de cette famille, la sous-famille des salmoninés est divisée en trois genre : *Salvelinus* (exemple : l'omble chevalier *Salvelinus salpinus*), *Salmo* (exemple : le saumon atlantique) et *Oncorhynchus* (exemple : la truite arc-en-ciel) (source : FishBase). Les salmonidés dérivent d'un ancêtre tétraploïde ayant subi un épisode de duplication du génome daté entre 25 et 100 millions d'années suivi d'une rediploïdisation (Allendorf et Thorgaard, 1984). Cet épisode de duplication est largement postérieur à celui intervenu à la base des téléostéens il y a environ 350 millions d'années (voir Figure 8) (Jaillon *et al.*, 2004). En cela, les salmonidés sont de bons modèles pour l'étude des conséquences de la duplication des gènes en particulier des extinctions de gènes (qui deviennent des pseudogènes) ou de la néofonctionnalisation de gènes. Globalement cette famille est très importante en aquaculture à l'échelle mondiale (voir Figure 7 pour l'exemple de la truite arc-en-ciel).

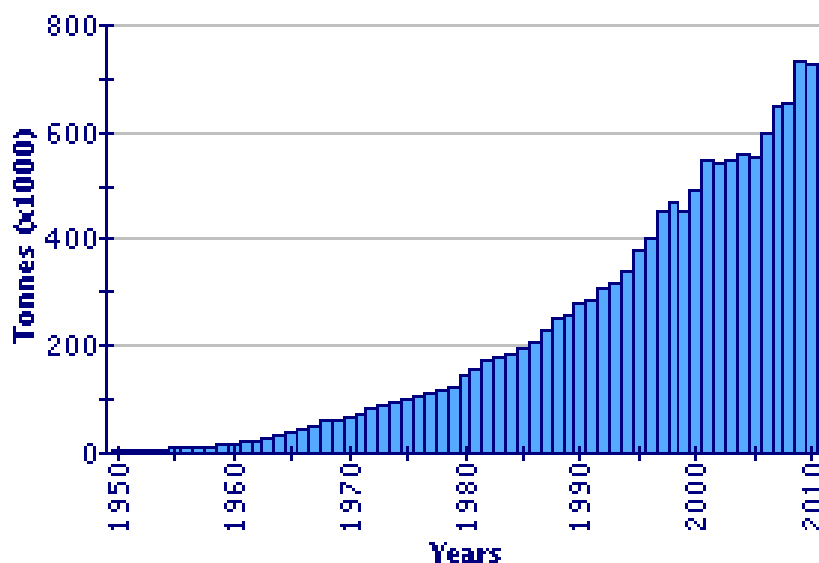


Figure 7 : Production mondiale de truite arc-en-ciel (source : FAO > pêche et aquaculture).

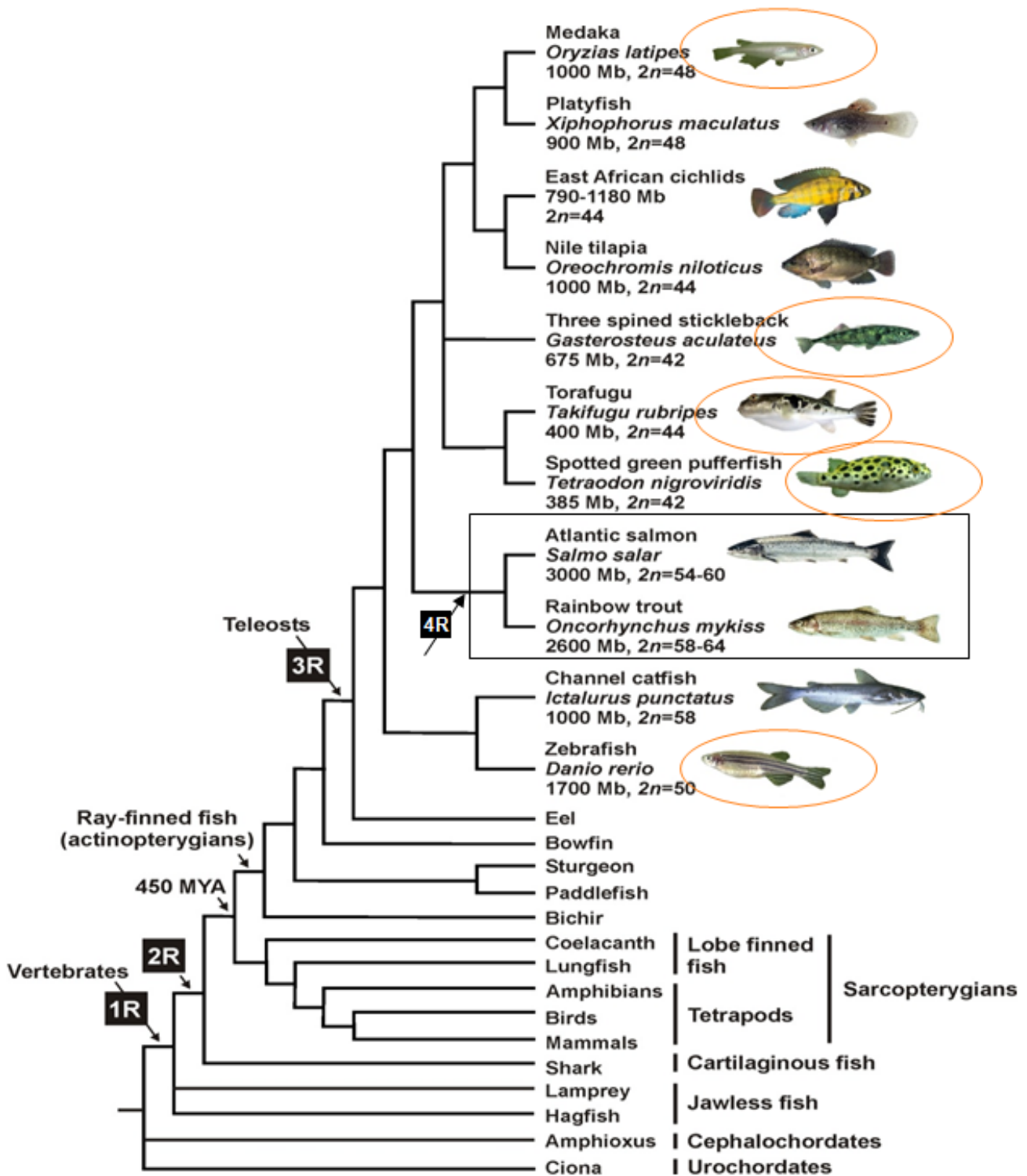


Figure 8 : Arbre phylogénétique des chordés, centré sur les poissons téléostéens (adapté de Froschauer *et al.*, 2006). Les cadres noirs représentent les épisodes complets de duplication du génome, dont 3R (spécifique des téléostéens) et 4R (spécifique des salmonidés). Les espèces de poissons représentées sont les principales espèces modèles. Quelques génomes (entourés en orange) sont entièrement séquencés.

b) Ressources génétiques et génomiques

Une des limites du modèle est l'absence de génome séquencé, en comparaison d'autres espèces modèles comme le poisson zèbre, l'épinoche ou le Tétrodon. La principale difficulté résulte évidemment de l'épisode de tétraploïdisation récent à l'origine des salmonidés. Le génome de ces poissons est plus grand que la plupart des espèces modèles (environ 3000 Mb, voir Figure 8) et est surtout très riche en séquences dupliquées (entre 50 et 60% du génome chez la truite arc-en-ciel, encore davantage chez le saumon atlantique), rendant difficile le séquençage et l'assemblage de ces génomes (Davidson *et al.*, 2010; Palti *et al.*, 2011).

Même si le génome n'est pas séquencé, de nombreuses ressources génomiques sont disponibles chez la truite arc-en-ciel : on compte en particulier de nombreuses banques de BACs (*bacterial artificial chromosome*) ayant permis la construction d'une carte physique, ainsi qu'une base de données d'environ 200 000 séquences d'extrémités de BACs (ou BES pour *BAC end sequences*) (Genet *et al.*, 2011; Palti *et al.*, 2011). On compte aussi une très grande base de données d'ESTs (pour *expressed sequenced tag*) et des transcriptomes de référence (Rexroad *et al.*, 2003; Govoroun *et al.*, 2006; Salem *et al.*, 2010). Une carte génétique synthétique reprenant les données de 3 cartes génétiques créées indépendamment a aussi récemment vu le jour (Guyomard *et al.*, 2012). Cette carte de plus de 2200 marqueurs SNPs (*single nucleotide polymorphism*) ou microsatellites couvre sur une longueur totale de 3600cM les 29 groupes de liaisons de la truite arc-en-ciel (correspondant aux 58 à 64 chromosomes décrits chez la truite arc-en-ciel). On observe également un développement rapide de nombreux SNPs dans l'espèce (Boussaha *et al.*, 2012).

A ces nombreuses données génomiques s'ajoute un matériel expérimental très intéressant pour les études génétiques, avec des lignées sélectionnées pour un certain nombre de caractères : déterminisme du sexe, teneur en lipides du muscle, réponse au stress, croissance sur aliment d'origine végétale, population anadromes ou non... (Quillet, 2002; Quillet *et al.*, 2005; Pottinger, 2010; Le Boucher *et al.*, 2012). Les manipulations chromosomiques permettent en outre l'utilisation d'un matériel original : des lignées clonales de poissons double haploïdes obtenues par gynogenèse.

c) Manipulations chromosomiques : la gynogenèse

La gynogenèse est une forme particulière de parthénogenèse, c'est-à-dire de développement d'un zygote pluriploïde à partir d'un gamète femelle non fécondé. Dans le cas de la gynogenèse, le développement de l'œuf est stimulé par la présence de sperme, sans que le matériel génétique d'origine mâle ne participe de façon active. Certaines salamandres du genre *Ambystoma* peuvent se reproduire dans la nature de cette façon sous certaines conditions, de température notamment (Elinson *et al.*, 1992), et des cas ont également été décrits chez les poissons, comme chez le carassin (*Carassius auratus gibelio*) (Chourrout, 1982).

Chez la truite arc-en-ciel, la maîtrise de la fécondation *in vitro* permet la reproduction des poissons via cette technique, en utilisant du sperme irradié aux ultraviolets (UVs) pour détruire le matériel génétique des spermatozoïdes (Chourrout et Quillet, 1982; Diter, 1993). La présence de sperme irradié sur les ovules active la reprise de la deuxième division de méiose. Il existe alors deux possibilités pour retourner à l'état diploïde, indispensable à la viabilité du zygote : ou l'expulsion du second globule polaire est inhibée par choc thermique ou hyperbare, et l'on obtient un zygote diploïde, c'est la gynogenèse méiotique. Ou bien le second globule polaire est expulsé, et c'est la première mitose embryonnaire qui est inhibée par un choc thermique ou hyperbare, on obtient alors un zygote haploïde doublé (HD), c'est la gynogenèse mitotique (voir Figure 9).

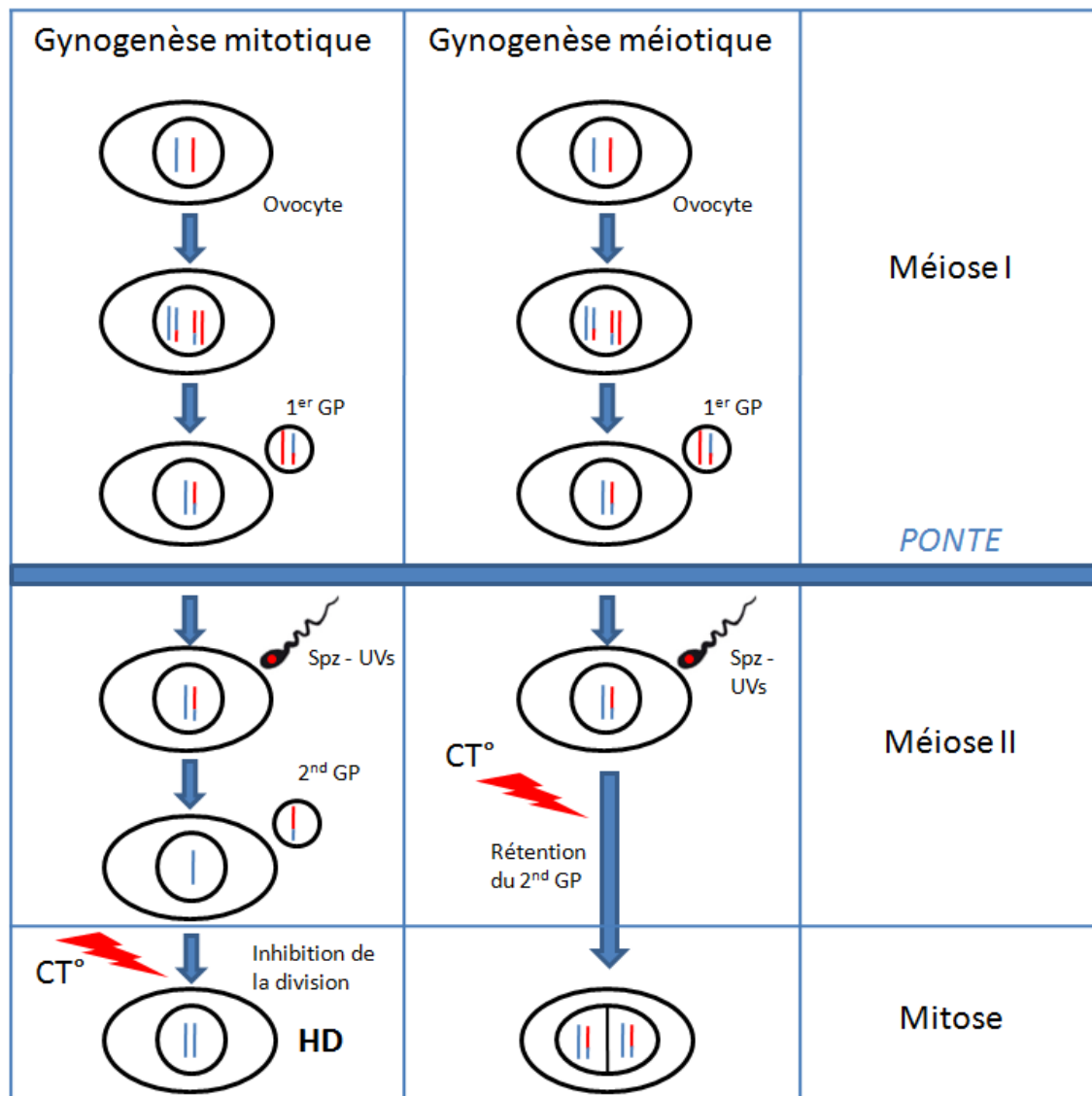


Figure 9 : Les deux types de gynogenèse. Le spermatozoïde est irradié aux UVs (Spz-UVs) afin de détruire son matériel génétique. Lors de la gynogenèse mitotique, un choc thermique (CT°) lors du premier cycle cellulaire du zygote inhibe la division cellulaire. On obtient un zygote haploïde doublé (HD) 2n viable. Lors de la gynogenèse méiotique, un choc thermique durant la deuxième division de méiose entraîne la rétention du second globule polaire, et le développement d'un individu gynogénétique.

A partir d'une population de truites arc-en-ciel, une première génération de gynogenèse mitotique permet l'obtention d'individus HDs. A la génération suivante, des lignées clonales homozygotes à tous les locus (que nous appellerons dans la suite de ce manuscrit « lignées isogéniques ») sont obtenues après reproduction par gynogenèse méiotique de chaque femelle HD. Par traitement hormonal, le sexe de certains individus de chaque lignée isogénique peut être inversé. On obtient alors des néomâles XX (femelle génétique de phénotype mâle), permettant la reproduction d'une année sur l'autre des

lignées à l'identique par croisement intra-lignée (à l'exception des réarrangements chromosomiques ou des mutations qui peuvent arriver très rarement dans les lignées germinales).

Ces lignées isogéniques sont à peu près l'équivalent génétique (obtenu en seulement deux générations) des lignées consanguines de souris, qui sont un modèle génétique très intéressant pour l'étude de nombreux caractères quantitatifs (Peltz et Usuka, 2005). Les individus sont homozygotes à tous les locus, ce qui entraîne des phénotypes plus contrastés que dans une population classique, et permet en particulier d'identifier plus facilement les individus extrêmes porteurs notamment de certains allèles récessifs rares à des locus importants. On observe aussi une redistribution de la variance génétique (qui est deux fois plus élevée que dans une population normale). Un avantage très important est la constance du matériel animal d'une année à l'autre, permettant de comparer des études non simultanées. Les lignées isogéniques permettent également de faire la différence entre variants alléliques d'un même locus et locus dupliqués, ce qui dans le contexte d'un génome dupliqué comme celui de la truite arc-en-ciel peut être très intéressant. Enfin, ces animaux sont histocompatibles, ce qui est un atout critique dans l'étude des réponses immunitaires (Quillet, Dorson, *et al.*, 2007). Elles sont néanmoins difficiles à produire et à entretenir, et de telles lignées sont de ce fait disponibles dans assez peu d'espèces et de laboratoires (un au Japon, un aux Etats-Unis et le laboratoire GenAqua de Jouy-en-Josas).

2) Les virus de la SHV et de la NHI : deux Novirhabdovirus

Parmi les virus les plus importants et les plus étudiés infectant la truite arc-en-ciel les virus de la SHV et de la NHI ont été utilisés dans le cadre de ce travail.

a) Des rhabdovirus

Les virus de la SHV et de la NHI appartiennent à la famille des Rhabdoviridés. Cette famille comprend environ 160 espèces de virus réparties en six genres (vesiculovirus,

lyssavirus, ephemerovirus, novirhabdovirus, cytorhabdovirus et nucleorhabdovirus) ayant une large diversité d'hôtes parmi les plantes et les animaux – dont les poissons téléostéens – et possédant des caractéristiques morphologiques et génétiques relativement proches (Fu, 2005). La nomenclature ICTV actuelle distingue en plus de ces six genres une catégorie *unsigned* qui regroupe un certain nombre d'espèces de rhabdovirus dont la taxonomie demeure incertaine. Les rhabdovirus sont caractérisés par un génome constitué d'un ARN simple brin antisens de petite taille (généralement environ 10kb) enveloppé dans une membrane en forme d'ogive (Purcell *et al.*, 2012). Ce génome code pour 5 protéines structurales : une nucléoprotéine (N), une phosphoprotéine (P), une protéine de matrice (M), une glycoprotéine (G) et une polymérase (L pour « large ») (voir Figure 10) (Hoffmann *et al.*, 2002).

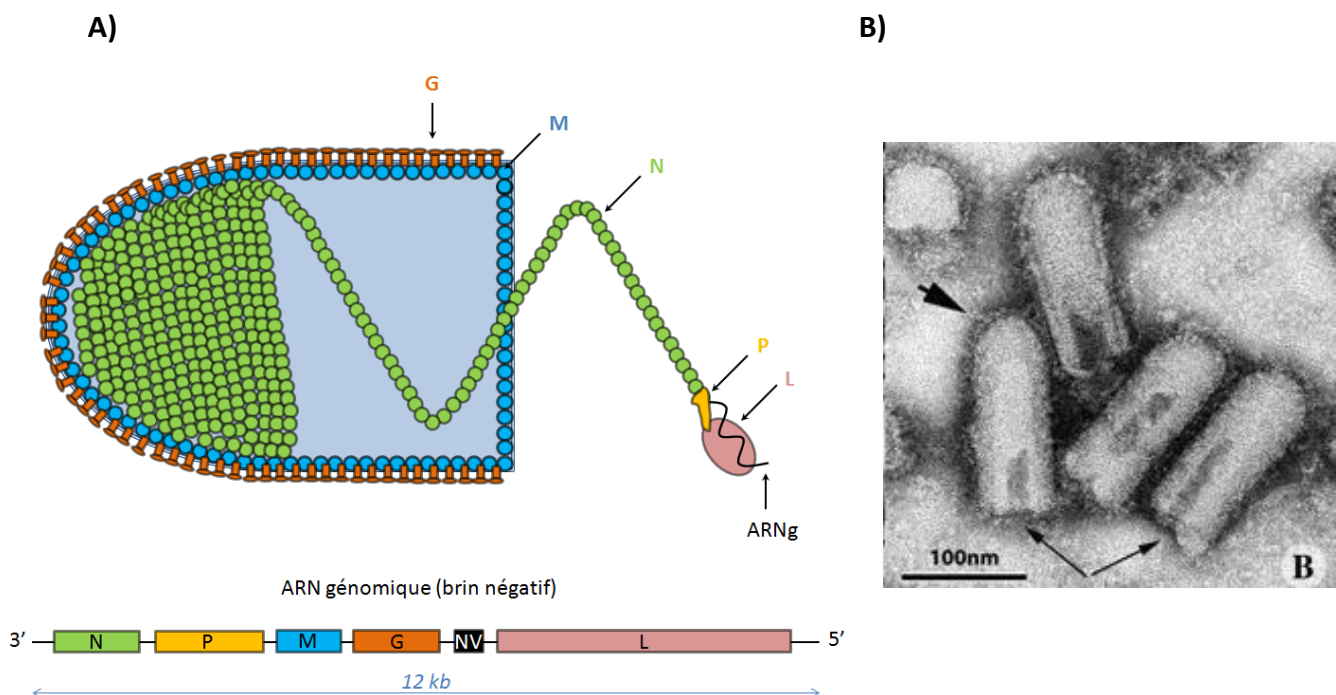


Figure 10 : (A) Organisation schématique du virus de la SHV. La ribonucléocapside est composée d'une membrane lipidique, d'une protéine de matrice (M) et d'une glycoprotéine de surface (G). Le virus possède également deux autres protéines structurales : une polymérase (L) et une phosphoprotéine (P). Une nucléoprotéine (N) protège l'ARN génomique simple brin antisens de 12 kb contenant 6 gènes, dont un codant pour une protéine NV non structural. **(B) Observation en microscopie électronique de particules virales d'un rhabdovirus (Virus de la stomatite vésiculaire ou VSV).** La flèche de gauche indique la glycoprotéine de surface G. Les deux flèches du bas indiquent une faible densité à la base de la particule (Libersou *et al.*, 2010).

Le cycle d'infection des rhabdovirus fait intervenir les 5 protéines structurales : la fixation de la glycoprotéine G avec un récepteur membranaire de la cellule cible entraîne l'entrée du virus par endocytose. Les membranes du virus et de l'endosome fusionnent (Albertini *et al.*, 2012), et la nucléocapside virale est libérée dans le cytoplasme de la cellule. Les gènes viraux sont alors transcrits à l'aide de la polymérase et les protéines sont traduites à l'aide de la machinerie de la cellule hôte. De nouveaux génomes complets viraux sont synthétisés à partir d'un ARN viral brin +. Les protéines L, N et P sont synthétisées à l'aide de ribosomes libres de la cellule situés dans le cytoplasme. Elles se lient à de nouvelles copies d'ARN antisens pour former la ribonucléoprotéine (RNP), qui s'associe à la protéine M pour former le complexe RNP-M. La glycoprotéine G est synthétisée dans le réticulum endoplasmique avant d'être glycosylée dans l'appareil de Golgi et d'être adressée au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. Le complexe RNP-M migre vers les régions membranaires enrichies en protéines G virales avant de bourgeonner pour former un nouveau rhabdovirus complètement enveloppé qui est exocyté hors de la cellule hôte (Purcell *et al.*, 2012).

Les virus de la SHV et de la NHI – qui comptent parmi les plus étudiés des rhabdovirus de poissons – appartiennent au genre des novirhabdovirus. Ce genre est caractérisé par la présence sur le génome d'un 6^e gène nommé NV, situé entre la G et la L codant pour une protéine non structurale jouant un rôle sans doute important dans la pathogénicité de ces virus chez la truite arc-en-ciel (voir ci-après) (voir Figure 10). La taille de leur génome est respectivement de 12 et 11kb (Kurath and Leong, 1985; Schütze *et al.*, 1999; Thoulouze *et al.*, 2004). Ils comptent parmi les 3 rhabdovirus à déclaration obligatoire infectant les poissons (avec le virus de la virémie printanière de la carpe) listés par l'office international des épizooties (OIE) (Crane et Hyatt, 2011).

b) VSHV

Le virus de la SHV est l'agent causal de la septicémie hémorragique virale, qui est une des plus sérieuses maladies affectant les élevages de truites arc-en-ciel en Europe (Wolf, 1988). Identifiée dès le début du 20^e siècle, elle a longtemps été considérée comme une

maladie spécifique des truites arc-en-ciel en Europe, jusqu'à ce que le virus soit détecté sur un saumon à la fin des années 80, et qu'il fut montré que l'origine de cette souche n'était certainement pas européenne et qu'il devait provenir d'une souche infectant les poissons de l'Amérique du Nord (Batts *et al.*, 1993; Oshima *et al.*, 1993). On sait aujourd'hui que cette maladie peut toucher de nombreuses espèces de poissons, marines ou d'eau douce, dont les salmonidés, les clupéidés (comme le hareng d'Atlantique *Clupea harengus*), les pleuronectidés et bien d'autres (Crane et Hyatt, 2011). Quatre génotypes majeurs (de I à IV) (et de nombreuses lignées par génotype) ont été décrits à ce jour, représentant chacun des zones géographiques distinctes (respectivement : eaux douces et mers d'Europe, mer Baltique, océan Atlantique nord, Amérique du nord/Japon/Corée) (Benmansour *et al.*, 1997; OIE, 2009).

Trois formes d'infection au virus de la SHV ont été décrites : la forme aiguë provoque chez les poissons de sérieuses lésions de type hémorragique, avec des épanchements sanguins sous l'épiderme, des saignements ponctuels dans les muscles, le tissu adipeux et la cavité ventrale, des branchies pâles, une coloration plus foncée et une exophtalmie. Elle peut conduire à d'importantes pertes dans les élevages : la mortalité varie généralement de 30 à 70% chez les adultes, et peut atteindre 100% chez les alevins (Skall *et al.*, 2005). La forme chronique entraîne moins de mortalité et des signes cliniques moins marqués. (Ghittino, 1965). Enfin, une forme nerveuse a été rapportée, avec peu de mortalité et peu de symptômes (Purcell *et al.*, 2012). La diversité des lignées virales, des hôtes et des interactions hôtes-pathogènes rendent difficiles la mise en place de programme de contrôle de cette maladie. L'absence de traitement disponible contre ce virus rend le vide sanitaire indispensable pour éradiquer localement la maladie. Les programmes de destruction de cheptels après détection de la maladie se sont révélés efficaces au Royaume-Uni, en Norvège et au Danemark (Crane et Hyatt, 2011). Aujourd'hui, la prophylaxie sanitaire couplée à une police sanitaire de contrôle est le seul moyen de prévenir efficacement les infections virales. En France, le fonctionnement d'une pisciculture est soumis à un agrément sanitaire d'élevage, et aujourd'hui, tout le territoire français est considéré indemne de SHV (Ministère de l'agriculture, 2010).

a) VNHI

Le virus de la NHI est l'agent causal de la nécrose hématopoïétique infectieuse, qui affecte la majorité des espèces de salmonidés (Crane et Hyatt, 2011). Les premières descriptions datent de 1950 en Amérique du Nord. Comme pour la SHV, on cru d'abord la maladie spécifique du genre *Oncorhynchus* jusqu'à ce que la maladie soit diagnostiquée sur un saumon atlantique au milieu des années 80 (Mulcahy et Wood, 1986). Elle cause de sévères dommages dans les fermes de salmonidés d'Amérique du Nord, d'Asie et d'Europe (OIE, 2009). On sait également que des espèces autres que les salmonidés sont susceptibles d'être infectés comme par exemple l'esturgeon blanc (*Acipenser transmontanus*) (LaPatra, Jones, *et al.*, 1995), mais ces infections restent expérimentales (et par injection). On connaît 4 géotypes du virus, en fonction de la séquence du gène G. (Kurath *et al.*, 2003)

Comme pour la SHV, les symptômes sont des hémorragies, et la coloration foncée de la peau ainsi que l'exophtalmie sont également observés. Deux types d'infection ont été décrites : hématopoïétique et neurotrophique (LaPatra, Lauda, *et al.*, 1995). Les facteurs de risque fluctuent en fonction du géotype, de l'espèce infectée et très fortement de l'âge (Crane et Hyatt, 2011). Il semblerait que les stades précoces comme l'entrée du virus et sa réplication dans la cellule déterminent une part importante de la virulence (Peñaranda *et al.*, 2009).

Si les symptômes de la NHI sont extrêmement proches de ceux de la SHV (de sorte qu'en France l'une a souvent été prise pour l'autre), on observe quand même quelques différences importantes entre les deux virus. Le VNHI semble principalement être un pathogène des salmonidés, les infections d'autres poissons restant expérimentales. L'âge/la taille des poissons semble être un paramètre très important dans l'infection au VNHI, moins dans l'infection au VSHV. Enfin, Les virus sont structurellement et génétiquement assez différents, notamment la séquence du gène NV.

De par leur importance économique, ces deux virus ont été largement étudiés. La réponse de l'hôte, et en particulier l'étude des mécanismes de résistance à ces deux maladies ont été également abordés, particulièrement chez la truite arc-en-ciel.

3) Réponse de la truite arc-en-ciel aux infections à rhabdovirus

Les interactions entre la truite arc-en-ciel et le VSHV ont été très étudiées de la réponse innée à la mise en évidence de l'immunité adaptative. C'est en particulier dans ce modèle que l'existence d'un mécanisme de type IFN chez les téléostéens a été montrée (de Kinkelin et Dorson, 1973). Même si peu de travaux existent sur les stades très précoces de l'infection, et en particulier l'entrée des virus dans la cellule, il semblerait que la fibronectine joue un rôle essentiel de récepteur au VSHV (Bearzotti *et al.*, 1999). De plus, il a été montré que la base des nageoires est le site d'entrée dans le poisson du VNHI (Harmache *et al.*, 2006). Ce chapitre fait une synthèse concise des études sur les réponses immunitaires de la truite arc-en-ciel après infection par les 2 rhabdovirus VSHV et VNHI.

a) Réponse innée

Comme chez les mammifères, la réponse innée est la première défense contre les infections à rhabdovirus chez les poissons. L'activation de la réponse IFN est un facteur clé de l'inhibition de la réplication du virus. Ainsi, l'induction du système IFN via le Poly(I:C) protège les salmonidés contre ces deux rhabdovirus (Eaton, 1990), tout comme les surnageants cellulaires contenant de l'IFN (de Kinkelin *et al.*, 1982) ou l'IFN recombinant (Ooi *et al.*, 2008; Aggad *et al.*, 2009). Avant même la description des gènes des IFNs de poissons, on savait que le système IFN et en particulier des ISGs typiques (comme *Mx*) étaient impliqués dans la réponse précoce aux infections par VSHV et VNHI chez la truite arc-en-ciel (Trobridge *et al.*, 1997; Boudinot *et al.*, 1999; O'Farrell *et al.*, 2002). On en sait un peu plus aujourd'hui sur les différents IFNs de poissons et leur rôle dans la réponse aux rhabdovirus : les gènes des 2 groupes d'IFN- ϕ sont induits par les infections à rhabdovirus, mais leurs actions semblent assez différentes. Si l'on savait que les IFN- ϕ s recombinants du groupe I inhibaient la réplication virale, une récente étude chez le poisson zèbre a montré que les IFN- ϕ s du groupe II entraînent une induction rapide mais transitoire des ISGs. Les IFN- ϕ s du groupe I, eux, induisent l'expression des ISGs et de certaines cytokines pro-inflammatoires de manière plus lente, mais plus durable pour la lutte contre l'infection (López-Muñoz *et al.*, 2009). L'IFN- γ joue également un rôle dans la réponse précoce à l'infection par les deux

virus, en induisant soit directement l'expression des ISGs, soit celle des IFN- ϕ s (Purcell *et al.*, 2012).

L'infection par ces deux rhabdovirus induit donc une réponse IFN classique, dont les effecteurs chez la truite arc-en-ciel sont des ISGs dont certains ont été décrits, tels la *vipérine*, *vig-2*, *isg15*, *Mx* ou encore un certain nombre de TRIMs, à la fonction encore inconnue (voir la revue Verrier *et al.*, 2011). Chez les poissons infectés, la réponse IFN est corrélée à la charge virale dans les tissus, mais pas spécialement à la protection des poissons contre l'infection (Purcell *et al.*, 2012). Cette observation suggère une course critique entre la vitesse de réplication du virus d'une part et la cinétique d'expression des molécules antivirales d'autre part, ce qui est confirmé par des études faisant le lien entre la vitesse de réplication de certaines souches du VNHI et leur pathogénicité (Park *et al.*, 2010; Wargo and Kurath, 2011). L'inhibition précoce de la réplication virale, due à l'immunité innée ou à des barrières intrinsèques des cellules, a été associée à la résistance à l'infection chez la truite arc-en-ciel : ainsi, une plus faible charge virale après 24h d'infection est retrouvée dans des descendants de truites relativement résistantes à la NHI, par rapport à la charge virale retrouvée sur des descendants de familles plus sensibles (Purcell *et al.*, 2010). De plus, la résistance à l'infection par bain au virus de la SHV chez la truite arc-en-ciel est corrélée à la faible réplication virale *in vitro* sur des explants de nageoires (Quillet *et al.*, 2001). Cependant, les mécanismes sous-jacents contrôlant la réplication virale dans les stades précoces sont encore inconnus.

Une forte réponse immunitaire innée aux multiples facettes est donc induite par l'infection aux rhabdovirus. Une forte pression de sélection s'exerce sur ces virus pour contourner ces défenses et détourner la machinerie cellulaire. Il a par exemple été montré que la protéine M du VNHI est capable d'induire une diminution drastique de l'expression des gènes de la cellule hôte (Chiou *et al.*, 2000).

Les fonctions de la protéine NV ont été également étudiées. A l'aide d'un virus recombinant, il a été montré que cette protéine est essentielle à la réplication virale, *in vivo* (chez la truite arc-en-ciel) et *in vitro* (Thoulouze *et al.*, 2004). La protéine NV du VSHV semble inhiber ou retarder l'apoptose cellulaire, favorisant ainsi la réplication virale, ce qui est une stratégie fréquente chez les virus (Ammayappan et Vakharia, 2011). Il semble que ce rôle anti-apoptotique soit également joué par la NV du VNHI, malgré la faible homologie de séquence entre les deux gènes (moins de 50%) (Thoulouze *et al.*, 2004; Ammayappan et

Vakharia, 2011). Il reste néanmoins à déterminer quelle voie apoptotique est ciblée par cette protéine.

La protéine NV du VNHI peut également limiter la réponse IFN de l'hôte via un domaine peptidique appelé NLS (pour *nuclear localization signal*) qui induit la migration de la protéine vers le noyau. Le NLS est retrouvé dans toutes les lignées de VNHI, mais pas dans le VSHV, ce qui suggère que la protéine NV n'a pas la même fonction chez tous les rhabdovirus (Choi *et al.*, 2011). Cependant, l'intensité de la réponse IFN dans les infections à rhabdovirus laisse supposer qu'un tel mécanisme de répression peut également exister chez le VSHV. Il serait alors intéressant de comparer les mécanismes d'actions des 2 virus pour échapper à la réponse immunitaire.

Si la réponse innée semble jouer un rôle primordial dans la réponse aux infections à rhabdovirus chez les poissons, l'étude des mécanismes de l'immunité adaptative et le rôle des anticorps dans la résistance à long terme contre ces infections ont également été établis.

b) Réponse spécifique

Comme décrit dans le chapitre 2, l'existence d'une réponse spécifique lors de l'infection par des rhabdovirus chez la truite arc-en-ciel a été montrée depuis longtemps.

Les anticorps neutralisant induits par infection des poissons ou vaccination avec la protéine G recombinante ou avec des virus atténués assurent une protection à long terme contre ces virus (Winton, 1997; Boudinot *et al.*, 1998; Lorenzen et Lapatra, 1999). Ces anticorps neutralisant sont détectables plusieurs semaines voire plusieurs mois dans les poissons. A contrario, les anticorps naturels du sérum ne jouent certainement qu'un rôle limité dans la résistance à une primo infection aiguë par le VSHV ou le VNHI (Purcell *et al.*, 2012). On connaît en fait peu de choses sur la structure de cette réponse humorale, en particulier les isotypes d'Ig capables de détecter les deux rhabdovirus.

On sait également depuis une dizaine d'années que les rhabdovirus sont capables d'induire une réponse spécifique à médiation cellulaire chez les salmonidés : une expansion clonale des cellules T fut observée dans des cellules de rate de truites arc-en-ciel infectées par le VSHV (Boudinot *et al.*, 2001). Les spectratypes de longueur du CDR3 du TCR β sont

drastiquement modifiés dans la rate après infection et révèlent une réponse publique utilisant des chaînes V β 4 J β 1 de CDR3 de tailles 8 et 3 résidus. La réponse publique a été retrouvée après vaccination génétique avec la protéine G, suggérant que la cible de cette réponse publique est localisée sur la protéine G virale (Boudinot *et al.*, 2004). L'existence d'une cytotoxicité induite par les cellules T a également été mise en évidence chez des lignées isogéniques de truite arc-en-ciel. Des lymphocytes de truites arc-en-ciel infectés par le VSHV montrent de plus une forte activité cytotoxique contre les cellules infectées présentant des molécules du CMH de classe I compatibles chargées en peptides viraux (Utke *et al.*, 2007).

De nombreuses études existent donc sur les interactions entre les deux rhabdovirus et truite arc-en-ciel. Les réponses immunitaires aux infections à rhabdovirus semblent assez similaires. Mais si les virus sont apparentés, on observe quand même certaines différences importantes. De plus, les mécanismes immunitaires mis en jeu par les poissons pour résister à ces infections sont encore largement incompris. Les couples rhabdovirus / truite arc-en-ciel sont de bons modèles pour ces questions. Des études comparées entre les deux virus à l'aide de lignées isogéniques de truites arc-en-ciel ont d'ailleurs déjà tenté d'y répondre.

c) Variabilité de la résistance aux rhabdovirus

Avant mon arrivée à l'INRA, neuf lignées isogéniques de truites arc-en-ciel ont été obtenues comme décrit précédemment à partir de la population de référence Sy² (synthétique) (Quillet, Dorson, *et al.*, 2007). Elles ont été infectées avec une même souche de VSHV (07-71 sérotype I). Les résultats montrent une grande variabilité de résistance entre les différentes lignées, avec en particulier trois lignées présentant une survie finale de 90% et des lignées présentant 100% de mortalité après quelques jours d'infection (voir Figure 11). Ceci montre donc un contrôle génétique de la résistance à l'infection au VSHV dans ce modèle. Les mêmes lignées ont également été infectées avec une souche de VNHI (32-87). Comme pour la SHV, la résistance aux virus est variable entre les lignées isogéniques. De

² Population entretenue sans sélection et sans épisode infectieux

plus, cette première analyse suggérait l'existence d'une certaine corrélation entre la résistance au VSHV et au VNHI. Cette étude avait posé les premières bases d'un contrôle génétique de la résistance aux rhabdovirus, que je me suis attaché à étudier.

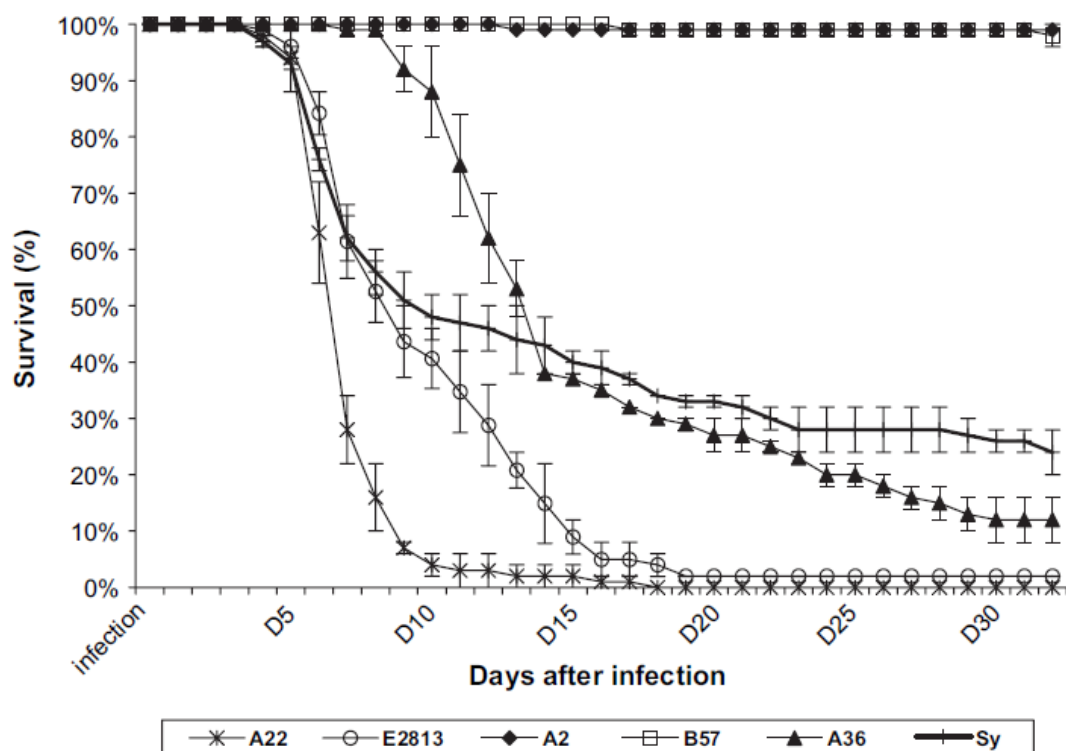


Figure 11 : Courbes de mortalité de certaines lignées isogéniques après infection au VHSV 07-71 (Quillet, Dorson, *et al.*, 2007). Sy : lignée INRA synthétique.

Les différences et les similitudes observées entre les deux virus ont confirmé l'intérêt d'une double approche visant à obtenir une description aussi complète que possible des mécanismes de résistance chez la truite arc-en-ciel à ce type de virus.

Objectifs de l'étude

Identifier les mécanismes de réponse aux virus chez les poissons téléostéens répond donc à deux objectifs, comprendre l'évolution des mécanismes de défense des vertébrés et améliorer la santé en aquaculture.

Ce projet propose une double approche de l'étude de la résistance aux viroses chez les poissons. Une première approche sans *a priori* à l'aide de familles de truites-arc-en-ciel ayant des réponses variables à l'infection par le VSHV a recherché des régions du génome potentiellement impliquées dans la résistance à cette infection *via* la détection de QTL. En parallèle, des études fonctionnelles à l'aide d'un modèle *in vitro* ont cherché à mieux disséquer les mécanismes moléculaires de la résistance.

Par ailleurs, ce projet propose d'aborder la résistance aux viroses chez les poissons d'un autre point de vue, en comparant la résistance de familles de truites arc-en-ciel à deux virus de la même famille (VSHV et VNHI). Cette comparaison est en effet susceptible de fournir des informations complémentaires sur la nature des mécanismes impliqués.

L'objectif est de comparer les trois approches pour éliminer ou sélectionner des mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance à ces infections.

Partie I : détection de QTL.

Cette partie d'étude positionnelle présente la primolocalisation d'un QTL majeur de résistance au VSHV à partir de familles d'HD obtenues par gynogenèse (chapitre 4). Nous avons ensuite cherché à caractériser ce QTL à l'aide de croisements de lignées isogéniques de truite arc-en-ciel ayant une résistance variable à l'infection par le VSHV (chapitre 5).

Partie II : analyse fonctionnelle.

Cette partie présente le développement d'un modèle *in vitro* utilisant des lignées cellulaires dérivées d'ovaires de truites pour l'étude des mécanismes de résistance au VSHV (chapitre 6). Ce modèle a permis de caractériser en partie la voie Interféron dans les différents fonds génétiques disponibles (chapitre 7).

Partie III : Comparaison de la résistance à deux rhabdovirus.

Le chapitre 8 s'intéresse enfin aux corrélations potentielles entre résistance au VSHV et au VNHI dans les lignées isogéniques.

Résultats

Chapitre 4.

Identification d'un QTL majeur de résistance au VSHV chez la truite arc- en-ciel.

Objectifs

L'objectif de cette première étude sans *a priori* était d'identifier les régions du génome impliquées dans la résistance au VSHV. Deux familles de deuxième génération ont été produites à partir de poissons sensibles et résistants dont la résistance à l'infection avait été mesurée sur un critère indirect (croissance virale sur explant de nageoire dont on sait qu'elle est corrélée à la survie du poisson, Quillet *et al.*, 2001). La génération ségrégeante a été obtenue par gynogenèse mitotique, il s'agit donc d'haploïdes doublés (HD), ce qui augmente la puissance de détection (aucun individu hétérozygote). La recherche de QTL sur le génome entier a été réalisée *via* une stratégie de génotypage sélectif : ainsi seuls les poissons « extrêmes » (survivants ou premiers à mourir) ont été génotypés dans un premier temps pour les marqueurs répartis sur l'ensemble du génome. Environ 20% de la population des familles est ainsi génotypée (10% de chaque extrême). La présence de QTL est analysée en comparant les fréquences alléliques des marqueurs dans chaque groupe. Les avantages de ce mode d'analyse sont la réduction des coûts de génotypage et la facilitation de détection des régions impliquées dans la variation du caractère en surexprimant les effets des QTL détectés (mais elle ne permet donc pas de connaître l'effet précis des allèles dans la population). Le chapitre qui suit présente les principaux résultats obtenus, qui font l'objet d'un article paru dans la revue PLoS One.

Resistance to a rhabdovirus (VHSV) in rainbow trout: identification of a major QTL related to innate mechanisms

Eloi Verrier, Michel Dorson, Stéphane Mauger, Corinne Torhy, Céline Ciobotaru, Caroline Herve, Nicolas Dechamp, Carine Genêt, Pierre Boudinot et Edwige Quillet

Introduction

Many lines of evidence in vertebrates have established that host genetics plays an important role in the relative susceptibility to infections to a range of pathogens including viruses. In human and monkey, the genetic restriction of HIV infection based on TRIM5a is one of the best examples [1–4]. In mice, a major locus also controls the resistance to leukemia viruses [5]. In farmed animals, genetic factors controlling resistance to several pathogens have been identified in pig, cow, sheep and chicken [6], and selective breeding is an appealing approach to improve the resistance to diseases in farm animals [7–11].

In fish, the existence of genetic variability associated with different levels of susceptibility to several diseases is well established. Significant heritabilities have been found for the resistance to various pathogens in marine and freshwater species [12,13] and an increasing number of QTL (Quantitative Trait Loci) are being identified for resistance to a range of pathogens, including parasites [14,15], bacteria [16,17] and viruses [18–20]. These results provide a robust basis to promote resistance to diseases as a selective objective in the current aquaculture breeding programs [13,21,22].

Viral diseases currently constitute a major threat for aquaculture industry and, in some cases, for wild fish populations and fisheries [23]. Viral Haemorrhagic Septicemia virus (VHSV) has been reported in a number of wild and domestic marine or freshwater fish species [24,25] and is considered as one of the most important fish viruses due to its great potential economic impact [26]. VHS is among the most studied fish viral diseases, especially in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) where it was originally described [27]. VHSV is a *Novirhabdovirus*, with a single strand RNA genome of negative polarity encoding five structural proteins (N, P, M, G and L) and the non structural NV protein specifically expressed in the *Novirhabdovirus* genus (reviewed in [28]).

Although considerable progress has been made in the understanding of finfish immune system, the respective importance of innate and adaptive immune mechanisms in the resistance to viruses is still poorly understood. The protective power of fish adaptive responses has been firmly established for different viruses including the *Novirhabdoviruses*

IHN and VHSV: efficient vaccines have been developed, which elicit specific B and T cell responses [29,30]. In addition, the resistance to another virus - the Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV) - has been linked to the MHC, indicating a role for T cell immunity in the susceptibility to this virus [31]. However, innate and/or intrinsic factors are likely to play a key role in the genetic resistance to natural infections with rhabdoviruses. Comparing viral variants with variable virulences, or hosts with different genetic backgrounds, a suite of studies have shown that host mortality correlates with early virus load, faster replication enabling the virus to rapidly override the host defence [32–37]. Regarding VHSV, the correlation between genetic resistance and virus load in fin explants provided a good hint of the implication of such factors [32,38]. The perfect correspondence between the resistance of clonal lines of rainbow trout and that of derived fibroblast cells in vitro definitely underlined the importance of innate/intrinsic components of immune response [37]. Additionally, the early and fast induction of IFN1 after infection was also involved in the resistance of some genotypes to the VHSV [37]. However, the general pathways and the key genes responsible for the variability of host resistance remain unknown.

Besides its potential to enhance selective breeding efficiency, QTL identification is also a first step toward the molecular dissection of complex phenotypes and toward the identification of associated causal mutations. In this study, we discovered several QTL for survival to VHSV after waterborne infection. We also established that the control of virus replication in fin explants and the fish survival to infection share common genetic bases, strongly suggesting that intrinsic/innate factors are responsible for much of the genetic variability of resistance to the virus. Our results pave the way to a better understanding of the mechanisms of viral response and the identification of the key genes involved and to new prospects for marker assisted selection of resistant fish.

Material and methods

Experimental families and QTL design

Several distinctive features of the trout model were considered to draw up the QTL mapping strategy. First, we took advantage of the fact that it is relatively easy to produce

doubled haploid (DH) gynogenetic individuals by physical treatments (pressure or temperature) of ova previously fertilized with genetically inactivated milt. DH individuals contain two identical copies of the maternal chromosomes, *i.e.* they are fully homozygous, which facilitates the capture of extreme phenotypes/genotypes. In the present study, both F0 population and F2 mapping progeny were composed of DH individuals, allowing an accurate evaluation of their status and an increased power of QTL detection [39,40]. Secondly, trout characteristics (large size family and low marginal cost of individual phenotypes for survival at infectious challenge) are propitious to a selective genotyping strategy. Selective genotyping has been shown to be highly cost effective with negligible disadvantages in term of power of detection provided a large population base can be easily phenotyped and that a sufficient number of individuals at each tail are genotyped to limit the risk of detection of false positive marker-trait associations [41,42].

Selection of F0 breeders. Fish originated from the experimental outbred rainbow trout population maintained at the INRA experimental farm (Gournay-sur-Aronde, France) which is free of known viruses. Virological controls have been regularly performed on both healthy fish from each raceway (at least once a year) and on every group affected with unexpected mortality. No control was ever found positive. Hence, we believe that the original population was not subjected to any unintended selection by viruses including VHSV and IHNV.

Doubled haploid individuals (DH) were produced through mitogynogenetic reproduction of outbred females according to [43]. Some of the fry were hormonally sex-reversed to produce functional XX males. When adults, DH females and males were fin clipped and scored for the resistance status to VHSV using an *in vitro* test based on the correlation between the virus replication in excised fin tissue (VREFT value) and the survival of individual fish after an immersion challenge [32,44]. The test is effective to select individuals transmitting resistance or susceptibility to the virus [38] without using direct inoculation that would definitely impair their use as breeders. Thirty nine DH individuals (F0 generation of the QTL design) were selected for respectively low (resistant, R) and high (susceptible, S) VREFT values and individuals with alternative resistance were pair-mated to produce F1 crosses. From offspring survival and contrast between VREFT values of the

breeders, two F1 crosses (F98 and F00) were kept as future parents of the QTL families. The homozygous status of the corresponding F0 breeders (two females and two XX males) was checked using allelic variation at six microsatellite markers.

Production of doubled haploid (DH) mapping progeny. The family pedigree and experimental design are detailed in Figure 12. Because of their gynogenetic origin, F1 crosses were all females which were reproduced through a new generation of mitogynogenesis as previously described in [43]. The resulting offspring (DH) thus combine the two grand-parental genomes and have only one allelic type at every locus. In order to generate a sufficient number of progeny, several F98 and F00 individual females were used. As F1 females were isogenic (mating of two fully homozygous F0 individuals), DH progeny from females of the same F1 cross were further pooled into a single family (DH-F98 and DH-F00 families).

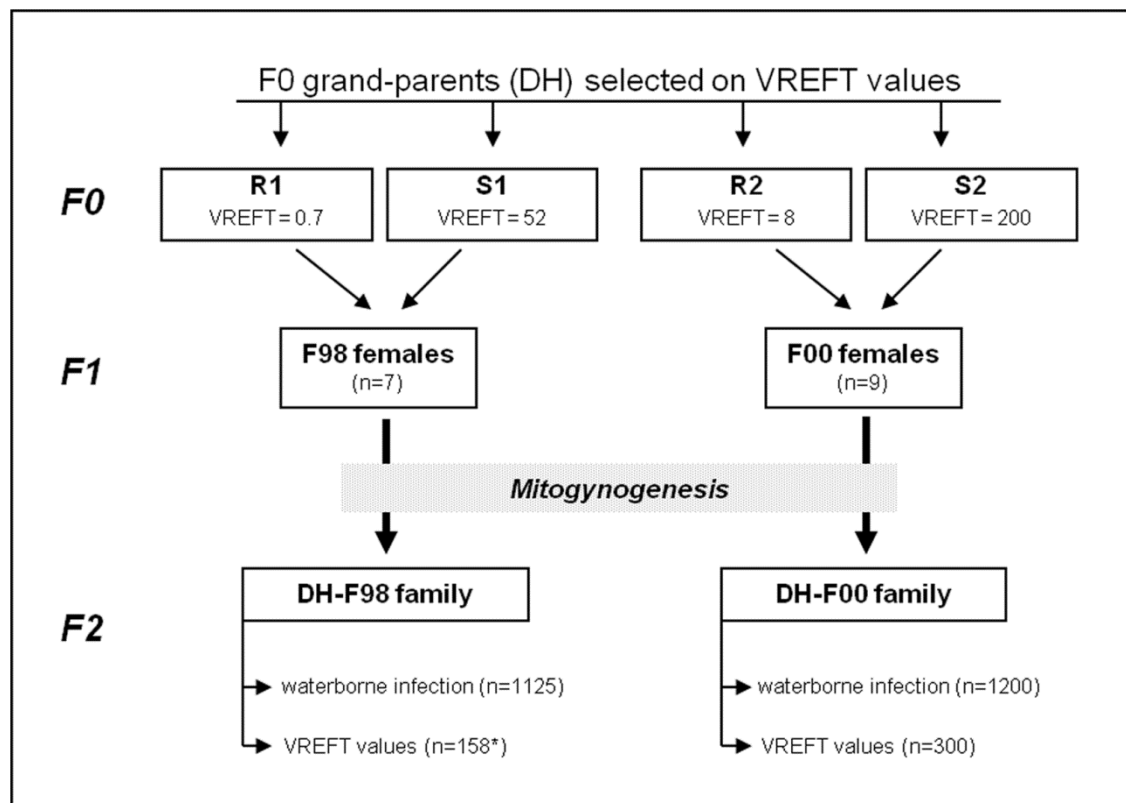


Figure 12. Production of experimental families and QTL design

DH: doubled haploid individuals (all homozygous), obtained by mitogynogenesis (fertilization of ova with UV irradiated sperm followed by inhibition of the first embryonic mitosis); VREFT values: viral replication in excised fin tissue (in pfu.mg⁻¹); in each lineage, F1 females are isogenic, and their progeny were pooled into a single family.

*: offspring used to measure VREFT values were produced one year later, from a single F98 female.

Males homozygous for a dominant body colour mutation (golden phenotype) were used as milt donors for gynogenesis. The lack of golden fry in the progeny and of surviving fry in the haploid controls (no heat shock after fertilization with irradiated sperm) served as control of the efficiency of the irradiation process. Fertilized eggs were iodine disinfected and placed in units supplied with recirculated, dechlorinated tap water at 10°C constant (IERP, INRA, Jouy-en-Josas, France) where fish were reared until the infectious challenge.

Phenotyping QTL families for resistance to VHSV

Survival at immersion challenge. Waterborne challenges were carried out on 4 to 5-months old juveniles using the VHSV strain 07-71 (serotype 1) as described in [32]. VHS virus strain 07-71 was isolated in 1971 from diseased fish sampled in a trout farm in Normandy (France) [45]. This virus belongs to the type 1 serotype originally described in Denmark. This strain has been propagated since then in epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cell line, which provides high titers. Virus titers were determined as pfu.ml⁻¹ using the plaque assay method as described in [37]. For the challenges analysed in this work, a large virus production was titrated, aliquoted and kept at -70°C until use. Regular titering provided values consistent with the initial assessment, indicating that the different experiments were performed in similar conditions (*i.e.* with the same number of pfu per ml). Virus suspensions were thawed just before infection and kept in ice until use. For each DH family, a little over one thousand fish were distributed into 10 l aquaria (125 fish into 9 aquaria and 120 fish into 10 aquaria for DH-98 and DH-00 respectively) and were infected by incubation for 2h in a 5 x 10⁴ pfu.ml⁻¹ virus suspension in static water with vigorous aeration. This protocol regularly leads to 80-90% mortality in the INRA outbred rainbow trout population. Water supply was set up again after exposure to the virus. Mortality was monitored during 34 days for F98 and 58 days for F00.

Dead fish were removed twice a day. At the end of the period of survey, surviving fish were sacrificed (lethal anaesthesia with 2-phenoxyethanol). All individuals were immersed in absolute ethanol for further DNA extraction. Although not all dead fish could be used for virus re-isolation, we could re-isolate the virus regularly from moribund infected animals

during the project. In addition, we did not observe any mortality associated to the typical clinical signs of the VHS in controls.

Measurement of VREFT values. Remaining uninfected DH-F00 progeny were kept in the controlled rearing unit for further growth (Figure 12). When they weighted about 35g, 300 fish were anaesthetized and rayed fin (anal and/or pelvic) was clipped and processed as described in [46] to perform a measure of viral replication in excised fin tissue (VREFT). Briefly, fin explants (mean weight: 74mg) were infected by immersion for 1h in 2ml of Stoker's medium containing 2×10^5 VHSV pfu.ml⁻¹, then rinsed and incubated for 3 days at 14°C. The virus titration (pfu.mg⁻¹ of fin explant) was then measured using the number of plaques recorded on EPC monolayers after inoculation with a serial 10-fold dilutions of ground explants. Because of a problem in the facilities, DH-F98 fry were no more available for VREFT measure. Subsequently, one F98 female was used the next spawning season to produce a genetically identical DH offspring. Fertilization and rearing procedures were as previously described. Fin explants (mean weight: 34mg) were sampled on 158 individuals (11g body weight) and processed as for DH-F00. A piece of fin of every sampled fish was kept in absolute ethanol for further genotyping.

Microsatellite genotyping

As indicated above, a bidirectional selective genotyping approach was applied to search for QTL associated to survival after waterborne infection. Within each family, highly susceptible and highly resistant individuals ('tails') were selected. The susceptible tail was composed of the 10% most susceptible fish (first to die) from every aquarium. In DH-F98, the resistant tail was composed of survivors (n=95, 8% of the challenged fish). In DH-F00, a random sample of survivors was taken in order to limit the size of the resistant tail to 10% of the population (120 individuals). Thus, the fraction of genotyped individuals relative to the whole population was around 20%, ensuring a reasonable power of QTL detection considering the whole size of the population and the marker density [42,47,48]. F0 grand-parents and F1 females were also genotyped. The genome scan was performed with 131 and 142 polymorphic microsatellite markers including 25 and 18 duplicated markers for DH-F98

and DH-F00 respectively (Supporting information Table S1 and Table S2, Annexe 1 p230) evenly distributed along the INRA reference map [49,50]. Average overall spacing between markers was 22.1 cM (DH-F98) and 20.4 cM (DH-F00) (2 to 10 markers per linkage group). Search for VREFT-associated QTL was focused on the regions where a significant QTL for survival was detected. Subsequently, VREFT-phenotyped progeny were genotyped for a set of microsatellites (4 to 8) in each linkage group of interest (Supporting information File S1, Annexe 1, p238).

DNA extraction and genotyping methods for microsatellite markers were described in [49,50]. Linkage groups were named according to [50]. A linkage map was rebuilt for the families of the design using all genotyped individuals and CarthaGène software [51,52].

Association studies and QTL detection

In the selective genotyping approach (survival-associated QTL), marker-trait association was inferred by testing difference in marker allele frequencies among the two population tails. The Pearson χ^2 test (1df) was performed at every marker used for the genome scan to search for association between the issue of infectious challenge (dead/surviving) and the genotype (R vs S grand-parental allele). Bonferroni correction was considered for multiple tests at the chromosome-wide level.

Detection for VREFT-associated QTL was performed using QTLMap software [53]. An interval mapping method described by Elsen *et al.* [54] was applied, scanning for QTL every 1 cM in the genome. To take into account the uniparental origin of the DH families, they were considered as full-sib families where each fish was assigned a virtual unknown parent different for every individual. For each F1 dam, QTL effects were estimated as the allelic substitution effects. The hypotheses of the presence of one QTL (H1) vs no QTL (H0) at one location were compared using an approximate likelihood ratio test (LRT) [55]. For each linkage group, the empirical distribution of LRT was obtained from 10000 simulations under the null hypothesis, with a trait heritability fixed to 0.5. Thresholds of H0 rejection at the chromosome-wide level were then estimated with the method described by HARREL and

DAVIS [56]. The 95% confidence QTL support intervals were obtained using the "one LOD drop-off method" [41]. Log-transformed VREFT values were used to meet the assumption of normality.

One limitation of selective genotyping is the difficulty to estimate unbiased QTL genetic effects [42]. In order to estimate the effect of relevant survival-associated QTL more precisely, a comprehensive analysis was carried out including all fish in a subset of three aquaria per DH family. A whole post challenge life-time dataset was built. Individual data were the surviving status (dead or alive at the end of the challenge) and the time to death (TTD, in days after infection) of each fish that died. Surviving fish corresponded to 'censored' observations, *i.e.* that the expected event (death) was not recorded during the observation period. Fish not genotyped yet (dead after the first 10% and, for DH-F00, survivors not previously sampled) were genotyped for the markers of the target region. Data were pre-corrected for fixed effect (aquarium). QTL detection was performed with QTLMap software using an interval mapping method for survival phenotypes (non-normal distribution and presence of censored data) based on Cox model and described by [57]. Pedigree design was encoded as previously described and methods to test the presence of QTL and to determine thresholds were the same.

The QTL effects (% of phenotypic variance explained) were estimated by testing the within family effect of the alternative alleles at the marker closest to the QTL location (ANOVA with SAS software). QTL effect on survival was estimated using TTD, assuming a Gaussian distribution and fixing the maximum TTD at day 28 in DH-F98 (day of the last mortality recorded in the family). The same limit was chosen in DH-00 to facilitate comparison and to avoid a too high dispersion of TTD values.

Ethics statements. Animals were handled in accordance with the national and European guidelines and regulations on laboratory animals care in force at the time of the experiments. Animal work was approved by the French Veterinary Services (personal authorizations numbers 78-67 and 32-57 for Edwige QUILLET and Michel DORSON respectively). During the infectious challenge, water quality was regularly monitored. Fish

were fed and controlled twice a day. Dead fish were systematically removed as well as fish obviously suffering (abnormal swimming behaviour) that were euthanized using lethal anaesthesia.

Results

Production of DH families from F0 grandparents selected for opposite resistance or susceptibility to VHSV

In order to increase the probability of detecting QTL, F1 parents of the mapping progeny were generated by crossing F0 individuals with opposite expected resistance to the virus. To this purpose, VREFT values were assessed from a number of DH progeny from females randomly sampled in the original outbred population, and used as a criterion for choice of four F0 breeders. VREFT values in the initial F0 population (143 DH individuals) ranged from 0 to 5454 pfu.mg¹, a range slightly narrower than previously observed in standard individuals from the same population [32]. VREFT values of the 39 DH individuals retained to produce the parental F1 crosses spanned the observed variability (0 to 4762 pfu.mg¹). Two critical issues affected the production of F2 families: many F1 crosses failed because of the poor reproductive performance of DH (fully inbred) individuals [58] and the deleterious impact of treatments used to induce mitogynogenesis with ova of F1 females often yielding low survival in F2 offspring. Finally, two F2 families with a sufficient number of DH fry could be kept (DH-F98 and DH-F00). The four F0 individuals were progeny of four different females from the original population.

The contrast between the VREFT values of the corresponding F0 grandparents was lower than expected (0.7 vs 52 pfu.mg¹ for DH-F98 and 8 vs 200 pfu.mg¹ for DH-F00). Yet, our previous results had shown that VREFT values below 10 pfu.mg¹ are associated with high survival, while susceptibility increases dramatically for values above that threshold [32]. Therefore, we classified the two F0 individuals with low VREFT values (0.7 and 8 pfu.mg¹) as resistant and the two F0 ones with higher VREFT values (52 and 200 pfu.mg¹) as susceptible (Figure 12).

Genetic status and average performances of DH offspring

Average survival of DH progeny was much higher than usually recorded in experiments where mitogynogenesis is induced from outbred females (Table 4). The use of fully homozygous DH grandparents likely contributed to this good yield, by reducing the number of segregating lethal and deleterious alleles. In DH-98 family, a small proportion of wild type surviving fry was recorded in the haploid controls (Table 4). Such fry are usually considered as the result of spontaneously unreduced ova. Indeed, they were all normally pigmented (no golden phenotype), indicating that the sperm irradiation process had been successful. In this family, genotyping of juveniles few months later revealed an unexpectedly high proportion of non-fully homozygous individuals (overall proportion of 10.5%). As in the haploid control, those individuals were normally pigmented. Moreover, they carried only the expected maternal F1 alleles, which supported the hypothesis that F98 females produced a small proportion of spontaneously unreduced ova. The higher proportion of resulting individuals in several months old juveniles than in larvae is likely due to a higher mortality at early life stages in the 'true' homozygous DH than in those partially heterozygous individuals.

Table 4. Main characteristics of DH families until infectious challenge

Family	%H ^a	% DH embryos ^b	% DH juveniles ^c	Body weight
DH-F98	1.5	41.0	37.8	1.3 g
DH-F00	~ 0	32.4	36.4	1.6 g

^a : survival in the haploid control group (H) at the end of yolk resorption (% ova fertilized with irradiated sperm without diploidization treatment). In DH-F98, 49 wild pigmented type surviving fry out of 3230 fertilized ova. In DH-F00, no wild type surviving fry and one single surviving fry with golden phenotype out of 1900 fertilized ova.

^b : normal eyed embryos in DH progeny (% fertilized ova)

^c : 4-5 month-old DH juveniles (% eyed embryos)

In contrast, no wild type individual survived in the DH-F00 haploid group. Further genotyping of juveniles detected only one non homozygous individual, confirming that frequency of unreduced ova was very low in F00 females. One single fry with golden phenotype (indicating fecundation with intact sperm) was recorded in the haploid control. The origin of this unique golden fry remains intriguing, as other fish in this family were all

normally pigmented and carried only the expected maternal alleles, confirming the overall efficiency of the irradiation process. All non homozygous individuals were discarded from further analyses (survival and VREFT measurement).

To identify survival-associated QTL, an immersion challenge was carried out when fish weighted around 1-2g. The cumulative survival curves were quite typical of development of VHSV infection after waterborne challenge (Figure 13). Final survival was 8% and 23% in DH-F98 and DH-F00 respectively. To identify QTL for viral production on fin explants, VREFT values were determined for 133 DH-F98 individuals and 300 DH-F00 individuals. Mean values were 256 and 792 pfu.mg¹ respectively. The corresponding ranges were [2.2 – 5,529] and [0.9 - 36,293] pfu.mg¹.

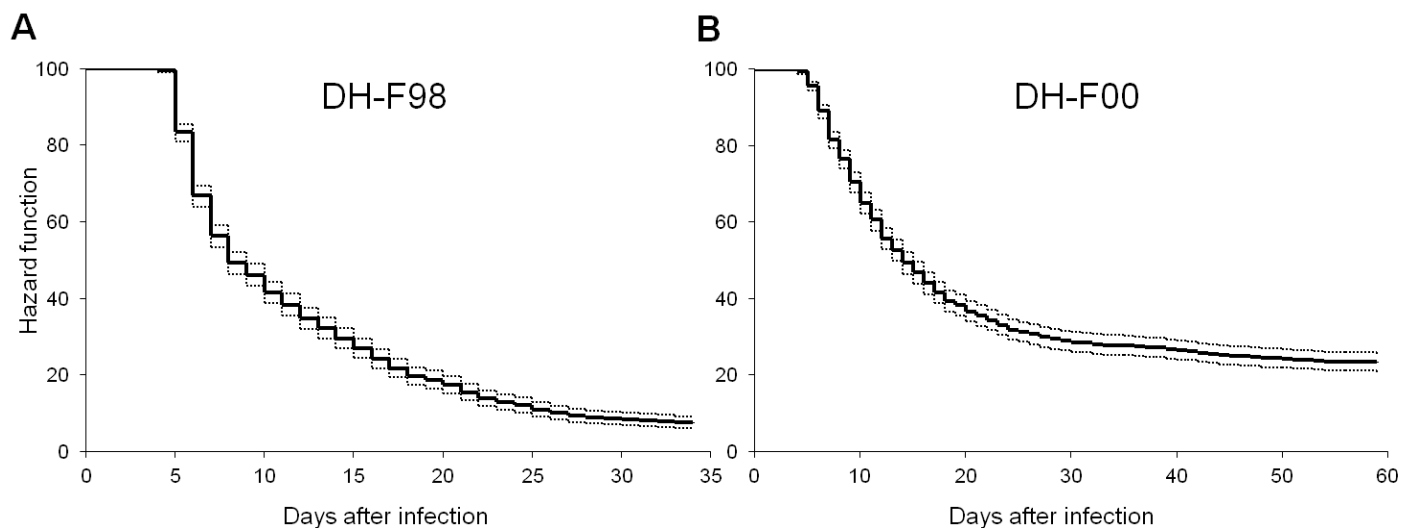


Figure 13. Cumulative survival curves after waterborne infection of the two DH families used for selective genotyping.

