



SYNDICAT FRANÇAIS DE L'AQUACULTURE MARINE  
et NOUVELLE

| *RAPPORT FINAL*

**PROGRAMME BIOTECHNOLOGIES**

**Recherche de moyens de dépistage et prévention  
de la nodavirose du bar**

*(DOSSIER ANVAR A9804041J)*

*1998 - 2002*



**Juin 2002**

**Recherche de moyens de dépistage et de prévention  
de la nodavirose du bar**

**(Dossier ANVAR A9804041J)**

**1998-2002**

# Recherche de moyens de dépistage et de prévention de la nodavirose du bar

(Dossier ANVAR A9804041J)

1998-2002

## *I. Introduction*

Ce rapport clôture une collaboration, entreprise courant 97, entre l'Agence Nationale pour la Valorisation de la Recherche (ANVAR), l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), le Syndicat National des Aquaculteurs Marins (SFAM) et l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER).

A l'origine (97) ce contrat a démarré sous l'égide de la délégation ANVAR de Bordeaux et avec comme contractant principal le SFAM. Le statut juridique de ce syndicat s'avéra incompatible au pilotage de ce dossier. Une nouvelle procédure fut entamée avec l'ANVAR de Montpellier, l'IFREMER Palavas devenant le contractant principal et l'AFSSA de Brest (ex. CNEVA) le deuxième contractant. En plus de la cosignature de ce contrat, l'AFSSA et l'IFREMER sont liés par un accord de consortium.

Certains des travaux dépendant de cycles naturels ou de conditions de température une partie des expérimentations furent tout de même initiées fin 97 afin d'éviter que ce contretemps administratif ne pénalise d'une année les recherches. Par la suite, pour permettre de finaliser certaines recherches, un délai supplémentaire d'un an fut accordé par l'ANVAR aux différents partenaires. Ces raisons expliquent la durée supérieure aux 3 ans initialement prévus pour ce type de contrat.

En parallèle des recherches autres que celles inscrites à ce contrat ont été menées, elles permirent une meilleure cohésion des multiples facettes du sujet. Ces résultats sont cités lorsque la compréhension de l'ensemble le nécessite

### *I.A. Le rapport*

Ce rapport comporte deux types de numérotation :

**Premier type de numérotation**, sous forme de chiffre romain ou de lettre en italique. Elle est chronologique et concerne les chapitres de ce rapport.

**Deuxième type de numérotation** sous formes de chiffres arabes. Elle fait référence au plan de l'annexe technique (annexe1) et qui a été reprise dans les différents

rapports et documents dont la partie scientifique de celui-ci (III). Cette numérotation apparaît plusieurs fois au cours de ce rapport.

## ***I. B. Les annexes***

Les publications, présentations orales, résumés de poster et rapports internes sont fournis en annexe. Les deux rapports intermédiaires ne sont pas communiqués car les partenaires en possèdent un exemplaire. Le premier rapport était informel et concernait essentiellement l'état d'avancement des travaux. Les quelques résultats qu'il contenait ont été repris dans le second rapport de mars 2000. Les renvois font appel soit aux annexes soit au rapport de mars 2000 soit au § III de celui-ci

## ***II. Travaux réalisés en regard des objectifs***

### ***II.A Le bilan***

Ce programme a été très riche en enseignements scientifiques dont certains étaient prévisibles et d'autre moins, ce qui a obligé les différents partenaires à des adaptations permanentes.

Le bilan et les tableaux récapitulatifs reprennent les propositions de l'annexe technique (annexe 1) et utilisent le même plan.

Sur la quarantaine de tâches prévues la quasi totalité a été effectuée, seules 2 n'ont pas été réalisées et 2 ont été réorientées par contre 4 points cités dans le rapport n'étaient pas prévus au contrat ANVAR. Elles ont été réalisées car elles étaient nécessaires à la sa cohérence ou s'incluent naturellement dans ce travail. Elles sont citées à titre d'information.

#### **1. Structure et propriétés du virus**

La totalité des tâches a été réalisée.

Deux lignées de nodavirus infectant le bar ont été mises en évidence avec une pathogénie variable selon l'âge (larves, juvéniles, reproducteurs...) et selon les facteurs extérieurs. Ce virus s'est montré d'une résistance exceptionnelle aux facteurs tant physiques que chimiques.

Bien que non prévue au contrat l'étude des lignées affectant d'autres espèces a été réalisée.

#### **2. Mise au point des moyens de diagnostic**

La totalité sauf une tâche a été réalisée.

Les diagnostics existants ont été adaptés ou réabordés sous un autre angle. Des diagnostics non prévus au contrat ont été mis au point car ils étaient indispensables à une comparaison fiable des différentes techniques.

Tâche non réalisée:

«La suspension virale remplacée par... protéine virale recombinante... »

Lors de la rédaction du contrat la production de virus sur culture de cellule était encore aléatoire et toutes les options de remplacement avaient été envisagées, mais:

- La production de virus fut rapidement mise au point.
- Le choix de la production de protéine recombinante a été réorienté (voir 4.1.4)
- Les informations obtenues lors du travail sur les membranes (annexe 25), dans le cadre des vaccins synthétiques, permettent maintenant de douter de la pertinence de cette alternative.

### **3. Etude épidémiologique**

L'ensemble des tâches a été réalisé.

### **4. Vaccin et vaccination**

L'étude des peptides synthétiques a permis de sélectionner un peptide potentiellement protecteur.

Tâche réorientée :

«Vaccin recombinant : clonage de la protéine de capsid dans différents vecteurs (bactérie, baculovirus)» a été réorienté vers l'injection des plasmides directement chez le poisson. 2 raisons ont justifié cette nouvelle orientation:

- Il existe une différence de structure possible entre la protéine produite par les vecteurs et l'originale.

- Des travaux sur la truite ont montré une protection par l'injection directe de plasmide

Tâche non réalisée ou réorientée :

«Comparaison d'autres vaccins ou méthodes de vaccination... Recherche, en condition normale d'élevage, des effets des vaccins et méthodes de vaccination sélectionnés en laboratoire... »

L'absence de résultats probants en laboratoire rendait ces étapes prématurées. La vaccination par virus tué a été envisagée mais non retenue. L'étude des virus tués comme témoin positif a permis de mettre en évidence une persistance de la virulence non compatible avec son usage en tant que vaccin.

Le bilan global paraît très positif surtout en regard des objectifs qui étaient très ambitieux. Ce bilan ne traite pas des voies potentiellement intéressantes qui se sont avérées, après étude, sans intérêt.

### **5. Désinfection et inactivation du virus**

L'ensemble des tâches a été réalisé

## II.B. Tableaux récapitulatifs

<b>Tâche à réaliser</b> <i>Phrase ou idée exprimée dans l'annexe technique</i>	<b>N°Ligne</b> <i>Dans. L'annexe technique.</i>	<b>Acteur</b> <i>Afssa Ifremer Sfam</i>	<b>Fait</b> <i>Oui Non</i>	<b>observations</b>
<b>Structure et propriété du virus</b>	110			
..définir une souche virale servant de modèle	121	A+I	oui	SB2 Rapt 99 & Rapt. Scient.(III) §1 Annexes 2 ;3
..étude de la variabilité des souches virales en fonction de leur provenance géographique	123	A+S	Oui	Rapt 99 §1 Rapt. Scient.(III) §1 Annexes 2 ; 3
...l'étude de la pathogénicité pourrait être réalisée <i>in vivo</i> par contaminations expérimentales de larves et de juvéniles.	124	A+I	Oui	Rapt. Scient.(III) §1;§ 3.1; §3.2 Annexes 10 à 18 <a href="#">13</a>
...le tropisme vis-à-vis de différents organes, pendant la phase aiguë de la maladie, la cinétique d'apparition du virus et des lésions dans les organes cibles.	128	A	Oui	Rapt. Scient.(III).§ 3.1 Annexes 10 à <a href="#">13</a>
...ainsi que les organes porteurs de virus chez les poissons porteurs sains.	129	A+I	Oui	Rapt. Scient.(III) §3.2.1 §3.2.2 § 4.2.1 Annexes 14 à 16
La multiplication du nodavirus en culture cellulaire (SS N-1 en un premier temps) devrait permettre une production virale importante, la quantification du virus,...	132	A+I	Oui	Rapt 99 §2.2 Rapt. Scient.(III) §2.2. Annexes 2 4, <a href="#">25</a>
l'étude de la pathogénicité réalisée <i>in vivo</i> par contaminations expérimentales de larves et de juvéniles.	135	A+I	Oui	Rapt. Scient.(III) §3.1; §3.2
<b>Mise au point et validation des moyens de diagnostic</b>	138			
Comparaison des sensibilités respectives des techniques RT-PCR et nested RT-PCR	154	A	Oui	Rapt 99 §2.1 Prérapt §2.1 Annexes <a href="#">4</a> à 6

<b>Tâche à réaliser</b> <i>Phrase ou idée exprimée dans l'annexe technique</i>	<b>N°Ligne</b> <i>Dans L'annexe technique.</i>	<b>Acteur</b> <i>Afssa Ifremer Sfam</i>	<b>Fait</b> <i>Oui Non</i>	<b>observations</b>
Elaboration d'un standard interne ... contrôle des faux positifs ... automatisation Validation de la méthode...porteurs sains et contaminés : encéphale, rein, yeux, rate, sang, gonades.	157 164 168 174	A	Oui	Rapt. Scient.(III) § 2.2 Annexes <u>4</u> à 6
...SSN-1 pour l'isolement du virus à partir de poissons contaminés	179	A+I	Oui	Rapt 99 §2.2. Rapt. Scient.(III) §2.2.
Identification par séroneutralisation -	180	A	Non	
Comparaison(cc) avec les autres techniques de diagnostic	181	A+I	Oui	Rapt. Scient.(III) §2.1 ; §2.2. ;§2.3. ;§2.4. ;§3.1 ;§3.2 Annexes <u>4</u> , 5, 6, <u>7</u> et 8
Utilisation d'un ELISA sandwich pour la détection d'anticorps sériques chez le bar	185 à 189	I+A	Oui	La mise au point d'un ELISA pour les anticorps sériques n'est pas prévue dans le contrat ANVAR ((§ 2.3 Elisa ; Etat des connaissances ). Seule son adaptation au dépistage est prévue. Rapt 99 §2.3.1 Rapt. Scient.(III) § 2.3.1 Annexes <u>7</u> à 8
La recherche d'antigène viral par ELISA	<b>non prévu</b>	I	Oui	Rapt 99 §2.3.2 Rapt. Scient.(III) § 2.3.2.
Hybridation in situ	<b>non prévu</b>	A	Oui	Rapt 99 §2.4.1. Rapt. Scient.(III) § 2.3.4.
Production IgG lapin anti-noda	<b>non prévu</b>	A	Oui	Rapt 99 §2.4.2
Adaptation ( ELISA) au dépistage chez les reproducteurs et cinétique anticorps	199	I	Oui	Rapt 99 §3.2.1.1.
Comparer les résultats obtenus avec ceux des autres techniques de détection (PCR, culture cellulaires).	200	A+I	Oui	Rapt. Scient.(III) §2.1 ; §2.2. ;§2.3. ;§2.4. ;§3.1 ;§3.2 Annexes <u>4</u> ,5, 6, <u>7</u> et 8

