

INTÉRÊT DE LA GÉNÉTIQUE INVERSE APPLIQUÉE AUX VIRUS À ARN : EXEMPLES D'UN RHABDOVIRUS ET D'UN ALPHAVIRUS DES SALMONIDÉS

INTEREST OF REVERSE GENETICS APPLIED TO RNA VIRUSES: EXAMPLES OF A SALMONID RHABDOVIRUS AND ALPHAVIRUS

Par Michel BREMONT⁽¹⁾
(communication présentée le 23 novembre 2006)

RÉSUMÉ

Les élevages piscicoles français et européens de truite arc-en-ciel sont confrontés à des infections virales qui tuent annuellement environ le cinquième de leur production (soit 10.000 tonnes pour la France, 23 millions d'Euros par an). Les principales viroses sont provoquées par deux rhabdovirus qui coexistent : le virus de la septicémie hémorragique virale, vSHV, et le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse, vNHI. Les rhabdovirus, dont le prototype le plus connu est le virus de la rage, ont un génome constitué d'une molécule d'ARN de polarité négative d'environ 12 kilobases (kb). Ces maladies virales sont les plus fréquentes mais l'intensification des élevages de salmonidés et le développement de l'élevage d'autres espèces entraînent l'apparition de pathologies nouvelles et, aussi, une augmentation de l'incidence des pathologies anciennes. L'un des exemples le plus notable de ces dernières années est certainement la maladie du sommeil des salmonidés, connue depuis les années 1980, présente dans la plupart des pays européens et sur le continent Nord américain. Jusqu'alors peu fréquente dans les élevages piscicoles français, elle affecte maintenant 30-40 % de ces élevages. Le virus responsable ou virus de la maladie du sommeil (VMS) appartient à la famille des alphavirus; son génome est une molécule d'ARN de polarité positive de 12 kb.

Depuis quelques années, nous focalisons notre activité en partie sur le développement de stratégies vaccinales en manipulant le génome de ces virus, permettant à terme l'utilisation de vaccins vivants,

La manipulation génétique des virus à ARN passe obligatoirement par l'aptitude à récupérer le virus à partir d'une copie ADN du génome ARN. C'est ce que l'on appelle « la génétique inverse ». La première démonstration de génétique inverse pour un virus à ARN de polarité positive, le poliovirus, date des années 1980, et il a fallu attendre une quinzaine d'années pour qu'il en soit de même pour un virus à ARN de polarité négative, le virus de la rage. Le passage par un intermédiaire ADN artificiel, copie conforme du génome viral à ARN, offre la possibilité de manipuler aisément le génome et, par exemple, d'enlever des gènes pour étudier leur rôle ou bien d'en rajouter pour exprimer des gènes hétérologues.

Des systèmes de génétique inverse pour le vNHI et le VMS ont été élaborés au laboratoire et ont permis de générer de nombreux virus recombinants dont certains sont en phase d'expérimentation à grande échelle comme outil vaccinal.

Mots-clés : virus à ARN, salmonidés, génétique inverse, souche vaccinale, vecteur de gène.

(1) Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Jouy-en-Josas.
michel.bremont@jouy.inra.fr

SUMMARY

European and French rainbow trout farms are faced with viral infections which kill every year approximately one fifth of their production (i.e. 10,000 tons worth €23m a year in France). Major viral diseases are caused by two coexisting rhabdoviruses: the viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). The genome of rhabdoviruses, the best known being the rabies virus, consists of a single negative-strand RNA molecule of about 12 kb. These viral diseases are the most frequent, but the intensification of salmonid fish farms as well as the development of fish farming using new species have led to the emergence of new diseases as well as an increase in the incidence of existing diseases. One of the more notable examples over the past few years is undoubtedly the emergence of salmonid sleeping disease, known since the '80s in most of the European countries and in North America. Although it used to be infrequent in French fish farms, it now affects 30-40 % of their production. The genome of the sleeping disease virus (SDV), a member of the alphavirus family, consists of a single positive-strand RNA molecule of about 12 kb.

- Over the past few years, we have been focusing some of our research activity on the virus genetic engineering to obtain live vaccines.
- Genetic engineering of RNA viruses is based on the availability of a DNA copy of the RNA genome. This approach is called "reverse genetics". Reverse genetics on a positive-strand RNA virus was demonstrated for the first time on the poliovirus in the '80s. It took another fifteen years to establish a reverse genetics system for the recovery of a negative-strand RNA virus, the rabies virus. The synthesis of an intermediate cDNA, which is an exact copy of the viral RNA genome, helps manipulations such as gene deletions to study their role, or gene insertions to express heterologous genes.
- Reverse genetics systems have now been established for IHNV and SDV, and have helped generate numerous recombinant viruses, of which some are currently being tested as vaccines in large-scale field trials.

