

## NÉCROSE PANCRÉATIQUE INFECTIEUSE DES SALMONIDÉS : ENQUÊTE SÉROLOGIQUE DANS LES POPULATIONS DOMESTIQUES ET SAUVAGES

M. DORSON et P. de KINKELIN  
avec la collaboration technique d'Annie BARDE et Corinne TORCHY

Laboratoire d'Ichthyopathologie, I. N. R. A.,  
78850 Thiverval Grignon

---

### RÉSUMÉ

Divers salmonidés français ont été éprouvés, aussi bien en pisciculture qu'en eau libre, pour leur activité séronéutralisante dirigée contre le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse de type Sp. Toutes les truites arc-en-ciel présentent une activité nette contre ce virus. Seules, quelques rares truites fario en sont dépourvues. La nature exacte et l'origine de cette activité sont encore indéterminées, mais la spécificité de la neutralisation suggère qu'elle est de nature immunitaire.

### INTRODUCTION

La Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI) est une virose des alevins de salmonidés. L'étiologie de la maladie fut établie par WOLF *et al* (1960) tandis que les caractéristiques de croissance *in vitro* d'une souche de virus américain étaient fixées par MALSBERGER et CERINI (1965), puis MOSS et GRAVELL (1969). Ces derniers suggéraient son appartenance au groupe des Réovirus, qui fut confirmée par COHEN et SCHERRER (1972). L'antigénicité du virus a fait l'objet de travaux tant aux U. S. A. (WOLF et QUIMBY, 1971) qu'en Europe (VESTERGÅRD-JØRGENSEN et KEHLET, 1971) : plusieurs souches d'antigénicité différente — communément dénommées sérotypes — ont été décrites. En particulier :

- ATCC VR 299, une des souches nord-américaines ;
- Ab et Sp, les deux souches connues au Danemark.

Tous les virus de la NPI isolés en France appartiennent au type « Sp ». Dès 1963, WOLF *et al*. signalaient que la plupart des survivants d'une épizootie de NPI pouvaient rester porteurs du virus jusqu'à leur maturité sexuelle et le disséminaient dans leurs excréments ou leurs produits sexuels, entretenant ainsi la transmission verticale de la maladie.

Ces porteurs se caractérisaient par l'absence d'anticorps sériques neutralisant le virus ATCC VR299, tandis que les autres survivants, chez lesquels le virus ne pouvait être mis en évidence, présentaient une activité sérique neutralisante notable. WOLF et QUIMBY (1969) insistent sur le fait que les sérums des truites Arc-en-ciel et des Saumons de fontaine provenant de piscicultures indemnes ne neutralisaient pas le virus. De tels animaux réagissaient à l'injection du virus par la production d'anticorps neutralisants.

Nous avons cherché à retrouver dans les cheptels salmonicoles français des poissons appartenant aux trois catégories définies par WOLF et QUIMBY (1969) c'est-à-dire poisson « normal », porteur « tolérant », poisson immunisé.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### *Poissons et prélèvements*

Les animaux contrôlés appartenaient aux espèces suivantes : truite Arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), truite Fario (*Salmo trutta*), Saumon de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et Saumon Atlantique (*Salmo salar*). Les détails concernant la taille et l'origine des poissons sont donnés dans le tableau 1, les lieux des prélèvements étant indiqués sur la figure 1. Le sang est obtenu par ponction cardiaque ou artérielle (artère caudale). Après coagulation (deux heures à la température ambiante) et centrifugation (4 000 g, 15 mn), les sérums sont recueillis et stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La recherche éventuelle du virus sur des poissons sacrifiés est faite à partir de broyats de rate et de rein antérieur, homogénéisés dans un milieu physiologique (solution de Earle tamponnée *tris*), puis centrifugés (5 000 g, 15 mn).

### *Cellules*

Les cellules de la lignée RTG 2 (WOLF et QUIMBY, 1962) sont cultivées à  $+20^{\circ}\text{C}$  en boîtes « Falcon » de 250 ml dans du milieu de Stocker (Eurobio, Paris) tamponné à pH 7,4 par le *tris*-HCl 0,16 M. Ce milieu est supplémenté par 10 p. 100 de sérum fœtal bovin et 10 p. 100 de phosphate de tryptose, et contient 100 UI de pénicilline, 100  $\mu\text{g}$  de streptomycine et 50  $\mu\text{g}$  de kanamycine par millilitre.

