

RÉPONSES ANTIVIRALES DES POISSONS : DE L'INTERFÉRON AUX LYMPHOCYTES T

FISH RESPONSES TO VIRUSES: FROM INTERFERON TO T-CELLS

Par Pierre BOUDINOT ⁽¹⁾ et Abdenour BENMANSOUR ⁽¹⁾
(communication présentée le 23 novembre 2006)

RÉSUMÉ

Les virus des poissons d'intérêt agronomique, comme la truite arc-en-ciel, ont été bien étudiés parce qu'ils causent des dommages significatifs dans les élevages. Ainsi, des vaccins ont été développés contre la Septicémie Hémorragique Virale (SHV), montrant l'existence d'une réponse efficace et spécifique basée sur les anticorps neutralisants et celle d'une mémoire immunitaire. La réponse non spécifique des leucocytes de truite induite par le virus de la SHV a pu être explorée par différentes techniques d'analyse différentielle des transcrits. Il a ainsi été démontré que les gènes induits par l'interféron orchestrent cette réponse, comme c'est aussi le cas chez les mammifères. Enfin, une stratégie de spectratypage des longueurs de jonctions VDJ des transcrits du récepteur spécifique de l'antigène des lymphocytes T (TCR) a été développée pour l'étude de la réponse cellulaire spécifique chez la truite arc-en-ciel. Cette approche a permis de démontrer l'existence de réponses T antivirales complexes chez les poissons.

Mots-clés : rhabdovirus, SHV, réponse immunitaire, interféron, salmonidés.

SUMMARY

Viruses affecting farmed fish species, such as the rainbow trout, have been studied extensively because they cause significant economic losses. Studies on vaccines developed against Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) have provided evidence of an effective and specific response based on neutralizing antibodies, as well as of an immune memory. Various techniques of differential transcript analysis were used to investigate the non-specific leukocyte response to the VHS virus in trout. As in mammals, this response was dependent on interferon-responsive genes. A VDJ junction spectratyping approach of transcripts of the specific T-cell antigen receptor (TCR) was also developed to examine the specific cellular response in rainbow trout. This approach was used to show the existence of complex antiviral T-cell responses in fish.

Key words: rhabdovirus, VHS, immune response, interferon, salmonids.

(1) INRA, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France.

INTRODUCTION

Les virus sont des organismes de très petite taille, parasites obligatoires de leurs cellules hôtes dont ils détournent les biosynthèses pour leur multiplication. Les virions, particules virales infectieuses, sont constitués d'un génome ADN ou ARN et d'une capsidie protéique entourée ou non d'une enveloppe lipidique. Les infections virales sont en général délétères pour les cellules parasitées et peuvent conduire à des pathologies graves ou fatales chez les plantes et les métazoaires. Des systèmes de défense ont donc été sélectionnés au cours de l'évolution des organismes, qui limitent ou bloquent la réplication et la dissémination des virus. Le système de défense d'un organisme comporte en général des barrières, des mécanismes et des récepteurs permettant l'identification du pathogène ou de l'infection, des mécanismes effecteurs qui détruisent le pathogène ou les cellules infectées et enfin, des mécanismes de régulation qui règlent l'intensité de la réponse et le retour à la normale. Des systèmes de défense se sont constitués dans les différents embranchements des métazoaires, dont certaines composantes sont spécialisées dans la lutte contre les virus. Ces mécanismes antiviraux spécialisés ont évolué, dans chaque lignage, en réponse aux pressions de sélection spécifiques imposées par les virus qui l'infectent, et à partir des ressources génomiques disponibles. Il est donc intéressant de comprendre ces mécanismes dans leur contexte physiologique, et peut-être plus encore, leur histoire évolutive, pour mieux appréhender comment les organismes peuvent co-évoluer à long terme avec des parasites aussi efficaces.