Kaplan-Meier estimation of survival functions after infectious challenge for the two DH families. Fish were infected by incubation for 2h with the VHSV strain 07-71. All fish, including heterozygous fish detected after genotyping of the phenotypic tails, were conserved to draw the curve. (A) Hazard function of DH-F98 progeny (1125 fish challenged, 9 aquaria). (B) Hazard function of DH-F00 progeny (1200 fish challenged, 10 aquaria).

Several survival-associated QTL identified by genotyping individuals with extreme phenotypes

Results of association tests between markers and fish survival are shown in Figure 14, Table S1 and Table S2 (Annexe 1, p230). Seven significant survival-associated QTL were detected ($P < 0.01$ at the chromosome-wide level) on six different linkage groups. Three and four QTL were identified in DH-F98 and in DH-F00 family respectively. One QTL only was mapped in both crosses, in the telomeric region of linkage group RT31. This common QTL was highly significant: almost all surviving fish carried the allele of the R grandparent at the closest locus. Effects of other QTL were consistent with the known lineage in the DH-F00 family (higher survival associated with the R grandparent allele) while in the DH-F98 family, the resistant offspring carried preferentially the S grandparent alleles at the two other QTL loci segregating in the family. In fact, most of the resistance to VHSV infection was explained by the same genomic region in both families. Few additional regions were also involved, but with effects more disparate and of lesser magnitude.

In order to refine the estimation of the major QTL effect (RT31), an analysis including life-time data throughout the course of the infectious challenge was performed in a subset of three aquaria of 120-125 fish per family. Individuals were genotyped for the same 10 microsatellites of the RT31 linkage group. Results were very consistent with the results of the selective approach (Figure 15), the QTL being again highly significant in both families ($P < 0.01$ at the genome-wide level), and located at the same position, at the end of the linkage group, close to OMM5005. Because of this distal position, no clear support interval could be established for the QTL. However, according to LRT values, interval corresponding to 1cM around QTL position could be established in DH-F98 family. Only the first quote could be assessed in DH-F00 (1cM before the maximum) because no decrease of LRT values was observed after QTL position.

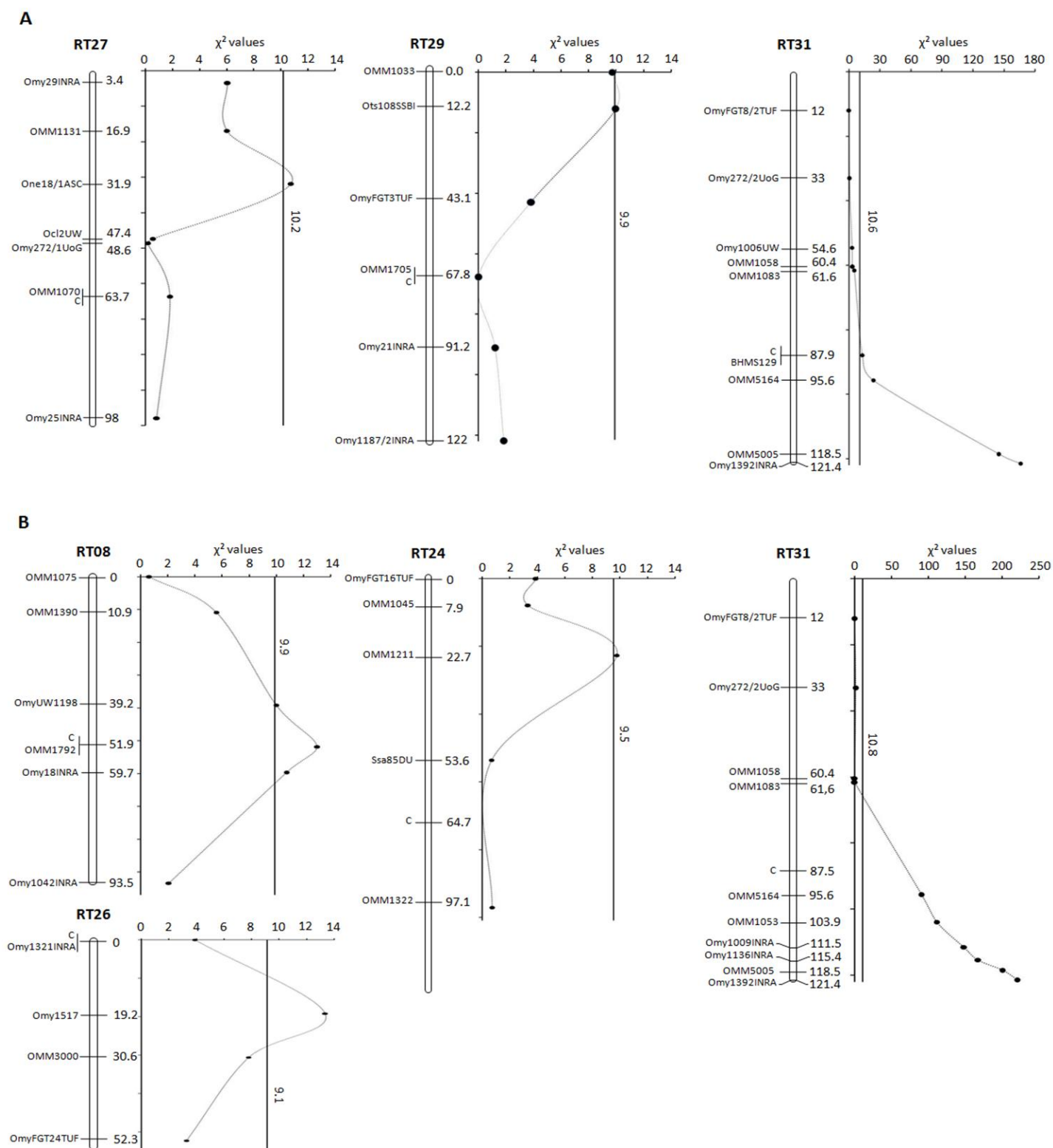


Figure 14. Survival-associated QTL detected in DH-F98 and DH-F00 families after VHSV waterborne infection using a bidirectional selective genotyping strategy. The figure shows significant QTL identified in DH-F98 (A) and DH-F00 families (B). In each family, about 20% of the entire population (1125 and 1200 fish respectively) were genotyped, *i.e.* about 10% extremely susceptible individuals (first to die) and 8% (DH-F98) to 10% (DH-F00) resistant fish (survivors) according to the survival at the end of the challenge. Only linkage groups with significant QTL are shown. Linkage groups are labelled according to (Guyomard *et al.* 2012). C indicates the position of centromere. Marker positions are given on the linkage groups rebuilt for each family from all genotyped individuals. At every marker position, a P-value <0.01 at the chromosome-wide level (χ^2 -test with Bonferroni correction) was taken as the significance threshold. For each linkage group, black line constitutes the significance threshold χ^2 value at the chromosome-wide level. The QTL on RT31 was also significant at the genome-wide level.

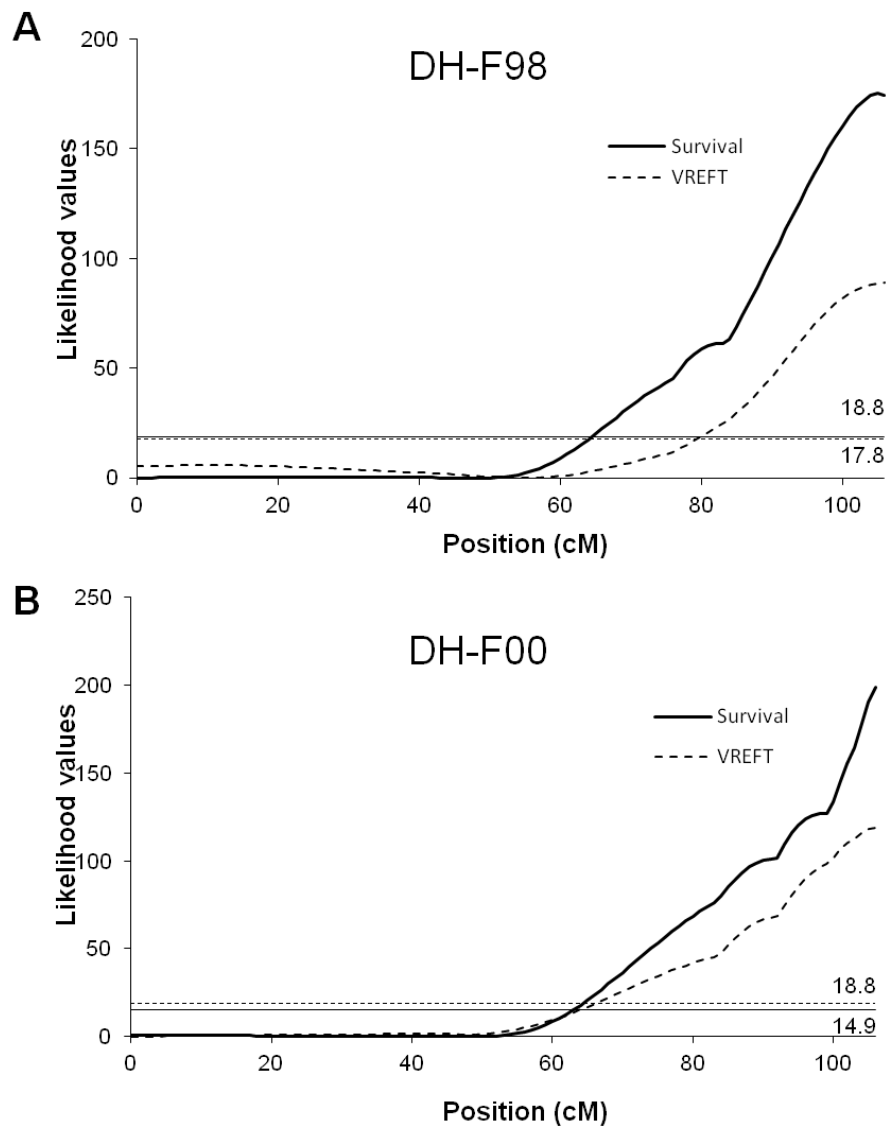


Figure 15. Likelihood ratio profiles for survival and VREFT values associated QTL on linkage group RT31 in DH-F98 and DH-F00 families. Analyses for the survival-associated QTL were performed with the complete post challenge life-time dataset (3 aquaria per family, *i.e.* 354 fish in DH-F98 family and 360 fish in DH-F00 family). For VREFT-associated QTL, 133 and 300 fish respectively were analysed in the two families. A total of 8 and 10 markers located on RT31 were genotyped in DH-F98 and DH-F00 respectively. Marker names and positions are available on supplementary Table 1S. Likelihood values were obtained using the QTLMap software. Likelihood thresholds for significant QTL ($P < 0.01$ at the genome-wide level) are determined from LRT distribution of 10000 simulations under the null hypothesis (no QTL). Survival-associated QTL locate at 105 and 106 cM in DH-F98 and DH-F00 respectively. VREFT-associated QTL locate at 106 cM in both families (confidence intervals estimated at about 1 cM in length).

The effect of the QTL (RT31) on survival was estimated from the Cox regression model used in QTLMap by the relative risks according to the QTL allelic status. Risks provide time-

independent relative estimators of the susceptibility of different groups to the virus. Taking the risk of fish homozygous for the R allele at the QTL as reference (risk fixed at 1), the risk associated to homozygous status for the alternative S allele was 7.0 and 7.3 in DH-F98 and DH-F00 families, respectively, which was significantly higher than the reference risk (χ^2 -tests (1 df) significant at $P < 0.01$). The cumulative hazard functions (Kaplan-Meier estimators) according to the allelic status at marker OMM5005 clearly illustrate this strong difference (Figure 16A). Using TTD (time to death) as the resistance trait, the QTL explained 44% to 65% of the phenotypic variance (Table 5).

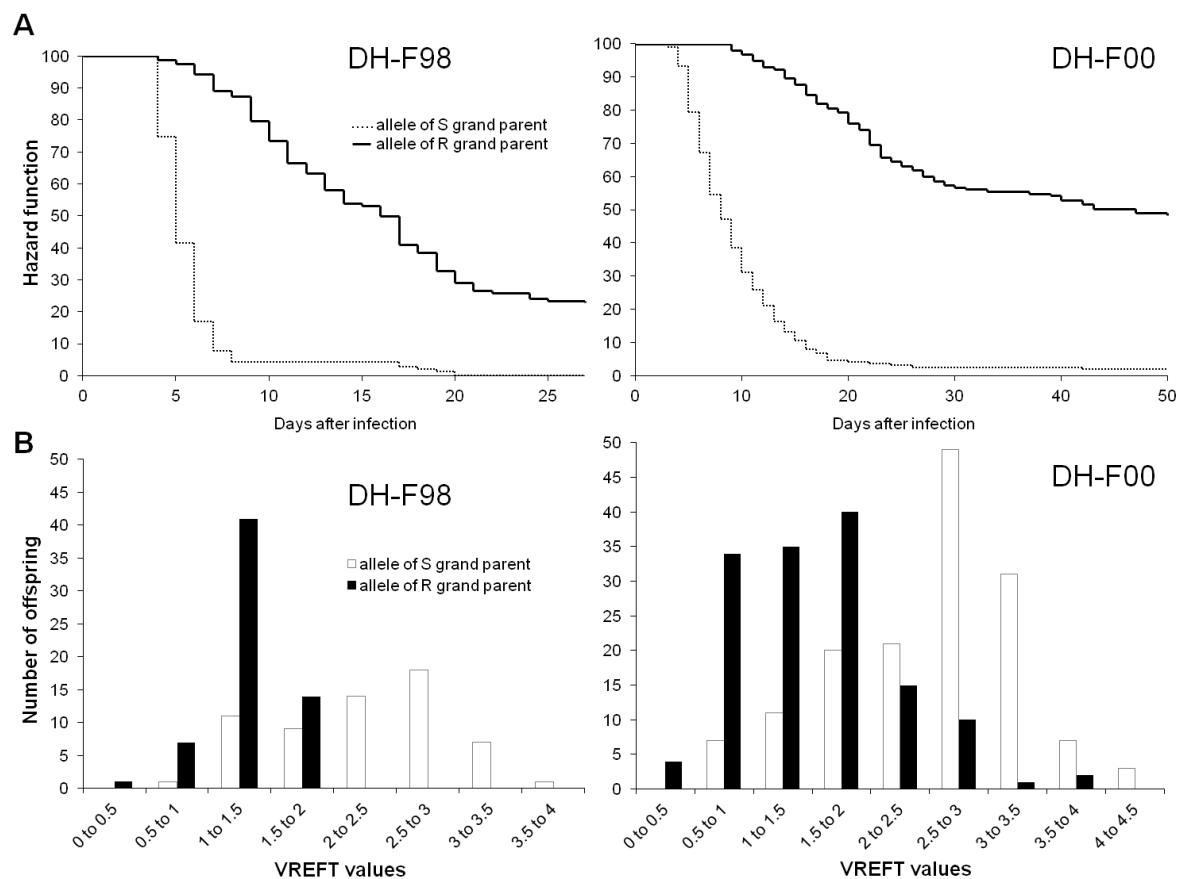


Figure 16. Effect of allelic state at OMM5005 marker (RT31) on cumulative survival curves during infectious challenge and distribution of VREFT values in the two DH families. (A) Cumulative hazard functions (Kaplan-Meier estimator) for the alternative R/S alleles. (B) Frequency distribution of VREFT values in the two families for the alternative R/S alleles. VREFT values (pfu.mg^{-1}) are log-transformed.

Table 5. Mean performances according to the alternative alleles at OMM5005 marker and percentage of the phenotypic variance explained for time to death (TTD) and viral replication in fin explants (VREFT)

Trait	Family	Values		R^2
		R allele offspring	S allele offspring	
TTD	DH-F98	16.6 ± 7.6	6.1 ± 3.6	0.44
	DH-F00	24.2 ± 5.7	9.5 ± 5.1	0.65
VREFT	DH-F98	1.3 ± 0.3	2.3 ± 0.7	0.49
	DH-F00	1.6 ± 0.7	2.6 ± 0.8	0.33

The major survival-associated QTL controlled viral replication in excised fin tissues

Our previous studies with the VREFT test and fibroblast cells from clonal trout lines have raised the hypothesis that innate/intrinsic defence mechanisms may largely determine the outcome of infection. To further investigate the genetic link between fish survival and viral proliferation on fin explants, we tested whether the genomic regions that control survival after infection were also involved in the variability of the VREFT phenotype. Linkage associations for VREFT values were performed on the target linkage groups (RT27, RT29, RT31 in DH-98 and RT08, RT24, RT26 and RT31 in DH-00). They revealed only one significant QTL ($P < 0.01$ at the genome-wide level) in both families, on RT31 at the same position than the survival-associated major QTL (Figures 15 and 16B). This QTL explained 33 to 49% of the VREFT phenotypic variance (Table 5). No other QTL could be identified on any of the six other linkage groups, even when a correction for a fixed effect corresponding to the allelic effect of the major QTL on RT31 was applied prior analysis.

The major survival-associated QTL was detected in two additional families.

Results of the two DH families suggested that a common major QTL plays a pivotal role in the resistance/susceptibility to VHSV in different genetic backgrounds. To provide additional support to this result, we searched for the survival-associated QTL in two additional DH families. The two families (DH-F01 ad DH-F21) had been produced according

to the same procedure as DH-F98 and DH-F00 (F2 progeny from breeders selected for VREFT values) but were not used in the first phase of the QTL detection because of a shortage of surviving juveniles. In addition to the selection on VREFT values, the additional F0 breeders were chosen to have no relatedness with the ones previously tested, with the exception of one for which the pedigree was unknown. The same selective strategy (early dead vs survivors) was performed and the two tail-groups were genotyped at the closest survival-associated QTL marker (OMM5005). Alternative alleles were almost fixed in the two extreme phenotypes accordingly to the expected grand-parental origin (Table 6), which confirmed the key role of this major QTL in the variability of resistance to the virus.

Table 6. Characteristics of additional DH families and marker-trait associations at OMM5005 in extreme phenotypes (early dead/surviving).

Family	VREFT of F0 grandparents ^a		Number challenged	Survival at challenge	Dead		Surviving		χ^2 value ^c
	Susceptible	Resistant			S ^b	R ^b	S	R	
DH-F01	2605	0.75	375	35.5%	82	3	2	68	131.8
DH-F21	667	0.25	390	24.4%	85	0	1	78	156.1

^a : (pfu.mg⁻¹)

^b : R: allele from the resistant grandparent ; S: allele from the susceptible grandparent

^c : the threshold value for χ^2 -test (1df) at P < 0.01 at the chromosome level is 10.8

Each family was challenged in 3 aquaria. In every aquarium, the first 30 fish to die and up to 30 survivors were sampled, *i.e.* a sample of 90 dead vs 72 and 80 survivors in DH-F01 and DH-F21 respectively. Thirteen fish had missing genotype.

Discussion

In this work, we have identified a major QTL that consistently explains a large part of resistance to a rhabdovirus waterborne infection in rainbow trout, a fish species important for aquaculture. The same QTL controls both the survival of juvenile fish after VHSV infection and the virus replication on fin explants. Thus, these two traits are governed by the same genomic region, which strengthens the idea of a key role for intrinsic/innate defence in the

resistance to the virus [32,35,37]. The critical role of a major QTL in the resistance to VHS does not exclude a contribution of other defence mechanisms. In particular, adaptive immunity might be especially important at later stages of the life of the fish.

Additionally, the effect of QTL was assessed in an experimental population having a unique genetic structure (fully homozygous doubled haploid) and should be confirmed in standard outbred trout populations.

In total, seven QTL for survival were mapped on six different linkage groups, but only one major QTL was observed in the different genetic backgrounds. Other QTLs were cross-specific, i.e. mapped in a single family. Altogether, it seems that they play smaller roles in survival, even in the genetic backgrounds where they were detected. However, the selective strategy was not suitable to precisely assess their contribution to resistance since they may have been partly masked by the effect of the major QTL. Moreover, because of the medium density of the genome coverage for QTL detection, additional QTL with smaller effect may have been missed. These minor QTL may help to identify the sequence of genes involved in the resistance at the whole organism level, and could be critical in specific contexts. Interestingly, the closest marker to the RT29 secondary QTL in DH-98 family (Ots108SSBI) was mapped very close to one Mx gene according to [50]. Mx genes belong to the interferon stimulated genes (ISGs) involved in innate immune response to viruses (for a review, [59]). Notably, polymorphism of Mx sequences has been associated with variation of resistance to another rhabdovirus - the IHNV - in rainbow trout [60]. As previously mentioned, the allele effect at Ots108SSBI was contrary to the one expected from lineage, i.e. the S grandparent transmitted the resistance allele. The favorable effect of the S allele on resistance (departure from a 1:1 allelic ratio significant at $P=0.002$) was recorded in survivors also having the favorable allele at the major QTL, but not in dead individuals, suggesting that a second defensive line involving Mx might follow the effect of the major QTL and confer a higher level of resistance.

It is noteworthy that none of the secondary survival-associated QTLs was retrieved as VREFT-associated QTL, and that only one VREFT-associated QTL was detected. This may be due to a lower power of detection compared to survival QTL, e.g. due to insufficient number of samples (as in DH-98, where only 133 offspring were available) or to imprecise

phenotyping. Indeed, using VREFT values may misclassify some individuals ('false' resistant fish, [12,32]). More generally, viral resistance phenotypes are difficult to assess as many non genetic factors modulate the virus entry or subsequent viral replication [61]. This is well illustrated by the fish-to-fish dispersion of the time to death among individuals belonging to the same clonal trout line despite their genetic homogeneity [44]. In the same line, one cannot exclude that a complete genome scan for VREFT phenotypes would have detected some QTL exclusively controlling viral replication without correlated effect on fish survival. Viral replication in fin explants and survival might rely on distinct mechanisms: indeed, the major QTL could contain several different genes playing different roles in the resistance and viral replication in fin explants, respectively. However, the detection of a major QTL common to both traits may also reflect the existence of a mechanism governing virus replication, which in turn determines further survival of fish. This would be well consistent with studies underlying the importance of early replication kinetics in the outcome of the viral infection. Hence, the major QTL on RT31 is a very attractive candidate for further fine mapping and identification of the causative gene(s). Several lines of evidence suggest that the intrinsic/innate mechanisms behind resistance are likely to act in the very first steps of the rhabdovirus infection [32, 35, 37]. Thus, relevant candidate genes should likely involve antiviral factors, including moderators of virus entry, replication or production.

The detection of a unique QTL for viral replication could suggest a single-step underlying mechanism, like a receptor-type mechanism. Little is known about potential VHSV receptors. It has been shown that fibronectin could mediate the cell entry of the virus [62]. However, there is still no information about the possible location of any trout fibronectin gene within the QTL region.

Post-entry mechanisms, for example variations of the kinetics of gene expression involved in innate immune response to infection could also be involved. Indeed, a number of such genes are overexpressed after VHSV infection, like *ifn ϕ* , *viperin/vig-1*, *isg15* or genes involved in NF- κ B signal transduction [63–65]. Our previous work using clonal lines of rainbow trout and derived fibroblastic cell lines [37] indicated that, at least for one line, resistance is associated to a very early induction of functional IFN- ϕ 1 (within the first hours

after infection). In this case, genes acting upstream the IFN production – such as virus sensors or signalling molecules upstream IFN - would be the pivotal factors of the resistance.

In this context, TLRs (Toll-Like Receptors) constitute relevant candidates. TLRs are transmembrane proteins acting as Pattern Recognition Receptors (PRRs), recognizing pathogen structures and inducing innate immune responses (for a review, [66]). TLR7 and TLR8 recognize single-stranded viral RNA and are located in the trout genome close to the OMM5005 marker on RT31 [67], promoting their interest as possible candidate genes in the major QTL we detected.

Interestingly, the OMM5005 marker itself is located close to a gene encoding the protein SPRYD7 since it was derived from the EST 1RT90I19. SPRYD7 seems to be conserved in vertebrates, but its function remains unknown. However, the SPRY domain is found in many TRIM proteins involved in antiviral defence [68,69]. Moreover, the gene trim13 that is involved in autophagy regulation and cellular stress in mammals [70] is closely linked to spryd7 in different fish and other vertebrate genomes.

Further investigations are needed to identify causative genes. The rapid development of genomic resources in rainbow trout, including SNP makers for high throughput genotyping [71,72] and the next release of the genome sequence [73,74] will be most helpful. In salmonids, the recombination patterns during meiosis are characterized by large sex differences, leading to sex-specific linkage maps longer in females. Regional differences are also observed, with usually higher recombination rates in centromeric regions in female maps and in telomeric regions in male maps [75,76]. During this study, we failed in extending the map around the QTL, because there was almost no recombination at the end of the chromosome arm in the female device we used. Although our results indicate a relatively tight QTL support interval (a few cM), we suspect from male maps [72] that the actual interval is much larger, which may complicate the identification of relevant positional candidate genes. Using a male device might be an alternative for future investigations aiming at bounding the QTL and refining its position.

Another example of a major QTL governing resistance to a virus in fish has been recorded in salmonids, i.e. the QTL for resistance to IPNV (Infectious Pancreatic Necrosis Virus), in Atlantic salmon (*Salmo salar*). This QTL also explains a very large proportion of the

genetic variance of resistance in Scottish and Norwegian farmed populations [19,20]. Fine mapping of such QTLs and identification of underlying causative genes represent major challenges for the next few years. These findings will provide an in depth understanding of the basis of resistance variations in teleost fish and beyond, and will help the development of efficient strategies of health control in farmed fish.

Fish selective breeding is a very dynamic industry. However, disease resistances are traits usually difficult to select for in commercial breeding programs. For such traits, marker assisted selection may be particularly advantageous over conventional breeding methods. In this respect, the identification of a major QTL for resistance to VHSV, a major threat for rainbow trout industry, opens attractive prospects.

References

1. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, et al. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE . Science (New York, NY) 273: 1856–1862.
2. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, et al. (1996) Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature 382: 722–725.
3. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, et al. (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell 86: 367–377.
4. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, et al. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. Nature 427: 848–853.
5. Pincus T, Hartley JW, Rowe WP (1971) A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. I. Tissue culture studies of naturally occurring viruses. J Exp Med 133: 1219–1233.
6. Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB (2010) Breeding for disease resistance in farm animals. Ed. 3. CABI; Wallingford; UK.

7. Woolaston RR (1992) Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: peri-parturient effects on faecal egg counts. *Int J Parasitol* 22: 947–953.
8. Bisset S a, Morris C a (1996) Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. *Int J Parasitol* 26: 857–868.
9. Hunter N, Moore L, Hosie BD, Dingwall WS, Greig A (1997) Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet Rec* 140: 59–63.
10. Wilkie B, Mallard B (1999) Selection for high immune response: an alternative approach to animal health maintenance? *Vet Immunol Immunopathol* 72: 231–235.
11. Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J (2000) Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest Prod Sci* 64: 95–106.
12. Quillet E, Boudry P, Lapegue S (2007) Genetic variability of response to pathogens: a tool to improve health of farmed fish and molluscs. *Prod Anim* 20: 239–251.
13. Ødegård J, Baranski M, Gjerde B, Gjerdem T (2011) Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquac Res* 42: 103–114.
14. Baerwald MR, Petersen JL, Hedrick RP, Schisler GJ, May B (2011) A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* 106: 920–926.
15. Gilbey J, Verspoor E, Mo TA, Sterud E, Olstad K, et al. (2006) Identification of genetic markers associated with *Gyrodactylus salaris* resistance in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ* 71: 119–129.
16. Massault C, Franch R, Haley C, De Koning DJ, Bovenhuis H, et al. (2010) Quantitative trait loci for resistance to fish pasteurellosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Anim Genet* 42: 191–203.
17. Rodríguez-Ramilo ST, Toro MA, Bouza C, Hermida M, Pardo BG, et al. (2011) QTL detection for *Aeromonas salmonicida* resistance related traits in turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics* 12: 541.
18. Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra MR, et al. (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Genet Genomics* 265: 23–31.

19. Houston RD, Haley CS, Hamilton A, Guy DR, Tinch AE, et al. (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics* 178: 1109–1115.
20. Moen T, Baranski M, Sonesson AK, Kjøglum S (2009) Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics* 10: 368.
21. Moen T (2010) Breeding for resistance to viral diseases in salmonids. In: Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB, editors. *Breeding for disease resistance in farm animals*. CABI; Wallingford; UK. pp. 166–179.
22. Villanueva B, Fernández J, García-Cortés LA, Varona L, Daetwyler HD, et al. (2011) Accuracy of genome-wide evaluation for disease resistance in aquaculture breeding programs. *J Anim Sci* 89: 3433–3442.
23. Bain MB, Cornwell ER, Hope KM, Eckerlin GE, Casey RN, et al. (2010) Distribution of an invasive aquatic pathogen (viral hemorrhagic septicemia virus) in the Great Lakes and its relationship to shipping. *PLoS One* 5: e10156.
24. Al-Hussiney L, Lord S, Stevenson RMW, Casey RN, Groocock GH, et al. (2011) Immunohistochemistry and pathology of multiple Great Lakes fish from mortality events associated with viral hemorrhagic septicemia virus type IVb. *Dis Aquat Organ* 93: 117–127.
25. Pierce LR, Stepien CA (2012) Evolution and biogeography of an emerging quasispecies: diversity patterns of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV). *Mol Phylogenet Evol* 63: 327–341.
26. Wahli T, Bergmann SM (2011) Viral haemorrhagic septicaemia (VHS): detection, distribution and combat. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 6: 1–10.
27. Dorson M, Barde A, de Kinkelin P (1975) Egtved virus induced rainbow trout serum interferon: some physicochemical properties. *Annales de microbiologie* 126: 485–489.
28. Purcell MK, Laing KJ, Winton JR (2012) Immunity to fish rhabdoviruses. *Viruses* 4: 140–166.
29. Winton JR (1997) Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Fish Vaccinology* 90: 211–220.
30. Boudinot P, Boubekeur S, Benmansour a (2001) Rhabdovirus infection induces public and private T cell responses in teleost fish. *J Immunol* 167: 6202–6209.
31. Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, Midtlyng P, Kjøglum S, et al. (2003) MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing

pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. Immunogenetics 55: 210–219.

32. Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C (2001) In vitro viral haemorrhagic septicaemia virus replication in excised fins of rainbow trout: correlation with resistance to waterborne challenge and genetic variation. Dis Aquat Organ 45: 171–182.
33. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, et al. (2007) A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. Science 317: 944–947.
34. Peñaranda MMD, Purcell MK, Kurath G (2009) Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics. J Gen Virol 90: 2172–2182.
35. Purcell MK, Lapatra SE, Woodson JC, Kurath G, Winton JR (2010) Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Fish Shellfish Immunol 28: 98–105.
36. Overturf K, LaPatra S, Towner R, Campbell N, Narum S (2010) Relationships between growth and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 33: 321–329.
37. Verrier ER, Langevin C, Tohy C, Houel A, Ducrocq V, et al. (2012) Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status. PLoS One 7: e33935.
38. Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C (2007) *In vitro* assay to select rainbow trout with variable resistance/susceptibility to viral haemorrhagic septicaemia virus. Dis Aquat Organ 76: 7–16.
39. Lynch M, Walsh B (1997) Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates Incorporated; Sunderland; USA.
40. Seymour DK, Filiault DL, Henry IM, Monson-Miller J, Ravi M, et al. (2012) Rapid creation of *Arabidopsis* doubled haploid lines for quantitative trait locus mapping. Proc Natl Acad Sci USA 109: 4227–4232.
41. Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185–199.
42. Navabi A, Mather DE, Bernier J, Spaner DM, Atlin GN (2009) QTL detection with bidirectional and unidirectional selective genotyping: marker-based and trait-based analyses. Theor Appl Genet 118: 347–358.
43. Diter A (1993) Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. J Fish Biol 42: 777–786.

44. Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P (2007) Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 22: 510–519.
45. LeBerre M, de Kinkelin P, Metzger A (1977) Identification sérologique des rhabdovirus des salmonidés. *Bull Off Int Epizoot* 87: 391–393.
46. Dorson M, Torhy C (1993) Viral haemorrhagic septicaemia virus replication in external tissue excised from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and hybrids of different susceptibilities. *J Fish Dis* 16: 403–408.
47. Ayoub M, Mather DE (2002) Effectiveness of selective genotyping for detection of quantitative trait loci: an analysis of grain and malt quality traits in three barley populations. *Genome* 45: 1116–1124.
48. Sun Y, Wang J, Crouch JH, Xu Y (2010) Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. *Mol Breed* 26: 493–511.
49. Guyomard R, Mauger S, Tabet-Canale K, Martineau S, Genet C, et al. (2006) A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC Genomics* 7: 302.
50. Guyomard R, Boussaha M, Krieg F, Hervet C, Quillet E (2012) A synthetic rainbow trout linkage map provides new insights into the salmonid whole genome duplication and the conservation of synteny among teleosts. *BMC Genetics* 13: 15.
51. de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T (2005) CARTHAGENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21: 1703–1704.
52. Carthagene home page. Available: <http://www.inra.fr/mia/T/CartaGene>. Accessed 2013 Jan 3.
53. Filangi O, Moreno C, Gilbert H, Legarra A, Le Roy P, et al. (2010) QTLMap, a software for QTL detection in outbred populations. *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: 1-6 August; Leipzig*. P n°787.
54. Elsen J-M, Mangin B, Goffinet B, Boichard D, Le Roy P (1999) Alternative models for QTL detection in livestock. I. General introduction. *Genet Sel Evol* 31: 213.
55. Le Roy P, Elsen J-M, Boichard D, Mangin B, Bidanel J, et al. (1998) An algorithm for QTL detection in mixture of full and half sib families. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production; Armidale*. pp. 257–260.
56. Harrell FE, Davis CE (1982) A new distribution-free quantile estimator. *Biometrika* 69: 635–640.

57. Moreno CR, Elsen JM, Le Roy P, Ducrocq V (2005) Interval mapping methods for detecting QTL affecting survival and time-to-event phenotypes. *Genet Res (Camb)* 85: 139–149.
58. Quillet E (1994) Survival, growth and reproductive traits of mitotic gynogenetic rainbow trout females. *Aquaculture* 123: 223–236
59. Verrier ER, Langevin C, Benmansour A, Boudinot P (2011) Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev Comp Immunol* 35: 1204–1214.
60. Trobridge GD, LaPatra SE, Kim CH, Leong JC (2000) Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected for susceptibility or resistance to IHNV. *Dis Aquat Organ* 40: 1–7.
61. Wargo AR, Kell AM, Scott RJ, Thorgaard GH, Kurath G (2012) Analysis of host genetic diversity and viral entry as sources of between-host variation in viral load. *Virus Res* 165: 71–80.
62. Bearzotti M, Delmas B, Lamoureux a, Loustau a M, Chilmonczyk S, et al. (1999) Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J Virol* 73: 7703–7709.
63. Boudinot P, Massin P, Blanco M, Riffault S, Benmansour A (1999) Vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *J Virol* 73: 1846–1852.
64. O'Farrell C, Vaghefi N, Cantonnet M, Buteau B, Boudinot P, et al. (2002) Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *J Virol* 76: 8040–8049.
65. Jørgensen HBH, Sørensen P, Cooper GA, Lorenzen E, Lorenzen N, et al. (2011) General and family-specific gene expression responses to viral hemorrhagic septicaemia virus infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Immunol* 48: 1046–1058.
66. Palti Y (2011) Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Dev Comp Immunol* 35: 1263–1272.
67. Palti Y, Gahr SA, Purcell MK, Hadidi S, Rexroad CE, et al. (2010) Identification, characterization and genetic mapping of TLR7, TLR8a1 and TLR8a2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 34: 219–233.
68. Ozato K, Shin D-M, Chang T-H, Morse HC (2008) TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 8: 849–860.
69. Boudinot P, van der Aa LM, Jouneau L, Du Pasquier L, Pontarotti P, et al. (2011) Origin and evolution of TRIM proteins: new insights from the complete TRIM repertoire of zebrafish and pufferfish. *PLoS One* 6: e22022.

70. Tomar D, Singh R, Singh AK, Pandya CD, Singh R (2012) TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells. *Biochim Biophys Acta* 1823: 316–326.
71. Boussaha M, Guyomard R, Cabau C, Esquerré D, Quillet E (2012) Development and characterisation of an expressed sequence tags (EST)-derived single nucleotide polymorphisms (SNPs) resource in rainbow trout. *BMC Genomics* 13: 238.
72. Miller MR, Brunelli JP, Wheeler PA, Liu S, Rexroad CE, et al. (2012) A conserved haplotype controls parallel adaptation in geographically distant salmonid populations. *Mol Ecol* 21: 237–249.
73. Genotrutout project. Available:
http://www4.rennes.inra.fr/lpgp_eng/Programs/Genotrutout. Accessed 2013 Jan 3.
74. ARS project. Available:
http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=162319. Accessed 2013 Jan 3.
75. Sakamoto T, Danzmann RG, Gharbi K, Howard P, Ozaki A, et al. (2000) A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* 155: 1331–1345.
76. Lien S, Gidskehaug L, Moen T, Hayes BJ, Berg PR, et al. (2011) A dense SNP-based linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns. *BMC Genomics* 12: 615.

Acknowledgements

Authors thank the staff of INRA experimental facilities (fish farm in Gournay-sur-Aronde, and platform of infectiology in Jouy-en-Josas) for help in fish management, Jérôme GARRIGUE and Alix SAUSSET for contribution to genotyping, and Dr Carole MORENO for helpful advice in using QTLMap software. We thank an anonymous reviewer for sharing with us information about the EST containing the OMM5005 marker.

Abstract

Health control is a major issue in animal breeding. A better knowledge of the genetic bases of resistance to diseases is needed in teleost fish for which specific data remain limited. The detection of quantitative trait locus (QTL) allows to uncover the genetic architecture of complex traits and to understand the pathways involved in resistance to pathogens. We report here the detection of QTL for resistance to Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV), a major threat for European aquaculture industry. Two induced gynogenetic doubled haploid F2 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) offspring were used. These families combined the genome of susceptible and resistant F0 breeders and contained only fully homozygous individuals. Fish were phenotyped for survival after an immersion challenge with the virus and for *in vitro* virus replication on fin explants. A selective genotyping strategy identified seven QTL associated to survival. One of those QTL was significant at the genome-wide level and largely explained both survival and viral replication in fin explants in the different families of the design (up to 65% and 49% of variance explained respectively). Our results evidence the key role of innate defence in resistance to the virus and pave the way for the identification of the gene(s) responsible for resistance. The identification of a major QTL also opens appealing perspectives for selective breeding of fish with improved resistance.

Chapitre 5

Caractérisation du QTL de résistance au VSHV à l'aide de lignées isogéniques de truite arc-en-ciel.

Eloi Verrier, Caroline Hervet, Céline Ciobotaru, Nicolas Dechamp, Pierre Boudinot et Edwige Quillet

Etudiants encadrés : Mathieu Besson (M1)
Eugénie Juranville (BTS 1^{ère} année)

Introduction

Un QTL majeur de résistance à la SHV a donc été identifié sur le GL31 (Omy3) et sa présence confirmée dans plusieurs familles gynogénétiques de truite arc-en-ciel issues de parents sélectionnés pour des aptitudes différentes à la prolifération du virus sur explants de nageoire. Nous avons poursuivi ce travail avec trois objectifs :

- **préciser la localisation du QTL**, qui n'avait pas pu être borné dans les premières analyses. Les données de cartographie disponibles chez les salmonidés montraient que les taux de recombinaison diffèrent assez fortement dans les deux sexes avec d'une part, des cartes génétiques plus courtes chez le mâle et également des différences locales, les femelles présentant des taux de recombinaison plus élevés en zone centromérique mais moindres en zone télomérique (Sakamoto *et al.*, 2000; Lien *et al.*, 2011). L'exploitation de familles de mères, a priori favorable (carte globale plus longue), n'était donc pas propice à un travail de cartographie fine compte tenu de la localisation du QTL.
- **confirmer définitivement le rôle du QTL**, à partir de croisements issus de parents sélectionnés directement pour la survie, et non sur le critère indirect de la multiplication virale sur explants de nageoire, et poursuivre sa caractérisation en exploitant la gamme de résistances plus variées disponible dans la population.
- **préparer du matériel animal** permettant de coupler les approches positionnelles et fonctionnelles en vue d'une caractérisation poussée du QTL, les animaux du dispositif initial n'ayant pas pu être conservés.

Pour cela, nous avons exploité la collection de lignées isogéniques de truite arc-en-ciel développée par l'équipe GenAqua. Comme décrit dans le chapitre 3 de ce manuscrit, ces lignées sont obtenues après deux générations successives de gynogenèse. Ces poissons, homozygotes à tous les locus³ et génétiquement identiques au sein d'une même lignée, sont d'excellents outils pour les approches de biologie intégrative. Un premier criblage systématique de ces lignées avec deux virus a montré une grande diversité de résistance des différentes lignées après infection par le VHSV 07-71 (Quillet, Dorson, *et al.*, 2007), les taux

³ Il subsiste en réalité un faible taux d'hétérozygotie résiduelle, notamment liée à l'apparition de mutations au cours de l'entretien des lignées.

de survie observés variant de 0 à presque 100% (Figure 17). La comparaison des lignées à partir de la mortalité finale et de la cinétique de mortalité a permis de définir deux lignées presque totalement résistantes (B57 et A2), trois lignées extrêmement sensibles (AP2, A3 et A22), dans lesquelles la mortalité atteint plus de 95% dix jours seulement après l'infection, et des lignées de résistance « intermédiaire », présentant une cinétique de mortalité plus lente avec des survies finales de 20 à 40% (A36 notamment). Des croisements entre ces groupes de performance variée ont donc été réalisés. L'inversion sexuelle précoce⁴ d'une partie des femelles de la génération F1 a permis d'obtenir des reproducteurs de phénotype mâle pour certains des croisements et d'analyser les ségrégations dans les descendance correspondantes. La truite arc-en-ciel ne pond qu'une fois par an et l'intervalle de génération est de deux ans. De telles études de ségrégation sont donc longues à mettre en place et les capacités des élevages expérimentaux étant limitées, seulement une partie des croisements potentiellement intéressants a pu être mise en place.

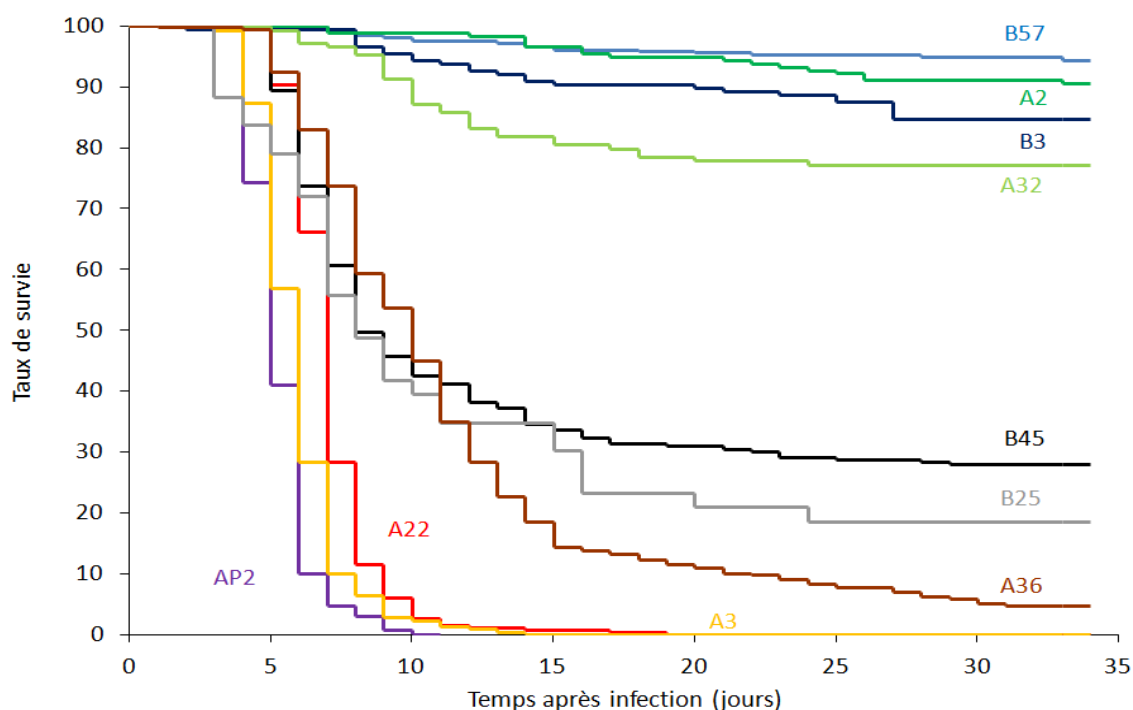


Figure 17 : Courbes de survie de 10 lignées isogéniques de truites arc-en-ciel après infection par le VHSV 07-71. L'estimateur de Kaplan-Meier est calculé pour chaque lignée à partir des données de 6 infections par bain indépendantes.

Un génotypage ciblé dans la région du QTL a été mis en place dans les croisements disponibles. Les résultats sont décrits dans le chapitre qui suit.

⁴ par incorporation de méthyltestostérone dans l'aliment en début d'élevage

Matériel et méthodes

1) Production de familles de 2^{ème} génération par croisement de lignées isogéniques.

Les lignées isogéniques (dérivées de la souche INRA "synthétique" de référence) ont été produites comme décrit dans le chapitre 3.

Les familles QTL ont été obtenues en croisant les lignées isogéniques entre elles. A partir du croisement F1, trois possibilités existent pour la production de familles en ségrégation utilisées pour la cartographie du QTL : soit un individu F1 est croisé avec un des deux parents initiaux (« back cross » BC ou croisement en retour), soit deux individus F1 sont croisés entre eux (génération F2), soit une femelle F1 est reproduite par gynogenèse mitotique (« haploïdes doublés » ou HD). En fonction des disponibilités, ces trois types de croisements ont été produits (Table 7 et Figures S1 à S3, Annexe 1, p239-240).

Table 7 : Familles utilisées pour la recherche du QTL de résistance dans les descendance de lignées isogéniques.

Famille QTL	Gm	Gp	Type de croisement	Méiose	Année	N
HD_B57AP2	B57	AP2	HD	♀	2009	180 ^a
BC_B57A3	B57	A3	BC sur ♂ B57	♀	2009	414
F2_A2A3	A2	A3	F2	♀/♂	2011	168 ^b
F2_A2A36	A2	A36	F2	♀/♂	2011	195
BC_B57A22	B57	A22	BC sur ♀ B57	♂	2012	239
BC_A36A3	A36	A36(♀) x A3(♂)	BC sur ♀ A36 ^c	♂	2012	269

Gm : Grand-mère Gp : Grand-père

Méiose : sexe du parent hétérozygote pour le QTL.

N. : Nombre d'individus génotypés par famille.

^a Génotypage sélectif (90 survivants & 90 morts précoces sur 1000 individus).

^b Uniquement les individus morts. 37 poissons (survivants) sont manquants.

^c Le mâle utilisée est issu d'un back-cross entre un mâle F1 ((A36 x A3) et une femelle A36. Ce mâle a été génotypé dans la zone du QTL sur le GL31 et choisi pour être hétérozygote A36 / A3 pour tous les marqueurs de la zone.

Les poissons ont été élevés et testés dans les installations expérimentales de l'INRA (les élevages de reproducteurs à la pisciculture de Gournay-sur-Arond et de la PEIMA et les infections de juvéniles à la plateforme d'infectiologie IERP, Jouy-en-Josas).

2) Infection expérimentale par le virus.

Les juvéniles de 4 à 5 mois ont été infectés par bain à l'aide du VHSV 07-71 comme décrit dans (Quillet *et al.*, 2001). Les poissons sont transférés dans les aquariums et infectés par incubation pendant 2h dans une suspension de virus à 5.10^4 pfu.mL⁻¹ dans de l'eau statique avec une vive aération. La circulation de l'eau est rétablie après exposition au virus. Pour les infections intrapéritonéales, 10000 PFU ont été injectés dans chaque poisson.

Les poissons de chaque famille ont été divisés en deux, trois ou quatre lots (un lot par bassin). La mortalité des poissons a été enregistrée durant 30 à 40 jours après infection. Les morts ont été récoltés deux fois par jour. A la fin de l'expérience, les poissons survivants sont sacrifiés (anesthésie létale au 2-phénoxyéthanol). Les mortalités intra-famille sont à chaque fois homogènes entre les différents réplicats. Les différents lots ont donc été considérés comme une seule population. Tous les individus ont été conservés dans l'éthanol.

3) Génotypage

Table 8 : marqueurs utilisés dans les différentes familles, et positions^a (en cM).

Marqueurs	Type	B57AP2	B57A3	A2A3	A2A36	B57A22	A36A3
M1	μS					X (0)	
M2	μS					X (0,2)	X (0)
M3	μS					X (0,4)	
M4	μS				X (0)	X (0,8)	X (16,6)
M5	μS				X (0,2)	X (18,6)	
M6	μS		X	X	X (1,3)	X (20,7)	X (32,2)
M7	μS						X (33,4)
M8	μS				X (2,6)		
M9	μS					X (21,1)	
M10	μS	X			X (15,8)	X (35,9)	
M11	SNP						X (36)
M12	SNP						X (61,7)
M13	μS				X (23,8)		X (63,3)

μS : marqueur microsatellite.

SNP : *single nucleotid polymorphism*

^a La distance entre marqueurs dans chacune des familles est estimée par le pourcentage de recombinaison entre marqueurs, le marqueur le plus « en amont » servant de référence (position 0).

L'extraction d'ADN et les méthodes de génotypage des marqueurs microsatellites ou SNP ont été décrits dans le chapitre précédent. Une carte génétique est construite pour chaque famille en fonction des marqueurs génotypés en utilisant le logiciel CarthaGène (de Givry *et al.*, 2005). Les caractéristiques des marqueurs sont présentées Table 8. Les marqueurs sont ceux utilisés pour la construction de la carte génétique de Guyomard *et al.*, 2006 et de nouveaux marqueurs développés à partir de BACs présents dans la zone du QTL SHV ou dérivés de la littérature (Miller *et al.*, 2012).

4) Etudes d'association pour la détection de QTL.

Dans les 2 familles de mères (B57AP2 et B57A3, analyse de la méiose femelle), un seul marqueur a été génotypé. En effet, compte tenu du faible taux de recombinaisons au cours de la méiose, l'information fournie par les différents marqueurs est très largement redondante, et il s'agit d'abord de confirmer ou non la présence du QTL dans ces croisements.

Dans les autres familles, les marqueurs polymorphes dans le croisement ont été exploités, à l'exception de la famille A2A3. En effet, suite à une erreur de manipulation dans l'installation expérimentale, les individus survivants à l'épreuve de ce lot n'ont pas pu être génotypés. L'effort de génotypage sur les individus disponibles (morts pendant l'épreuve) a donc été limité à un marqueur.

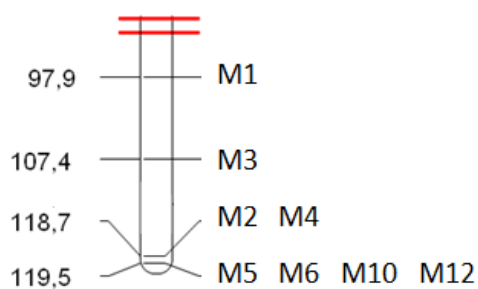
L'analyse d'association entre allèles au marqueur et phénotype est décrite dans le chapitre précédent.

Pour toutes les familles (exceptée B57AP2), le pourcentage de la variance expliquée par le QTL a été estimé en testant au sein des familles l'effet des allèles au marqueur supposé le plus proche du QTL (ANOVA *via* le logiciel SAS). L'effet du QTL a été mesuré en utilisant la durée de survie (en jours après infection), considérée ici comme un caractère gaussien (la durée de survie des survivants ayant été fixée à la date de leur euthanasie).

Résultats

1) Différences des cartes génétiques mâle/femelle.

GL31 région QTL femelle (OMM 2.0)



GL31 région QTL mâle

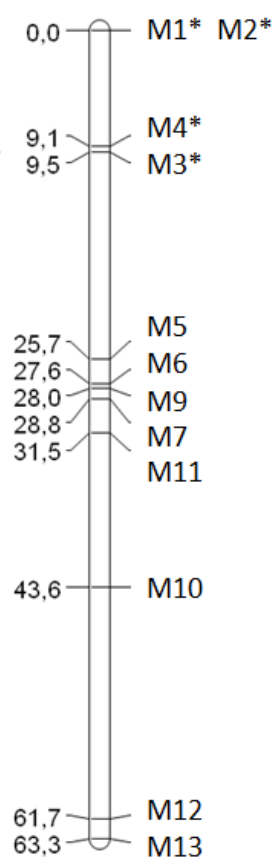


Figure 18. Carte génétiques mâles et femelles de la région du QTL SHV. L'extrémité du GL31 publié dans (Guyomard *et al.*, 2006) est représenté à gauche sur la figure. La carte de droite est construite à partir des données de génotypage des deux familles de seconde génération utilisant un mâle hybride comme géniteur (les deux back-cross A36A3 et B57A22). Les deux marqueurs en rouge permettent la comparaison des taux de recombinaisons observés. *La position des 4 marqueurs entre eux n'est pas garantie par le logiciel CarthaGène.

Afin de confirmer que les recombinaisons sont moins fréquentes dans les régions télomériques durant la méiose femelle que durant la méiose mâle, une carte génétique par voie mâle a été construite en utilisant les données de génotypage aux différents marqueurs des individus des deux familles back-cross B57A22 et A3A36 (Figure 18). Alors que sur la carte génétique (femelle) de référence du laboratoire OMM 2.0 (Guyomard *et al.*, 2006) les marqueurs M4 et M12 ne sont séparés que de 0,8 cM, ils sont séparés de plus de 50 cM sur les cartes obtenues par voie mâle (ce qui correspond donc à plus de 50% de recombinaisons entre les deux marqueurs). Ces résultats confirment les données de la carte génétique publiée entre temps par Miller *et al.* (2012) (taille de la zone : environ 50cM en utilisant une carte mâle). Ce premier résultat nous indique que la carte génétique mâle peut être très utile pour l'étude de la région du QTL. Elle va en effet permettre de disjoindre les marqueurs colocalisés dans la carte femelle, préciser la localisation relative du QTL par rapport à ces marqueurs et peut-être ainsi de pouvoir éliminer ceux qui sont trop loin de la région du QTL le cas échéant.

2) Croisements entre lignées résistantes (B57 et A2) et lignées hautement sensibles.

Dans une première étude, des poissons issus de la lignée la plus résistante au VHSV (B57) ont été croisés avec des poissons des trois lignées les plus sensibles (AP2, A22 et A3).

a) Première analyse par voie femelle : « pseudo-F2 » B57AP2

Les poissons de la génération « pseudo-F2 » (composée de poissons haploïdes doublés) sont passés en épreuve par bain avec le VHSV 07-71. La mortalité finale est d'un peu plus de 50% (voir Table 9). La présence ou l'absence du QTL dans les poissons de ce croisement a pu être vérifiée à l'aide d'un seul marqueur de la région par génotypage sélectif. Un groupe de 90 poissons parmi les survivants ainsi qu'un autre de 90 poissons morts précocement ont été génotypés pour le marqueur M11. La fréquence des allèles en fonction des groupes est présentée Table 9.

Table 9 : fréquence allélique au marqueur M11 en fonction du statut des poissons.

Famille	N	S. finale	Morts ^a		Vivants ^b		χ^2 ^d
			B57/B57 ^c	AP2/AP2	B57/B57	AP2/AP2	
B57AP2	1000	51,3 %	1	87	78	10	136,2

N : nombre total de poissons passés en épreuve.

S. finale : survie finale du groupe.

^a groupe de 90 poissons morts précocement (jour 4 après infection)

^b groupe de 90 poissons survivants à la fin de l'épreuve.

^c allèle au marqueur OMM1599.

^d valeur de χ^2 . Le seuil de signficativité à $p < 0,001$ pour un test de χ^2 (1 dl) est de 10,8.

Les résultats montrent que les poissons du groupe des survivants portent en grande majorité l'allèle de la grand-mère B57 résistante au marqueur M11. Dans le groupe des morts précoces en revanche, tous les poissons sauf un portent l'allèle du grand-père AP2 sensible. Le déséquilibre allélique entre les deux groupes est largement significatif (à $p < 0,001$, test du χ^2 à 1 dl). Ces résultats suggèrent fortement que le QTL est conservé dans cette famille. Ce résultat resterait à confirmer sur l'ensemble du groupe pseudo-F2 pour estimer l'effet du QTL dans cette famille. En effet, il s'agit ici d'une stratégie de génotypage sélectif, s'intéressant uniquement aux individus à phénotype extrême.

b) Seconde analyse par voie femelle : Back-cross B57A3

La deuxième famille QTL fut obtenue en croisant une femelle hybride B57A3 avec un mâle B57. Il s'agit là encore d'une analyse par la voie femelle. Un lot 414 poissons (correspondant à 4 aquariums d'environ 100 poissons) ont été infectés par le VHSV 07-71. La mortalité finale du groupe est d'environ 45%. Tous les individus ont été génotypés pour le marqueur M6. Les fréquences alléliques sont proches de celles attendues dans le cadre de l'équilibre d'Hardy-Weinberg (51% d'allèles B57/B57 contre 49% d'allèles B57/A3). En revanche, dans les 55% de poissons survivants, on retrouve majoritairement des poissons homozygotes pour l'allèle B57 (85,6% contre 14,4% de poissons hétérozygotes B57/A3). A l'inverse, le génotype B57/A3 est beaucoup plus fréquent chez les poissons morts (78,9% contre 21,1% d'homozygotes B57B57). La valeur de χ^2 associée à ce déséquilibre est de 159,1 ($p < 0,001$). Ces résultats suggèrent donc que dans cette famille également, la région

télomérique du GL31 joue un rôle déterminant dans la variabilité de la résistance. Cet effet est illustré par les courbes de mortalité en fonction du génotype au marqueur M6 (Figure 19).

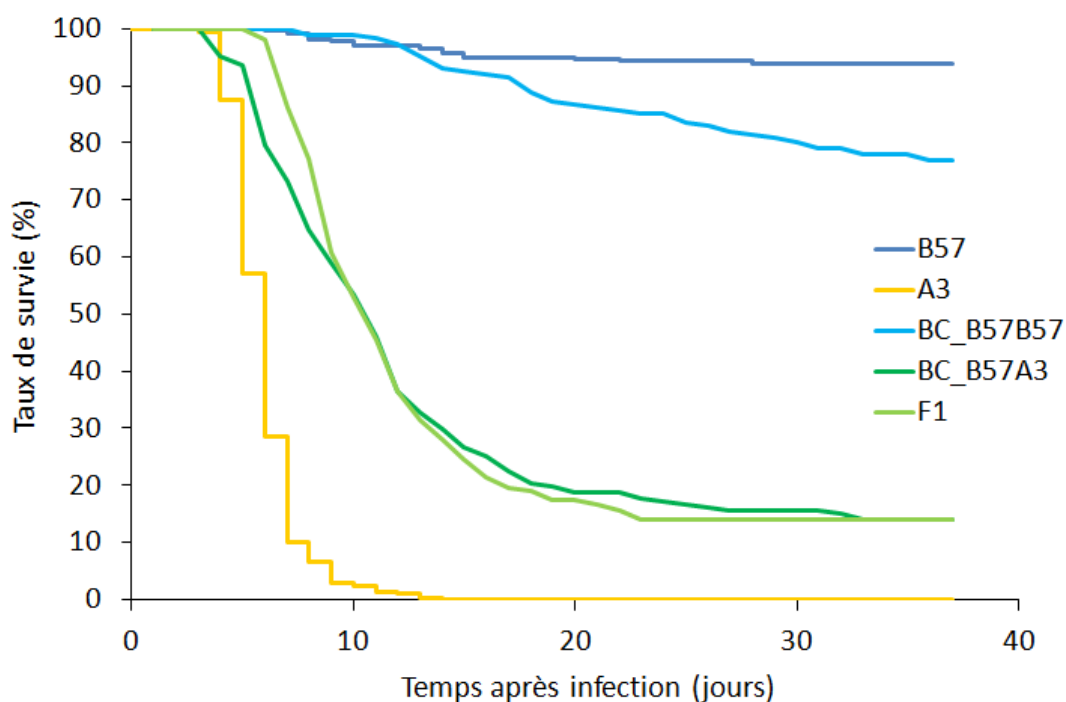


Figure 19 : Survie des poissons back-cross B57A3 en fonction de l'allèle au marqueur M6. B57 & A3 : estimateur de Kaplan-Meier pour les deux lignées grand-parentales. BC_B57B57 : individus homozygotes pour l'allèle B57 au marqueur. BC_B57A3 : individus hétérozygotes au marqueur. F1 : pour mémoire, survie des poissons issus du croisement F1 (B57 X A3).

La survie finale des poissons homozygotes pour l'allèle B57 est d'un peu moins de 80%, indiquant la bonne résistance de ces poissons au VHSV. Les courbes de survie de 200 poissons issus de la génération F1 (génotype B57A3 à tous les locus) est indiquée à titre de comparaison. Les courbes de mortalité des poissons hétérozygotes au QTL (B57A3 au marqueur) et celles du croisement F1 sont très similaires, avec notamment le même pourcentage de survie finale (autour de 10%). Les poissons hétérozygotes B57A3 au QTL SHV ont donc une sensibilité au VSHV très voisine de celle des poissons hétérozygotes B57A3 sur l'ensemble de leur génome.

c) Analyse par voie mâle : back-cross B57A22

La dernière famille QTL impliquant la lignée B57 est également un back-cross. Mais cette fois, c'est un mâle hybride F1 (B57A22) qui a été croisé avec une femelle B57. Deux lots de 120 et 119 poissons back-cross ont été infectés avec le VHSV 07-71 (survie finale de 54,8%) puis génotypés pour 8 marqueurs indiqués Table 8.

L'analyse de l'association entre allèles aux marqueurs et durée de survie après infection a été réalisée par cartographie d'intervalle avec le logiciel QTLMap comme expliqué dans le chapitre précédent. Les résultats sont indiqués Figure 20.

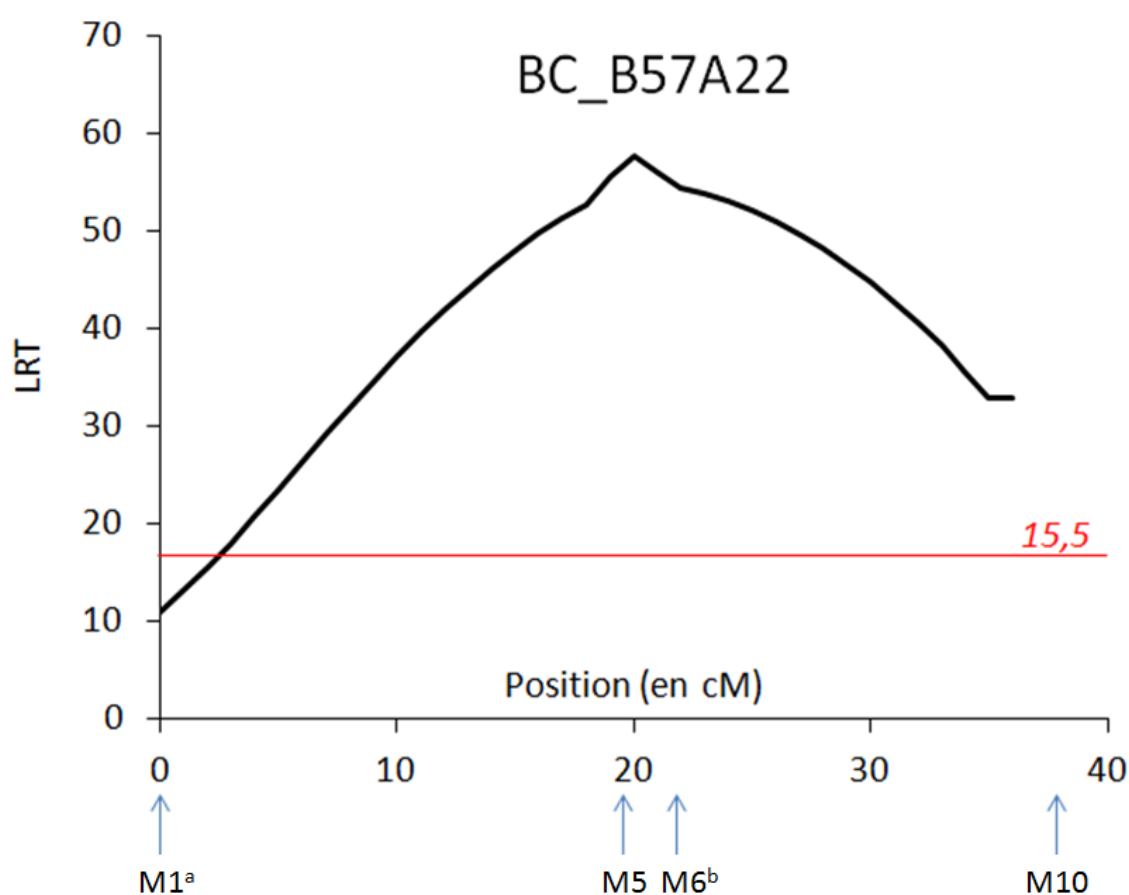


Figure 20 : Valeur de LRT (vraisemblance) en fonction des marqueurs pour le back-cross B57A22 (calculées *via* le logiciel QTLMap, modèle analyse de survie). Le maximum de vraisemblance est obtenu en position 20cM. L'intervalle de confiance est de 1cM autour de ce maximum. Marqueurs flanquant le maximum de vraisemblance : M5 et M6. Le seuil de significativité du test d'hypothèse sur la présence de QTL à 1% au niveau du génome est de 15,5 (droite rouge). ^a Plusieurs marqueurs proches sont non représentés sur la figure (manque de place) : M2 à 0,2cM, M3 à 0,4cM et M4 à 0,8cM. ^b Le marqueur M9 (en position 21,1) n'est pas représenté par manque de place.

Les résultats confirment la présence dans cette zone d'un QTL hautement significatif dans ce croisement. Le maximum de vraisemblance de la présence d'un QTL dans la zone est observé en position 20cM entre les marqueurs M5 et M6 (Figure 20). Ces résultats nous permettent aussi et pour la première fois de borner le QTL. En effet, La valeur des LRT diminue fortement après le maximum, ce qui n'était pas le cas lors de la première étude. Grâce aux recombinaisons introduites par la méiose mâle, on peut aujourd'hui affirmer que dans cette famille, le QTL est situé entre les marqueurs M10 et M2, et est proche des marqueurs M5 et M6. Ceci marque une avancée significative dans la localisation chromosomique du QTL.

Les résultats obtenus avec ces trois premières familles montrent donc que le QTL est conservé dans les croisements impliquant la lignée résistante B57 et trois lignées hautement sensibles. Le rôle déterminant de ce QTL dans la population étudiée est donc confirmé. Dans l'hypothèse d'un seul gène au QTL, cela suggère qu'un même mécanisme serait responsable des différences de résistance entre individus extrêmes dans l'ensemble de la population. Il est donc intéressant de tester si ce mécanisme de résistance est également commun aux poissons de l'autre lignée très résistante, la lignée A2.

d) Analyse par voie mâle utilisant une seconde lignée résistante : F2 A2A3

Afin d'exploiter à nouveau les possibilités offertes par les cartes génétiques construites par voie mâle et pour vérifier la présence ou l'absence du QTL dans les croisements en utilisant la lignée A2, deux poissons hybrides F1 A2A3 ont été croisés (voir Figure S2, Annexe 1, p239). Deux lots de 102 et 103 poissons F2 ont été infectés par le VHSV 07-71. La mortalité finale a été de 82% (Figure 21). Malheureusement, suite à une erreur technique, les survivants de cette épreuve ont été éliminés avant d'avoir pu être génotypés pour les marqueurs de la région.

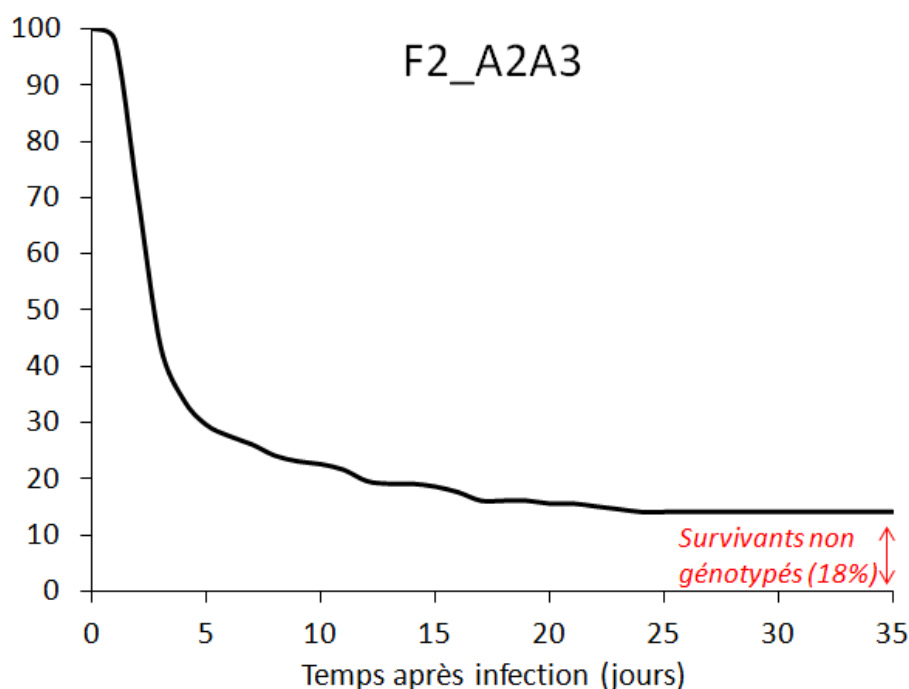


Figure 21 : Courbe de mortalité des poissons F2 A2A3. Les poissons sont infectés au VHSV 07-71 et les morts ont été relevés deux fois par jour pendant 35 jours après infection.

