

Projet Biotechnologies

Recherche de moyens de prévention de la Nodavirose

I - HISTORIQUE - ASPECTS ECONOMIQUES

• Historique

Une nouvelle maladie virale affectant le système nerveux central des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*) est apparue il y a une dizaine d'années (Bellance et Gallet de Saint Aurin, 1988) en Martinique, puis sur la côte méditerranéenne française (Breuil *et al*, 1991) et chez le baramundi en Australie (Glazebrook *et al*, 1990).

Cette maladie, décrite sous le nom d'encéphalopathie et rétinopathie virale, ou nodavirose, a également été reportée chez de nombreuses espèces de poissons marins en Europe et en Asie : turbot (Bloch *et al*, 1991) et flétan (Glotmol *et al*, 1995) en Norvège, de nombreuses espèces au Japon (Nishizawa *et al*, 1995), mérrou en Thaïlande (Boonyaratpalin *et al*, 1996).

Deux équipes de recherche travaillant indépendamment sur des espèces de poissons différentes ont classé l'agent infectieux dans la famille des nodaviridés (Mori *et al*, 1992 ; Comps *et al*, 1994). Une ligne de cellules de poissons, disponible depuis peu (Frerichs *et al*, 1996), permet la culture des nodavirus en grande quantité.

La plupart des travaux réalisés à ce jour sur la nodavirose a porté essentiellement sur la description de la maladie chez plusieurs espèces de poissons (histopathologie et modes de transmission) et sur la mise au point de techniques d'identification des nodavirus (OIE, 1995 ; Comps *et al*, 1996).

Récemment, une étude plus fondamentale du virus du loup (DIEV) a consisté à cloner la séquence codante de la protéine de capsid. D'autre part, l'identification d'une lignée cellulaire de loup permissive au DIEV, a permis une meilleure caractérisation du virus et de son cycle lytique (Delsert *et al*, 1997). Ce travail a, par ailleurs, conduit à la mise au point d'une technique d'immunotitration qui permettra les aspects quantitatifs du programme proposé.

Des travaux préliminaires ont, également, montré la faisabilité d'un diagnostic par RT-PCR à partir d'extrait brut de tissus infectés (M. Comps et C. Delsert, communication personnelle).

D'autres expériences ont mis en évidence la possibilité d'une transmission expérimentale de la maladie aux larves (IFREMER Palavas) et aux juvéniles (Thiéry *et al*, 1997).

Le séquençage d'un second isolat du virus DIEV indiquent une hétérogénéité de la séquence nucléotidique de la protéine de capsid (Thiéry, communication personnelle). Il apparaît donc

39 nécessaire de mieux caractériser les différentes souches de nodavirus de façon, dans un premier
40 temps, à permettre la mise au point d'amorces déterminées dans la région la mieux conservée de la
41 séquence, contribuant ainsi à améliorer l'efficacité du diagnostic par RT-PCR et, dans un second
42 temps, à concevoir différentes stratégies vaccinales basées sur l'utilisation de protéines
43 recombinantes.

44

45 • Aspects économiques

46 La nodaviriose est devenue la maladie virale prépondérante dans les élevages de bar en France et en
47 Europe. Aux pertes économiques subies par les pisciculteurs, dont le manque à gagner par rapport au
48 chiffre d'affaire a été estimé à environ 15 millions de francs en 1996, soit deux fois plus qu'en 1995,
49 s'ajoute l'effet psychologique engendré par la dénomination de la maladie, évocatrice d'une pathologie
50 très médiatisée en 1996 (Encéphalopathie Spongiforme Bovine). Ceci pourrait à terme pousser les
51 aquaculteurs marins à abandonner l'élevage du bar au profit d'autres espèces de poissons marins.
52 Cependant, la possibilité d'une transmission à d'autres espèces (turbot, dorade) n'est pas, a priori, à
53 écarter.