### *Virus*

Le virus utilisé pour les épreuves de séroneutralisation appartient au type Sp et provient d'un isolement effectué au laboratoire par de KINKELIN (souche 27/70). Ce virus est cultivé sur des monocouches confluentes de cellules RTG 2, âgées de 2 jours et incubées après infection à  $+14^{\circ}\text{C}$  dans du milieu de STOKER à 2 p. 100 de sérum. Cette infection provoque en 2 jours un effet cytopathogène généralisé. Le milieu infectieux est soumis aux ultrasons (1 mn, à  $0^{\circ}\text{C}$  sous 200 W et 10 kilocycles) et les débris cellulaires éliminés par centrifugation (5 000 g, 10 mn). Les suspensions virales ainsi obtenues sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ , soit additionnées de 10 p. 100 de DMSO, soit mélangées à un volume égal de glycérol. Aucune baisse notable de titre n'a été observée dans de telles conditions après plus d'un an de stockage.

### *Titrage du virus et épreuve de séroneutralisation*

Le titrage du virus est réalisé sur un volume de 0,1 ml suivant la technique de plages sous 0,5 p. 100 d'agarose, technique décrite par de KINKELIN et SCHERRER (1970) à propos du virus d'Egtved.

La séroneutralisation est effectuée en incubant 1 heure à  $+20^{\circ}\text{C}$  des volumes égaux de sérum à la dilution voulue et d'une suspension virale titrant 2 000 u.f.p. par ml. Le titrage du pouvoir infectieux rémanent se fait suivant la technique citée plus haut. Le titre d'un sérum est exprimé par l'inverse du coefficient de dilution correspondant à une réduction de 50 p. 100 du nombre de plages par rapport à une suspension témoin non neutralisée (la même suspension virale de 2 000 u.f.p./ml mélangée à un volume de milieu de Eagle) suivant une adaptation de la technique décrite par CASALS (1967). Les suspensions virales obtenues à partir de l'extrait d'organes infectés ont pu de la même façon être titrées et le virus de la NPI identifié par séroneutralisation avec un sérum de lapin immunisé contre un virus de la NPI du type Sp.

TABLEAU I

*Activité neutralisante antivirale de la Nécrose Pancréatique (sérotype Sp) des sérums de salmonidés concernés par l'enquête*  
 Les lieux des prélèvements sont indiqués dans la figure 1

Origines et dates des prélèvements	Espèces	Poids moyens (g)	Nbre de positifs (†) Nbre de contrôlés	Titres (‡) neutralisants	Remarques
Salmonicultures 1 - Août 1972	Truite Arc-en-Ciel (TAC)	1 500	10/10	> 200	Poissons survivant à la maladie. Pas de virus détectable dans les excréments de ces 10 poissons.
	Truite Fario	20 1 000	10/10 10/10	— —	
2 - Sept. 1972	TAC	20	8/8	≥ 2 000	Survivants d'une enzootie. Virus isolé dans les organes de 3/10 poissons.
3 - Sept. 1972	TAC	150	10/10	≥ 200	
4 -	Truite Fario	150	5/5	≥ 200	
5 - Mai 1973	Truite Fario	1,2	pool de 10	> 20	
6 - Nov. 1972	TAC	200	10/10	> 200	
	Truite Fario Saumon de Fontaine	200 800	10/10 2/2	— —	
7 - Avril 1972	Truite Fario	300	7/7	> 200	
8 - Fév. 1973	Saumon de Fontaine	500 à 1 000	9/9	≥ 2 000	
9 - Sept. 1972	TAC	1 000	10/10	≥ 2 000	Reproducteurs provenant d'une exploitation danoise indemne de NPI.