Néanmoins, 82% des poissons restaient disponibles, ce qui nous a encouragés à exploiter l'information en génotypant les 167 poissons sensibles au marqueur M6 (qui semble être un des marqueurs très proches du QTL).

L'analyse globale des fréquences alléliques montre un déficit de l'allèle A2 (40% contre 50% attendu en l'absence de déséquilibre allélique), dans des proportions compatibles avec une présence majoritaire d'individus homozygotes A2A2 dans les individus vivants non génotypés (parmi les morts : 32% de génotype A3A3, 56% de génotype A2A3 et seulement 12% de génotype A2A2). L'échantillonnage de 167 poissons est statistiquement en déséquilibre (probabilité du test du χ^2 à 1 dl associé $p = 0,009$)

Pour tester la présence éventuelle du QTL dans la zone d'intérêt, les poissons ont été répartis par génotype au marqueur M6 et par date de mortalité (mortalité précoce entre 4 et 6 jours, mortalité intermédiaire entre 7 et 11 jours et mortalité tardive survenue plus de 12 jours après infection). Le nombre de poissons de chaque catégorie est indiqué Figure 22.

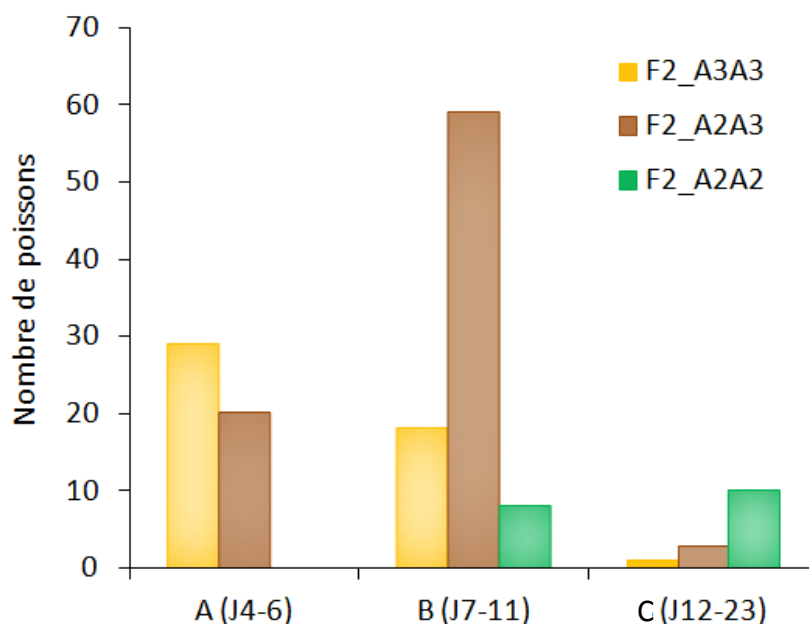


Figure 22 : Mortalité des poissons F2 A2A3 en fonction de leur génotype au marqueur M6. Les 167 poissons morts au cours de l'épreuve sont génotypés pour le marqueur M6. Les poissons sont classés en fonction de leur génotype au marqueur et de la date de mortalité. A : mortalité précoce (entre 4 et 6 jours après infection). B : mortalité intermédiaire (entre 7 et 11 jours après infection). C : mortalité tardive (plus de 12 jours après infection). F2_A3A3: poissons F2 homozygotes A3A3 au marqueur M6. F2_A2A3: poissons F2 hétérozygotes A2A3 au marqueur. F2_A2A2: poissons F2 homozygotes A2A2.

Aucun poisson homozygote A2A2 n'est retrouvé parmi les morts précoces, majoritairement homozygotes A3A3. La plupart des poissons de mortalité intermédiaire sont hétérozygotes A2A3, et l'on retrouve quelques poissons de génotype A2A2 et A3A3. La majorité des poissons A2A2 observés sont dans le groupe de mortalité tardive, dans lequel ne figurent plus que quelques poissons portant les autres génotypes. Ces résultats suggèrent donc fortement que le QTL est également présent dans cette famille. Afin de s'en assurer, il faudrait recommencer cette expérience en génotypant l'ensemble de la population, sur tous les marqueurs de la zone. Ce résultat suggère néanmoins que les mécanismes de résistance des lignées B57 et A2 sont gouvernés par la même zone QTL.

3) Extension du QTL aux lignées de sensibilités intermédiaires :

a) Croisement avec une lignée résistante : F2 A2A36

Pour tester l'importance de la région dans une lignée de sensibilité intermédiaire, une famille QTL a été établie à partir de poissons A2 et A36. Un total de 195 poissons divisés en deux bassins a été infecté par le VHSV 07-71. La survie finale du lot était de plus de 64%. Les individus ont été génotypés pour les marqueurs indiqués Table 8.

De manière surprenante, aucun QTL n'est détecté dans la zone d'intérêt (donnée non présentée). Ceci indiquerait donc que la différence de résistance entre les lignées A2 et A36 n'est pas expliquée par un gène de la zone du QTL SHV. Ceci peut aussi s'expliquer par le fait que le contraste entre les lignées résistantes (B57 et A2) et A36 est moins élevé qu'entre ces mêmes lignées et les autres lignées sensibles. La détection de QTL par l'intermédiaire de cette famille est donc potentiellement moins puissante. D'ailleurs, la survie observée (de 64%) est la plus élevée de toutes les familles ségrégeantes testées jusqu'à maintenant.

Les résultats disponibles à ce jour nous permettent juste de conclure que le QTL SHV n'est pas retrouvé dans le croisement A2A36. La plus grande sensibilité de la lignée A36 serait donc contrôlée par une (ou plusieurs) autre(s) région(s) du génome.

b) Croisement avec une lignée sensible : back-cross A36A3

En parallèle de cette analyse, un croisement entre A36 et A3, un clone particulièrement sensible avait également été réalisé, afin de vérifier si la différence de sensibilité entre deux lignées sensibles pouvait également s'expliquer par une variation de la région du QTL SHV.

Deux lots de 135 et 134 poissons ont été infectés par VHSV 07-71. La mortalité finale du lot est de 97,4%. Les 269 poissons ont été génotypés pour 7 marqueurs de la région du QTL (voir table 8). La détection de QTL a été réalisée en utilisant le logiciel QTLMap. Les résultats sont indiqués figure 23, et montrent que le QTL est également retrouvé dans ce croisement.

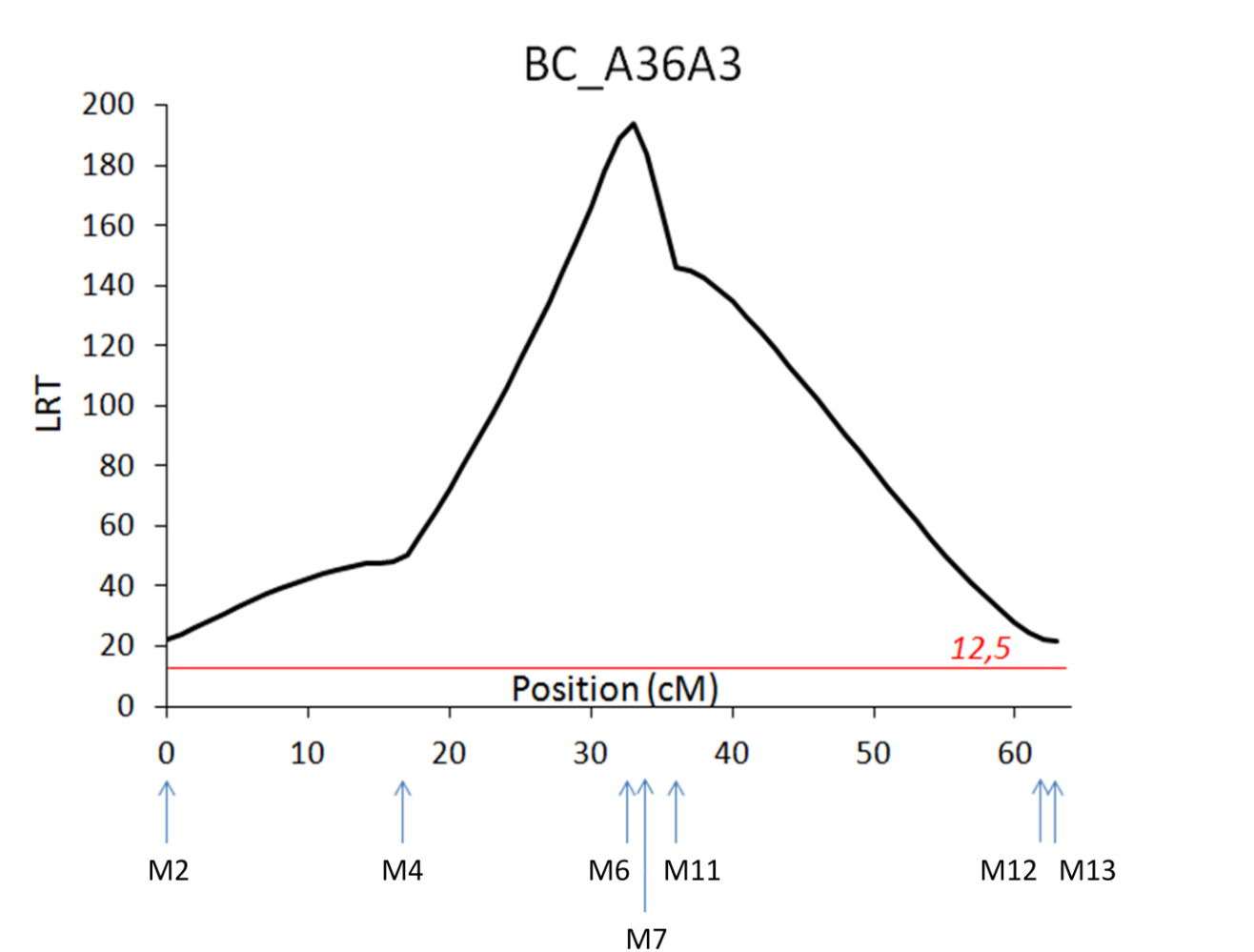


Figure 23 : Valeur de LRT (vraisemblance) en fonction des marqueurs pour le back-cross A36A3. Les analyses ont été réalisées via le logiciel QTLMap (modèle analyse de survie). Le maximum de vraisemblance est obtenu en position 33cM. L'intervalle de confiance est de 1cM autour de ce maximum. Les deux marqueurs flanquant le maximum sont M6 et M7. Le seuil de significativité du test d'hypothèse sur la présence de QTL à 1% au niveau du génome est de 12,5 (droite rouge).

Ainsi, la différence de sensibilité, entre A36 et A3, pourtant réduite en terme de mortalité finale, reste expliquée en grande partie par cette région du génome. En outre, le maximum de vraisemblance étant atteint en position 33,4 cM, à proximité du marqueur M6. Au vu des intervalles de confiance, on peut donc dire que QTL dans les deux familles A36A3 et B57A22 sont colocalisés.

4) Quantification de l'effet du QTL en pourcentage de la variance.

Pour quantifier l'importance de cette zone dans les différents croisements, l'effet de l'allèle au marqueur supposé le plus proche du QTL (M6) a été testé en utilisant la durée de survie après infection comme une donnée gaussienne, en attribuant comme performance aux survivants la date de leur euthanasie. Une analyse de variance (ANOVA) est réalisée *via* le logiciel SAS en tenant compte de la date de mortalité en fonction du génotype au marqueur M6. Toutes les familles étudiées ont été testées, mise à part la pseudo-F2 B57AP2, résultant du génotypage des individus extrêmes (génotypage sélectif). Les résultats sont indiqués Table 10.

Table 10 : durée moyenne de survie en fonction des génotypes à M6

Famille	Durée moyenne de survie			R^2	p
	R/R	R/S	S/S		
B57A3	34 ± 8,2	14,5 ± 10,6		0,51	< 0,001
A2A3 ^a	15,3 ± 6,3	6,8 ± 2,4	6,5 ± 3,1	0,42	< 0,001
A2A36	35,9 ± 8,3	32,1 ± 11,2	32,1 ± 10,2	0,02	0,12
B57A22	26,5 ± 9,9	16,2 ± 6		0,28	< 0,001
A36A3	14,2 ± 6,9	4,8 ± 1,2		0,48	< 0,001

^a cette étude ne prend en compte que les poissons morts au cours de l'épreuve (survivants indisponibles).

Pour les 4 familles dans lesquelles le QTL est significatif (B57A3, A2A3, B57A22 et A3A36), le génotype au marqueur M6 explique 28 à 51% de la variance phénotypique. L'écart de performance entre les porteurs de l'allèle de sensibilité et les porteurs de l'allèle de résistance est significatif à $p < 0,001\%$. Comme attendu, seule la famille A2A36 ne présente pas de différence de performance significative en fonction des allèles au marqueur. Pour les autres croisements, ces résultats confirment l'effet majeur du QTL dans la résistance au VSHV.

5) Importance du QTL en fonction du mode d'infection

Afin de mieux caractériser le QTL, nous avons enfin cherché s'il était conservé après inoculation du virus par un autre mode d'infection. Le QTL identifié contrôlant à la fois la survie des poissons et la croissance virale sur nageoire, il est en effet possible que la résistance soit liée aux mécanismes d'entrée du virus au niveau des barrières épidermiques. Afin de s'affranchir de cette étape, le virus a été inoculé aux poissons du back-cross B57A22 par injection intrapéritonéale. La première description des lignées isogéniques a montré que l'infection par injection de doses virales massives était fatale à toutes les lignées. Afin de contraster au maximum les phénotypes, la dose d'injection a donc été divisée par 10 par rapport à l'étude de Quillet *et al.*, (2007). Un groupe de 125 poissons a ainsi été injecté, et la mortalité finale du lot a été de 66%. Les poissons ont été génotypés pour le marqueur M10, qui n'est pas le marqueur le plus proche du QTL, mais les résultats décrits plus hauts n'étaient pas encore connus. Parmi les survivants à l'épreuve, 90% sont homozygotes B57B7, alors qu'une majorité de poissons morts, 63% sont hétérozygotes B57A22 ($\chi^2 = 32$, $p < 0,001$). La cinétique de mortalité en fonction du génotype au marqueur est indiquée Figure 24.

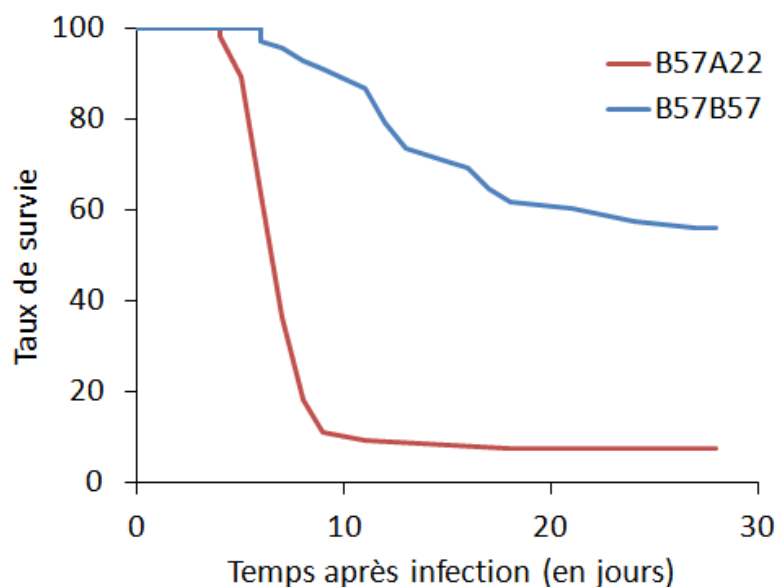


Figure 24 : Mortalité des poissons B57A22 après injection par le VSHV 07-71 en fonction du génotype au marqueur M10.

Ce résultat confirme l'effet du QTL sur la résistance dans ce croisement après infection par injection, et nous indique ainsi que le mécanisme de contrôle de la résistance

impliqué dans le QTL est conservé quel que soit le mode d'infection. Par conséquent, si la croissance virale sur nageoire nous oriente vers des mécanismes innés, le franchissement de la barrière épidermique ne semble pas être une étape critique dans la résistance au VSHV.

Discussion et conclusions

Cette étude confirme définitivement le rôle majeur du QTL de la région télomérique du GL31 dans la variabilité de résistance au virus de la SHV de la population étudiée. Le QTL est impliqué dans la plupart des croisements étudiés, et y explique une large part de la variance phénotypique observée. Contrairement à l'étude précédente, les lignées parentales sont cette fois-ci caractérisées directement à partir de leur performance de survie (et non sur un critère indirect de résistance), ce qui conforte et généralise les résultats.

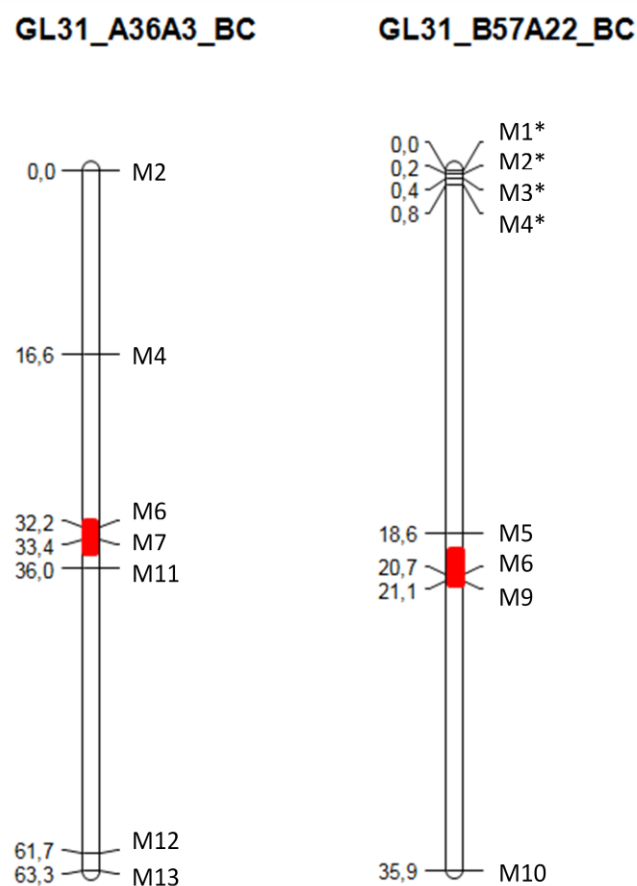


Figure 25. Position du QTL SHV dans les familles B57A22 et A36A3. L'intervalle de confiance de la position du QTL est indiqué en rouge. * La position des marqueurs n'est pas garantie par le logiciel.

Une des retombées majeures de cette étude est la mise en évidence de différences significatives entre les cartes génétiques construites à partir des recombinaisons après méiose mâle ou femelle. Des marqueurs que l'on trouvait liés chez la femelle sont chez le mâle distants de plusieurs dizaines de cM. Ceci nous a permis entre autres de borner le QTL et ainsi réduire la région à explorer (Figure 25). L'utilisation de croisements par voie mâle permettra certainement de préciser la localisation de ce locus, à l'aide de croisements avancés à partir de reproducteurs issus des générations F2 des croisements entre lignées isogéniques (afin d'induire de nouvelles recombinaisons dans la zone et exclure les marqueurs les plus éloignés).

Cette étude a donc confirmé dans un certain nombre de croisements de lignées isogéniques de truite arc-en-ciel ayant une sensibilité variable au VHSV que la région télomérique du GL31 jouait un rôle très important dans l'issue de l'infection par ce virus. En particulier, le QTL est retrouvé dans deux croisements de lignées résistantes (B57 et A2) avec une même lignée sensible (A3). Ceci suggère que les lignées B57 et A2, mais aussi les individus de l'étude du chapitre précédent à l'origine des familles QTL partagent au moins une partie de leurs mécanismes de résistance. De plus, ce QTL majeur laisse supposer qu'un seul gène majeur ou plusieurs gènes très proches sont impliqués dans les variations de ce mécanisme de résistance.

Les résultats montrent également que la différence de sensibilité entre deux lignées classées sensibles sur la base de leur mortalité finale (A3 et A36) peut s'expliquer par un polymorphisme dans la même région. Ceci peut laisser supposer l'existence d'une série allélique à un locus, qui conférerait une résistance plus ou moins forte à l'infection à l'individu en fonction de l'allèle. L'absence de déséquilibre de liaison (au marqueur supposé le plus proche du QTL, on ne retrouve aucun allèle préférentiellement associé à la résistance ou à la sensibilité parmi nos lignées) est compatible avec cette hypothèse. A2 et B57 pourraient en effet être tous deux résistants à l'infection mais porter un allèle différent au locus QTL.

Cependant, l'absence du QTL dans le croisement A2A36 peut suggérer une autre hypothèse : si l'on exclut que la puissance de détection est trop faible compte tenu de la mortalité finale du lot, cela signifie que la différence de résistance entre les deux lignées

n'est pas expliquée par le locus QTL SHV. Or, la présence du QTL dans le croisement A36A3 suggère que les lignées A2, B57 et A36 possèdent le même allèle de résistance au QTL. La sensibilité des poissons A36 serait alors expliquée par un autre locus ailleurs dans le génome. Un autre résultat va dans le sens de cette hypothèse. Les poissons de deuxième génération issus de grand-parents B57 et A2 (2 résistants) ont une survie finale d'environ 50% après infection par le VSHV, et on ne retrouve pas le QTL du GL31 dans ce croisement. Là encore, on peut supposer que B57 et A2 possèdent le même allèle de résistance au QTL, et que d'autres régions du génome, à l'état hétérozygote dans l'hybride, confèrent une sensibilité accrue au virus. Il serait dans ce cas intéressant d'élargir le génotypage des individus à un jeu de marqueurs couvrant l'ensemble du génome afin de déterminer à quel endroit se trouve le/les locus de sensibilité. Les marqueurs entourant les QTL secondaires décrits dans le chapitre précédent constituent les premiers candidats pour une approche de ce type.

De manière générale, il serait également intéressant de multiplier les croisements entre lignées afin de vérifier la présence du QTL dans un maximum de fonds génétiques. En particulier, le croisement B57A36 (pour la comparaison avec A2A36) permettrait de disséquer la région concernée dans les poissons A36. Le croisement de poissons B3 ou A32 (deux autres lignées résistantes) avec la lignée sensible de référence A3 permettrait également de vérifier que le locus QTL SHV est également primordial pour la résistance de ces lignées.

Cette étude nous a également permis d'en savoir un peu plus sur les mécanismes sous-jacents responsables de la résistance. Ainsi, même après infection du virus par injection, l'effet du QTL sur la résistance est conservé, indiquant que le gène responsable et la mutation causale ne sont pas spécifiques des cellules de la peau ou des muqueuses. Le QTL étant maintenant borné, il sera possible de commencer à explorer son contenu en gènes, à la recherche de gènes candidats potentiels pertinents dans la résistance aux viroses. La présence de certains gènes de *Toll-like receptor* dans la zone est déjà une première piste à explorer (Palti *et al.*, 2010). C'est une première étape vers la découverte du gène et de la mutation causale responsable des variations de résistances au VHSV observées dans nos familles.

Eléments complémentaires

Les croisements avancés : confirmation des bornes du QTL

Parallèlement à la cartographie du QTL par la voie mâle, des études exploitant des croisements avancés issus des premières familles QTL avaient été entreprises pour tenter de borner le QTL par cette approche. Une femelle de la famille DH-F00 (chapitre 4) choisie pour son génotype homozygote R2R2 (allèle de la grand-mère résistante) pour les marqueurs proches du QTL a donc été croisée avec un mâle homozygote de la lignée A3 (sensible). Une des femelles issues de ce premier croisement (C1) a ensuite également été croisée avec un mâle A3, donnant des descendants C2. Ces croisements en retour successifs avaient pour but d'induire des recombinaisons dans la région du QTL et de réduire la zone d'intérêt par analyse de la descendance d'individus supposés hétérozygotes au QTL compte tenu de leur génotype aux marqueurs de la zone.

En l'absence d'information sur la dominance des allèles R2 et S2 présents dans cette généalogie, nous avons fait l'hypothèse que nous nous adressions aux mêmes allèles que dans le croisement B57 et A3. Dans cette hypothèse, les allèles de sensibilité sont dominants, et le génotype R2B57 confère une forte résistance. Ainsi, 3 mâles de la génération C2 ont été sélectionnés en fonction des disponibilités et de leur génotype à différents marqueurs (Figure 26)

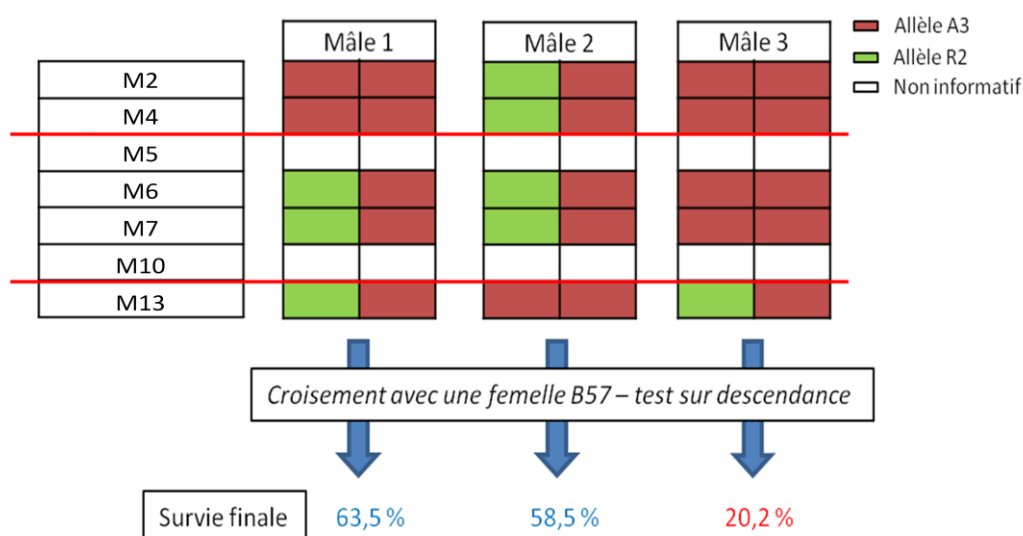


Figure 26. Génotype des mâles sélectionnés aux marqueurs proches du QTL SHV. La descendance de ces mâles croisés avec une femelle B57 est infectée avec le VSHV 07-71 (test sur descendance).

Ils ont ensuite été croisés avec une femelle B57, et leurs descendants ont été infectés par balnéation par le VSHV 07-71 sous les hypothèses suivantes, supposées après l'observation des précédents résultats :

- Si le mâle sélectionné est hétérozygote (R2A3) au QTL, alors la survie des descendants de son croisement avec un poisson résistant B57 devrait être de plus de 50% (comme par exemple les individus back-cross B57A3 ou B57A22)
- Si le mâle sélectionné est homozygote (A3A3) au QTL, alors la survie des descendants de son croisement avec un poisson résistant B57 devrait être inférieure à 25% (soit à peu près la survie des générations F1 issus de croisements entre poissons très sensibles et très résistants).

Ces hypothèses supposent donc que l'effet du QTL sur la résistance ou la sensibilité au VSHV est comparable dans les différents fonds génétiques (A3, B57, R2...).

Les survies finales des descendants des croisements issus des trois mâles sont indiquées Figure 26. Les mâles 1 et 2 (survie supérieures à 50%) ont donc été supposés hétérozygotes au QTL, ce qui exclut de la zone du QTL les marqueurs M2, M4 (le mâle 1 est homozygote A3A3 pour ces marqueurs) et M13 (le mâle 2 est homozygote A3A3). Comme la survie des descendants du troisième croisement était de 20%, le troisième mâle est supposé homozygote A3A3 au QTL, ce qui confirme que M13 est hors de la région. Celle-ci est donc désormais bornée par les marqueurs M4 et M13.

Ces résultats complémentaires ont permis de confirmer les bornes du QTL et ont montré l'intérêt des croisements avancés dans la caractérisation du QTL. Avec les descendants des croisements présentés au chapitre 5, il sera également possible de mettre en place ce type de démarche et espérer ainsi statuer sur le cas des marqueurs proches non informatifs dans le premier croisement étudié (M5 et M10).

Première exploration de la région QTL : une zone riche en gènes de l'immunité (Genêt, non publié)

Si le génome de la truite arc-en-ciel n'est pas encore disponible, nous avons à notre disposition un certain nombre de données de séquences, en particulier une banque de BACs. L'analyse des BACs localisés dans la zone a montré qu'ils contenaient de nombreux gènes impliqués dans l'immunité innée antivirale. En effet, la présence des gènes *tlr7* et *tlr8a* déjà publiée (Palti *et al.*, 2010) a été confirmée. Des gènes de la famille des *crfbs* ont également été retrouvés : *crfb1*, *crfb2* et *crfb5*. Ces gènes codent pour les sous-unités des récepteurs des IFN ϕ s. Le gène codant pour une sous-unité des récepteurs des IFN γ s (IFNGR2) est aussi présent dans un des BACs. Un gène de la famille des TRIM ainsi qu'un gène impliqué dans le complément (C1q like) ont également été identifiés. Cette zone est donc particulièrement riche en gènes de l'immunité innée et en particulier de la voie IFN. L'analyse fonctionnelle de ces voies dans les différents fonds génétiques nous permettrait de tester la pertinence de ces gènes candidats positionnels.

Développement d'un modèle in vitro pour l'étude des mécanismes de résistance

Nos études de détection de QTL ont montré l'intérêt de ce type d'approche pour la compréhension des mécanismes sous-jacents. En parallèle de ces résultats, nous avons développé un modèle *in vitro* de lignées cellulaires à partir des lignées isogéniques de truites arc-en-ciel. Parce qu'elle est un bon moyen de tester les voies moléculaires impliquées dans la variation des caractères observés, cette approche fonctionnelle nous a permis d'appréhender sous un autre angle les mécanismes de résistance au VSHV chez la truite arc-en-ciel.

Chapitre 6.

**Développement d'un modèle
cellulaire pour l'étude des
mécanismes moléculaires de
résistance au VSHV.**

Objectifs

L'objectif de cette approche était de caractériser la réponse antivirale dans les différents fonds génétiques au niveau cellulaire. Comme le QTL oriente vers des mécanismes innés, l'étude de ces mécanismes à l'aide d'un modèle cellulaire peut se révéler particulièrement intéressante. Dans la littérature, la lignée cellulaire établie de truite arc-en-ciel de référence est la lignée RTG-2 (pour *rainbow trout gonads*), dérivée d'ovaires (Wolf et Quimby, 1962). Les cellules en culture sont des fibroblastes. À partir d'ovaires de poissons issus des lignées isogéniques précédemment décrites, nous avons donc dérivé des lignées cellulaires fibroblastiques qui ont été établies après quelques passages cellulaires (Figure 27). Les fibroblastes étant un type cellulaire très répandu dans le corps des poissons (y compris dans la nageoire), l'utilisation de ces lignées dans notre étude était justifiée.

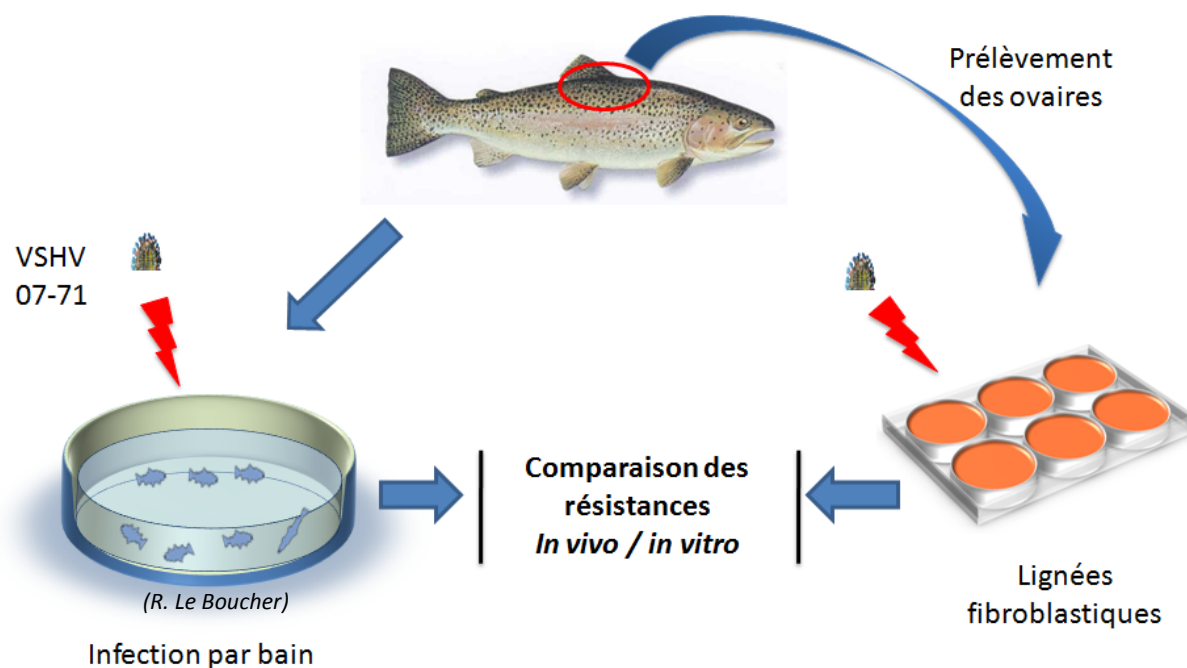


Figure 27 : Production de lignées cellulaires à partir d'ovaires de truite arc-en-ciel.

Dans ce chapitre sont présentés les premiers résultats de l'utilisation du modèle cellulaire pour comprendre les différences de résistance entre les fonds génétiques.

Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status

Eloi Verrier, Christelle Langevin, Corinne Torhy, Armel Houel, Vincent Ducrocq, Abdenour Benmansour, Edwige Quillet et Pierre Boudinot

PLoS ONE 7(4): e33935. doi:10.1371/journal.pone.0033935

Introduction

Only a fraction of individuals infected by viruses show clinical disease, and epidemiological evidences have established that the host genetic background plays an important role in the susceptibility to infections, explaining a significant part of the clinical variability observed within populations. In human, the interest for the genetic bases of resistance and predisposition to viral infections has dramatically increased during the last years (reviewed in [1]). Monogenic resistance to viruses has been demonstrated, generally involving mutations in receptors such as CCR5 for HIV1 [2-4], erythrocyte P antigen for the parvovirus B19 ([5]), or in genes controlling the receptor expression such as the fucosyltransferase (FUT2), which is required for the expression of norovirus ABH co-receptors [6]. In fact, predisposition to viral diseases mirrors the resistance and contributes to the variability of their prevalence within populations. Such predispositions may concern multiple infections when the mutation induces a general immune defect: typical genetic predispositions to multiple infections are due to global primary immunodeficiencies, which are generally rare and usually affect hematopoietic cells like in SCID and XLA [7,8]. On the contrary, a mutation may enhance the susceptibility to a single virus as in the well-studied example of the skin warts and cancer induced by HPV infection in individuals with a mutated cellular zinc regulator [9]. In fact, single gene based predispositions cover a large continuum between these extreme situations depending on the affected pathway, the range of expression of the mutated gene, and other factors such as the age of the host. Thus, *trim5 α* is responsible for the restriction of different retroviruses in non human primates through capsid targeting [10], reviewed in [11]. Host susceptibility to viral infections may also depend on several genes with a higher impact of environmental factors. A traditional distinction is made between single gene based predisposition to rare infections and complex predisposition to common infections within populations [1]. Such complex situations of inheritance are modeled by the so-called “polygenic model of inheritance” [12]. However, in many cases a “major gene” or a “major locus” can be responsible for a significant part of the variability of complex traits including many phenotypes of variable susceptibility to infections. Such major genes (or loci) have been identified for viral disease using polymorphic markers in genome wide linkage analysis. Thus, several polymorphisms including MHC haplotypes have been recently involved in the host control of HIV-1 by a

large-scale study [13]. Overall, the genetic determinism of viral diseases in human is still poorly known.

The basis of genetic resistance and susceptibility to viral infections in domestic animals is not better understood, although the scale of modern farming has led to a situation where herds are affected by a few diseases of which the consequences can be dramatic. Selection of domestic animals usually focused on improving production efficiency while keeping a reasonable general fitness. Mutations that confer strong predisposition to multiple infections have certainly been counter-selected, but many important domestic breeds are very vulnerable to well-adapted viruses. Genome wide analyses have been performed in species where the genetic tools (such as dense genetic maps) are available, in order to understand the basis of resistance to diseases. However, major genes have been identified for only a few infections. For example, a strong association between Marek's disease susceptibility and the chicken MHC has been firmly established [14,15], but a significant part of the genetic susceptibility to this herpes virus infection is explained by other loci that encode lymphocyte surface antigens of unknown functions. In cows, a *trim* gene related to the TRIM5/TRIM6/TRIM34 group was identified as a restriction factor for different retroviruses [16]. In fish, genetic control of the resistance to viral diseases has been reported in many species. Within domestic salmonids populations, wide ranges of susceptibility have been observed for many viruses including Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VSHV), the Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV), Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV)[17-21] in rainbow trout, and for Salmon Pancreatic Disease Virus (SPDV) [22], ISAV [23] and IPNV [24] in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In common carp (*Cyprinus carpio* L.), strains more or less susceptible to CyHV-3 have been reported [25,26], the resistance to the SVCV associated to dropsy was improved by selection [27]. Another example of large intrapopulation variation in resistance to viral diseases has been reported in Atlantic cod (*Gadus morhua*) for the nervous necrosis virus (NNV) [28].

Genome wide analyses have been carried out in some cases, and QTL or major genes for the resistance to several viruses have been identified [29,30,16,31,32,33]. In particular, in Atlantic Salmon a major QTL explaining 83% of the genetic variance was identified, which indicates that the resistance to IPNV is in this case almost a monogenic resistance [32]. Even if the mechanisms of resistance or predisposition have not been discovered so far, these

results show that, as in mammals and birds, there is a strong genetic control of the resistance to viruses in fish. We previously reported a wide range of variation of susceptibility to the rhabdovirus Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) between gynogenetic fish clones [21]. Within such clones, fishes are homozygous at every locus and fully histocompatible, constituting a propitious genetic context for studying fish response to pathogens [34,35]. In particular, it is much easier in this context to distinguish allelic variants of a single gene from duplicated genes that are numerous in salmonids, owing to the whole genome duplication experienced in their early evolution [36,37].

VHSV is a novirhabdovirus with a single strand RNA genome of negative polarity encoding five structural proteins (N, P, M, G and L) and the non structural NV protein specifically expressed in the novirhabdovirus genus [38-41]. The viral glycoprotein (G) is the unique protein expressed at the surface of the viral particle and triggers attachment of the virus to target cells via recognition of cellular receptor; endocytosis and pH-dependent fusion of the viral membrane to the endosomal vesicle. Release of the nucleocapsid initiates transcription/replication of the viral genome catalyzed by the polymerase complex. The neosynthesized RNA genomes will further serve as templates for viral replication or be encapsidated to allow budding of viral neoparticles at the cell surface. VHSV is highly cytopathic and induces the apoptosis of the infected cell, which is mediated by the matrix protein [42].

During the viral cycle, intermediates of replication (ds RNA and 5'-triphosphate RNA) can be recognized by cytoplasmic RNA sensors of the RIG-I (retinoic acid inducible gene –I) family, including in fish a RIG-I protein [43] as well MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5) and laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) homologs [44]. Activation of these sensors triggers their interaction with the key adaptor Mitochondrial AntiViral Signaling (MAVS) leading to the recruitment of distinct kinases and triggering dedicated signaling pathways [43]. The following phosphorylation of the transcription factors NFkB and IRF3 induced their translocation and the production of IFN [43,45]. Virus induced fish interferons – named IFN ϕ – are structurally and functionally very similar to type I IFN [46,47] and induce many conserved effector genes [48], but they differ from mammalian type I interferons by the presence of introns in their genes [49,50] and the structure of their

receptor [51,52]. Additionally, IFN ϕ expression can be induced through TLR (Toll like receptor) pathways [53]. In fish, TLR3 has been reported in endoplasmic reticulum where it binds small size ssRNAs while TLR22 is expressed at the cell membrane and recognizes long dsRNAs [54]. These TLRs recruit TIR containing adaptors (TICAMs) and trigger IRF-dependent IFN ϕ production. Finally, IFN ϕ binding to their cognate receptors results in the activation of JAK/STAT canonical pathways and subsequent induction of many interferon stimulated genes (ISG), some of which having a known anti-viral activity like Mx, PKR, ISG15 or Vig-1/viperin. Thus, as in mammals, teleost fish antiviral innate immunity is based on interferons and on a large diversity of interferon stimulated genes (ISGs) ([48], reviewed in [55]). Teleost fish also mount antigen-specific B and T cells responses against viruses [56], which afford a strong protection based on neutralizing antibodies. However, the relative contribution of intrinsic and adaptive mechanisms in the genetic resistance to VHSV is still poorly understood.

In the present work, we demonstrate that the susceptibility to VHSV infection of fibroblast-like cell lines derived from each fish clone is strictly paralleled to the resistance levels assessed *in vivo* in the parent/birth clones to waterborne infection, indicating that predominant mechanisms involved should be intrinsically active in every cells rather than systemic. We characterized this relationship and we took advantage of the system to show for two highly resistant genetic backgrounds, that different mechanisms of virus restriction are involved.

Material and methods

Fish and cell lines.

Rainbow trout belonging to six homozygous clones (B57, A2, B45, A36, A22 and A3) were used [21]. Clones were established after two successive generations of gynogenetic reproduction and further maintained by within-clone single pair mating using sex reversed (XX) neomales [21]. Every next generation, every breeder (male or female) was checked for homozygosity and isogenicity using allelic variation at 10 polymorphic microsatellite

markers. Fish were reared in the INRA experimental facilities (PEIMA, Sizun, for breeders, and IERP, Jouy-en-Josas, for infectious challenges).

Rainbow trout cell lines were derived from the six different fish clones as described for the RTG-2 cell line. After fish have been sacrificed by overexposure to 2-phenoxyethanol diluted 1/1000, ovary was extracted, then trypsinased under constant mild shaking for 2 hours. The supernatant was collected in modified Mac Pherson Stoker Eagle's medium (Eurobio) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 IU.mL⁻¹ penicillin and 100µg.mL⁻¹ streptomycin. The cell suspension was centrifuged for 5 minutes at 1000 g, and cells resuspended in culture medium at 20°C in a P24-well plate.

Ethics Statement

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and by the Regional Paris South Ethics committee, and all animal work was approved by the Direction of the Veterinary Services of Versailles (authorization number 78-28).

Cells and fish infections with virus

The strain 07-71 of VHSV (serotype 1) and the strain VR-299 of Infectious Pancreatic Necrosis Virus were used [57,58]. Cell monolayers were incubated with virus at different MOIs for 1h at 14°C in medium containing 2% of FCS. The virus suspension was then replaced with fresh media with 2% FCS and cells kept at 14°C. Poly I:C from Sigma (P9582) was used for IFN induction.

Fish from five of the six clones had previously been tested against the VHS virus [21]. For the purpose of this study, an additional fish clone (B45) was challenged in the same conditions, while control challenges were performed at the same time with the other five fish clones. For waterborne infection, fish were incubated with 10⁵ pfu per ml at 10°C for two hours, then kept in UV treated recirculating water.

Fin explant cultures.

Fin explants were cultured following the protocol previously published in [59]. Two experiments were performed independently, depending on the availability of the fish: B57, A2 and A3 on one hand, and A36, B45 and A22 on the other hand. Fin explants were infected 24h post sampling at the same virus concentration (depending on the size of the fin, this represented $8 \cdot 10^3$ pfu per mg of tissue for the first experiment and $2 \cdot 10^3$ pfu per mg of tissue for the second one). Fins were crushed in culture medium and the viral titer measured 4 days post infection.

RNA extraction and cDNA preparation

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen), then purified using the RNeasy mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions, and exposed to DNase treatment. RNA samples were then checked using Agilent Nano Chips and stored at -80°C .

Reverse transcription was performed on 1 μg of total RNA using 125 ng of random hexamer primers (Roche), using the Superscript II Reverse transcriptase kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Real Time PCR

The level of gene expression was measured by real time PCR with a Realplex² Mastercycler Instrument (Eppendorf) using Power SYBR[®] Green PCR Mastermix (Applied Biosystems). Each sample is composed by 5 μL of primers (300nM each), 5 μL of cDNA (diluted 1/10) and 10 μL of PCR Mastermix. Samples were first incubated for 2 minutes at 50°C and for 10 minutes at 95°C , then subjected to 40 amplification cycles (95°C for 15 and 60°C for 1 minute), followed by 15 seconds at 95°C , 15 seconds at 60°C , 20 minutes from 60°C to 95°C and finally 15 seconds at 95°C , to establish the melting curve of PCR products. Gene expressions were computed according to the ABI Prism 7700 user bulletin (Applied

biosystems) and normalized to the beta-actin expression level. Primers used for QPCR are indicated in Table 11.

Table 11 : qPCR primer sequences

Gene (Reference for published primers)	Sequence (5', 3')
shIFN ϕ 1 (45)	GCGAAACAACTGCTATTTACAATGTATA TCACAGCAATGACACACGCTC
IFN ϕ 1 (45)	CACGCGAAGTTATTAGCAGTTGAA AAATTATAGTTGAACCACAATGAAATATTATTC
Mx1 (46)	GGTTGTGCCATGCAACGTT GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT
Mx3	GATGCTGCACCTCAAGTCCTACTA CGGATCACCATGGGAATCTGA
VHSV-N	CCTGGTGAACAGGTGTCCTT TTCATAGAGGGGGTTTGCAC
gRNA _{VHSV}	CAAATTACGGGATTCCGATG TGTGATCATCTCACGGAGGA

Evaluation of cell monolayer destruction with crystal violet coloration

Cytotoxic effect of viral infection was correlated to cell destruction, evaluated at different times post- infection. Following viral infection and plaque formation, cell monolayers were fixed with 10% Formol for 1 hour at room temperature, then colored with a solution of 1% crystal violet in ethanol for 1 hour at room temperature and washed with tap water.

Evaluation of cell monolayer destruction with DAPI coloration.

Cell monolayers were infected as previously described and fixed after virus absorption or 3 days post-infection in 4% paraformaldehyde. Cell were then permeabilized with 0.2% Triton X100 before treatment with nuclear marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (SIGMA). Quantification of cell nuclei was then performed from images acquired with 10X objective on a Zeiss Axio Observer-Z.1 microscope by IMAGE J software automatic analysis.

Plaque assay

Titers of infectious virions were measured by plaque assay on monolayers of EPC cells. Supernatants were collected, and serially diluted in duplicates for the plaque assay. The infection was performed at 14°C under a layer of methylcellulose (0.75% final concentration) for three days after an adsorption step at 14°C for one hour in liquid phase. The plaques were then counted after treatment by formaldehyde (10%) and staining using crystal violet (1% final dilution).

Western Blot

Clones cells or EPC were transfected with N_VHS cDNA kindly provided by Stephane Biacchesi (INRA, Jouy en Josas). Cells were washed in PBS before lysis in buffer (Tris pH8 50mM, EDTA 5mM, MgCl₂ 15mM, NP40 1%, NaCl 150mM) supplemented with a protease inhibitor cocktail (complete EDTA free, Roche). After a short centrifugation (1000 rpm, 5min.), 50µg of cell lysate proteins were methanol precipitated for 1 hour at -20°C before centrifugation at 12,000 rpm for 30 min. Pellet were resuspended in sample buffer before analysis by SDS PAGE in 4-12% Nupage gels (Invitrogen) and electrotransfer onto nitrocellulose membranes (Biorad) stained with red ponceau before treatment with anti-N_{SHV} monoclonal antibody (34F5) and secondary anti mouse antibody coupled to horseradish peroxidase. Immunoreactivity was visualized by enhanced chemiluminescence (GE, Healthcare).

Ranking of trout clones for in vivo susceptibility to virus (Survival Analysis)

In order to compare accurately the *in vivo* susceptibility of the six fish clones, we combined in a single dataset the results of the previous challenges [21] and those of the additional ones (this study). Thus, data from 9 independant waterborne VHSV experimental infections and a total of 5166 fish were available. The surviving status (dead or alive at the end of the challenge) and the time to death of each fish (in days after infection) were registered.

Surviving fish correspond to 'censored' observations, *i.e.* that the expected event (death) was not recorded during the observation period. Survival analysis models allow the joint analysis of censored and non censored data. As they take into account both end survival and the kinetics of mortality, they provide an accurate ranking of the susceptibility (relative risk) of groups. The dedicated software named « The Survival Kit » [60] was used to calculate raw (Kaplan-Meier) estimates of the survivor curve $S_i(t)$ for each clone. A graphical test based on a plot of $\log(-\log S_i(t))$ vs $\log(t)$ showed that the hazard functions of the various clones were roughly proportional. Using the same software, relative risks were calculated using a Cox regression model [61].

Results

Resistant and susceptible fibroblastic cell lines from several trout clones

A collection of homozygous clonal lines of rainbow trout produced by gynogenesis showed a wide range of survival rate to VHSV infection [21]. To establish an *in vitro* system for the analysis of the resistance mechanisms, we derived several cell lines from the ovary of fish homozygous clones. Cell lines were derived from six fish clones, representing susceptible and resistant genetic backgrounds. After 1 month of culture we obtained pseudo-stable cell lines with typical fibroblast morphology (Figure 28A). To assess cell susceptibility to virus infection, we infected the cell lines at different MOIs. The RTG-2 cell line was used as a reference for hyper susceptibility (Figure 28B). In a first analysis, sensitivity to virus infection was assessed by observation of the cytopathic effect (CPE). Among the 6 cell lines, we could distinguish three classes of phenotypes: resistant (B57 and A2), susceptible (A36 and A22) or hyper- susceptible (A3 and B45). To better characterize the cytopathic effect (CPE), we evaluated the cell death triggered by virus infection (MOI 1) three days post-infection. While no cell death was recorded in B57 and A2 cell lines upon exposure to the virus, the destruction rate reached 87% and 92% for cell lines A3 and A22, respectively. A36 and B45 cell lines showed intermediary phenotypes with 70% and 50% of destroyed cells after infection (Figure 28C).

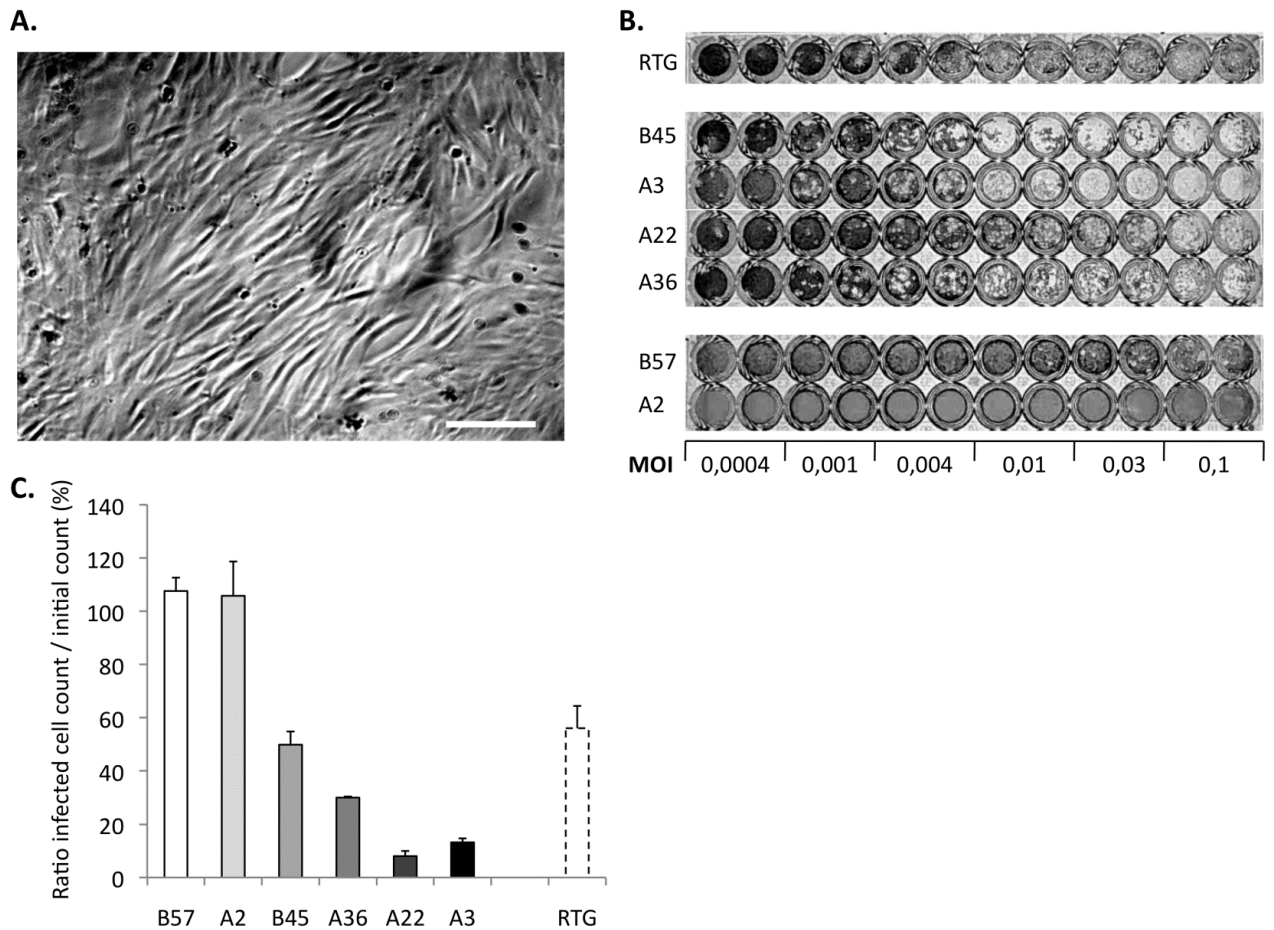


Figure 28. Fibroblastic cell lines from double haploid fish clones show different susceptibilities to VHSV infection. (A). Fibroblast-like cells from the B57 line. Bar 50 μm . (B): Monolayer destruction 3 days post infection with different MOI of VHSV. Cells were incubated 3 days with the virus inoculum, then fixed and colored with crystal violet. (C) Quantification of CPE after VHSV infection (MOI 1): cells were infected as indicated in Materials and Methods, colored with DAPI 3 days post infection, and nuclei counted using the ImageJ software. Three independent infections were performed. Results are shown as ratios of cell counts in infected wells to cell counts before infection. This ratio may be >1 when cell growth occurs after infection in the absence of cytopathic effect.

Thus, the different cell lines derived from fish clones provided a set of culture systems with a large range of divergent susceptibility to the VHSV infection.

Early expression of viral N mRNA is correlated to later CPE and viral production

Virus production was first evaluated through viral titration experiments in the different cell lines 48h, 72h or 96h post infection at a MOI 1 (Figure 29A). The resistant cell lines B57 and A2 did not produce any virus (Figure 29A). In contrast, the highly susceptible

A22 cell line showed a strong virus production. The sensitive A3 cell line also supported a strong increase of the virus titer between 48 and 96 hours post-infection in accordance with their susceptible phenotype, while B45 and A36 lines presented an intermediary phenotype, with a delayed and lower increase in virus titer. The RTG cell line that has been kept in culture for a long time - more than 100 passages - shows a high virus production, as expected from previous observations.

To further characterize the early steps of viral infection in the different cell lines, the amount of viral N transcripts was quantified using real time RT-PCR analysis at 4 hours post-infection (MOI 1) (Figure 29B). Since the gene encoding the N protein is the first and the most expressed from the VHSV genome, these experiments provided a rough assessment of the efficiency of the first steps of the virus replication cycle. As shown in figure 29B, we observed different phenotypes well consistent with the pattern of virus production (Figure 29A) and the CPE shown in Figure 28. While A3 and A22 cell lines presented significant amounts of N transcripts as early as 4 hours post infection, very low levels were detected in B57 and A2 resistant cell lines at this time. Intermediate values were found for cell lines previously mentioned as moderately susceptible to the virus. Unexpectedly, the expression of N transcript in the susceptible RTG cells was still rather low at 4 hours post infection, while the virus production is very high at later time points.

Finally, the viral N protein can only be detected in the most susceptible clones (A22 and A3) and one intermediary (B45) cell lines by Western blot analysis. In contrast, we were not able to detect viral N protein expression in the resistant clones (A2 and B57) even upon longer time of exposure (data not shown). Protein loading control was performed by red ponceau staining of the nitrocellulose membrane (Supplemental Figure 4, Annexe 1, p241). While no protein can be detected after 1 hour of virus absorption, a drastic difference was observed between resistant and susceptible cells after 48 hours of infection. This result was in good accordance with the amount of N mRNA measured 4 hours post infection (Figure 29C).

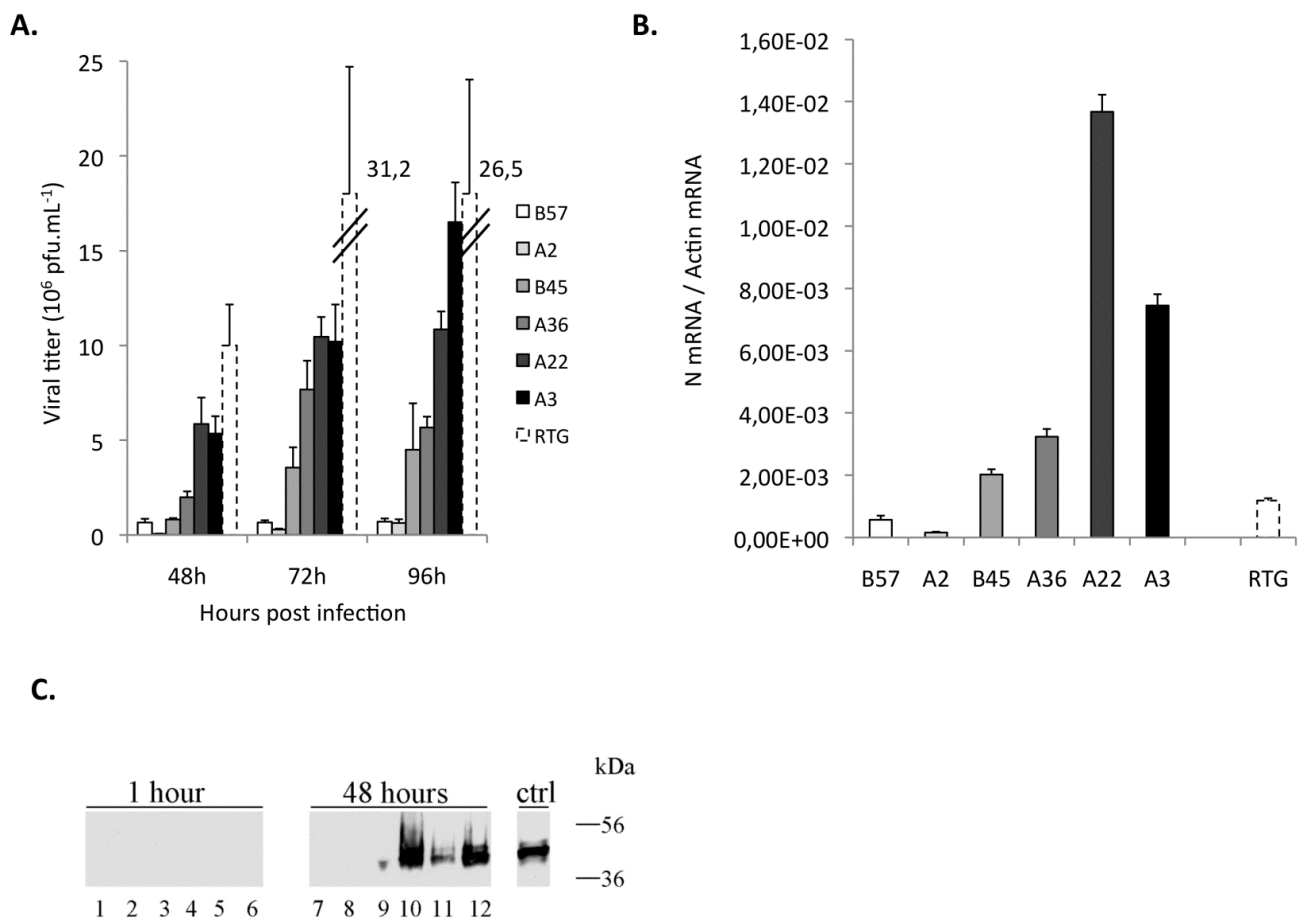


Figure 29. Viral titer, production of N transcripts and protein by the different cell lines. (A) The viral titer in cell supernatant 2, 3 and 4 days post infection with VHSV at MOI 1 was measured by plaque assay using EPC cells. Two independent lines for each genetic background were tested in the experiment, and the plaque assays operated in duplicates. (B) Expression of the N viral transcript 4 hours post infection by VHSV at MOI 1 was measured using qPCR. Transcript copy numbers were normalized to the β -actin expression (measured ratio of VHSV N mRNA / actin mRNA). Mean values of triplicates are shown. (C) Visualization of the N viral protein by Western Blotting. Infected cell lysates were treated with anti-NSHV monoclonal antibody (34F5). **1 hour:** cells were incubated with VHSV 07-71 during only one hour and lysates prepared for western blotting. (1): B57 (2): A2 (3): B45 (4): A22 (5): A3 (6): RTG. **48 hours:** cells were infected as described in Material and Methods, and lysates prepared 48 hours post infection for western blotting. (7): B57 (8): A2 (9): B45 (10): A22 (11): A3 (12): RTG. **Ctrl:** EPC cells transfected with NSHV cDNA.

Thus, the assessments of virus infection at the different stages were well correlated, either at the early time points through viral gene transcription analysis or later during the viral cell cycle (CPE and viral production). These observations suggested that the differences of susceptibility between cell lines are determined at least in part during the first steps of the infection.

Cell line susceptibility to the virus infection mirrors susceptibility of parental fish clones.

The mortality of the parental fish clones on day 40 post-infection was highly variable and revealed a vast diversity of resistance levels to the VHSV infection [21]. Susceptibility of the derived cell lines appeared to be in global accordance with the mortality rates of the parental fish clones after bath viral infection [21], and the most resistant cell lines A2 and B57 were derived from the fish clones with the lowest mortality. However, final mortality is only a rough indicator of the fish susceptibility, and we therefore calculated a quantitative index by performing a longitudinal statistical analysis of the kinetics of fish mortality. Using the “Survival kit” software [60], we first estimated the raw survival function of each clone (Figure 30A). A statistical analysis of the kinetics of mortality based on a simple Cox proportional hazards model was performed. Choosing the most resistant clone (*i.e.* B57) as a reference, the different fish clones could be ranked according to their relative risk defined as the exponential of the estimate of the clone effect in the Cox model (Figure 30B). Ability of the respective derived cell lines to produce virus 96h post-infection appeared to be highly representative of the relative risk of the fish clone from which they originated. Both viral production (Figure 30C) and N mRNA level (Figure 30D) were remarkably correlated to the *in vivo* clones susceptibility (coefficient of correlation was 0.85 and 0.99 respectively). This excluded that a systemic immune response would be the main factor determining the resistance level of fish clones. Similar phenotypes were observed with additional cell lines produced from other fish individuals of the same clones (data not shown). Thus, the susceptibility of the fibroblasts is highly representative of the susceptibility of the fish from the same genetic background, which indicates that the resistance is based on intrinsic or innate mechanisms still acting in the isolated fibroblastic cell lines.

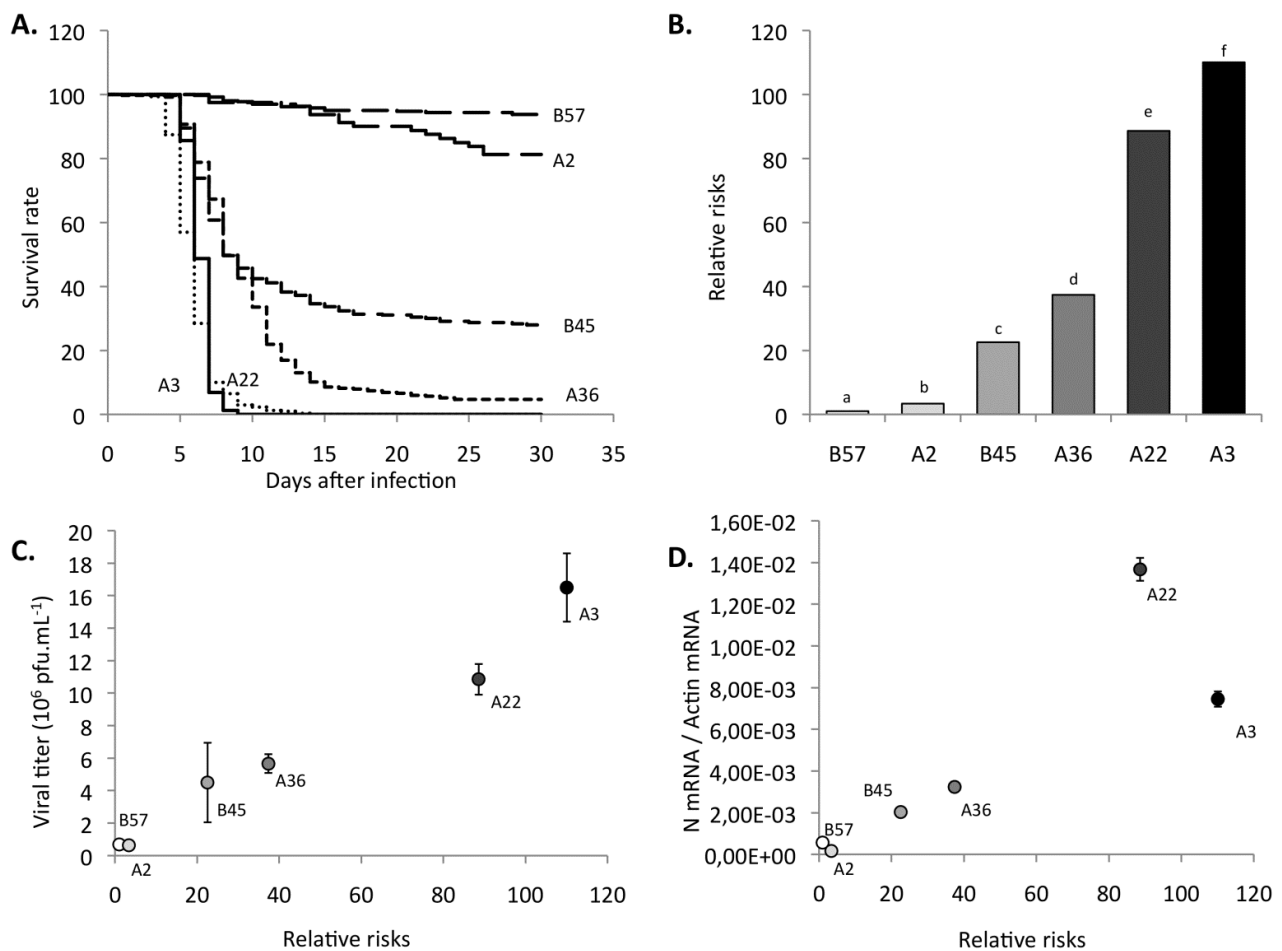


Figure 30. The susceptibilities of fish clones and cell lines to VHSV infection are highly correlated.

(A) Kaplan-Meier estimation of survival function for every fish clones. This estimation is calculated from the 9 independent waterborne infections with VHSV corresponding to 5166 infected fish (including data from (49)). (B) Relative risks relative to the B57 clone ($R=1$). Relative risks are estimated from the same dataset as above using survival kit. The program also computes a χ^2 test between each clone pair. Letters above each column design a clone significantly different from all the others. All paired tests indicated statistically significant differences between clones. (C) Correlation between risks of fish clones and viral production 96 hours post infection. Linear regression: $R=0.99$. (D) Correlation between risks of fish clones and N viral gene expression 4 hours post infection in cell lines. Linear regression: $R=0.85$.

This correlation was consistent with virus titration on fin explant cultures (Supplemental Figure 5, Annexe 1, p241). As for the fibroblastic cell lines, the virus production on fins kept in culture *in vitro* was high for susceptible A3 and A22 and lower for B57, A2, as well as for B45 and A36. These results showed that the cell response was not affected by the culture process and confirmed the good correlation between viral growth on fin explants and fish survival described in [59].

A2 and B57 cell lines express different resistance mechanisms.