Key words: RNA virus, salmonids, reverse genetics, vaccine strain, gene vector.

LE VIRUS DE LA NÉCROSE HÉMATOPOIÉTIQUE INFECTIEUSE (VNHI)

Le génome du vNHI, comme celui de tous les rhabdovirus, code cinq protéines structurales : la nucléoprotéine N, la protéine P, un cofacteur de la polymérase virale, la protéine matricielle M, l'unique glycoprotéine externe G et l'ARN polymérase ARN dépendante L. Le vNHI se distingue des autres rhabdovirus par la présence d'un gène surnuméraire, le gène NV, localisé entre les gènes G et L, qui code une protéine non structurale dont le rôle reste encore à déterminer (figure 1).

La présence de ce gène NV a conduit à classer les rhabdovirus de poissons dans la famille des Novirhabdovirus. Ceux-ci (le virus de la septicémie hémorragique virale, vSHV, et le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse, vNHI) affectent principalement les alevins et entraînent une mortalité des alevins de truites arc-en-ciel pouvant atteindre 100 %, en l'espace de 8 à 15 jours. Les premiers symptômes sont le développement d'une forte exophtalmie, suivie d'une pâleur des branchies. Les organes internes présentent de fortes hémorragies et les organes hématopoïétiques, des lésions de nécrose (Wolf 1988). Il n'existe à l'heure actuelle aucune parade vaccinale, la seule attitude étant la désinfection des installations aquacoles. Le coût annuel estimé des pertes de production est de 23 m€, représentant environ le cinquième de la production annuelle de truite.

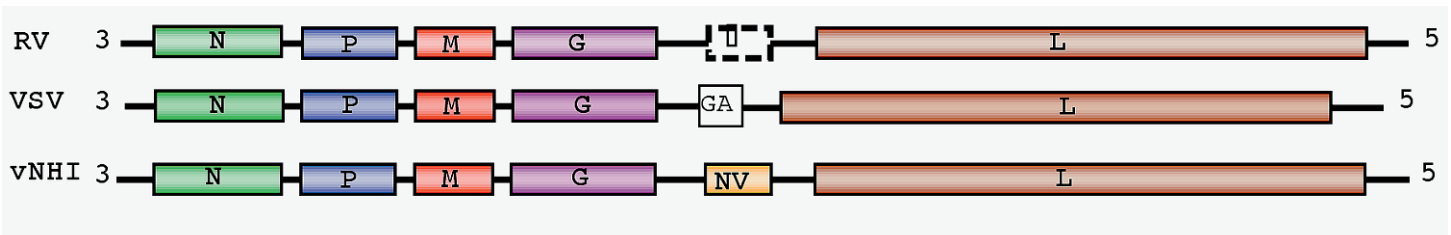


Figure 1 : Comparaison des génomes du virus RV de la rage (Lyssavirus), du virus VSV de la stomatite vésiculaire (Vésiculovirus) et du virus vNHI de la nécrose hématopoïétique ψ : pseudogène; GA: dinucléotide (guanine adénine); NV: non virion.

Le système de génétique inverse

L'ARN génomique des rhabdovirus n'est jamais nu dans les cellules infectées, il est toujours associé aux trois protéines N, P et L qui forment un complexe réplcatif permettant la transcription et la réplication du génome. Cette observation a conduit l'équipe de K.K. Conzelmann en 1994 (Schnell *et al.* 1994) à élaborer un système très original basé sur l'utilisation de quatre constructions plasmidiques et d'un virus recombinant de la vaccine exprimant une enzyme, l'ARN polymérase T7, dérivée du phage du même nom (*figure 2*).

Quatre constructions plasmidiques sont donc nécessaires (i) un plamide pIHN, dans lequel est clonée l'intégralité du génome du vNHI sous forme d'un ADN complémentaire (ADNc), fusionné à l'extrémité 5' à une séquence promotrice T7 et à l'extrémité 3', à une séquence ribozyme suivie d'une séquence d'arrêt de la polymérase T7. Ce plamide sert à fournir une copie conforme ARN du génome viral. En effet, par l'action de l'ARN polymérase T7, qui reconnaît la séquence promotrice, le génome ADNc est transcrit en une copie conforme ARN (identique au génome viral). L'extrémité 3' de l'ARN est clivée précisément au dernier nucléotide par l'action autocatalytique du ribozyme. Les gènes N, P et L sont également clonés sous contrôle d'un promoteur T7 (pT7-N, pT7-P, pT7-L) et permettent l'expression des protéines correspondantes. Ainsi, lorsque pIHN, pT7-N, pT7-P et pT7-L sont transfectés dans des cellules préalablement infectées par vTF7-3, l'ARN polymérase T7 néo-synthétisée permet la transcription des quatre constructions plasmidiques, donnant lieu à la synthèse de l'ARN viral qui est encapsidé par les trois protéines du complexe réplcatif N, P et L. On reconstitue donc artificiellement le complexe de réplication/transcription qui est l'une des étapes du cycle de réplication du virus dans une cellule infectée. Le cycle