<b>Tâche à réaliser</b> <i>Phrase ou idée exprimée dans l'annexe technique</i>	<b>N°Ligne</b> <i>Dans. L'annexe technique.</i>	<b>Acteur</b> <i>Afssa Ifremer Sfam</i>	<b>Fait</b> <i>Oui Non</i>	<b>observations</b>
Amélioration du test ELISA. La suspension virale remplacée par: -virus obtenu en culture cellulaire,  -protéine virale recombinante -peptides de synthèse	201	I A	Oui  Non Oui	Rapt99 et Rapt. Scient.(III) §.2.2 ; §2.3.1. Annexes 15 ; 16 Les résultats des travaux sur les membranes ont montré l'absence d'intérêt de ce type d'alternative. Rapt. Scient.(III) §4.2.2. Annexes 19, 20, <a href="#">21</a> , <a href="#">22</a> et <a href="#">23</a>
<b>Etude épidémiologique chez les géniteurs et les larves</b>	232	I		
Constitution de lots de reproducteurs sains et contaminés	248	I	Oui	Rapt 99 § 3.2.1 Rapt. Scient.(III) §3.2.1. ; §3.2.2. Annexes 15 ; 16
Cinétique d'anticorps sériques, PCR (biopsies ovariennes, sang ?)	251	I	Oui	Rapt 99 § 3.2.1.1.1. Rapt. Scient.(III) § 3.2.1.1 Annexes 17
rechercher le virus dans différents organes (encéphale, gonades etc...) chez les porteurs sains.	254	I	Oui	Rapt 99 § 3.2.1.1.1. Rapt. Scient.(III) § 3.2.2.1. ; § 4.2.1 Annexes 17
transmission horizontale chez des larves issues de reproducteurs "sains"	257	I	oui	Rapt 99 § 3.2.2 Rapt. Scient.(III) § 3.2.1.1 Annexes 20, <a href="#">21</a> , <a href="#">22</a>
transmission verticale chez des larves issues de reproducteurs virosés (porteurs sains) ou expérimentalement contaminés.	258	I	Oui	Rapt 99 § 3.2.3 Rapt. Scient.(III) § 3.2.2. Annexes 15 ; 16
Recherche des effets de différents facteurs sur la contamination, la cinétique de l'infection et la réponse immunitaire	261	I	Oui	Température, stress, Saison, âge. Rapt99 et Rapt. Scient.(III) § 3 et § 4.1 Annexes 18 ;20, <a href="#">21</a> , <a href="#">22</a>



<b>Tâche à réaliser</b> <i>Phrase ou idée exprimée dans l'annexe technique</i>	<b>N°Ligne</b> <i>Dans. L'annexe technique.</i>	<b>Acteur</b> <i>Afssa Ifremer Sfam</i>	<b>Fait</b> <i>Oui Non</i>	<b>observations</b>
<b>Enquête épidémiologique dans les élevages</b>	264	A+S		
Etude spatio-temporelle de l'infection, des facteurs de risque et des conséquences.	266	A+S	Oui	Rapt 99 § 3.2.3. Rapt. Scient.(III) §3.3
<b>Vaccins et vaccination</b>	270	A+I		
<u>vaccin classique</u> : virus tué, adjuvé ou non à titre de référence.	271	A	Oui/non	Rapt. Scient.(III) §4.1. Annexes 19
<u>vaccin recombinant</u> : clonage de la protéine de capsid dans différents vecteurs (bactérie, baculovirus)	273	A	Non/oui	Remplacé par l'injection de plasmide Rapt 99 § 4.2 Rapt. Scient.(III) §4.1 Annexes 19
<u>peptide de synthèse</u> : tester différentes portions de la protéine de capsid,	275	I	Oui	Rapt 99 § 4.3 Rapt. Scient.(III) § 4.1 Annexes 20, <a href="#">21</a> , <a href="#">22</a> , <a href="#">23</a> , 24 <a href="#">25</a>
<b>Recherche des vaccins sur juvéniles</b>	278	A		
Détermination d'un modèle vaccinal	279	A	Non	Il faut attendre de posséder différents vaccins potentiels avant définir les conditions de vaccination.
Comparaison d'autres vaccins ou méthodes de vaccination au modèle	281	A	non	
<b>Recherche des effets sur géniteurs et larves</b>	284	I		
Détermination d'un modèle vaccinal chez les géniteurs	285	I	oui	Rapt. Scient.(III) §3.2.1. Les reproducteurs ne sont pas sensibles. Protection éventuelle de la descendance pendant les 4 premiers jours.

<b>Tâche à réaliser</b> <i>Phrase ou idée exprimée dans l'annexe technique</i>	<b>N°Ligne</b> <i>Dans. L'annexe technique.</i>	<b>Acteur</b> <i>Afssa Ifremer Sfam</i>	<b>Fait</b> <i>Oui Non</i>	<b>observations</b>
...des anticorps dans le sérum (protection des reproducteurs)	286	I	oui	Rapt. Scient.(III) §3.2.1. ;§3. Annexes 15 ; 16
Cinétique d'apparition dans les ovocytes des femelles et dans les larves (transmission d'une immunité passive).	287	I	oui	Rapt. Scient.(III) §3.2.2.2 Annexes 16
-protection des larves après vaccination des géniteurs, et recherche d'un éventuel portage sain.	288	I		Rapt. Scient.(III) §3.2.2.2 Annexes 16
Comparaison d'autres vaccins ou méthodes de vaccination	290	I	Non/oui	Utilisation des vaccins tués comme témoin positif Rapt. Scient.(III) §4.1 ; §4.2.1 Annexes 19,20, <a href="#">21</a> , <a href="#">22</a> , <a href="#">23</a> et 24
<b>Essais cliniques en élevage</b>	291			
Recherche, en condition normale d'élevage, des effets des vaccin(s) et méthode(s) de vaccination sélectionné en laboratoire	292	A+I+S	Non	Non envisageable tant que les résultats labo ne sont pas probants.
<b>Désinfec. Inactiva. du virus</b>				
...l'étude de certaines propriétés : croissance, sensibilité aux désinfectants, à la chaleur,	133	A	Oui	Rapt. Scient.(III) § 5; §4.1 Annexes 14 à 17 ; 26 et 27

### ***III Rapport Scientifique***

Cette partie ne reprend que les idées principales, la majorité des résultats ayant déjà été diffusée par d'une façon plus détaillée par d'autres voies, thèse : publications dans des revues internationales à comité de lecture, présentation orale ou sous forme de poster dans des réunions nationales ou internationales, rapport interne. Toutes ces publications sont communiquées en annexe.

<b>Support de communication</b>	<b>Nombre</b>
Publication dans des revues internationales à comité de lecture	10
Présentation orale	7
Poster	6
Rapport interne et intermédiaire	5
Thèse	1

## 1. Structure et propriétés du virus (AFSSA Brest)

Il a été montré qu'au moins deux souches différentes de nodavirus peuvent infecter le bar *Dicentrarchus labrax*. Le Sb1 qui a été isolé en atlantique et le Sb2 isolé en Méditerranée

Thiéry R., Arnauld C., Delsert C., 1999.

Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes.

J. Fish Dis., 22, 201-207. (annexe 2)

Thiéry R., Arnauld C., Delsert C., 1999.

Mise en évidence de deux génotypes distincts du nodavirus du bar (*Dicentrarchus labrax*).

2° journées francophone de virologie, Virologie, 3(2), 181 (poster, annexe 3)

Une souchothèque comportant 41 isolats de nodavirus d'origine géographique et d'espèces de poissons différentes a été constituée (tab :1)

Les isolats les plus représentatifs ont fait l'objet d'une analyse phylogénétique basée sur le séquençage d'une partie du gène codant pour la protéine de capsid virale (fig :1)

## 2. Mise au point des moyens de diagnostic

### 2.1. PCR (AFSSA Brest)

Un protocole de RT-PCR (voir Thiéry *et al* 99 ci dessus) permet de réaliser les étapes de transcription inverse et de PCR dans le même tube sans interruption du programme (RT-PCR ininterrompue, non publié). Un protocole de nested-PCR a été élaboré.

Deux couples d'amorces sont utilisés pour identifier sélectivement les deux génotypes impliqués dans les infections des poissons élevés sur le territoire français. Un autre couple d'amorces, moins sélectif, mais permettant théoriquement la détection de l'ensemble des génotypes de nodavirus connus à ce jour a également été testé récemment. Le virus du flétan (*Halibut NNV*), sévissant en Europe du nord et au Royaume Uni est notamment détectable avec ces amorces.

Une méthode alterne de typage rapide des nodavirus (Sb1 ou Sb2) par RT-PCR suivie d'une digestion à l'aide d'enzymes de restriction (PCR-RFLP) est également opérationnelle.

Thiéry R., Raymond J.C., Castric J., 1999.

Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Research*, 63, 11-17. (annexe 4)

Thiéry R. 1999.  
 Nodavirus characterisation and diagnostic tools  
 IX<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce,  
 20-24 septembre 1999 (Communication orale, annexe 5)

Thiéry, R. Arnauld, C. Boscher, S. Castric, J. 1999  
 Genotyping of nodavirus isolates from sea bass *Dicentrarchus labrax*:  
 implication on PCR-based diagnosis IX<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and  
 Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999, (Poster-148, annexe 6)

## **2.2. CULTURE CELLULAIRE (AFSSA Brest)**

Les techniques permettant la production et la recherche de nodavirus dans les  
 tissus ont été mises au point

## **2.3. ELISA**

### **2.3.1. Mise au point d'un ELISA pour la détection dans le sérum des anticorps spécifiques du nodavirus**

Deux méthodes ont été utilisées, l'une à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin anti-  
 immunoglobulines de bar (AFSSA), l'autre à l'aide d'un anticorps monoclonal  
 (IFREMER).

Afin de réaliser l'étude sur le terrain, l'AFSSA, site de Brest, a produit les  
 différents réactifs nécessaires à la réalisation de la technique ELISA: sérum polyclonal de  
 lapin anti-nodavirus, stocks de nodavirus souche Sb1 et Sb2, sérum polyclonal de lapin  
 anti-immunoglobulines de bar, sérums de bars positif et négatif de référence.