Cell lines from the two resistant backgrounds (A2 and B57) constitute interesting models to dissect the genetic basis of the resistance mechanisms. Several lines of evidence suggested that the mechanisms responsible for the resistance to the virus were different in A2 and B57: (1) the final survival rate and the kinetics of fish mortality were significantly different for A2 and B57 as shown by the relative risk produced by the survival analysis (2) VHSV could be re-isolated from around 10% of the B57 infected fish (even if they showed no clinical sign) while it was never the case from the A2 animals ([21] & data not shown) (3) whereas no sign of infection was ever observed on A2 cell monolayer, a few plaques were present at high MOI for B57 cells (Figure 28B). To further compare the resistance of A2 and B57 cell lines to VHSV, we infected sub-confluent monolayers with the virus at MOI 1 and MOI 4. We observed no CPE on A2 cell line even at MOI 4, while the B57 monolayer was partially destroyed 72h post infection at MOI 4, but not at MOI 1 (Figure 31A). Accordingly, the viral production was minimal for both clones when infected at MOI 1 (as shown in Figure 29A). The viral titer in the supernatant of A2 and B57 infected at MOI 4 was determined at 24, 48, 72 and 96 hours post-infection (Figure 31B) and revealed a significant difference between the two lines: while the virus titer remained low (1.10^6 pfu/ml) for both cell lines during the first two days of infection, it reached $1.7.10^7$ pfu/ml at 72 hours for B57 while it was increasing slowly in A2 supernatant and was still below $3 \cdot 10^6$ pfu/ml at 96h post infection. In comparison, a titer over 10^8 pfu/ml was observed with the highly susceptible cell line A22 in the same conditions. These observations were consistent with the CPE observed on monolayers, and indicated that the mechanisms responsible for the high resistance of A2 and B57 cells to VHSV infection are different, qualitatively or quantitatively.

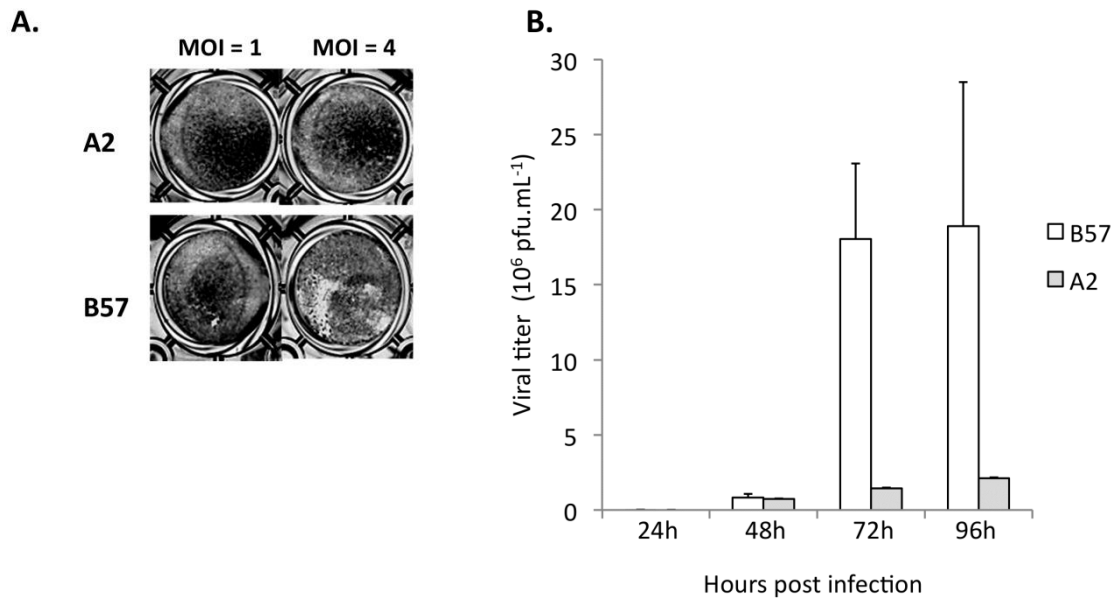


Figure 31. Different resistant phenotypes of cell lines A2 and B57. (A): viral production in cells infected by VHSV at MOI 4. Two independent infections were performed. Viral titer was estimated by plaque assay on EPC cells in duplicates. (B): CPE after VHSV infection at MOI 1 and MOI 4. Cells were fixed 3 days post infection and colored with crystal violet.

Early expression of IFN ϕ after VHSV infection only by the resistant cell line B57

IFN ϕ (also known as type I IFN) is the central mediator of the fish innate antiviral response and provided an obvious candidate for the explanation of the diversity of resistance among clones. To check that the IFN ϕ system was functional and supported antiviral activity in the cell lines, we verified that incubation with poly I:C prior to virus infection induced protection of cell monolayers in a dose-dependant manner, except for the A2 clone that never showed any CPE (data not shown). Since the level of N mRNA expression 4 hours post infection already mirrored the susceptibility level of cell lines, early mechanisms should be involved. To look for a relevant innate antiviral response participating to the resistance to VHSV, we therefore analyzed the early induction of IFN ϕ by the virus infection. In fish, the induction of IFN ϕ involves alternative splicing and promoter usage: in non-infected cells, the first in-frame AUG codon is located downstream of the leader peptide, and the constitutive IFN mRNA therefore encodes a non-secreted IFN devoid of leader peptide. Upon viral infection, another promoter is used downstream, and five exons are spliced together to yield a shorter mRNA encoding a functional secreted protein. This

additional regulation was first described in zebrafish [51] but has been later found in rainbow trout IFN ϕ 1 [20]. We therefore quantified the short IFN ϕ 1 (shIFN ϕ 1) transcript encoding a functional cytokine 4 hours post infection in all the cell lines (Figure 32A). At this early time point, we found a significant amount of shIFN ϕ 1 transcript only in the B57 cell line, suggesting that the IFN system is involved in the VHSV resistant phenotype of this particular genetic background. In contrast, no shIFN ϕ 1 mRNA could be detected in the other resistant A2 cell line, or in the susceptible cell lines. At this point, it was important to check that the effector pathways downstream of IFN ϕ were effective against the viral infection. To do so, we incubated cell lines with serial dilutions of poly I:C overnight before infection, and we observed the cytopathic effect induced by the virus (Supplemental Figure 6A, Annexe 1, p242). Our results indicate that poly I:C treatment is indeed inducing a full protection of susceptible cells at concentrations higher than 10 μ g/ml, confirming that at least part of the IFN pathway was effective downstream IFN. At higher dilutions, the destruction of the monolayer depended on the genetic background and was consistent with the susceptibility of cell lines previously described (Figure 28). Additionally, when the birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus was used in a similar experiment (Supplemental Figure 6B, Annexe 1, p242), the cell lines A3 and A22 appeared much more susceptible than B57 and A2 like after VHSV infection, suggesting that a general antiviral mechanism is involved. In contrast, B45 and A36 cell lines were fully resistant, which was indicative of other IPNV-specific mechanisms. All cell lines were protected after incubation with higher doses of poly I:C. Taken together, these results show that poly IC treatment induces a protection against viruses from different families in most cells lines, which is consistent with an implication of IFN.

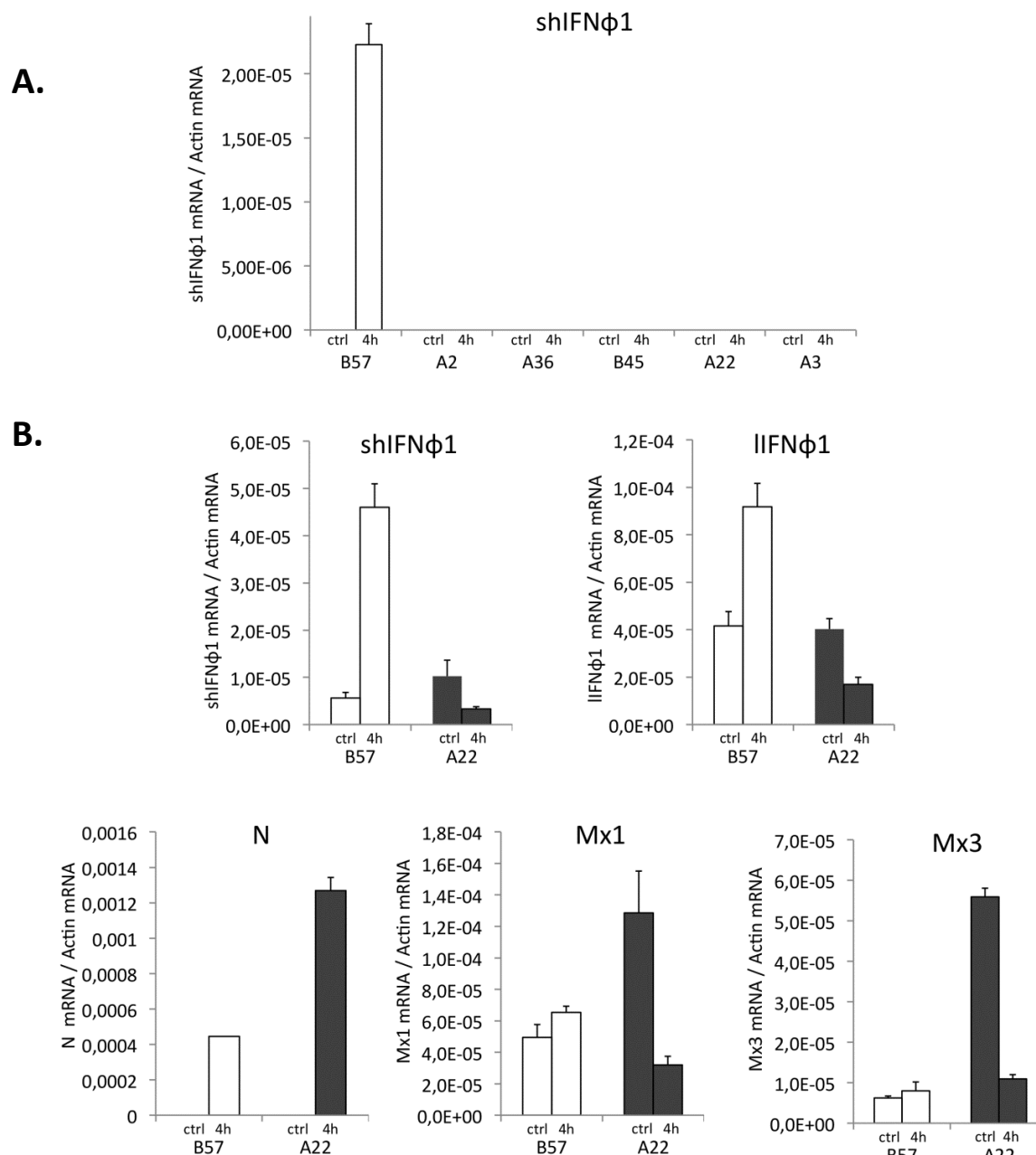


Figure 32. The resistant phenotype of B57 cells results from combined early IFN ϕ 1 and intrinsic immunity. (A): Expression of the functional IFN ϕ 1 (shIFN ϕ 1) in cell lines. Gene expression was measured by qPCR 4 hours post infection by VHSV (MOI 1) or in mock infected cells (ctrl). shIFN ϕ 1 transcript copy numbers were normalized on the β actin expression (measured ratio of mRNA of interest / actin mRNA). The mean of three experiments is shown. (B): Expression of IFN ϕ 1, Mx1 and Mx3 interferon induced genes and viral N mRNA in B57 and A22 cell lines. Expression was measured by qPCR 4 hours post infection or in control cells. Higher amount of template was used, allowing detection of the basic expression levels of the different genes. Primers used are presented in Table 11.

The resistant phenotype of B57 cells is partly based on intrinsic antiviral mechanisms

We further investigated the role of IFN ϕ in the B57 resistant phenotype, using one of the most susceptible clones (A22) as a control for comparison. Both shIFN ϕ 1 and mRNA

encoding the long isoform (lIFN ϕ 1) were both clearly induced in B57 cells 4 hours post infection (MOI 1). Interestingly, the induction of shIFN ϕ 1 mRNA was stronger than for lIFN ϕ 1, as observed in the zebrafish model [51]. Both IFN transcripts were down regulated in A22 cells, probably reflecting the virus induced shut-off of cellular RNA synthesis. The viral N transcript was much more expressed in A22 compared to B57 cells 4 hours post infection (MOI 1). To determine if this early difference could be due to effectors induced by IFN, we assessed the expression level of two typical IFN-induced antiviral genes, Mx1 and Mx3. While IFN ϕ 1 is already up-regulated 4 hours post inoculation, we did not observe Mx1 or Mx3 induction in B57 cells. Hence, a significant viral inhibition was observed in B57 cells shortly after infection when IFN-induced effector genes were still absent, suggesting the implication of an (early) intrinsic antiviral activity in addition to interferon-dependent mechanisms. In fact, both Mx1 and Mx3 were expressed in the non-infected B57 and A22 cells at low, slightly different levels (Figure 32B). Upon infection, both Mx1 and Mx3 mRNAs showed a down-regulation in A22 cells 4 hours post infection, as observed for IFNs. Mx genes are induced later, after expression of IFN (data not shown).

To check that the induction of IFN expression by the virus was delayed in A22 compared to B57, we measured shIFN ϕ 1 transcripts 4, 8 and 24 hours post infection (Figure 33). When cells were infected at MOI 1, the N mRNA reached a very high expression rate in A22 cells - more than twice the actin mRNA level at 24 hours post infection– and the shIFN ϕ was finally strongly up-regulated following the considerable virus production in these cells (Figure 33A). In contrast, the expression level of shIFN ϕ mRNA decreased at 24hours post infection in B57 cells (Figure 33A). At this stage, no CPE was observed, and the virus N transcript was expressed at a detectable but low level (Figure 33B) in B57 cells. Hence, the resistance of the B57 cells appears to be firstly due to an intrinsic component, in addition to the early induction of IFN.

To investigate the impact of this factor on the early replication of the virus, we quantified the viral genomic RNA in B57 and A22 cell lines using RT-QPCR primers located in two different ORF. Cells were incubated with the inoculum until harvesting to avoid any possible bias due to medium change after the adsorption step. We consistently observed that the total amount of genomic viral RNA (strand + plus strand -) decreased in B57 cells and increased in A22 cells between 2 and 6 hours post infection, suggesting that an early mechanism hampering viral replication arose in B57 cells (Figure 33C). Accordingly, the

expression level of the N mRNA followed the same trend (Figure 33D). In good accordance with the results shown above, we observed an up-regulation of the shIFN ϕ 1 induction only in B57 cells 6 hours post inoculation, but not change compared to the control in any cell line, 2 hours post inoculation (data not shown).

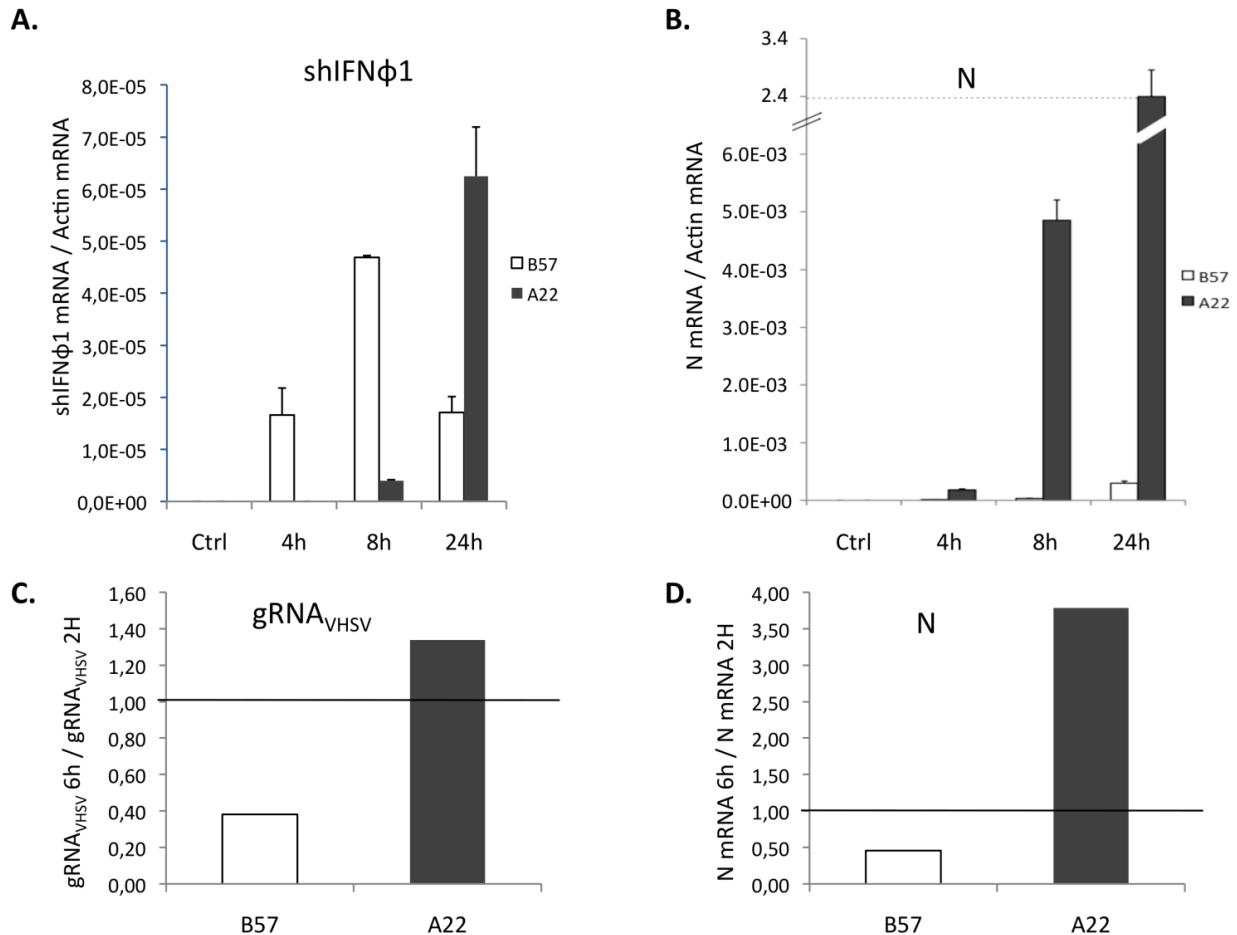


Figure 33. Early IFN- dependent and independent viral inhibition in B57 cells. (A): The expression of shIFN ϕ 1 transcript in A22 and B57 cells after VHSV infection was measured by qPCR 4, 8 and 24 hours post infection by VHSV or in mock infected cells (ctrl). mRNA copy numbers were normalized on β -actin expression (measured ratio of shIFN ϕ 1 mRNA / actin mRNA). The mean of three experiments is shown. (B): Expression of N viral gene in cells after VHSV 07-71 infection at different time. Expression of gene is measured by qPCR after 4, 8 and 24 hours of infection by VHSV 07-71 or without viral infection (ctrl). Gene expression is evaluated relative to β -actin expression (measured ratio of VHSV N mRNA / actin mRNA). The mean of three experiments is shown. (C): Viral genomic RNA (strand + plus strand -) was quantified using qPCR. The virus replication was assessed by the ratio of virus genome at 6h versus 2h post-inoculation. (D): The mRNA encoding the viral N protein was quantified in parallel and the ratio N mRNA 6hours post inoculation / N mRNA 2hours post inoculation is represented.

Discussion

In this work, we showed a remarkable correlation between the *in vivo* susceptibility to VHSV infection of isogenic clones of rainbow trout and the susceptibility of the cell lines derived from these animals. Our results demonstrated that the variation of susceptibility to the virus depends on the genetic background and that the major pathways responsible for resistance are independent of the specific immune response. We could establish that the resistant phenotypes are based on multiple precocious mechanisms, including the capacity to mount an early IFN ϕ response in some cases.

We directly demonstrated that the genetic basis for the resistance to the virus does not rely on the specific response and is most probably not linked to the MHC: the tight correlation of resistance between fish clones and their derived fibroblast-like cell lines points up the contribution of innate/intrinsic mechanisms. A strong association has been demonstrated between MHC haplotypes and the resistance to several viral infections including AIDS in human, Newcastle disease in poultry and ISA in Atlantic salmon, suggesting that T cell mediated immunity was involved. In rainbow trout, the susceptibility of fish families to VHSV was recently correlated to the expression of genes involved in adaptive immunity [62], which may be linked to a T-cell dependent synthesis of neutralizing antibodies [56,63]. However, several observations indicated that the resistance to waterborne rhabdovirus infection may rely on the innate immune response, in accordance with our results. Thus, Purcell and colleagues [64] described an association between the early viral load and the level of resistance to IHN in young rainbow trout families, suggesting that early antiviral mechanisms are pivotal for the host survival. In the same line, fish survival to VHSV waterborne infection was strongly correlated to the viral replication on excised fin tissue 24h after *ex vivo* infection [59], which was confirmed in this study with susceptible and resistant fish clones. This virus production assay on fin culture could even predict the susceptibility of the progeny of individual fish [21]. As fins have been shown to constitute the major entry point of the virus [65], the control of virus spreading in the early steps of infection appeared to explain partly the genetic resistance to the virus.

The susceptibility level of fibroblast-like cell lines could be determined by an innate antiviral response inducible by the infection, or by intrinsic cellular factors modulating the innate response or directly the viral cycle (entry, replication, assembly...). As in mammals,

the fish innate antiviral response is orchestrated by typical virus-induced IFNs - also known as IFN ϕ s with antiviral activity [46,49,52,66,67] and many interferon stimulated genes (ISGs) that are either conserved in all vertebrates (*ISG15*, *viperin*, *Mx*,...) [68,69-71] or specific to teleost fish (*fintrim*, *vig2*) [72,73]. Pre-stimulation with poly I:C indicated that the IFN system of each cell line was functional, since a certain dose of poly I:C could induce cell protection. Yet, this assay did not discriminate the impact of differential IFN induction and intrinsic cell factors. We therefore analyzed the early IFN ϕ 1 induction, since a key factor for the fate of the infection is the kinetics of IFN production. Only the resistant cell line B57 showed an early IFN ϕ 1 response, indicating that the mechanisms involved were different in B57 and in the other resistant cell line A2. In fact, a large repertoire of IFN ϕ has been discovered in Atlantic salmon [74], and the rainbow trout IFN ϕ diversity is rapidly expanding [66]. As the trout genome sequencing is still ongoing, the final trout IFN ϕ repertoire is not available and we could not directly rule out that A2 cells constitutively expressed IFN genes unknown so far. However, we did not detect any antiviral activity in the supernatant of A2 cells used in a plaque assay, further suggesting that these cells do not resist the virus infection through IFN production. In spite of the higher resistance of A2 cell line to the infection at high MOI compared to B57 and of the absence of virus in survivor fish, the A2 fish are significantly less resistant to the viral infection than B57 fish, suggesting that additional factors are important at the organism level. Interestingly, A2 fish are the most resistant of all clones to the infection by another fish rhabdovirus, IHNV. This higher resistance is especially marked to infections of fry weighing less than one gram, since B57 are still poorly resistant at this stage [21]. As fibronectin was shown to mediate the entry of both VHSV and IHNV in fish fibroblasts [75], it is tempting to speculate that an impaired virus entry in A2 cells may be involved in their resistance to rhabdovirus infection. The capacity of viruses to infect other cell types *in vivo* could modulate the resistance level at the organism level.

A significant contribution of early IFN response in the B57 phenotype was suggested by the diversity of viruses to which B57 shows a robust resistance: in addition to VHSV, the B57 cell line was resistant to IHNV and to a birnavirus, the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) (data not shown). Also, the B57 fish clone was one of the most resistant clone to the fish orthomyxovirus-like virus causing the infectious salmon anaemia, ISAV [19]. Taken together, these observations suggest that the B57 resistance involves a general mechanism inhibiting a wide range of viruses, which is very suggestive of an implication of the IFN

system. In fact, the level of IFN expression was already decreasing 24 hours post infection in B57 cells, when the virus had not succeeded to start a successful infection. Interestingly, the production of the viral transcript encoding the N protein was strongly impaired 4 hours post infection (MOI 1) in B57 cells, when the expression of effector ISGs such as Mx genes was still undetectable. Hence, the difference of resistance at this time could not be explained by the IFN response and ISGs, but rather by other cellular restriction mechanisms. Thus, the basis of the B57 resistance to viral infections appears to proceed from a combination of early IFN induction and intrinsic cell restriction mechanisms. The decrease of the amount of viral genomic RNA between 2 and 6 hours post infection in resistant B57 cells - in contrast to the susceptible A22 cells – suggest that the early viral replication is hampered in B57. We can imagine that this double line of defense contributes to the very strong level of resistance of this clone after *in vivo* infection.

Our results also showed differences of response between susceptible clones. Mortality kinetics during the infectious challenge were significantly different as shown by the relative risk. Differential cellular responses were observed both in term of viral production and CPE: for example, B45 cell monolayers were quickly destroyed by the infection at MOI 1, in spite of a viral production much lower than with A22 or A3 cells that was in agreement with the intermediate survival rate of fish after waterborne challenge. The A36 cell line was fairly susceptible to the VHSV infection, and A36 fish clones were susceptible to both VHSV and IHNV [21]. In contrast, this fish clone was among the most resistant to ISAV infection [19]. While B57 fish did resist the ISAV infection without clinical signs, A36 fish showed very clear exophthalmia, a swollen belly and lateral petechiae but generally survived, possibly through systemic antiviral mechanisms. The A36 cell line was also quite resistant to the birnavirus IPNV, suggesting that the responses triggered by different viruses were of different efficacies.

In conclusion, we have established a dual collection of double haploid fish clones and isogenic derived fibroblast-like cell lines spanning a wide range of susceptibility to VHSV infection. Cell lines susceptibility to the virus mirrors the susceptibility of parental fish clones, emphasizing the role of antiviral innate/intrinsic mechanisms. Thus, resistance and susceptibility to viruses involve multiple mechanisms, in addition to the interferon response. Progress in sequencing technologies and genomics promises fast advances for the coming

years, and further studies may reveal that new major genes confer a predisposition to many common diseases in different species from fish to human.

Acknowledgements

We thank Stéphane Biacchesi for the N_VHS cDNA clone, Jérôme Chappuis for his help with DAPI quantitation analysis, and Bernard Delmas for helpful discussions and advices. This work was supported by the Animal Health- and Animal genetics- divisions of the Institut National de la Recherche Agronomique.

References

1. Alcais A, Abel L, Casanova JL (2009) Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest* 119: 2506-2514.
2. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, et al. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273: 1856-1862.
3. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, et al. (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367-377.
4. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, et al. (1996) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-725.
5. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, et al. (1994) Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med* 330: 1192-1196.
6. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, et al. (2003) Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9: 548-553.
7. Bruton OC (1962) A decade with agammaglobulinemia. *J Pediatr* 60: 672-676.
8. Fischer A, Le Deist F, Hachein-Bey-Abina S, Andre-Schmutz I, Basile Gde S, et al. (2005) Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev* 203: 98-109.
9. Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, et al. (2006) XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 444: 110-114.
10. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, et al. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848-853.
11. Goff SP (2004) Retrovirus restriction factors. *Mol Cell* 16: 849-859.

12. Abel L, Casanova JL (2000) Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance. *Am J Hum Genet* 67: 274-277.
13. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, et al. (2007) A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 317: 944-947.
14. Cole RK (1968) Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Avian Dis* 12: 9-28.
15. Hanson MP, Van Zandy JN, Law GR (1967) Differences in susceptibility to Marek's disease in chickens carrying two different **B** locus blood alleles. *Poult Sci* 46: 1268.
16. Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, Coimbra M, Sakamoto T, et al. (2006) Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 254: 203-210.
17. Dorson M, Quillet E, Hollebecq MG, Torhy C, Chevassus B (1995) Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet Res* 26: 361-368.
18. Slierendrecht WJ, Olesen NJ, Juul-Madsen HR, Lorenzen N, Henryon M, et al. (2001) Rainbow trout offspring with different resistance to viral haemorrhagic septicaemia. *Fish Shellfish Immunol* 11: 155-167.
19. Biacchesi S, Le Berre M, Le Guillou S, Benmansour A, Bremont M, et al. (2007) Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J Fish Dis* 30: 631-636.
20. Purcell MK, Lapatra SE, Woodson JC, Kurath G, Winton JR Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 28: 98-105.
21. Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P (2007) Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 22: 510-519.
22. Norris A, Foyle L, Ratcliff J (2008) Heritability of mortality in response to a natural pancreas disease (SPDV) challenge in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts on a West of Ireland sea site. *J Fish Dis* 31: 913-920.
23. Kjøglum S, Larsen S, Bakke HG, Grimholt U (2006) How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol* 21: 431-441.
24. Guy DR, Bishop SC, Brotherstone S, Hamilton A, Roberts RJ, et al. (2006) Analysis of the incidence of infectious pancreatic necrosis mortality in pedigreed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., populations. *J Fish Dis* 29: 637-647.
25. Shapira Y, Magen Y, Zak T, Kotler M, Hulata G, et al. (2005) Differential resistance to Koi herpesvirus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio*) strains and crossbreds. *Aquaculture* 245: 1-11.
26. Ødegård J, Olesen I, Dixon P, Zsigmond J, Nielsen H-M, et al. (2010) Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains. II: Resistance to koi herpesvirus and *Aeromonas hydrophila* and their relationship with pond survival. *Aquaculture* 304: 7-13.
27. Kirpichnikov V, Ilyasov J, Shart L, Vikhman A, Ganchenko A, et al. (1993) Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L.) for resistance to dropsy: principal results and prospects. *Aquaculture* 111: 7-20.
28. Overgard AC, Nerland AH, Patel S Evaluation of potential reference genes for real time RT-PCR studies in Atlantic halibut (*Hippoglossus Hippoglossus* L.); during development, in tissues of healthy and NNV-injected fish, and in anterior kidney leucocytes. *BMC Mol Biol* 11: 36.
29. Houston RD, Gheyas A, Hamilton A, Guy DR, Tinch AE, et al. (2008) Detection and confirmation of a major QTL affecting resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev Biol (Basel)* 132: 199-204.
30. Li J, Boroevich KA, Koop BF, Davidson WS Comparative genomics identifies candidate genes for infectious salmon anemia (ISA) resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar Biotechnol (NY)* 13: 232-241.

31. Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra M, et al. (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). . *Molecular Genetics and Genomics* 265: 23-31.
32. Moen T, Baranski M, Sonesson AK, Kjøglum S (2009) Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics* 10: 368.
33. Palti Y, Parsons J, Thorgaard G (1999) Identification of candidate DNA markers associated with IHNV resistance in backcrosses of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and cutthroat trout (*O. clarki*). . *Aquaculture* 173: 81-94.
34. Boudinot P, Boubekour S, Benmansour A (2001) Rhabdovirus infection induces public and private T cell responses in teleost fish. *J Immunol* 167: 6202-6209.
35. Phillips RB, Zimmerman A, Noakes MA, Palti Y, Morasch MR, et al. (2003) Physical and genetic mapping of the rainbow trout major histocompatibility regions: evidence for duplication of the class I region. *Immunogenetics* 55: 561-569.
36. Hansen JD, Strassburger P, Thorgaard GH, Young WP, Du Pasquier L (1999) Expression, linkage, and polymorphism of MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Immunol* 163: 774-786.
37. Koop BF, von Schalburg KR, Leong J, Walker N, Lieph R, et al. (2008) A salmonid EST genomic study: genes, duplications, phylogeny and microarrays. *BMC Genomics* 9: 545.
38. Basurco B, Benmansour A (1995) Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* 212: 741-745.
39. Benmansour A, Paubert G, Bernard J, De Kinkelin P (1994) The polymerase-associated protein (M1) and the matrix protein (M2) from a virulent and an avirulent strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Virology* 198: 602-612.
40. Bernard J, Lecocq-Xhonneux F, Rossius M, Thiry ME, de Kinkelin P (1990) Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Gen Virol* 71 (Pt 8): 1669-1674.
41. Thiry M, Lecocq-Xhonneux F, Dheur I, Renard A, De Kinkelin P (1991) Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochim Biophys Acta* 1090: 345-347.
42. Chiou PP, Kim CH, Ormonde P, Leong JA (2000) Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host-directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures. *J Virol* 74: 7619-7627.
43. Biacchesi S, LeBerre M, Lamoureux A, Louise Y, Lauret E, et al. (2009) Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses. *J Virol* 83: 7815-7827.
44. Chang M, Collet B, Nie P, Lester K, Campbell S, et al. (2011) Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Virol* 85: 8403-8412.
45. Lauksund S, Svingerud T, Bergan V, Robertsen B (2009) Atlantic salmon IPS-1 mediates induction of IFN α 1 and activation of NF-kappaB and localizes to mitochondria. *Dev Comp Immunol* 33: 1196-1204.
46. Robertsen B (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 20: 172-191.
47. Hamming OJ, Lutfalla G, Levraud JP, Hartmann R (2011) Crystal structure of Zebrafish interferons I and II reveals conservation of type I interferon structure in vertebrates. *J Virol* 85: 8181-8187.
48. Verrier ER, Langevin C, Benmansour A, Boudinot P (2011) Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev Comp Immunol* 35: 1204-1214.
49. Altmann SM, Mellon MT, Distel DL, Kim CH (2003) Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J Virol* 77: 1992-2002.
50. Lutfalla G, Roest Crollius H, Stange-Thomann N, Jaillon O, Mogensen K, et al. (2003) Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in

- vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 4: 29.
51. Levraud JP, Boudinot P, Colin I, Benmansour A, Peyrieras N, et al. (2007) Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *J Immunol* 178: 4385-4394.
 52. Aggad D, Mazel M, Boudinot P, Mogensen KE, Hamming OJ, et al. (2009) The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains. *J Immunol* 183: 3924-3931.
 53. Oshiumi H, Matsuo A, Matsumoto M, Seya T (2008) Pan-vertebrate toll-like receptors during evolution. *Curr Genomics* 9: 488-493.
 54. Matsuo A, Oshiumi H, Tsujita T, Mitani H, Kasai H, et al. (2008) Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J Immunol* 181: 3474-3485.
 55. Robertsen B (2008) Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish Shellfish Immunol* 25: 351-357.
 56. Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, Benmansour A (1998) Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 249: 297-306.
 57. Le Berre M, de Kinkelin P, Metzger A (1977) Identification sérologique des Rhabdovirus de Salmonidés. *Bull Off It Epizoot* 87: 391-393.
 58. Wolf K (1988) Infectious pancreatic necrosis. *Fish viruses and fish viral diseases* New York,: Cornell University Press. pp. 115-157.
 59. Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C (2001) In vitro viral haemorrhagic septicaemia virus replication in excised fins of rainbow trout: correlation with resistance to waterborne challenge and genetic variation. *Dis Aquat Organ* 45: 171-182.
 60. Ducrocq V, Sölkner J, Mészáros G (2010) Survival Kit V6 - a Software Package for Survival Analysis (ID232). 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP) Leipzig, Germany.
 61. Cox D (1972) Regression models and life table. *J Royal Stat Soc* 34: 187-220.
 62. Jorgensen HB, Sorensen P, Cooper GA, Lorenzen E, Lorenzen N, et al. General and family-specific gene expression responses to viral hemorrhagic septicaemia virus infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Immunol* 48: 1046-1058.
 63. Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell J, Wu T, et al. (1998) Protective immunity to VHS in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 8 261–270.
 64. Purcell MK, Marjara IS, Batts W, Kurath G, Hansen JD Transcriptome analysis of rainbow trout infected with high and low virulence strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol* 30: 84-93.
 65. Harmache A, LeBerre M, Droineau S, Giovannini M, Bremont M (2006) Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *J Virol* 80: 3655-3659.
 66. Zou J, Tafalla C, Truckle J, Secombes CJ (2007) Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J Immunol* 179: 3859-3871.
 67. Lopez-Munoz A, Roca FJ, Meseguer J, Mulero V (2009) New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities. *J Immunol* 182: 3440-3449.
 68. Trobridge GD, Leong JA (1995) Characterization of a rainbow trout Mx gene. *J Interferon Cytokine Res* 15: 691-702.
 69. Trobridge GD, Chiou PP, Leong JA (1997) Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J Virol* 71: 5304-5311.

70. O'Farrell C, Vaghefi N, Cantonnet M, Buteau B, Boudinot P, et al. (2002) Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *J Virol* 76: 8040-8049.
71. Boudinot P, Massin P, Blanco M, Riffault S, Benmansour A (1999) vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *J Virol* 73: 1846-1852.
72. Van der Aa LM, Levraud JP, Yahmi M, Lauret E, Briolat V, et al. (2009) A large new subset of TRIM genes highly diversified by duplication and positive selection in teleost fish. *BMC Biol* 7: 7.
73. Boudinot P, Salhi S, Blanco M, Benmansour A (2001) Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 11: 383-397.
74. Sun B, Robertsen B, Wang Z, Liu B (2009) Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Dev Comp Immunol* 33: 547-558.
75. Bearzotti M, Delmas B, Lamoureux A, Loustau AM, Chilmonczyk S, et al. (1999) Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J Virol* 73: 7703-7709.

Abstract

Genetic factors of resistance and predisposition to viral diseases explain a significant part of the clinical variability observed within host populations. Predisposition to viral diseases has been associated to MHC haplotypes and T cell immunity, but a growing repertoire of innate/intrinsic factors are implicated in the genetic determinism of the host susceptibility to viruses. In a long-term study of the genetics of host resistance to fish rhabdoviruses, we produced a collection of double-haploid rainbow trout clones showing a wide range of susceptibility to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) waterborne infection. The susceptibility of fibroblastic cell lines derived from these clonal fish was fully consistent with the susceptibility of the parental fish clones. The mechanisms determining the host resistance therefore did not associate with specific host immunity, but rather with innate or intrinsic factors. One cell line was resistant to rhabdovirus infection due to the combination of an early interferon IFN induction - that was not observed in the susceptible cells - and of yet unknown factors that hamper the first steps of the viral cycle. The implication of IFN was well consistent with the wide range of resistance of this genetic background to VHSV and IHNV, to the birnavirus IPNV and the orthomyxovirus ISAV. Another cell line was even more refractory to the VHSV infection through different antiviral mechanisms. This collection of clonal fish and isogenic cell lines provides an interesting model to analyze the relative contribution of antiviral pathways to the resistance to different viruses.

Chapitre 7.

Caractérisation de la réponse interféron dans les lignées *in vitro* à l'aide d'inducteurs de senseurs cellulaires.

Eloi Verrier, Corinne Torhy, Edwige Quillet et Pierre Boudinot.

Introduction

Notre caractérisation de la réponse des clones cellulaires induite par le VSHV a montré que la résistance des lignées de truite isogéniques est sans doute due, au moins en partie, à des facteurs innés qui interviennent dans les étapes très précoces de l'infection virale. Ainsi, l'expression précoce d'*IFN ϕ 1* explique une partie de la résistance. Cette composante est donc vraisemblablement liée à un (des) gène(s) qui régulent la cinétique précoce de l'induction des *IFN ϕ* . Lorsqu'une particule virale entre en contact avec une cellule ou y est endocytée, le génome viral et les transcrits précoces sont reconnus par un certain nombre de senseurs (TLRs, RLRs...), induisant la production des *IFN ϕ* s. Différentes voies de signalisation conduisent de la reconnaissance du virus à la production d'IFN. Le but de cette étude est de tester la fonctionnalité des différentes voies d'induction des IFNs dans les clones cellulaires de fond génétique sensible ou résistant que nous avons caractérisés, afin d'essayer de comprendre leur contribution à la résistance.

La présence des gènes *tlr7/tlr8* et de gènes de la famille des *crfb* (codant les chaînes des récepteurs de nombreuses cytokines dont les IFNs) dans la région du QTL (Carine Genêt, non publié) représente un autre argument fort en faveur de cette approche. L'identification de différences à ce niveau permettrait de caractériser les modifications des mécanismes précoces de défense antivirale qui auraient une influence sur l'issue de l'infection. Les gènes associés à ces voies de signalisation non encore localisés sur le génome de la truite arc-en-ciel constitueraient bien sûr des gènes candidats pertinents, qui pourraient être cartographiés pour tester leur présence voire leur position dans la zone du QTL.

Différents inducteurs ou ligands des TLRs et RLRs sont bien connus chez les mammifères. Ils sont souvent des répliques synthétiques des acides nucléiques viraux. Chez les poissons téléostéens, des orthologues et, plus généralement des homologues fonctionnels probables, ont été décrits pour les TLRs et des RLRs. Leurs fonctions de senseurs semblent au moins en partie conservées. Certains inducteurs des senseurs mammaliens sont capables d'induire l'expression d'*IFN ϕ* s chez les poissons, mais les mécanismes d'interaction avec les senseurs n'ont en général pas été confirmés (Palti, 2011). En supposant que les différents inducteurs des senseurs mammaliens stimulent les mêmes senseurs – ou au moins des voies similaires – chez les mammifères et les poissons, nous nous proposons de stimuler les senseurs des cellules de truite arc-en-ciel à l'aide des inducteurs

disponibles et de mesurer l'expression d'*IFN ϕ 1* court (fonctionnel) dans les différents fonds génétiques. La liste des inducteurs utilisés et de leurs senseurs présumés est indiquée Table 12 et Figure 34. Les différents inducteurs sont incubés avec ou transfectés dans les clones cellulaires B57, A2 (résistants), A22 et A3 (sensibles) ou transfectés. L'expression d'*IFN ϕ 1* court est ensuite mesurée par qPCR quelques heures après stimulation. Afin de tester la fonctionnalité des récepteurs des IFNs et des voies conduisant de ces récepteurs à l'expression des ISGs et des IFNs eux mêmes (voie d'auto amplification), les cellules ont été également stimulées *via* de l'IFN ϕ 1 recombinant.

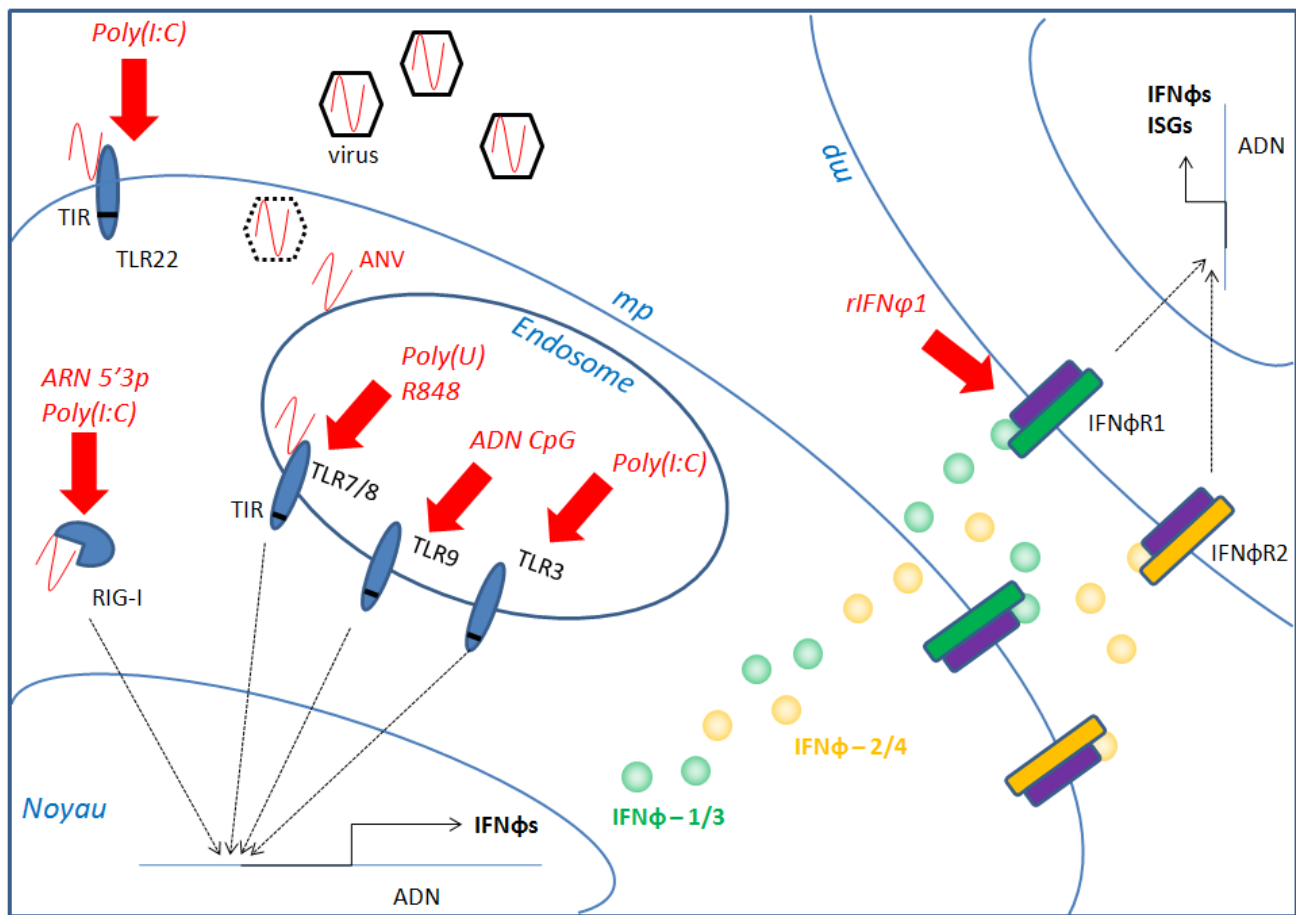


Figure 34 : Principales voies d'induction des IFN ϕ s après infection virale chez les poissons. Des senseurs reconnaissent l'acide nucléique viral (ANV) : TLR7/8, TLR9 et TLR3 sont situés dans les endosomes, TLR22 à la surface des cellules. Le domaine effecteur TIR des TLRs est cytoplasmique. L'hélicase RIG-I est située dans le cytoplasme. Ces senseurs induisent l'expression des 2 groupes d'IFN ϕ s : le groupe 1 (en vert) composé des IFN ϕ 1 et IFN ϕ 3 et le groupe 2 (ocre) composé des IFN ϕ 2 et IFN ϕ 4. Les IFN ϕ s de groupe 1 se fixent sur leur récepteur, dimère de CRFB5 (en violet) et CRFB1 (en vert). Les IFN ϕ s du groupe 2 se fixent sur leur récepteur, dimère de CRFB5 (en violet) et CRFB2 (ocre). mp : membrane plasmique. ISGs : *interferon stimulated genes*. rIFN ϕ 1 : IFN ϕ 1 recombinant.

Table 12 : Listes des inducteurs des TLRs viro-induits et de RIG-I utilisés.

Senseur	Inducteurs		Références
	Mammifères	Poissons	
TLR3	Poly(I:C)	Poly(I:C)	Alexopoulou <i>et al.</i> , 2001 Matsuo <i>et al.</i> , 2008
TLR7/8	Poly(U), R848	Inconnu	Diebold <i>et al.</i> , 2004 Hemmi <i>et al.</i> , 2002
TLR9	ADN CpG	Inconnu	Latz <i>et al.</i> , 2004
TLR22	Absent	Poly(I:C)	Matsuo <i>et al.</i> , 2008
RIG-I	ARN 5'3p, Poly(I:C)	Inconnu	Takahasi <i>et al.</i> , 2008

Matériel et méthodes

1) Culture cellulaire

Quatre lignées cellulaires fibroblastiques décrites plus haut (chapitre 6) ont été utilisées : A2 et B57 (résistantes après infection par le VSHV), A22 et A3 (sensibles). Les cellules ont étéensemencées la veille de la stimulation (5.10^5 cellules par puits de P6) dans un milieu modifié « Mac Pherson Stoker Eagle's medium » (Eurobio) complémenté par 10% de sérum de veau foetal, de la pénicilline (100 UI.mL^{-1}) et de la streptomycine (100 mg.mL^{-1}). Les cellules ont été cultivées à 20°C pendant la nuit.

2) Stimulation des senseurs via différents inducteurs

Les cellules ont été mises en contact avec différents inducteurs de TLRs et de RIG-I (voir Table 12) :

- Le Poly(I:C) (Sigma), le Poly(U) (InvivoGen), l'ADN CpG ODN 1826 (séquence : 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT) et le R848 (InvivoGen, molécule proches des Imidazoquinolines) ont été dissous dans le milieu.
- Les ARN 5'3p (InvivoGen) ont été transfectés dans les cellules *via* le protocole AMAXA (électroporation), cette technique étant la seule permettant de transfecter efficacement nos

cellules (les tests à l'aide de lipofectants classiques et d'un plasmide contenant le gène de la GFP se sont révélés infructueux).

3) Extraction des ARNs et synthèse d'ADNc

Les cellules ont ensuite été lysées dans le Trizol (InvitroGen) et les ARNs extraits par précipitation à l'isopropanol, purifiés sur colonne RNeasy® Mini Kit (Qiagen) et soumis à un traitement à la DNase. La qualité des ARNs a été vérifiée sur gel d'agarose 0,5%. Les cDNAs double-brin ont ensuite été synthétisés selon le protocole du kit SuperScript®II d'InvitroGen en utilisant 125ng d'hexamères aléatoires (Roche) par µg d'ARN total.

4) Mesure de l'expression des gènes par qPCR

L'expression des gènes *IFNφ1* (transcrit court fonctionnel) et *Mx3* avant et après stimulation a été mesurée par PCR en temps réel (qPCR) avec le Realplex2 Mastercycler (Eppendorf) en utilisant le SYBR® Green PCR Mastermix (Applied Biosystems). Chaque mélange réactionnel est composé de 5 µL d'amorces (300 nM chacune), 5 µL d'ADNc (dilué 1/10) et 10 µL du PCR Mastermix.

Programme de PCR :

50°C	2 min	Initiation
95°C	10 min	Activation de l'enzyme
95°C	15 sec	} X 40 cycles d'amplification
60°C	1 min	
95°C	15 sec	} Courbe de dissociation
60°C	15 sec	
de 60 à 90°C	20 min	
95°C	15 sec	

Les expressions des gènes ont été calculées en fonction du bulletin d'utilisateur ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) et normalisées à la β-actine. Les oligonucléotides (amorces) utilisés sont indiqués Table 13.

Table 13 : Liste des amorces.

Transcrit	Séquence	Référence
IFN ϕ 1 court	gcgaaacaaactgctatttacaatgtata tcacagcaatgacacacgctc	(Purcell <i>et al.</i> , 2009)
Mx3	gatgctgcacctcaagtcctacta cggatcacatgggaatctga	B. Collet
β -actine	ggtggtacggccagaggc gggagaagatgaccagatcatg	(Bernard <i>et al.</i> , 2006)

5) Mise en contact des cellules avec l'IFN ϕ 1 recombinant

Les cellules ont également été mises en contact avec de l'IFN ϕ 1 recombinant (rIFN ϕ 1). Le gène de l'IFN ϕ 1 a été cloné au laboratoire il y a quelques années dans un vecteur d'expression eucaryote en fusion avec un TAG HA. Après transfection de cellules de la lignée COS (cellules rénales de singe africain) avec ce plasmide, le surnageant a été passé sur des colonnes d'anticorps anti_HA et l'IFN élué et dosé. Le pouvoir protecteur de cet IFN (au 1/250^e) a été revérifié avant les expériences décrites ici. Après 24h d'incubation, les cellules ont été infectées par le VSHV 07-71 (MOI : 1) comme décrit dans le chapitre 6 et incubées à 14°C. 72h post infection, les cellules ont été fixées au Formol 10% 1h à température ambiante puis colorées avec une solution de Crystal violet 1% 1h à température ambiante.

Résultats

1) Stimulation de RIG-I par l'ARN 5'ppp

RIG-I est une hélicase cytoplasmique capable de détecter la présence de virus et d'induire la synthèse d'IFNs (chez les mammifères et les poissons) via l'adaptateur mitochondrial VISA (voir Introduction du Chapitre 2). Les ARN 5'3p (InvivoGen) – qui sont des inducteurs assez spécifiques de RIG-I – ont été transfectés dans les lignées cellulaires selon les recommandations du fournisseur (2 μ g pour 2.10⁶ cellules). La transfection par

électroporation AMAXA étant stressante pour ces cellules, il ne restait qu'un nombre restreint de cellules vivantes 6h après transfection. Pour la lignée A2, aucune expression n'a pu être mesurée pour la β -actine. Pour les 3 autres lignées, le niveau basal de transcrit IFN ϕ 1 court n'était pas détectable dans le lot témoin (non stimulé). En revanche, on a pu mesurer l'expression d'IFN ϕ 1 6h après transfection, indiquant bien une induction d'IFN ϕ 1 par l'ARN 5'3p. En normalisant par rapport au nombre de copies de l'ARN actine (NCAC), le nombre de transcrits IFN ϕ 1 court étaient de $1,74 \cdot 10^{-4}$ NCAC pour B57, $1,43 \cdot 10^{-4}$ NCAC pour A22 et $2,31 \cdot 10^{-4}$ NCAC pour A3 (voir Figure 35).

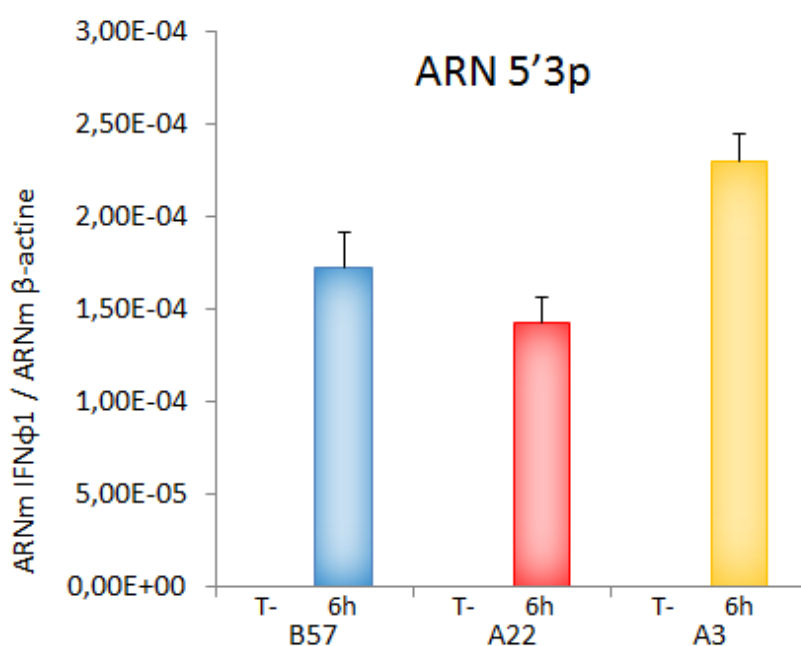


Figure 35 : Expression d'IFN ϕ 1 (transcrit court) après stimulation par l'ARN5'3p (transfection AMAXA). Le nombre de copies de transcrits est normalisé par rapport à l'expression de la β -actine. Les valeurs moyennes de triplicats techniques sont présentées.

Ces expérimentations n'ont pas été répétées suffisamment pour permettre une analyse statistique des moyennes. Cependant, ces premières observations vont dans le sens d'une induction sensiblement équivalente pour les trois lignées cellulaires. L'IFN ϕ 1 court, fonctionnel, est induit précocement dans les trois lignées. Sous l'hypothèse que l'ARN 5'3p est également un inducteur de RIG-I chez les poissons (et uniquement de RIG-I), on peut donc conclure que la voie de signalisation de ce senseur cytoplasmique est fonctionnelle dans nos lignées, et donc que le polymorphisme éventuel de son gène ou des gènes impliqués dans la cascade en aval n'est pas à l'origine des différences de résistance observées dans nos lignées isogéniques, pour ce qui est de l'induction précoce de l'IFN ϕ 1.

2) Stimulation de TLR9 par l'ADN CpG ODN 1826

Les motifs CpG sont connus pour être des inducteurs de TLR9 chez les mammifères (Latz *et al.*, 2004). Afin de vérifier si la voie d'induction des IFN ϕ s via TLR9 est fonctionnelle dans les différents fonds génétiques testés, les lignées cellulaires ont été mises en contact avec une solution d'ADN CpG ODN 1826 à 1 μ M pendant 6h à 14°. L'expression du transcrit IFN ϕ 1 court mesurée par qPCR indique qu'il n'y a aucune induction de ce gène après 6h de mise en contact. Plusieurs explications peuvent expliquer ce résultat : il est possible que l'ADN CpG ODN 1826, connu pour être un inducteur des TLR9 mammaliens ne soit pas reconnu par le TLR9 (ou un autre senseur) des poissons téléostéens. Il a été montré chez le saumon atlantique que certains CpG de classe B (Skjaeveland *et al.*, 2008) sont capables d'induire la surexpression de TLR9. Il serait intéressant de stimuler nos cellules à l'aide de ces ADNs. On peut aussi imaginer que la stimulation du TLR9 induise l'expression d'autres gènes d'IFN ϕ (non détectés avec nos amorces), ou encore que cette surexpression intervienne plus tard, après 6 heures post-stimulation.

3) Stimulation des TLR7/8 par une Imidazoquinoline et le Poly(U)

TLR7 et TLR8 reconnaissent l'ARN viral simple brin et sont stimulés par son équivalent synthétique, le Poly(U) (Diebold *et al.*, 2004). Les molécules de la famille des Imidazoquinolines sont également des ligands de ces TLRs chez les mammifères (Hemmi *et al.*, 2002). Après 6h de mise en contact avec une solution de R848 (une Imidazoquinoline commercialisée par InvivoGen) à 10 μ g.mL⁻¹, aucune induction d'IFN ϕ 1 n'a pu être observée dans nos essais. On pourrait penser que le R848 soit une Imidazoquinoline spécifique des TLRs de mammifères et qu'il ne joue pas son rôle d'inducteur chez la truite arc-en-ciel. Cependant, il a été montré que le même R848 (utilisé en même quantité et durant la même durée) induisait *ex vivo* une réponse IFN dans des leucocytes de rein antérieur de truite arc-en-ciel (Palti *et al.*, 2010). On peut donc faire l'hypothèse que le R848 n'est pas actif sur les cellules fibroblastiques et qu'il n'induit pas de réponse IFN dans notre modèle parce que ces senseurs ne sont pas exprimés. Il a été montré que l'Imidazoquinoline S-27609 induisait une réponse IFN dans différents organes du saumon atlantique (Kileng *et al.*, 2008). Cette

molécule n'est pas commercialisée à notre connaissance, mais il serait intéressant de la tester sur nos lignées.

En revanche, après 6h de stimulation par une solution de 30 μ g.mL⁻¹ de Poly(U) (InvivoGen), une induction d'IFN ϕ 1 est détectable pour B57 (2,7 fois le niveau basal) et A2 (3,3 fois le niveau basal). Mais aucune induction n'est observée pour A22 et A3 (ou une induction très faible) (voir Figure 36).

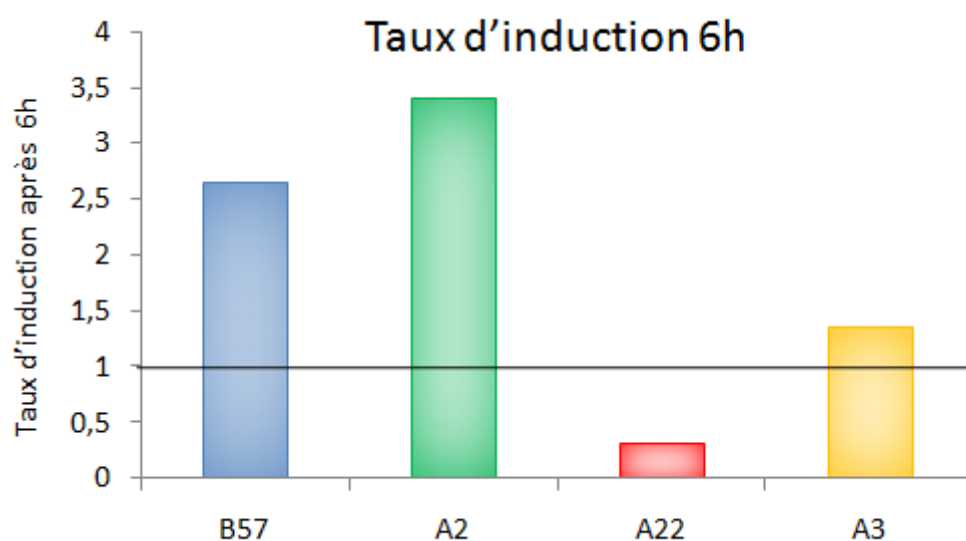


Figure 36 : Induction d'IFN ϕ 1 court après 6h de mise en contact avec le Poly(U). Le taux d'induction est déterminé par le rapport du nombre de transcrits d'IFN ϕ 1 court après 6h d'incubation et du nombre de transcrits d'IFN ϕ 1 court dans le lot témoin, les expressions étant normalisées en référence à la β -actine.

Ces résultats sont préliminaires et doivent être confirmés. Cependant, il est intéressant de remarquer que l'induction précoce d'IFN ϕ 1 court ne se fait que dans les deux lignées résistantes, ce qui est en accord avec les résultats décrits dans le chapitre précédent, qui montrent qu'une expression précoce d'IFN ϕ 1 est associée à la résistance de B57 après infection virale. Cette expression n'avait pas été mise en évidence avec la lignée A2 dans nos expériences antérieures, très peu de virus étant entré dans les cellules et les mécanismes de résistance des lignées A2 et de B57 étant potentiellement différents, au moins en partie. Ces résultats sont néanmoins à confirmer, les taux d'induction n'étant pas particulièrement élevés.

4) Stimulation des TLR22 et TLR3 par le Poly(I:C)

Le Poly(I:C) (analogue des ARN double brin) est un des inducteurs d'IFN les plus utilisés et stimule les cellules via le TLR22 chez les poissons, et le TLR3 ainsi que RIG-I chez les mammifères (Alexopoulou *et al.*, 2001; Takahasi *et al.*, 2008; Matsuo *et al.*, 2008). Afin de vérifier la réponse IFN ϕ après induction par le Poly(I:C), les cellules sont mises en contact avec une solution de 30 μ g.mL⁻¹ de Poly(I:C) (Sigma) 6h, 15h et 24h. Les résultats présentés Figure 37 montrent une induction massive d'IFN ϕ 1 dans la lignée B57 après 15h de stimulation.

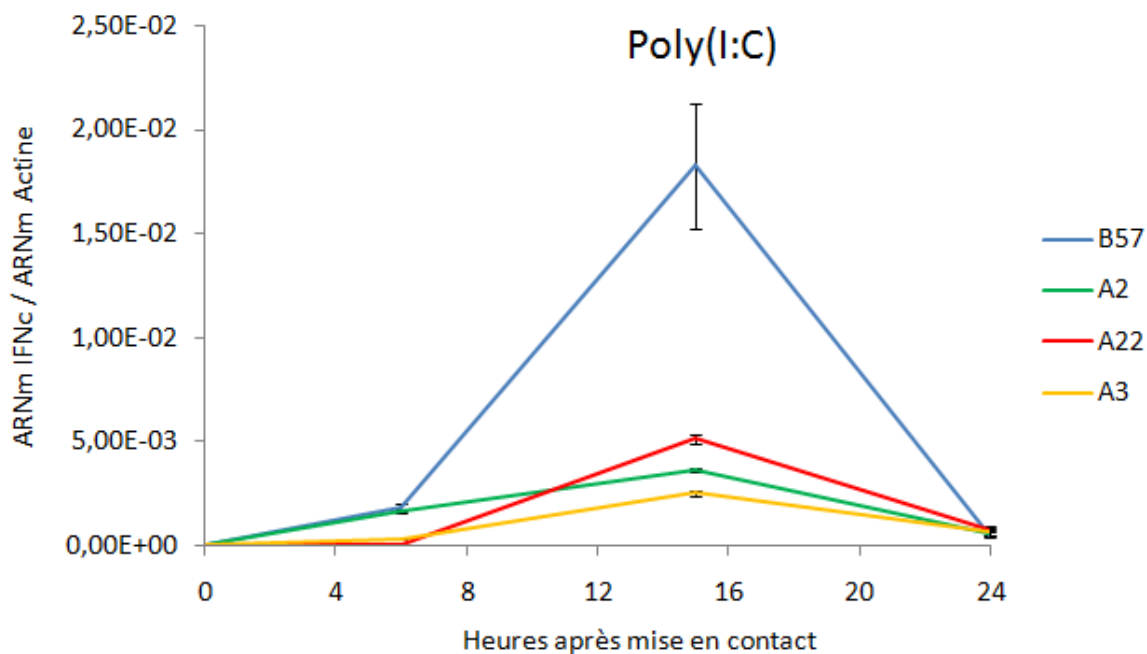


Figure 37 : Expression d'IFN ϕ 1 court dans les lignées cellulaires après différents temps d'incubation (6h, 15h, 24h) avec le Poly(I:C). Le nombre de transcrits est normalisé sur la β -actine.

Comme pour le Poly(U), on retrouve après 6h de stimulation une induction précoce d'IFN ϕ 1 court dans les lignées A2 et B57, mais beaucoup plus forte (respectivement 132 et 72 fois le niveau basal). Une plus faible induction est détectée dans les autres lignées. Après 15h, IFN ϕ 1 court est massivement présent dans les cellules B57 ($1,83.10^{-2}$ NCAc) alors que les niveaux d'expression pour les 3 autres lignées vont de $2,5.10^{-3}$ à 5.10^{-3} NCAc. Ces résultats confirment la capacité de B57 à produire de l'IFN ϕ 1, et confirme l'expression différée chez les lignées sensibles A22 et A3, comme décrit dans le chapitre 6.

L'expression précoce d'IFN ϕ 1 après stimulation au Poly(I:C) et au Poly(U) est retrouvée dans les deux lignées résistantes, et pourrait expliquer les différences de sensibilité observée entre les différents fonds génétiques.

5) Induction d'IFN ϕ 1 et de Mx3 après stimulation par l'IFN ϕ 1 recombinant

Une fois synthétisés, les IFNs sont en général excrétés de la cellule et se fixent sur leur récepteur. Chez les poissons, deux récepteurs des IFN ϕ s ont été décrits (voir Introduction chapitre 2) : les IFN ϕ s du groupe I se lient à un dimère de CRFB1 et CRFB5 et les IFN ϕ s du groupe 2 se lient à un dimère de CRFB2 et CRFB5. Afin de vérifier si la voie IFN en aval de la fixation sur son récepteur était fonctionnelle, les cellules ont été incubées avec du rIFN ϕ 1 à différentes concentrations, puis infectés par le VHSV 07-71 (MOI : 1). Le résultat de la destruction des tapis cellulaires après infection est montrée Figure 38.

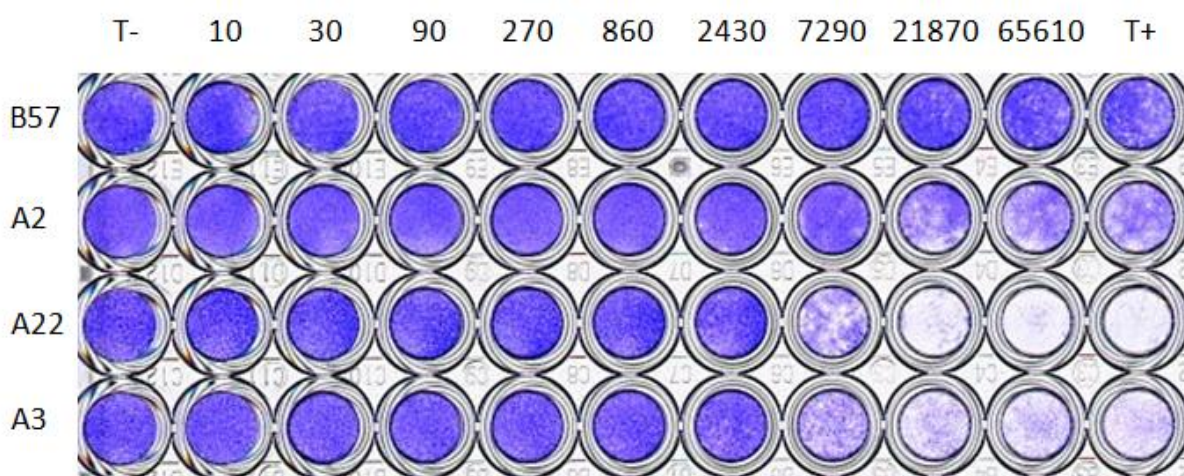


Figure 38 : Destruction du tapis cellulaire après mise en contact avec différentes concentration de rIFN ϕ 1 puis infection au virus VHSV 07-71. Les cellules sont incubées 24h avec le rIFN ϕ 1, puis 3 jours avec le virus, puis fixées et colorées au cristal violet. Les dilutions de rIFN ϕ 1 sont indiquées au dessus des puits. T- : cellules non infectées non mises en contact avec rIFN ϕ 1. T+ : cellules infectées non mises en contact avec rIFN ϕ 1.

Après 24h d'incubation, rIFN ϕ 1 induit une protection de tous les types cellulaires de façon dose-dépendante contre l'infection par le VHSV. La dose nécessaire dépend de la résistance initiale de la cellule. Ainsi, A2 est complètement protégée avec une dilution au 1/7290, alors qu'il faut une dilution trois fois moins importante pour protéger les cellules A22 et A3

(1/2430). Ces résultats montrent que le récepteur des IFN ϕ s de groupe I est fonctionnel dans tous les types cellulaires et qu'il induit l'expression de molécules antivirales protégeant les cellules de l'infection. Les infections ont été réalisées 24h après l'incubation avec rIFN ϕ 1. Afin de vérifier qu'il n'y a pas de différences dans les stades précoces après la fixation de rIFN ϕ 1 sur son récepteur, les lignées cellulaires ont été incubées 6h avec rIFN ϕ 1 (1/250). L'expression du gène antiviral *Mx3* a été mesurée. Comme il existe une boucle de rétroaction positive sur la production d'IFN ϕ , l'expression du transcrit court de *IFN ϕ 1* a également été mesurée. Les résultats sont présentés Figure 39.