Les viroses des poissons ont été assez bien étudiées parce qu'elles peuvent causer des dommages assez sérieux dans les élevages. Une certaine diversité de virus susceptibles d'infecter des téléostéens a ainsi pu être décrite, associée à des pathologies aux noms évocateurs (Benmansour & de Kinkelin, 1997) : septicémie hémorragique virale (causée par un rhabdovirus chez la truite), nécrose pancréatique infectieuse (due à un birnavirus chez la truite) ou encore maladie du sommeil (causée par un alphavirus chez le saumon)... Les principales familles de virus décrites chez les poissons sont les birnavirus, les rhabdovirus et les herpesvirus. La diversité réelle des virus des poissons est sans doute bien supérieure à celle que l'on connaît actuellement. En effet, les espèces d'élevage exploitées à ce jour ne représentent qu'une infime fraction des téléostéens (plus de 20 000 espèces). Cependant, les connaissances acquises sur les virus identifiés chez les poissons font de ces animaux un modèle intéressant pour étudier les réponses antivirales dans un contexte différent de celui des mammifères.

La réponse antivirale innée est orchestrée par l'interféron chez les poissons comme chez les mammifères.

Comme chez les mammifères, la première réponse des poissons à l'infection virale est non spécifique. L'induction de la sécrétion d'un médiateur présentant les propriétés d'un interféron par des virus est connue chez la truite arc-en-ciel depuis les années 70 (de Kinkelin & Le Berre, 1974). Ce médiateur résistant au traitement acide à pH 2.2 et doté d'une forte activité antivirale fut décrit chez différentes espèces de téléostéens. L'identification formelle d'un interféron chez un poisson allait pourtant devoir attendre plus de trente ans puisque les premières séquences d'interféron viro-induit ne furent publiées qu'en 2003 (Robertsen *et al.* 2003). Un gène similaire à l'interféron γ des mammifères fut identifié depuis chez le fugu, suggérant que les deux types d'interférons sont exprimés chez les poissons et pourraient jouer un rôle dans la réaction antivirale (Zou *et al.* 2004). Les séquences de différents gènes spécifiquement induits par l'interféron, furent amplifiées par PCR, puis clonées grâce à leur relative conservation, tout au moins pour certains motifs. L'homme et la souris possèdent différents gènes *Mx* qui codent des protéines possédant une activité antivirale significative contre des virus à ARN négatif (influenza, hantavirus,...). Les homologues de ces gènes ont d'abord été clonés chez la perche (Staheli *et al.* 1989), puis chez différentes autres espèces de poissons. Par ailleurs, les promoteurs des gènes *Mx* chez les poissons ont une structure typique des gènes induits par l'interféron, avec des motifs ISRE (*interferon stimulating response elements*) caractéristiques¹. Ces promoteurs ont par ailleurs été insérés dans des lignées cellulaires de truite et de saumon, en amont de gènes rapporteurs, ce qui en fait d'excellents outils de dosage de l'interféron (Johansen *et al.* 2004). Avec la publication de banques de séquences d'ESTs (*expressed sequence tags*) chez différentes espèces de poissons (truite, saumon, fugu, zebrafish,...) et la connaissance de la séquence de certains génomes complets, c'est l'intégralité des séquences des gènes homologues des gènes induits par l'interféron qui est maintenant disponible. Ces ressources ont déjà été largement utilisées pour identifier *in silico*, puis caractériser des gènes dont l'importance dans la réponse antivirale est bien connue chez les mammifères comme la Protéine kinase R (PKR)². Les gènes des interférons des poissons ont d'ailleurs été ainsi identifiés initialement *in silico* dans des banques d'ESTs ou de séquences génomiques.

Un autre type d'approche, ne supposant aucune connaissance *a priori* sur les séquences recherchées, a été mis en œuvre dans plusieurs modèles pour identifier les gènes de la réponse des ver-

1 Lorsque les interférons se lient à leur récepteur, des tyrosines kinases comme tyk2 Janus-activated kinase (JAK)-1 et JAK-2 sont phosphorylées et activent la formation de complexes protéiques, les ISGF (pour *interferon-stimulated gene factor*) comprenant STAT-1 α ou STAT-1 β et STAT-2. Le complexe ISGF phosphorylé est dirigé vers le noyau où il forme avec d'autres protéines comme IRF-9 (pour "*interferon responsive factor*") un complexe spécifique des motifs ISRE situés dans les promoteurs des gènes induits par les interférons.