de réplication ainsi déclenché se poursuit par la synthèse des différentes protéines virales, jusqu'à la formation de particules virales qui bourgeonnent à la membrane cellulaire et sont relarguées dans le milieu de culture.

Nous avons tenu compte des spécificités du vNHI par rapport à celles des rhabdovirus de vertébrés supérieurs (Biacchesi *et al.* 2000a). Le vNHI, comme tous les virus de salmonidés, a une température optimale de multiplication, en culture cellulaire (cellules de poissons), comprise entre 10 et 14°C. Cette caractéristique a constitué un handicap lors de la mise au point du système de génétique inverse pour le vNHI. En effet, comme cela a été décrit précédemment, l'une des étapes clés consiste en l'utilisation d'un virus recombiné de vaccine exprimant une enzyme, l'ARN polymérase T7, dérivée du phage du même nom. Ce virus est capable d'infecter les cellules de poissons mais est incapable de se multiplier à basse température. Pour contourner cet obstacle, les cellules de poissons sont infectées par vTF7-3 à 37°C, transfectées une heure après par les constructions plasmidiques (Biacchesi *et al.* 2000b), et incubées 5 heures à 37°C, puis pendant une semaine à 14°C. Dans ces conditions, les quelques heures d'incubation à 37°C permet au vTF7-3 de se répliquer et de fournir aux cellules infectées et transfectées suffisamment d'ARN polymérase T7 pour permettre la transcription des différents plasmides.

Par ce système, nous avons produit du vNHI recombiné qui se multiplie à des titres équivalents à ceux du virus sauvage en culture cellulaire (>10⁸ unité formant plaque/ml) et qui est aussi pathogène pour la truite par balnéation.

Un très grand nombre de virus recombinants ont ainsi été construits pour différentes applications (Biacchesi *et al.* 2002; Boudinot *et al.* 2004; Brémont 2005; Romero *et al.* 2005).

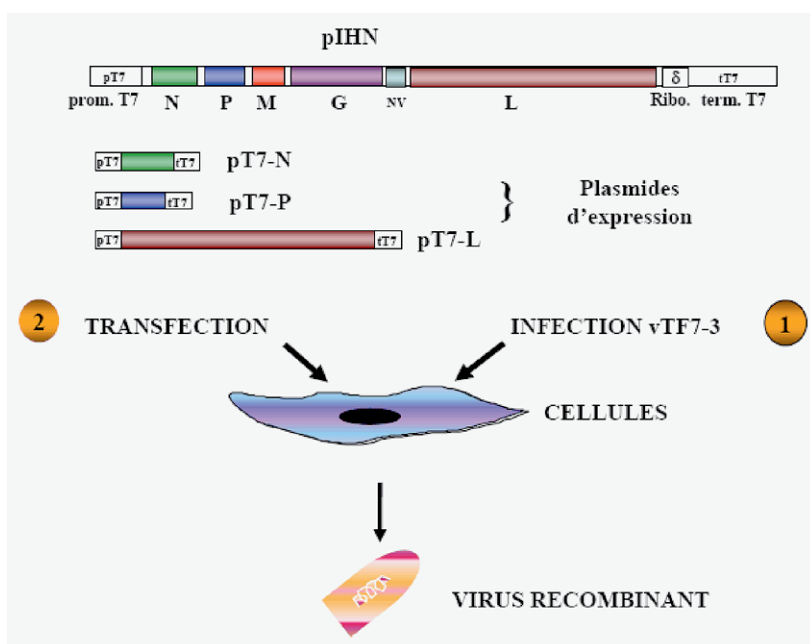


Figure 2 : Système de génétique inverse : explications dans le texte (Abréviations : prom T7 : séquence promotrice de l'ARN polymérase T7 ; Ribo : séquence ribozyme dérivée du virus de l'hépatite δ ; tT7 : séquence d'arrêt de l'ARN polymérase T7 ; vTF7-3 : virus recombiné de la vaccine exprimant l'ARN polymérase T7).