Breuil, G. & Romestand, B. 1999. A rapid ELISA method for detecting specific  
 antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.):  
 application in the screening of spawners in sea bass hatchery. *Journal of Fish Disease*  
**22**: 45-52. (annexe 7)

Breuil G, Pépin JF, Castric J, Fauvel C & Thiery R. 2000. Detection of serum  
 antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the  
 screening of the broodstock in sea bass hatcheries. *Bull Europ. Assoc. Fish. Pathol.* **20**,  
 95-100. (annexe 8)

### **2.3.2. Mise au point d'un ELISA pour la détection d'antigène viral. (IFREMER Palavas)**

Objectif : Détecter la présence de nodavirus dans des échantillons de larves ou dans  
 des biopsies ovariennes. Cette technique présente l'avantage d'être rapide (24 h), facile à  
 mettre en œuvre pour de nombreux échantillons et très économique.

Breuil G., Mouchel O. and Pepin J.F. 2001 A sandwich ELISA to detect Nodavirus in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Disease of Aquatic Organisms* **43**, 25-31. (annexe 9)

## 2.4. Autres Méthodes

### 2.4.1. Hybridation *in situ* (ISH) (AFSSA Brest)

La méthode adaptée à la détection du nodavirus sur sections de tissus (cerveau et rétine) de bar, est relativement "lourde" et ne paraît pas plus sensible que l'histo-immunochimie. Cette technique sera difficile à adapter au diagnostic de routine.

## 3. Etude épidémiologique

### 3.1. Chez les alevins et les juvéniles (AFSSA Brest)

Un modèle de transmission expérimentale de la nodaviose chez le bar par injection intramusculaire et balnéation.

L'injection d'une dose de  $10^3$  à  $10^4$  PFU/poisson permet d'obtenir la DL50. La DL50 n'est jamais atteinte par bain.

Par ailleurs, les voies de pénétration et la progression du virus dans l'hôte ont été étudiées.

Péducasse S., Boscher S., Le Ven A., Baudin Laurencin F. 1999. Study of portals of entry and progression for nodavirus in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. IX<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999, (communication orale –136, annexe 10)

Péducasse S., Castric J., Thiéry R., Jeffroy J., Le Ven A., Baudin Laurencin F., 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass. *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Dis. Aquat. Org.*, 36(1), 11-20. (annexe 11)

Péducasse S. & Quentel C. 2000. Etudes des voies de pénétration et du tropisme du nodavirus chez le bar *dicentrarchus labrax* : une étude virologique. *Virologie*, 2èmes journées francophone de virologie, 4 (2), 149. (poster, annexe 12)

Un isolat de nodavirus isolé de daurades asymptomatiques (génotype Sb2) a été démontré pathogène pour le bar. Les daurades porteuses asymptomatiques peuvent transmettre la nodaviose à des bars sains placés en contact.

Castric J, Thiéry R, Jeffroy J, de Kinkelin P, Raymond JC. 2001. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus.. *Dis Aquat Organ.* 47(1):33-38. (annexe 13)

Des essais de transmission expérimentale du génotype Sb2 montrent la sensibilité du turbot à la nodavirose.

Boscher S., Péducasse S. Quentel C. 2001. Experimental nodavirus transmission trials to juvenile turbot *Scophthalmus* : comparison with juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. 10<sup>th</sup> international conference of the EAAP, Dublin, Irlande, 9-14 septembre 2001. (Poster-233, annexe 14)

De même, différents isolats de génotype Sb1 se sont également révélés pathogènes pour le turbot à basse température (Castric et al, non publié).

### **3.2. Chez les géniteurs et les larves (IFREMER Palavas)**

La période optimale pour le screening des reproducteurs se situe en Août-Septembre.

Les premiers résultats sérologiques indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les proportions de poissons séropositifs trouvés dans les installations de Palavas et dans le milieu naturel

#### **3.2.1. Chez les poissons séronégatif**

Aucun virus n'a été détecté (PCR, ELISA et Cultures cellulaires) dans les biopsies des femelles séronégatives et leurs larves n'ont développé aucun symptôme.

**La pathogénicité** des différents isolats de nodavirus a été étudiée chez le bar adulte et les larves. La différence entre les deux souches Sb1 (origine Atlantique) et Sb2 (origine Méditerranée) se confirme. La souche Atlantique est plus pathogène que la souche Méditerranéenne chez les larves (infections au stade ovocyte) alors que le phénomène inverse est observé chez les juvéniles et les poissons en grossissement. Ici, le facteur température de l'eau de mer doit avoir un rôle. Les géniteurs n'ont jamais développé la maladie après infection expérimentale avec ces deux souches virales.

**La transmission verticale** du virus de la mère aux œufs a été expérimentalement démontrée après inoculation des reproducteurs avec la souche Sb1 (et non avec Sb2). Le virus peut être détecté par RT-PCR ou ELISA au moment de la ponte (ovules), juste avant (stade ovocyte mûre) ou après (œuf fécondé) fécondation. Les larves issues de ces géniteurs développent des lésions virales caractéristiques au niveau du cerveau et visibles en histologie au 14<sup>ème</sup> jour d'élevage.

#### **3.2.2. Chez les poissons séropositifs**

Les biopsies ovariennes étaient négatives en cultures cellulaires. Par contre, du virus a été détecté par RT-PCR (AFSSA Brest) et ELISA dans deux échantillons. Les recherches de nodavirus par ELISA ou HI sur les larves issues de ces échantillons ont été négatives.

**Le dépistage chez les reproducteurs** : Cette expérimentation qui est *la première preuve expérimentale d'une transmission verticale du nodavirus chez les poissons*

*marins*, a permis de constater qu'aucune des techniques de dépistage direct du virus actuellement disponibles (RT-PCR ou ELISA antigène) ne permet de détecter la présence de virus dans les différentes biopsies ovariennes effectuées *avant* la ponte. Ce résultat met en doute l'efficacité d'un dépistage précoce de l'agent pathogène chez les reproducteurs de bar par ces différentes techniques. En l'état actuel, la détection des anticorps par analyse sérologique semble la seule méthode efficace pour constituer des lots de géniteurs de bar indemnes de virus.

Breuil, G., R. Thiery, J.-F. Pépin, J.-P. Blancheton 2001. The control of nodavirus disease in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from breeder to commercial size : toward a new approach of organic aquaculture. *Aquaculture interchange program (AIP) workshop, biosecurity in aquaculture production systems : exclusion of pathogens and other undesirables, 23-26 July, 2001, Honolulu, Hawaii (USA)*. IFREMER, Palavas-les-Flots. (annexe 15)

Breuil, G., J.-F. Pépin, O. Mouchel, C. Fauvel, R. Thiery. 2001. Experimental vertical transmission of nodavirus from mother to eggs and larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *10th International conference of the EAFP, 9th-14th September, 2001, Dublin*. (Communication orale 119, annexe 16)

### **3.2.1.1. Etablissement d'un modèle de transmission horizontale aux œufs et aux larves**

La contamination virale peut être effectuée, soit précocement au moment de la fécondation, soit plus tardivement, au stade L4 (larves 4 jours post éclosion)

La souche Sb1 (origine Atlantique) semble bien plus pathogène que la souche Sb2 pour les larves. L'existence d'une pathogénicité thermodépendante différente entre les souches Sb1 et Sb2 semble confirmée.

Breuil G, Mouchel O, Fauvel C & Pepin JF. 2001. Sea bass, *Dicentrarchus labrax*, nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Dis. Aquat. Org.* **43**, 25-31. (annexe 17)

### **3.2.2.2. Réponse immunitaire des reproducteurs et établissement d'un modèle de transmission verticale a été démontré pour Sb1**

Breuil G., J.-F. Pépin, S. Boscher & R. Thiery . Experimental vertical transmission of nodavirus from mother to eggs and larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). (in press, J.Fish Dis. annexe 18)

## **3.3. Etude sur le terrain (SFAM – AFSSA Brest)**

L'enquête effectuée en 1999, la première à être réalisée sur cette maladie à l'échelle d'un pays, apporte aux aquaculteurs français de poissons marins des informations utiles qui doivent leur permettre d'orienter et d'optimiser rapidement les investigations et les recherches portant sur la nodaviose :

Elles ont montré la présence de nodavirus ou de matériel viral dans 20,4% des échantillons étudiés et que 50% des écloséries et 20% des fermes de grossissement étudiées en 1999 étaient contaminées.

Au total le nodavirus a été mis en évidence (par culture cellulaire ou RT-PCR) dans 28,4% des sites.

Sur les 887 sérums de bars analysés, 89,52 % sont dépourvus d'anticorps anti-nodavirus (ELISA AFSSA).

Le nombre de sites ayant des poissons porteurs d'anticorps est relativement élevé, 21/31, soit 67,7 % des sites.

Dans ces sites, le pourcentage d'animaux présentant des anticorps varie de 2 à 83 %.

En 2000/2001, la recherche d'anticorps anti-nodavirus a été effectuée sur l'ensemble des géniteurs de trois écloséries, soit 1920 bars. L'étude n'a pas pu être réalisée sur toutes les écloséries du fait du non-marquage individuel des poissons par les éleveurs.

L'enquête virologique de 1999 ayant mis en évidence la présence de 2 génotypes viraux dans les élevages, et bien que les anticorps produits chez des animaux infectés par un génotype donné reconnaissent le second génotype, un cocktail viral composé de Sb1 et Sb2 a été utilisé, afin d'améliorer la sensibilité de la technique ELISA, 93% des animaux ne présentent pas d'anticorps anti-nodavirus sériques.

## 4. Vaccins et vaccination

### 4.1. Vaccin recombinant (AFSSA Brest)

Différentes constructions moléculaires (plasmides) ont été réalisées. Le principe repose sur l'expression du gène codant la protéine de capsid virale dans les cellules musculaires de poisson après injection (vaccination ADN). La protéine synthétisée *in vivo* doit ensuite induire la synthèse d'anticorps protecteurs contre le nodavirus par le poisson vacciné.

Après injection de plasmides la présence d'ARN viral néo-synthétisé au niveau des cellules musculaires de bar été démontrée.

Boscher S., Thiéry R. , 1999.

Expression du gène de la protéine de capsid du nodavirus du bar (*Dicentrarchus labrax*) après injection intramusculaire d'un plasmide recombinant à des bars juvéniles. 2èmes journées francophones de virologie

Virologie, 3(2), 179. (poster, annexe 19)

Des expériences de transfection *in vitro* de cellules sensibles au nodavirus, par ces différentes constructions moléculaires, ont montré que celles ci permettent la synthèse de la protéine de capsid du nodavirus dans les cellules de poissons (non publié).