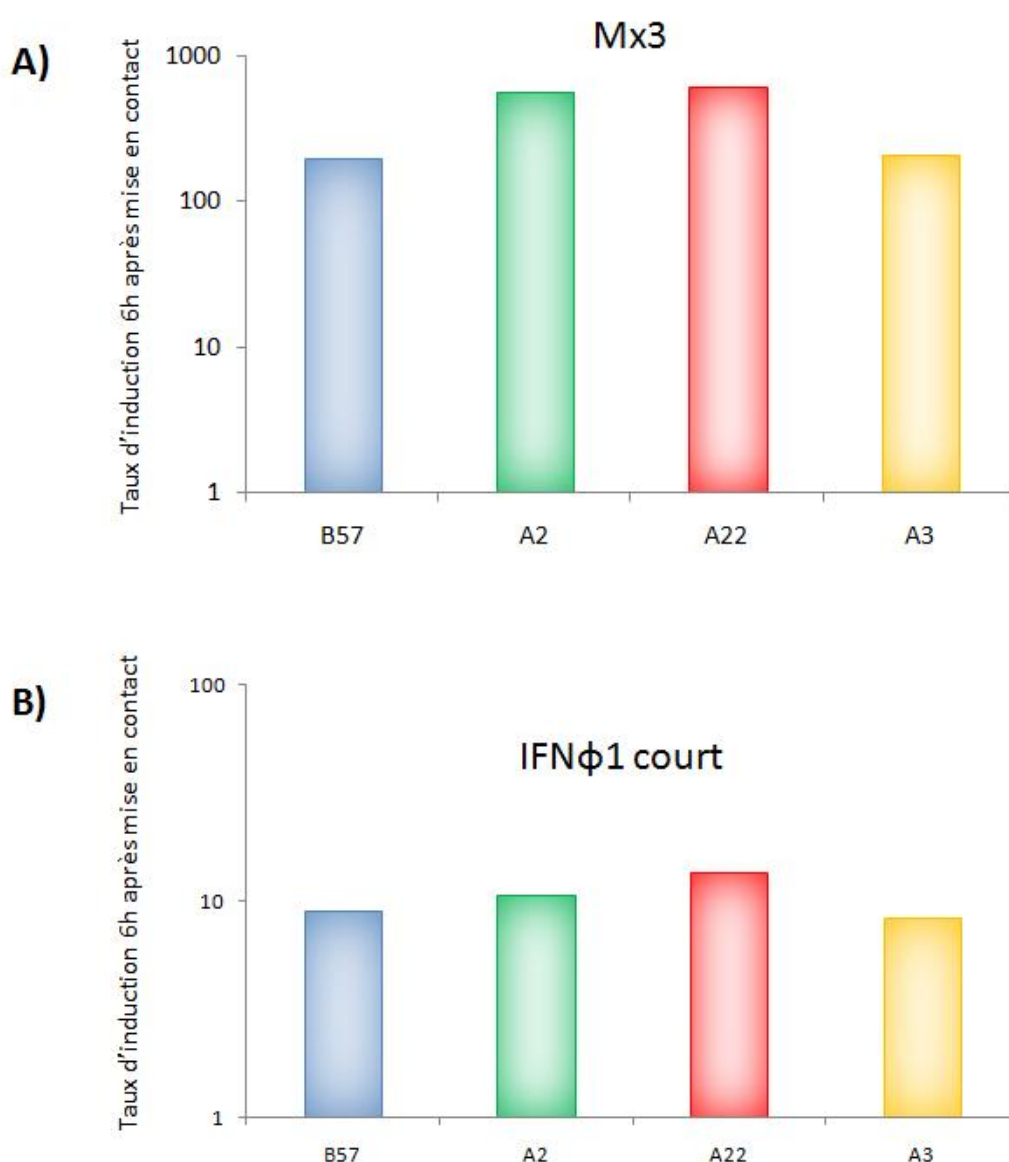


Figure 39 : Induction de *Mx3* (A) et *IFN ϕ 1* (B) après 6h de mise en contact avec rIFN ϕ 1. L'expression des gènes est normalisée avec la β -actine. Les résultats sont exprimés en rapport nombre de transcrits après induction / nombre de transcrits chez le témoin. Les résultats sont présentés sur une échelle log(10).

Une très forte induction de *Mx3* est observée chez les quatre lignées cellulaires dès 6h après mise en contact avec rIFN ϕ (de 200 à 600 fois en fonction des lignées). Même si des différences peuvent être observées entre les lignées, l'induction est suffisamment forte pour imaginer que le récepteur de l'IFN ϕ 1 fonctionne correctement dans toutes les lignées. De plus, les différences observées, si elles sont significatives (ce qui resterait à confirmer par des expériences supplémentaires) ne permettraient pas d'expliquer des différences de résistance observées chez les poissons puisque ce sont les cellules A22 (induction de plus de 600 fois le niveau de base) qui expriment le plus *Mx3*. En valeur absolue après incubation, les différences sont moins importantes (de 3.10^{-3} chez B57 à $1,5.10^{-3}$ chez A3 par rapport à la β -actine).

De même, on observe une induction d'*IFN ϕ 1* après 6h de mise en contact avec rIFN ϕ 1. Le taux d'induction varie de 8,5 (A3) à 13,7 (A22) fois le niveau basal d'expression. B57 (9,1) et A2 (10,8) présentant des taux d'induction intermédiaire. Encore une fois, les différences observées sont assez modestes et l'on peut supposer que la boucle de rétroaction d'IFN ϕ 1 fonctionne correctement dans tous les fonds génétiques.

Discussion et conclusions

Afin de vérifier si les senseurs antiviraux cellulaires et leurs cascades conduisant à l'expression d'IFN ϕ étaient fonctionnels, les cellules dérivées des lignées isogéniques sensibles et résistantes ont été exposées à différents inducteurs, et l'expression d'*IFN ϕ 1* et de l'ISG *Mx3* ont été mesurées par qPCR.

Les résultats observés permettent tout d'abord de conclure que RIG-I n'est sans doute pas impliqué dans les différences de résistance observées dans les lignées. En effet, si l'on admet que le 5'3p stimule RIG-I chez les poissons, l'expression d'*IFN ϕ 1* semble être équivalente dans les différents fonds génétiques. Cependant, RIG-I n'est pas la seule hélicase cytoplasmique capable de reconnaître les acides nucléiques viraux. LGP2 et MDA5 en sont deux autres exemples. On sait de plus que MDA5 est stimulé par le Poly(I:C) court lorsqu'il est transfecté dans les cellules (produit non disponible au laboratoire) (Gitlin *et al.*, 2006).

Afin d'éliminer définitivement les RLRs comme gène candidat potentiel, il faudrait réaliser ces mêmes expériences en utilisant les inducteurs de ces autres hélicases.

Les stimulations par le Poly(U) et le Poly(I:C) montrent une différence d'induction entre les lignées sensibles et les lignées résistantes : B57 et A2 semblent montrer une induction plus précoce de *IFN ϕ 1*, ce qui pourrait être à l'origine de leur résistance. La très forte expression d'*IFN ϕ 1* dans les cellules B57 est en outre une confirmation des résultats du chapitre 6. TLR7/8 sont de bons gènes candidats, puisqu'ils sont capables de reconnaître l'ARN simple brin, comme celui du VHSV. Cependant, la non-induction d'*IFN ϕ 1* par le R848 peut laisser supposer que cette molécule ne trouve pas de récepteur dans nos cellules. Ces expériences ont été menées exactement dans les mêmes conditions que celles de Palti *et al.*, (2010), où une induction de *IFN ϕ 1* après stimulation des leucocytes du rein avait été observée. Si l'on suppose que le R848 est bien un inducteur de TLR7 et TLR8 chez les poissons, cela voudrait dire que ces TLRs ne s'expriment peut-être pas ou peu dans nos cellules, et que par conséquent ils ne peuvent être responsables de la différence de résistance de nos lignées cellulaires. L'induction d'*IFN ϕ 1* après stimulation par le Poly(U) pourrait s'expliquer par le fait que cette molécule est peut-être moins spécifique des TLR7/8 que R848 et serait reconnu par un autre senseur cellulaire. Ce point est particulièrement important à éclaircir, l'induction précoce d'*IFN ϕ 1* étant le seul point commun entre les deux lignées résistantes. Ces conclusions restent toutefois à mettre au conditionnel, les résultats devant être répétés.

TLR4, un TLR potentiellement antiviral chez les poissons, n'a lui pas été analysé. Une expérience (non montrée) de mise en contact avec un inducteur connu du TLR4 chez les mammifères, le LPS, nous a montré qu'aucune induction d'*IFN ϕ 1* n'était détectable 6h après la mise en contact avec les extraits de vibrio (contenant du LPS). Il est toutefois possible que ce TLR ne s'exprime pas dans les fibroblastes.

Le rIFN ϕ 1 est capable d'induire une protection contre l'infection, et une induction de *Mx3* et d'*IFN ϕ 1* dans nos cellules. Ces résultats suggèrent que le récepteur aux IFN ϕ 1 est fonctionnel dans tous les fonds génétiques étudiés. CRFB1 et CRFB5 peuvent donc sans doute être écartés de la liste des gènes candidats. Cependant, ces aspects doivent être

confirmés et analysés de manière plus détaillée. Il serait ainsi intéressant de vérifier si le récepteur aux IFN ϕ s de groupe 2 est lui aussi fonctionnel dans toutes les lignées. Pour cela, il nous faut produire l'IFN ϕ 2 recombinant et réaliser la même expérience d'induction.

De manière générale, cette étude est préliminaire. En particulier, il serait intéressant de mesurer l'expression des autres gènes d'IFN ϕ , de plusieurs ISGs tels que *Mx* ou *isg15* (sachant que *vig-1* ne s'exprime pas dans nos lignées), et d'étudier les cinétique de productions des transcrits. De même, il faudrait disséquer en détail les voies d'induction des TLRs, et s'intéresser plus particulièrement aux facteurs de transcriptions IRFs induisant l'expression des IFN ϕ s. Des gènes candidats potentiels pourraient se révéler critiques s'ils sont dans la zone du QTL. Il faut également replacer ces résultats dans le contexte du chapitre 6 dans lequel la résistance d'A2 semblait indépendante de la voie IFN. Il est possible que les lignées B57 et A2 ne résistent pas à l'infection *via* le même mécanisme et que l'induction précoce d'IFN ϕ 1 observée dans la lignée A2 ne soit pas en lien avec sa résistance.

Chapitre 8.

Analyse comparée entre résistance au VSHV et au VNHI chez la truite arc-en-ciel.

Objectifs

L'objectif de cette étude était d'aborder la résistance aux virus par une troisième approche, en jouant sur les variations de mécanismes de virulence entre espèces de rhabdovirus étroitement apparentées comme le VSHV et le VNHI. Pour des applications pratiques, il est aussi important de s'intéresser à la fois à ces deux virus dans la mesure où ils induisent des pathologies présentant des symptômes très semblables chez les jeunes poissons. Dans cette étude nous avons essayé de comprendre comment un même fond génétique répondait à ces deux infections. Comme le QTL contrôle des mécanismes non spécifiques de résistance au VSHV, une hypothèse pourrait être que ces mécanismes permettent également de résister au VNHI. La première étude des lignées isogéniques par (Quillet, Dorson *et al.*, 2007) semblait d'ailleurs indiquer une corrélation entre la résistance à ces infections. Dans cette étude, nous avons comparé les données des infections des lignées isogéniques par le VSHV 07-71 et le VNHI 32-87 en utilisant les mêmes méthodes statistiques qu'au chapitre 6 (analyse de survie *via* un logiciel dédié). Ces travaux font l'objet d'un article (accepté pour publication dans la revue *Fish and Shellfish Immunology*), et sont suivis de travaux de recherche d'un potentiel QTL de résistance au VNHI dans la région du QTL SHV.

Lack of correlation between the genetic resistances to two rhabdovirus infections in rainbow trout

Eloi Verrier, Aude Ehanno*, Stéphane Biacchesi, Sandrine Le Guillou, Nicolas Dechamp, Pierre Boudinot, Michel Bremont et Edwige Quillet

* Stagiaire encadrée dans le cadre de la thèse

Introduction

Viral infections cause severe outbreaks and important economic losses in fish livestock. The infectious hematopoietic necrosis (IHN) and the viral haemorrhagic septicaemia (VHS), caused by IHNV and VHSV respectively, can cause severe losses in salmonid farms and sometimes in wild populations [1]. These two viruses have been extensively studied, especially in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). They both possess a negative-sense single-stranded RNA genome encoding five structural proteins: a nucleoprotein (N), a phosphoprotein (P), a matrix protein (M), a glycoprotein (G) and a large polymerase (L) [2–9]. The G protein is responsible for attachment to the host cell membrane and entry within the cell by a receptor-mediated endocytosis [10]. As members of the Novirhabdovirus family, IHNV and VHSV genomes contain an additional gene encoding a non-structural protein, the non virion protein (NV) [11, 12] which plays an important role in the pathogenicity [13, 14].

These two freshwater diseases share common symptoms, such as hemorrhages, darkening skin and exophthalmia [1], although the fish weight has a stronger impact on the virulence of IHNV compared to VHSV [1]. It has been shown that fin bases are the entry site for IHNV [15]. In this perspective, it is interesting to note that VHSV replication in fin explants is correlated with resistance to the disease, which might suggest a critical role of early virus amplification in this tissue for the outcome of infection [16]. The host response against these two viruses has been shown to be rather similar with a classical interferon (IFN) response followed by the expression of numerous interferon stimulated genes (ISGs) (for a review, [17]). Several lines of evidence suggest that innate factors play a key role in the early steps of infection and the outcome of disease at the individual level [18–22].

Besides, the development of effective vaccines able to protect fish from infections by the viruses demonstrates the capacity of adaptive immune response to afford a robust protection [23, 24]. However, adaptive response is unlikely to play a major role in the natural resistance of freshwater species like rainbow trout, since neutralizing antibodies are usually detectable several weeks only after infection, *i.e.* after the acute phase of mortality.

The comparison of the two viral glycoprotein sequences reveals that they share only 39% of amino acid identity. Immunization with viral particles or with DNA vaccines encoding VHSV or IHNV glycoproteins does not induce cross-neutralizing antibodies in the infected fish [3, 8, 25]. Based on G gene sequences, four major genotypes (I-IV) have been described for VHSV and three major genogroups (U, M and L) for IHNV [9, 26–28]. This variability is likely associated to differences in host specificity and geographic repartition of diseases. An increasing number of teleost species developing symptoms due to VHSV infection have been reported all around the world [29], demonstrating the ability of this virus to adapt to new hosts.

While many reports have been published on the interactions between salmonids and IHNV or VHSV, the main molecular immune pathways involved in the natural resistance to the infection have not been identified unambiguously. In particular, according to the similarities and differences between both viruses, it was not established whether natural resistance relies on some common host defence mechanisms and/or on mechanisms involving (or linked to) specific virulence factors. The importance of the host genetic background for the natural resistance to these infections has been well established in rainbow trout [22, 30, 31]. Extreme susceptibility or resistance ranging from 0 to more than 95% survival to VHSV infection - and to a lesser extent, to IHNV infection - was recorded among a collection of gynogenetic clonal lines of rainbow trout [32]. Moreover, an apparent correspondence of the survival rate of these clonal lines after VHSV and IHNV infection was previously noted.

We therefore undertook a detailed comparison of the resistance levels to IHNV and VHSV infections using a number of clonal lines and a longitudinal statistical method based on the kinetics of mortality [33]. We confirmed that IHNV resistance was highly dependent on fish weight in all genetic backgrounds. We showed that the resistance levels to VHSV and IHNV were not significantly correlated. Finally, using a recombinant IHNV virus expressing the VHSV glycoprotein, we showed that the G protein plays a key role in the issue of infection in the different genetic backgrounds.

Material and methods

Experimental material

Clonal lines were established from females randomly sampled from the INRA SY reference strain after two successive generations of gynogenetic reproduction and were further maintained by within-line single pair mating using sex reversed (XX) neomales [32]. Every next generation, every breeder (male or female) was checked for homozygosity and isogenicity using allelic variation at ten polymorphic microsatellite markers. Breeders were maintained in INRA experimental farms that are free of IHNV and VHSV and permanently controlled (Gournay-sur-Aronde, Oise then PEIMA, Finistère). Hence, we believe that the clonal lines were established without any unintended selection by those viruses.

Virus production and viral infections

VHSV strain 07-71 (serotype 1) isolated from diseased fish from a French trout farm was propagated in EPC cells as described in [34]. After infection, the cells were incubated at 14°C in Glasgow's modified Eagle's medium-HEPES 25 mM medium supplemented with 2% foetal bovine serum, 2mM L-glutamine and antibiotics (penicillin 100 IU ml⁻¹, streptomycin 0.1 mg ml⁻¹ and kanamycin 0.1 mg ml⁻¹). The virus was harvested when the cytopathic effect was total. IHNV strain 32-87 (also called 25-52) was produced in similar conditions. The recombinant IHNV (32-87 background) containing the VHSV 07-71 glycoprotein instead of that of IHNV (rIHNV-Gvhsv) was produced using a reverse genetics system as previously described [35].

A total of ten different fish clonal lines were screened during the study. Infections were performed during four successive years at INRA experimental platform for infectiology (IERP, Jouy-en-Josas). Every year, fish were introduced as iodine disinfected eyed eggs and reared in units supplied with recirculated, dechlorinated tap water at 10°C constant until the infectious challenges. Groups of few months old juveniles were infected by bath immersion. The dataset used to analyse the responses of the ten clonal lines to wild type viruses (VHSV 07-71 and IHNV 32-87) combined data previously published [21, 32] and data from new infection trials. Fish origin and the number of fish tested at every challenge are detailed in Table 14. Fish were challenged at various ages (from day 83 to day 274 post-fertilization), with corresponding weights ranging from 0.2 to almost 5g according to clonal line, year and

trial within year. Within a given trial, age differences were due to the spreading of spawning dates among lines. Trials with rIHN-VgV were performed with six of the lines (Table 15). A typical infection was performed in duplicate aquaria of 30-50 juveniles per clonal line. Waterborne infections were performed by incubating for 2h with virus at 5×10^4 PFU/ml. In trial with rIHN-VgV, virus isolation was assayed on randomly sacrificed individuals from 3 additional aquaria infected with every virus (Table 16). Fin tissues were homogenized in a mortar with a pestle and sea sand in Glasgow's modified Eagle's medium-HEPES 25 mM medium containing penicillin (200 IU/ml), streptomycin (0.2 mg/ml), and kanamycin (0.2 mg/ml). After centrifugation at 2,000 g for 15 min at 4°C, the supernatant was used to inoculate EPC cells and the virus titer in each sample was determined by plaque assay. In parallel, blood was taken from each animal. Clotted trout blood samples were centrifuged for 20 min at 2000 g at 4°C and the supernatants were collected and used to inoculate EPC cells.

Table 14. Number of fish challenged with wild type viruses in each clonal line

Line	SY females ¹	Challenges											
		VHSV						IHN					
		2005	2006a	2006b	2007a	2007b	2008	2005a	2005b	2006a	2006b	2007	2008
A2	T10	100 ³					80 ⁴	100 ^{3*}	40 ³				80
A3	T9		79 ⁴		100 ⁴	50 ⁴	80 ⁴			80*	30	101	81
A22	T10	100 ³	80 ⁴				80 ⁴	100 ³	60 ³	80*	30		80
A32	T14				99	50						99	
A36	T21	100 ³	77 ⁴	100 ⁴	100 ⁴	50 ⁴	79 ⁴	100 ^{3*}	60 ³	76*		101	81
AP2	Un ²					50	79					99	80
B3	T6		78			100				83*		100	77
B25	T6					43						100	
B45	T15		80 ⁴		98 ⁴	50 ⁴	78 ⁴			82*		99	35
B57	T24	100 ³	78 ⁴	50 ⁴	100 ⁴	50 ⁴	80 ⁴	100 ^{3*}	60 ³	80*		98	80
Age	mean	154	111	227	133	173	109	119	245	111	192	173	162
	range	128-183	83-132	211-242	123-159	155-191	84-136	93-148	219-274	83-132	190-193	155-191	137-189
Weight	mean	1.4	0.4	0.7	0.8	1.8	0.5	0.7	3.9	0.4	1.7	1.8	2.2
	range	0.9-1.8	0.2-0.5	0.4-1.0	0.5-1.1	1.1-3.4	0.3-0.8	0.3-1.0	3.2-4.7	0.2-0.5	1.5-1.8	1.1-3.4	1.7-4.5

¹: individual SY females from which each clonal line was derived

²: unknown (founder female chosen in a mixture of DH progeny from different SY females)

³: Data described in [32]

⁴: Data described in [21]

*: not used for correlation of resistance of lines among IHN and VHSV (mean weight < 1g in IHN-infected fish)

Statistical analysis

For each trout line and infection trial, mortalities were recorded every day over a 21 to 34 days period of time. For survival analysis, the time of death of every fish was registered and survivors at the end of trials were coded as “censored” data, *i.e.* the expected event (death) was not recorded during the observation period. A longitudinal analysis was performed for each virus separately using the dedicated software named « The Survival Kit » [33]. Raw Kaplan-Meier estimates of the survival function $S_i(t)$ (where S_i is the survival function of population i and t is the time in days after infection) were calculated for each clonal line. A graphical test (plotting $\log(-\log S_i(t))$ versus $\log(t)$) was used to check that hazard functions of the different clonal lines were proportional. The relative risks of the different lines were then calculated using a Cox regression model [36]. Under the hypothesis that hazard functions are proportional, the relative risk of every line is a time independent value. Thus, after the risk of one line is arbitrary fixed (usually fixed to 1, whatever the actual susceptibility of the line), it is possible to determine the relative risk of the other lines (a risk higher than 1 indicates a higher susceptibility than the reference line). Relative risks take into account not only the final mortality but also the kinetics of mortality, and provide a time-independent parameter useful for comparing resistance of lines to each other (using a χ^2 test, 1df). In a first step, the different clonal lines were given a rank according to their relative risk values considering their performance for each virus separately. In order to compare the resistance status of the different lines after VHSV and IHNV infections, a non parametric correlation was then calculated using the Spearman’s rank coefficient of correlation [37].

Ethics Statement

Animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm), and the animal work was approved by the Direction of the Veterinary Services of Versailles (authorization numbers 78-28 and 58-37) and by the Ethics committee COMETHEA (protocol 12/053).

Results

Great dispersion of resistance levels to VHSV infection across ten rainbow trout clonal lines

Over a four years period of time, juvenile trout from ten clonal lines were infected by immersion with VHSV (Table 14). For each clonal line, mortalities were recorded daily during 21 to 34 days post infection. Kaplan-Meier estimators, based on data from all infection trials, were calculated in order to estimate the survival function of each line. The relative risk of each line was then calculated from the most resistant line (B57), which was chosen as reference (*i.e.* B57 risk was equal to 1). Results are presented in Figures 40 A to C. The ten lines were classified into eight groups significantly different for resistance, refining our previous results [32]. Lines B57 and A2 were almost fully resistant (survival >95%). High levels of resistance were confirmed in lines A32 and B3, though lower than for B57 and A2 (survival higher than 70%). The line B25 was tested for the first time and ranked as intermediate, between B45 and A36. Finally, line AP2 appeared as the most susceptible of the whole set and ranked after the highly susceptible lines A22 and A3. Interestingly, we detected no effect of fish weight on the resistance to this virus: within each clonal line, the relative risks of the different challenges were not statistically different, although mean weight varied up to 5 fold among challenges. Differences among challenges were observed in line B45 (higher susceptibility in year 2008 compared to the other challenges) but occurred in a weight-independent manner (data not shown). Thus, this set of rainbow trout clonal lines appeared as a stable and relevant tool to investigate the factors associated to the variation of the susceptibility to VHSV.

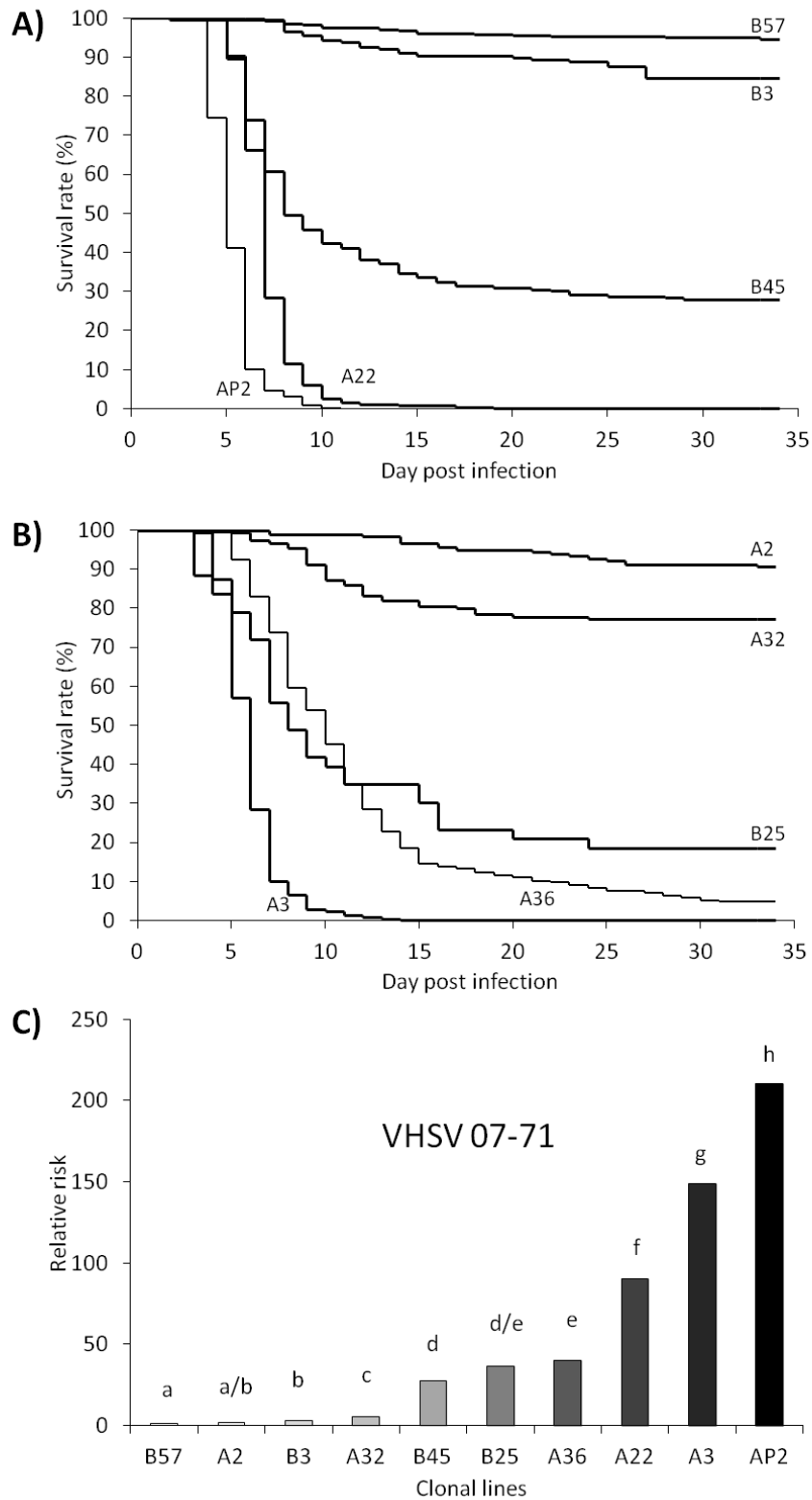


Figure 40. Resistance status of clonal lines after VHSV infection by immersion. (A) & (B) Kaplan-Meier estimates of the survival curves of the different clonal lines after VHSV infection. Data from 10 clonal lines and 6 independent waterborne infections with VHSV 07-71 were analysed (Table 14). For easy reading of figures, clonal lines are presented in two groups (A22, AP2, B3, B45, B57 in (A) and A2, A3, A32, A36, B25 in (B)). (C) Relative risks were calculated with the whole dataset (details in Table 14) and compared to the reference line B57 (risk fixed to 1). Clonal lines are ranked from the most resistant (B57) to the most susceptible (AP2). Lines with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Resistance to IHNV is highly dependent on the fish weight in each trout line

In order to compare the resistance to VHSV and IHNV infections, clonal lines were infected with IHNV (strain 32-87) by immersion. It is well known that trout fry is much more susceptible to IHNV infection than the adults [1, 38], and previous experiments with our clonal lines confirmed that it was also the case in the range of weights tested (0.3 to 5g, [32]). However, large differences in spawning dates and growth among lines prevent the comparison of lines of similar size in a single trial. In order to overcome this problem, we took advantage of our extended dataset based on challenges performed during different years with fish of various sizes to refine the effect of fish weight on the survival of clonal fish after IHNV infection. Within each line, survival analysis was conducted using the aggregated results of all the trials performed in different years. The relative risks according to the mean weight at the challenge time point were then calculated, taking the heavier group as reference (risk defined as 1). Typical results are illustrated for four of the lines in Figure 41. The susceptibility to the virus infection dramatically increased when fish were less than 1g, introducing an important variability of resistance to IHNV that was independent of the genetic background. For instance, the relative risk of A3 fish groups with a low mean weight (0.43g; 0.44g) was 87 and 66 times higher, respectively, than the risk of individuals belonging to the reference group (mean weight 2.5g, risk=1) (Figure 41A). In contrast, for other groups with a mean weight of 1.4g and over, the relative risks ranged from 1 to 5 compared to the reference risk, which was not significantly different from the reference. A similar trend was observed within A22, A36 and B57 (Figure 41B, 41C and 41D, respectively) and the other clonal lines tested in this study (data not shown). Hence, in order to avoid experimental bias due to fish weight difference at the challenge time, trials performed with fish groups weighting less than 1g were removed from the comparison of resistance to IHNV (marked (*) in Table 14). Thus, the maximum relative risk of the different groups within a given clonal line did not exceed 10 times the risk value of the reference (heavier group), which did not represent significant differences ($P < 0.05$). These results showed that once the weight effect had been removed, the different challenges provided a consistent assessment of the resistance of the different lines that can be used for further comparison of line resistances.

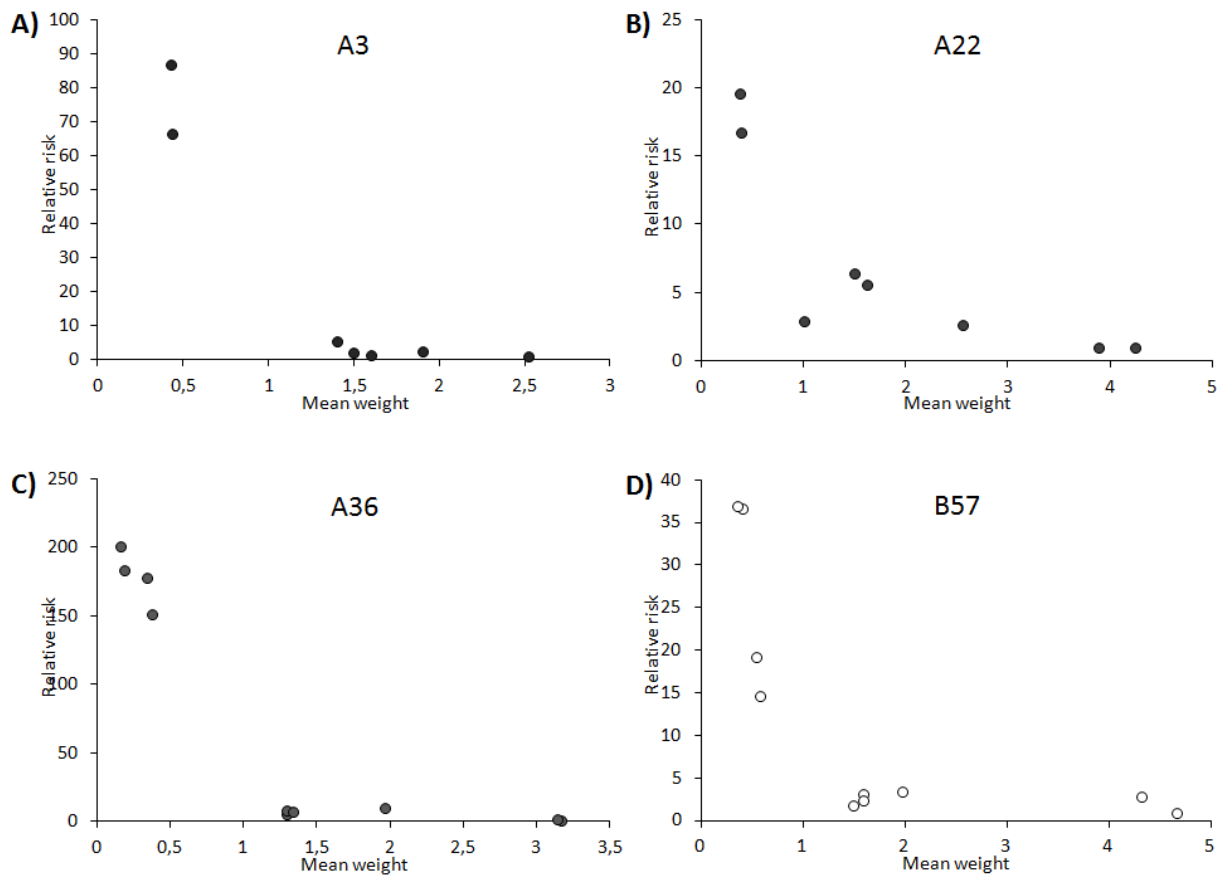


Figure 41. Fish weight-effect on resistance to IHNV infection. Data from 6 independent IHNV infections were compiled (IHNV 32-87 strain). The mean weight in grams of each infected group was recorded before challenge and resistance of the different groups was compared using the relative risk. In each line, the reference group (*i.e.* risk fixed to 1) was the group with the highest mean fish weight. The evolution of relative risks according to body weight is presented for four lines: A3 (A), A22 (B), A36 (C) and B57 (D).

A wide range of resistance to IHNV is observed but is not correlated with resistance to VHSV

Using the weight-corrected data set for IHNV infection, Kaplan-Meier estimators of the survival function after IHNV infection were calculated for the ten clonal lines. As for VHSV, a wide range of susceptibility was observed among the lines (Figure 42A and 42B), with a final survival rate varying from 92% (line A3) to 0% (A32, AP2, B25, B45). The relative risks were calculated using the Cox regression model as previously described. Clonal lines were then ranked according to the relative risk values, choosing the most resistant line A3 as reference (Figure 42C). Seven different groups of relative susceptibility were distinguished ($P < 0.05$). Lines A3, A2 and B57 were the most resistant and B45 and B25 the most susceptible. Line A32 was somewhat atypical, with a low overall risk associated to a delayed mortality but a complete final mortality. In all lines, the initial mortalities after IHNV infection usually occurred later than after VHSV infection (Figures 40A and B and 41A and B).

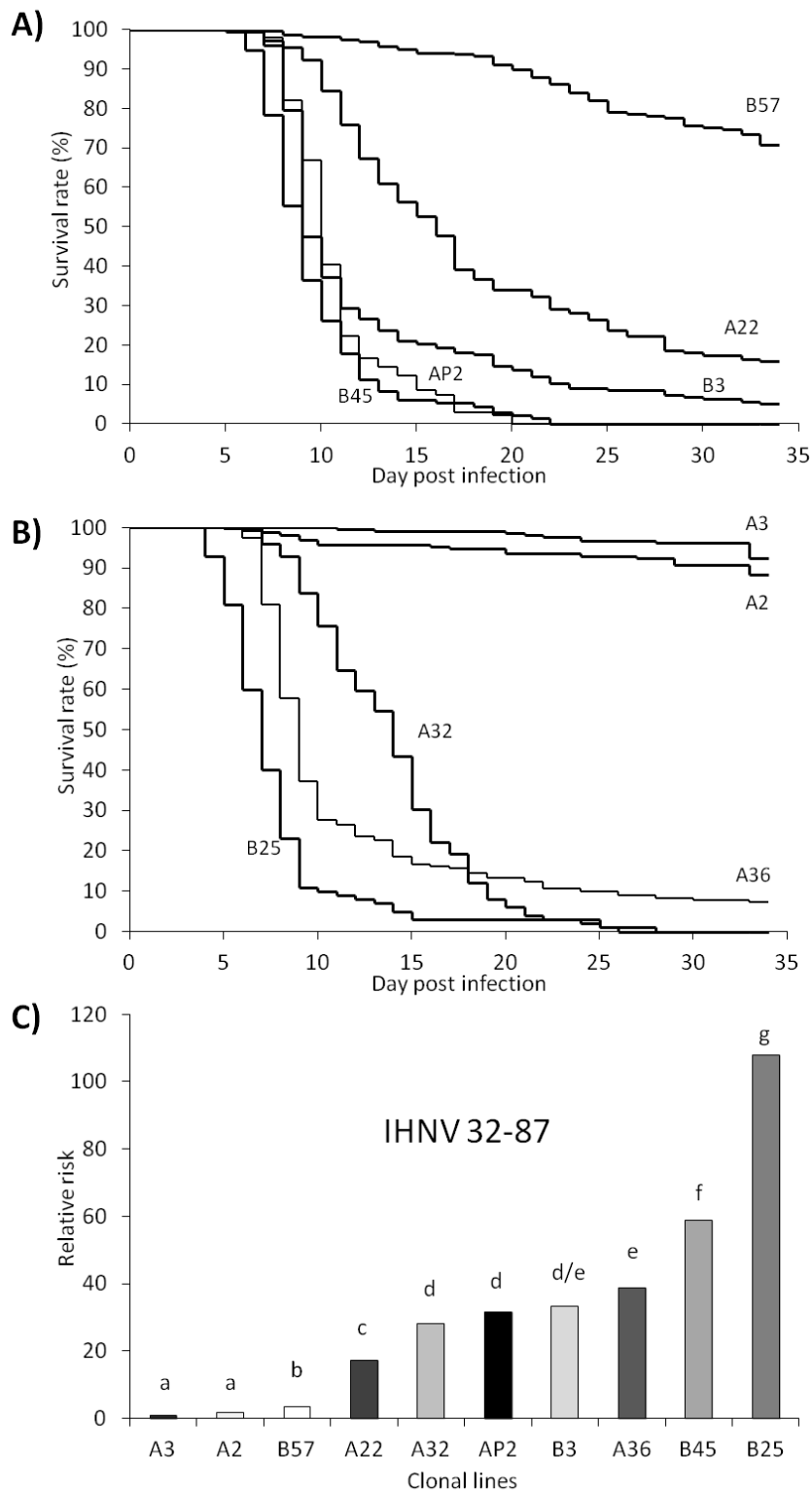


Figure 42. Resistance status of clonal lines after IHN virus infection by immersion. (A) & (B) Kaplan-Meier estimates of the survival curves of the different clonal lines after IHN virus infection. Data from 10 clonal lines and 5 independent waterborne infections with IHN virus 32-87 were analysed. For easy reading of figures, clonal lines are presented in two groups (A22, AP2, B3, B45, B57 in (A) and A2, A3, A32, A36, B25 in (B)). (C) Relative risks were calculated with the weight-corrected data set (elimination of groups with mean body weight lower than 1g, details in Table 14) and compared to the reference line A3 (risk fixed to 1). Clonal lines are ranked from the most resistant (A3) to the most susceptible (B25). Lines with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

This analysis extends and refines our previous results on the broad variability of resistance to IHNV and VHSV within a collection of rainbow trout clonal lines. Interestingly, some drastic differences were observed between ranking of lines for resistance to VHSV and to IHNV. While some lines were resistant (B57, A2) or susceptible (A36, AP2) to both viruses, others exhibited highly contrasted performances. For example, A3 was almost fully resistant to IHNV whereas it was one of the most susceptible lines to VHSV. In contrast, B3 was resistant to VHSV and highly susceptible to IHNV (with a final survival rate of 5%). Similarly, B25 and B45 displayed a medium resistance to VHSV and were highly susceptible to IHNV. To illustrate the change in line ranking, the relative risks of mortality of the ten clonal lines were plotted in Figure 43 for VHSV and IHNV. The non parametric Spearman's rank coefficient of correlation of risks calculated for the different lines and viruses was not significant ($r_s = 0.09$, 5% threshold value = 0.248 for ten pairs of observation [37]). Thus, while a few clonal lines were resistant or susceptible to both VHSV and IHNV, no general correlation between the resistance levels to these viruses could be detected for fish weighting 1 to 5 g.

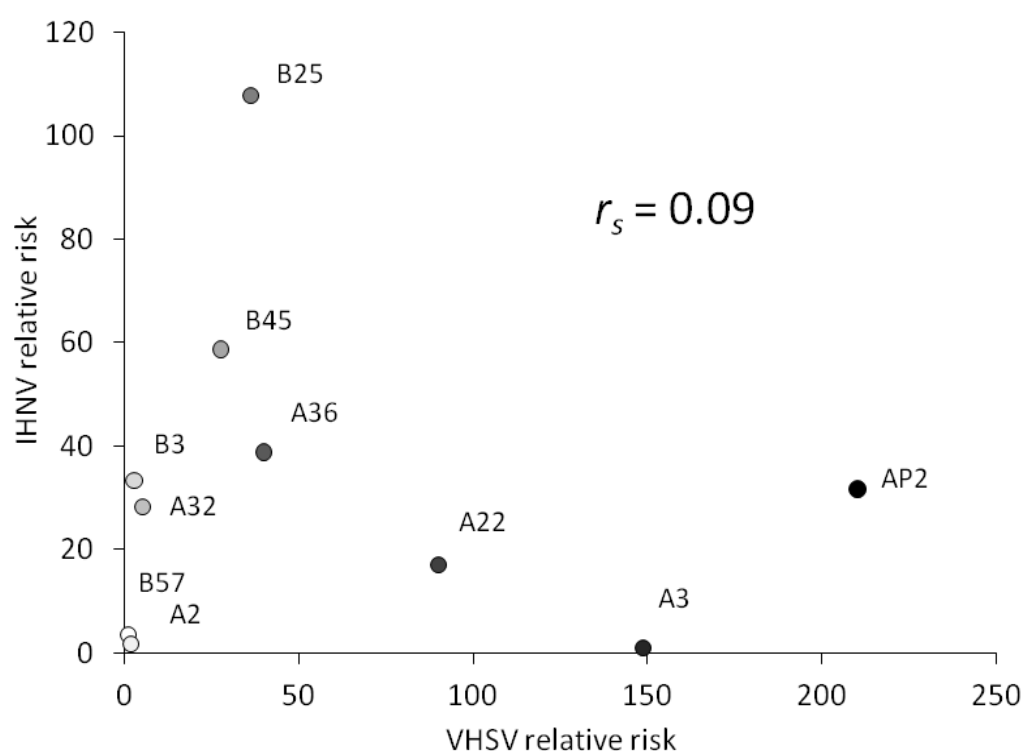


Figure 43. Comparison of relative resistance to IHNV and VHSV of each clonal line. Relative risks of each line are plotted for both viruses. Within each virus, risk values of the lines were relative to the most resistant line (B57 for VHSV and A3 for IHNV). A non parametric correlation analysis was performed using Spearman rank correlation coefficient (r_s).

Viral glycoprotein G plays a key role in the variability of susceptibility to virus infection among lines

The comparison of host groups with divergent responses to VHSV and IHN virus is a possible approach to identify viral factors responsible for virulence. In order to investigate which differences between these two viruses belonging to the same genus could affect the outcome of infection, we performed further experimental infections with a chimeric recombinant IHN virus containing the VHSV glycoprotein gene instead of that of IHN virus (rIHN-Gvhsv). In a first experiment, 40 fish of six lines were challenged in duplicate with rIHN-Gvhsv and wild-type IHN virus and VHSV as controls. Lines selected for this test were classified as exhibiting either a higher relative susceptibility to IHN virus than to VHSV (B57, B3, B45) or a higher susceptibility to VHSV than to IHN virus (A22, A36 and A3). For each line, the relative risks were established for the three viruses, taking the challenge with IHN virus as the reference (risk=1). Results are presented in Table 15 and Figure 44. Because of the small size of the fish in this experiment, overall mortality was very high with IHN virus even for the most resistant line A3 (70% *versus* 97 to 100% for the other lines). For VHSV, the results were consistent with the usual performance of the different lines, with a low cumulative mortality in B57 and B3 (9% and 27% respectively) and mortality close to 100% for the other lines. Final survival rates and relative risks were used to compare the time course of infection across viruses (Table 15). As illustrated in Figure 44, the relative susceptibility of fish lines to the control viruses was lower for VHSV than for IHN virus in lines B3, B45 and B57 (lower risks) and higher for A3 and A22, which was consistent with previous results. Unexpectedly, A36 exhibited a higher susceptibility to IHN virus than to VHSV ($P < 0.001$). The very small size of fish in this line at the time of challenge may have contributed to this opposite result. The effect of fish body weight on mortality associated to IHN virus was observed with both wild type and recombinant IHN virus. This may indicate that the weight effect on susceptibility does not rely only on viral glycoprotein characteristics. In all lines, the risk associated to the recombinant virus was intermediate between IHN virus and VHSV risks. When compared to the wild type IHN virus, the rIHN-Gvhsv virus increased the risk of lines more susceptible to VHSV (A3 and A22) and decreased the risk of lines that performed better against VHSV (B3, B45 and B57). These observations suggested a strong effect of the G protein on the variation of susceptibility among lines.

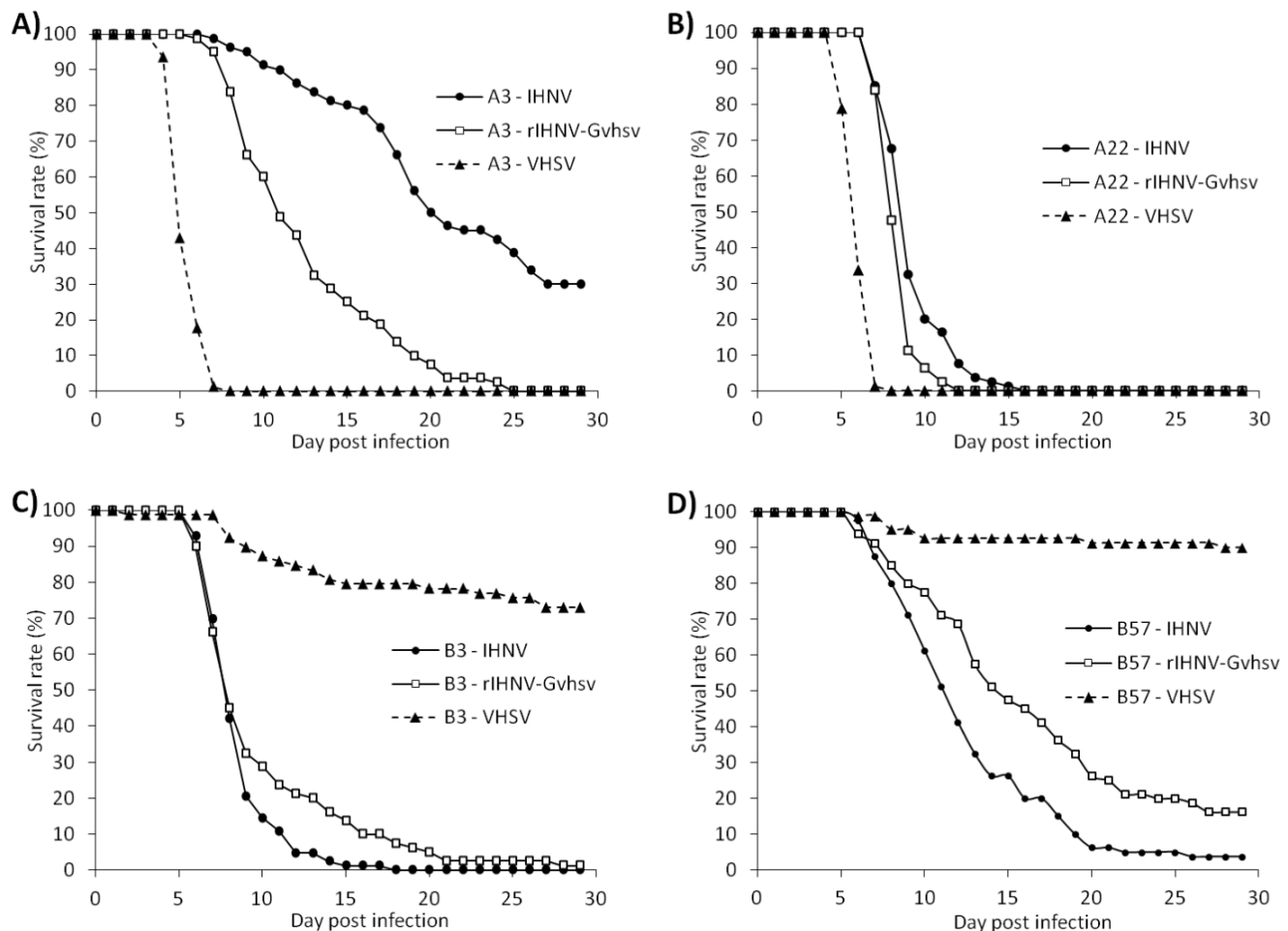


Figure 44. Survival curves in clonal lines after infection with IHNV, VHSV or rIHNV-Gvhsv by immersion. For each line (namely A3 (A), A22 (B), B3 (C) and B57 (D)), 80 fish were infected with either IHNV 32-87, VHSV 07-71 or rIHNV-Gvhsv. Mortalities were recorded daily for 30 days post-infection.

Table 15. Comparison of relative risk and cumulative percent of mortality for each clonal line to IHNV, VHSV and rIHNV-Gvhsv

Virus		VHSV		rIHNV-Gvhsv		IHNV	
Line	Weight (g)	Relative risk	Associated mortality	Relative risk	Associated mortality	Relative risk	Associated mortality
A3	0.45	132.00	100%	4.38	100%	1	70%
A22	0.39	14.08	100%	1.57	100%	1	100%
A36	0.17	0.19	98%	0.41	100%	1	100%
B3	0.50	0.07	27%	0.76 ^{NS}	99%	1	100%
B45	0.49	0.26	100%	0.5	100%	1	100%
B57	0.36	0.04	9%	0.57	85%	1	97%

^{NS}: non significant difference with IHNV risk (χ^2 test (1 df) at $P < 0.05$. All other values are significantly different from the reference risk.

In order to confirm the effect of Gvhsv and Gihnv on fish relative susceptibility and to overcome possible effect of body weight differences among groups, a second experiment

was performed with fish weighing more than 1g. Two lines with highly contrasted ranks with IHNV and VHSV were tested, *i.e.* A3 which is almost fully resistant to IHNV infection and fully susceptible to VHSV infection and A22 among the most resistant to IHNV but still highly susceptible to VHSV (see Figures 40 and 41). Fish were infected by immersion with the wild-type IHNV and recombinant rIHNV-Gvhsv (Figure 45). While A3 fish were almost fully resistant to IHNV infection, they appeared to be highly susceptible to the rIHNV-Gshv, with no survivor at the end of the experiment. However, the mortalities recorded with rIHNV-Gshv infection started only 11 days post-infection, while those induced by VHSV infection were usually recorded around 4-6 days post infection (Figure 40A). A3 fish from additional aquaria were randomly sacrificed at different days post infection to monitor viral titres. Low titres could be measured only from fin tissues and sera from a few fish infected with IHNV, in accordance with the resistant status of the line (Table 16). In contrast, high virus titres were determined from fish infected with VHSV at days 3 and 5 post infection. Regarding the chimeric virus, intermediate titres could be determined as early as day 3 post infection from the fin tissues. Line A22 also appeared more susceptible to rIHNV-Gshv than to IHNV, with 100% mortality after only 9 days post infection (Figure 45). Finally, the susceptibility of A3 and A22 to rIHNV-Gshv was very close to their susceptibility to VHSV infection, as previously observed.

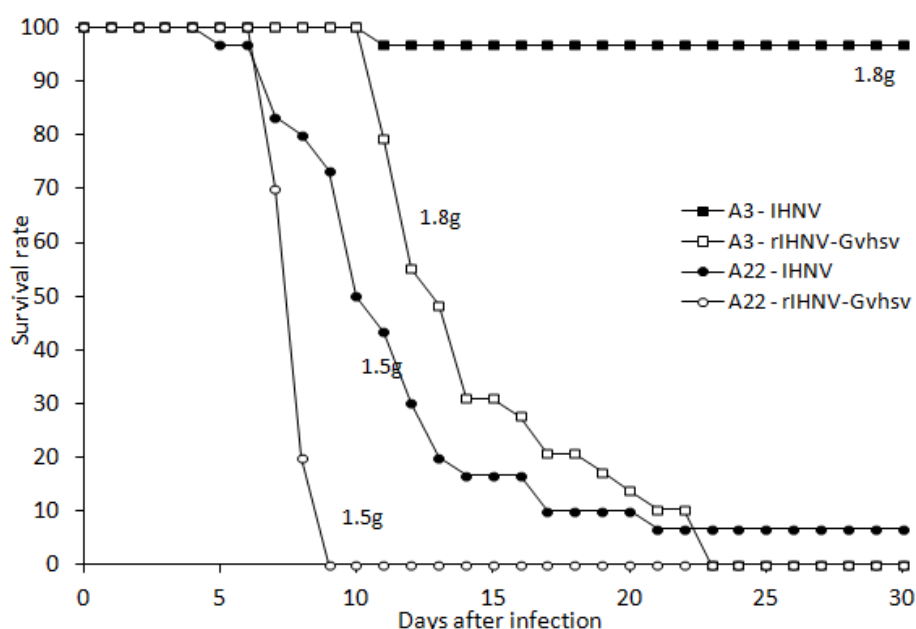


Figure 45. Survival curves of lines A3 and A22 after infection with IHNV and rIHNV-Gvhsv by immersion. Challenges were performed with 30 fish per virus (IHNV 32-87 and rIHNV-Gvhsv) and per line (A3 and A22). Mean weights at challenge are shown on the figure. Mortalities were recorded daily for 30 days post-infection.

Table 16. Virus titer in infected A3 clone line.

Virus ^a	Virus titer ^b											
	Day 3		Day 5		Day 7		Day 10		Day 12		Day 14	
	Serum	Fins	Serum	Fins	Serum	Fins	Serum	Fins	Serum	Fins	Serum	Fins
IHNV	2	3	3	-	3	2	3	1	-	-	-	3
32-87	-	-	-	-	2	1	2	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rIHNV-	4	5	6	4	7	6						
Gvhsv	-	4	3	4	5	5	3	3	NA	NA	NA	NA
	-	3	-	3	5	4						
VHSV	4	6	8	7								
07-71	4	4	8	7	8	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	4	4	7	6								

^a Groups of 12 (IHNV, rIHNV) or 18 (VHSV) fish were infected on day 0 by bath immersion with 5×10^4 PFU/ml of IHNV 32-87, rIHNV-Gvhsv and VHSV 07-71. At different days postinfection, virus was isolated either from the serum or the fins from three randomly sacrificed fish, except for day7 and day10 where only one fish was still alive for VHSV 07-71 and rIHNV-Gvhsv groups, respectively. Non applicable (NA) means that all fish died.

^b The virus titer is expressed in $\log_{10}$ PFU/ml of serum or PFU/g of fin tissue. The lower limit of detection is 10^2 PFU/ml or 10^1 PFU/g. A minus sign (-) is assigned to samples with no detectable virus.

Discussion

In the present study, we compared the natural resistance of ten clonal lines of rainbow trout to bath immersion infection with VHSV and IHNV, two major fish rhabdoviruses. As previously described for VHSV in a smaller collection of clonal lines, a wide range of IHNV fish susceptibility and resistance was observed, with mortality rates ranging from a few percent to 100% after immersion infection of 1-5g juveniles. Six of the lines had been previously tested against infectious salmon anaemia virus [39] and a large variability had also been recorded. Altogether, these results confirm that a large variability of susceptibility to viruses exists in rainbow trout, a fraction of which has been captured in our collection of clonal lines.

Since the levels of susceptibility to infection by VHSV and IHNV were highly variable between clonal lines, we attempted to determine whether they were correlated. In contrast to what was suggested by our previous observations on fewer lines that appeared to be mainly of extreme, shared phenotype [32], no significant correlation could be established

within the range of juvenile body weights tested here. While a few lines exhibited consistent resistance or susceptibility as previously noted, a number of inversions of resistance were recorded, *i.e.* higher or lower susceptibility to IHNV than to VHSV. The most demonstrative example was the line A3, which was almost fully resistant to IHNV but extremely susceptible to VHSV. Overall, our observations do not support the hypothesis that a shared defence pathway would play a key role in the natural resistance to both viruses.

In aquaculture fish species as in terrestrial animals, many results evidence that selective breeding is a promising tool for improving resistance to various diseases including viruses [40]. One important point to consider for establishing successful selection programs is the correlation between target traits. A limited number of studies have investigated the importance of genetic correlations among diseases. Altogether, results indicate that there are limited genetic correlations between the resistances to different diseases and that it should be possible to improve resistance to one disease without major adverse effect on others [30, 41]. The results of the present study indicating no or limited correlations among the two viral diseases are in agreement with previous studies. The lack of correlation means that it should be possible to select fish resistant to both viruses, as exemplified by B57 or A2 fish lines, but that a specific advantage is not expected from the selection for the resistance to one virus regarding the resistance to the other one. However, confirming these results by testing a larger number of genetic origins, *e.g.* standard families from different populations of rainbow trout, would be necessary before developing selection strategies.

The comparison of the trout lines for resistance to IHNV and VHSV revealed differences that could be due either to the virulence mechanisms or to host defence mechanisms. To test the impact of the viral G protein on the resistance to the viruses, we used a recombinant IHNV carrying the VSHV G glycoprotein. The replacement of the G_{ihnv} by G_{vhsv} partially restored the level of resistance/susceptibility observed in the different lines when infected with wild type VHSV. This pattern was observed in all lines, whatever they were more resistant to IHNV or to VHSV. Thus, the properties of the viral G protein have a significant influence on the relative level of resistance of rainbow trout individuals to rhabdoviruses. In some cases, it may even explain most of the difference of resistance to IHNV and VHSV, as illustrated by the fish line A3.

There are several mechanisms through which the viral G protein impacts the virulence of the virus in a given genetic background. First, the G protein recognizes the virus

receptor at the surface of host cells; fibronectin, a glycoprotein of the extracellular matrix, has been shown to mediate trout cell entry of VHSV and several other fish rhabdoviruses including IHNV [42, 43]. Hence, variation of G protein characteristics may have a strong impact on the efficiency of the entry process. Secondly, the G protein is the target of the protective neutralizing antibodies [44, 45]. While in naive fry the specific antibody response is not likely to interfere with the fast mortality post infection, differential reactivity of the natural antibodies to various G proteins may influence the virulence of the virus. Finally, viral G proteins have the ability to induce interferon responses [25, 46]. Additionally, Novirhabdoviruses express anti-interferon mechanisms which are likely to be different in the context of IHNV and VHSV induced pathogeneses, respectively [47]. The implication of the G protein in the regulation of interferon response may therefore explain the differential effects observed.

Additional features seemed to be specific to IHNV or VHSV, whatever the genetic background (clonal line). While the influence of host size on the susceptibility is well established for both viruses, we found it significant for IHNV but not for VHSV within the range of tested weights (0.2-5g). As fish were reared in similar conditions across years, differences in weight mostly corresponded to differences in age at challenge (due to date of spawning which is not the same for the different lines/years and to different dates of trials among years). Fish heavier than 1g were around 130 days post-fertilization old or older, whatever the line. Hence, the distinct effects of body size and age could not be distinguished. In any case, the substitution of Gihnv by Gvhsv in the IHNV did not protect fry from the higher susceptibility associated to low weights/ages which was observed for the wild type IHNV.

Besides, a delay in the first mortality after infection was recorded for IHNV, when compared to VHSV across the different clonal lines. In line A3, the substitution of the G glycoprotein in the IHNV recombinant virus did not abolish the short delay in initial mortality usually observed after IHNV infection compared to VHSV infection. The same tendency was observed with A22 or B3, where mortalities started at the same time for wild-type or recombinant IHNV. These observations suggest that this parameter did not depend on the characteristic of the G protein.

Therefore, the re-ranking of rainbow trout clonal lines when infected by the two viruses underlines both the variety of virulence mechanisms within Novirhabdovirus and the complexity of the host defence mechanisms against the virus. The marked change in relative line susceptibility may indicate that the variability of host response to each virus relies on defence mechanisms specific of some genetic backgrounds. It is also possible that some common defence mechanisms are triggered to face infection but that their relative contribution to the outcome of the infection depends on subtle differences in virus characteristics and virulence factors. Taken together, our results indicate that crossing host and virus genetics is a promising approach to investigate the complexity of host-virus interactions in fish.

Acknowledgement

Authors thank the staff of INRA experimental facilities (fish farms in Gournay-sur-Aronde and PEIMA and platform of infectiology in Jouy-en-Josas) for help in fish management, Amandine Launay and Céline Ciobotaru for microsatellite genotyping. The research leading to these results was supported by the Animal Genetics and Animal Health divisions of INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) and has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7, 2007-2013), Research Infrastructures action, under the grant agreement No. FP7-228394 (NADIR).

References

- [1] Crane M, Hyatt A. Viruses of fish: an overview of significant pathogens. *Viruses* 2011; 3:2025–46.
- [2] Bernard J, Lecocq-Xhonneux F, Rossius M, Thiry ME, de Kinkelin P. Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Gen Virol* 1990; 71:1669–74.

- [3] Thiry M, Lecoq-Xhonneux F, Dheur I, Renard A, De Kinkelin P. Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1090:345–7.
- [4] Benmansour A, Paubert G, Bernard J, De Kinkelin P. The polymerase-associated protein (M1) and the matrix protein (M2) from a virulent and an avirulent strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Virology* 1994; 198:602–12.
- [5] Schütze H, Mundt E, Mettenleiter TC. Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 1999; 19:59–65.
- [6] Schütze H, Enzmann PJ, Kuchling R, Mundt E, Niemann H, Mettenleiter TC. Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *J Gen Virol* 1995; 76:2519–27.
- [7] Lorenzen N, Olesen NJ, Jørgensen PE, Etzerodt M, Holtet TL, Thøgersen HC. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *J Gen Virol* 1993; 74:623–30.
- [8] Koener JF, Passavant CW, Kurath G, Leong J. Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J Virol* 1987; 61:1342–9.
- [9] Benmansour A, Basurco B, Monnier AF, Vende P, Winton JR, de Kinkelin P. Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *J Gen Virol* 1997; 78:2837–46.
- [10] Gaudin Y, de Kinkelin P, Benmansour A. Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *J Gen Virol* 1999; 80:1221–9.
- [11] Kurath G, Leong JC. Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein. *J Virol* 1985; 53:462–8.
- [12] Basurco B, Benmansour A. Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* 1995; 212:741–5.
- [13] Thoulouze M-I, Bouguyon E, Carpentier C, Brémont M. Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol* 2004; 78:4098–107.
- [14] Ammayappan A, Vakharia VN. Nonvirion protein of novirhabdovirus suppresses apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol* 2011; 85:8393–402.

- [15] Harmache A, LeBerre M, Droineau S, Giovannini M, Brémont M. Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *J Virol* 2006; 80:3655–9.
- [16] Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C. In vitro assay to select rainbow trout with variable resistance/susceptibility to viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis Aquat Org* 2007; 76:7–16.
- [17] Verrier ER, Langevin C, Benmansour A, Boudinot P. Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev Comp Immunol* 2011; 35:1204–14.
- [18] Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C. In vitro viral haemorrhagic septicaemia virus replication in excised fins of rainbow trout: correlation with resistance to waterborne challenge and genetic variation. *Dis Aquat Org* 2001; 45:171–82.
- [19] Peñaranda MMD, Purcell MK, Kurath G. Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics. *J Gen Virol* 2009; 90:2172–82.
- [20] Purcell MK, Lapatra SE, Woodson JC, Kurath G, Winton JR. Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 2010; 28:98–105.
- [21] Verrier ER, Langevin C, Tohy C, Houel A, Ducrocq V, Benmansour A, Quillet E, Boudinot P. Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status. *PLoS One* 2012; 7:e33935.
- [22] Verrier ER, Dorson M, Mauger S, Torhy C, Ciobotaru C, Herve C, Dechamp N, Genet C, Boudinot P, Quillet E. Resistance to a Rhabdovirus (VHSV) in Rainbow Trout: Identification of a Major QTL Related to Innate Mechanisms. *PLoS One* 2013; 8: e55302
- [23] Winton JR. Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Dev Biol Stand* 1997; 90:211–220.
- [24] de Kinkelin P, Béarzotti M, Castric J, Nougayrède P, Lecocq-Xhonneux F, Thiry M. Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicaemia in France. *Vet Res* 1995; 26:379–87.
- [25] Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, Benmansour A. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 1998; 249:297–306.
- [26] Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R, Lorenzen N. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Gen Virol* 2004; 85:1167–79.
- [27] Kurath G, Garver KA, Troyer RM, Emmenegger EJ, Einer-Jensen K, Anderson ED. Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J Gen Virol* 2003; 84:803–14.

- [28] Stone DM, Way K, Dixon PF. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). J Gen Virol 1997; 78 :1319–26.
- [29] Wahli T, Bergmann SM: Viral haemorrhagic septicaemia (VHS). Detection, distribution and combat. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural 2011; 6:1–10.
- [30] Henryon M, Berg P, Olesen NJ, Kjær TE, Slierendrecht WJ, Jokumsen A, Lund I. Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. Aquaculture 2005; 250:621–636.
- [31] Palti Y, Parsons JE, Thorgaard GH. Identification of candidate DNA markers associated with IHN virus resistance in backcrosses of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and cutthroat trout (*O. clarki*). Aquaculture 1999; 173:81–94.
- [32] Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P. Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. Fish Shellfish Immunol 2007; 22:510–9.
- [33] Ducrocq V, Sölkner J, Mészáros G: Survival Kit V6 - a Software Package for Survival Analysis (ID232). In 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP) Leipzig, Germany. 2010.
- [34] Dorson M, Chevassus B, Torhy C. Comparative susceptibility of three species of char and of rainbow trout x char triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses. Dis Aquat Org 1991; 11:217–224.
- [35] Biacchesi S, Béarzotti M, Bouguyon E, Brémont M. Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a Novirhabdovirus. J Virol 2002; 76:2881–2889.
- [36] Cox D. Regression models and life table. J Royal Stat Soc. 1972; 34:187–220.
- [37] Sprent P. Pratique des statistiques nonparamétriques. Paris: INRA; 1992
- [38] Lapatra SE: Factors affecting pathogenicity of infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) for salmonid fish. J Aquat Anim Health 1998; 10:121–131.
- [39] Biacchesi S, Le Berre M, Le Guillou S, Benmansour A, Brémont M, Quillet E, Boudinot P. Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. J Fish Dis 2007; 30:631–6.
- [40] Moen T. Breeding for resistance to viral diseases in salmonids. In: Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB, editors. Breeding for disease resistance in farm animals, Ed. 3. Wallingford, UK: CABI; 2010, p. 166–179.

- [41] Ødegård J, Olesen I, Gjerde B, Klemetsdal G. Positive genetic correlation between resistance to bacterial (furunculosis) and viral (infectious salmon anaemia) diseases in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 2007; 271:173–177.
- [42] Bearzotti M, Delmas B, Lamoureux a, Loustau a M, Chilmonczyk S, Bremont M. Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J Virol* 1999; 73:7703–9.
- [43] Liu X, Collodi P. Novel form of fibronectin from zebrafish mediates infectious hematopoietic necrosis virus infection. *J Virol* 2002; 76:492–8.
- [44] Lorenzen N, Olesen NJ, Jørgensen PE. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J Gen Virol* 1990; 71:561–7.
- [45] Engelking HM, Leong JC. The glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus elicits neutralizing antibody and protective responses. *Virus Res* 1989; 13:213–30.
- [46] Lorenzen N, Lapatra SE. Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol* 1999; 9:345–360.
- [47] Choi MK, Moon CH, Ko MS, Lee U-H, Cho WJ, Cha SJ, Do JW, Heo GJ, Jeong SG, Hahm YS, Harmache A, Bremont M, Kurath G, Park JW. A nuclear localization of the infectious haematopoietic necrosis virus NV protein is necessary for optimal viral growth. *PLoS One* 2011; 6:e22362.

Abstract

The *Viral Hemorrhagic Septicemia Virus* (VHSV) and the *Infectious Hematopoietic Necrosis Virus* (IHNV) are two rhabdoviruses responsible for serious outbreaks in salmonid farms. To date, little is known about the variability of host response to these viruses. Using gynogenetic clonal lines of rainbow trout exhibiting a wide range of resistance to viral infections, we showed that there was no correlation between the resistance to VHSV and IHNV. We also confirmed the importance of fish weight for its susceptibility to IHNV infection. Finally, using a chimeric recombinant IHNV expressing the VHSV glycoprotein, we showed that the glycoprotein plays a key role in the virulence and in the level of resistance observed in different genetic backgrounds. Taken together, our results provide new prospects for a better understanding of host responses to rhabdovirus infections in salmonids.