2 La PKR est activée par l'ARN double brin et joue un rôle essentiel dans la réponse cellulaire à l'interféron. La PKR est induite par l'interféron sous forme latente. La liaison de la PKR avec l'ARN double brin induit sa dimérisation et des autophosphorylations.

tébrés aux infections virales. Il s'agissait d'identifier les gènes induits ou réprimés dans différents tissus par l'infection virale. L'approche la plus naturelle consistait à rechercher les transcrits différentiellement exprimés dans des cellules infectées ou non infectées. Différentes méthodes globales de comparaison des populations de transcrits sont apparues et ont été mises en œuvre chez plusieurs espèces de poissons, en combinaison avec plusieurs virus. Une technique d'imagerie différentielle des transcrits (« mRNA differential display ») fut employée au laboratoire chez la truite pour identifier les transcrits induits par le virus de la septicémie hémorragique virale (vSHV). Ces expériences furent effectuées à partir de l'ARN de leucocytes du pronéphros³ incubés avec le virus ou avec un milieu témoin pendant 40 heures. Deux gènes, *vig-1* et *vig-2* (pour « VHSV-induced gene ») furent ainsi identifiés : ces gènes sont aussi induits *in vivo* dans le rein antérieur, lors de l'infection virale (Boudinot *et al.* 1999) et par l'injection intramusculaire à la truite d'un plasmide permettant l'expression de la glycoprotéine virale (vaccination génétique). Cependant, leurs modalités d'induction sont différentes : *vig1* est inducible par deux voies, directement (sans synthèse de médiateur intermédiaire) ou *via* un milieu conditionné contenant une activité de type interféron, alors que *vig2* ne peut être induit directement. La protéine VIG1 comporte un motif MaaA conservé des bactéries aux mammifères dans des protéines nécessaires à la synthèse des ptérines, cofacteurs de certaines enzymes. Le gène *Vig1* possède un homologue humain, *cig5*, dont la séquence est très conservée ; il est aussi inducible par différents virus comme le cytomégalovirus humain (HCMV) et possède une activité antivirale (Chin & Cresswell, 2001). En effet, l'expression stable du produit de ce gène, la « vipérine », dans des fibroblastes, diminue fortement l'expression de plusieurs protéines structurales du HCMV (gB, pp28, et pp65) nécessaires à la production de virions.

Les stratégies efficaces de soustraction de banques d'ADN complémentaires (ADNc), comme la SSH (pour « subtraction suppression hybridization », une technique de soustraction suppressive de banques d'ADNc suivie d'un criblage par hybridation), générant moins de faux positifs que le « mRNA differential display », furent ensuite utilisées. Cette démarche fut mise en œuvre dans notre laboratoire, à partir de l'ARN des leucocytes du pronéphros de truite, après incubation pendant 40 heures avec du vSHV ou sans virus. Après soustraction des banques d'ADNc obtenues à partir des cellules incubées ou non en présence du virus, 24 séquences différentielles purent être identifiées (O'Farrell *et al.* 2002). L'induction des transcrits obtenus par le virus fut confirmée par RT-PCR semi-quantitative spécifique de chaque transcrit, puis la séquence de chaque candi-

dat pertinent fut déterminée par des techniques de PCR à partir d'une séquence connue et d'amorces spécifiques des extrémités des ADNc (5' et 3' RACE).

Trois des séquences obtenues correspondaient à des gènes déjà connus pour être induits par le vSHV chez les salmonidés : il s'agissait des gènes *Mx3*, *vig1* et *vig2*, déjà identifiés par « mRNA differential display ».