Rôle de la protéine NV dans la pathogénicité du vNHI chez la truite

La possibilité de manipuler le génome du vNHI et de produire des virus recombinés a permis d'étudier de façon plus approfondie le rôle de la petite protéine non structurale NV au cours de la réplication du vNHI en culture cellulaire, mais aussi *in vivo* chez la truite. Les protéines NV (NV NHI et NV SHV) des *Novirhabdovirus* (vSHV et vNHI) sont constituées d'environ 120 à 130 acides aminés et ne présentent pas d'homologie de séquence entre elles. Cependant, la conservation de ce gène, au cours de l'évolution virale, laisse penser qu'elles ont un rôle identique. Pour tenter de comprendre le rôle de cette protéine virale, des virus recombinés, dont le gène NV a été supprimé (vNHI- Δ NV) et remplacé par un gène rapporteur comme le gène de la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, GFP) ou celui de la luciférase (LUC) ou bien par le gène NV du vSHV (vNHI-NV_{SHV}) ont été produits (Thoulouze *et al.* 2004). La délétion du gène NV entraîne, en culture cellulaire, un effet drastique sur la réplication virale et une chute considérable du titre viral produit. Par contre, le remplacement du gène NV du vNHI par NV de vSHV restaure un phénotype sauvage. Chez les poissons infectés par balnéation par les virus recombinants vNHI- Δ NV, aucune mortalité n'est enregistrée dans les 30 jours qui suivent l'infection, alors que, dans le même temps, on observe de 80 à 100 % de mortalité chez les poissons infectés par le vNHI sauvage ou le vNHI-NV_{SHV}. L'absence de mortalité observée après infection par les vNHI- Δ NV n'est pas liée à un déficit de l'entrée et de la multiplication du virus chez le poisson, car des poissons infectés par vNHI- Δ NV sont protégés de l'infection par un vNHI sauvage administré 5 semaines après l'immunisation. Cela démontre que le vNHI- Δ NV a déclenché une réaction de défense chez le poisson vacciné. Au final, les résultats de cette étude montrent que la protéine NV joue un rôle primordial dans la réplication du vNHI en culture cellulaire et que la protéine NV est impliquée dans le pouvoir pathogène, *in vivo*, chez la truite. De plus, NV du vNHI et NV du vSHV, bien que génétiquement peu conservées, ont un rôle identique pour la réplication virale.

Le vNHI comme vecteur de gènes

Pour les virus dont le génome est empaqueté dans une coque rigide à structure icosaédrique (cas des alphavirus), les contraintes structurales sont telles que l'on ne dispose que de peu de flexibilité pour augmenter la taille du génome. Ce genre de contrainte n'existe pas pour les rhabdovirus dont le génome n'est pas encapsidé dans une coque rigide et pour lesquels la taille de la particule virale augmente proportionnellement à la taille du génome. Par ailleurs, le génome des rhabdovirus est constitué d'unités transcriptionnelles avec des séquences de démarrage et d'arrêt de la transcription, reconnues par la polymérase virale, au début et à la fin des cadres de lecture de chacun des gènes. Ainsi, pour que le vNHI puisse exprimer un ou des gènes surnuméraires, il faut introduire dans des régions intergéniques des unités transcriptionnelles supplémentaires. Pour évaluer la faisabilité de cette approche, le génome de vNHI a été modifié par l'insertion du gène

rapporteur LUC, bordé de séquences d'initiation et d'arrêt de transcription, dans une région intergénique (Harmache *et al.* 2006). Un virus recombinant vNHI-LUC a été produit en culture cellulaire et, malgré l'augmentation de la taille du génome, il a des caractéristiques de multiplication en culture cellulaire (cinétique de réplication, effet cytopathogène, titre viral) semblables à celles du virus sauvage. Ce virus est aussi pathogène chez la truite que le virus sauvage. Le gène LUC est classiquement utilisé comme gène traceur car la détection de l'activité luciférase, enzyme qui émet des photons en présence de son substrat, la luciférine, est extrêmement sensible. Ainsi pour le vNHI-LUC, on a montré que l'on pouvait détecter une cellule infectée parmi 106 cellules non infectées. Ce seuil de détection extrêmement sensible a permis de développer un système d'imagerie par bioluminescence permettant de visualiser, *in vivo*, la réplication du virus chez les truites infectées par balnéation. Ce système comporte une caméra extrêmement sensible capable de détecter les photons émis par la luciférase, qui est couplée à un système informatique de reconstitution d'image (figure 3).