Différents essais ont été réalisés dans le but d'évaluer ces candidats vaccins en terme de protection vis à vis de la nodaviriose chez le bar. Aucune protection n'a put être mise en évidence.

Essais de vaccination contre la nodaviriose. 2002. Rapport interne AFSSA site de Brest (annexe 20)

Dans le but de produire une protéine recombinante, différentes constructions de plasmides ont été réalisées. Celles ci doivent permettre la synthèse et la production de la protéine de capsid du nodavirus par les cellules bactériennes (*E. coli*). Les constructions sont disponibles, il reste à produire les protéines recombinantes et à tester leur pouvoir immunogène et protecteur.

En outre, différents essais d'inactivation du nodavirus (chaleur, traitements chimiques) n'ont pas permis l'obtention d'un candidat vaccin tué efficace et présentant une innocuité suffisante. (Boscher et al, non publié).

## **4.2. Peptides de synthèse (IFREMER Palavas)**

Six peptides ont été testés, quatre issus de la lignée Sb1 et 2 de la lignée Sb2. Ils correspondant aux extrémités C et N terminales (C-ter, N-ter) de ces 2 lignées et à 2 boucles potentiellement externes du Sb1.

2 voies ont été explorées

- Epreuve vaccinale après injection de peptides synthétiques

- La recherche de sites potentiellement protecteur par la méthode des membranes « peptide-spot »

### **4.2.1. Epreuve vaccinale après injection de peptides synthétiques**

Tous ces peptides, liés à la KLH comme protéine porteuse, sont immunogènes. Le manque d'immunogénicité du N-ter avait pour origine une surévaluation statistique de la liaison du peptide à la KLH. Des mesures analytiques ont éliminé ce problème.

Les anticorps générés par les 2 boucles ne reconnaissent pas le nodavirus. Et un tiers environ (27 à 38%) des poissons injectés avec une des extrémités (Cter ou Nter) reconnaissent le nodavirus.

La protection a été étudiée par injection du Sb2 car le Sb1 n'entraîne aucun symptômes ni mortalité chez les adultes ou chez les alevins. La pré-étude faite en 99 permettait de penser que le N-ter du Sb1 était potentiellement protecteur contre le Sb2 mais ces résultats n'ont pas été confirmés en 2001 par l'injection du N-ter du Sb2 théoriquement plus efficace car de séquence identique au virus utilisé.

Par contre la diminution (non significative) de la mortalité constatée avec le C-ter du Sb1(98) a été confirmée avec le C-ter du Sb2 (2001). Les conditions de l'étude de 2001 étaient plus rigoureuses (triplicat), plus proche de la réalité (poisson de 10g) et l'évaluation de la protection portait sur la mortalité et la morbidité (nombre de malade). La morbidité est significativement diminuée par le C-ter du Sb2. Le C-ter du Sb2 semble être un candidat potentiel pour un vaccin.

Les vaccins issus de virus Sb1 ou Sb2 inactivés par la chaleur sont immunogènes et semblent conférer une protection variable mais réelle qui pourrait être liée à un reliquat de virulence, entraînant une sélection des résistants au challenge plutôt

qu'une vaccination. Ce type de vaccin pourrait présenter des risques de développement de la maladie.

L'étude comparative (culture de cellule, histochimie, immunohistochimie, ELISA) des cerveaux des survivants et des morts a montré différents états de contamination, allant de la simple présence de protéine virale à l'existence de vacuoles contenant du virus vivant.

En marge de ces travaux, il a été observé que le stress accélérât la mortalité mais n'en modifiait pas son taux à terme. Il a aussi été constaté qu'un pourcentage variable et parfois important des poissons testés possédaient "naturellement" des anticorps anti-KLH, éclairant l'importance du choix de la protéine porteuse.

Coeurdacier Jean-Luc, Laporte Florent, Pepin Jean-François 1999

Preliminary study of immunogenicity and protection against nodavirus following injection of synthetic peptides from its capsid protein. Présentation orale au colloque de L'EAFP du 20 au 24 septembre 1999 à Rhodes. (annexe 21)

Coeurdacier Jean-Luc, Laporte Florent, Pepin Jean-François

Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy (*fish and shellfish immunol, in press*, annexe 22)

Coeurdacier Jean-Luc,

La vaccination potentielle contre le nodavirus par un peptide de sa capsid (2002). Présentation orale Journées du SFAM 18-22 février, Montpellier. (annexe 23)

#### **4.2.2. La recherche de sites potentiellement protecteur par la méthode des membranes « peptide-Spot »**

La recherche de sites potentiellement protecteur par la méthode des membranes « peptide-Spot » a permis de confirmer les différences de structure entre les deux souches (Sb1 et Sb2) mais n'a pas permis d'identifier de nouveaux sites potentiellement protecteurs. La difficulté d'extrapoler ce type d'analyse, basé sur la conformation des protéines du modèle mammifère, au modèle poisson, reste le handicap majeur pour le développement de cette technique.

Coeurdacier Jean-Luc,

The use of spot-synthesis technique to investigate nodavirus RNA2 protein sites recognised by serum from nodavirus challenged sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Présentation orale au colloque de L'EAFP du 9-14 septembre Dublin (Poster.020, annexe 24)

Coeurdacier Jean-Luc

Adaptation de la méthode peptide-spot à la recherche de sites de la protéine RNA2 du nodavirus reconnus par des sérums de loup (*Dicentrarchus labrax*) ayant survécus à l'injection de ce virus vivant (Rapport interne annexe 25)

## **5. Désinfection inactivation de virus**

Les différents travaux ont montré la grande résistance du virus aux agents physiques, chimiques, à la congélation, à la chaleur et au temps (stockage).

Péducasse S. 2000. Caractérisation du nodavirus, pathogénie et épidémiologie expérimentale de la nodaviriose ou de l'encéphalopathie et rétinopathie virale chez le bar juvénile *Dicentrarchus labrax* L. Thèse de doctorat de l'université de Montpellier II. (annexe 26)

Péducasse S., Castric J., & Baudin Laurencin F. Physical and chemical inactivation of sea bass nodavirus on SSN1 cell line. Colloque de L'EAFP du 20 au 24 septembre 1999 à Rhodes. (poster 172, annexe 27)

## 6. Tableau et figures

Table I : Isolats de Nodavirus (Afssa Brest)

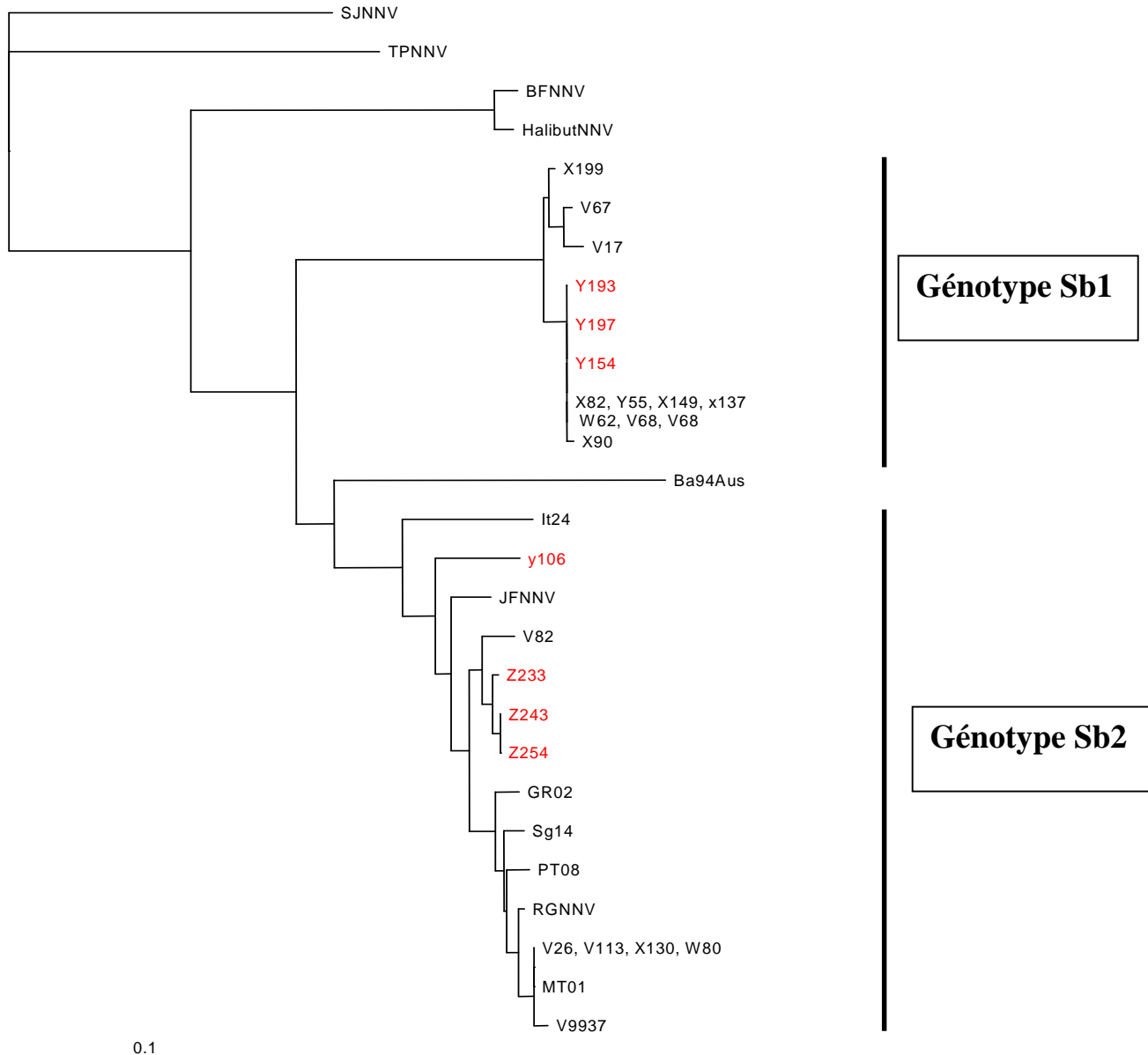
Isolats	Origine	Espèce	Date
V17 (Sb1)	France - Côte atlantique	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1991
V26 (Sb2)	France – Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1996
V67	France – Côte atlantique	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1995
V68	France – Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1997
V69	France – Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1997
W 62	France – Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1996
V 82	Tunisie	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1992
W 80	France - Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1998
V113	France - Côte Méditerranéenne	<i>Sparus aurata</i>	1997
X 82	France – Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1999
X 90	France – Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1999
X 130	France – Côte Méditerranéenne	<i>Siaena aquila</i>	1999
X 137	France - Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1999
X 149	France – Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1999
X 199	France – Côte Méditerranéenne	<i>Sciaena aquila</i>	1999
Mt/01/Sba* *	Malte	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1994
Gr/02/Sba* *	Grèce	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1995