Parmi les autres séquences, les gènes qui présentaient une similarité convaincante avec des séquences annotées purent être ainsi classés en différentes catégories fonctionnelles présumées :

- des gènes induits par l'interféron chez les mammifères codant les protéines suivantes : l'ubiquitine ISG15, la protéine p56/58 qui comprend des motifs tétratricopeptide et est aussi induite par l'acide rétinoïque, la protéine p28 de fonction inconnue, et une protéine à 6 domaines transmembranaire ;
- trois gènes codant des chémoattractants : la galectine-9, et deux CXC chimiokines ;
- deux gènes codant des protéines présentant des domaines de liaison aux acides nucléiques.

Tous ces transcrits étaient aussi induits *in vivo* dans les organes lymphoïdes des animaux infectés.

Les répertoires de gènes viro-induits chez les poissons vont probablement s'élargir dans les années à venir avec l'utilisation des puces à ADN. Ils pourront être comparés entre eux et avec les résultats d'études similaires effectuées chez d'autres types d'organismes, en particulier les mammifères, et devraient contribuer à une compréhension intégrée des effets de l'infection virale.

La réponse antivirale spécifique chez les poissons.

Le fait que les rescapés d'une infection soient protégés contre une nouvelle attaque par le même virus, mais pas contre une infection par un autre virus voisin, avait très tôt suggéré que les poissons devaient effectuer des réponses immunitaires spécifiques susceptibles d'assurer une protection durable. Différentes stratégies de vaccinations furent mises en œuvre avec succès, en particulier pour les rhabdovirus vNHI et vSHV. Des souches atténuées furent donc obtenues par passages multiples en culture (Winton 1997), qui garantissaient une protection effective. La vaccination génétique par injection d'un plasmide permettant l'expression de l'antigène a aussi donné d'excellents résultats chez les poissons dès les premiers essais effectués chez les salmonidés contre les rhabdovirus vSHV et vNHI. Les anticorps

³ Les leucocytes du pronéphros sont obtenus en éliminant les érythrocytes par centrifugation sur un gradient de Ficoll.

⁴ Les TCR comprennent deux chaînes transmembranaires, alpha/bêta ou gamma/delta. Chaque chaîne comprend un domaine variable et un domaine constant, extracellulaires. La diversité du domaine variable est due comme pour les immunoglobulines au réarrangement génomique de segments de gènes pendant la différenciation du lymphocyte. Au site de recombinaison des mécanismes retirent ou ajoutent des nucléotides ; la région de jonction des segments (CDR3), peut donc être de taille différente pour des réarrangements différents.

anti-glycoprotéine constituent le support essentiel et suffisant de la protection, comme pour les réponses protectrices contre le virus de la rage chez les mammifères.

Les réponses cellulaires spécifiques des poissons ne furent identifiées que bien après les réponses humorales, comme ce fut d'ailleurs le cas chez les mammifères. L'existence même de cellules T resta longtemps incertaine. Différentes observations suggéraient cependant l'existence de mécanismes impliquant l'intervention de cellules T comme chez les mammifères. Le rejet de greffe fut observé dès les années 1960, chez le poisson rouge, suggérant l'existence de mécanismes d'hypersensibilité. Le clonage des gènes des récepteurs des cellules T (TCR pour T cell receptor) apporta le premier argument direct en faveur de la présence de cellules T homologues de celles qui sont bien connues chez les mammifères⁴. Le premier transcrite de TCR fut cloné chez la truite arc-en-ciel; il codait une chaîne β , (Partula *et al.* 1994, 1995). L'identification des transcrits de chaînes α suivit peu après (Partula *et al.* 1996) et il s'avéra rapidement que ces transcrits présentaient une structure tout à fait similaire à ce qui était connu chez l'homme ou la souris. Des gènes de bêta 2-microglobuline et de protéines de classe I et classe II du complexe majeur d'histocompatibilité ont aussi été identifiés chez différentes espèces de téléostéens. Un autre argument en faveur d'un mode de présentation de l'antigène classique chez les poissons est la présence de gènes nécessaires au chargement des peptides sur les protéines du CMH de classe I et II des peptides, situés dans le locus de classe I. Les gènes *LMP2/d*, *TAP1A*, *TAP2B* ont ainsi été retrouvés.