Nous avons ainsi pu établir une cinétique de l'infection, visualiser les étapes très précoces de la réplication virale chez l'animal infecté et, enfin, déterminer la porte d'entrée du virus.

La réplication du vNHI, reflétée (figure 4) par l'expression de la luciférase, a été visualisée chez la truite à différents temps après l'infection. À huit et 16 heures, la réplication virale est localisée à la base des nageoires qui constituent donc la porte primaire d'entrée du virus.

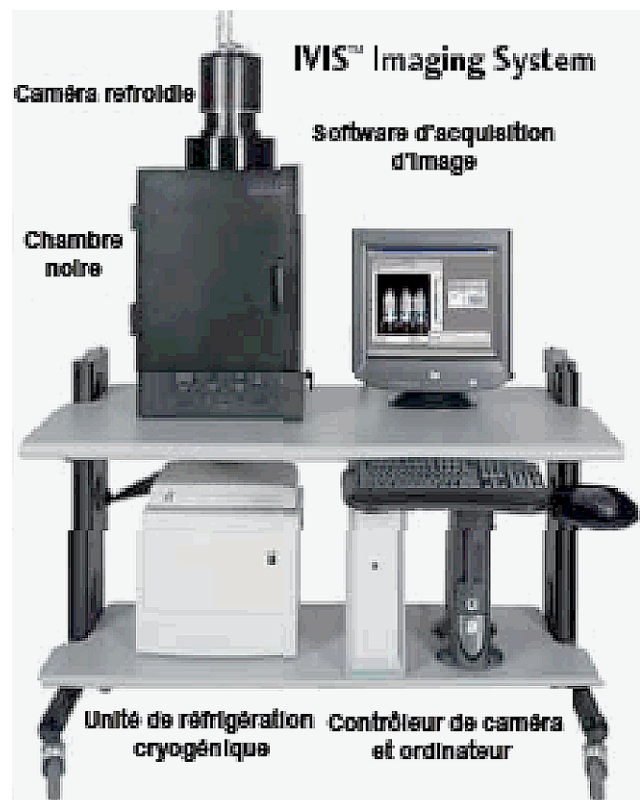


Figure 3 : Système d'imagerie permettant de visualiser *in vivo* la réplication du virus chez les truites infectées par balnéation.

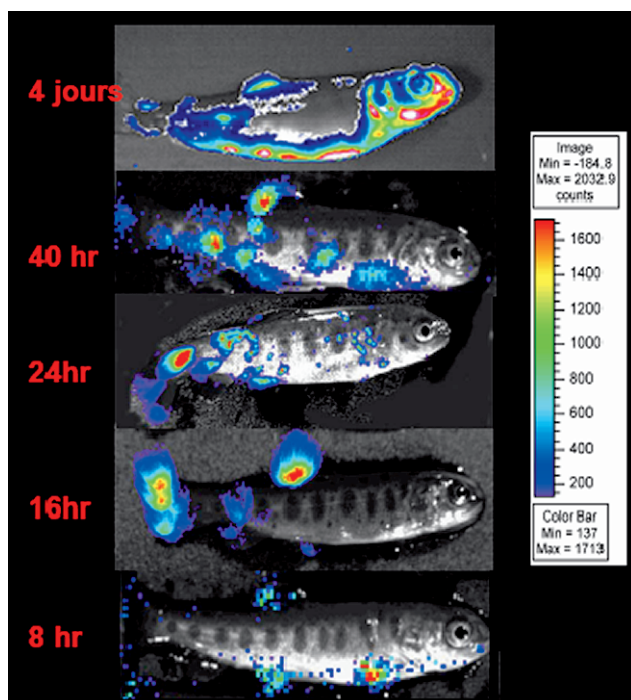


Figure 4 : Truitelles infectées par bain avec le vNHI-LUC, observées à différent temps après l'infection.

Nous avons produit de nombreux virus recombinants dérivés du vNHI dans le génome duquel de un à trois gènes surnuméraires ont été introduits. Certains constituent de très bons outils vaccinaux chez les salmonidés, comme un vNHI qui exprime, à la surface de la particule virale, les protéines HA et F du virus de l'anémie infectieuse du saumon (ISAV). Des truitelles immunisées par balnéation par ce virus recombiné sont totalement protégées d'une infection par le virus sauvage ISAV.

Par ailleurs, ces vNHI recombinants constituent également de bons outils vaccinaux pour les vertébrés supérieurs (Harmache A. *et al.* en cours de publication). En injectant à la souris le vNHI-LUC incapable de se multiplier à des températures supérieures à 20°C, nous avons fait la démonstration qu'il est naturellement inactivé et qu'il joue un rôle d'adjuvant naturel en stimulant la réponse immunitaire innée. Des expériences sont en cours pour évaluer la réponse immune chez des porcs auxquels on a injecté un vNHI exprimant les deux antigènes HA et NA d'un virus grippal porcine (H3N2).