54 • Références bibliographiques

55

- 56 **Bellance, R. and Gallet de Saint-Aurin, D.** (1988). L'encéphalite virale du loup de mer. *Caraiibes*
57 *Medical*, pp. 105-114.
- 58 **Bloch, B. et al** (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent.
59 *Dis. Aquat. Org.*, **10**, 65-70.
- 60 **Boonyaratpalin, S. et al** (1996). Picorna-like virus associated with mortality and a spongy
61 encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis. Aquat. Org.*, **26**, 75-80.
- 62 **Breuil, G. et al** (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in
63 hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, **97**, 109-
64 116.
- 65 **Delsert, C. et al** (1997). Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and
66 fish cell cultures. *J. Virol.*, **57**, 5673-5677.
- 67 **Comps, M. et al** (1994). Purification and characterisation of two fish encephalitis virus (FEV)
68 infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **123**, 1-10.
- 69 **Comps, M. et al** (1996). Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine
70 fishes using DIG labelled probes. *Aquaculture*, **142**, 113-121.
- 71 **Glazebrook, J.S. et al** (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval
72 barramundi *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish. Diseases*, **13**, 245-249.
- 73 **Glotmol, S. et al** (1995). Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus*
74 *hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in
75 the central nervous system and retina. *Bull. EAFP*, **15**, 176-180.
- 76 **Frerichs, G.N. et al** (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus (PNN) from
77 juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067-2071.
- 78 **Mori, K. et al** (1992). Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack
79 (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, **187**, 368-371.
- 80 **Nishizawa, T. et al** (1995). Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the
81 causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1563-1569.
- 82 **OIE** (1995). *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*, pp 85-90. Office International des
83 Epizooties, Paris.

84 **Thiéry, R. et al** (1997). Experimental transmission of viral encephalopathy and retinopathy in
85 juvenile sea bass. *Bull. EAFP* , **3/4**, 118-122.

86

87 **II - Objectifs du projet**

88 Etablissement de méthodes prophylactiques, sanitaires et médicales permettant d'éliminer la
89 maladie ou susceptibles d'en limiter l'extension et les effets dans les élevages. A cet effet il est
90 nécessaire de parfaire les connaissances de base portant sur

91 **a- la structure et les propriétés physico-chimiques et biologiques du virus**, principalement
92 en ce qui concerne la pathogénicité et l'immunogénicité.

93 **b- l'étude épidémiologique** : recherche des réservoirs naturels, des modes et des facteurs de
94 transmission de la maladie

95 **c- la réaction immunitaire** de l'hôte lors de contamination naturelle ou expérimentale (après
96 épreuve ou vaccination).

97

98 Ces différentes études reposeront sur l'utilisation de différentes **méthodes de diagnostic** et de
99 **vaccins expérimentaux** qui auront été mis au point et validés dans le cadre de ce projet.

100

101 La mise au point de **techniques de diagnostic** sensibles et spécifiques et leur validation
102 permettra en particulier d'affirmer ou infirmer la présence de virus chez des poissons potentiellement
103 porteurs asymptomatiques. L'étude du virus (objectif a) ne peut s'effectuer en l'absence des
104 techniques évoquées dans ce paragraphe, mais inversement, la mise au point de ces techniques repose
105 sur une connaissance plus approfondie du virus, telle qu'évoquée en (a). De la fiabilité du diagnostic
106 dépend la réalisation des objectifs b et c suivants.

107 La préparation et la validation de **vaccins** permettra de diminuer l'impact de la maladie en
108 zones contaminées.

109

110 **III - Etat des connaissances et travaux envisagés**

111 ***I. Structure et propriété du virus***

112 *Etat des connaissances*

113 Le virus responsable est désormais bien identifié comme un nodavirus, avec en particulier les
114 caractères suivants : virus non enveloppé, sphérique, de 25-30 nm de diamètre, facilement observable
115 en microscopie électronique. Le génome est composé de deux fragments d'ARN simple brin à polarité
116 positive : RNA₁ et RNA₂. Le PM du fragment RNA₁ est de $1,01 \times 10^6$ Da et code pour une protéine
117 non structurale de poids moléculaire 100 Kda, probablement impliquée dans la réplication du virus.
118 Le fragment RNA₂ de PM $0,49 \times 10^6$ Da code pour la protéine de capsid qui peut se présenter sous
119 deux formes légèrement différentes respectivement de PM 42 et 40 Kd chez le virus isolé du bar.

120

121

Travaux envisagés

122 La première étape consistera à définir une souche virale servant de modèle pour les
123 différentes études envisagées.