L'étude de phénomènes de cytotoxicité constituait une voie possible pour rechercher des lymphocytes T. Des cellules à activité cytotoxique furent observées chez le poisson-chat par Norman Miller dès les années 1980, résultat qui demeura longtemps le meilleur indice en faveur d'une réponse cellulaire spécifique chez les poissons. Une prolifération lymphocytaire était induite par le contact de leucocytes d'animaux de fonds génétiques variables, et nécessitait la présence de leucocytes n'exprimant pas d'immunoglobuline de surface. L'obtention de lignées cellulaires de poisson-chat cultivables à long terme, a permis d'étudier plus en détail les modalités de la réaction cytotoxique allogénique chez le poisson-chat (Stuge *et al.* 1997, 2000).

Dans notre laboratoire, une approche différente a été suivie pour étudier la réponse cellulaire spécifique des poissons, l'étude des modifications du répertoire du TCR au cours de la réponse immunitaire. En l'absence d'anticorps spécifiques du TCR ou de tétramères de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité chargées d'antigène, cette approche ne pouvait être menée que sur les populations de transcrits ou de réarrangements génomiques. Une méthode d'étude des modifications des transcrits du TCR de la truite arc-en-ciel a donc été mise au point

à partir de l'approche « Immunoscope », développée par C. Pannetier dans le laboratoire de P. Kourilsky (Institut Pasteur, Paris) sur les répertoires T humains et murins (Pannetier *et al.* 1993, 1995). Les variations de taille des CDR3 des transcrits TCR β , sont visualisées par des profils de taille de produits de PCR comprenant le CDR3. Elles donnent une estimation de la diversité du répertoire associé, pour les différentes combinaisons de segments géniques V β , et J β , impliqués dans les réarrangements (figure 1). Cette approche permet donc d'identifier

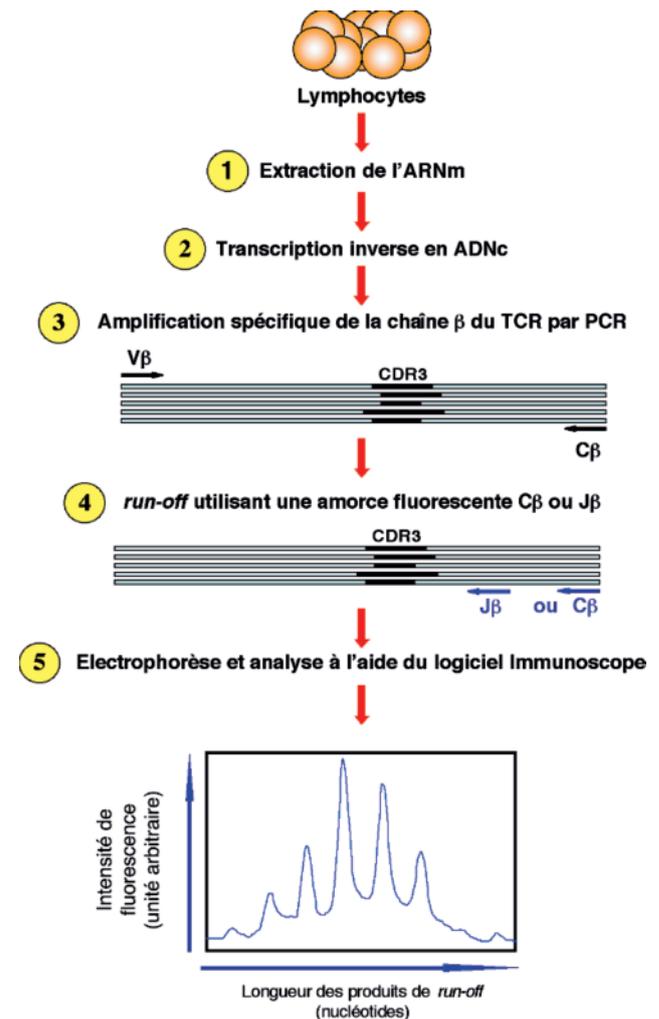


Figure 1 : Principe de la méthodologie Immunoscope.