TABLEAU I (suite)

Origines et dates des prélèvements	Espèces	Poids moyens (g)	Nbre de positifs (1) Nbre de contrôlés	Titres (2) neutralisants	Remarques
10 - Sept. 1972	TAC	4	pool de 10	> 200	Piscicultures indemnes de NPI. Animaux provenant d'œufs danois indemnes et contrôlés périodiquement.
11 - Fév. 1972	TAC	90 7,5	40/40 8/8	≥ 2 000 200 à 2 000	
Laboratoire d'Ichtyopathologie 12 - de janv. 1972 à mars 1973	TAC — — — —	150 à 1 000 0,75 0,12 20 à 150 9	30/30 pool de 10 pool de 50 12/12 pool de 10	> 2 000 > 200 2 000 > 200 ≥ 200	Poissons issus d'œufs non garantis, mais dans lesquels le virus n'a pu être mis en évidence. Provenant d'œufs garantis indemnes de NPI.
Cours d'eau 13 - Andelle Janv. 1973	Truite Fario	60 200 à 1 500	5/6 3/10	≥ 200 —	Rivière traversant plusieurs salmonicultures. Absence de virus dans les excréments des 10 poissons examinés.
14 - Bresle Nov. 1972	Truite Fario Saumon atlantique adulte Jeune saumon atlantique	200 à 4 000 2 000 à 5 000 60	20/20 6/6 12/12	> 200 — > 200 à 2 000	Cours d'eau important, alimentant plusieurs piscicultures.
15 - Veyre Mars 1973	Truite Fario	80	0/6	0	Ruisseau renfermant des truites sauvages.
16 - Echimont Juin 1972	Truite Fario	50 à 300	0/6	0	Ruisseau renfermant des truites sauvages. Pas de virus détectable dans les organes de ces 6 poissons.

(1) Sérums produisant une réduction du nombre de plages supérieure à 50 p. 100 à la dilution au 1 : 20.

(2) Inverse de la dilution du sérum entraînant une réduction de 50 p. 100 du nombre de plages.



FIG. 1. — Carte indiquant les points de prélèvement figurés par des flèches et des nombres dont la signification est détaillée dans le tableau 1

## RÉSULTATS

Au cours de cette enquête sérologique, les sérums de plus de 250 salmonidés ont été éprouvés contre le virus de la NPI de type Sp, soit individuellement, soit par groupes lorsque la taille des animaux ne permettait pas l'obtention de volumes individuels suffisants de sérum. Le tableau 1 résume les résultats obtenus.

Seuls les sérums de quelques truites *Fario* n'avaient aucune activité neutralisante. Il s'agissait de poissons capturés sur une rivière, l'Andelle (8 sur 16 éprouvés), et surtout sur de petits ruisseaux isolés, la Veyre (6 sur 6) et l'Éclimont (6/6). Dans ces deux derniers cas, les poissons appartenaient à des peuplements que l'isolement du biotope et l'absence de réempoissonnement permettent de considérer comme « sauvages ».

Les poissons provenant de salmonicultures (truite Arc-en-ciel, truite Fario et Saumon de fontaine) et la plupart des salmonidés des deux rivières importantes traversant des piscicultures (Bresle et Andelle) se révélèrent posséder une activité séroneutralisante importante. Cela s'est vérifié chez des Saumons atlantiques adultes capturés sur les frayères avant la ponte et des saumons immatures (smolts) pris avant la descente vers la mer.

Il n'a été possible de trouver aucun sérum de Truite Arc-en-ciel dépourvu d'activité neutralisante. Même des alevins de 0,12 g de poids moyen et âgés de 1 mois, élevés au laboratoire d'ichtyopathologie, et chez lesquels le virus n'a jamais été mis en évidence, ont présenté cette activité.

Chez des truitelles, survivantes d'une épizootie de NPI, le virus fut aisément isolé à partir de la rate, du rein antérieur ou des excréments, en dépit du fait que ces mêmes poissons possédaient une activité séroneutralisante notable (titre du sérum supérieur à 2 000) : pisciculture n° 2.

Nous n'avons jamais trouvé des poissons « tolérants » au sens immunitaire tels ceux décrits par WOLF et QUIMBY (1969). Il fut en effet impossible de mettre en évidence le virus de la NPI chez 6 truites Fario dont le sérum n'était pas neutralisant.