<b>Pt/08/Sba*</b> *	Portugal	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>1995</b>
<b>Y55</b>	France - Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>2000</b>
<b>Y153</b>	France - Côte Méditerranéenne	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>2000</b>
<b>Y154</b>	France - Côte Méditerranéenne	<i>Sciaena aquila</i>	<b>2000</b>
<b>V9937 **</b>	UK	<i>Scophthalmus maximus</i>	<b>1999</b>
<b>It/24/ Uci</b> **	Italie	<i>Umbrina cirrosa</i>	<b>1999</b>
<b>Sg/14/Sba*</b> *	Singapour	<i>Lates calcarifer</i>	<b>1996</b>
<b>Y106</b>	France – outre mer	<i>Lates calcarifer</i>	<b>2000</b>
<b>Y193</b>	France	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>2000</b>
<b>Y197</b>	France	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>2000</b>
<b>Y220</b>	France	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>2000</b>
<b>Y225</b>	France	<i>Sciaena aquila</i>	<b>2000</b>
<b>Z232 *</b>	France- outre mer	<i>Acanthurus triostegus</i>	<b>2001</b>
<b>Z233 *</b>	France- outre mer	<i>Acanthurus triostegus</i>	<b>2001</b>
<b>Z243 *</b>	France- outre mer	<i>Apogon exostigma</i>	<b>2001</b>
<b>Z249 *</b>	France- outre mer	<i>Z. scopas</i>	<b>2001</b>
<b>Z250 *</b>	France- outre mer	<i>A. triostegus</i>	<b>2001</b>
<b>Z251 *</b>	France- outre mer	<i>A. lineatus</i>	<b>2001</b>
<b>Z252 *</b>	France- outre mer	<i>V. strigata</i>	<b>2001</b>
<b>Z254 *</b>	France- outre mer	<i>Apogon exostigma</i>	<b>2001</b>
<b>Z256 *</b>	France- outre mer	<i>C. flavissimus</i>	<b>2001</b>
<b>Z257 *</b>	France- outre mer	<i>D.trimatilacus</i>	<b>2001</b>
<b>Z271 *</b>	France	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>2001</b>
<b>Z279 *</b>	France	<i>Umbrina cirrosa</i>	<b>1996</b>
<b>Z298 *</b>	France	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<b>2001</b>

\* Isolés en 2001

\*\* Origine: Université de Stirling (Ecosse).

**Figure 1.** Phylogénie moléculaire des isolats de nodavirus. Analyse effectuée d'après la séquence nucléotidique de la partie variable de la protéine de capsid. La position d'isolats dont la séquence est disponible dans la littérature est indiquée (RGNNV, SBNNV, JFNNV, TPNNV, Halibut NNV). Les isolats étudiés en 2001 sont indiqués en rouge.



## ***IV. Démarches dans un but de valorisation des résultats***

Différentes démarches de valorisation des résultats scientifiques obtenus ont été entreprises au cours du programme (Intervet) et surtout en fin de programme.

### ***IV. A . Démarches de valorisation auprès des entreprises***

Elles ont consistées en :

- Une prospection téléphonique
- Un envoi de mails ou courrier
- une conversation téléphonique ou une visite sur place
- l'envoi ou présentation d'un résumé des résultats et des publications consultables (§ IV.B.)
- Une reprise de contacts téléphoniques

Parallèlement une démarche d'offre de technologie par le canal du CRI a été entreprise (§ V.D.)

Les méthodes de diagnostic ELISA ou/et PCR intéressent les « valorisateurs » potentiels. L'aspect vaccination leurs semble intéressant, mais peu porteur à cours terme, la tendance étant plutôt de rechercher de produire des animaux indemnes que de vacciner, surtout dans un contexte de transfert d'animaux vivants qui s'internationalise de plus en plus.

Le principal obstacle semble être la méconnaissance du marché et l'impossibilité d'utiliser les outils ou les filières, que ces sociétés maîtrisent, pour pénétrer ce marché.

Entreprises contactées et ayant reçu un résumé de résultats

- Société Adiagene Saint Briec § IV.C.a
- Société Covalab Lyon § IV.C.b
- Société Bioenvirotech Marseille § IV.C.c
- Institut Pourquoi Montpellier § IV.C.d
- Société Kurios Libourne § IV.C.e
- Société Intervet : Boxmeer The netherlands § IV.C.f
- Société Aquastream Ploemeur § IV.C.g

## ***IV. B. Résumé des résultats potentiellement valorisables***

Ce résumé a été envoyé aux entreprises contactées. Il reprend essentiellement les résultats du rapport scientifique (§ III) mais il s'en différencie sur plusieurs points :

- Seuls sont cités les résultats ou travaux potentiellement valorisables
- La majorité des résultats cités sont issus du contrat ANVAR mais apparaissent aussi d'autres travaux menés parallèlement ou plus anciens.
- Certaines références ne sont pas issues de nos travaux mais présentent des résultats similaires. Ils permettent de donner une idée de nos travaux sans entacher une possibilité de protection ultérieure.

### **1. Structure et propriétés du virus (AFSSA Brest)**

Il a été montré qu'au moins deux souches différentes de nodavirus peuvent infecter le bar *Dicentrarchus labrax*.

Thiéry R., Arnauld C., Delsert C., 1999.  
Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes.  
J. Fish Dis., 22, 201-207.

Thiéry R., Arnauld C., Delsert C., 1999.  
Mise en évidence de deux génotypes distincts du nodavirus du bar (*Dicentrarchus labrax*).  
Virologie, 3(2), 181.

### **2. Mise au point des moyens de diagnostic**

#### **2.1. PCR (AFSSA Brest)**

Un protocole de RT-PCR (voir Thiéry *et al* 99 ci dessus) permet de réaliser les étapes de transcription inverse et de PCR dans le même tube sans interruption du programme (RT-PCR ininterrompue, non publié) Un protocole de nested-PCR a été élaboré.

Thiéry R., Raymond J.C., Castric J., 1999.  
Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax* : study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction  
Virus Research, 63, 11-17.

Thiéry R. 1999.  
Nodavirus characterisation and diagnostic tools

IX<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999 (Communication orale).

Thiéry, R. Arnauld, C. Boscher, S. Castric, J. 1999  
Genotyping of nodavirus isolates from sea bass *Dicentrarchus labrax*:  
implication on PCR-based diagnosis IX<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999, P-148.

Thiéry R., Raymond J.C., Castric J., 1999  
Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax* :.study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Research*, 63, 11-17.

## **2.2. CULTURE CELLULAIRE (AFSSA Brest)**

Les techniques permettant la production et la recherche de nodavirus dans les tissus ont été mises au point

## **2.3. ELISA**

### **2.3.1. Mise au point d'un ELISA pour la détection dans le sérum des anticorps spécifiques du nodavirus**

Deux méthodes l'une a l'aide d'un polyclonal lapin (AFSSA ), l'autre à l'aide d'un monoclonal

Breuil, G. & Romestand, B. 1999. A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application in the screening of spawners in sea bass hatchery. *Journal of Fish Disease* **22**: 45-52.

Breuil G, Pépin JF, Castric J, Fauvel C & Thiery R. 2000. Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of the broodstock in sea bass hatcheries. *Bull Europ. Assoc. Fish. Pathol.* **20**, 95-100.

### **2.3.2. Mise au point d'un ELISA pour la détection d'antigène viral. (IFREMER Palavas)**

Détecter la présence de nodavirus dans des échantillons de larves ou dans des biopsies ovariennes. Cette technique présente l'avantage d'être rapide (24 h), facile à mettre en œuvre pour de nombreux échantillons et très économique

Breuil G., Mouchel O. and Pepin J.F. 2001 A sandwich ELISA to detect Nodavirus in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Disease of Aquatic Organisms* **43**, 25-31.



## 2.4. Autres Méthodes

### 2.4.1. Hybridation in situ (ISH) (AFSSA Brest)

La méthode adaptée à la détection du nodavirus sur sections de tissus (cerveau et rétine) de bar Cette technique relativement "lourde" sera difficile à adapter au diagnostic de routine

### 2.4.2. Production d'anticorps et d'IgG de lapin (IFREMER Palavas)

### 2.4.3. Des Anticorps Monoclonaux anti-Noda ont été produits (covalab)

## 3. Etude épidémiologique

### 3.1. Chez les alevins et les juvéniles (AFSSA Brest)

Un modèle de transmission expérimentale de la nodavirose chez le bar par injection intramusculaire et balnéation.

L'injection d'une dose de  $10^3$  à  $10^4$  PFU/poisson permet d'obtenir la DL50. Par bain on n'atteint jamais la DL50.

Par ailleurs, les voies de pénétration et la progression du virus dans l'hôte ont été étudiées.

Péducasse S., Boscher S., Le Ven A., Baudin Laurencin F. 1999. Study of portals of entry and progression for nodavirus in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. IX<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999, O-136.

Péducasse S., Castric J., Thiéry R., Jeffroy J., Le Ven A., Baudin Laurencin F., 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. Dis. Aquat. Org., 36(1), 11-20.

### 3.2. Chez les géniteurs et les larves (IFREMER Palavas)

La période optimale pour le screening des reproducteurs se situe en Août-Septembre.

Les premiers résultats sérologiques indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les proportions de poissons séropositifs trouvés dans les installations de Palavas et dans le milieu naturel

#### 3.2.1. Chez les poissons séronégatif

Aucun virus n'a été détecté (PCR, ELISA et Cultures cellulaires) dans les biopsies des femelles et leurs larves n'ont développé aucun symptôme

### 3.2.2. Chez les poissons séropositifs

Les biopsies ovariennes étaient négatives en cultures cellulaires. Par contre, du virus a été détecté par RT-PCR (AFSSA Brest) et ELISA dans deux échantillons. Les recherches de nodavirus par ELISA ou HI dans leurs larves ont été négatives.

Breuil, G., R. Thiery, J.-F. Pépin, J.-P. Blancheton 2001. The control of nodavirus disease in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from breeder to commercial size : toward a new approach of organic aquaculture. *Aquaculture interchange program (AIP) workshop, biosecurity in aquaculture production systems : exclusion of pathogens and other undesirables, 23-26 July, 2001, Honolulu, Hawaii (USA)*. IFREMER, Palavas-les-Flots, 26 p.