LE VIRUS DE LA MALADIE DU SOMMEIL DES SALMONIDÉS (VMS) : UN ALPHAVIRUS ATYPIQUE.

Depuis quelques années, une maladie émergente « la maladie du sommeil » a fait son apparition dans les élevages piscicoles français. Ce nom est lié au comportement anormal des truites affectées par cette maladie, qui restent couchées sur le flanc au fond des bassins (figure 5).

L'étiologie virale de cette maladie a été établie et le virus responsable, caractérisé dans notre laboratoire comme étant le premier Alphavirus (Famille des *Togaviridae*) isolé chez les poissons (Villoing *et al.* 2000a). Un virus très proche génétiquement, celui de la maladie du pancréas VMP, a également été caractérisé chez le saumon (Weston *et al.* 2002).

Ces virus, comparés aux alphavirus des vertébrés supérieurs, présentent des caractéristiques qui en font des alphavirus atypiques et probablement des virus ancestraux : taille des protéines plus grande, régions non codantes plus courtes et, surtout, absence de transmission de ces virus via un arthropode. La transmission directe d'animaux infectés à des animaux sains est en effet maintenant bien établie. Des outils de diagnostic ont été produits, permettant soit la détection du génome viral (Villoing *et al.* 2000b), soit des antigènes viraux (Morieux *et al.* 2005). Ils devraient permettre à terme une étude épidémiologique sur le terrain et de déterminer, de façon fiable, la réelle incidence de cette maladie, jusqu'à présent estimée de façon empirique à 30 % des élevages piscicoles bretons.

Comme pour la plupart des infections virales, le seul moyen de lutte passe par le développement de vaccins. Dans les élevages de truites, les animaux les plus sensibles aux infections sont les alevins et leur vaccination par injection n'est pas envisageable, compte tenu du stress qu'elle engendre, à l'origine d'une mortalité élevée, de leur taille réduite et du nombre important (plusieurs dizaines de milliers) d'animaux à vacciner. Aussi nos études portent-elles sur le développement de vaccins vivants utilisables par balnéation.

Construction d'un ADNc infectieux pour le VMS

La construction d'un ADNc infectieux est, dans l'absolu, assez aisée. Le principe est de convertir le génome ARN de polarité positive en un ADNc copie conforme de ce génome. Cet ADNc est cloné dans un plasmide sous contrôle d'un promoteur permettant sa transcription en ARN soit *in vitro* (dans ce cas, on utilise un promoteur T7 ou SP6, la transcription étant effectuée par respectivement l'ARN polymérase T7 ou SP6), soit *in vivo* par transfection de ce plasmide dans des cellules en



Figure 5 : Truitelles expérimentalement infectées par le VMS (28 jours après l'infection).

culture (dans ce cas, on utilise un promoteur eucaryote comme le promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV). L'ARN ainsi transcrit se comporte comme un ARNm pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire, donnant lieu à la synthèse des protéines virales qui répliquent le génome viral et l'encapsident, puis à la libération de particules virales néoformées dans le milieu extracellulaire. Toutes les tentatives pour élaborer un tel système avec le VMS ont échoué. Sans doute est-ce lié à la structure particulière de son génome et, en particulier, à la taille très réduite des régions non codantes aux extrémités 5' et 3' du génome.

Pour contourner cet obstacle, nous avons généré un ADNc pour le VMS, dans lequel le premier nucléotide de l'extrémité 5' du génome est fusionné à une séquence dite ribozyme « en tête de marteau ». Lors de la transcription en ARN de cette construction, un autoclivage au point de jonction permet ainsi de générer un transcrite qui est une copie conforme de l'ARN génomique. Grâce à cette astuce technique, nous avons pu produire un virus VMS recombinant (rVMS) par transfection d'une construction plasmidique dans des cellules de poissons et obtenir des titres équivalents à ceux du virus sauvage.

Le pouvoir pathogène de ce virus recombiné a été évalué chez des truitelles par balnéation ou par injection, et nous avons montré que bien que répliquatif chez les truitelles infectées, ce rVMS est totalement apathogène pendant une période de deux mois, alors que dans le même temps, le virus sauvage (wtVMS) provoque près de 80 % de mortalité cumulée (Morielle *et al.* 2006) (figure 6).