124 Celles-ci concerneront en particulier l'étude de la variabilité éventuelle des souches virales en
125 fonction de leur provenance géographique et l'étude de leur pathogénicité vis-à-vis du bar. L'analyse
126 de la variabilité pourrait se faire au niveau moléculaire par séquençage d'une région du génome de la
127 protéine de capsid après amplification par PCR, à l'aide d'amorces choisies dans les régions
128 hautement conservées du génome viral. La pathogénie de ces souches sera ensuite étudiée. En
129 particulier : le tropisme vis-à-vis de différents organes, pendant la phase aiguë de la maladie, la
130 cinétique d'apparition du virus et des lésions dans les organes cibles, ainsi que les organes porteurs de
131 virus chez les poissons porteurs sains. Cette étude sera réalisée à l'aide de différentes méthodes
132 d'analyse permettant d'obtenir des informations complémentaires : RT-PCR, hybridation *in situ*, histo
133 immuno chimie.

134 La multiplication du nodavirus en culture cellulaire (SS N-1 en un premier temps) devrait
135 permettre une production virale importante, la quantification du virus, et l'étude de certaines
136 propriétés : croissance, sensibilité aux désinfectants, à la chaleur, etc.

137 Enfin l'étude de la pathogénicité pourrait être réalisée *in vivo* par contaminations
138 expérimentales de larves et de juvéniles.

139

140 2. Mise au point et validation des moyens de diagnostic nécessaires à l'ensemble de l'étude

141 2.1. PCR

142 **Etat des connaissances.**

143 A l'heure actuelle, il existe deux techniques basées sur la PCR permettant de détecter le génome viral
144 chez les poissons atteints. Une première méthode de RT - PCR, publiée par un groupe japonais
145 (Nishizawa *et al.*, 1994, Dis. Aquat. Org., 18, 103-107), est fondée sur l'utilisation d'un couple
146 d'amorces spécifiques du génome du Nodavirus isolé chez *Pseudocaranx dentex*. Cette technique,
147 utilisée jusqu'à présent au CNEVA Brest, permet également de détecter le virus chez le bar, au moins
148 chez les poissons qui présentent les signes cliniques de la maladie. Il se pose cependant le problème
149 de l'utilisation de cette technique chez les poissons porteurs sains. Une seconde technique dite de
150 "nested" RT-PCR, mise au point à l'IFREMER, utilisant deux couples d'amorces spécifiques du
151 génome du virus isolé chez le bar est en cours de validation.

152 **Objectif**

153 Disposer d'une technique PCR adaptée au diagnostic fiable, sensible et en grand nombre, utilisable sur
154 les différents tissus où le virus est présent ainsi que chez les poissons porteurs sains asymptomatiques.

155 ***Travaux envisagés***

156 1. Comparaison des sensibilités respectives des techniques RT-PCR et nested RT-PCR sur extrait de
157 matériel sain artificiellement contaminé par des quantités connues de virus ou de RNA/DNA viral.

158

159 2. Elaboration d'un standard interne

160 Selon la technique retenue en 1 - Elaboration d'un standard interne.

161 But : prévention des faux négatifs.

162 Principe : introduction systématique d'un RNA/ou DNA aisément différenciable de l'ARN cible
163 (taille du produit d'amplification) dans toutes les réactions PCR, pour contrôler l'efficacité de
164 l'amplification.

165

166 3. Introduction d'un moyen de contrôle des faux positifs

167 But : prévenir l'apparition de signaux liés à l'amplification possible des produits PCR type "carry-
168 over". Plusieurs solutions sont utilisables: dUTP, UV, DNase.

169

170 4. Rapidité de l'analyse et automatisation

171 But: Réaliser un test en un seul tube : utilisation d'un enzyme type RTth capable d'effectuer les
172 étapes de reverse transcription et d'amplification : gain de temps et possibilités de contaminations
173 réduites. Détection des produits PCR par une méthode colorimétrique après hybridation sur
174 microplaque avec une sonde de capture; comparaison avec la detection sur gel d'agarose.

175

176 5. Validation de la méthode

177 Sur matériel issu de porteurs sains et contaminés : recherche du génome viral dans les divers tissus
178 : encéphale, rein, yeux, rate, sang, gonades.