Breuil, G., J.-F. Pépin, O. Mouchel, C. Fauvel, R. Thiery. 2001. Experimental vertical transmission of nodavirus from mother to eggs and larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *10th International conference of the EAAP, 9th-14th September, 2001, Dublin "Diseases of fish and shellfish"* abstract book. European association of fish pathologists, Aberdeen, Scotland, p. 0-119

#### 3.2.1. Etablissement d'un modèle de transmission horizontale aux œufs et aux larves

La contamination virale peut être effectuée soit plus précocement au moment de la fertilisation soit plus tardivement, au stade L4

La souche Sb1 (origine Atlantique) semble plus pathogène que la souche Sb2 pour les larves L'existence d'une pathogénicité thermodépendante différente entre les souches Sb1 et Sb2

Breuil G, Mouchel O, Fauvel C & Pepin JF. 2001. Sea bass, *Dicentrarchus labrax*, nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Dis. Aquat. Org.* **43**, 25-31.

#### 3.2.2. Réponse immunitaire des reproducteurs et établissement d'un modèle de transmission verticale a été démontré pour Sb1

Breuil G., J.-F. Pépin, S. Boscher & R. Thiery . Experimental vertical transmission of nodavirus from mother to eggs and larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). (Submitted J.Fish Dis.)

### 3.3. Etude sur le terrain (SFAM – AFSSA Brest)

Cette enquête, la première à être réalisée sur cette maladie à l'échelle d'un pays, apporte aux aquaculteurs français de poissons marins des informations utiles qui doivent leur permettre d'orienter et d'optimiser rapidement les investigations et les recherches portant sur la nodavirose.

Présence de nodavirus ou de matériel viral a été mise en évidence. dans 20,4% des échantillons

89,52 % de la population(900) examinée est dépourvus d'anticorps anti-nodavirus.

Le nombre de sites ayant des poissons porteurs d'anticorps (67,7 % )  
 Dans ces sites, le pourcentage d'animaux présentant des anticorps varie de 2 à 83 %.

Il faut également remarquer que les plus forts pourcentages d'animaux positifs se trouvent dans des sites où le virus n'a pas été détecté.

## 4. Vaccins et vaccination

### 4.1. Vaccin recombinant (AFSSA Brest)

Après injection de plasmides la présence d'ARN viral néo-synthétisé au niveau des cellules musculaires a été démontrée mais aucune protection n'a pu être mise en évidence. Dans le but de produire une protéine recombinante différentes constructions de plasmides ont été réalisées.

Boscher S., Thiéry R. , 1999.

Expression du gène de la protéine de capsid du nodavirus du bar (*Dicentrarchus labrax*) après injection intramusculaire d'un plasmide recombinant à des bars juvéniles.

Virologie, 3(2), 179.

### 4.2. Peptides de synthèse (IFREMER Palavas)

Quatre peptides ont été testés:

-Le C-ter semble être un candidat potentiel.(non publié)

-Malgré son caractère immunogène la protection contre le virus par le N-ter n'a pu être confirmée

-Les peptides issus des 2 boucles internes ne sont ni protecteurs ni immunogènes

-La mortalité des poissons vaccinés semble se concentrer en début d'infection

-Les vaccins issus de virus Sb1 ou Sb2 inactivés/chaleur sont immunogènes et semblent conférer une protection variable selon les essais. Ce type de vaccin peut présenter des risques de développement de la maladie (non publié).

Coeurdacier Jean-Luc, Laporte Florent, Pepin Jean-François 1999

"Preliminary study of immunogenicity and protection against nodavirus following injection of synthetic peptides from its capsid protein." Présentation orale au colloque de L'EAFP du 20 au 24 septembre 1999 à Rhodes.

Coeurdacier Jean-Luc, Laporte Florent, Pepin Jean-François

Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy (*fish and shellfish immunol, submitted*)

## 5. Désinfection inactivation de virus

Les différents travaux ont montré la grande résistance du virus aux agents physiques, chimiques, à la congélation, à la chaleur et au temps.

Frerichs GN, Tweedie A, Starkey WG, Richards RH. 2000  
Temperature, pH and electrolyte sensitivity, heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 185, 13-24.

## ***IV.C. Sociétés contactées***

### ***IV.C.a. Société Adiagene Saint Brieuc***

Cette société est intéressée par le diagnostic PCR. Depuis l'envoi du résumé des résultats et des courriers, la société Adiagène à présenter ce projet à AES ( groupe de laboratoires). Ils semblent intéressés par le diagnostic PCR.

La question de la brevetabilité des amorces se pose, surtout si leurs séquences ont déjà été publiées.

Monsieur,

Comme convenu ce jour avec votre collaboratrice je vous communique en quelques mots le but de ma démarche.

Le nodavirus est l'agent responsable de l'encéphalite spongiforme qui affectant le loup (Bar). Ces dernières années cette maladie a provoqué, tant en France qu'à l'étranger, des pertes importantes dans les élevages de loups. Nous savons maintenant qu'elle touche de nombreuses espèces sous toutes les latitudes. Cette menace pèse tant sur les espèces actuellement élevées que sur celles qui devraient l'être dans un proche avenir.

L'IFREMER en collaboration avec d'autres équipes et notamment dans le cadre d'un contrat ANVAR, a travaillé sur les processus de transmission, les différentes méthodes de diagnostics et les vaccins relatifs au nodavirus.

Les travaux sur la vaccination ont porté sur les virus tués, les protéines recombinantes, l'injection de plasmides et peptides synthétiques. Certains de ces résultats sont prometteurs mais j'ignore s'ils rentrent dans le champ de vos activités.

Vous seriez peut-être intéressé par la valorisation des différentes méthodes de diagnostic (ELISA anticorps, ELISA antigène, PCR...) d'autant qu'elles ont été comparées et validées entre elles.

D'autres résultats, s'ils ne sont pas exploitables directement éclairent d'un jour différent la vision que nous avons de ce problème et permettraient de mieux valoriser l'usage des ces diagnostics.

Je souhaiterais discuter avec vous, des prolongements possibles de ces travaux dans votre secteur d'activité.

Dans l'attente de vous avoir au téléphone, je vous prie de croire, Monsieur, à l'expression de mes salutations distinguées

#### ***IV.C.b. Société Covalab Lyon***

Nous travaillons avec cette société sur d'autres programmes.

Cette société travail surtout sur le problème humain et serait éventuellement intéressée si ces thèmes ou méthodes appliqués poisson avaient des liens potentiels avec la santé humaine

Monsieur,

Vous collaborer avec l'équipe d'IFREMER-Palavas depuis quelques temps et vous êtes, du moins partiellement, au courant de nos différents travaux sur le Nodavirus. Comme convenu la semaine dernière avec votre collaboratrice je vous communique en quelques mots le but de ma démarche.

L'IFREMER en collaboration avec d'autres équipes, a travaillé sur les processus de transmission, les différentes méthodes de diagnostics et les vaccins relatifs au nodavirus responsable de l'encéphalite spongiforme affectant de nombreuses espèces de poissons.

Les travaux sur la vaccination ont porté sur les virus tués, les protéines recombinantes, l'injection de plasmides et peptides synthétiques. Même si certains de ces résultats sont prometteurs je pense que ce domaine ne rentre pas dans le champ de vos activités, mais je me trompe peut-être.

Par contre vous seriez peut-être intéressé par la valorisation des différentes méthodes de diagnostic (ELISA anticorps, ELISA antigène, PCR...) d'autant qu'elles ont été comparées et validées entre elles.

D'autres résultats, s'ils ne sont pas exploitables directement éclairent d'un jour différent la vision que nous avons de ce problème et permettraient de mieux valoriser l'usage des ces diagnostics.

Je souhaiterais discuter avec vous des prolongements possibles de ces travaux dans votre secteur d'activité.

Je vous téléphonerai dans la semaine, en attendant, je vous prie de croire, Monsieur, à expression de mes salutations distinguées

#### ***IV.C.c Société Bioenvirotech Marseille***

Cette société commercialise le monoclonal anti IgM de loup que nous avons produit et qui sert dans les ELISA dosant la séropositivité du loup (nodavirus, KLH, peptide et éventuellement toute autre maladie du loup). Il avait été envisagé (1997) de mettre au point un Kit « Multi séropositivité » dont le Noda. A l'époque, le point d'achoppement était la production fiable d'antigène de nodavirus. Actuellement nous les produisons par culture cellulaire et éventuellement par chimie ( Peptides). Cette société semble travailler à façon, nous ignorons si elle possède son propre réseau commercial

Monsieur ,

Vous avez collaboré avec l'équipe d'IFREMER-Palavas il y a quelques années et vous êtes, du moins partiellement, au courant de nos différents travaux sur le Nodavirus. Comme convenu, ce jour, avec votre collaboratrice je vous communique en quelques mots le but de ma démarche.

L'IFREMER en collaboration avec d'autres équipes, a travaillé sur les processus de transmission, les différentes méthodes de diagnostics et les vaccins relatifs au nodavirus responsable de l'encéphalite spongiforme affectant de nombreuses espèces de poissons.

Les travaux sur la vaccination ont porté sur les virus tués, les protéines recombinantes, l'injection de plasmides et peptides synthétiques. Même si certains de ces résultats sont prometteurs et si ma mémoire est bonne, ce domaine ne rentrait pas dans le champ de vos activités, mais je cela a peut-être changé.

Par contre vous seriez peut-être intéressé par la valorisation des différentes méthodes de diagnostic (ELISA anticorps, ELISA antigène, PCR...) d'autant qu'elles ont été comparées et validées entre elles.

D'autres résultats, s'ils ne sont pas exploitables directement éclairent d'un jour différent la vision que nous avons de ce problème et permettraient de mieux valoriser l'usage des ces diagnostics.

Je souhaiterais discuter avec vous des prolongements possibles de ces travaux dans votre secteur d'activité.

En attendant de vous avoir au téléphone, je vous prie de croire, Monsieur, à l'expression de mes meilleurs souvenirs

#### ***IV.C.d. Institut Pourquoi Montpellier***

Le laboratoire Pourquoi est intéressé par la production de kits ELISA. Ce laboratoire a déjà développé un kit de diagnostic crevette issu de la DRIM à Montpellier (Unité mixte Université, IFREMER, CNRS). Cet établissement se dit tout à fait compétent pour transformer nos méthodes de laboratoire en kit utilisable en routine. Mais il ne s'estime pas compétent pour sa commercialisation.

Monsieur,

Comme convenu la semaine dernière avec votre collaboratrice je vous communique en quelques mots le but de ma démarche.

Le nodavirus agent responsable de l'encéphalite spongiforme qui affectant le loup (Bar). Ces dernières années cette maladie à provoquer tant en France qu'a l'étranger de nombreuses pertes dans les élevages de loup et nous savons maintenant qu'elle affecte de nombreuses espèces sous toutes les latitudes. Cette menace pèse sur les espèces élevées mais aussi sur certaines qui le seront dans années avenir.