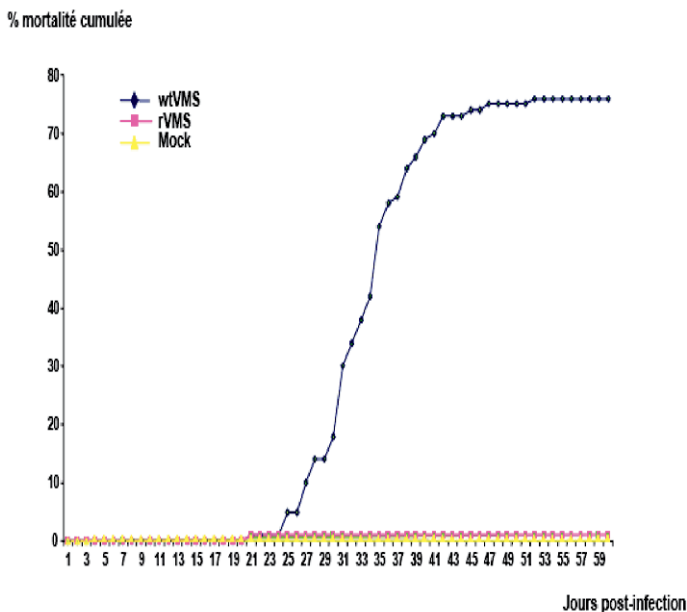


Figure 6 : Mortalité cumulée de truitelles infectées par le virus sauvage (wtVMS), le virus recombinant (rVMS) ou de truitelles témoins (mock).

Le séquençage complet du génome du rVMS, comparé à celui du wtVMS, fait apparaître un certain nombre de changements d'acides aminés, en particulier dans les deux glycoprotéines externes E2 et E1, ce qui explique sans doute l'absence de pathogénicité observée avec le rVMS. Des études visant à corriger, dans le génome du rVMS, les changements observés, par mutagenèse dirigée, sont actuellement en cours et devraient permettre d'identifier les acides aminés impliqués dans la pathogénicité du wtVMS.

Le rVMS peut-il être utilisé comme souche vaccinale ?

Il est bien établi que le rVMS est totalement apathogène lorsqu'il est administré aux truites non seulement par balnéation, mais aussi par injection. Cependant, la recherche d'anticorps, en particulier d'anticorps neutralisants, dans les sérums des animaux infectés, à différents temps après l'administration, ne permet pas d'être certain que ces animaux infectés soient protégés d'une surinfection par un virus sauvage. En effet, le taux d'anticorps neutralisants détectables reste faible durant les 2 mois de suivi.

Afin d'infirmer ou de confirmer que les truites préalablement infectées par le rVMS sont protégées d'une infection par le virus sauvage, nous avons infecté des truitelles par le rVMS, puis soumis ces truites, trois et cinq mois après, en l'absence de mortalité, à une infection par le virus sauvage. Deux mois plus tard, à 5 mois dans le premier cas et à sept dans le second, on a noté la mortalité cumulée (figure 7).

La figure 7 montre sans ambiguïté que les truites immunisées par le rVMS sont totalement protégées de l'infection par un virus sauvage et qu'une protection à long terme (7 mois) s'est installée.

Le rVMS constitue donc une souche vaccinale de choix. Des expérimentations à grande échelle sont actuellement en cours chez la truite mais également chez le saumon d'élevage.

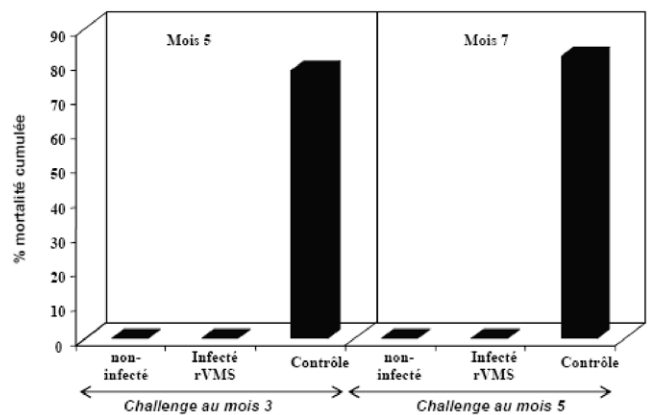


Figure 7 : Des truitelles vaccinées par le rVMS ont été soumises à une infection par le virus sauvage trois mois (épreuve au mois 3) ou cinq mois (épreuve au mois 5) après l'infection par le rVMS. La mortalité cumulée a été notée deux mois plus tard (respectivement aux mois 5 et 7).