#### DISCUSSION

Il va de soi que l'enquête sérologique rapportée ici ne suffit pas à donner un aperçu représentatif de la situation sur le plan sérologique des populations de salmonidés français vis-à-vis du virus de la NPI. L'obtention de poissons provenant des eaux naturelles n'est pas toujours aisée, en particulier si on désire obtenir du sérum de poissons « sauvages ». En effet les rivières sont généralement repeuplées avec des poissons de pisciculture. Pour la Truite Arc-en-Ciel, il ne semble pas exister actuellement en France de population établie se reproduisant naturellement. Cependant, on peut déjà faire les remarques suivantes :

— Les seuls sérums pouvant être considérés comme « normaux » (d'un point de vue immunologique) proviennent de truites Fario appartenant à des peuplements « sauvages » ;

— Aucun sérum dépourvu d'activité neutralisante n'a été trouvé en pisciculture, même parmi les individus porteurs du virus. On retrouve à cette occasion ce qui est parfois observé chez les mammifères : la coexistence de l'infection virale et de la production d'anticorps neutralisants (PARAF *et al.*, 1971).

La situation en France, où tous les virus de la NPI isolés jusqu'à présent appartiennent au type Sp, est donc différente de celle qui a été décrite aux U.S. A. par WOLF et QUIMBY (1969) avec le type ATCC VR 299. De la même façon, VESTERGÅRD-JØRGENSEN (1973) note la présence de cette activité séroneutralisante chez les truites Arc-en-ciel de piscicultures danoises officiellement indemnes de NPI.

L'ubiquité de ce « facteur neutralisant » parmi les truites Arc-en-Ciel indemnes permet de mettre en doute sa nature immunitaire, dans la mesure où aucun sérum non neutralisant n'a pu être décelé. Une caractérisation plus précise a donc été entreprise à partir des sérums des truites Arc-en-Ciel appartenant à la pisciculture n° 11 (DORSON et de KINKELIN, 1974). La neutralisation est associée à la fois à des molécules 16S corres-

pondant aux IgM déjà décrites (DORSON, 1972) et à des molécules 6S. La spécificité de la neutralisation est comparable à celle d'un sérum de lapin immunisé contre le virus de type Sp. Il en est de même avec les sérums de truites fario. La nature immunologique de la molécule 6S neutralisante semble donc probable, mais seul son isolement par affinité et sa caractérisation biochimique permettront de l'affirmer. En effet, si des anticorps d'un coefficient de sédimentation de 6 S ont été décrits chez les poissons téléostéens (CLEM et SMALL, 1970) leur existence est contestée (MARCHALONIS, 1971) et ils n'ont pu être mis en évidence chez la truite immunisée avec des immunogènes non viraux (DORSON, 1972).

La détermination du stimulus immunogénique éventuel responsable de la synthèse de tels anticorps risque d'être malaisée : on recouvre généralement du vocable « d'anticorps normaux » des immunoglobulines pour lesquelles l'immunogène échappe à l'expérimentateur (BORDET, 1972).

De toute façon, cette activité d'apparition ontogénique précoce peut expliquer les échecs rencontrés dans la reproduction expérimentale de la maladie (DORSON et de KINKELIN, résultats non publiés). Son rôle éventuel dans la résistance des alevins à la maladie sera recherché par examen des sérums au cours de l'évolution de celle-ci en salmoniculture. Enfin, ces résultats mettent en lumière l'inutilité des épreuves sérologiques pour le contrôle de l'état sanitaire des piscicultures eu égard à la NPI.

*Reçu pour publication en mars 1974.*

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier ici M. ARRIGNON, Ingénieur chargé de la première région piscicole du Conseil Supérieur de la Pêche et MM. SALASC et LE BERCHE, gardes-chef, pour les opérations de captures qui ont rendu possible les contrôles sur les animaux sauvages.

## SUMMARY

### INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS : SEROLOGICAL SURVEY OF FRENCH SALMONID POPULATIONS

A variety of French salmonids were tested for serum neutralizing activity against Sp serotype Infectious Pancreatic Necrosis Virus, as well in trout farms as in rivers.