L'IFREMER en collaboration avec d'autres équipes, a travaillé sur les processus de transmission, les différentes méthodes de diagnostics et les vaccins relatifs au nodavirus agent responsable de l'encéphalite spongiforme qui affectant de nombreuses espèces de poissons et Cette maladie a déjà provoqué de nombreuses pertes dans les élevages de loup (Bar) et nous savons maintenant qu'elle affecte de nombreuses espèces sous toutes les latitudes. Cette menace pèse sur les espèces élevées mais aussi sur certaines qui le seront dans années avenir.

Les travaux sur la vaccination ont porté sur les virus tués, les protéines recombinantes, l'injection de plasmides et peptides synthétiques. Même si certains de ces résultats sont prometteurs je pense que ce domaine ne rentre pas dans le champ de vos activités, mais je me trompe peut-être.

Par contre vous seriez peut-être intéressé par la valorisation des différentes méthodes de diagnostic (ELISA anticorps, ELISA antigène, PCR...) d'autant qu'elles ont été comparées et validées entre elles.

D'autres résultats, s'ils ne sont pas exploitables directement éclairent d'un jour différent la vision que nous avons de ce problème et permettraient de mieux valoriser l'usage des ces diagnostics.

Je souhaiterais discuter avec vous des prolongements possibles de ces travaux dans votre secteur d'activité.

Je vous téléphonerai dans la semaine, en attendant, je vous prie de croire, Monsieur, à expression de mes salutations distinguées

#### ***IV.C.e. Société Kurios Libourne***

Spécialisée dans la vaccination animale, nous étions en contact avec cette société dès le début du programme

Pour la vaccination la société Kurios semble intéressée mais se pose toujours la question du marcher potentiel.

Plusieurs éléments semblent montrer que le marcher de la nodavirose du bar est très mal connu (surtout à l'étranger) et vraisemblablement restreint. A ceci s'ajoute que, d'une façon générale, le marché des produits vétérinaires spécifiques au poisson n'est pas potentiellement intéressant pour un industriel. Pour preuve l'arrêt de commercialisation de certain vaccin pour poisson. La seule voie possible d'extension du marché serait l'ouverture vers les pays du Nord de l'Europe dont les élevages (flétan et morue) sont touchés par un nodavirus.

Il faut aussi préciser qu'actuellement il n'existe aucun vaccin peptidique vétérinaire ou humain.

Monsieur

Comme convenu avec votre collaboratrice je vous communique en quelques mots le but de ma démarche.

Nous avons déjà était en contact en 96 (Cf. votre lettre à Antoine Dosdat 17 juin 97)

A cette époque nous projetions de travailler sur les possibilités de vaccination du bar et éventuellement d'autres espèces contre le nodavirus responsable de l'encéphalite spongiforme affectant de nombreuses espèces de poissons.

Ces travaux ont porté sur différentes voies : virus tués, protéines recombinantes, injection de plasmides et peptides synthétiques.

Certains de ces résultats sont prometteurs d'autre s'ils ne sont pas exploitables directement éclairer d'un jour différent la vision que nous avons de ce problème.

Je souhaiterais discuter avec vous des prolongements possibles de ces travaux dans votre secteur d'activité.

Je vous téléphonerai dans la semaine, en attendant, je vous prie de croire, Monsieur, à expression de mes salutations distinguées.





Dear colleagues

Apart our last meeting on Fair project, we discussed two points on nodavirus vaccine: Intervet asked us for supplying them in nodavirus and the three partners work, outside of FAIR project, on this subject.

Intervet

We did not clearly understand if they spoke about project, works in process or nearly finish. It was proposed to contact this company again to know what they did exactly on nodavirus vaccine and to propose them a collaboration rather a simple supplying in virus.

For our works

It was proposed to each partner to write a short summary (double A4) on their vaccine works in process to know the state of art . It will permit to have a better discussion with Intervet and eventually to propose a FAIR programme (new one or continuation of the current one)

Did some body have a new contact with Intervet?

If yes, what new?

If no, who will be in charge of this contact?.

It will be of interest to inform the other partners on our state of art on nodavirus vaccine

I sent last month, to each partner, a rough copy of a publication on peptide vaccines, it would permit to know what we did in Palavas in 1998-99. I can summarise this work and those of 2000-2001.

Please let me know your opinion on this proposal

Sincerely your

***IV.C.g. Société Aquastream Ploemeur***

Intéressé à produire des animaux indemnes de maladie et à mettre en place des procédures dans ce sens

## ***IV.D. Demande auprès du CRI***

### ***Description générale***

#### ***Deadline /date limite***

Durée de validité de l'annonce, maximum 1 an.

#### ***Title /titre***

**ELISA to detect Nodavirus in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*).**

#### ***Abstract /Résumé***

This method is a new process for detection or quantification of nodavirus. This virus is the causative agent of a novel infectious neuropathological condition, characterised a high mortality among larval and juvenile stages of fish. This infection has been occurring with increasing frequency in the marine aquaculture industry during the past few years.

The sandwich ELISA allows to detect the nodavirus in infected larvae and this technique was used in addition to the immunohistochemistry method or the Fluorescent Antibody Technique detection method recommended by the OIE .

This ELISA was performed for two marine species, sea bass and baramundi and on different nodavirus strains. This assay can directly be used for others species that are infected by those three strains or cross-reacting with them; it can be easily extended to other species.

A company, which is interested in this ELISA, is needed to standardise, product and commercialise this technique as a Kit that could be used in routine either in lab or in practical conditions.

#### ***Description / Description***

The fish Nodaviruses are the causative agents of Viral Encephalopathy and Retinopathy responsible of mortalities in larvae and juveniles of several fish species. The causative agents (SJNNV, Striped Jack Nervous Necrosis Virus and FEV, Fish Encephalitis Virus) were isolated and characterized in striped Jack (*Pseudocaranx dentex*) in Japan, in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and in barramundi, (*Lates calcarifer*) in France. Comparable pathological conditions have now also been observed in larval and juvenile forms of many other fish species. The latest findings show that the virus is present in more than 25 fish species.

A sandwich ELISA was achieved to detect, in larvae, nodavirus that is revealed by biotiniled rabbit IgG. It was tested on two nodavirus strains; Sea bass 1 (Sb1) was isolated from sea bass collected in the Atlantic Ocean; and sea bass 2(Sb2) isolated from sea bass collected in the Mediterranean Sea (Sb2) and to a nodavirus isolated from baramundi. The assays can be directly used for species infected by nodavirus that cross-

react with the strain tested and it can be easily extent to other fishes that are infected by other strains but in this case, specific antibodies production will be needed.

### ***Innovative Aspects /Aspects innovants***

The Immunohistochemistry method or the Fluorescent Antibody Technique detection recommended by the OIE needs individual observation of larvae

### ***Main Advantages / Principaux avantages***

This ELISA is less time and money consuming and permits to detect nodavirurs earlier than others techniques. The sample size can be bigger because a pool of larvae are dilacerated and homogenised before testing.

### ***Technology keywords / Mots-clés décrivant la technologie (cf liste)***

Diagnostic, virus

### ***Current Stage of Development / Etat de développement de la technologie***

Development phase  
Available for demonstration

### ***Exploitation of RTD Results / Exploitation de resultats de programmes R&D***

### ***National Programme and FAIR***

### ***Intellectual Property Rights I Propriété intellectuelle***

Will be defined further

### ***IPR Comments /Commentaires sur PI***

### ***Organisation/Company / Nature de l'organisation présentant l'offre***

Research institute

Size /Taille  
>500

### ***Domaines d'application de la technologie***

### ***Application Domains***

AGRICULTURAL AND MARINE RESOURCES AND PRODUCTS  
Food - Agro Industry  
Fisheries, resources of the sea

Veterinary

***Market application keywords / Mots-clés concernant les domaines d'application***

Diagnostic test and equipment, animal husbandry

***Market Applications Highlights / Domaine d'applications commerciales***

Veterinary laboratories, fish farming

***Type de collaboration/Collaboration Type***

Technical cooperation

***Manufacturing agreement***

Commercial agreement with technical assistance

***Informations complémentaires***

***Autres informations***

[www/ifremer.fr](http://www.ifremer.fr)

***Diffusion***

***Distribution List/ Liste de diffusion***

***\* All countries***

*Laboratoire d'Immuno-Pathologie*

*IFREMER*

*Route de Maguelone*

*F 34 250 Palavas les Flots*

*France*

*Phone: 33 4 67 50 41 11 or 00*

*Fax : 33 4 67 68 28 85*

*email:*

*jlcoeurd@ifremer.fr*

*gbreuil@ifremer.fr*

***IV.F Autres pistes de valorisation***

Des démarches sont en cours pour proposer nos résultats à différentes start-up (canadienne notamment).

***V. Choix de la protection***

Il est souhaitable de breveter ce qui peut l'être pour préserver l'avenir car souvent la valorisation ne se fait que plus tard. Une étude de brevetabilité de certains résultats devrait être lancée.

### *Listes des annexes*

annexe 1 page 2

Annexe technique

Contrat ANVAR A9804041J

annexe 2 page13

Thiéry R., Arnauld C., Delsert C., 1999. Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.* 22, 201-207.