Eléments complémentaires

Absence de QTL majeur de résistance au VNHI dans la région du QTL SHV

Nous avons cherché à savoir s'il y avait un QTL de résistance au VNHI dans la région du QTL SHV, malgré l'absence de corrélation des résistances aux deux virus dans nos lignées. Comme le QTL SHV contrôle un caractère non spécifique de défense antivirale, il est en effet possible que ce caractère soit commun à deux virus de la même famille. On peut par exemple imaginer un même facteur présentant une forte variabilité allélique liée à des modalités différentielles de restriction des deux virus en fonction du génotype de l'hôte.

Sur les croisements déjà réalisés dans le cadre de l'étude du QTL SHV, certains d'entre eux sont en fait également le résultat d'un croisement entre lignées sensible et résistante au VNHI. Des individus de ces familles ont donc été infectés par le virus VNHI dans les mêmes conditions que le VHSV et ont été génotypés pour un marqueur proche du QTL SHV en fonction des disponibilités (polymorphisme dans la famille et qualité du marqueur). Parmi les familles, on retrouve celles précédemment étudiés :

- Les descendants gynogénétiques HD issus du croisement B57AP2 (B57 est résistante au VNHI et AP2 sensible).
- Ceux issus du BC B57A22 (B57 est résistante et A22 sensible, bien que les différences soient moins marquées que dans le croisement précédent).
- Et ceux du BC A36A3 (A3 est résistante et A36 sensible).

Une nouvelle famille a également été testée, correspondant à un BC entre un mâle F1 A2A36 et une femelle A2 (A2 est résistante et A36 sensible). Les poissons de cette famille ont par ailleurs été infectés par injection du virus (10000 PFU par poisson). Les résultats des génotypages sont indiqués Table 17. Les poissons sont regroupés en fonction de leur statut après infection (mort/vivant) et la fréquence des génotypes au marqueur étudié est comparée entre les deux statuts. Un test du χ^2 est alors effectué pour vérifier l'existence d'une différence éventuelle de fréquence génotypique entre les poissons morts et vivants.

Table 17 : Répartition des poissons en fonction de leur génotype à un marqueur proche du QTL SHV après infection par le VNHI 32-87.

Famille	Type	Nbe	Mf	Marqueur	Vivants			Morts			χ^2	p
					R/R	R/S	S/S	R/R	R/S	S/S		
B57AP2	HD	249	38,6 %	M10	75		75	52		39	1,2	0,28
B57A22	BC	269	21,9 %	M10	101	108		35	24		2,6	0,11
A36A3	BC	270	63 %	M2	41	58		96	74		5,7	0,02
A2A36 ^a	BC ^b	111	50,5 %	M10	25	26		34	19		2,4	0,12

^a Infection par injection du virus

^b Back-cross sur femelle A2

Nbe : nombre de poissons passés en épreuve et génotypes.

Mf : mortalité finale du lot.

R : allèle provenant de la lignée résistante au VNHI (B57, A3, A2).

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de QTL majeur associé à la résistance au VNHI dans la région du QTL SHV. Le seul résultat significatif (à $p < 0,05$) va dans le sens d'une hausse de fréquence du génotype résistant au VNHI chez les poissons morts et *vice-versa* chez les poissons survivants. La résistance à ce virus dans nos lignées est donc sans doute majoritairement contrôlée par une (ou plusieurs) autre(s) région(s) du génome confirmant l'idée d'une absence de corrélation entre résistance aux deux infections. Ces résultats restent néanmoins à confirmer car obtenus à l'aide d'un test peu puissant, sur un nombre pas toujours très élevé de poissons ou avec peu de mortalité dans le groupe et avec un seul marqueur.

Bonne corrélation entre résistance des cellules et des poissons

Parallèlement, nous avons voulu vérifier si, comme dans le cas de l'infection par le VHSV, le parallélisme de résistance entre poissons et cellules dérivées était conservé avec ce second rhabdovirus. Trois lignées cellulaires (A2 et A3, issues de poissons résistants au VNHI et A22 issue de poissons sensibles) ont donc été infectées avec le VNHI 32-87 à différentes concentrations virales et les cellules ont été fixées et colorées après 3 jours d'infection afin d'évaluer la destruction des tapis cellulaires. Les résultats sont indiqués Figure 46 et

montrent que les cellules issues de lignées résistantes au VNHI (A2 et A3) résistent bien à ce virus, contrairement aux cellules A22 dont le tapis est complètement détruit aux plus fortes concentrations.

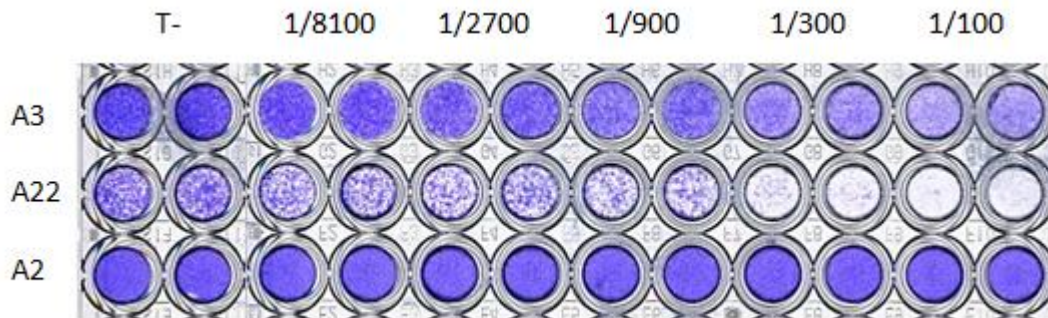


Figure 46 : Destruction du tapis cellulaire après infection par le VNHI 32-87. Les cellules sont incubées 3 jours avec le virus à différentes concentrations (les dilutions sont indiquées au dessus des puits) puis fixées et colorée au Crystal violet.

Ceci suggère donc que bien qu'apparemment différents, les mécanismes de résistance au VNHI sont également de nature innée. Il serait intéressant d'approfondir ces résultats à l'aide de toutes nos lignées disponibles et en élargissant les critères observés (production de virus, nombre de copies de transcrits N après quelques heures d'infection). Ces résultats ouvrent en tout cas des perspectives intéressantes dans la compréhension des mécanismes de résistance à ces deux virus chez la truite arc-en-ciel.

Discussion générale

Rappel des principaux résultats

Un QTL majeur de résistance à la SHV retrouvé dans des génotypes variés de truite arc-en-ciel

Le premier résultat important de cette étude est la mise en évidence d'un QTL majeur de résistance au VHSV dans la région télomérique du GL31 (Omy3) chez la truite arc-en-ciel. Dans les premières familles d'haploïdes doublés étudiées, ce QTL explique jusqu'à plus de 60% de la variance phénotypique. Cette région contrôle à la fois la survie et la croissance virale *in vitro* sur explant de nageoire (elle-même corrélée à la survie des poissons, Quillet *et al.*, 2001) suggérant l'implication de mécanismes innés dans les différences de résistance observées dans ces familles. La présence de ce QTL a été confirmée dans de nombreuses autres familles obtenues en croisant des lignées isogéniques ayant une résistance variable à l'infection. La mesure de croissance virale sur les nageoires de poissons de ces lignées a confirmé la corrélation avec la survie, renforçant la cohérence d'ensemble des résultats. Ceux-ci montrent en outre que si les mécanismes recherchés sont bien de nature innée, la résistance n'est pas liée à des spécificités cellulaires des barrières physiques que sont la peau et le mucus du poisson (on retrouve le QTL après infection par injection intrapéritonéale du virus). Les premières analyses du contenu en gènes dans la région indiquent que celle-ci est très riche en gènes de l'immunité. Cette région semble donc très importante pour la résistance à ce virus dans l'ensemble de la population étudiée.

La résistance dépend des stades précoces de l'infection au niveau cellulaire.

A partir de lignées cellulaire fibroblastiques dérivées de ces lignées isogéniques de truite, le rôle majeur des facteurs innés dans la résistance à l'infection par le VHSV a été confirmé : les résistances des cellules (destruction du tapis cellulaires ou production de virus) sont très corrélées à la résistance des poissons. De plus, les étapes précoces semblent primordiales puisque dès 4 heures après infection, les différences d'expression d'un transcrit viral entre lignées sensibles et résistantes sont déjà visibles, indiquant que le contrôle de la prolifération virale est déjà effectif. L'expression précoce d'interféron semble jouer un rôle complémentaire dans la résistance d'une des lignées (B57). Toutefois, cette activité précoce

n'est pas systématiquement associée à la résistance alors que la comparaison des lignées A2 et B57 suggère l'existence en amont d'un mécanisme commun de contrôle de la réplication virale (qui serait indépendant de l'IFN). Le fait de ne pas retrouver le QTL dans le croisement B57A2 (qui est pourtant relativement sensible) indique que d'autres régions que le QTL majeur peuvent expliquer une partie de la résistance qui serait rompue à l'état hétérozygote.

Pas de corrélation entre la résistance au VSHV et au VNHI

L'infection des lignées isogéniques avec le VNHI, un virus de la même famille que le VSHV, indique qu'il n'y a pas de corrélation entre les résistances à ces infections. En particulier, certaines lignées sont extrêmement résistantes au VNHI et extrêmement sensibles au VSHV (lignée A3). Ceci suggère l'existence de modalités distinctes d'élaboration de la résistance. Ces résultats sont confirmés puisqu'on ne retrouve pas de QTL majeur pour la résistance au VNHI dans la région du QTL SHV. Cependant les premiers résultats sur cellules semblent montrer que la résistance à ce virus dépend également de facteurs innés : en effet, la résistance des lignées cellulaires dérivées (estimée par la destruction du tapis après infection) semble également corrélée à la survie des poissons. De plus de précédentes études ont indiqué les rôles primordiaux des stades précoces dans les conséquences d'une infection au VNHI chez la truite arc-en-ciel (Peñaranda *et al.*, 2009; Purcell *et al.*, 2010), suggérant l'existence d'un (ou plusieurs) mécanismes du même type que pour la résistance au VSHV mais à des niveaux différents.

Caractérisation du QTL SHV

La carte femelle

Le QTL majeur de résistance à la SHV en région télomérique du GL31 de truite arc-en-ciel a d'abord été identifié à l'aide d'individus gynogénétiques haploïdes doublés. Les informations des marqueurs en zones télomériques ont confirmé que très peu de recombinaisons avaient eu lieu dans cette zone durant la méiose femelle. Les marqueurs génétiques disponibles dans la zone étaient colocalisés sur la carte génétique. Ceci a freiné l'étude du QTL en profondeur en particulier car il était difficile de le borner. Par conséquent, la taille précise de la région et la distance du dernier marqueur (Omy1392INRA) au QTL n'ont pu être déterminées. L'utilisation d'haploïdes doublés répondait pourtant à une logique double : tout d'abord, l'utilisation de la gynogénèse permettait l'obtention d'individus homozygotes à phénotype plus contrasté, particulièrement intéressants pour l'étude des caractères quantitatifs. Par ailleurs, la carte femelle est globalement plus étendue que la carte mâle, du fait des plus nombreuses recombinaisons à l'échelle du génome durant la méiose femelle (Sakamoto *et al.*, 2000), ce qui en faisait une carte plus résolutive pour la recherche de QTL. Cette circonstance générale a été mise en défaut dans ce cas précis et les croisements par voie mâle (mis en place pour compléter l'analyse) ont en fait permis de sérieusement avancer dans la connaissance du QTL.

Différences cartes mâle et femelle : hétérochiasmie

Cette impressionnante différence entre les taux de recombinaison durant les méioses mâle et femelle n'est pas l'apanage des salmonidés. Ce phénomène, appelé hétérochiasmie est en fait décrit depuis le début du 20^e siècle : les premières études d'association chez la drosophile *Drosophila melanogaster* montrèrent alors qu'aucune recombinaison n'avait lieu chez le mâle durant la méiose (Morgan, 1912). L'hétérochiasmie est assez courante chez les eucaryotes. Elle est assez difficile à mesurer car, même au sein d'une espèce, il existe beaucoup de grandes variations du taux de recombinaisons d'un génotype à l'autre et d'un chromosome à l'autre (Lenormand, 2003). Cependant, l'observation principale est que la

plupart du temps la fréquence de recombinaison est plus élevée chez la femelle que chez le mâle (Lenormand et Dutheil, 2005). Ceci a été en particulier montré chez les salmonidés, la truite arc-en-ciel donc (Sakamoto *et al.*, 2000) et le saumon atlantique (Moen *et al.*, 2004). Même si les mécanismes expliquant ces différences ne sont pas encore connus, plusieurs théories existent : (1) Bernstein *et al.* (1988) suggèrent qu'un métabolisme globalement plus élevé chez la femelle pourrait être à l'origine de ce phénomène. Cependant, ceci n'expliquerait pas pourquoi l'on retrouve de l'hétérochiasmie chez les animaux hermaphrodites (Lenormand, 2003). (2) La règle de Haldane-Huxley suggère que chez les espèces hétérogamétiques X Y, le taux de recombinaison est moins important chez les individus hétérogamétiques (donc les mâles X Y), ce qui limite les crossing overs entre chromosomes sexuels. Comme conséquence, les crossing overs sont également moins nombreux sur les autosomes (Haldane, 1922; Huxley, 1928). L'exemple extrême se trouvant dans les espèces achiasmates comme le Bombyx ou la drosophile, où aucun crossing over n'a lieu durant la méiose mâle.

Quoi qu'il en soit, l'hétérochiasmie n'est pas homogène à l'échelle du génome, ni d'ailleurs à l'échelle du chromosome. Si le phénomène est décrit chez l'Homme et la souris depuis quelques années (Kong *et al.*, 2002; Shifman *et al.*, 2006), une étude récente sur d'autres vertébrés a montré que le taux de recombinaison était beaucoup plus élevé chez le mâle que chez la femelle dans les seules régions télomériques (chez le chien, le porc, l'opossum ou le poulet, Popa *et al.*, 2012). La truite arc-en-ciel ne déroge donc pas à la règle en cela, puisque dans notre étude, une zone d'environ 2cM sur une carte génétique femelle de la région télomérique du GL31 mesure en fait jusqu'à 66cM sur une carte génétique mâle. Il est d'ailleurs à noter que nos cartes génétiques mâles sont obtenues à partir de néomâles génétiquement XX, et qu'elles sont comparables à celles de (Miller *et al.*, 2012) obtenues à partir de mâles androgénétiques YY. L'origine des mécanismes responsables de l'hétérochiasmie semble donc venir des fonctionnements intrinsèques des méioses mâles et femelles et non des différences génétiques entre les individus de sexes différents. Quoi qu'il en soit, l'information de nombreux marqueurs supplémentaires (tous colocalisés sur une carte génétique femelle) a pu ainsi être exploitée grâce aux cartes mâles. Ceci nous a permis de borner le QTL et on peut maintenant affirmer qu'il se trouve proche du marqueur M6.

Cependant, différents points restent à éclaircir. Premièrement, la taille physique absolue de la région contenant le QTL est toujours inconnue. Les variations de distances entre les marqueurs sur les cartes génétiques mâles et femelles ne nous permettent pas d'estimer avec une précision raisonnable la correspondance entre cM et nombre de bases (qui est de 1cM pour 1 Mégabase à l'échelle du génome de la truite arc-en-ciel). La séquence du génome de la truite – bientôt disponible – devrait permettre de connaître le contenu de cette zone avec plus de précision. L'autre indication est qu'on ne retrouve pas d'allèle au marqueur M6 (et plus généralement à aucun marqueur de la zone) qui soit préférentiellement associé à la résistance ou la sensibilité entre les différentes familles utilisées. Ceci peut signifier que nous nous en trouvons encore assez loin. La richesse en gènes impliqués dans la réponse immunitaire de la région peut aussi indiquer qu'il existe deux QTL très proches, ce qui pourrait expliquer l'absence de déséquilibre de liaison. Cette hypothèse pourrait être étudiée dans une population si plus de marqueurs sont développés.

Une autre hypothèse (non exclusive) suggère que le QTL, contrôle un mécanisme nécessaire à la résistance mais pas suffisant dans tous les cas. Ceci expliquerait pourquoi la lignée A36, que l'on suppose porteuse de l'allèle de résistance au QTL SHV (le QTL n'est pas retrouvé dans le croisement A2A36) est en fait relativement sensible à l'infection, mais avec une cinétique lente. Une ou plusieurs autres régions du génome seraient responsables de la sensibilité finale de cette lignée. Cette/ces régions contrôleraient un mécanisme en aval de celui contrôlé par le QTL majeur, ce qui expliquerait la cinétique de mortalité plus lente. Ceci est compatible avec les mortalités observées lorsque l'on croise les lignées B57 et A2 pourtant toutes deux résistantes à l'infection, puisqu'au stade actuel de l'étude, on suppose que les poissons des deux lignées possède le même allèle de résistance au QTL. (QTL retrouvé dans le croisement B57A3 et A2A3).

Le développement de nouveaux marqueurs et un génotypage de ces différentes familles couvrant l'ensemble du génome devrait aider à mieux comprendre les mortalités observées dans ces lignées et ces croisements.

Indirectement, les données issues des études fonctionnelles *via* le modèle *in vitro* permettront également de mieux caractériser les mécanismes et ainsi aider à trouver les gènes de la région qui sont importants pour la résistance.

L'apport du modèle *in vitro* à la compréhension des mécanismes de résistance

L'intérêt des lignées cellulaires

Le développement des lignées cellulaires à partir des lignées isogéniques de truite arc-en-ciel nous a permis de commencer à comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance. Cet outil permet d'avoir une projection des caractéristiques des génomes de poisson dans un contexte de type cellulaire particulier qu'on peut confronter à un certain nombre d'analyses et d'infections : on peut ainsi facilement mesurer par plusieurs paramètres leur résistance à l'infection virale. En outre, ce modèle *in vitro* permet de mesurer facilement l'expression des gènes de façon cinétique au cours de l'infection, d'induire certaines voies moléculaires et d'avoir ainsi une bonne idée à l'échelle de la cellule de la réponse à différents stimulus dont l'infection virale. Ce modèle est donc un bon outil au niveau cellulaire pour comprendre les différences entre les fonds génétiques disponibles. Elles sont en outre relativement faciles à mettre en œuvre (en principe) et à entretenir lorsqu'elles sont établies. De plus, elles possèdent l'avantage contrairement aux extraits d'organes de n'être composées que d'un seul type cellulaire (en l'occurrence des fibroblastes).

Notre modèle cellulaire est aussi et surtout très intéressant dans l'étude des mécanismes de réponse au VSHV car la résistance des cellules miment parfaitement celle des poissons. C'est donc un outil puissant pour l'étude des mécanismes innés de la réponse antivirale. Cette caractéristique semble s'étendre à l'infection par le VNHI et il serait intéressant de vérifier si elle se confirme pour d'autres virus et pathogènes : des études sur les lignées ont déjà montré qu'il existait une variation de résistance pour l'infection au VNPI mais on ne connaît pas encore la gamme de sensibilité des lignées isogéniques à l'infection par ce virus. A l'inverse, on sait que les poissons ont aussi une sensibilité différentielle à l'infection par *Flavobacterium psychrophilum*, le modèle cellulaire pourrait donc se révéler utile également dans l'analyse de cette infection.

Les études *in vitro* faisant appel à des lignées même type cellulaire ayant des sensibilités variables aux infections virales existent déjà même si elles sont peu nombreuses.

Certaines lignées cellulaires de chien, de porc et de lapin ont ainsi été sélectionnées pour leur résistance au BVDV (*bovine viral diarrhea virus*) (Dezengrini *et al.*, 2006). Chez le saumon atlantique, deux lignées de leucocytes provenant du rein antérieur (SHK-1 et TO) ont montré des niveaux de résistance différents à l'infection par l'alphavirus du saumon associés à un niveau d'expression différentiel du gène *Mx* (Gahlawat *et al.*, 2009). Plus récemment, des sensibilités variables ont été observées sur deux lignées de fibroblastes humaines au virus du Chikungunya (Thon-Hon *et al.*, 2012). L'originalité de notre modèle est que nous avons à notre disposition un relativement grand nombre de lignées cellulaires ayant une gamme assez variée de résistance à l'infection par le VSVH (des extrêmes mais aussi certaines de sensibilité intermédiaire), ce qui en fait un outil très résolutif pour la compréhension des mécanismes de résistance.

Les contraintes du modèle cellulaire

L'utilisation de ces lignées cellulaires se heurte cependant à certaines limites, et les résultats obtenus à partir de ce modèle sont à mettre en perspective avec les incertitudes dues à sa nature. Au sein d'une lignée cellulaire établie, au fur et à mesure des divisions cellulaires, des anomalies et des aberrations chromosomiques non contrôlées sont susceptibles d'apparaître, modifiant le génome et le métabolisme des cellules. Ainsi, lors de l'établissement de lignées cellulaires de poissons zèbres au laboratoire, une duplication complète du génome avec doublement du nombre de chromosomes dans les cellules fut observée après seulement quelques passages. Au cours de notre étude, certaines modifications phénotypiques ont pu être observées sur nos lignées cellulaires de truite : au fur et à mesure des divisions, certaines lignées dégénéraient et les cellules finissaient par mourir, et une sous lignée B57 est même devenue sensible à l'infection par le VHSV (alors que la lignée mère était très résistante)... Ceci nous a donc encouragés à définir un cadre optimal d'utilisation des lignées cellulaires, qui se situait entre 10 et 20 passages de cellules (c'est-à-dire 10 à 20 épisodes de repiquage des cellules dans une autre flasque après décollement à la trypsine). Il faut aussi mentionner les fonds génétiques potentiellement incompatibles avec la culture cellulaire : ainsi les lignées cellulaires dérivées de poissons A36 se sont révélées très difficiles à utiliser, les cellules ayant une faible croissance voire

dégénérant rapidement après mise en culture. Ceci nous a privés d'informations fonctionnelles concernant cette lignée pourtant particulièrement intéressante vu les résultats de l'analyse QTL.

L'utilisation des cellules se heurtent également aux limites dues à la disponibilité des outils de biologie cellulaire disponibles chez la truite arc-en-ciel : peu d'anticorps sont disponibles, et leur utilisation en immunofluorescence montre une faible spécificité. Il est également difficile de transfecter nos cellules, les efficacités de transfection à l'aide des lipofectants classiques étant quasiment nulles. La seule méthode qui fonctionne est l'électroporation *via* le protocole Amaxa, méthode qui se révèle assez destructrice pour les cellules (beaucoup de mortalité enregistrées 24h post-transfection). Ce manque d'outil peut être gênant pour l'analyse de certains mécanismes, et notamment l'étude des caractères innés potentiellement impliqués dans la cellule : interactions protéines virales – protéines de l'hôte, études des protéines endogènes impliquées dans l'entrée du virus, dans sa réplication (récepteur en particulier...). La caractérisation fine de ces étapes nécessite ce type d'expérimentation, c'est pourquoi aujourd'hui il est impossible d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes innés responsables de la résistance par cette approche là.

Malgré ces limites, il a été possible d'étudier les potentiels mécanismes antiviraux cellulaires par des études d'expression de gènes.

L'étude de la voie Interféron

En mesurant l'expression de gènes d'intérêt par qPCR, nous avons ainsi pu explorer la voie Interféron dans nos différents fonds génétiques, afin de vérifier qu'elle était fonctionnelle dans nos lignées, y compris celles sensibles à l'infection. Cependant, cette approche reste préliminaire, l'expression d'un seul gène *IFN ϕ* (*IFN ϕ 1*, du premier groupe des « type I » des IFNs de poissons) ayant été mesurée. Elle doit être donc complétée à l'aide des autres *IFN ϕ s* connus chez la truite arc-en-ciel. Une tentative de construction d'amorces à l'aide de séquences d'*IFN ϕ* putatives (identifiées par des chercheurs d'Aberdeen) s'est révélée infructueuse à ce jour, indiquant que ces gènes ne sont en fait pas connus de manière sûre.

Il serait également intéressant d'élargir le nombre d'ISGs mesurés après infection. Pour le moment, seuls les gènes *Mx* ont été analysés. Une tentative à l'aide d'amorces amplifiant le transcrit *vig-1* a montré que ce gène n'était en revanche pas exprimé dans nos cellules fibroblastiques, comme nous l'attendions d'après des résultats antérieurs. Une analyse transcriptomique globale a d'ailleurs été entamée dans ce sens. Le séquençage de transcriptomes à haut débit à partir de lignées cellulaire et de tissus de poissons issus de lignées sensibles et résistantes (B57 et A22) a été réalisé *via* la technologie Illumina (HiSeq 2000). Le but est de faire une description globale des gènes différentiellement exprimés entre poissons/cellules infectés ou non d'une part et entre lignées sensibles/résistantes d'autre part. Les séquençages ont eu lieu à la plateforme génomique de Toulouse (INRA) et les analyses sont aujourd'hui en cours de traitement. Ce projet s'inscrivait originellement dans le cadre de cette étude, mais : (1) des problèmes techniques ont retardé le projet de plus d'un an. (2) entre-temps, nos résultats ont montré que les stades précoces étaient déterminants dans l'issue de l'infection, or les cellules que nous avons récoltées pour le transcriptome l'étaient 24h après mise en contact avec le virus. Cependant, ces résultats nous donnerons quand même une information sur l'état des cellules après 24h d'infection, et notamment sur le panel des ISGs exprimés.

L'analyse des récepteurs des IFN ϕ s mérite aussi d'être complétée. Un seul type d'IFN ϕ recombinant a été utilisé pour tester la fonctionnalité du récepteur des IFN ϕ . Ceci nous a permis de conclure que le récepteur des IFN ϕ s du groupe 1 (dimère CRFB1 - CRFB5) était fonctionnel dans nos différents fonds génétiques. Pour être complet sur cette étude, stimuler les cellules à l'aide d'un IFN ϕ recombinant du groupe 2 permettrait de tester la fonctionnalité du complexe CRFB2 – CRFB5 dans nos différents fonds génétiques, et d'éliminer définitivement ces gènes de la liste des gènes candidats le cas échéant.

Faire le lien entre études positionnelles et analyses fonctionnelles

Deux approches différentes ont donc permis de mieux comprendre la résistance à l'infection par le VHSV chez la truite arc-en-ciel. Elles confirment toutes les deux le résultat principal de l'étude, à savoir que la résistance à l'infection est majoritairement due à des

facteurs innés. Cet éclairage réciproque est surtout un bon exemple de la complémentarité de ces deux types d'approches.

Validation fonctionnelle de gènes candidats potentiels

Chez la truite arc-en-ciel, la séquence du génome n'est pas encore disponible, et un relativement faible nombre de gènes est annoté, ce qui complique l'exploration fine de régions génomiques d'intérêt. Cependant, grâce aux banques de BACs et d'ESTs disponibles, un premier travail d'analyse d'une partie de la région potentielle du QTL a été réalisé (Carine Genêt, non publié). Cette région est très riche en gènes de l'immunité. Ainsi, la présence de *tlr7* et *tlr8a* (publiée par Palti *et al.*, 2010) a pu être confirmée. Différents gènes de la famille des *crfbs* sont également présents. Le modèle cellulaire nous permet alors vérifier si les voies moléculaires impliquant les gènes candidats potentiels de la zone sont fonctionnelles dans nos différentes lignées. Ainsi, il semblerait que CRFB1 soit fonctionnelle dans les différents fonds génétiques sensibles et résistants que nous avons étudiés : l'induction de *Mx* et d'*IFN ϕ 1* semble équivalente dans les différentes lignées cellulaires après stimulation par l'*IFN ϕ 1* recombinant, indiquant un récepteur aux *IFN ϕ s* de groupe I fonctionnel. Ceci indique que c'est n'est pas une variation dans la séquence des gènes qui codent pour les protéines de ce récepteur qui explique les différences de résistance observées. L'analyse après la mise en contact des cellules avec différentes doses d'*IFN ϕ 1* recombinant devrait être faite pour confirmer.

Cartographie de gènes candidats

Réciproquement, connaître la localisation génomique de la résistance permet aussi de vérifier la localisation de gènes candidats fonctionnels susceptibles d'expliquer les différences de résistance observées et certains d'entre eux ont pu être cartographiés. Ainsi, le gène codant pour la fibronectine (protéine d'adhérence cellulaire), récepteur cellulaire du VHSV était un gène candidat potentiel a priori. Les premières recherches (Carine Genêt, non publié) ont montré qu'il existe plusieurs gènes codant pour des protéines de ce type dans le

génomique de la truite arc-en-ciel, mais aucun de ceux qui ont pu être cartographiés à ce jour ne semble localisé dans la zone du QTL SHV. D'autres gènes potentiellement impliqués dans la résistance antivirale ont également été cartographiés, comme les gènes *vig-2*, *vig-3*, *vig-4*, *vig-5* et *vig-10* (respectivement situé sur les GL29, GL19, GL17, GL6 et GL1). Aucun ne colocalise avec une zone QTL, majeure ou secondaire. En revanche, un gène *Mx* a été placé sur le GL29, dans une zone QTL secondaire dans une des familles décrites au chapitre 4. Il est possible qu'un polymorphisme dans ce gène explique une partie de la résistance dans certaines familles.

Intérêt d'une approche intégrée

Notre étude aborde de façon synthétique et sans *a priori* (en partie) la compréhension des mécanismes de résistances au virus chez les poissons téléostéens. Les deux approches – positionnelles et fonctionnelles - ne sont pas exclusives mais au contraire complémentaires.

Outre son importance en sélection, cette étude montre l'intérêt de la connaissance de la variabilité génétique au sein d'une population dans l'analyse des voies moléculaires impliquées. La production de lignées à phénotypes très contrastés *via* la gynogenèse facilite l'utilisation de ce type d'approche. Ces outils seront très utiles à l'avenir pour continuer le projet et découvrir le ou les gènes responsables des différences de résistances observées.

Perspectives

Caractérisation du QTL – élément d'un groupe de synténie conservé ?

Les prochaines études devront s'intéresser à la caractérisation fine du contenu du QTL. Comme la séquence du génome de la truite arc-en-ciel n'est pas encore disponible, une des approches possibles est d'étudier le contenu de la zone par comparaison avec des génomes de référence, en espérant que l'association des gènes de la zone de notre QTL soit

conservée. Bien entendu, plus les individus sont phylogénétiquement proches, plus les chances d'avoir des régions conservées d'un génome à l'autre sont a priori élevées. Chez l'épinoche, par exemple, une région du GL 16 est assez colinéaire avec la région du QTL SHV chez la truite arc-en-ciel (Guyomard *et al.*, 2012) (on retrouve entre autres *trl7*, *tlr8* et des récepteurs des IFNs). L'étude détaillée des gènes de cette région chez l'épinoche pourrait nous donner des indications sur les potentiels gènes candidats présents dans la zone, même si des ruptures de synténie ont déjà été identifiées (Genêt, non publié).

Les comparaisons avec le génome de l'Homme sont délicates. L'éloignement phylogénétique avec les salmonidés comprend entre autres deux épisodes de duplications supplémentaires chez la truite arc-en-ciel. Un avantage est cependant que la distance permet précisément d'identifier des groupes de synténies particuliers. En fait, les premières études de séquençage de BACs de la région du QTL 31 nous ont permis d'identifier des homologues de gènes humains qui sont tous concentrés dans un groupe de quatre régions paralogues (ou Ohnologues) : cette tétrade (3q13, 11q23, 21q21, 1q22) identifiée à partir de l'étude des gènes *CTX*, est issue du chromosome contenant le proto-CMH des vertébrés, tout comme le groupe de synténie du CMH identifié par Kasahara *et al.* (1996), faisant écho à l'idée d'une double duplication génomique durant l'évolution ancienne des vertébrés formulées par Ohno (1970) à partir des gènes de globine (voir Figure 8, 1R et 2R). Les quatre régions paralogues (que nous considérerons donc ici comme un groupe de synténie « mineur » du CMH) sont en fait issues d'un produit de *cis* duplication du proto CMH à travers les deux épisodes de duplication complète du génome ayant eu lieu lors de l'émergence des vertébrés (voir Figure 47) (Flajnik et Kasahara, 2001; Du Pasquier *et al.*, 2004). Il a par ailleurs été décrit que certains des éléments de la tétrade étaient présents chez les poissons, notamment les gènes de la famille B7, molécules exprimées par les cellules présentatrices d'antigène et reconnues par les récepteurs des cellules T (Hansen *et al.*, 2009).

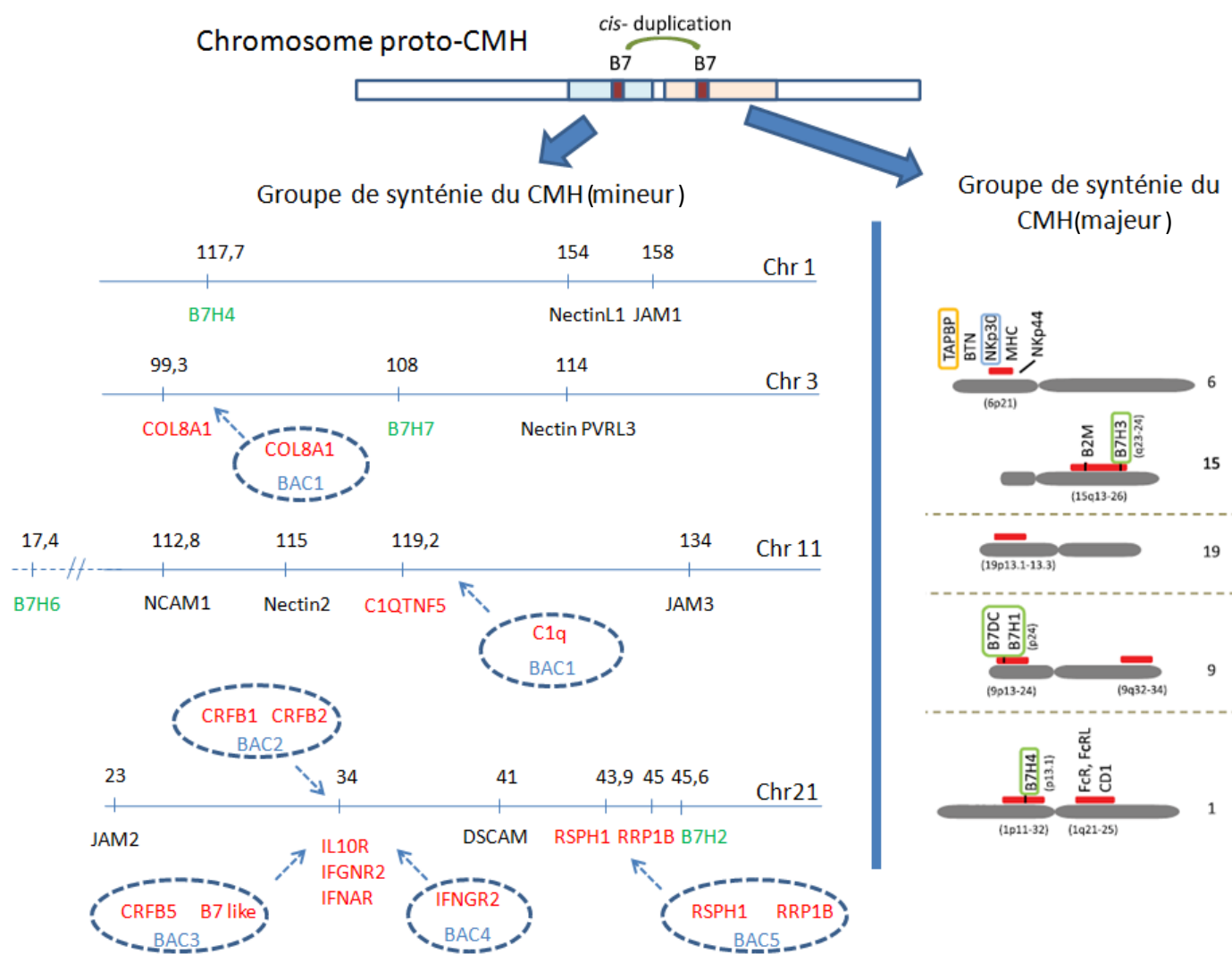


Figure 47 : présentation schématique des deux groupes de synténies issus du chromosome proto-CMH (adapté de Hansen *et al.*, 2009) chez l'Homme et complétée pour la truite à partir de Genêt (non publié). Quatre portions des chromosomes (*H. sapiens*) de la tétrade sont représentées. L'échelle est en Mégabases. Les gènes en noir sont des marqueurs de la région, les gènes en vert sont les gènes de la famille B7, les gènes en rouge sont les gènes possédant des homologues dans la région du QTL SHV, retrouvés après séquençage de BACs (indiqués dans les cercles bleus).

Il a été retrouvé dans plusieurs BACs situés a priori dans la région du QTL SHV des homologues des gènes présents dans ce groupe de synténie (Boudinot et Genêt, non publié). Il est donc possible que nous nous trouvions dans une région issue elle aussi (au moins en partie) du produit de *cis* duplication du proto-CMH. Or, chez l'Homme, ces régions contiennent de nombreux gènes de la superfamille des immunoglobulines, souvent des molécules d'adhésion impliquées dans la biologie des cellules de l'immunité. Certains de ces gènes codent pour des protéines jouant le rôle de récepteurs de réovirus et de poliovirus

(Du Pasquier, 2004). La protéine NCAM (dont le gène est présent sur un des chromosomes de la tétrade) est en outre un récepteur du virus de la rage, un rhabdovirus (Thoulouze *et al.*, 1998). L'analyse précise du contenu en gènes de la tétrade et la recherche d'homologues chez la truite arc-en-ciel permettra donc peut-être de contribuer à identifier les déterminants des mécanismes de résistance au VHSV.

Cartographie fine du QTL

Afin d'étudier la région plus en détail, l'utilisation de croisements avancés issus des croisements de clones ou de ceux précédemment décrits permettra d'induire de nouvelles recombinaisons, et ainsi petit à petit d'éliminer des marqueurs qui sont trop loin du QTL. Un projet est également en cours pour séquencer entièrement le génome des lignées isogéniques. Les informations de ces génomes permettront d'identifier des polymorphismes existant entre différents fonds génétiques et donc de déterminer la/les mutations responsables des différences phénotypiques observées.

Etude en population commerciale

Dans cette étude, seules des familles d'individus homozygotes particuliers ont été analysés. Il serait intéressant de produire des familles QTL à partir de populations commerciales et ainsi de mesurer l'importance du QTL au sein de ces populations, et essayer d'identifier un déséquilibre de liaison. Ceci permettra en outre de confirmer des effets d'additivité ou de dominance, que l'on a pu observer à l'aide des croisements de lignées isogéniques : les premières études sur les hybrides F1 semblent montrer que la sensibilité est globalement un caractère dominant : les descendants issus d'un parent très résistant (B57, A2) et d'un parent très sensible (A3, A22) sont sensibles, avec des mortalités allant jusqu'à 100%. Par ailleurs, le croisement de deux lignées résistantes (B57 et A2) donne des individus ayant une mortalité de près de 50% après infection par le VHSV, indiquant que d'autres régions du génome indépendantes du QTL SHV peuvent induire une sensibilité à l'infection à l'état hétérozygote.

Changer de point de vue

Un autre moyen de continuer l'analyse des mécanismes de réponse aux virus chez la truite arc-en-ciel est de travailler à génome de l'hôte constant et de modifier les autres paramètres. Les travaux sur la comparaison de la résistance au VHSV et au VNHI (deux virus du même genre, mais provoquant des maladies différentes et ayant des spectres d'hôtes différents) indiquent qu'il n'y a aucune corrélation entre la sensibilité aux deux virus. La région du QTL SHV ne joue probablement aucun rôle dans la résistance au vu des premières familles analysées. Pourtant, les premiers résultats cellulaires semblent indiquer que les facteurs de résistance au VNHI sont également des facteurs innés et il a été montré que les stades précoces étaient également très importants pour l'issue de l'infection (Peñaranda *et al.*, 2009; Purcell *et al.*, 2010). L'étude de l'expression des IFN ϕ après infection au VNHI permettrait peut-être de mieux comprendre les différences de réponse observées après les deux infections.

Il est à noter également que les poissons de la lignée B57 sont non seulement résistants à ces deux virus, mais également à d'autres virus comme l'ISAV (Biacchesi *et al.*, 2007). Il serait intéressant de savoir si dans ce cas précis, ce sont les mêmes mécanismes non spécifiques qui interviennent dans la résistance à ces différents pathogènes.

On pourrait également s'intéresser à la variabilité observée intra-lignées isogéniques. Au sein d'une même lignée, les individus possèdent tous le même fond génétique. Et pourtant, l'issue de l'infection varie d'un individu à l'autre au sein des lignées. Ainsi, pour la lignée A36, on observe régulièrement de 10 à 20% d'individus survivants à l'infection. Il serait intéressant d'analyser cette variabilité intra-lignées afin de vérifier si cela est uniquement dû aux variations environnementales entre les individus. En particulier, on pourrait sélectionner des individus résistants au sein d'une lignée et les croiser, afin de vérifier si le niveau de résistance des descendants est supérieur ou non au niveau de résistance de référence de la lignée. Cela permettrait par exemple d'identifier certains facteurs épigénétiques transmissibles impliqués dans la résistance au virus.

Conclusions

Cette étude a démontré l'influence d'une région majeure impliquée dans cette résistance ou la sensibilité dans de nombreux fonds génétiques. Cette notion de région majeure va donc à l'encontre du modèle communément admis en génétique quantitative, le modèle polygénique (multitude de gènes à petits effets sur le phénotype). Il est en fait faux dans un certain nombre de cas, et il n'est pas rare d'observer des variations de phénotypes contrôlées uniquement par un seul gène. Ceci est évidemment un avantage lorsque l'on souhaite sélectionner des individus pour un caractère donné. Ainsi, dans les populations d'animaux domestiques, il existe un certain nombre d'exemples de sélection des individus pour des caractères à déterminisme simple (liste non exhaustive): le cornage chez les bovins (gène « sans corne »), la couleur des œufs ou des pattes chez la poule, l'accroissement du taux de muscle chez les bovins (gène de la myostatine, phénotype « culard »), et la résistance à la tremblante chez les ovins, qui a conduit à la mise en place du premier programme de sélection pour la résistance aux maladies chez les animaux d'élevage (en 2002), et d'autres... (Cours en ligne 2).

Certaines études ont montré que la résistance aux maladies infectieuses chez les vertébrés pouvait également être contrôlée par un gène ou une région majeure : ainsi comme décrit dans le chapitre 1, des mutations dans le gène TLR3 peuvent être responsables de la sensibilité à certains virus chez l'Homme (Alcaïs *et al.*, 2009). En fait, dans la très grande majorité des cas, la résistance aux maladies à déterminisme simple concerne des infections virales chez les vertébrés (voir Chapitre 1 pour les exemples). La plupart des études d'associations entre résistance aux infections bactériennes ou parasitaires et variabilité génétique chez les vertébrés conduit à la découverte de QTL multiples, comme la résistance aux mammites ou aux infections à tiques chez les bovins (Bishop *et al.*, 2010) par exemple, ou encore la résistance aux salmonelles chez les ovins (Lantier *et al.*, 2012) et le poulet (Calenge *et al.*, 2009; Fife *et al.*, 2010). Chez les poissons également, plusieurs QTL ont été détectés dans des familles de truite arc-en-ciel après infection par la bactérie *Flavobacterium psychrophilum* (Palti *et al.*, 2012 ; Quillet, non publié). En fait, la seule étude décrivant un locus majeur de résistance aux infections non virales chez les vertébrés a été décrite chez la truite arc-en-ciel (QTL de résistance au parasite *Myxobolus cerebralis* identifié par, Baerwald *et al.*, 2011).

Quoiqu'il en soit, la présence d'un QTL majeur favorise la mise en place de schémas de sélection pour la résistance à ce virus comme c'est le cas pour la résistance à VNPI chez le saumon atlantique (voir chapitre 1). Cependant, la mise en place de tels schémas doit se faire de façon maîtrisée. En effet, le QTL ayant un effet très fort sur la variance phénotypique, l'allèle de résistance sera très rapidement fixé dans l'ensemble de la population sélectionnée, supprimant ainsi toute diversité génétique à ce locus. Or, si le virus par mutation acquiert la capacité de contourner la résistance conférée par cet allèle, les éleveurs auront perdu toute marge de manœuvre pour réagir. Il est donc important d'explorer les autres régions potentiellement importantes pour la résistance (comme les QTL secondaires identifiés) et en tenir compte dans la mise en place des schémas de sélection. Ce QTL offre également l'opportunité d'investigations approfondies sur les mécanismes sous-jacents qui caractérisent cette résistance, et en particulier la description du/des gène(s) et de la/des mutation(s) causale(s), non seulement en vue de la synthèse de molécules antivirales ou de schémas de sélection, mais aussi pour la compréhension générale des réponses antivirales chez les vertébrés.

Les mécanismes de cette réponse antivirale sont encore assez mal décrits chez les poissons. Cependant, ils semblent relativement bien conservés entre poissons et mammifères, comme le montre l'organisation des deux systèmes IFN, structurellement assez différents mais fonctionnellement particulièrement bien conservé. Notre approche sans *a priori* est un bon moyen d'avancer vers la description complète des mécanismes et des cascades en jeu chez les poissons. Notre étude décrit un résultat original, montrant que la résistance cellulaire est remarquablement bien corrélée à la résistance des poissons après infection virale. Elle est un premier pas vers la découverte d'une catégorie de mécanismes potentiellement nouveaux de résistance aux virus, qui quoi qu'il en soit permettra de mieux comprendre l'évolution des interactions hôtes-virus chez les vertébrés.

Annexes

Annexe 1 : Figures & Tables complémentaires

1) Chapitre 4

Table S1. Markers used for detection of survival-associated QTL and results of association tests for family DH-F98.

Table S2. Markers used for detection of survival-associated QTL and results of association tests for family DH-F00.

File S1. Markers used to refine the effect of the major survival-associated QTL and for detection of VREFT-associated QTL in the two DH families

TABLE S1

List of microsatellite markers used for detection of survival-associated QTL (DH-F98)

Linkage Group	Marker	Position	Accession number	χ^2
RT1	OmyFGT19/1TUF	7.6	Sakamoto ^a	0.08
	Omy1200INRA	24.2	BV681488	0.015
	Omy1326INRA	54.2	BV681457	0.995
RT2	Str1BFRO/1	34.9	U90327	1.211
	OmyFGT18/1TUF	111.2	Sakamoto ^a	0.822
	OMM1200	111.2	AF469985	0.343
	OMM1218/1	115.4	AF469991	0.293
	OMM1206/1	117.1	AF470000	0.022
RT3	Omi161TUF	12.3	AB105853	0.686
	OMM1230	37.2	AF470010	0
	OGO2/1UW	72.1	AF007827	0.001
	Omy1097INRA	104.3	BV681357	1.82
RT4_25	OMM1193	15.6	AF469978	0.037
	Ogo2/2UW	100.1	AF009794	0.57
	OMM1054	132.8	AF352739	1.151
RT5	OMM1728	26.4	BV212208	0.207
	OMM1032	60.3	AF352737	0.46

RT6	OMM1231	9.2	AF470011	0.51
	Omy1143INRA	36.7	BV681517	0.01
	OMM1776	120.2	BV212244	0.82
RT7	Omy207UoG	29.7	O'Connell ^b	0.47
	OMM1351	66.1	G73581	0.53
	One1/2ASC	96.9	U56699	0.9
RT8	OMM1075	0	AF352746	0.23
	OMM1792	37.1	BV212253	0.45
	Omy18INRA	59.4	Pr009689144.1	0.08
RT9	OMM1206/2	0.8	AF469991	0.02
	OMM1218/2	4.1	AF470000	0
	OMM1200/2	4.1	AF469985	0.03
	OmyFGT18/2TUF	5.2	Sakamoto ^a	0.09
	OmyFGT28TUF	24.5	Sakamoto ^a	0.31
	OMM1450	58.7	BV079594	0.25
	OMM1130	84.6	AF375031	0.08
	OMM1096	98.8	AF352762	0.41
RT10	OMM1179	0	AF469966	0.03
	One10ASC	17.8	U56710	1.01
	OmyRGT2TUF	37.2	AB087587	3.77
	OMM1753	67.7	BV212227	4.16
	OMM5186	85.5	BV212286	2.48
	OMM1202/1	104.3	AF469987	4.02
RT11	Ocl1UW	12.4	AF028694	4.83
	Omy7DIAS	15.7	AF239043	6.89
	SSOSL32/1	42.3	Z69642	0.91
	Omy23INRA	52.9	Pr009689146.1	0.34
	OMM1004	52.9	AF375008	0.26
RT12	OMM5233	15.7	CA349039	0
	OMM1030	45.4	AF375012	1.98
	OMM3059	78	BV078095	0
	OMM1381	95.1	BV078067	1.08
RT13	OMM1216	6.1	AF469998	0.06
	Omy1479INRA	45.2	BV686475	0.69
RT14	OMM1241	1.7	AF470021	0
	Omy1214INRA	23.6	BV681478	2.87
	SSa14DU	54.1	McConnell ^c	0.2
	Omy120/2INRA	100.7	Pr009689154.1	0.17
	Omy4/1INRA	110.9	Pr009689136.1	0.16
RT15	OMM1455	17.2	BV079599	0.35
	Ots1BML	53.2	AF107029	0

RT16	Omy14INRA	83.6	Pr009689141.1	0.26
	Omy1383INRA	98.2	BV681442	3.65
	OMM1101	8.6	AF352765	3.66
	Omy1038INRA	23.1	BV681522	2.31
	OMM1013	59.5	AF346674	0.02
RT17	OMM1156	90.7	AY039638	0.67
	OMM1403	109.2	BV078088	0.57
	OMM1076	15.6	AF352747	0.12
	OtsG422	49.2	AF393197	0.94
	OMM1775	87.4	BV212243	0.04
RT18	Omy1DIAS	46	U93270	0.03
	OMM1311	50.2	G73551	0.28
	Omy335UOG	67.3	Jackson ^d	2.02
RT19	Ocl8UW	0	AF028697	0.04
	OMM1025	40.2	AF346682	0.01
	OMM1313	60.7	G73553	0.02
	One3ASC	98.8	U56701	0.1
RT20	OMM1050	11.8	AF346694	0.06
	Omy8DIAS	48.5	AF090390	9.23
	Omi102/1TUF	78.8	AB105844	0.2
	Omy120/1INRA	95.7	Pr009689154.1	1.99
	Omy4/1INRA	103.5	Pr009689136.1	0.29
RT21	OmyFGT2TUF	21.8	Sakamoto ^a	0.18
	OmyFGT27TUF	47.8	Sakamoto ^a	0.05
	OMM5014	73.8	CO805119	0.02
	OMM5179	95.2	BV211905	0
	OMM1271	116.1	AF470036	0.64
RT22	OMM1023	3.4	AF346681	2.58
	OMM1744	32.8	BV212219	1.87
	Str58CNRS	51.8	U60223	2.23
	OMM1445	68	BV079589	1.43
	Ssa420UOS	92.3	AJ402737	0.98
RT23	OMM1069	0.9	AF375018	0.02
	OMM1097	7	AF352763	0
	Omy1501INRA	33.6	BV681375	0
	OMM1339	55	G73572	0.69
	OMM1190	72.8	AF469975	0.26
RT24	Omy1278INRA	91.2	BV681436	0.43
	Omy1103INRA	116.4	BV681351	1.12
	OmyFGT16TUF	0	Sakamoto ^a	0.01
	OMM1045	9.7	AF346692	0.22

	OMM1211	19.3	AF469995	0.36
	Omy1342INRA	31.5	BV686468	1.34
	Ssa85DU	49.9	U43692	6.79
	Omy4DIAS	66.8	AF090389	8.37
	OMM1322	79.7	G73560	3.5
RT26	Omy1517INRA	21.9	GF111273	0.12
	OMM3000	37.1	G73802	0
	SSOSL32/2	62.5	Z69642	0.01
RT27	Omy29INRA	13.5	Pr009689149.1	6.06
	OMM1131	18.6	AF375032	6.05
	One18/1ASC	24.7	U56718	10.76
	Ocl2UW	44.5	AF028699	0.59
	Omy272/1UoG	46.3	Jackson ^d	0.21
	OMM1070	59.8	AF375019	1.84
	Omy25INRA	101.7	Pr009689147.1	0.84
RT29	OMM1033	0.9	AF375013	9.73
	Ots108SSBI	14.2	AF069680	9.96
	OmyFGT3TUF	39.7	Sakamoto ^a	3.79
	OMM1705	57.4	BV212187	0.03
	Omy21INRA	77.1	Pr009689145.1	1.24
	OMM1187/2	109.9	BV681499	1.85
RT30	Omy108INRA	28.3	Gharbi ^e	0.66
	OMM1238	48.1	AF470018	0.06
RT31	One18/2ASC	12	U56718	0.01
	Omy272/2UoG	21.4	Jackson ^d	0.75
	Omy1006UW	42	AY518329	3.29
	OMM1058	53.2	AF352741	3.49
	OMM1083	54.1	AF352751	5.41
	BHMS129	76	AF256764	13.16
	OMM5164	88.4	BV211874	23.85
	OMM5005	118.7	CO805111	144.95
	Omy1392INRA	119.5	BX861189	153.98

References:

^a Sakamoto 1997 PhD Thesis, Tokyo Univ. Of Fisheries

^b O'Connell *et al.* 1997 Can J Fish Aquat Sci 54:1391

^c McConnell *et al.* 1995 Can J Fish Aquat Sci 52:1863-1872

^d Jackson *et al.* 1998 Heredity 80:143

^e Gharbi *et al.* 2006 Genetics 172(4): 2405–2419

Position: marker positions are given according to Guyomard *et al.* 2012.

χ^2 : comparison of allele frequencies (R vs. S grandparental allele) in the two population tails (early dead & survivors) at each locus.

TABLE S2

List of microsatellite markers used for detection of survival-associated QTL (DH-F00)

Linkage Group	Marker	Position	Accession number	χ^2
RT1	OmyFGT19/1TUF	7.6	Sakamoto ^a	0.82
	Omy1200INRA	24.2	BV681488	0.18
	Omy17INRA	54.2	Pr009689143.1	0.02
RT2	Str1BFRO/1	34.9	U90327	0.01
	Omy1197/1INRA	17.3	BV681489	0.03
	OMM1200	111.2	AF469985	0.01
	OMM1218/1	115.4	AF469991	0.04
RT3	Omi161TUF	12.3	AB105853	2.24
	OMM1230	37.2	AF470010	0.27
	OGO2/1UW	72.1	AF007827	0.27
	Omy1137INRA	91.7	BV681523	0.1
RT4_25	OMM1193	15.6	AF469978	0.41
	OMM1389	107	BV078075	0.47
	OMM1054	132.8	AF352739	0
RT5	OMM1728	26.4	BV212208	1.94
	OMM1032	60.3	AF352737	0.03
RT6	OMM1231	9.2	AF470011	0.07
	Omy1143INRA	36.7	BV681517	3.38
	OMM1780	63.5	BV212247	1.78
	OMM1454	72.7	BV079598	1.61
	Cocl-lav221	109.2	AY453223	0
	Omy16INRA	135.9	Pr009689142.1	0.04
	Ogo4UW	3.3	AF009796	0.02
RT7	Omy207UoG	29.7	O'Connell ^b	0.36
	OMM1087	57.8	AF352756	1.84
	One1/2ASC	96.9	U56699	0.34
	OMM1075	0	AF352746	0.62
RT8	Omy1390INRA	7	BV681569	5.58
	OmyUW1198	25.3	AY505310	10.03
	OMM1792	37.1	BV212253	13.03
	Omy18INRA	59.4	Pr009689144.1	10.8
	OMM1009	66.3	AF346671	11.6
	Omy1042INRA	88.3	BV681405	2.06
	OMM1218/2	4.1	AF470000	4.72
RT9	OMM1200/2	4.1	AF469985	6.74
	OmyFGT18/2TUF	5.2	Sakamoto ^a	7.88

RT10	OMM1161	15	AY039643	0.84
	OmyFGT28TUF	24.5	Sakamoto ^a	1.25
	OMM1711	39.5	BV212192	2.35
	OMM1450	58.7	BV079594	1.29
	OMM1130	84.6	AF375031	4.01
	OMM1096	98.8	AF352762	3.74
	OMM1179	0	AF469966	0
	One10ASC	17.8	U56710	0
	OmyRGT2TUF	37.2	AB087587	0.04
	OMM1753	67.7	BV212227	0.17
RT11	OMM5186	85.5	BV212286	0.74
	OMM1202/1	104.3	AF469987	2.93
	Ocl1UW	12.4	AF028694	0.07
	Omy13DIAS	28.5	AF239030	2.92
	Omy1134INRA	41	CR376472	3.12
RT12	OMM1004	52.9	AF375008	3.47
	OMM5233	15.7	CA349039	2.55
	OmyFGT4TUF	36.6	Sakamoto ^a	1.75
	OMM1030	45.4	AF375012	2.3
	OMM3059	78	BV078095	0.01
RT13	OMM1381	95.1	BV078067	0
	OMM1216	6.1	AF469998	0.07
	OmyRGT46TUF	50.4	AB087612	0
RT14	OMM1241	1.7	AF470021	0.45
	Omy1214INRA	23.6	BV681478	1.92
	SSa14DU	54.1	McConnell ^c	2.63
	Omy1374INRA	72.5	BV681404	1.43
	Omy120/2INRA	100.7	Pr009689154.1	1.07
RT15	OMM1455	17.2	BV079599	0.11
	Ots1BML	53.2	AF107029	0.15
	Str11INRA	83.6	Gharbi ^d	1.25
RT16	OMM1101	8.6	AF352765	0.87
	Omy1038INRA	23.1	BV681522	1.5
	Omy1227INRA	44.5	BV681503	7.51
	OMM1013	59.5	AF346674	3.82
	Omy77DU	90.7	Morris ^e	3.15
RT17	OMM1403	109.2	BV078088	1.44
	OMM1076	15.6	AF352747	0.98
	OtsG422	49.2	AF393197	0.85
	Omy1376INRA	66.4	BV681462	2.74
	OMM1775	87.4	BV212243	0.74

RT18	OMM1384	23.7	BV078070	0.15
	Omy1DIAS	46	U93270	4.76
	OMM1311	50.2	G73551	5.51
	OMM1202/1	60.8	AF469987	0.64
RT19	Ocl8UW	0	AF028697	0.02
	Omi174TUF	20.8	AB105854	0.1
	OMM1025	40.2	AF346682	1.51
	OMM1313	60.7	G73553	0.02
RT20	OMM1333	93.6	G73567	3.59
	OMM1050	11.8	AF346694	0.05
	SsaN82LEE	28.4	U86706	1.54
	Omy8DIAS	48.5	AF090390	0.61
RT21	Omi102/1TUF	78.8	AB105844	1.2
	Omy120/1INRA	95.7	Pr009689154.1	1.15
	Omy325UoG	0	O'Connell ^b	0.1
	Omy301UoG	23.4	Jackson ^f	1.37
RT22	OmyFGT2TUF	21.8	Sakamoto ^a	1.55
	Omy2DIAS	47.8	AF039065	5.01
	OMM5014	73.8	CO805119	0.01
	OMM5179	95.2	BV211905	0.01
RT23	OMM1271	116.1	AF470036	0.33
	OMM1023	3.4	AF346681	1.52
	OMM1744	32.8	BV212219	0.09
	Str58CNRS	51.8	U60223	5.73
RT24	OMM1445	68	BV079589	0.75
	OMM1069	0.9	AF375018	4.24
	OMM1459	0.9	BV079603	3.3
	OMM1097	7	AF352763	1.45
RT25	Omy27INRA	30.2	Pr009689148.1	0.27
	OMM1719	54.2	BV212200	0.43
	OMM1190	72.8	AF469975	0.84
	Omy1278INRA	91.2	BV681436	0.25
RT26	OmyFGT23TUF	118.8	Sakamoto ^a	0
	OmyFGT16TUF	0	Sakamoto ^a	3.88
	OMM1045	9.7	AF346692	3.31
	OMM1211	19.3	AF469995	9.79
RT27	Ssa85DU	49.9	U43692	0.69
	OmyPupupyDAL	50.8	Morris ^e	0
	OMM1322	79.7	G73560	0.73
	Omy1321INRA	0	BV681520	3.9
RT28	Omy1517INRA	21.9	GF111273	13.34

	OMM3000	37.1	G73802	7.8
	OmyFGT24TUF	59.1	Sakamoto ^a	3.28
RT27	Omy29INRA	13.5	Pr009689149.1	0
	Str4/1INRA	35.3	Gharbi ^d	0.94
	Ocl2UW	44.5	AF028699	0.72
	Omy272/1UoG	46.3	Jackson ^f	0.53
	OMM1070	59.8	AF375019	1.78
	Omy1264INRA	85.9	BV681587	0
RT29	Ots108SSBI	14.2	AF069680	0.21
	OmyFGT3TUF	39.7	Sakamoto ^a	0.14
	OMM1705	57.4	BV212187	1.55
	Omy21INRA	77.1	Pr009689145.1	5.08
RT30	Omy108INRA	28.3	Gharbi ^g	0.43
	OMM1238	48.1	AF470018	0.11
RT31	OmyFGT8/2TUF	12	Sakamoto ^a	0.52
	Omy272/2UoG	21.4	Jackson ^f	2.09
	OMM1058	53.2	AF352741	0
	OMM1083	54.1	AF352751	0
	OMM5164	88.4	BV211874	91.05
	OMM1080	97.9	AF352750	112.24
	Omy1009INRA	107.4	BV681599	148.33
	Omy1136INRA	113	BV681527	167.56
	OMM5005	118.7	CO805111	201.43
	Omy1392INRA	119.5	BX861189	221.01

References:

^a Sakamoto 1997 PhD Thesis, Tokyo Univ. Of Fisheries

^b O'Connell *et al.* 1997 Can J Fish Aquat Sci 54:1391

^c McConnell *et al.* 1995 Can J Fish Aquat Sci 52:1863-1872

^d Gharbi and Guyomard, Jouy-en-Josas, INRA

^e Morris *et al.* 1996 Can J Fish Aquat Sci 53:120

^f Jackson *et al.* 1998 Heredity 80:143

^g Gharbi *et al.* 2006 Genetics 172(4): 2405–2419

Position: marker positions are given according to Guyomard *et al.* 2012.

χ^2 : comparison of allele frequencies (R vs. S grandparental allele) in the two population tails (early dead & survivors) at each locus.

File S1

1) Markers for survival QTMMap analysis

DH-F98		DH-F00	
RT31		RT31	
Marker	Distance ^a	Marker	Distance
One18ASC	0	OmyFGT8TUF	0
Omy272UoG	0.21	Omy272UOG	0.21
OMM1058	0.496	OMM1058	0.496
BHMS129	0.759	OMM5164	0.836
OMM5164	0.836	OMM1053	0.919
OMM5005	1.065	Omy1009INRA	0.995
		Omy1136INRA	1.034
		OMM5005	1.065

2) Markers for VREFT QTLMap analysis

DH-F98					
RT27		RT29		RT31	
Marker	Distance	Marker	Distance	Marker	Distance
Omy29INRA	0	Ots108SSBI	0	One18ASC	0
OMM1131	0.138	OmyFGT3TUF	0.255	Omy1006UW	0.426
OmyFGT8TUF	0.179	OMM1705	0.432	OMM1058	0.496
Ocl2UW	0.399	Omy21INRA	0.629	BHMS129	0.759
				OMM5164	0.836
				OMM5005	1.065

DH-F00							
RT8		RT24		RT26		RT31	
Marker	Distance	Marker	Distance	Marker	Distance	Marker	Distance
OMM1075	0	OmyFGT16TUF	0	Omy1321INRA	0	OmyFGT8TUF	0
OmyUW1198	0.277	OMM1045	0.079	Omy1517	0.192	Omy272UOG	0.202
OMM1793	0.466	OMM1211	0.227	OMM1734	0.306	OMM1058	0.485
Omy18INRA	0.684	Ssa85DU	0.536	OmyFGT24TUF	0.523	OMM5164	0.763
Omy1042INRA	0.971					OMM1053	0.84
						Omy1009INRA	0.912
						Omy1136INRA	0.948
						OMM5005	1.016

2) Chapitre 5

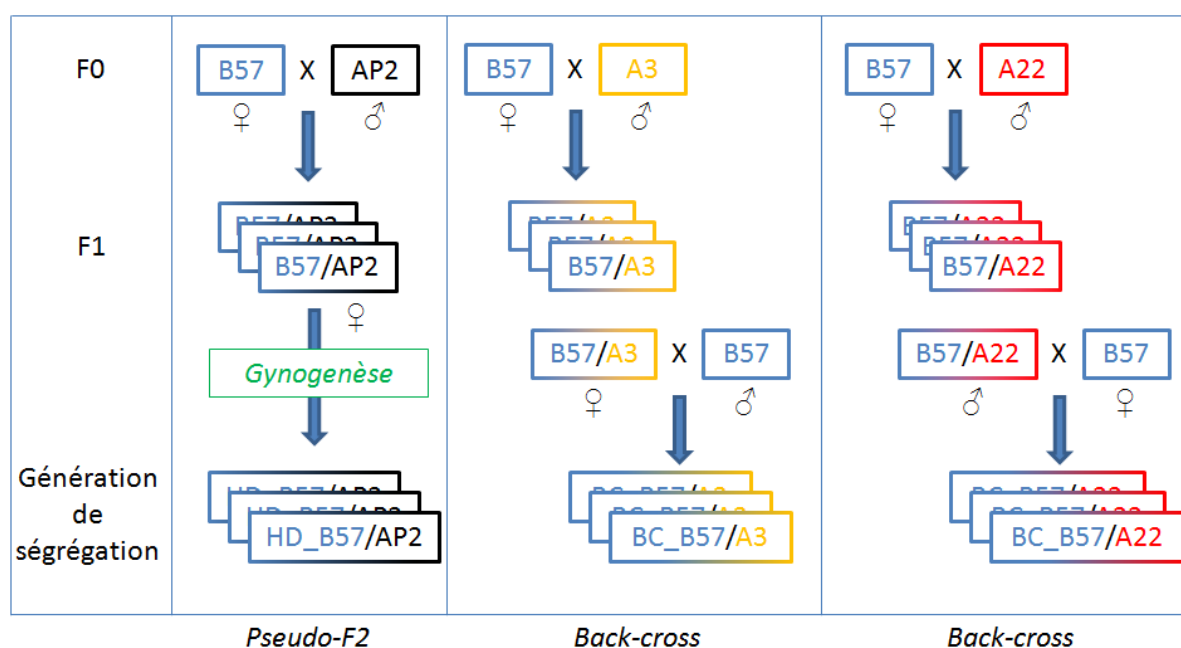


Figure S1 : détail des croisements effectués entre des poissons B57 et des poissons issus de lignées sensibles. F0 : génération grand-parentale. Génération de ségrégation : descendants passés en épreuve par bain avec le virus VHSV 07-71 pour détection de QTL.

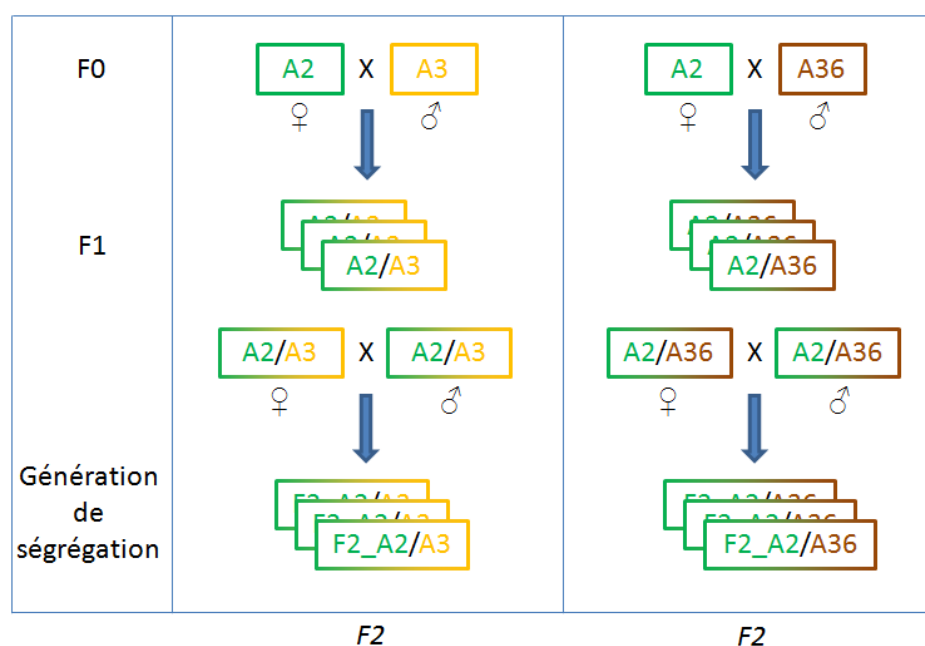


Figure S2 : détail des croisements effectués entre des poissons A2 et des poissons issus de lignées sensibles. F0 : génération grand-parentale. Génération de ségrégation : descendants passés en épreuve par bain avec le virus VHSV 07-71 pour détection de QTL.