L'ARN total extrait de lymphocytes est rétrotranscrit en ADNc et amplifié par PCR avec des amorces spécifiques des segments V et C des chaînes β du TCR. Les produits obtenus subissent une élongation ou run-off à l'aide d'amorces fluorescentes spécifiques des segments C β ou J β . L'ADN amplifié fluorescent est déposé sur un gel de polyacrylamide puis séparé à l'aide d'un séquenceur automatique. L'analyse à l'aide du logiciel Immunoscope révèle les profils de longueurs de CDR3 pour des combinaisons V β C β ou V β J β , avec une moyenne de 6 à 11 pics espacés de 3 nucléotides, correspondant à des transcrits en phase de chaîne β .

⁴ Les TCR comprennent deux chaînes transmembranaires, alpha/bêta ou gamma/delta. Chaque chaîne comprend un domaine variable et un domaine constant, extracellulaires. La diversité du domaine variable est due comme pour les immunoglobulines au réarrangement génomique de segments de gènes pendant la différenciation du lymphocyte. Au site de recombinaison des mécanismes retirent ou ajoutent des nucléotides; la région de jonction des segments (CDR3), peut donc être de taille différente pour des réarrangements différents.

des réponses spécifiques (figure 2). En effet, la prolifération d'un clone induit une sur-représentation de la taille de CDR3 correspondante, et donc une altération du profil de fluorescence. Des oligonucléotides spécifiques des différents segments J β , et des familles de segments V β , connus chez la truite arc-en-ciel ont donc été obtenus et utilisés pour établir une image du répertoire des transcrits TCR β , exprimés par les poissons "naïfs" (Boudinot et al. 2001). Ces expériences permirent de démontrer que le répertoire des chaînes β , de truite est polyclonal et divers. On pensait en effet jusqu'alors que les répertoires de récepteurs spécifiques de l'antigène des poissons et des amphibiens étaient de diversité nettement inférieure à ceux des mammifères ou des oiseaux. De nombreux profils altérés (comportant un nombre restreint de pics ou un pic très très dominant) furent identifiés chez des animaux infectés par le rhabdovirus de la SHV. Une analyse systématique fut effectuée sur plusieurs individus génétiquement identiques issus du croisement de produits de gynogenèse⁵. Une réponse spécifique du virus

observée chez tous les animaux, dite « publique », fut identifiée ainsi que de nombreuses réponses privées. La réponse publique caractérisée dans le contexte d'un clone de truite arc-en-ciel particulier mettait en jeu un réarrangement V β 4J β 1 récurrent, codant pour la jonction SSGDSYSE (figure 2). Il apparut aussi que les réponses secondaires étaient beaucoup plus prononcées que les réponses primaires, ce qui suggérait l'existence d'une certaine forme de mémoire. La diversité de la réponse cellulaire contre le virus de la SHV fut confirmée lorsque de nouvelles familles de segments V β furent identifiées (Boudinot et al. 2002). En plus des quatre familles connues jusqu'alors, un criblage de banque d'ADN complémentaires construite par 5'RACE permit d'identifier six nouvelles familles de segments V β . Les répertoires de transcrits TCR β issus de réarrangements de ces segments montraient des modifications nombreuses et accentuées chez les animaux infectés, comme cela avait été observé pour les familles étudiées auparavant. Même des transcrits impliquant le segment V β 6, dont les longueurs de CDR1 et CDR2 indiquent qu'il doit avoir une structure atypique, participent à des réponses induites par l'infection virale.