<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00164.x>

annexe 3 page21

Thiéry R., Arnauld C., Delsert C., 1999. Mise en évidence de deux génotypes distincts du nodavirus du bar (*Dicentrarchus labrax*). 2èmes journées francophone de virologie, *Virologie*, 3(2), 181. ( poster)

annexe 4 page23

Thiéry R., Raymond J.C., Castric J., 1999. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax* , study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Research*, 63, 11-17.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00053-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00053-2)

annexe 5 page 31

Thiéry R. 1999. Nodavirus characterisation and diagnostic tools

IXth International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999 (Communication orale)

annexe 6 page 34

Thiéry, R. Arnauld, C. Boscher, S. Castric, J. 1999. Genotyping of nodavirus isolates from sea bass *Dicentrarchus labrax*: implication on PCR-based diagnosis IXth International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999, (Poster-148)

annexe 7 page 35

Breuil, G. & Romestand, B. 1999. rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application in the screening of spawners in sea bass hatchery. *Journal of Fish Disease* 22: 45-52.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2761.1999.00136.x/pdf>

annexe 8 page 45

Breuil G, Pépin JF, Castric J, Fauvel C & Thiery R. 2000. Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of the broodstock in sea bass hatcheries. *Bull Europ. Assoc. Fish. Pathol.* 20, 95-100.

annexe 9 page 52

Breuil G., Mouchel O. and Pepin J.F. 2001. A sandwich ELISA to detect Nodavirus in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Disease of Aquatic Organisms* 43, 25-31.  
<http://www.int-res.com/articles/dao/45/d045p025.pdf>

annexe 10 page 60

Péducasse S., Boscher S., Le Ven A., Baudin Laurencin F. 1999. Study of portals of entry and progression for nodavirus in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. IXth International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Rhodes, Grèce, 20-24 septembre 1999,( communication orale –136)

annexe 11 page 62

Péducasse S., Castric J., Thiéry R., Jeffroy J., Le Ven A., Baudin Laurencin F., 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Dis. Aquat. Org.*, 36(1), 11-20.

annexe 12 page 74

Péducasse S. & Quentel C. 2000. Etudes des voies de pénétration et du tropisme du nodavirus chez le bar *dicentrarchus labrax* : une étude virologique. *Virologie*, 2èmes journées francophone de virologie, 4 (2), 149. (poster)

annexe 13 page 76

Castric J, Thiéry R, Jeffroy J, de Kinkelin P, Raymond JC. 2001. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus.. *Dis Aquat Organ.* 47(1):33-38. <http://www.int-res.com/articles/dao/47/d047p033.pdf>.

annexe 14 page 83

Boscher S., Péducasse S. Quentel C. 2001. Experimental nodavirus transmission trials to juvenile turbot *Scophthalmus* : comparison with juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. 10th international conference of the EAAP, Dublin, Irlande, 9-14 septembre 2001. (Poster-233)

annexe 15 page 85

Breuil, G., R. Thiery, J.-F. Pépin, J.-P. Blancheton 2001. The control of nodavirus disease in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from breeder to commercial size : toward a new approach of organic aquaculture. Aquaculture interchange program (AIP) workshop, biosecurity in aquaculture production systems : exclusion of pathogens and other undesirables, 23-26 July, 2001, Honolulu, Hawaii (USA). IFREMER, Palavas-les-Flots.

annexe 16 page 106

Breuil, G., J.-F. Pépin, O. Mouchel, C. Fauvel, R. Thiery. 2001. Experimental vertical transmission of nodavirus from mother to eggs and larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 10th International conference of the EAAP, 9th-14th September, 2001, Dublin "Diseases of fish and shellfish" abstract book. European association of fish pathologists, Aberdeen, Scotland ; (Communication orale 119)

annexe 17 page 108

Breuil G, Mouchel O, Fauvel C & Pepin JF. 2001. Sea bass, *Dicentrarchus labrax*, nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Dis. Aquat. Org.* 43, 25-31.

annexe 18 page 117

Breuil G., J.-F. Pépin, S. Boscher & R. Thiery . Experimental vertical transmission of nodavirus from mother to eggs and larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). (in press, *J.Fish Dis*)

annexe 19 page131

Boscher S., Thiéry R. , 1999. Expression du gène de la protéine de capsid du nodavirus du bar (*Dicentrarchus labrax*) après injection intramusculaire d'un plasmide recombinant à des bars juvéniles. 2èmes journées francophones de virologie *Virologie*, 3(2), 179. (poster)

annexe 20 page133

Essais de vaccins contre la nodavirose. AFSSA Site de Brest  
Rapport interne

annexe 21 page 160

Coeurdacier Jean-Luc, Laporte Florent, Pepin Jean-François. 1999. Preliminary study of immunogenicity and protection against noda virus following injection of synthetic peptides from its capsid protein. Présentation orale au colloque de L'EAFP du 20 au 24 septembre 1999 à Rhodes.

<http://archimer.ifremer.fr/doc/00157/26828/24943.pdf>

annexe 22 page169

Coeurdacier Jean-Luc, Laporte F, Pepin Jean-Francois (2003). Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish And Shellfish Immunology*, 14(5), 435-447.

<http://dx.doi.org/10.1006/fsim.2002.0449>

annexe 23 page 195

Coeurdacier Jean-Luc. 2002.

La vaccination potentielle contre le nodavirus par un peptide de sa capsid. Présentation orale Journées du SFAM 18-22 février, Montpellier.

<https://w3.ifremer.fr/archimer/doc/00157/26832/24949.pdf>

annexe 24 page 200

Coeurdacier Jean-Luc, 2001. The use of spot-synthesis technique to investigate nodavirus RNA2 protein sites recognised by serum from nodavirus challenged sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Présentation orale au colloque de L'EAFP du 9-14 septembre Dublin (Poster.020)

annexe 25 page 202



Coeurdacier Jean-Luc. 2001. Adaptation de la méthode peptide-spot à la recherche de sites de la protéine RNA2 du nodavirus reconnus par des sérums de loup (*Dicentrarchus labrax*) ayant survécus à l'injection de ce virus vivant (Rapport interne)

<http://archimer.ifremer.fr/doc/00157/26810/>

annexe 26 page 240

Péducasse S. 2000. Caractérisation du nodavirus, pathogénie et épidémiologie expérimentale de la nodavirose ou de l'encéphalopathie et rétinopathie virale chez le bar juvénile *Dicentrarchus labrax* L.

Thèse de doctorat de l'université de Montpellier II.

annexe 27 page 242

Péducasse S., Castric J., & Baudin Laurencin F. Physical and chemical inactivation of sea bass nodavirus on SSN1 cell line.

## **VI. Table des Matières**

<b>I. Introduction</b> .....	3
<b>I.A. Le rapport</b> .....	3
<b>I. B. Les annexes</b> .....	4
<b>II. Travaux réalisés en regard des objectifs</b> .....	4
<b>II.A Le bilan</b> .....	4
1. Structure et propriétés du virus .....	4
2. Mise au point des moyens de diagnostic.....	4
3. Etude épidémiologique .....	5
4. Vaccin et vaccination.....	5
5. Désinfection et inactivation du virus .....	5
<b>II.B. Tableaux récapitulatifs</b> .....	6
Vaccins et vaccination .....	9
Recherche des vaccins sur juvéniles .....	9
Désinfec. Inactiva. du virus.....	10
<b>III Rapport Scientifique</b> .....	10
1. Structure et propriétés du virus (AFSSA Brest).....	11
2. Mise au point des moyens de diagnostic.....	11
2.1. PCR (AFSSA Brest) .....	11
2.2. CULTURE CELLULAIRE (AFSSA Brest).....	12
2.3. ELISA .....	12
2.3.1. Mise au point d'un ELISA pour la détection dans le sérum des anticorps spécifiques du nodavirus.....	12
2.3.2. Mise au point d'un ELISA pour la détection d'antigène viral. (IFREMER Palavas) .....	12
2.4. Autres Méthodes .....	13
2.4.1. Hybridation <i>in situ</i> (ISH) (AFSSA Brest).....	13
3. Etude épidémiologique .....	13
3.1. Chez les alevins et les juvéniles (AFSSA Brest).....	13
3.2. Chez les géniteurs et les larves (IFREMER Palavas) .....	14
3.2.1. Chez les poissons séronégatif .....	14
3.2.2. Chez les poissons séropositifs.....	14
3.2.1.1. Etablissement d'un modèle de transmission horizontale aux œufs et aux larves .....	15
3.2.2.2. Réponse immunitaire des reproducteurs et établissement d'un modèle de transmission verticale a été démontré pour Sb1 .....	15
4. Vaccins et vaccination .....	16
4.1. Vaccin recombinant (AFSSA Brest).....	16
4.2. Peptides de synthèse (IFREMER Palavas) .....	17
4.2.1. Epreuve vaccinale après injection de peptides synthétiques .....	17
4.2.2. La recherche de sites potentiellement protecteur par la méthode des membranes « peptide- Spot ».....	18
5. Désinfection inactivation de virus .....	18
6. Tableau et figures.....	19
<b>IV. Démarches dans un but de valorisation des résultats</b> .....	22
<b>IV. A . Démarches de valorisation auprès des entreprises</b> .....	22
<b>IV. B. Résumé des résultats potentiellement valorisables</b> .....	23
1. Structure et propriétés du virus (AFSSA Brest).....	23
2. Mise au point des moyens de diagnostic.....	23
2.1. PCR (AFSSA Brest) .....	23
2.2. CULTURE CELLULAIRE (AFSSA Brest).....	24
2.3. ELISA .....	24

2.3.1. Mise au point d'un ELISA pour la détection dans le sérum des anticorps spécifiques du nodavirus.....	24
2.3.2. Mise au point d'un ELISA pour la détection d'antigène viral.. (IFREMER Palavas) .....	24
2.4. Autres Méthodes .....	25
2.4.1. Hybridation in situ (ISH) (AFSSA Brest).....	25
2.4.2. Production d'anticorps et d'IgG de lapin (IFREMER Palavas).....	25
2.4.3. Monoclonaux anti-Noda ont été produits (covalab).....	25
3. Etude épidémiologique .....	25
3.1. Chez les alevins et les juvéniles (AFSSA Brest).....	25
3.2. Chez les géniteurs et les larves (IFREMER Palavas) .....	25
3.2.1. Chez les poissons séronégatif .....	25
3.2.2. Chez les poissons séropositifs.....	26
3.2.1. Etablissement d'un modèle de transmission horizontale aux œufs et aux larves .....	26
3.2.2. Réponse immunitaire des reproducteurs et établissement d'un modèle de transmission verticale a été démontré pour Sb1 .....	26
3.3. Etude sur le terrain (SFAM – AFSSA Brest).....	26
4. Vaccins et vaccination .....	27
4.1. Vaccin recombinant (AFSSA Brest).....	27
4.2. Peptides de synthèse (IFREMER Palavas) .....	27
5. Désinfection inactivation de virus .....	27
<i>IV.C. Sociétés contactées</i> .....	28
<i>IV.C.a. Société Adiagene Saint Briec</i> .....	28
<i>IV.C.b. Société Covalab Lyon</i> .....	29
<i>IV.C.c Société Bioenvirotech Marseille</i> .....	30
<i>IV.C.d. Institut Pourquier Montpellier</i> .....	31
<i>IV.C.e. Société Kurios Libourne</i> .....	32
<i>IV.C.f. Société Intervet : Boxmeer The netherlands.</i> .....	33
<i>IV.C.g. Société Aquastream Ploemeur</i> .....	34
<i>IV.D. Demande auprès du CRI</i> .....	35
Abstract /Résumé .....	35
Current Stage of Development / Etat de développement de la technologie .....	36
Exploitation of RTD Results / Exploitation de resultats de programmes R&D.....	36
Intellectual Property Rights I Propriété intellectuelle .....	36
IPR Comments /Commentaires sur PI.....	36
Organisation/Company / Nature de l'organisation présentant l'offre .....	36
Market Applications Highlights / Domaine d'applications commerciales .....	37
Manufacturing agreement .....	37
Diffusion .....	37
<i>IV.F Autres pistes de valorisation</i> .....	37
<i>V. Choix de la protection</i> .....	37
<i>VI. Table des Matières</i> .....	42