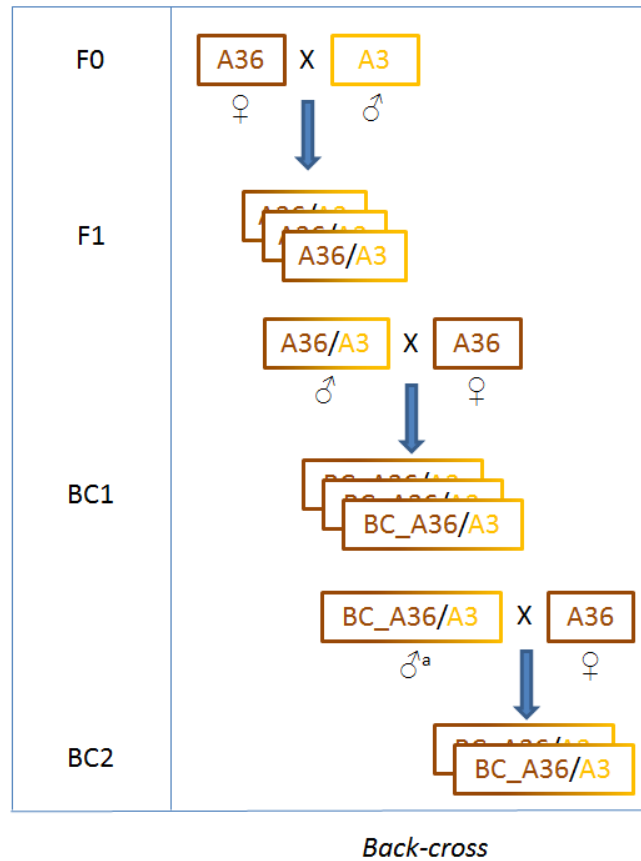


Figure S3 : détail du croisement back-cross A36A3. F0 : lignées isogéniques d'origine. BC1 : première génération de back-cross. BC2 : deuxième génération de back-cross, obtenue par croisement d'un mâle BC1 dont on sait qu'il est hétérozygote A36/A3 à tous les marqueurs de la région du QTL SHV (^a). Les poissons BC2 sont passés en épreuve par bain avec le VHSV 07-71 pour détection de QTL.

3) Chapitre 6

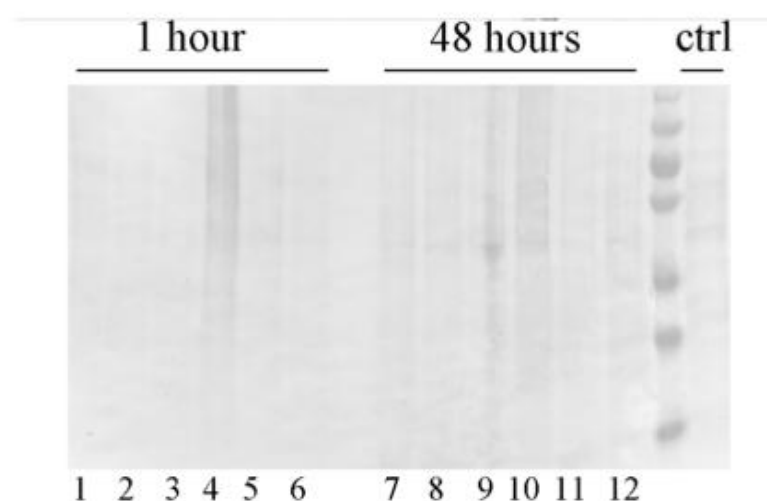


Figure S4. Normalization of protein loading in the analysis of the NSHV expression. Normalized amounts of each cell lysates (50 μg of proteins/well) were analyzed by SDS PAGE. To evaluate the protein loading, nitrocellulose membrane was stained with Red ponceau in absence of available antibody directed against trout proteins.

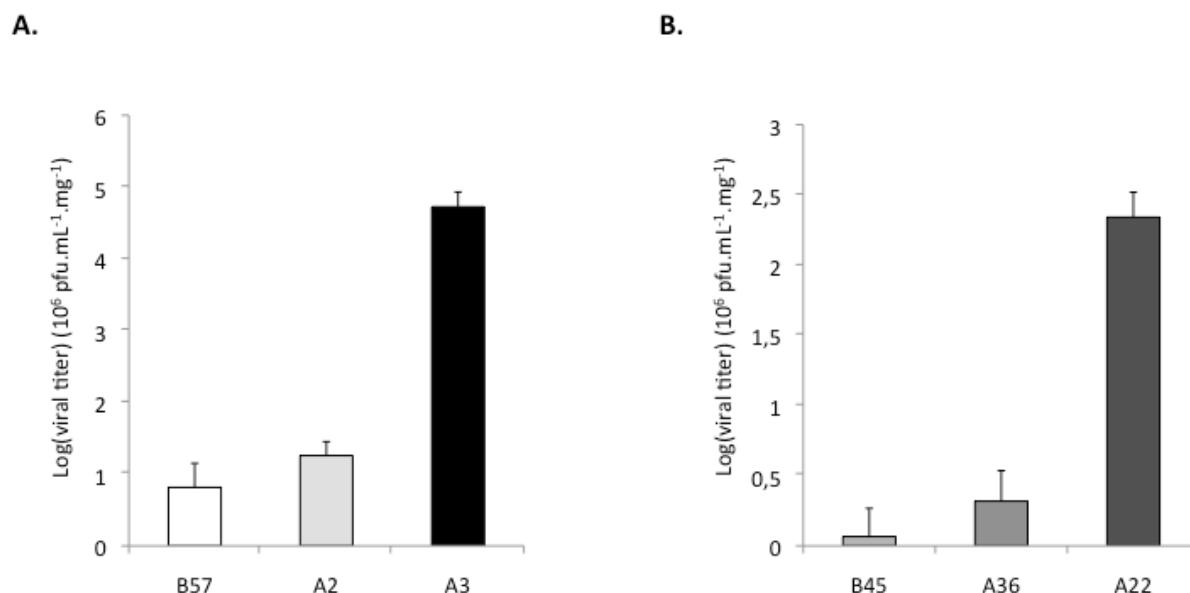


Figure S5. Viral titer in fin explants after 4 days of infection by VHSV 07-71. Fin explants were infected as indicated in Material and Methods. Log(viral titer) are expressed in $10^6 \cdot \text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ per mg of tissue. The two culture experiments must be considered independently and viral titers cannot be directly compared since the inoculum cannot be properly normalized in this protocol.

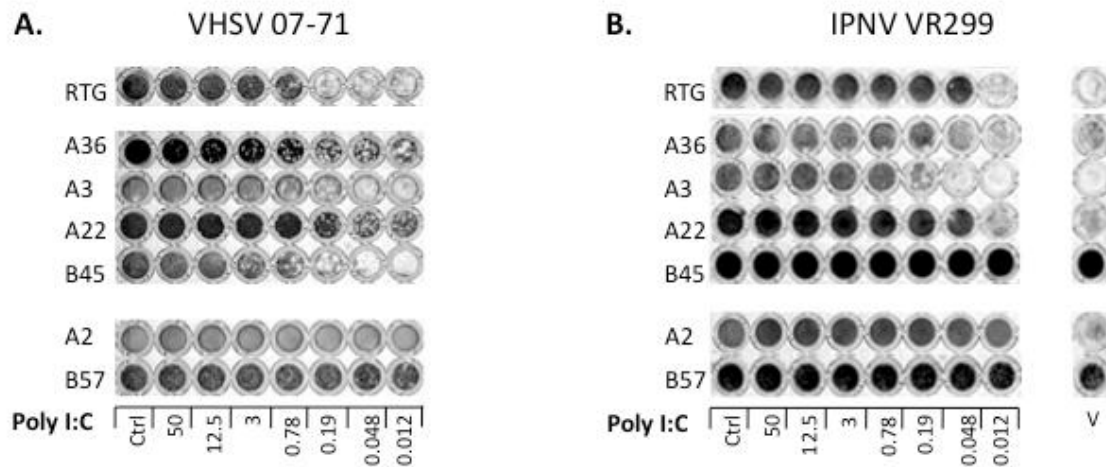


Figure S6. IFN Induction by Poly I:C protects cell monolayers against two different viral infections in a dose-dependant manner. Cells were treated with increasing concentrations of Poly I:C overnight before infection. Poly I:C concentrations are in $\mu\text{g/mL}$. Cells were infected and kept 3 days with the virus inoculum, then fixed and colored with crystal violet. Monolayer destruction 3 days post infection by VHSV (MOI 1) (A) or by IPNV (MOI 1) (B). **V:** Cell monolayer IPNV infection without Poly I:C pre-treatment. **Ctrl:** Non-infected cell monolayers without Poly I:C pre-treatment.

Early antiviral response and virus-induced genes in fish

Eloi Verrier, Christelle Langevin, Abdenour Benmansour et Pierre Boudinot

Developmental and Comparative Immunology 35 (2011) 1204 – 1214.
doi: 10.1016/j.dci.2011.03.012.



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci

Review

Early antiviral response and virus-induced genes in fish

Eloi R. Verrier^{a,b,c}, Christelle Langevin^a, Abdenour Benmansour^a, Pierre Boudinot^{a,*}^aINRA, Fish Infection and Immunity, Molecular Virology and Immunology, Domatne de Vilvert, 78352 Jouy en Josas, France^bINRA, Genaqua, GABI, domatne de Vilvert, 78352 Jouy en Josas, France^cAgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 15 March 2011

Keywords:

Fish
Virus
Interferon
ISG
Innate immunity

ABSTRACT

In fish as in mammals, virus infections induce changes in the expression of many host genes. Studies conducted during the last fifteen years revealed a major contribution of the interferon system in fish antiviral response. This review describes the screening methods applied to compare the impact of virus infections on the transcriptome in different fish species. These approaches identified a "core" set of genes that are strongly induced in most viral infections. The "core" interferon-induced genes (ISGs) are generally conserved in vertebrates, some of them inhibiting a wide range of viruses in mammals. A selection of ISGs – PKR, *vig-1/viperin*, *Mx*, ISG15 and finTRIMs – is further analyzed here to illustrate the diversity and complexity of the mechanisms involved in establishing an antiviral state. Most of the ISG-based pathways remain to be directly determined in fish. Fish ISGs are often duplicated and the functional specialization of multigenic families will be of particular interest for future studies.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	1204
2. Towards a comprehensive description of the transcriptional response to viruses in fish.....	1205
3. PKR, an interferon-induced regulator of protein synthesis.....	1206
4. <i>vig-1/viperin</i> , a member of SAM superfamily suppressing diverse viruses.....	1208
5. <i>Mxs</i> , GTPases with antiviral activity.....	1209
6. ISG15, an ubiquitin-like antiviral protein.....	1209
7. finTRIMs and other teleost TRIM proteins: newcomers in fish antiviral activity.....	1210
8. <i>vig2</i> , a salmonid-specific ISGs with elusive functions.....	1211
9. Conclusion.....	1211
Acknowledgements.....	1211
References.....	1211

1. Introduction

Fish are able to mount strong and protective immune responses to many viruses, as evidenced by vaccine efficacy. The specific protection is most often afforded by neutralizing antibodies, for example, for rhabdoviruses (Boudinot et al., 1998; Corbeil et al., 1999) although T cells and NK cells probably play an important role in the clearing of infected cells. The first antiviral defense is mediated by innate immunity in particular by interferons and interferon-induced genes and by intrinsic cellular mechanisms. More than 200 interferon-responsive genes (ISGs) have been

described in mammals to date (Der et al., 1998; Welsh and Sen, 1997), illustrating the diversity of the cellular pathways triggered by virus infections.

In mammals, interferons were described as protective against viral infection 50 years ago (Isaacs and Lindenmann, 1957), and they have been classified in three types according to their biological and structural properties: type I (IFN α , β , ω , ϵ , κ), type II (IFN- γ) and type III (IFN- λ , formerly IFN-like cytokine) (Pestka et al., 2004). Type I and III are directly induced by virus infection, and promote the transcription of antiviral genes through a single pathway. This pathway involves Jak kinases (Jak1 and Tyk2) and transcription factors belonging to the STAT family (STAT-1, -2, -3 and -4) (Zhou et al., 2007). IFN- γ induces the transcription of antiviral genes through a specific receptor constituted by two subunits IFNGR-1 and -2 and through a slightly different Jak-STAT pathway (Boehm et al., 1997).

* Corresponding author. Tel.: +33 1 34652585; fax: +33 1 34652591.
E-mail address: pierre.boudinot@jouy.inra.fr (P. Boudinot).

In fish, the induction of a secreted mediator with IFN properties has been known for years (de Kinkelin and Dorson, 1973), but the first IFN sequences were only reported in the early 2000s from genomic and EST databases (Robertson et al., 2003; Lutfalla et al., 2003; Altmann et al., 2003). Fish IFNs have been often compared to Type I mammalian IFNs (Robertson, 2008) though they are encoded by genes with four introns (Lutfalla et al., 2003) and their receptor is closer to the type III interferon receptors (Levraud et al., 2007; Aggad et al., 2009). Additionally, the expression of fish interferons is subject to an additional level of regulation. Indeed, in zebrafish and rainbow trout viral infection triggers activation of an alternative IFN isoform with an effective signal peptide (Levraud et al., 2007; Purcell et al., 2009), while the normal promoter usage leads to the expression of a non-secreted isoform in absence of stimulation. In this review fish virus-induced IFNs “IFN ϕ ” will be named according to Stein et al. (2007) nomenclature. Multiple IFN ϕ are found in fish studied so far, which are induced differentially depending on the inflammatory contexts (Lopez-Munoz et al., 2009). In zebrafish, IFN ϕ 1 ensures a slow and powerful induction of antiviral genes while IFN ϕ 2 and 3 lead to rapid and transient responses to the virus (Aggad et al., 2009; Lopez-Munoz et al., 2009). Thus, IFN ϕ 1 exerts a better protection against IHN virus than IFN ϕ 2. However, the specificity of the transcriptional response triggered by the fish multiple interferons is still poorly understood. Besides the IFNs, an IFN- γ orthologue has also been identified in fish (Zou et al., 2004; Igawa et al., 2006; Milev-Milovanovic et al., 2006).

Besides the characterization of fish IFNs, other studies have focused on virus- and interferon-induced genes (ISGs). Many of these genes can be considered as the effectors of the interferon response, and some of them possess a documented antiviral activity. Tetrapods and fish share a number of ISGs that are remarkably conserved, indicating that the interferon system is an ancient and fundamental part of the immune system of gnathostomes. However, many fish ISGs remain poorly characterized, and a strong antiviral activity has only been demonstrated for a few of them. Additionally, since teleost fish constitute the most diverse class of vertebrates, a variety of new antiviral genes and antiviral strategies probably arise in the different fish families during a long evolutionary time marked by multiple global genome duplications (Volff, 2005).

To characterize the antiviral response mechanisms, different approaches were followed to directly identify genes induced by the virus infections using different strategies. The first part of this review will briefly describe how these strategies identified the interferon system as the main target of the virus-induced transcriptional response in fish. The second part will examine selected virus- and interferon-induced genes involved in the key pathways activated by viral infection.

2. Towards a comprehensive description of the transcriptional response to viruses in fish

Fish virus and interferon induced genes were first identified by PCR using primers designed on conserved sequences. For example, Mx – a protein from the dynamin family with a tripartite GTP domain and a leucine zipper – was cloned in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Trobridge and Leong, 1995) and in other teleost species (including Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Robertson et al., 1997), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Jensen and Robertson, 2000) and fugu (*Takifugu rubripes*) (Yap et al., 2003) following this strategy. The same approach was followed for proteins belonging to defined pathways such as the MHC class I presentation system. Northern blots with probes generated on trout genes cloned from mammalian sequences demonstrated that MHC I presentation pathway genes were up-regulated by the

infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) infection in leukocytes (Hansen and La Patra, 2002).

Many virus-induced genes were too divergent to be retrieved using such strategies and global approaches were used to search for transcripts up-regulated by viral infections. Differential display PCR was first used to identify rainbow trout transcripts up-regulated by the viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. This approach led to the identification of two VHSV- and interferon-induced genes: *vig1* (also known as *viperin* and *rsad2* in mammals, see below) (Boudinot et al., 1999) and *vig2* an elusive gene that is highly induced in salmonid leukocytes and possess a typical interferon-inducible promoter, but does not contain any obvious ORF (Boudinot et al., 1999). Since the differential display generated many false positive candidates, it was superseded later by a more efficient PCR-based method, the subtractive suppressive hybridization (SSH). In fish, SSH screens revealed a first core set of virus- and interferon-induced genes. In rainbow trout, this strategy identified 24 genes induced by VHSV in leukocytes, including *Mx*, *vig1* and *vig2* (O'Farrell et al., 2002). Among these genes were also the *Isg15/vig3* – an ubiquitin-like gene with antiviral activity –, a gene encoding a retinoic acid and interferon-inducible protein with tetratricopeptide repeats (TPR) (*vig4*) and three chemo-attractant factors similar either to CXC chemokines (*vig7* and *vig8*) or to *galectin-9*. All these genes were expressed *in vivo* in VHSV infected animals. Additionally, they were strongly induced by rainbow trout interferon in leukocytes *ex vivo*, suggesting a central role of the interferon pathway in the response to VHSV. The same methodology was used later in several models to identify virus-induced genes. In Atlantic salmon cells infected by IHN virus, virus-induced transcripts including a chemokine, the tetraspanin CD9 and ISG15 were identified (Fujiki et al., 2002; Seppola et al., 2007). When transcripts from cells persistently infected by infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and non-infected cells were compared, genes involved in direct interaction or degradation of viral proteins were identified, as well as the X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome *ATRX* gene, a transcription repressor which may control viral replication (Marjara et al., 2010). In crassian carp (*Carassius carassius*), subtractive approaches were used to characterize the response to the grass carp (*Carassius auratus*) hemorrhagic virus (GVHV) and led to the identification of an IRF7-like (Zhang et al., 2003), JAK1 and STAT1 (Zhang and Gui, 2004), two *Mx* (Zhang et al., 2004), two ISG15 (Zhang et al., 2004, 2007a) and a number TPR-containing proteins (Zhang et al., 2004). In Atlantic cod (*Gadus morhua*), SSH screening after poly(I:C) stimulation revealed several *Isg15* genes as well as IRF-1, -7 and -10, MHC class I, *viperin/vig1*, and the ATP-dependent helicase LGP2 (Rise et al., 2008). The transcriptional response induced in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) brain by nodavirus infection was characterized by the same technique, leading to the discovery of two C-type lectins, a short pentraxin and a galectin that possessed a potential anti-inflammatory, protective role against viral infection (Dios et al., 2007; Poisa-Beiro et al., 2009). All these studies demonstrate a major contribution of a core set of interferon-responsive genes in the transcriptional response to virus infection.

During the past few years, full genome assemblies for several fish and extensive fish ESTs collections became available opening the way to a more comprehensive description of the fish transcriptome and virus-induced genes. They revealed many homologues of mammalian ISGs as well as the fish interferons themselves (Robertson et al., 2003; Lutfalla et al., 2003; Altmann et al., 2003). These sequences were used to build microarrays, providing powerful tools for the characterization of the transcriptional response to fish viruses.

The first microarray studies of the fish innate response to viruses and virus compounds were performed on Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). An innate immunity genes enriched microarray

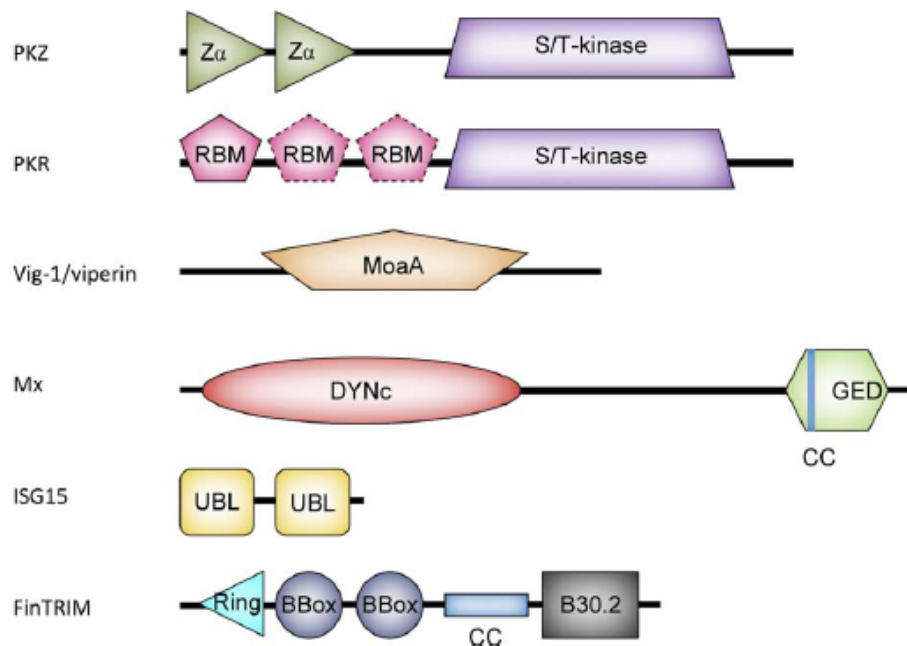


Fig. 1. Domain structure of fish virus- and interferon-induced proteins. Protein kinase Z (PKZ) contains two DNA binding domains ($Z\alpha$) and a serine/threonine kinase domain (S/T-kinase) in the C terminus. Protein kinase R (PKR) contains one, two or three RNA binding domains (RBM labeled with dotted lines indicating that a domain can be absent in certain species) and a serine/threonine kinase (S/T-kinase) in the C-terminus. Vig1/viperin contains a molybdenum cofactor biosynthesis protein A domain (MoaA); Mx proteins are GTPase proteins characterised by a large dynamin domain (DYNc) which binds GTP and a GTPase effector domain (GED) containing a coil-coiled sequence (CC). Interferon stimulated protein of 15 kDa (ISG15) is an ubiquitin-like protein containing two ubiquitin-like domains (UBL). Fish induced novel tripartite motif proteins (finTRIMs) are characterized by a canonical domain association in the N-terminus: a ring, two B-boxes and a coil-coiled, C-terminal part of the protein can be variable but most antiviral TRIMs contain a PRY/SPRY (B30.2) domain.

was used to characterize the response to the VHSV G protein after DNA vaccination (Byon et al., 2005, 2006) and HIRV rhabdovirus infection (HrV) (Byon et al., 2006). Soon after, a 16,008-feature salmonid cDNA microarray (von Schalburg et al., 2005) was used to characterize the response of homozygous rainbow trout to a DNA vaccine encoding the G protein of the IHNV (Purcell et al., 2006). Such studies provided a much more comprehensive picture of the transcriptome modifications induced by viruses. The same microarray was also used to characterize the impact of the expression of the IFN γ onto the transcriptome of trout macrophages and showed a significant induction of genes involved in the antigen presentation pathway (Martin et al., 2007a). The respective effects of IFN ϕ and γ in macrophage-like cells were also assessed using another large Atlantic salmon cDNA microarray (salmon 17K feature TRAITS/SGP array; <http://www.abdn.ac.uk/src/salmon>): while a minority of up-regulated genes were induced by both types of interferon (like γ IP, SAA, ISG12 and ISG15), large sets of specifically induced genes could be identified (Martin et al., 2007b). For example, *Fip2*, and several VHSV-induced genes (*vigs*) are specifically induced by IFN ϕ while *gig2* and β 2microglobulin are induced by IFN γ . Similarly it was shown that early stage IHNV infection down-regulates hematopoietic and protein biosynthetic function and up-regulates interferon (MacKenzie et al., 2008).

Such microarray analyses could also provide potentially interesting predictive markers, for example, for early versus late mortality due to specific viral infections (Jorgensen et al., 2008), and could highlight the importance of particular responses such as increased oxidative stress in infectious salmon anemia virus (ISAV) infected Atlantic salmon macrophages (Schlotz et al., 2008). The microarray analyses performed to date using different virus and IFN inducers in multiple cell types and tissues suggest that a "core" set of 50–100 genes is typically induced (Milev-Milovanovic et al., 2009; Workenhe et al., 2009 and references above; Table 1).

Beyond the list of all transcripts up- or down-regulated during virus infections, it appears more and more important to understand

how each cell type specifically reacts to a given type of virus. In the following sections, we examine the current knowledge about a selection of virus- and interferon-induced genes that have potentially a direct antiviral activity.

3. PKR, an interferon-induced regulator of protein synthesis

The double stranded RNA-dependent protein kinase or protein kinase R (PKR) is probably the best known of the interferon-induced proteins. Though recently characterized (Clemens et al., 1993) it has been known for decades that a protein with dsRNA-dependent kinase activity is involved in the cellular response to viral infections and is induced by interferons (Roberts et al., 1976; Sen et al., 1978). This protein kinase was first cloned in human in 1990 (Meurs et al., 1990). PKR has been extensively studied and is involved in many cellular processes, including cell proliferation and cell growth, apoptosis, and tumor suppression (reviewed in Garcia et al., 2006).

Human PKR is encoded by a single gene of 17 exons, which is constitutively expressed in most cell types (Kuhlen et al., 1996). PKR is a serine/threonine kinase composed by a kinase domain and two regulatory dsRNA-binding domains (dsRBD) (Fig. 1). PKR activation through autophosphorylation is triggered by dsRNA, and induces the phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 ($eIF-2\alpha$) (Galabru and Hovanessian, 1987), leading to a strong inhibition of protein synthesis (Sudhakar et al., 2000) (Fig. 2). PKR activation therefore leads to the inhibition of viral mRNA translation. As an example, this phenomenon was characterized during vesicular stomatitis virus (VSV) or vaccinia virus infections in mice (Balachandran et al., 2000; Lee and Esteban, 1993; Stojdl et al., 2000). Viruses have developed several strategies to inhibit PKR activation, indicating the importance of PKR in the antiviral response. Thus, viral RNAs or proteins of diverse viruses (adenovirus VAI RNA, Epstein barr virus EBER RNA, HIV TAT protein, influenza virus NS1 protein, reovirus $\sigma 3$ protein, etc.) have been involved

Table 1
Fish virus and interferon induced genes.

Proteins	Methods of identification	Inducer	Antiviral function proved in mammals
<i>IFN signaling and sensing</i>			
ATPdpdt helicase LGP2	SSH	poly(I:C)	+
IRF1	SSH	poly(I:C)	+
IRF7	SSH	poly(I:C), GVHV	+
IRF10	SSH	poly(I:C)	ND
Jak/STAT	SSH	Many viruses	+
<i>Intracytoplasmic ISG</i>			
Mx1, Mx2, Mx3	RACE PCR Northern blot SSH	poly(I:C), dsRNA, IHN, IPNV, VHSV, GVHV, SAV-3, GCHV, nodavirus, CSV	+
Vig1 (asa viperin, Rsad2)	DD PCR, SSH	poly(I:C), dsRNA, GCHV, ISAV, VHSV, ISKNV, CSV	+
Vig2	DD PCR, SSH	VHSV	ND
Vig3 ISG15	SSH	poly(I:C), dsRNA, VHSV, GVHV, IPNV, ISAV, GCHV	+
Vig4 TPR	SSH	VHSV, GVHV	ND
Vig6	SSH	VHSV	ND
PKR	PCR	poly(I:C), IPNV SMRV	+
PKZ	PCR	poly(I:C), IPNV	+
finTRIMs	SSH	poly(I:C), VHSV	ND ^a
<i>Secreted factors</i>			
Vig7 CXC	SSH	VHSV	ND
Vig8 CXC	SSH	VHSV	ND
Galectin 1	SSH	Nodavirus	+
Galectin 9	SSH	VHSV	ND
Tetraspanin CD9	SSH	IHN	ND
<i>Acute phase response</i>			
C type lectin	SSH	Nodavirus	ND
Pentraxin	SSH	Nodavirus	ND
<i>Ag presentation and class I pathway</i>			
STAT-1, PSMB9A ABCB2	Northern blot	poly(I:C), IHN, VHSV	+

SSH; subtractive suppressive hybridization; DD: differential display PCR; ND: non determined.

^a Antiviral activity proved for mammalian TRIMs with B30.2 domains.

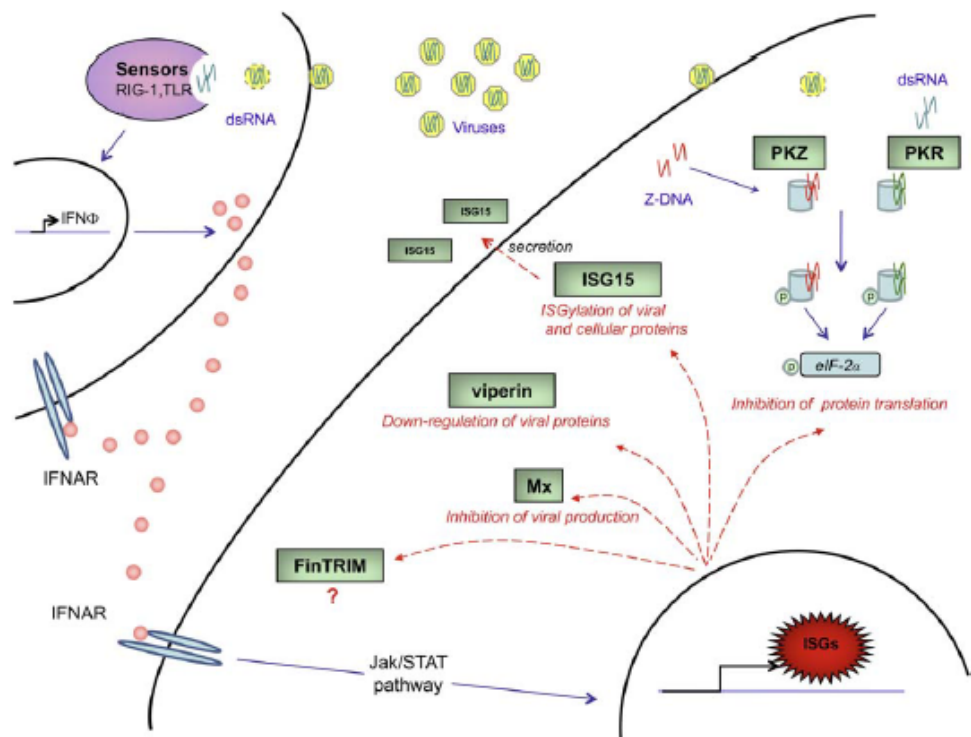


Fig. 2. Fish virus induced genes in the context of interferon ϕ signaling. Following virus entry in the cell, viral nucleic acids bind different sensors as RIG-1 and TLRs. Activation of these sensors leads to the induction and secretion of interferons. This cytokine has auto- and paracrine activity mediated through interactions with a transmembrane receptor (IFNAR) that activates JAK/STAT pathway. It then leads to the induction of a set of interferon stimulated genes (ISGs) such as *Isg15*, *pkz*, *pkz*, *Mx*, *vig1/viperin* or *finTRIMs*. The entities inducing the IFN ϕ and effector responses are indicated in blue and the putative antiviral functions of the different genes are in red.

in inhibition of PKR functions through different mechanisms i.e., interference with kinase dimerization, with dsRNA binding region or with the catalytic site of PKR (reviewed in Gale and Katze, 1998).

A first study (Garner et al., 2003) showed that recombinant eIF-2 α of rainbow trout and zebrafish (*Danio rerio*) can be phosphorylated by the human PKR, suggesting that the fish PKR belongs to an antiviral pathway conserved in vertebrates. Moreover, poly(I:C) treatment or IPNV infection induces an increase in eIF-2 α phosphorylation in the rainbow trout fibroblastic cell line RTG-2. Later on a kinase protein named PKR-like or PKZ was cloned from goldfish (*Carassius auratus*), zebrafish, Atlantic salmon and rare minnow (*Gobiocypris rarus*) (Hu et al., 2004; Rothenburg et al., 2005; Bergan et al., 2008; Su et al., 2008a). This protein is closely related to the mammalian PKR but contains two Z-DNA binding domain (or Z α) instead of dsRBD domains (Fig. 1). PKZ can bind dsRNA and dsDNA in the left-handed Z conformation and is able to phosphorylate eIF-2 α , suggesting that it could play a similar role in antiviral defense as the mammalian PKR (Fig. 2) (Bergan et al., 2008) against different viruses (Rothenburg et al., 2005). PKZ was first considered as the only *pkz* orthologue in fish, but true *pkz* genes were finally cloned from different fish species (Rothenburg et al., 2008; Zhu et al., 2008). Three *pkz* genes inducible by poly(I:C) were identified from the *Tetraodon nigroviridis* genome, one containing three dsRBD domains and two containing one dsRBD domain in the N-terminal region. In zebrafish, one *pkz* was described with three dsRBD domains and was over-expressed in different tissues from animals after poly(I:C) treatment. Two *pkz* genes with a putative dsRBD were also identified in fugu, as well as in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*). Only one gene was described in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) with two putative dsRBD domains. In Japanese flounder, one *pkz* was described with the same structural characteristics as the mammalian *pkz*. It has been demonstrated in this species that *pkz* over-expression increases eIF-2 α phosphorylation and could stop the replication of the *Scophthalmus maximus* rhabdovirus in embryonic cells (Zhu et al., 2008). Finally, a *pkz* was recently cloned from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) with the same domain organization (Zenke et al., 2010). *pkz* sequences from rainbow trout (NP_001139363) and Atlantic salmon (ABU24344) are available in public databases.

Fish *pkz* genes seem to be closer to fish *pkz* than to mammalian *pkz* (Rothenburg et al., 2008), suggesting that they are paralogues and derive from an ancestral kinase gene duplicated after the divergence from the tetrapod lineage. Thus, the *pkz* may represent an adaptation to specific fish viruses. In fact, several proteins with dsRNA-binding domains were described in invertebrates, such as Staufin/Stau-1 in *D. melanogaster* (NP_476751) and C. *elegans* (NP_508196) but no antiviral activity has yet been demonstrated for those proteins. The antiviral PKR found in vertebrates most probably derives from this ancient family. Taken together, these studies suggest that the eIF-2 α /IFN/PKR system is conserved within vertebrates, and constitutes a primordial antiviral pathway.

4. *vig-1/viperin*, a member of SAM superfamily suppressing diverse viruses

The transcripts *cig5* and *vig1* were identified in mRNA differential display screening for HCMV- and VHSV-induced genes in human and rainbow trout, respectively (Boudinot et al., 1999; Zhu et al., 1997). They encode for a protein highly conserved in vertebrates, with a MoaA motif suggesting a role in the synthesis of enzymatic cofactor (Fig. 1) (Boudinot et al., 1999). This motif places this protein into the large SAM superfamily of enzymes (Sofia

et al., 2001; Duschene and Broderick, 2010). Homologues were also induced in virus-infected dendritic cells in mice (Boudinot et al., 2000), and were expressed in rat osteoblasts (Grewal et al., 2000). These genes were up regulated by type I interferons. They were also induced directly by the virus in the presence of inhibitors of protein synthesis like cycloheximide (Boudinot et al., 1999; Zhu et al., 1997), indicating that the up-regulation could occur through two different pathways. Later studies confirmed the implication of this gene in the transcriptional response to many viruses: Dengue virus (Fink et al., 2007), hepatitis C virus (Helbig et al., 2005; Jiang et al., 2008), West Nile virus (Jiang et al., 2010) in human or alphavirus and lymphocytic choriomeningitis virus in mice (Zhang et al., 2007b; Hinson et al., 2010).

An antiviral effect of the *cig5*-encoded protein was demonstrated, and the protein finally named viperin (for virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible) (Chin and Cresswell, 2001). In a first study, it was shown that viperin represses human cytomegalovirus (HCMV) infection and down-regulates the viral proteins gB, pp28 and pp65. In fact, the expression of these viral proteins leads to a modification of the viperin spatial distribution from ER to cytoplasmic vacuoles containing viral proteins involved in virus assembly (Chin and Cresswell, 2001). Antiviral effects of viperin were demonstrated later in other models. Viperin could impair the release of influenza virus by altering the fluidity of the plasma membrane (Wang et al., 2007). Another study established that viperin binds and inhibits farnesyl diphosphatase synthase, decreasing the membrane fluidity (Hinson and Cresswell, 2009). Finally, viperin expression was induced by IFN regulatory factor-1 (IRF-1), which binds the murine viperin promoter (Stirnweiss et al., 2010). These studies firmly establish that viperin is involved in the interferon response against viruses from several families, probably through different pathways.

In fish, the homologue of viperin was early described in rainbow trout leukocytes as a VHSV-induced gene, *vig-1* (Boudinot et al., 1999). Up-regulation of *vig-1* was observed in leukocytes incubated *ex vivo* with the virus or with trout interferon as well as in lymphoid organs of infected fish. Induction of *vig-1/viperin* was also observed in macrophages and fibroblast cell lines after infection with chum salmon (*Oncorhynchus keta*) reovirus and stimulation with poly(I:C) or dsRNA (DeWitte-Orr et al., 2007). Since then, *vig-1/viperin* has been identified in many species of teleosts. *vig-1/viperin* and its promoter region have been cloned in the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) (Chen et al., 2010). Mandarin fish viperin was over-expressed after cell stimulation with poly(I:C) or after infection with UV-inactivated Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) (Sun and Nie, 2004). *vig-1/viperin* promoter contains one IRF-1 binding site, suggesting an induction pattern similar to the one observed in mammals. In grass carp, *vig-1/viperin* was cloned from blastulae cells after induction by UV-inactivated grass carp hemorrhagic virus (GCHV) together with other typical genes of the antiviral response such as IFN, PKR or Mx1 (Zhang et al., 2007c). In Atlantic cod, SSH cDNA libraries led to the identification of several ISGs following poly(I:C) treatment, including *vig-1/viperin* (Rise et al., 2008). In Atlantic salmon, microarray hybridizations confirmed the induction of *vig1/viperin* during macrophages infection with ISAV (Workenhe et al., 2009). In zebrafish, since *vig-1/viperin* was induced only via interferon in the embryos, it provided a good system to assess the effect of interferon and to identify INF ϕ receptors (Levraud et al., 2007).

These studies firmly establish that *vig-1/viperin* is involved in response to many different viruses in fish and is induced in a variety of cell types. It can be inferred from the complexity of the antiviral activity of mammalian viperin that the fish orthologue is probably involved in different pathways of the early antiviral response.

5. Mx, GTPases with antiviral activity

Mx – for orthomyxovirus resistance gene – was first identified (Horisberger et al., 1983; Haller et al., 1980) as a factor explaining high resistance to orthomyxoviruses in the inbred mouse strain AG2 (Lindenmann, 1964). Several Mx genes were found, that were induced by type I and type III interferons (Haller et al., 1980) and presented a strong antiviral activity against the avian influenza virus (Staeheli et al., 1986; Arnheiter et al., 1990). Homologues of Mx1 and Mx2 were soon found in rat, and showed different antiviral activity against influenza and VSV, respectively (Meier et al., 1990). In human, two interferon-induced Mx homologues were identified by a cross-reacting monoclonal antibody directed against mouse Mx1. These two genes encoded two cytoplasmic proteins named MxA and MxB, which presented similar antiviral activities (Staeheli and Haller, 1985; Aebi et al., 1989). Antiviral activity of Mx proteins was later reported against a large spectrum of viruses, including orthomyxoviruses like thogoto virus (THOV), bunyaviruses (Haller et al., 1998), togaviruses like the Semliki Forest virus, coxsackieviruses, and the hepatitis B virus (Gordien et al., 2001).

The products of Mx genes are GTPases with a molecular mass of about 80 kDa and low affinity for GTP (Staeheli et al., 1993). Mx proteins are expressed both in cytoplasm and nucleus. Rodent Mx1 was found near nuclear bodies while Mx2 was located only in the cytoplasm (Chelbi-Alix et al., 1995). Human MxA is normally located in the cytoplasm, but can be translocated into the nucleus where it is found associated to the nuclear bodies (Engelhardt et al., 2004), like other antiviral proteins as TRIM19/PML. Mx proteins located in different cellular compartments target distinct viruses: mouse Mx1 is responsible for the resistance to influenza virus that replicates in the nucleus, while mouse Mx2 inhibits the replication of cytoplasmic viruses such as LaCrosse virus (LACV) or VSV (Haller and Kochs, 2002). The antiviral mechanisms mediated by Mx proteins are still not totally understood and may vary between species. The human MxA binds nucleoprotein of THOV and LACV capsids (Kochs et al., 2002) and blocks their nuclear import (Kochs and Haller, 1999). MxA forms copolymers with LACV capsids, probably blocking the virus assembly. All these studies established that Mx proteins play an important role in host defense against several viruses in mammals.

Mx homologues with antiviral activities were found in other vertebrates including birds and fish, suggesting that these antiviral proteins were already present in the common ancestor of vertebrates (Schumacher et al., 1994; Staeheli et al., 1989). Mx-like sequences were also recently described in a mollusk, the disk abalone (*Haliotis discus discus*) where they were over expressed after poly(I:C) stimulation (De Zoysa et al., 2007), suggesting that they may have antiviral functions (Fig. 2).

In teleosts, the first Mx was cloned in the common perch (*Perca fluviatilis*) (Staeheli et al., 1989), as a dsRNA-induced gene. Mx homologues were found later in many fish species. In rainbow trout, three full-length Mx cDNAs were obtained by RACE PCR in poly(I:C)-induced RTG-2 cells (Trobridge et al., 1997). Over-expression of Mx in rainbow trout cells did not inhibit IHNV infection (Trobridge et al., 1997). However, Mx was up-regulated during the early interferon response after DNA vaccination against VHSV (Boudinot et al., 1998), which was correlated to early protection (McLauchlan et al., 2003). Mx over-expression was also observed in fibroblast-like RTG-2 cells infected by chum salmon reovirus (CSV). Mx induction was observed even in the presence of cycloheximide – a molecule inhibiting the protein synthesis – suggesting that induction could be IFN-independent (DeWitte-Orr et al., 2007). Interestingly, different expression patterns were found for the three Mx isoforms after VHSV infection or stimulation with poly(I:C), depending on the tissues, which suggested different regulation pathways (Tafalla et al., 2007). In Atlantic salmon, an antiviral activity of Mx proteins was

proved against a birnavirus, the IPNV (Larsen et al., 2004). Injection of poly(I:C) in salmon led to an over-expression of Mx, which was correlated to a resistant status to ISAV (Jensen et al., 2002). Induction of Mx by viruses or IFN was later described in many contexts. Salmon infection with salmonid alphavirus-3 (SAV-3) caused an increase of Mx expression (Xu et al., 2010). Over-expression of Mx gene was also observed in the brain of sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass after infection with nodavirus (Poisa-Beiro et al., 2008). Two Mx genes were up-regulated in CAB cells after treatment with UV-unactivated GCHV (Zhang et al., 2004). Mx homologues were also found in zebrafish (Altmann et al., 2003), fugu (Yap et al., 2003), spotted green pufferfish (Lutfalla et al., 2003), Japanese flounder (Ooi et al., 2006), estuary cod (*Epinephelus coioides*) (Chen et al., 2006), catfish (*Ictalurus punctatus*) (Plant and Thune, 2008) and rare minnow (Su et al., 2008b). The different Mx promoters described in fish present the organization of interferon-induced genes with typical ISRE (for interferon stimulating response elements) (Yap et al., 2003; Ooi et al., 2006; Plant and Thune, 2008; Collet and Secombes, 2001). Trout and salmon cell lines expressing a reporter gene under the control of these promoters were produced and used to monitor IFN activity (Collet et al., 2004; Johansen et al., 2004). Finally, Mx transgenic rare minnows derived from eggs injected with linearized pCMV-EGFP-CMV-Mx-SV40 constructs appear to be more resistant to Grass Carp reovirus (Su et al., 2009).

Taken together, these studies show that Mx constitute important virus- and IFN-induced genes in fish, and suggest that they exert an antiviral activity against some fish viruses. However, the antiviral mechanisms of these proteins have still to be uncovered.

6. ISG15, an ubiquitin-like antiviral protein

Isg15 (IFN-stimulated gene 15) is induced to a very high level by type I IFNs in mammals (Dao and Zhang, 2005). It was first identified more than 20 years ago as a 15 kDa-protein induced by IFNs in human and bovine cells (Korant et al., 1984). The gene was cloned in human (Blomstrom et al., 1986), and appeared to be highly similar to ubiquitin. The ISG15 protein was conjugated with other proteins, and was considered as an ubiquitin-like protein with similar properties (Haas et al., 1987; Loeb and Haas, 1992). Free or conjugated forms of ISG15 were detected in cells (Loeb and Haas, 1992) but free ISG15 was also secreted by human monocytes and lymphocytes (Knight and Cordova, 1991). This secreted form constitutes a cytokine that induces the production of IFN- γ by CD3+ T cells (Recht et al., 1991) and activates the proliferation of natural killer cells (D'Cunha et al., 1996). ISG15 is conjugated to target proteins via a pathway named "Isgylation". Ubiquitination and isgylation constitute similar but distinct post-translational modifications that modify the stability, the function or the localization of the targeted proteins. These modifications involve enzymatic cascades, which will be not detailed here (see, Staub, 2004; Herrmann et al., 2007, for detailed reviews). Importantly, ISG15 can inhibit the replication of a large set of viruses in human or mouse. The inhibition of the HIV replication by ISG15 was first reported by Kunzi and Pitha (1996) but the antiviral mechanism was (partly) elucidated only 10 years later (Okumura et al., 2006). Isg15 expression can stop the HIV-1 release by inhibiting the Gag ubiquitination that is required for HIV-1 assembly and budding (Schubert et al., 2000). It is commonly accepted that the Gag protein is isgylated, which would interfere with ubiquitination but the details of the pathway remain unknown. A recent article shows that isgylation plays a key role in the antiviral response to Sindbis virus in a mouse model (Giannakopoulos et al., 2009). ISG15 also inhibits Ebola virus budding, through inhibition of Nedd4-mediated ubiquitination of the VP40 viral protein (Malakhova and Zhang, 2008). The infection by influenza B virus leads to a conjugation of ISG15 to several unknown

cellular proteins *in vivo* and *in vitro* (Lai et al., 2009). In fact, KO-mice lacking ISG15 show increased sensitivity to the viral infection (Lai et al., 2009), and isgylation is involved in the activation of antiviral mechanisms against influenza A virus (Tang et al., 2010) as well as hepatitis C virus (Kim and Yoo, 2010). Taken together, these studies show the importance of ISG15 in the early response to viruses in mammals.

In teleosts, *Isg15* homologues were first identified in rainbow trout as a VHSV-induced gene (*vig-3*) in a SSH screen (O'Farrell et al., 2002), and in goldfish as a gene responsive to a renal toxicant, gentamicin (Liu et al., 2002). The protein encoded by *vig-3* contained the critical C-terminal glycine residues, suggesting that it could be conjugated to target proteins and have similar functions to mammalian ISG15 (Fig. 1). In goldfish, the promoter of the *Isg15* gene contained typical ISRE and was induced by mycobacterial infection, suggesting that *Isg15* could play a general role in innate immunity (Liu et al., 2002). By genome scanning, the same group identified *Isg15* homologues in zebrafish, pufferfish and catfish (Liu et al., 2002). In Atlantic salmon, *Isg15* was found to be over-expressed after treatment with poly(I:C) or dsRNA as well as after ISAV infection.

The ISG15 protein was able to interact with intracellular proteins and with an ISAV protein (Rokenes et al., 2007). *Isg15* was also over-expressed after Salmon Alpha Virus-3 infection in the macrophage like TO cell line (Xu et al., 2010). In Atlantic cod, three *Isg15* homologues were found. A first gene was found by suppression subtractive hybridization in head kidney cells treated with poly(I:C) (Seppola et al., 2007), and was found to be induced after IPNV infection (Jensen et al., 2009). The two others were identified later by the same group from cDNA libraries of head kidney and spleen made from poly(I:C)-stimulated fish (Furnes et al., 2009). The promoters of all these genes contained typical ISRE motifs and ISG15-2 was shown to be conjugated to cellular proteins after infection by IPNV. Two *isg15* homologues were also described in crucian carp (*Carassius auratus*), only one of which was induced in CAB cells by GCHV or UV-inactivated GCHV treatment (Zhang et al., 2007a). Other *Isg15* homologues with similar characteristics have been recently described in black rockfish (*Sebastes schlegelii*) (Baek et al., 2008), Japanese flounder (Yasuike et al., 2010), and red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Liu et al., 2010).

Taken together, these studies show that fish express one or several *isg15*-like genes in response to virus infection. These proteins can be conjugated to target proteins through an isgylation pathway and may have antiviral functions conserved in vertebrates (Fig. 2).

7. finTRIMs and other teleost TRIM proteins: newcomers in fish antiviral activity

The superfamily of tripartite proteins (TRIM) is defined by the N-terminus TRIM or RBCC motif, which comprises in the following order a RING domain, one or two B-box domains and an associated coiled-coil domain (Fig. 1) (Reymond et al., 2001). The RBCC motif is usually followed by one or two domains that determine(s) the partners of the TRIM protein and the pathway in which it is involved. TRIM proteins are present in vertebrates and invertebrates, but their diversity seems to be greatly expanded in vertebrates. The RING domain has an E3 ubiquitin ligase activity and can mediate the conjugation of target proteins with ubiquitin or ubiquitin-like molecules such as ISG15, which confers a broad functional flexibility to TRIM proteins. TRIM proteins are involved in diverse biological processes such as development, tumorigenesis, cell division, and antiviral immunity. In mammals, many *trim* genes are induced in response to IFNs and virus infection (Rajsbaum et al., 2008) and are involved in antiviral innate immunity through various mechanisms (reviewed in Nisole et al., 2005; Ozato et al.,

2008). For example, TRIM28 is involved in the transcriptional control of the moloney murine leukemia virus provirus (Wolf and Goff, 2007). TRIM19 – also known as promyelocytic leukemia (PML) – has an activity against a wide range of viruses (Nisole et al., 2005; Chelbi-Alix et al., 1998). PML is required for the formation of nuclear macromolecular complexes called nuclear bodies, which contain large number of proteins. PML expression is induced by IFNs in many cells (Regad et al., 2001). The contribution of PML and nuclear bodies to immunity against RNA viruses is complex and proceeds through different p53-dependent and p53-independent pathways. For instance, the resistance to human foamy retrovirus, VSV, rabies virus, lymphocytic choriomeningitis virus and influenza virus is p53 dependent, while the resistance to poliovirus is p53 independent (Everett and Chelbi-Alix, 2007). In addition, many TRIMs containing a B30.2 domain in their C-terminus are involved in antiviral immunity at various levels of the interferon-signaling cascade. For example, *trim25* is induced by IFN and is required for interferon induction via the viral RNA sensor RIG-I (Gack et al., 2007) while *trim21*, another TRIM-B30.2 is IFN-inducible and plays a role in antiviral signalization. TRIM21 is mainly localized in the cytoplasm, but accumulates in the nucleus after IFN stimulation where it ubiquitylates the transcription factor IRF8 (Strandberg et al., 2008). Ubiquitylated IRF8 has an improved efficiency to regulate the production of cytokines including IFN itself, and the expression of many other genes involved in innate immunity. Other TRIM proteins with a C-terminal B30.2 domain such as Trim5a target retroviruses directly: the B30.2 domain binds the nucleocapsid of viral particles after their entry in cells and inhibits the first steps of the viral cycle. TRIM5a is induced by IFN, and was described as a strong restriction factor for HIV-1 in rhesus macaque (Stremlau et al., 2004). Interestingly, the B30.2 domain of TRIM5a has been diversified during primate evolution, allowing restriction of specific retroviruses in different species (Stremlau et al., 2005). Overall, many TRIM proteins are involved in the innate antiviral immunity, and a growing number of TRIM family members appear to be regulated by IFN. In a systematic analysis, Carthagen et al. (2009) recently established that the expression of 27 out of 72 human TRIM genes are controlled by type I and/or II IFNs in lymphocytes and macrophages.

In teleost, a transcript identified in a SSH screen looking for genes induced *ex vivo* by the VHSV in rainbow trout leukocytes (O'Farrell et al., 2002) led to the description of a large subset of TRIM proteins named finTRIMs for “fish novel TRIMs” (van der Aa et al., 2009). Up to 84 genes were found in zebrafish. The *fintrim* genes were found in different teleost species in various numbers and do not have true orthologues in tetrapods. In zebrafish, the B30.2 domain of finTRIMs evolved under strong diversifying selection, and the codons under positive selection are remarkably congruent in finTRIMs and in the mammalian antiviral TRIM5a. Furthermore, the B30.2 domains most closely related to finTRIM are found among NOD-like receptors (NLR), indicating that evolution of TRIMs and NLRs was connected by exon shuffling. In fact, the presence of TRIM-B30.2 in invertebrates and the absence of B30.2 domains from the tetrapod NLRs suggest that the exon shuffling moved a B30.2 domain from a TRIM-B30.2 gene to an NLR gene rather than the contrary (Du Pasquier, 2009). Another TRIM subset with B30.2 domain was also highly diversified in zebrafish with 39 members found in the genome; these genes were named *btr* (for *bloodthirsty-related trim*) after a member of that gene family called *bloodthirsty* due to its involvement in erythrocyte differentiation (Yergeau et al., 2005). In Atlantic cod, a counterpart of *bloodthirsty* was identified from a poly(I:C) subtractive cDNA library, and was shown to be fairly induced in the spleen by poly(I:C) (Furnes and Robertsen, 2010).

A fair diversity of other *trim* subsets is observed in teleost fish, suggesting that they may play an important role in immunity (Sardiello et al., 2008). Moreover, a genome scan of nucleotide

diversity in natural populations of three-spine stickleback identified a region rich in *trim* genes with in particular *trim14* and three *trim35*-like genes, allowing for an additional level of diversification (Hohenlohe et al., 2010). While the multiple roles of TRIM proteins in antiviral immunity are not fully understood in mammals, the remarkable diversity of this family in fish will probably lead to interesting discoveries.

8. *vig2*, a salmonid-specific ISGs with elusive functions

While the ISGs described above are generally well conserved among teleosts, or even among vertebrates, others can be unique to a fish family. *vig2*, a gene identified by differential display PCR in leukocytes incubated with VHSV (Boudinot et al., 2001), constitutes a good example of such a ISG with restricted species range. *vig2* was observed in several transcriptome analyses after virus infection in salmonids (for example, Purcell et al., 2006). *vig2* is strongly induced by interferon in both rainbow trout and Atlantic salmon, and contains a typical ISRE in its promoter (Boudinot et al., 2001). However, no orthologues have been found in other species. Since *vig2* contains no ORF, it may be either a pseudogene or a gene encoding an active RNA species of unknown structure. The function of *vig2* is still unknown.

9. Conclusion

Many mammalian ISGs have been retrieved in fish and are likely to play similar antiviral functions through vertebrates. The main components of the interferon system were highly conserved during evolution of fishes and tetrapods. Hence, this pathway probably appeared in early vertebrate evolution and became the primary antiviral system. These “core” components of the interferon system are generally active against a broad spectrum of viruses (Table 1). Such antiviral activity has been proved for a few ISGs like *Mx*, *vig1/viperin*, ISG15 and PKR, but the mechanisms involved are not completely understood. For example, the detailed antiviral pathways of *Mx* and *viperin* remain unknown and the current knowledge on the cellular functions of ISG15 and isgylation is still limited. More functional studies are required to dissect the pathways involving these conserved ISGs in the fish antiviral response, and to clarify whether they are similar to those found in mammals. Global characterization and better modelization of the virus induced response is also necessary to get a comprehensive view of the functional pathways involved in the cell response. Indeed, many genes that are modulated during viral infection belong to various functional Gene Ontology categories such as calcium regulation, protein and lipid metabolism, translation, etc. The relative involvement of these processes in the antiviral defense and cell resilience is still to be determined.

Besides the interferon-mediated “core” response, virus infection up-regulates generic acute response proteins and pro-inflammatory mediators such as TNF and chemokines. Many secreted factors especially chemokines have been diversified and specialized independently during the evolution in fish and tetrapods, respectively. Furthermore, these genes are subjected to strong evolutionary pressures by pathogen subversion systems and their sequences, numbers and functions evolved quickly. Therefore, it is generally not safe to infer the function of these genes in the fish virus-induced response from the knowledge available in mammals.

New methodologies for global analysis of transcriptome such as high-throughput deep sequencing, combined with genome analysis and advanced imaging should help unravel complex antiviral mechanisms and reveal their involvement in other cellular pathways. New ISGs that are not conserved should also be identified. For these approaches, fish should provide interesting resources

for several reasons: (1) many fish viruses have been identified and well characterized, providing advanced tools for the analysis of host–virus relationships, (2) the full genome sequence of several fish species is available and represent a rich database of molecules potentially involved in antiviral defense. For example, multigenic families of diversified members like zebrafish *ifr* provide very interesting natural experiments to understand co-evolution of cellular and pathogen diversity/complexity (3) easy transgenesis or expression knock-down in transparent models such as zebrafish embryos represent extraordinary opportunities for the visualization of antiviral processes during infection. The study of fish/virus interactions should therefore continue to provide interesting clues about the antiviral defenses of vertebrates in the coming years.

Acknowledgements

We thank Sylvie Quiniou for discussions and proofreading of the manuscript. This work has been funded by INRA.

References

- Aebi, M., Fah, J., Hurt, N., Samuel, C.E., Thomis, D., et al., 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5062–5072.
- Aggad, D., Mazel, M., Boudinot, P., Mogensen, K.E., Hamming, O.J., et al., 2009. The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains. *J. Immunol.* 183, 3924–3931.
- Altmann, S.M., Mellon, M.T., Distel, D.L., Kim, C.H., 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.* 77, 1992–2002.
- Arnheiter, H., Skuntz, S., Noteborn, M., Chang, S., Meier, E., 1990. Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* 62, 51–61.
- Baeck, G.W., Kim, J.W., Park, C.I., 2008. Identification and expression analysis of an interferon stimulated gene 15 (ISG15) from black rockfish, *Sebastes schlegelii*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 679–681.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., et al., 2000. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 13, 129–141.
- Bergan, V., Jagus, R., Lauksund, S., Kileng, O., Robertsen, B., 2008. The Atlantic salmon Z-DNA binding protein kinase phosphorylates translation initiation factor 2 alpha and constitutes a unique orthologue to the mammalian dsRNA-activated protein kinase R. *FEBS J.* 275, 184–197.
- Blomstrom, D.C., Fahey, D., Kutny, R., Korant, B.D., Knight Jr., E., 1986. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 261, 8811–8816.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749–795.
- Boudinot, P., Blanco, M., de Kinkelin, P., Benmansour, A., 1998. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 249, 297–306.
- Boudinot, P., Massin, P., Blanco, M., Riffault, S., Benmansour, A., 1999. *vig-1*, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *J. Virol.* 73, 1846–1852.
- Boudinot, P., Riffault, S., Salhi, S., Carrat, C., Sedlik, C., et al., 2000. Vesicular stomatitis virus and pseudorabies virus induce a *vig1/cig5* homologue in mouse dendritic cells via different pathways. *J. Gen. Virol.* 81, 2675–2682.
- Boudinot, P., Salhi, S., Blanco, M., Benmansour, A., 2001. Viral haemorrhagic septicemia virus induces *vig-2*, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 383–397.
- Byon, J.Y., Ohira, T., Hirono, I., Aoki, T., 2005. Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 135–147.
- Byon, J.Y., Ohira, T., Hirono, I., Aoki, T., 2006. Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine* 24, 921–930.
- Carthagen, L., Bergamaschi, A., Luna, J.M., David, A., Uchil, P.D., et al., 2009. Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS One* 4, e4894.
- Chelbi-Alix, M.K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M.H., Venturini, L., et al., 1995. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9, 2027–2033.
- Chelbi-Alix, M.K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M.H., de The, H., 1998. Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J. Virol.* 72, 1043–1051.
- Chen, Y.M., Su, Y.L., Lin, J.H., Yang, H.L., Chen, T.Y., 2006. Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 58–71.

- Chen, D., Guo, X., Nie, P., 2010. Phylogenetic studies of siniperid fish (Perciformes: Siniperidae) based on multiple genes, with first application of an immune-related gene, the virus-induced protein (viperin) gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 1167–1176.
- Chin, K.C., Cresswell, P., 2001. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 15125–15130.
- Clemens, M.J., Hershey, J.W., Hovanessian, A.C., Jacobs, B.C., Katze, M.G., et al., 1993. PKR: proposed nomenclature for the RNA-dependent protein kinase induced by interferon. *J. Interferon Res.* 13, 241.
- Collet, B., Secombes, C.J., 2001. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 268, 1577–1584.
- Collet, B., Boudinot, P., Benmansour, A., Secombes, C.J., 2004. An Mx1 promoter-reporter system to study interferon pathways in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 793–801.
- Corbeil, S., Lapatra, S.E., Anderson, E.D., Jones, J., Vincent, B., et al., 1999. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Organ.* 39, 29–36.
- Dao, C.T., Zhang, D.E., 2005. ISG15: a ubiquitin-like enigma. *Front. Biosci.* 10, 2701–2722.
- D'Cunha, J., Ramanujam, S., Wagner, R.J., Witt, P.L., Knight Jr., E., et al., 1996. In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *J. Immunol.* 157, 4100–4108.
- de Kinkelin, P., Dorson, M., 1973. Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *J. Gen. Virol.* 19, 125–127.
- De Zoysa, M., Kang, H.S., Song, Y.B., Jee, Y., Lee, Y.D., et al., 2007. First report of invertebrate Mx: cloning, characterization and expression analysis of Mx cDNA in disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish Shellfish Immunol.* 23, 86–96.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H., 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15623–15628.
- DeWitte-Orr, S.J., Leong, J.A., Bols, N.C., 2007. Induction of antiviral genes, Mx and vig-1, by dsRNA and Chum salmon reovirus in rainbow trout monocyte/macrophage and fibroblast cell lines. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 670–682.
- Dios, S., Poisa-Beiro, L., Figueras, A., Novoa, B., 2007. Suppression subtraction hybridization (SSH) and microarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. *Mol. Immunol.* 44, 2195–2204.
- Du Pasquier, L., 2009. Fish 'n' TRIMs. *J. Biol.* 8, 50.
- Duschene, K.S., Broderick, J.B., 2010. The antiviral protein viperin is a radical SAM enzyme. *FEBS Lett.* 584, 1263–1267.
- Engelhardt, O.G., Sirma, H., Pandolfi, P.P., Haller, O., 2004. Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J. Gen. Virol.* 85, 2315–2326.
- Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K., 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819–830.
- Fink, J., Gu, F., Ling, L., Tolfvenstam, T., Olfat, F., et al., 2007. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, e86.
- Fujiki, K., Gauley, J., Bols, N., Dixon, B., 2002. Cloning and characterization of cDNA clones encoding CD9 from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* 54, 604–609.
- Furnes, C., Robertsen, B., 2010. Molecular cloning and characterization of blood-thirsty from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Shellfish Immunol.*
- Furnes, C., Kileng, O., Rinaldo, C.H., Seppola, M., Jensen, I., et al., 2009. Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) possesses three homologues of ISG15 with different expression kinetics and conjugation properties. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 1239–1246.
- Gack, M.U., Shin, Y.C., Joo, C.H., Urano, T., Liang, C., et al., 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916–920.
- Galabru, J., Hovanessian, A., 1987. Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* 262, 15538–15544.
- Gale Jr., M., Katze, M.G., 1998. Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol. Ther.* 78, 29–46.
- García, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., et al., 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1032–1060.
- Garner, J.N., Joshi, B., Jagus, R., 2003. Characterization of rainbow trout and zebrafish eukaryotic initiation factor 2alpha and its response to endoplasmic reticulum stress and IPNV infection. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 217–231.
- Giannakopoulos, N.V., Arutyunova, E., Lai, C., Lenschow, D.J., Haas, A.L., et al., 2009. ISG15 Arg151 and the ISG15-conjugating enzyme UBE1L are important for innate immune control of Sindbis virus. *J. Virol.* 83, 1602–1610.
- Gordien, E., Rosmorduc, O., Peltekian, C., Garreau, F., Brechot, C., et al., 2001. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J. Virol.* 75, 2684–2691.
- Grewal, T.S., Genever, P.G., Brabbs, A.C., Birch, M., Skerry, T.M., 2000. Best5: a novel interferon-inducible gene expressed during bone formation. *FASEB J.* 14, 523–531.
- Haas, A.L., Ahrens, P., Bright, P.M., Ankel, H., 1987. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 262, 11315–11323.
- Haller, O., Kochs, G., 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3, 710–717.
- Haller, O., Arnheiter, H., Lindenmann, J., Gresser, I., 1980. Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. *Nature* 283, 660–662.
- Haller, O., Frese, M., Kochs, G., 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.* 17, 220–230.
- Hansen, J.D., La Patra, S., 2002. Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection. *Immunogenetics* 54, 654–661.
- Helbig, K.J., Lau, D.T., Semendric, L., Harley, H.A., Beard, M.R., 2005. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 42, 702–710.
- Herrmann, J., Lerman, L.O., Lerman, A., 2007. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ. Res.* 100, 1276–1291.
- Hinson, E.R., Cresswell, P., 2009. The N-terminal amphipathic alpha-helix of viperin mediates localization to the cytosolic face of the endoplasmic reticulum and inhibits protein secretion. *J. Biol. Chem.* 284, 4705–4712.
- Hinson, E.R., Joshi, N.S., Chen, J.H., Rahner, C., Jung, Y.W., et al., 2010. Viperin is highly induced in neutrophils and macrophages during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Immunol.* 184, 5723–5731.
- Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Etter, P.D., Stiffler, N., Johnson, E.A., et al., 2010. Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS Genet.* 6, e1000862.
- Horisberger, M.A., Staeheli, P., Haller, O., 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1910–1914.
- Hu, C.Y., Zhang, Y.B., Huang, G.P., Zhang, Q.Y., Gui, J.F., 2004. Molecular cloning and characterization of a fish PKR-like gene from cultured CAB cells induced by UV-inactivated virus. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 353–366.
- Igawa, D., Sakai, M., Sazan, R., 2006. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol. Immunol.* 43, 999–1009.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 147, 258–267.
- Jensen, V., Robertsen, B., 2000. Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 701–710.
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A.I., Robertsen, B., 2002. Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 311–326.
- Jensen, I., Seppola, M., Steiro, K., Sandaker, E., Mennen, S., et al., 2009. Susceptibility of Atlantic cod *Gadus morhua* juveniles to different routes of experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dis. Aquat. Organ.* 85, 105–113.
- Jiang, D., Guo, H., Xu, C., Chang, J., Gu, B., et al., 2008. Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus. *J. Virol.* 82, 1665–1678.
- Jiang, D., Weidner, J.M., Qing, M., Pan, X.B., Guo, H., et al., 2010. Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections. *J. Virol.* 84, 8332–8341.
- Johansen, A., Collet, B., Sandaker, E., Secombes, C.J., Jorgensen, J.B., 2004. Quantification of Atlantic salmon type-I interferon using an Mx1 promoter-reporter gene assay. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 173–184.
- Jorgensen, S.M., Afanasyev, S., Krasnov, A., 2008. Gene expression analyses in Atlantic salmon challenged with infectious salmon anemia virus reveal differences between individuals with early, intermediate and late mortality. *BMC Genomics* 9, 179.
- Kim, M.J., Yoo, J.Y., 2010. Inhibition of hepatitis C virus replication by IFN-mediated ISGylation of HCV-NS5A. *J. Immunol.* 185, 4311–4318.
- Knight Jr., E., Cordova, B., 1991. IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 146, 2280–2284.
- Kochs, G., Haller, O., 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2082–2086.
- Kochs, G., Janzen, C., Hohenberg, H., Haller, O., 2002. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3153–3158.
- Korant, B.D., Blomstrom, D.C., Jonak, G.J., Knight Jr., E., 1984. Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *J. Biol. Chem.* 259, 14835–14839.
- Kuhen, K.L., Shen, X., Carlisle, E.R., Richardson, A.L., Weier, H.U., et al., 1996. Structural organization of the human gene (PKR) encoding an interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (PKR) and differences from its mouse homolog. *Genomics* 36, 197–201.
- Kunzi, M.S., Pitha, P.M., 1996. Role of interferon-stimulated gene ISG-15 in the interferon-omega-mediated inhibition of human immunodeficiency virus replication. *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 919–927.
- Lai, C., Struckhoff, J.J., Schneider, J., Martinez-Sobrido, L., Wolff, T., et al., 2009. Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UBE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. *J. Virol.* 83, 1147–1151.
- Larsen, R., Rokenes, T.P., Robertsen, B., 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *J. Virol.* 78, 7938–7944.