— The rare « normal » (from an immunological view point) salmonids were brown trout from wild populations.

— Non neutralizing serum could not be found in trout farm fish (Rainbow trout, brown trout, brook trout), and serum from virus carriers exhibited a noticeable activity, as well as serum of rainbow trout from IPN free trout farms.

The nature and origin of the neutralizing factor are still unknown, but first characterization results suggest an immunological nature.

## РЕЗЮМЕ

## Панкреатический инфекционный некроз лососёвых : Серологическая анкета в домашних и диких популяциях.

Нами изучались разные французские лососёвые, как в рыбоводствах, так и в свободных водах — рассматривалась их серонейтрализующая активность, направленная против вируса панкреатического инфекционного некроза типа Sp. Все форели радуга показывают явную противовирусную активность. Одни форели фарио, более редкие, лишены этой активности. Точную природу и происхождение этой активности, до сих пор, не удалось определить, но специфичность нейтрализации подсказывает, что она иммунитарного порядка.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BORDET P., 1972. *Immunologie*. Flammarion, Paris.
- CASALS J., 1967. Immunological techniques for animal viruses, In *Methods of Virology*, 113-198 Eds. Maramorosch and H. Koprowski 3. New York. Academic Press, Inc.
- CLEM L. W., SMALL P. A., 1970. Phylogeny of Immunoglobulin structure and function. V. Valences and association constants of Teleost-antibodies to a haptenic determinant. *J. exper. Med.*, **132** (3), 385-400.
- COHEN J., SCHERRER R., 1972. Structure de la capsid du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse de la Truite. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **274**, 1222-1225.
- DE KINKELIN P., SCHERRER R., 1970. Le virus d'Egtved. I. Développement, stabilité et structure de la souche danoise F<sub>1</sub>. *Ann. Rech. vétér.*, **1**, 17-30.
- DORSON M., 1972. La réponse immunitaire chez la truite Arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) ; quelques caractéristiques des immunoglobulines produites lors d'une réaction primaire. *Ann. Rech. vétér.*, **3**, 93-107.
- DORSON M., DE KINKELIN P., 1974. Nécrose pancréatique infectieuse : existence dans le sérum de truites indemnes d'une molécule 6S neutralisant spécifiquement le virus. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **278**, 785-788.
- MALSBERGER R. G., CERINI C. P., 1965. Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann. New York Acad. Sci.*, **126** (1), 320-327.
- MARCHALONIS J. J., 1971. Isolation and partial characterization of immunoglobulins of goldfish (*Carassius auratus*) and Carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology*, **20**, 161-173.
- MOSS L. H., GRAVELL M., 1969. Ultrastructure and sequential development of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Virol.*, **3**, 52-58.
- PARAF A., AYNAUD J. M., METZGER J. J., 1971. Relationship between immune reactions and tolerance to viruses. *Ann. New York Acad. Sci.*, **181**, 223-235.
- VESTERGÅRD-JØRGENSEN P. E., 1973. The nature and biological activity of IPN virus neutralizing antibodies in normal and immunized Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Arch. ges. Virusforsch., Osterr.*, **42**, 9-20.
- VESTERGÅRD-JØRGENSEN P. E., KEHLET N. P., 1971. Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout. Their serological and pathogenic properties. *Nord. Veter. Med.*, **23**, 568-575.
- WOLF K., QUIMBY M. C., 1962. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science, U. S. A.*, **135**, 1065-1066.
- WOLF K., QUIMBY M. C., 1969. Infectious Pancreatic Necrosis : Clinical and immune response of adult trouts to inoculation with live virus. *J. Fish. Res. Board Canada*, **26**, 2511-2516.
- WOLF K., QUIMBY M. C., 1971. Salmonid viruses : Infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of first european isolations. *Arch. ges. Virusforsch., Osterr.*, **34**, 144-156.
- WOLF K., QUIMBY M. C., BRADFORD A. D., 1963. Egg-associated transmission of IPN virus of trouts. *Virology*, **21**, 317-321.
- WOLF K., SNIESZKO S. F., DUNBAR C. E., PYLE E., 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **104**, 105-108.