179

180 **2.2. Culture cellulaire**

181 Utilisation de la lignée cellulaire SSN-1 pour l'isolement du virus à partir de poissons
182 contaminés - Identification par séroneutralisation - Comparaison avec les autres techniques de
183 diagnostic.

184

185 **2.3. ELISA**

186 ***Etat des connaissances***

187 Utilisation d'un ELISA sandwich pour la détection d'anticorps sériques chez le bar. Cet
188 ELISA met oeuvre un anticorps capteur (IgG de Lapin anti-nodavirus) et un anticorps traceur
189 (anticorps monoclonal 6E11 anti-IgM de bar). La recherche des anticorps sériques anti-nodavirus du

190 bar, est effectuée en déposant une suspension de virus (la suspension virale est actuellement purifiée à
191 partir de larves de bar contaminées) au fond des puits de la plaque ELISA.

192

193 ***Objectif***

194 Cette technique permet de rechercher les anticorps sériques anti-nodavirus chez des porteurs
195 sains. Un dépistage sérologique est applicable chez les reproducteurs mâles et femelles. Par rapport
196 aux autres techniques de détection (PCR sur des biopsies ovariennes), il présente l'avantage de
197 pouvoir être pratiqué indépendamment de la saison de ponte ou sur des pré-géniteurs lorsque ces
198 biopsies ovariennes ne sont pas possibles.

199

200 ***Travaux envisagés***

201 1. Adaptation de cette technique au dépistage chez les reproducteurs (cinétique anticorps) et comparer
202 les résultats obtenus avec ceux des autres techniques de détection (PCR, culture cellulaires).

203 2. Amélioration du test ELISA. La suspension virale utilisée dans l'ELISA pourrait être remplacée
204 par différents substituts plus appropriés pour la standardisation du test ELISA tels que: virus obtenu
205 en culture cellulaire, protéine virale recombinante ou peptides de synthèse.

206

207 ***3. Etude épidémiologique***

208 *3.1. Chez les alevins et juvéniles (CNEVA)*

209 *Objectifs* : répondre aux questions suivantes :

210 - y a-t-il naturellement transmission horizontale chez ces poissons ?

211 - si oui, quels sont les facteurs qui interviennent ?

212 facteurs intrinsèques ?

213 facteurs extrinsèques ?

214 - quelles sont les conséquences de cette transmission : infection, définitive ou limitée dans le temps,
215 portage asymptomatique, immunité acquise,... ?

216

217 *Réalisation*

218 a)Etablissement d'un modèle de transmission :

219 - choix d'une souche virale et d'une dose standard

220 - choix d'une technique de transmission

221 - choix de l'hôte : bar d'origine définie, âge, taille, état physiologique...

222 - condition d'environnement définie.

223 b) Recherche des effets de différents facteurs sur la contamination, la cinétique de l'infection et la
224 réponse immunitaire :

- 225 - souches virales
- 226 - facteurs intrinsèques : espèce, âge, origine, état physiologique...
- 227 - facteurs extrinsèques : température, salinité...

228 Les paramètres recherchés sont :

- 229 - les critères d'infection : mortalité, symptômes et lésions, identification du virus.
- 230 - la réponse immunitaire : établissement de cinétique par ELISA ou sur culture cellulaire (titrage
- 231 des anticorps neutralisants) d'anticorps et éventuellement recherche de réactions non spécifiques
- 232 (interféron...).

233

234 3.2. Chez les géniteurs et les larves (IFREMER)

235 Objectifs : répondre aux questions suivantes :

- 236 - y a-t-il naturellement transmission horizontale et verticale chez les larves et si oui quels sont les
- 237 facteurs qui interviennent ?
 - 238 - facteurs intervenants dans la transmission verticale du virus et particulièrement facteurs
 - 239 déclenchants la contamination virale des pontes chez un reproducteur porteur sain (stress,
 - 240 température etc.).
 - 241 - facteurs intervenants dans la transmission horizontale du virus : sexe des géniteurs,
 - 242 température, souches virales...
- 243
- 244 - quelles sont les conséquences de cette transmission :
 - 245 - une infection virale réalisée au moment de la mise en place du système immunitaire peut
 - 246 elle induire une immunotolérance chez la larve et quelles sont les conséquences de cette
 - 247 immunotolérance (portage asymptomatique ?)