La même stratégie fut également mise en œuvre pour l'étude de la réponse cellulaire induite par l'injection d'un vaccin génétique contre le vSHV (Boudinot et al. 2004). Le répertoire des transcrits TCR β n'était pas aussi fortement biaisé par la vaccination génétique que par l'infection virale. Cependant, la réponse publique V β 4J β 1 observée précédemment fut retrouvée, dans le même contexte génétique. Les jonctions récurrentes étaient toutefois plus diverses que dans le cas de l'infection. En effet, des jonctions récurrentes variées correspondant à des CDR3 de six et de huit acides aminés furent identifiées.

Les infections virales induisent donc des réponses spécifiques humorales et cellulaires chez les poissons. Les anticorps qui persistent longtemps dans le sérum de animaux immunisés jouent sans doute un rôle important dans la protection. Les réponses spécifiques permettent en tout cas, chez les poissons immunisés, l'établissement d'une protection à relativement long terme qui suppose l'existence d'une certaine forme de mémoire. Les mécanismes d'activation des lymphocytes T sont sans doute comparables chez les poissons et les mammifères. Les récepteurs de costimulation CD28 et CTLA4, qui contrôlent l'activation des cellules T, ont ainsi des homologues chez les poissons (D. Bernard et al., in press in *Developmental and comparative immunology*). Il a ainsi été démontré au laboratoire que la région intracytoplasmique de la molécule CD28 de truite induit des signaux d'activation susceptibles d'induire la production d'interleukine-2 dans le contexte d'une lignée lymphocytaire T humaine (Bernard et al. 2006). Un travail systématique autour de la famille de ces récepteurs de costimulation a été commencé, qui permettra d'explorer les modalités de l'activation des cellules T chez les poissons.

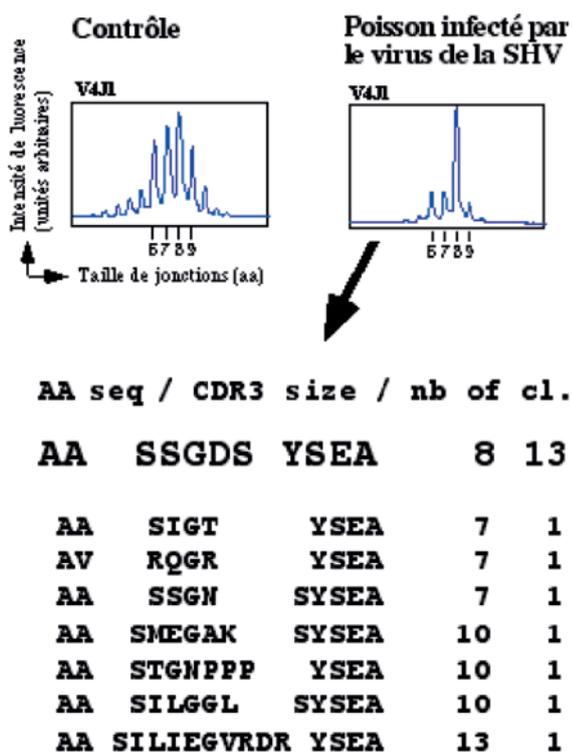


Figure 2 : Réponse T de la truite dirigée contre le virus de la SHV. Profils de taille de jonctions des transcrits TCR β exprimant des réarrangements V β 4J β 1, lors de la réponse secondaire chez une truite infectée par le vSHV (vSHV) ou non infectée (témoin) et séquences des jonctions exprimées par les cellules T anti-vSHV impliquées dans la réponse.

⁵ Chez la truite, il est possible d'induire le développement de l'œuf en utilisant du sperme irradié qui n'apporte pas d'ADN. On obtient ainsi des individus produits par gynogenèse.