- Lee, S.B., Esteban, M., 1993. The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase inhibits the replication of vaccinia virus. *Virology* 193, 1037–1041.
- Levrard, J.P., Boudinot, P., Colin, I., Benmansour, A., Peyrieras, N., et al., 2007. Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *J. Immunol.* 178, 4385–4394.
- Lindenmann, J., 1964. Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116, 506–509.
- Liu, M., Reimschuessel, R., Hassel, B.A., 2002. Molecular cloning of the fish interferon stimulated gene, 15 kDa (ISG15) orthologue: a ubiquitin-like gene induced by nephrotoxic damage. *Gene* 298, 129–139.
- Liu, C.S., Sun, Y., Zhang, M., Sun, L., 2010. Identification and analysis of a *Sciaenops ocellatus* ISG15 homologue that is involved in host immune defense against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 167–174.
- Loeb, K.R., Haas, A.L., 1992. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 7806–7813.
- Lopez-Munoz, A., Roca, F.J., Meseguer, J., Mulero, V., 2009. New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities. *J. Immunol.* 182, 3440–3449.
- Lutfalla, G., Roest Crolius, H., Stange-Thomann, N., Jaillon, O., Mogensen, K., et al., 2003. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 4, 29.
- MacKenzie, S., Balasch, J.C., Novoa, B., Ribas, L., Roher, N., et al., 2008. Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to in vivo challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation. *BMC Genomics* 9, 141.
- Malakhova, O.A., Zhang, D.E., 2008. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *J. Biol. Chem.* 283, 8783–8787.
- Marjara, I.S., Thu, B.J., Evensen, O., 2010. Differentially expressed genes following persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus in vitro and in vivo. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 845–853.
- Martin, S.A., Zou, J., Houlihan, D.F., Secombes, C.J., 2007a. Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 macrophage cells as revealed by transcriptome profiling. *BMC Genomics* 8, 150.
- Martin, S.A., Taggart, J.B., Seear, P., Bron, J.E., Talbot, R., et al., 2007b. Interferon type I and type II responses in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) SHK-1 cell line by the salmon TRAIT/SGP microarray. *Physiol. Genomics* 32, 33–44.
- McLauchlan, P.E., Collet, B., Ingerslev, E., Secombes, C.J., Lorenzen, N., Ellis, A.E., 2003. DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection—early protection correlates with Mx expression. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 39–50.
- Meier, E., Kunz, G., Haller, O., Arnheiter, H., 1990. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J. Virol.* 64, 6263–6269.
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., et al., 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62, 379–390.
- Milev-Milovanovic, I., Long, S., Wilson, M., Bengten, E., Miller, N.W., et al., 2006. Identification and expression analysis of interferon gamma genes in channel catfish. *Immunogenetics* 58, 70–80.
- Milev-Milovanovic, I., Majji, S., Thodima, V., Deng, Y., Hanson, L., et al., 2009. Identification and expression analyses of poly [I:C]-stimulated genes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Shellfish Immunol.* 26, 811–820.
- Nisole, S., Stoye, J.P., Saib, A., 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 799–808.
- O'Farrell, C., Vaghefi, N., Cantonnnet, M., Buteau, B., Boudinot, P., et al., 2002. Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *J. Virol.* 76, 8040–8049.
- Okumura, A., Lu, G., Pitha-Rowe, I., Pitha, P.M., 2006. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1440–1445.
- Ooi, E.L., Hirono, I., Aoki, T., 2006. Functional characterisation of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Mx promoter. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 293–304.
- Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., Morse 3rd, H.C., 2008. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 849–860.
- Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R., 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8–32.
- Plant, K.P., Thune, R.L., 2008. Genomic organisation of the channel catfish Mx1 gene and characterisation of multiple channel catfish Mx gene promoters. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 575–583.
- Poisa-Beiro, L., Dios, S., Montes, A., Aranguren, R., Figueras, A., et al., 2008. Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain. *Mol. Immunol.* 45, 218–225.
- Poisa-Beiro, L., Dios, S., Ahmed, H., Vasta, G.R., Martinez-Lopez, A., et al., 2009. Nodavirus infection of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) induces up-regulation of galectin-1 expression with potential anti-inflammatory activity. *J. Immunol.* 183, 6600–6611.
- Purcell, M.K., Nichols, K.M., Winton, J.R., Kurath, G., Thorgaard, G.H., et al., 2006. Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Immunol.* 43, 2089–2106.
- Purcell, M.K., Laing, K.J., Woodson, J.C., Thorgaard, G.H., Hansen, J.D., 2009. Characterization of the interferon genes in homozygous rainbow trout reveals two novel genes, alternate splicing and differential regulation of duplicated genes. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 293–304.
- Rajsbbaum, R., Stoye, J.P., O'Garra, A., 2008. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 619–630.
- Recht, M., Borden, E.C., Knight Jr., E., 1991. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN- γ . *J. Immunol.* 147, 2617–2623.
- Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P.P., de The, H., et al., 2001. PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J.* 20, 3495–3505.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., et al., 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20, 2140–2151.
- Rise, M.L., Hall, J., Rise, M., Hori, T., Gamperl, A.K., et al., 2008. Functional genomic analysis of the response of Atlantic cod (*Gadus morhua*) spleen to the viral mimic polyriboinosinic polyribocytidylic acid (pIC). *Dev. Comp. Immunol.* 32, 916–931.
- Roberts, W.K., Hovanessian, A., Brown, R.E., Clemens, M.J., Kerr, I.M., 1976. Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature* 264, 477–480.
- Robertson, B., 2008. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 351–357.
- Robertson, B., Trobridge, G., Leong, J.A., 1997. Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 21, 397–412.
- Robertson, B., Bergan, V., Rokenes, T., Larsen, R., Albuquerque, A., 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, 601–612.
- Rokenes, T.P., Larsen, R., Robertson, B., 2007. Atlantic salmon ISG15: expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Mol. Immunol.* 44, 950–959.
- Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dittmar, K., Koch-Nolte, F., Haag, F., et al., 2005. A PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1602–1607.
- Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dey, M., Dever, T.E., Tazi, L., 2008. Double-stranded RNA-activated protein kinase PKR of fishes and amphibians: varying the number of double-stranded RNA binding domains and lineage-specific duplications. *BMC Biol.* 6, 12.
- Sardiello, M., Cairo, S., Fontanella, B., Ballabio, A., Meroni, G., 2008. Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evol. Biol.* 8, 225.
- Schiote, B.L., Jorgensen, S.M., Rexroad, C., Gjoen, T., Krasnov, A., 2008. Transcriptomic analysis of responses to infectious salmon anemia virus infection in macrophage-like cells. *Virus Res.* 136, 65–74.
- Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., et al., 2000. Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13057–13062.
- Schumacher, B., Bernasconi, D., Schultz, U., Staeheli, P., 1994. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology* 203, 144–148.
- Sen, G.C., Taira, H., Lengyel, P., 1978. Interferon, double-stranded RNA, and protein phosphorylation. Characteristics of a double-stranded RNA-activated protein kinase system partially purified from interferon treated *Ehrlich ascites* tumor cells. *J. Biol. Chem.* 253, 5915–5921.
- Seppola, M., Stenvik, J., Steiro, K., Solstad, T., Robertson, B., et al., 2007. Sequence and expression analysis of an interferon stimulated gene (ISG15) from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 31, 156–171.
- 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.
- Staeheli, P., Haller, O., 1985. Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2150–2153.
- Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., Weissmann, C., 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44, 147–158.
- Staeheli, P., Yu, Y.X., Grob, R., Haller, O., 1989. A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3117–3121.
- Staeheli, P., Pitossi, F., Pavlovic, J., 1993. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell Biol.* 3, 268–272.
- Staub, O., 2004. Ubiquitylation and isgylation: overlapping enzymatic cascades do the job. *Sci. STKE* 2004, pe43.
- Stein, C., Caccamo, M., Laird, G., Leptin, M., 2007. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol.* 8, R251.
- Stirnweiss, A., Ksienzyk, A., Klages, K., Rand, U., Grashoff, M., et al., 2010. IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction. *J. Immunol.* 184, 5179–5185.
- Stojdl, D.F., Abraham, N., Knowles, S., Marius, R., Brasey, A., et al., 2000. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 74, 9580–9585.
- Strandberg, L., Ambrosi, A., Espinosa, A., Ottosson, L., Eloranta, M.L., et al., 2008. Interferon- α induces up-regulation and nuclear translocation of the Ro52 autoantigen as detected by a panel of novel Ro52-specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Immunol.* 28, 220–231.

- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., et al., 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853.
- Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S., Sodroski, J., 2005. Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J. Virol.* 79, 3139–3145.
- Su, J., Zhu, Z., Wang, Y., 2008a. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the PKZ gene in rare minnow *Gobletocypris rarus*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 106–113.
- Su, J., Zhu, Z., Wang, Y., Zou, J., Hu, W., 2008b. Toll-like receptor 3 regulates Mx expression in rare minnow *Gobletocypris rarus* after viral infection. *Immunogenetics* 60, 195–205.
- Su, J., Yang, C., Zhu, Z., Wang, Y., Jang, S., et al., 2009. Enhanced grass carp reovirus resistance of Mx-transgenic rare minnow (*Gobletocypris rarus*). *Fish Shellfish Immunol.* 26, 828–835.
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S.E., Kaufman, R.J., et al., 2000. Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39, 12929–12938.
- Sun, B.J., Nie, P., 2004. Molecular cloning of the viperin gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101, 161–170.
- Tafalla, C., Chico, V., Perez, L., Coll, J.M., Estepa, A., 2007. In vitro and in vivo differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 210–221.
- Tang, Y., Zhong, G., Zhu, L., Liu, X., Shan, Y., et al., 2010. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J. Immunol.* 184, 5777–5790.
- Trobridge, G.D., Leong, J.A., 1995. Characterization of a rainbow trout Mx gene. *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 691–702.
- Trobridge, G.D., Chiou, P.P., Leong, J.A., 1997. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J. Virol.* 71, 5304–5311.
- van der Aa, L.M., Levraud, J.P., Yahmi, M., Lauret, E., Briolat, V., et al., 2009. A large new subset of TRIM genes highly diversified by duplication and positive selection in teleost fish. *BMC Biol.* 7, 7.
- Volff, J.N., 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94, 280–294.
- von Schalburg, K.R., Rise, M.L., Cooper, G.A., Brown, G.D., Gibbs, A.R., et al., 2005. Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. *BMC Genomics* 6, 126.
- Wang, X., Hinson, E.R., Cresswell, P., 2007. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe* 2, 96–105.
- Welsh, R.M., Sen, G.C., 1997. Nonspecific host responses to viral infections. In: Nathanson, N. (Ed.), *Viral Pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 109–141.
- Wolf, D., Goff, S.P., 2007. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 131, 46–57.
- Workenhe, S.T., Hori, T.S., Rise, M.L., Kibenge, M.J., Kibenge, F.S., 2009. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolates induce distinct gene expression responses in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage/dendritic-like cell line TO, assessed using genomic techniques. *Mol. Immunol.* 46, 2955–2974.
- Xu, C., Guo, T.C., Mutoloki, S., Haugland, O., Marjara, I.S., et al., 2010. Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication in vitro. *J. Virol.* 84, 8903–8912.
- Yap, W.H., Tay, A., Brenner, S., Venkatesh, B., 2003. Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter. *Immunogenetics* 54, 705–713.
- Yasuike, M., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., 2010. Identification and characterization of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* interferon-stimulated gene 15 (IF-15). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*
- Yergeau, D.A., Cornell, C.N., Parker, S.K., Zhou, Y., Detrich 3rd, H.W., 2005. blood-thirsty, an RBCC/TRIM gene required for erythropoiesis in zebrafish. *Dev. Biol.* 283, 97–112.
- Zenke, K., Nam, Y.K., Kim, K.H., 2010. Molecular cloning and expression analysis of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133, 290–295.
- Zhang, Y., Gui, J., 2004. Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus* CaSTAT1 identified from the cultured cells in response to virus infection. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 211–227.
- Zhang, Y.B., Hu, C.Y., Zhang, J., Huang, G.P., Wei, L.H., et al., 2003. Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulatory factor 7. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 453–466.
- Zhang, Y.B., Li, Q., Gui, J.F., 2004. Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon. *Immunogenetics* 56, 68–75.
- Zhang, Y.B., Wang, Y.L., Gui, J.F., 2007a. Identification and characterization of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in crucian carp. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 52–61.
- Zhang, Y., Burke, C.W., Ryman, K.D., Klimstra, W.B., 2007b. Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *J. Virol.* 81, 11246–11255.
- Zhang, Y.B., Jiang, J., Chen, Y.D., Zhu, R., Shi, Y., et al., 2007c. The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 232–243.
- Zhou, Z., Hamming, O.J., Ank, N., Paludan, S.R., Nielsen, A.L., et al., 2007. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.* 81, 7749–7758.
- Zhu, H., Cong, J.P., Shen, T., 1997. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13985–13990.
- Zhu, R., Zhang, Y.B., Zhang, Q.Y., Gui, J.F., 2008. Functional domains and the antiviral effect of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR from *Paralichthys olivaceus*. *J. Virol.* 82, 6889–6901.
- Zou, J., Yoshiura, Y., Dijkstra, J.M., Sakai, M., Otake, M., et al., 2004. Identification of an interferon gamma homologue in Fugu, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 403–409.

Références

- Adams DO, Hamilton TA (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annual review of immunology* **2**: 283–318.
- Adams A, Thompson KD (2006). Biotechnology offers revolution to fish health management. *Trends in biotechnology* **24**: 201–5.
- Aggad D, Mazel M, Boudinot P, Mogensen KE, Hamming OJ, Hartmann R, *et al.* (2009). The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**: 3924–31.
- Aggad D, Stein C, Sieger D, Mazel M, Boudinot P, Herbomel P, *et al.* (2010). In vivo analysis of Ifn- γ 1 and Ifn- γ 2 signaling in zebrafish. *Journal of immunology* **185**: 6774–82.
- Aguet M, Dembić Z, Merlin G (1988). Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* **55**: 273–80.
- Ait-Ali T, Wilson AD, Westcott DG, Clapperton M, Waterfall M, Mellencamp MA, *et al.* (2007). Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. *Viral immunology* **20**: 105–18.
- Albertini AAV, Baquero E, Ferlin A, Gaudin Y (2012). Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses* **4**: 117–39.
- Alcaïs A, Abel L, Casanova J (2009). Human genetics of infectious diseases : between proof of principle and paradigm. *The Journal of clinical investigation* **119**: 2506–14.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732–8.
- Allendorf F, Thorgaard GH (1984). Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: Turner B (ed) *Evolutionary Genetics of Fishes*, New York, pp 1–46.
- Altmann SM, Mellon MT, Distel DL, Kim CH (2003). Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of virology* **77**: 1992–2002.
- Ammayappan A, Vakharia VN (2011). Nonvirion protein of novirhabdovirus suppresses apoptosis at the early stage of virus infection. *Journal of virology* **85**: 8393–402.
- Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, *et al.* (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17264–9.
- Arenzana-Seisdedos F, Parmentier M (2006). Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands. *Seminars in immunology* **18**: 387–403.
- Baerwald MR, Petersen JL, Hedrick RP, Schisler GJ, May B (2011). A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* **106**: 920–6.
- Barton GM, Medzhitov R (2003). Linking Toll-like receptors to IFN-alpha/beta expression. *Nature immunology* **4**: 432–3.

- Batts W, Arakawa C, Bernard J, Winton J (1993). Isolates of viral hemorrhagic septicemia virus from North America and Europe can be detected and distinguished by DNA probes. *Diseases of Aquatic Organisms* **17**: 67–71.
- Bearzotti M, Delmas B, Lamoureux a, Loustau a M, Chilmonczyk S, Bremont M (1999). Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *Journal of virology* **73**: 7703–9.
- Benmansour A, Basurco B, Monnier AF, Vende P, Winton JR, de Kinkelin P (1997). Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *The Journal of general virology* **78 (Pt 11)**: 2837–46.
- Bergan V, Steinsvik S, Xu H, Kileng Ø, Robertsen B (2006). Promoters of type I interferon genes from Atlantic salmon contain two main regulatory regions. *The FEBS journal* **273**: 3893–906.
- Bernard D, Riteau B, Hansen JD, Phillips RB, Michel F, Boudinot P, *et al.* (2006). Costimulatory receptors in a teleost fish: typical CD28, elusive CTLA4. *Journal of immunology* **176**: 4191–200.
- Bernstein H, Hopf F, Michod R (1988). Is meiotic recombination and adaptation for repairing DNA, producing genetic variation, or both? In: Michod R, Levin B (eds) *The evolution of sex*, Sinauer, Sunderland, MA., pp 139–160.
- Besnier C, Ylinen L, Strange B, Lister A, Takeuchi Y, Goff SP, *et al.* (2003). Characterization of murine leukemia virus restriction in mammals. *Journal of virology* **77**: 13403–6.
- Best S, Le Tissier P, Towers G, Stoye JP (1996). Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* **382**: 826–9.
- Biacchesi S, Le Berre M, Le Guillou S, Benmansour A, Brémont M, Quillet E, *et al.* (2007). Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *Journal of fish diseases* **30**: 631–6.
- Biacchesi S, LeBerre M, Lamoureux A, Louise Y, Lauret E, Boudinot P, *et al.* (2009). Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses. *Journal of virology* **83**: 7815–27.
- Bingulac-Popovic J, Figueroa F, Sato A, Talbot WS, Johnson SL, Gates M, *et al.* (1997). Mapping of mhc class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* **46**: 129–34.
- Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB (2010). *Breeding for disease resistance in farm animals.*, Ed. 3. CABI; Wallingford; UK.
- Bishop SC, Chesnais J, Stear MJ (2002). Breeding for disease resistance: issues and opportunities. In: *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August, 2002. Session 13.*,
- Bishop SC, Woolliams JA (2010). On the genetic interpretation of disease data. *PLoS One* **5**: e8940.
- Bleyzac P, Exbrayat J-M, Fellah JS (2005). Émergence du système immunitaire adaptatif : hypothèses en présence. *MEDECINE/SCIENCES* **21**: 210–215.

- Boddicker N, Waide EH, Rowland RRR, Lunney JK, Garrick DJ, Reecy JM, *et al.* (2012). Evidence for a major QTL associated with host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge. *Journal of animal science* **90**: 1733–46.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* **15**: 749–95.
- Bonjardim C a, Ferreira PCP, Kroon EG (2009). Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunology letters* **122**: 1–11.
- Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, *et al.* (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery* **6**: 975–90.
- Le Boucher R, Dupont-Nivet M, Vandeputte M, Kerneis T, Goardon L, Labbé L, *et al.* (2012). Selection for adaptation to dietary shifts: towards sustainable breeding of carnivorous fish. *PLoS One* **7**: e44898.
- Boudinot P, Bernard D, Boubekeur S, Thoulouze M-I, Bremont M, Benmansour A (2004). The glycoprotein of a fish rhabdovirus profiles the virus-specific T-cell repertoire in rainbow trout. *The Journal of general virology* **85**: 3099–108.
- Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, Benmansour a (1998). Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* **249**: 297–306.
- Boudinot P, Boubekeur S, Benmansour a (2001). Rhabdovirus infection induces public and private T cell responses in teleost fish. *Journal of immunology* **167**: 6202–9.
- Boudinot P, Boubekeur S, Benmansour A (2002). Primary structure and complementarity-determining region (CDR) 3 spectratyping of rainbow trout TCRbeta transcripts identify ten Vbeta families with Vbeta6 displaying unusual CDR2 and differently spliced forms. *Journal of immunology* **169**: 6244–52.
- Boudinot P, Massin P, Blanco M, Riffault S, Benmansour A (1999). vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *Journal of virology* **73**: 1846–52.
- Boussaha M, Guyomard R, Cabau C, Esquerré D, Quillet E (2012). Development and characterisation of an expressed sequence tags (EST)-derived single nucleotide polymorphisms (SNPs) resource in rainbow trout. *BMC genomics* **13**: 238.
- Brandstadter JD, Yang Y (2011). Natural killer cell responses to viral infection. *Journal of innate immunity* **3**: 274–9.
- Briles WE, Stone HA, Cole RK (1977). Marek's disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines. *Science (New York, N.Y.)* **195**: 193–5.
- Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, *et al.* (1994). Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *The New England journal of medicine* **330**: 1192–6.

- Burnet FM (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *The Australian journal of science* **20**: 67–68.
- Burridge MJ, Wilcox CJ, Hennemann JM (1979). Influence of genetic factors on the susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection. *European journal of cancer* **15**: 1395–400.
- Chourrout D (1982). La gynogenèse chez les vertébrés. *Reproduction Nutrition Développement* **22**: 713–734.
- Calenge F, Lecerf F, Demars J, Fève K, Vignoles F, Pitel F, *et al.* (2009). QTL for resistance to *Salmonella* carrier state confirmed in both experimental and commercial chicken lines. *Animal genetics* **40**: 590–7.
- Casrouge A, Zhang S-Y, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, *et al.* (2006). Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science (New York, N.Y.)* **314**: 308–12.
- Castro R, Bernard D, Lefranc MP, Six a, Benmansour a, Boudinot P (2011). T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish & shellfish immunology* **31**: 644–54.
- Cerwenka a, Lanier LL (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature reviews. Immunology* **1**: 41–9.
- Chang M, Nie P, Collet B, Secombes CJ, Zou J (2009). Identification of an additional two-cysteine containing type I interferon in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts. *Immunogenetics* **61**: 315–25.
- Cheng H (2010). Viral Diseases in Chickens. In: Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB (eds) *Breeding for disease resistance in farm animals*, CABI; Wallingford; UK, pp 70–86.
- Chin KC, Cresswell P (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 15125–30.
- Chiou PP, Kim CH, Ormonde P, Leong JA (2000). Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host-directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures. *Journal of virology* **74**: 7619–27.
- Choi MK, Moon CH, Ko MS, Lee U-H, Cho WJ, Cha SJ, *et al.* (2011). A nuclear localization of the infectious haematopoietic necrosis virus NV protein is necessary for optimal viral growth. *PLoS One* **6**: e22362.
- Chourrout D, Quillet E (1982). Induced gynogenesis in the rainbow trout: Sex and survival of progenies production of all-triploid populations. *Theoretical and Applied Genetics* **63**: 201–205.
- Clemens MJ, Hershey JW, Hovanessian AC, Jacobs BC, Katze MG, Kaufman RJ, *et al.* (1993). PKR: proposed nomenclature for the RNA-dependent protein kinase induced by interferon. *Journal of interferon research* **13**: 241.
- Collet B, Secombes CJ (2002). Type I-interferon signalling in fish. *Fish & shellfish immunology* **12**: 389–97.

- Cook JR, Cleary CM, Mariano TM, Izotova L, Pestka S (1996). Differential responsiveness of a splice variant of the human type I interferon receptor to interferons. *The Journal of biological chemistry* **271**: 13448–53.
- Crane M, Hyatt A (2011). Viruses of fish: an overview of significant pathogens. *Viruses* **3**: 2025–46.
- Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA (2005). The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature immunology* **6**: 295–302.
- Davidson WS, Koop BF, Jones SJM, Iturra P, Vidal R, Maass A, *et al.* (2010). Sequencing the genome of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genome biology* **11**: 403.
- Desvaux FX, Charlemagne J (1983). The goldfish immune response. II. Thymic influence on allograft rejection. *Developmental and comparative immunology* **7**: 563–7.
- Dezengrini R, Weiblen R, Flores EF (2006). Selection and characterization of canine, swine and rabbit cell lines resistant to bovine viral diarrhea virus. *Journal of virological methods* **137**: 51–7.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)* **303**: 1529–31.
- Dijkstra JM, Kiryu I, Yoshiura Y, Kumánovics A, Kohara M, Hayashi N, *et al.* (2006). Polymorphism of two very similar MHC class Ib loci in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* **58**: 152–67.
- Diter A (1993). Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *Journal of Fish Biology* **42**: 777–786.
- Domanski P, Witte M, Kellum M, Rubinstein M, Hackett R, Pitha P, *et al.* (1995). Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *The Journal of biological chemistry* **270**: 21606–11.
- Dorson M, Quillet E, Hollebecq MG, Torhy C, Chevassus B (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Veterinary research* **26**: 361–8.
- Elinson RP, Bogart JP, Licht LE, Lowcock LA (1992). Gynogenetic mechanisms in polyploid hybrid salamanders. *The Journal of experimental zoology* **264**: 93–99.
- Eaton W (1990). Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic:cytidylic acid. *Diseases of Aquatic Organisms* **9**: 193–198.
- Falconer DS (1981). An introduction to quantitative genetics. Longman, Londres. 340p.
- FAO (2009). *The State of World Fisheries and Aquaculture*.
- Fan S, Chen S, Liu Y, Lin Y, Liu H, Guo L, *et al.* (2008). Zebrafish TRIF, a Golgi-localized protein, participates in IFN induction and NF-kappaB activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**: 5373–83.
- Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, *et al.* (2007). A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* **317**: 944–7.

- Fife MS, Howell JS, Salmon N, Hocking PM, van Diemen PM, Jones MA, *et al.* (2010). Genome-wide SNP analysis identifies major QTL for Salmonella colonization in the chicken. *Animal genetics*.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, *et al.* (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine* **198**: 1043–55.
- Flajnik MF, Kasahara M (2001). Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity* **15**: 351–62.
- FranceAgriMer (2011). *Les filières pêche et aquaculture en France*.
- Froschauer A, Braasch I, Volff J-N (2006). Fish Genomes, Comparative Genomics and Vertebrate Evolution. *Current Genomics* **7**: 43–57.
- Fu Z (2005). Genetic comparison of the rhabdoviruses from animals and plants. In: *Current topics In Microbiology and Immunology*, pp 1–24.
- Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, Coimbra MRM, Sakamoto T, Okamoto N (2006). Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* **254**: 203–210.
- Gahlawat SK, Ellis AE, Collet B (2009). Expression of interferon and interferon--induced genes in Atlantic salmon *Salmo salar* cell lines SHK-1 and TO following infection with Salmon AlphaVirus SAV. *Fish & shellfish immunology* **26**: 672–5.
- Genet C, Dehais P, Palti Y, Gao G, Gavory F, Wincker P, *et al.* (2011). Analysis of BAC-end sequences in rainbow trout: content characterization and assessment of synteny between trout and other fish genomes. *BMC genomics* **12**: 314.
- Ghittino P (1965). Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **126**: 468–78.
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, *et al.* (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 8459–64.
- de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T (2005). CARHTA GENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**: 1703–4.
- GjØen HM, Refstie T, Ulla O, Gjerde B (1997). Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. *Aquaculture* **158**: 277–288.
- Glass EJ, Baxter R, Leach RJ, Taylor G (2010). Bovine Viral Diseases: the Role of Host Genetics. In: *Breeding for disease resistance in farm animals*, CABI; Wallingford; UK, pp 88–140.
- Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y (2006). Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. *BMC genomics* **7**: 196.
- Grayfer L, Belosevic M (2009). Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma. *Developmental and comparative immunology* **33**: 235–46.

- Grayfer L, Garcia EG, Belosevic M (2010). Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *The Journal of biological chemistry* **285**: 23537–47.
- Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, Midtlyng P, Kjoeglum S, Storset A, *et al.* (2003). MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics* **55**: 210–9.
- Guyomard R, Boussaha M, Krieg F, Hervet C, Quillet E (2012). A synthetic rainbow trout linkage map provides new insights into the salmonid whole genome duplication and the conservation of synteny among teleosts. *BMC genetics* **13**: 15.
- Guyomard R, Mauger S, Tabet-Canale K, Martineau S, Genet C, Krieg F, *et al.* (2006). A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC genomics* **7**: 302.
- Guénet J-L (2005). Assessing the genetic component of the susceptibility of mice to viral infections. *Briefings in functional genomics & proteomics* **4**: 225–40.
- Hershberger W (1992). Genetic variability in rainbow-trout populations. *Aquaculture* **100**: 51–71.
- Halbur PG, Rothschild MF, Thacker BJ, Meng XJ, Paul PS, Bruna JD (1998). Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie* **115**: 181–189.
- Haldane J (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* **12**: 101–109.
- Haller O, Arnheiter H, Lindenmann J, Gresser I (1980). Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. *Nature* **283**: 660–2.
- (Hamming *et al.*, 2011)Hamming OJ, Lutfalla G, Levraud J-P, Hartmann R (2011). Crystal structure of Zebrafish interferons I and II reveals conservation of type I interferon structure in vertebrates. *Journal of virology* **85**: 8181–7.
- Hansen JD, Landis ED, Phillips RB (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 6919–24.
- Hansen JD, Du Pasquier L, Lefranc M-P, Lopez V, Benmansour A, Boudinot P (2009). The B7 family of immunoregulatory receptors: a comparative and evolutionary perspective. *Molecular immunology* **46**: 457–72.
- Hansen JD, Strassburger P, Du Pasquier L (1996). Conservation of an alpha 2 domain within the teleostean world, MHC class I from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and comparative immunology* **20**: 417–25.
- Harmache A, LeBerre M, Droineau S, Giovannini M, Brémont M, Bre M (2006). Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *Journal of virology* **80**: 3655–9.

- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, *et al.* (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology* **3**: 196–200.
- Henryon M, Berg P, Olesen NJ, Kjær TE, Slierendrecht WJ, Jokumsen A, *et al.* (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture* **250**: 621–636.
- Hillier LW and the International Chicken Genome Sequencing Consortium. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **432**: 695–716.
- Himathongkham S, Luciw PA (1996). Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells. *Virology* **219**: 485–8.
- Hoffmann J a, Reichhart JM, Hetru C (1996). Innate immunity in higher insects. *Current opinion in immunology* **8**: 8–13.
- Hoffmann B, Schütze H, Mettenleiter TC (2002). Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus. *Virus research* **84**: 89–100.
- Holland JW, Bird S, Williamson B, Woudstra C, Mustafa A, Wang T, *et al.* (2008). Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: functional analysis and transcriptional modulation. *Molecular immunology* **46**: 269–85.
- Houston RD, Haley CS, Hamilton A, Guy DR, Tinch AE, Taggart JB, *et al.* (2008). Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics* **178**: 1109–15.
- Hu G, Xia J, Lou H, Liu Q, Lin J, Yin X, *et al.* (2011). Cloning and expression analysis of interferon regulatory factor 7 (IRF-7) in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Developmental and comparative immunology* **35**: 416–20.
- Huxley J (1928). Sexual difference of linkage in *Gammarus chevreuxi*. *Journal of Genetics* **20**: 145–156.
- Isaacs A, Lindenmann J (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)* **147**: 258–67.
- Iliev DB, Sobhkhaz M, Fremmerlid K, Jørgensen JB (2011). MyD88 interacts with interferon regulatory factor (IRF) 3 and IRF7 in Atlantic salmon (*Salmo salar*): transgenic SsMyD88 modulates the IRF-induced type I interferon response and accumulates in aggresomes. *The Journal of biological chemistry* **286**: 42715–24.
- Jaillon O, Aury J-M, Brunet F, Petit J-L, Stange-Thomann N, Mauceli E, *et al.* (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**: 946–57.
- Jerne NK (1955). The natural-selection theory of antibody formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **41**: 849–57.

- Jørgensen JB, Johansen L-H, Steiro K, Johansen A (2003). CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of virology* **77**: 11471–9.
- Kasahara M, Hayashi M, Tanaka K, Inoko H, Sugaya K, Ikemura T, *et al.* (1996). Chromosomal localization of the proteasome Z subunit gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 9096–101.
- Kaufman J, Jacob J, Shaw I, Walker B, Milne S, Beck S, *et al.* (1999). Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. *Immunological reviews* **167**: 101–17.
- Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG (2004). The structure of human parvovirus B19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 11628–33.
- Kawai T, Akira S (2007). TLR signaling. *Seminars in immunology* **19**: 24–32.
- Kawai T, Akira S (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1143**: 1–20.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, *et al.* (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science (New York, N.Y.)* **305**: 872–4.
- Kileng Ø, Albuquerque A, Robertsen B (2008). Induction of interferon system genes in Atlantic salmon by the imidazoquinoline S-27609, a ligand for Toll-like receptor 7. *Fish & shellfish immunology* **24**: 514–22.
- de Kinkelin P, Bearzotti M (1981). Immunization of rainbow trout against viral hemorrhagic septicaemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. *Developments in Biological Standardization* **49**: 431–439.
- de Kinkelin P, Dorson M (1973). Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *The Journal of general virology* **19**: 125–7.
- de Kinkelin P, Dorson M, Hattenberger-Baudouy AM (1982). Interferon synthesis in trout and carp after viral infection. *Developmental and comparative immunology*: 167–174.
- Knight E, Cordova B (1991). IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **146**: 2280–4.
- Komen H, Thorgaard GH (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* **269**: 150–173.
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, *et al.* (2002). A high-resolution recombination map of the human genome. *Nature genetics* **31**: 241–7.
- Korant BD, Blomstrom DC, Jonak GJ, Knight E (1984). Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *The Journal of biological chemistry* **259**: 14835–9.
- Kurath G, Garver KA, Troyer RM, Emmenegger EJ, Einer-Jensen K, Anderson ED (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *The Journal of general virology* **84**: 803–14.

- Kurath G, Leong JC (1985). Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein. *Journal of virology* **53**: 462–8.
- Kuroda N, Wada H, Naruse K, Simada A, Shima A, Sasaki M, *et al.* (1996). Molecular cloning and linkage analysis of the Japanese medaka fish complement Bf/C2 gene. *Immunogenetics* **44**: 459–67.
- Kurt-Jones E a, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp R a, *et al.* (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology* **1**: 398–401.
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**: 675–8.
- Künzi MS, Pitha PM (1996). Role of interferon-stimulated gene ISG-15 in the interferon-omega-mediated inhibition of human immunodeficiency virus replication. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **16**: 919–27.
- Lindenmann J (1964). Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **116**: 506–9.
- LaPatra SE, Jones GR, Lauda KA, McDowell TS, Schneider R, Hedrick RP (1995). White Sturgeon as a Potential Vector of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *Journal of Aquatic Animal Health* **7**: 225–230.
- LaPatra SE, Lauda KA, Jones GR, Walker SC, Shewmaker BS, Morton AW (1995). Characterization of IHNV isolates associated with neurotropism. *Veterinary research* **26**: 433–7.
- Lai C, Struckhoff JJ, Schneider J, Martinez-Sobrido L, Wolff T, García-Sastre A, *et al.* (2009). Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UbE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. *Journal of virology* **83**: 1147–51.
- Langenau DM, Zon LI (2005). The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nature reviews. Immunology* **5**: 307–17.
- Lantier I, Moreno CR, Berthon P, Sallé G, Pitel F, Schibler L, *et al.* (2012). Quantitative trait loci for resistance to infection in sheep using a live Salmonella Abortusovis vaccine. *Animal genetics* **43**: 632–635.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, *et al.* (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature immunology* **5**: 190–8.
- Lauksund S, Svingerud T, Bergan V, Robertsen B (2009). Atlantic salmon IPS-1 mediates induction of IFN α 1 and activation of NF-kappaB and localizes to mitochondria. *Developmental and comparative immunology* **33**: 1196–204.
- Leach RJ, O'Neill RG, Fitzpatrick JL, Williams JL, Glass EJ (2012). Quantitative trait loci associated with the immune response to a bovine respiratory syncytial virus vaccine. *PLoS One* **7**: e33526.
- Lenormand T (2003). The Evolution of Sex Dimorphism in Recombination. *Genetics* **163**: 811–822.

- Lenormand T, Dutheil J (2005). Recombination difference between sexes: a role for haploid selection. *PLoS biology* **3**: e63.
- Levraud J-P, Boudinot P, Colin I, Benmansour A, Peyrieras N, Herbomel P, *et al.* (2007). Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *Journal of immunology* **178**: 4385–94.
- Li J, Barreda DR, Zhang Y-A, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, *et al.* (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature immunology* **7**: 1116–24.
- Li M, Liu X, Zhou Y, Su SB (2009). Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *Journal of leukocyte biology* **86**: 23–32.
- Libersou S, Albertini AAV, Ouldali M, Maury V, Maheu C, Raux H, *et al.* (2010). Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *The Journal of cell biology* **191**: 199–210.
- Lien S, Gidskehaug L, Moen T, Hayes BJ, Berg PR, Davidson WS, *et al.* (2011). A dense SNP-based linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns. *BMC genomics* **12**: 615.
- Linder P, Jankowsky E (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**: 505–16.
- Long S, Milev-Milovanovic I, Wilson M, Bengten E, Clem LW, Miller NW, *et al.* (2006). Identification and expression analysis of cDNAs encoding channel catfish type I interferons. *Fish & shellfish immunology* **21**: 42–59.
- Lorenzen N, Lapatra SE (1999). Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish & Shellfish Immunology* **9**: 345–360.
- Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**: 145–51.
- Lukacs MF, Harstad H, Grimholt U, Beetz-Sargent M, Cooper GA, Reid L, *et al.* (2007). Genomic organization of duplicated major histocompatibility complex class I regions in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC genomics* **8**: 251.
- Lunney JK (2010). Viral Diseases in Pigs. In: Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB (eds) *Breeding for disease resistance in farm animals*, CABI; Wallingford; UK, pp 149–172.
- Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E, Monneron D, Reboul J, Rogers NC, *et al.* (1995). Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *The EMBO journal* **14**: 5100–8.
- Lutfalla G, Roest Crollius H, Stange-Thomann N, Jaillon O, Mogensen K, Monneron D (2003). Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC genomics* **4**: 29.
- Lynch M, Walsh B (1997). *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates Incorporated; Sunderland; USA.

- López-Muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, Mulero V (2009). New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities. *Journal of immunology* **182**: 3440–9.
- López-Soria S, Segalés J, Nofrarias M, Calsamiglia M, Ramírez H, Mínguez A, *et al.* (2004). Genetic influence on the expression of PCV disease. *The Veterinary record* **155**: 504.
- Mulcahy D, Wood J (1986). A natural epizootic of infectious haematopoietic necrosis in imported Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the enzootic region. *Journal of Fish Diseases* **9**: 173–175.
- Magor KE, Shum BP, Parham P (2004). The beta 2-microglobulin locus of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) contains three polymorphic genes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**: 3635–43.
- Malakhova OA, Zhang D-E (2008). ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *The Journal of biological chemistry* **283**: 8783–7.
- Matsuo A, Oshiumi H, Tsujita T, Mitani H, Kasai H, Yoshimizu M, *et al.* (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *Journal of immunology* **181**: 3474–85.
- McIntyre JD, Amend DF (1978). Heritability of Tolerance for Infectious Hematopoietic Necrosis in Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Transactions of the American Fisheries Society* **107**: 305–308.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394–7.
- Midtlyng P, Storset A, Michel C, Slierendrecht WJ, Okamoto N (2001). Breeding for disease resistance in fish. In: *10th international Conference of the European-Association-of-Fish-Pathologists*,
- Miller MR, Brunelli JP, Wheeler PA, Liu S, Rexroad CE, Palti Y, *et al.* (2012). A conserved haplotype controls parallel adaptation in geographically distant salmonid populations. *Molecular ecology* **21**: 237–49.
- Miller NW, Sizemore RC, Clem LW (1985). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. *Journal of immunology* **134**: 2884–8.
- Miller KM, Winton JR, Schulze AD, Purcell MK, Ming TJ (2004). Major Histocompatibility Complex Loci are Associated with Susceptibility of Atlantic Salmon to Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *Environmental Biology of Fishes* **69**: 307–316.
- Moen T (2010). Breeding for resistance to viral diseases in salmonids. In: Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB (eds) *Breeding for disease resistance in farm animals*, CABI; Wallingford; UK, pp 166–179.
- Moen T, Baranski M, Sonesson AK, Kjøglum S (2009). Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC genomics* **10**: 368.

- Moen T, Hoyheim B, Munck H, Gomez-Raya L (2004). A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Animal genetics* **35**: 81–92.
- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uzé G (1999). The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **19**: 1069–98.
- Morgan TH (1912). No crossing over in the male of drosophila of genes in the second and third pairs of chromosomes. *Biological Bulletin* **26**: 195–204.
- Neibergs H, Zanella R, Casas E, Snowden GD, Wenz J, Neibergs JS, *et al.* (2011). Loci on Bos taurus chromosome 2 and Bos taurus chromosome 26 are linked with bovine respiratory disease and associated with persistent infection of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of animal science* **89**: 907–15.
- Nisole S, Stoye JP, Saïb A (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nature reviews. Microbiology* **3**: 799–808.
- Norris A, Foyle L, Ratcliff J (2008). Heritability of mortality in response to a natural pancreas disease (SPDV) challenge in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts on a West of Ireland sea site. *Journal of fish diseases* **31**: 913–20.
- Ødegård J, Olesen I, Dixon P, Jeney Z, Nielsen H-M, Way K, *et al.* (2010). Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains. II: Resistance to koi herpesvirus and *Aeromonas hydrophila* and their relationship with pond survival. *Aquaculture* **304**: 7–13.
- Ødegård J, Sommer A-I, Præbel AK (2010). Heritability of resistance to viral nervous necrosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* **300**: 59–64.
- Ohno S (1970). *Evolution by gene duplication*. Springer, New-York, Heidelberg, Berlin.
- OIE (2009). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 6th ed. Paris, France.
- Okamoto N, Tayama T, Kawanobe M, Fujiki N, Yasuda Y, Sano T (1993). Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture* **117**: 71–76.
- Ooi EL, Verjan N, Haraguchi I, Oshima T, Kondo H, Hirono I, *et al.* (2008). Innate immunomodulation with recombinant interferon-alpha enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Developmental and comparative immunology* **32**: 1211–20.
- Ord WM, LeBerre M, de Kinkelin P (1976). Viral hemorrhagic septicemia - comparative susceptibility of rainbow-trout (*Salmo-gairdneri*) and hybrids (*Salmo-gairdneri* X *Oncorhynchus-kisutch*) to experimental infection. *Journal of the fisheries research board of Canada* **33**: 1205–1208.
- Oshima K, Higman K, Arakawa C, de Kinkelin P, Jørgensen P, Meyers T, *et al.* (1993). Genetic comparison of viral hemorrhagic septicemia virus isolates from North America and Europe. *Diseases of Aquatic Organisms* **17**: 73–80.

- Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, Matsumoto M, Ikeo K, Seya T (2003). Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* **54**: 791–800.
- Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra MR, Akutsu T, *et al.* (2001). Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular genetics and genomics* : **MGG 265**: 23–31.
- O’Farrell C, Vaghefi N, Cantonnet M, Buteau B, Boudinot P, Benmansour A (2002). Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *Journal of virology* **76**: 8040–9.
- O’Neill L a J, Fitzgerald K a, Bowie AG (2003). The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends in immunology* **24**: 286–90.
- Palti Y (2011). Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental and comparative immunology* **35**: 1263–72.
- Palti Y, Gahr S a, Purcell MK, Hadidi S, Rexroad CE, Wiens GD (2010). Identification, characterization and genetic mapping of TLR7, TLR8a1 and TLR8a2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and comparative immunology* **34**: 219–33.
- Palti Y, Genet C, Luo M-C, Charlet A, Gao G, Hu Y, *et al.* (2011). A first generation integrated map of the rainbow trout genome. *BMC genomics* **12**: 180.
- Palti Y, Parsons JE, Thorgaard GH (1999). Identification of candidate DNA markers associated with IHN virus resistance in backcrosses of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and cutthroat trout (*O. clarki*). *Aquaculture* **173**: 81–94.
- Palti Y, Vallejo RL, Welch TJ, Leeds TD, Evenhuis JP, Gao G, *et al.* (2012). Mapping of QTL for bacterial cold water disease resistance in rainbow trout. In: *The International Symposium on Genetics in Aquaculture XI*, Auburn, USA.
- Park JW, Moon CH, Wargo AR, Purcell MK, Kurath G (2010). Differential growth of U and M type infectious haematopoietic necrosis virus in a rainbow trout-derived cell line, RTG-2. *Journal of fish diseases* **33**: 583–91.
- Partula S, Fellah JS, de Guerra A, Charlemagne J (1994). [Characterization of cDNA of T-cell receptor beta chain in rainbow trout]. *Comptes rendus de l’Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* **317**: 765–70.
- Du Pasquier L (2004). Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *Comptes Rendus Biologies* **327**: 591–601.
- Du Pasquier L (2009). Diversification des immunorécepteurs au cours de l’évolution des métazoaires. *MEDECINE/SCIENCES*: 273–80.
- Du Pasquier L, Zucchetti I, De Santis R (2004). Immunoglobulin superfamily receptors in protochordates: before RAG time. *Immunological reviews* **198**: 233–48.
- Paul WE (2008). *Fundamental Immunology*, Ed. 6 (WE Paul, Ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

- Peltz G, Usuka J (2005). From mouse genetics to human therapeutics. *Current opinion in drug discovery & development* **8**: 253–61.
- Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N, Kindberg E, Svensson L (2006). Mendelian resistance to human norovirus infections. *Seminars in immunology* **18**: 375–86.
- Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G (2005). The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell research* **15**: 407–22.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews* **202**: 8–32.
- Petry DB, Holl JW, Weber JS, Doster AR, Osorio FA, Johnson RK (2005). Biological responses to porcine respiratory and reproductive syndrome virus in pigs of two genetic populations. *Journal of animal science* **83**: 1494–502.
- Peñaranda MMD, Purcell MK, Kurath G (2009). Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics. *The Journal of general virology* **90**: 2172–82.
- Phelan PE, Mellon MT, Kim CH (2005). Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular immunology* **42**: 1057–71.
- Pincus T, Hartley JW, Rowe WP (1971). A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. I. Tissue culture studies of naturally occurring viruses. *The Journal of experimental medicine* **133**: 1219–33.
- Popa A, Samollow P, Gautier C, Mouchiroud D (2012). The sex-specific impact of meiotic recombination on nucleotide composition. *Genome biology and evolution* **4**: 412–22.
- Pottinger TG (2010). A multivariate comparison of the stress response in three salmonid and three cyprinid species: evidence for inter-family differences. *Journal of fish biology* **76**: 601–21.
- Purcell MK, Laing KJ, Winton JR (2012). Immunity to fish rhabdoviruses. *Viruses* **4**: 140–66.
- Purcell MK, Laing KJ, Woodson JC, Thorgaard GH, Hansen JD (2009). Characterization of the interferon genes in homozygous rainbow trout reveals two novel genes, alternate splicing and differential regulation of duplicated genes. *Fish & shellfish immunology* **26**: 293–304.
- Purcell MK, Lapatra SE, Woodson JC, Kurath G, Winton JR (2010). Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish & shellfish immunology* **28**: 98–105.
- Purcell MK, Smith KD, Hood L, Winton JR, Roach JC (2006). Conservation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways in Teleost Fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics* **1**: 77–88.
- Quillet E (2002). Mutation in a Sex-Determining Gene in Rainbow Trout: Detection and Genetic Analysis. *Journal of Heredity* **93**: 91–99.
- Quillet E, Boudry P, Lapegue S (2007). Genetic variability of response to pathogens: a tool to improve health of farmed fish and molluscs. *Production Animales* **20**: 239–251.

- Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C (2001). In vitro viral haemorrhagic septicaemia virus replication in excised fins of rainbow trout: correlation with resistance to waterborne challenge and genetic variation. *Diseases of aquatic organisms* **45**: 171–82.
- Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P (2007). Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish & shellfish immunology* **22**: 510–9.
- Quillet E, Le Guillou S, Aubin J, Fauconneau B (2005). Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **245**: 49–61.
- Rebl A, Goldammer T, Seyfert H-M (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary immunology and immunopathology* **134**: 139–50.
- Recht M, Borden EC, Knight E (1991). A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **147**: 2617–23.
- Renauld J-C (2003). Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nature reviews. Immunology* **3**: 667–76.
- Rexroad CE, Lee Y, Keele JW, Karamycheva S, Brown G, Koop B, *et al.* (2003). Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and creation of a gene index. *Cytogenetic and genome research* **102**: 347–54.
- Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clemens MJ, Kerr IM (1976). Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature* **264**: 477–80.
- Robertsen B (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & shellfish immunology* **20**: 172–91.
- Robertsen B (2008). Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish & shellfish immunology* **25**: 351–7.
- Robertsen B, Bergan V, Røkenes T, Larsen R, Albuquerque A (2003). Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **23**: 601–12.
- Robertsen B, Zou J, Secombes C, Leong J-A (2006). Molecular and expression analysis of an interferon-gamma-inducible guanylate-binding protein from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and comparative immunology* **30**: 1023–33.
- Rodriguez MF, Wiens GD, Purcell MK, Palti Y (2005). Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* **57**: 510–9.
- Sadler AJ, Williams BRG (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews. Immunology* **8**: 559–68.
- Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* (2011). Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **34**: 352–63.

- Sakamoto T, Danzmann RG, Gharbi K, Howard P, Ozaki a, Khoo SK, *et al.* (2000). A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* **155**: 1331–45.
- Salem M, Rexroad CE, Wang J, Thorgaard GH, Yao J (2010). Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. *BMC genomics* **11**: 564.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, *et al.* (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**: 722–5.
- Samuel CE (2007). Interferons, Interferon Receptors, Signal Transducer and Transcriptional Activators, and Interferon Regulatory Factors. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 20045–20046.
- Sangrador-Vegas A, Martin SA, O’Dea PG, Smith TJ (2000). Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 7031–7.
- Savan R, Ravichandran S, Collins JR, Sakai M, Young HA (2009). Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine & growth factor reviews* **20**: 115–24.
- Schindler C, Levy DE, Decker T (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *The Journal of biological chemistry* **282**: 20059–63.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* **75**: 163-89
- Schütze H, Mundt E, Mettenleiter TC (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus genes* **19**: 59–65.
- Seo J-Y, Yaneva R, Hinson ER, Cresswell P (2011). Human cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity. *Science (New York, N.Y.)* **332**: 1093–7.
- Seppola M, Stenvik J, Steiro K, Solstad T, Robertsen B, Jensen I (2007). Sequence and expression analysis of an interferon stimulated gene (ISG15) from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and comparative immunology* **31**: 156–71.
- Shapira Y, Magen Y, Zak T, Kotler M, Hulata G, Levavi-Sivan B (2005). Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. *Aquaculture* **245**: 1–11.
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, *et al.* (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature immunology* **4**: 63–8.
- Shibata R, Sakai H, Kawamura M, Tokunaga K, Adachi A (1995). Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells. *The Journal of general virology* **76**: 2723–30.
- Shifman S, Bell JT, Copley RR, Taylor MS, Williams RW, Mott R, *et al.* (2006). A high-resolution single nucleotide polymorphism genetic map of the mouse genome. *PLoS biology* **4**: e395.

- Shiina T, Dijkstra JM, Shimizu S, Watanabe A, Yanagiya K, Kiryu I, *et al.* (2005). Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry. *Immunogenetics* **56**: 878–93.
- Shum BP, Azumi K, Zhang S, Kehrer SR, Raison RL, Detrich HW, *et al.* (1996). Unexpected beta2-microglobulin sequence diversity in individual rainbow trout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 2779–84.
- Shum BP, Guethlein L, Flodin LR, Adkison MA, Hedrick RP, Nehring RB, *et al.* (2001). Modes of salmonid MHC class I and II evolution differ from the primate paradigm. *Journal of immunology* **166**: 3297–308.
- Sieger D, Stein C, Neifer D, van der Sar AM, Leptin M (2009). The role of gamma interferon in innate immunity in the zebrafish embryo. *Disease models & mechanisms* **2**: 571–81.
- Skall HF, Olesen NJ, Mellergaard S (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming--a review. *Journal of fish diseases* **28**: 509–29.
- Skjaeveland I, Iliev DB, Strandskog G, Jørgensen JB (2009). Identification and characterization of TLR8 and MyD88 homologs in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental and comparative immunology* **33**: 1011–7.
- Skjaeveland I, Iliev DB, Zou J, Jørgensen T, Jørgensen JB (2008). A TLR9 homolog that is up-regulated by IFN-gamma in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental and comparative immunology* **32**: 603–7.
- Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, Miller NE (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 research* **29**: 1097–106.
- Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, Mariano TM, Cook JR, Wang N, *et al.* (1994). Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell* **76**: 793–802.
- Star B, Nederbragt AJ, Jentoft S, Grimholt U, Malmstrøm M, Gregers TF, *et al.* (2011). The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature* **477**: 207–10.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998). How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry* **67**: 227–64.
- Stein C, Caccamo M, Laird G, Leptin M (2007). Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome biology* **8**: R251.
- Stolte EH, Savelkoul HFJ, Wiegertjes G, Flik G, Lidy Verburg-van Kemenade BM (2008). Differential expression of two interferon-gamma genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and comparative immunology* **32**: 1467–81.
- Strandskog G, Ellingsen T, Jørgensen JB (2007). Characterization of three distinct CpG oligonucleotide classes which differ in ability to induce IFN alpha/beta activity and cell proliferation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes. *Developmental and comparative immunology* **31**: 39–51.

- Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**: 848–53.
- Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, *et al.* (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5514–9.
- Su J, Yang C, Xiong F, Wang Y, Zhu Z (2009). Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Fish & shellfish immunology* **27**: 33–9.
- Su J, Zhu Z, Wang Y, Zou J, Hu W (2008). Toll-like receptor 3 regulates Mx expression in rare minnow *Gobiocypris rarus* after viral infection. *Immunogenetics* **60**: 195–205.
- Sun B, Skjæveland I, Svingerud T, Zou J, Jørgensen J, Robertsen B (2011). Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of virology* **85**: 9188–98.
- Sunyer JO, Zarkadis I, Sarrias MR, Hansen JD, Lambris JD (1998). Cloning, structure, and function of two rainbow trout Bf molecules. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **161**: 4106–14.
- Swain P, Nayak SK, Nanda PK, Dash S (2008). Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish & shellfish immunology* **25**: 191–201.
- Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR (1996). Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* **32**: 486–8.
- Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, *et al.* (2008). Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Molecular cell* **29**: 428–40.
- Takano T, Kondo H, Hirono I, Endo M, Saito-Taki T, Aoki T (2007). Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Molecular immunology* **44**: 1845–53.
- Takano T, Kondo H, Hirono I, Saito-Taki T, Endo M, Aoki T (2006). Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA and gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Developmental and comparative immunology* **30**: 807–16.
- Thomas JK, Noppenberger J (2007). Avian influenza: a review. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* **64**: 149–65.
- Thon-Hon VG, Denizot M, Li-Pat-Yuen G, Giry C, Jaffar-Bandjee M-C, Gasque P (2012). Deciphering the differential response of two human fibroblast cell lines following Chikungunya virus infection. *Virology journal* **9**: 213.
- Thorgaard GH, Bailey GS, Williams D, Buhler DR, Kaattari SL, Ristow SS, *et al.* (2002). Status and opportunities for genomics research with rainbow trout . **133**: 609–646.

- Thorven M, Grahn A, Hedlund K-O, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, *et al.* (2005). A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *Journal of virology* **79**: 15351–5.
- Thoulouze M-I, Bouguyon E, Carpentier C, Brémont M (2004). Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *Journal of virology* **78**: 4098–107.
- Thoulouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M (1998). The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of virology* **72**: 7181–90.
- Tonegawa S (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**: 575–581.
- Tovey MG, Streuli M, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarho J, *et al.* (1987). Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 5038–42.
- Trobridge GD, Chiou PP, Leong JA (1997). Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *Journal of virology* **71**: 5304–11.
- Trobridge GD, LaPatra SE, Kim CH, Leong JC (2000). Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected for susceptibility or resistance to IHN. *Diseases of aquatic organisms* **40**: 1–7.
- Trobridge GD, Leong JA (1995). Characterization of a rainbow trout Mx gene. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **15**: 691–702.
- Trowsdale J (2011). The MHC, disease and selection. *Immunology letters* **137**: 1–8.
- Utke K, Bergmann S, Lorenzen N, Köllner B, Ototake M, Fischer U (2007). Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish & shellfish immunology* **22**: 182–96.
- Uze G (2007). IL-28 and IL-29 : Newcomers to the interferon family. **89**: 729–734.
- Uzé G, Lutfalla G, Gresser I (1990). Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* **60**: 225–34.
- Vanden Broecke C, Pfeffer LM (1988). Characterization of interferon-alpha binding sites on human cell lines. *Journal of interferon research* **8**: 803–11.
- de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, *et al.* (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of leukocyte biology* **69**: 912–20.
- Venkatesh B (2003). Evolution and diversity of fish genomes. *Current opinion in genetics & development* **13**: 588–92.
- Vercammen E, Staal J, Beyaert R (2008). Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clinical microbiology reviews* **21**: 13–25.

- Verrier ER, Langevin C, Benmansour A, Boudinot P (2011). Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Developmental and comparative immunology* **35**: 1204–14.
- Verrier ER, Langevin C, Tohry C, Houel A, Ducrocq V, Benmansour A, *et al.* (2012). Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status. *PLoS One* **7**: e33935.
- Vignal A (2011). Current state of genome sequencing in animal species. *Production Animales* **24**: 387–403.
- Wang X, Hinson ER, Cresswell P (2007). The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell host & microbe* **2**: 96–105.
- Wargo AR, Kurath G (2011). In vivo fitness associated with high virulence in a vertebrate virus is a complex trait regulated by host entry, replication, and shedding. *Journal of virology* **85**: 3959–67.
- de Weerd N a, Samarajiwa S a, Hertzog PJ (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *The Journal of biological chemistry* **282**: 20053–7.
- Winton JR (1997). Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Fish vaccinology* **90**: 211–220.
- Witter RL (2001). Protective efficacy of Marek's disease vaccines. *Current topics in microbiology and immunology* **255**: 57–90.
- Wolf K (1988). *Fish viruses and fish viral diseases*.
- Wolf D, Goff SP (2008). Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annual review of genetics* **42**: 143–63.
- Wolf K, Quimby MC (1962). Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science (New York, N.Y.)* **135**: 1065–6.
- Wolf K, Rumsey G (1985). The Representative Research Animal: Why Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Rich.)? *Journal of Applied Ichthyology* **1**: 131–138.
- Wu MC, Shanks RD, Lewin HA (1989). Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 993–6.
- Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA (1993). Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **151**: 6977–85.
- Yamamoto S, Sanjyo I, Sato R, Kohara M, Tahara H (1991). Estimation of the heritability for resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow-trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**: 1519–1522.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, *et al.* (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* **5**: 730–7.

- Zhang S-Y, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, *et al.* (2007). TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science (New York, N.Y.)* **317**: 1522–7.
- Zhang Y-B, Li Q, Gui J-F (2004). Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon. *Immunogenetics* **56**: 68–75.
- Zhang Y-A, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, *et al.* (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology* **11**: 827–35.
- Zhang Y-B, Wang Y-L, Gui J-F (2007). Identification and characterization of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in crucian carp. *Fish & shellfish immunology* **23**: 52–61.
- Zhang Z, Yuan B, Lu N, Facchinetti V, Liu Y-J (2011). DHX9 pairs with IPS-1 to sense double-stranded RNA in myeloid dendritic cells. *Journal of immunology* **187**: 4501–8.
- Zhu J, Mohan C (2010). Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation* **2010**: 781235.
- Zou J, Carrington A, Collet B, Dijkstra JM, Yoshiura Y, Bols N, *et al.* (2005). Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *Journal of immunology* **175**: 2484–94.
- Zou J, Chang M, Nie P, Secombes CJ (2009). Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *BMC evolutionary biology* **9**: 85.
- Zou J, Secombes CJ (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental and Comparative Immunology* **35**: 1376–1387.
- Zou J, Tafalla C, Truckle J, Secombes CJ (2007). Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *Journal of immunology* **179**: 3859–71.
- Zou J, Yoshiura Y, Dijkstra JM, Sakai M, Ototake M, Secombes C (2004). Identification of an interferon gamma homologue in Fugu, *Takifugu rubripes*. *Fish & shellfish immunology* **17**: 403–9.

Références en ligne :

Cours en ligne 1 : Verrier E., Brabant P., Gallais A. (2001). Faits et concepts de base en génétique quantitative. *Polycopié INA Paris-Grignon*, 134 p.

Disponible en ligne : <http://www.agroparistech.fr/svs/genere/uvf/GQ/GQintro.htm>

Cours en ligne 2 : Verrier E., Rognon X., Leroy G., Heams T. (2009). Amélioration génétique des animaux. *Polycopié AgroParisTech*, 125 p.

Disponible en ligne : <http://www.agroparistech.fr/svs/genere/uvf/AG/AGintro.htm>

FAO > Pêche et aquaculture : programme d'informations sur les espèces aquatiques cultivées. La truite arc-en-ciel.

Disponible en ligne : http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/fr

FishBase : <http://www.fishbase.org/search.php>

Ministère de l'agriculture : Maladie des animaux aquatiques (2010).

Disponible en ligne : <http://agriculture.gouv.fr/maladies-des-animaux-aquatiques>

Formations suivies au cours de la thèse

Intitulé	Lieu	Date	Durée
"Markers and mapping: from QTL detection to gene identification" (master Animal Breeding and Genetics)	AgroParisTech	nov-09	21h
Fish Immunology Workshop	Wageningen (P-B)	avr-10	25h
Formation à l'expérimentation animale	ENVNantes	juin-10	80h
Séminaire du Département de Génétique Animale	Roquebrune	oct-10	18h
Journées ABIES	AgroParisTech	mars-11	15h
Formation à l'alignement de séquences issues des NGS et à la recherche de polymorphismes	PlaGe – Toulouse.	avr-11	8h
Host Genetic Control of Infectious Diseases (EMBO)	Institut Pasteur	sept-11	20h

Valorisation

1) Articles dans revues à comité de lecture

Verrier ER., Ehanno A., Biacchesi S., Le Guillou S., Dechamp N., Boudinot P., Bremont M., Quillet E. *Lack of correlation between the genetic resistances to two rhabdovirus infections in rainbow trout*. 2013. Fish and Shellfish Immunology (accepté)

Verrier ER., Dorson M., Mauger S., Torhy C., Ciobotaru C., Hervet C., Dechamp N., Genêt C., Boudinot P., Quillet E. *Resistance to a rhabdovirus (VHSV) in rainbow trout: identification of a major QTL related to innate mechanisms*. 2013. PLoS One 8(2): e55302.

Verrier ER., Langevin C., Thory C., Houel A., Ducrocq V., Benmansour A., Quillet E., Boudinot P. *Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status*. 2012. PLoS ONE 7(4): e33935.

Verrier ER., Langevin C., Benmansour A., Boudinot P. *Antiviral response and virus-induced genes in fish*. Dev Comp Immunol. 2011 (12):1204-14.

2) Module d'enseignement doctoral « Immunoregulation: Cytokines & Interferons » (Tallinn, EST 2011) – Déplacement financé en partie par le programme « aide à la mobilité » de l'école doctorale ABIES.

Verrier ER. *Mammalian Interferons - structure and functions*. Doctoral course. "Immunoregulation: Cytokines and Interferons". October 17th 2011, TTÜ (Tallinn, EST)

Verrier ER. *Interferons in other vertebrates*. Doctoral course. “Immunoregulation: Cytokines and Interferons”. October 17th 2011, TTÜ (Tallinn, EST)

Verrier ER. *Interferons induced genes in vertebrates*. Doctoral course. “Immunoregulation: Cytokines and Interferons”. October 18th 2011, TTÜ (Tallinn, EST)

Verrier ER. *Genetic bases of resistance to VHSV in rainbow trout*. Doctoral course. “Immunoregulation: Cytokines and Interferons”. October 19th 2011, TTÜ (Tallinn, EST)

Verrier ER. *Designing primers for qPCR*. Practical course. Doctoral course. “Immunoregulation: Cytokines and Interferons”. October 19th 2011, TTÜ (Tallinn, EST)

3) Communications orales et posters

Verrier ER., et al., *Uncovering the genetic architecture of response to VHSV in rainbow trout O. mykiss*. **Présentation orale**. The International Symposium on Genetics in Aquaculture XI. 28/06/2012 (Auburn, USA).

Verrier ER. et al., *Using clonal lines of rainbow trout as model for studying antiviral response in vertebrates*. **Présentation orale**. 11th annual meeting of the Complex Trait Community. 15/06/2012 (Institut Pasteur, Paris, FRA).

Verrier ER., Torhy C., Quillet E., Boudinot P. 2011. *Validation d'un modèle cellulaire de résistance à la SHV chez la truite arc-en-ciel*. **Présentation orale** Colloque de l'association des doctorants de l'INRA de Jouy-en-Josas, mai 2011 (Jouy-en-Josas, FRA). **Prix de la meilleure presentation.**

Verrier ER., Boudinot P., Quillet E. *Antiviral pathways and genetic bases of resistance to viruses in rainbow trout* – **Présentation orale**. Séminaire des thésards du département de génétique animale, avril 2011 (Limoges, FRA).

Verrier ER., Langevin C., Torhy C., Ciobotaru C., Quillet E., Boudinot P. *Genetic bases of resistance to virus in rainbow trout*. **Poster**. European Congress of Immunology – septembre 2012, (Glasgow, RU).

Verrier ER., Torhy C., Quillet E., Boudinot P. 2011. *Mise en place et validation d'un modèle cellulaire de résistance à la SHV chez la truite arc-en-ciel*. **Poster** - Journées de l'école doctorale ABIES, AgroParisTech, mars 2011 (Paris, FRA). **Prix du meilleur poster.**

Verrier ER., Genet C., Boudinot P., Quillet E. *Antiviral pathways and genetic bases of resistance to viruses in rainbow trout*. **Poster** - Fish Immunology Workshop, avril 2010 (Wageningen, Pays-Bas).

Encadrement

- 2012 **Etudiante en Master 1** « Sciences et Techniques du Vivant et de l'Environnement » (AgroParisTech) - *3 mois*.
Sujet : Analyses de la résistance à deux rhabdovirus chez la truite arc-en-ciel.
- 2012 **Etudiante 1ere année de BTS**. « Biotechnologie » (Lycée de la vallée de Chevreuse) - *2 mois*.
Sujet : caractérisation d'un QTL de résistance au VSHV chez la truite arc-en-ciel
- 2011 **Etudiant en Master 1** «Animal Breedings and Genetics» (AgroParisTech) – *3 mois*.
Sujet: Confirmation d'un QTL de résistance au VSHV dans des croisements de lignées isogéniques de truites arc-en-ciel.

Résumé

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), espèce d'élevage majeure en Europe et notamment en France, est l'une des espèces de poisson les mieux connues dans un grand nombre de domaines, y compris l'immunologie. Les virus qui l'infectent ont aussi été bien caractérisés, en particulier deux Novirhabdovirus, le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV) et le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (VNHI), tous deux connus pour provoquer des pertes importantes dans les élevages aquacoles. Quelques travaux, conduits notamment à l'INRA, ont mis en évidence l'existence d'une variabilité génétique de la résistance à ces infections chez la truite (Quillet *et al.*, 2007).

Une approche combinant analyse génétique et étude des réponses cellulaires a été développée pour tenter de mieux caractériser la réponse de la truite contre le VSHV. L'objectif est de développer des outils d'amélioration de la santé dans les élevages piscicoles et de mieux comprendre les mécanismes de résistance antivirale chez les vertébrés.

Tout d'abord, une démarche de cartographie de QTL (quantitative trait locus) a permis de détecter un QTL majeur de résistance au VSHV dans la région télomérique du groupe de liaison 31 de la truite arc-en-ciel. Ce QTL contrôle la survie des poissons et la croissance *in vitro* du virus sur explants de nageoire (VREFT), ce qui suggère fortement l'implication de mécanismes innés dans la résistance. Le QTL est retrouvé dans des croisements impliquant des reproducteurs de résistance variée, et peut expliquer jusqu'à 65% (survie) et 49% (VREFT) de la variance phénotypique observée. Enfin, l'effet du QTL est conservé quel que soit le mode d'infection employé (baignade ou injection intrapéritonéale), suggérant que la résistance n'est pas liée à des particularités des tissus superficiels (peau, mucus), premiers sites de contact entre le virus et son hôte.

En parallèle, des lignées cellulaires ont été dérivées à partir d'ovaires de truites appartenant à des lignées isogéniques présentant des niveaux de résistance variable à l'infection par le VSHV. Une corrélation remarquable est observée entre la résistance à l'infection des lignées cellulaires et la survie des poissons dont elles sont issues, confirmant définitivement le rôle déterminant de mécanismes innés dans la résistance. Ce modèle cellulaire a également permis de montrer que le contrôle précoce de la prolifération virale était une étape clé de la résistance.

Le parallélisme entre résistance *in vitro* et *in vivo* semble conservé lors de l'infection par un second rhabdovirus, le VNHI, bien qu'aucune corrélation dans la résistance à ces deux infections n'ait été observée dans cette étude. Par ailleurs, le QTL à effet fort identifié pour la résistance au VSHV ne joue pas un rôle majeur dans la variabilité de résistance au VNHI. Ceci suggère que, même si ils concourent à l'activation de voies de signalisation communes, les facteurs clés de la résistance aux deux virus sont différents, et leur expression contrôlée par des zones génomiques distinctes.

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de démontrer sans équivoque le rôle clé des mécanismes innés dans la résistance de la truite à l'un de ses principaux virus, et l'existence d'une forte variabilité génétique sous-tendant l'expression des facteurs impliqués. En proposant des bases nouvelles pour aborder l'analyse des interactions hôte-virus chez la truite, ils ouvrent la voie à la découverte de mécanismes potentiellement nouveaux dans la réponse des poissons à ces infections et à une meilleure compréhension de ces mécanismes chez les vertébrés.

Abstract

The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of most significant fish model in many scientific fields, including immunology. Due to its importance in aquaculture, viruses that can infect this species have been well characterized. Two well-known Novirhabdoviruses, the viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) and the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) cause serious damage in fish farms and represent a significant threat for aquaculture in a number of countries. Our laboratories have previously reported a wide range of susceptibility to these infections in rainbow trout depending on the host genetic background (Quillet et al., 2007). In this work, we undertook a dual approach to better characterize the antiviral response in fish.

A without *a priori* approach led to the detection of a major QTL (quantitative trait locus) for resistance to VHSV in the telomeric region of the rainbow trout linkage group 31. This QTL controls both fish survival and viral replication in excised fin tissue (VREFT), suggesting the involvement of innate mechanisms in the resistance, and can explain up to 65% (survival) and 49% (VREFT) of the observed phenotypic variation. Additionally, this major locus was retrieved in a number of genetic backgrounds, and regardless of the infection route (waterborne infection or injection), suggesting that the virus entry in fish is not the main factor of resistance.

In parallel, cell lines were derived from ovaries of several rainbow trout isogenic lines with various levels of susceptibility to infection with VHSV. Resistance of cell lines to infection by the virus was remarkably correlated with the survival of fish from which they were derived, confirming the importance of innate factors for the resistance. This model also showed that the early stage response is critical for the cellular fate after infection.

The parallelism between resistance *in vitro* and *in vivo* has finally been observed after infection by a second rhabdovirus, IHNV, although no correlation in resistance to these two viruses could be detected. Moreover, no major QTL for IHNV resistance was found in the region of the VHSV QTL. This observation suggests that the key factors of resistance are different, even if they contribute to the activation of common signaling pathways. The expression of these factors is in any case controlled by distinct regions of the genome. Our work demonstrates a strong genetic determinism of resistance to a major virus in rainbow trout, based on innate mechanisms. We believe that these results pave the way for the discovery of new host response mechanisms against viruses, leading to a better understanding of antiviral immunity in vertebrates.