CONCLUSION

La vaccination des truites contre différents agents viraux est très efficace lorsque l'on injecte des virus tués ou de l'ADN « nu », ou bien encore dans certains cas des protéines recombinées. Cependant, l'emploi de ce mode de vaccination par injection reste à ce jour limité à l'échelle du laboratoire car il n'est pas envisageable de vacciner des millions d'alevins par injection. L'alternative est l'utilisation de vaccins vivants atténués qui peuvent être administrés par balnéation ; dans ce cas, les truites se vaccinent naturellement.

L'atténuation du pouvoir pathogène est liée dans certains cas au changement d'épitopes présents en général sur les protéines externes des particules virales, ou est liée à la délétion

de gènes impliqués dans la virulence. La possibilité de manipuler le génome des virus, en particulier celui des virus à ARN, permet de produire des virus recombinants dans lesquels ces changements (épitopes modifiés, délétion de gènes) sont introduits. À titre d'exemple, nous avons montré que le développement d'un système de génétique pour le vNHI, un rhabdovirus, a permis de générer une souche vaccinale, potentiellement utilisable à grande échelle, par la simple délétion du gène NV codant une protéine non structurale qui joue un rôle dans la pathogénicité du virus.

De même, l'introduction par mutagenèse dirigée de mutations ciblées dans le génome du VMS, un alphavirus, a permis la production d'une souche virale totalement atténuée et protectrice chez la truite.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de deux projets européens (FAIR CT 98-4398, QLRT-2000-970).

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de Virologie Moléculaire des Poissons, qui ont contribué à ces études.

Mes remerciements s'adressent également aux membres des installations piscicoles expérimentales (Jouy-en-Josas), qui ont permis la réalisation de toutes les expérimentations sur truite.

BIBLIOGRAPHIE

- Biacchesi, S., Bearzotti, M., Bouguyon, E., Brémont, M. 2002. Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a Novirhabdovirus. *J Virol.* 76 : 2881-2889.
- Biacchesi, S., Yu, Y.X., Bearzotti, M., Tafalla, C., Fernandez-Alonso, M., Brémont, M. 2000a. Rescue of synthetic salmonid rhabdovirus minigenomes. *J Gen Virol.* 81 : 1941-1945.
- Biacchesi, S., Thoulouze, M.I., Bearzotti, M., Yu, Y.X., Brémont, M. 2000b. Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J Virol.* 74 : 11247-11253.
- Boudinot, P., Bernard, D., Boubekour, 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.
- Brémont, M. 2005. Reverse genetics on fish rhabdoviruses: tools to study the pathogenesis of fish rhabdoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 292 : 119-141. Review.
- Harmache, A., LeBerre, M., Droineau, S., Giovannini, M., Brémont, M. 2006. Bioluminescence imaging on live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *J Virol.* 80 : 3655-3659.
- Moriette, C., LeBerre, M., Boscher, S.K., Castric, J., Brémont, M. 2005. Characterization and mapping of monoclonal antibodies against the Sleeping disease virus, an aquatic alphavirus. *J Gen Virol.* 86 : 3119-3127.
- Moriette, C., LeBerre, M., Lamoureux, A., Lai, T.L., Brémont, M. 2006. Recovery of a recombinant salmonid alphavirus fully attenuated and protective in rainbow trout. *J Virol.* 80 : 4088-4098.
- Romero, A., Figueras, A., Tafalla, C., Thoulouze, M.I., Brémont, M., Novoa, B. 2005. Histological, serological and virulence studies on rainbow trout experimentally infected with recombinant infectious necrosis viruses. *Dis Aquat Organ.* 68 : 17-28.
- Schnell, M. J., Mebastsion, T., Conzelmann K. K. 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 13 : 4195-4203.
- Thoulouze, M.I., Bouguyon, E., Carpentier, C., Brémont, M. 2004. Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol.* 78 : 4098-4107.
- Villoing, S., Bearzotti, M., Chilmonczyk, S., Castric, J., Brémont, M. 2000a. Rainbow trout sleeping disease virus is an atypical alphavirus. *J Virol.* 74 : 173-183.
- Villoing, S., Castric, J., Jeffroy, J., Le Ven, A., Thiery, R., Brémont, M. 2000b. An RT-PCR-based method for the diagnosis of the sleeping disease virus in experimentally and naturally infected salmonids. *Dis Aquat Organ.* 40 : 19-27.
- Weston J, Villoing S, Brémont M, Castric J, Pfeffer M, Jewhurst V, McLoughlin M, Rodseth O, Christie KE, Koumans J, Todd D. 2002. Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *J Virol.* 76 : 6155-6163.
- Wolf, K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, N.Y.