CONCLUSION

Les poissons osseux constituent le plus grand groupe de Vertébrés, qui compte plus de 20 000 espèces. Ils présentent une diversité étonnante de formes, de couleurs mais aussi de modes de vie et de physiologie. Certains groupes de poissons osseux peuplent les milieux aquatiques depuis l'ère primaire et peuvent être considérés, avec les Requins, comme des « messagers des origines » au sein des Vertébrés. Les poissons représentent aussi une ressource alimentaire importante des populations humaines à travers la pêche, d'abord, puis grâce aux techniques d'élevage de certaines

espèces. Comme tous les groupes de métazoaires, les poissons sont soumis aux agressions de nombreux organismes pathogènes (virus, bactéries, champignons, protozoaires parasites), mais les conséquences des infections passent généralement inaperçues en milieu naturel. Elles peuvent cependant devenir spectaculaires dans les conditions des élevages intensifs. C'est naturellement avec le développement de l'aquaculture qu'est né l'intérêt pour les pathogènes des poissons et leur biologie. La mise au point de nouvelles stratégies de lutte contre les pathogènes est donc plus que jamais souhaitable.

BIBLIOGRAPHIE

- Benmansour, A. & de Kinkelin, P. 1997. Les virus des poissons d'aquaculture. *Virologie* : 2 : 141-150.
- Bernard, D., Riteau, B., Hansen, J.D., Phillips, R.B., Michel, F., Boudinot, P., Benmansour, A. 2006. Costimulatory receptors in a teleost fish: typical CD28, elusive CTLA4. *J Immunol.* 176: 4191-4200.
- 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: 1846-1852.
- Boudinot, P., Boubekeur, S., Benmansour A. 2001. Rhabdovirus infection induces public and private T cell responses in teleost fish. *J Immunol.* 167: 6202-6209.
- 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. *J Immunol.* 169: 6244-6252.
- Boudinot, P., Bernard, D., Boubekeur, S., Thoulouze, M.I., Brémont, M., Benmansour, A. 2004. The glycoprotein of a fish rhabdovirus profiles the virus-specific T-cell repertoire in rainbow trout. *J Gen Virol.* 85: 3099-3108.
- Chin, K.C. & Cresswell, P. 2001. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15125-15130.
- 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.
- (de) Kinkelin, P. & Le Berre, M. 1974. Necrose hematopdftique infectieuse de salmonides: production d'interferon circulant induite après l'infection expérimentateur la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences D: Sciences Naturelles* 279: 445-448.
- O'Farrell, C., Vaghefi, N., Cantonnet, M., Buteau, M., 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. *J Virol.* 76: 8040-8049.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M., Kourilsky, P. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 4319-4323.
- Pannetier, C., Even, J., Kourilsky, P. 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunology Today* 16: 176-181.
- Partula, S., de Guerra, A., Fellah, J. S., 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: 765-770.
- Partula, S., Fellah, J. S., de Guerra, A. Charlemagne J. 1995. Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. *Journal of Immunology* 155: 699-706.
- Partula, S., de Guerra, A., Fellah, J. S., Charlemagne J. 1996. Structure and diversity of the TCR alpha-chain in a teleost fish. *Journal of Immunology* 157: 207-212.
- Robertsen, 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.
- 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.
- Winton, J. 1997. Immunization with viral antigens In *Fish vaccinology* (eds R.Guidding, P.Lillehaug, P.Midlyung, pp211, Karger, Basel.
- Stuge, T.B., Yoshida, S.H., Chinchar, V.G., Miller, N.W., Clem, L.W. 1997. Cytotoxic activity generated from channel catfish peripheral blood leukocytes in mixed leukocyte cultures. *Cellular Immunology* 177: 154-161.
- Stuge, T.B., Wilson, M.R., Zhou, H., Barker, K.S., Bengten, E., Chinchar, G., Miller, N.W., Clem, L.W. 2000. Development and analysis of various clonal alloantigen-dependent cytotoxic cell lines from channel catfish. *Journal of Immunology* 164: 2971-2977.
- Zou, J, Yoshiura, Y, Dijkstra, J.M., Sakai, M., Ototake, M., Secombes, C. 2004. Identification of an interferon gamma homologue in Fugu, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.* 17: 403-409.