248

249 Réalisation

250 a) Constitution de lots de reproducteurs "sains et contaminés"

251 Les différentes techniques de diagnostic seront utilisées chez les reproducteurs,
252 particulièrement :

- 253 -le sérodiagnostic : cinétique d'anticorps sériques
- 254 -la PCR (biopsies ovariennes, sang ?)

255 La validation des ces techniques sera effectuée en comparant les résultats obtenus avec
256 différentes méthodes de prélèvement (sang et biopsies) et en recherchant le virus dans différents
257 organes (encéphale, gonades etc...) chez les porteurs sains.

258 b) Etablissement d'un modèle de transmission :
259 -transmission horizontale chez des larves issues de reproducteurs "sains"
260 -transmission verticale chez des larves issues de reproducteurs virosés (porteurs sains)
261 ou expérimentalement contaminés.
262

263 c) Recherche des effets de différents facteurs sur la contamination, la cinétique de l'infection et la
264 réponse immunitaire :
265

266 3.3. Sur le terrain (Collaboration CNEVA-SFAM) : enquête épidémiologique dans les
267 élevages

268 Etude spatio-temporelle de l'infection, des facteurs de risque et des conséquences.
269 Utilisation des outils diagnostics (PCR, HIC, ELISA, séroneutralisation sur culture cellulaire) pour
270 révéler la présence d'antigènes viraux ou d'anticorps.
271

272 **4. Vaccins et vaccination**

273 Trois types de vaccin pourront être utilisés :

- 274 1) vaccin classique : virus tué, adjuvé ou non à titre de référence: préparation CNEVA.
275 2) vaccin recombinant : clonage de la protéine de capsidie dans différents vecteurs (bactérie,
276 baculovirus): préparation CNEVA.
277 3) peptide de synthèse : tester différentes portions de la protéine de capsidie, choisies à la lumière des
278 connaissances acquises sur la variabilité éventuelle des différentes souches: préparation
279 IFREMER.
280

281 4.1. Recherche des effets sur juvéniles (CNEVA)

282 a) Détermination d'un modèle vaccinal : a priori, injection d'un vaccin inactivé.
283

284 b) Comparaison d'autres vaccins ou méthodes de vaccination au modèle a).

285 En particulier par la recherche de protections après épreuves et par l'établissement de
286 cinétiques de production d'anticorps.

287 4.2. Recherche des effets sur géniteurs et larves (IFREMER)

288 a) Détermination d'un modèle vaccinal chez les géniteurs :

289 - Cinétique d'apparition des anticorps dans le sérum (protection des reproducteurs) ainsi que
290 dans les ovocytes des femelles et dans les larves (transmission d'une immunité passive).

291 - protection des larves après vaccination des géniteurs, et recherche d'un éventuel portage
292 sain.

293

294 b) Comparaison d'autres vaccins ou méthodes de vaccination (idem a).

295 **4.3. Essais cliniques en élevage (collaboration SFAM)**

296 Recherche , en condition normale d'élevage, des effets des vaccin(s) et méthode(s) de
297 vaccination sélectionnés en laboratoire.

298

299

300

301

302

303

304

305

IV - Répartition des tâches entre les partenaires SFAM (A) et IFREMER (B) et CNEVA

OBJECTIFS	IFREMER	SFAM	CNEVA
ETUDE DU VIRUS	Pathogénicité (chez les larves) et immunogénicité (larves et géniteurs)		Biologie moléculaire Propriétés physico chimiques et biologiques
DIAGNOSTIC a) Mise au point b) Validation *	Sérodiagnostic (ELISA) reproducteurs contaminés	Ecloséries	PCR et Cultures cellulaires alevins contaminés
EPIDEMIOLOGIE	Transmission horizontale aux LARVES Transmission verticale aux LARVES	Conditions naturelles de la transmission	Transmission horizontale aux JUVENILES
CONTROLE SANITAIRE	Constitution de lots de reproducteurs Sains, Virovés, Contaminés		Détermination d'élevages ou zones idemnes
VACCINATION -Recherche d'une protection - Caractérisation de la réaction immunitaire	Vaccination des reproducteurs Recherche d'une protection passive chez les larves	Essais cliniques	Chez les juvéniles: comparaison de vaccins et méthodes vaccinales