

INFECTION EXPÉRIMENTALE DE L'ALEVIN DE SILURE (*SILURUS GLANIS* L.) PAR LE VIRUS DE LA VIRÉMIE PRINTANIÈRE DE LA CARPE (V.P.C.)

L. PASCO (1), Corinne TORCHY (2), P. de KINKELIN (2)

(1) Laboratoire de Zoologie, Université Louis Pasteur, 12, rue de l'Université - 67000 STRASBOURG, France

(2) Institut National de la Recherche Agronomique Laboratoire d'Ichtyopathologie, route de Thiverval - 78850 THIVERVAL-GRIGNON, France (**)

Reçu le 28 septembre 1987
Accepté le 26 octobre 1987

Received 28 September, 1987
Accepted 26 October, 1987

RÉSUMÉ

La contamination d'alevins de silure âgés de 25 jours par immersion dans une suspension aqueuse de virus de la virémie printanière de la carpe (V.P.C.) titrant 3×10^5 ufp/ml pendant 2 heures, a été suivie de l'apparition de la maladie clinique à une température de 20 °C et d'une mortalité de 66 % de l'effectif en 12 jours, accompagnée d'une importante multiplication virale chez les malades. Cette sensibilité de l'alevin disparaît avec l'âge et pourrait être due à l'immaturité des mécanismes de défense non spécifique ainsi qu'il est discuté.

EXPERIMENTAL INFECTION OF SHEATFISH FRY (*SILURUS GLANIS* L.) BY SPRING VIRAEMIA OF CARP VIRUS (SVCV)

SUMMARY

Water route infection of 25 days old sheatfish fry by immersion for 2 hours into an aqueous suspension of spring viraemia of carp virus (SVCV) titrating 3×10^5 p.f.u./ml resulted in clinical infection and mortality reaching 66% of the infected group within 12 days at 20 °C. A strong virus multiplication was evidenced in diseased fry. This susceptibility, which disappeared as the fish gets older, could be due to the lack of maturity of certain non specific defence mechanisms as it is discussed.

1. INTRODUCTION

Le silure suscite actuellement un certain intérêt chez les pêcheurs mais également et surtout chez certains pisciculteurs qui voient la possibilité de l'élever en eau réchauffée. Dans ce but, des recherches en physiologie ont été entreprises au laboratoire de Zoologie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg pour définir les paramètres nécessaires à l'élevage intensif de ce poisson.

Mais, comme tout élevage intensif est sous la menace des agents de maladies contagieuses, la pathologie de ce poisson a également fait l'objet de certaines études. Sachant qu'en élevage, le silure est souvent associé à la carpe, nous avons commencé par rechercher s'il était réceptif à un virus de cette dernière, celui de la virémie printanière (V.P.C.). Cette orientation avait deux raisons : 1. L'absence de traitement anti-viral rendant les précautions sanitaires impératives, il est nécessaire de connaître les risques de contamination ; 2. Il y a quelques années, (JENEY *et al.* 1982) et (FIJAN *et al.* 1982), isolaient à partir d'alevins de silures présentant un syndrome hémorragique associé à une forte mortalité, un rhabdovirus antigéniquement semblable à celui de la V.P.C., et reproduisaient expérimentalement avec lui les signes cliniques observés. Nous avons donc, en utilisant une souche de virus de la V.P.C. issue de la carpe, éprouvé la sensibilité d'alevins de silure, en les contaminant par la voie naturelle sous la forme d'une baignade infectante.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Poissons

Des alevins de silure âgés de 25 jours et d'un poids individuel moyen de 50 mg ont été transférés au laboratoire à la fin du mois de juillet et placés dans des aquariums contenant 10 l d'eau

(**) Adresse où doit être envoyée toute correspondance.

à 20°C sous un débit horaire de 5l. Préalablement à leur arrivée, les poissons avaient été traités préventivement par le mélange formol-vert malachite (4 g de vert malachite dissous dans un litre de formol et emploi du mélange à 25 mg/l), et au cours d'une période d'acclimatation et d'observation de 5 jours, aucun agent pathogène n'avait été mis en évidence. Les alevins recevaient toutes les 3 heures un aliment sec en granulé de 0,4 à 0,7 mm.

2.2. Virus et techniques virologiques

La souche virale était celle utilisée au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires de Maisons-Alfort au cours de ses travaux sur la pathogénie de la V.P.C. (BAUDOY *et al.* 1980). La suspension virale, produite et titrée en cellules EPC, *Epithelioma papulosum cyprini*, (FIJAN *et al.* 1983) dans des conditions antérieurement décrites (DE KINKELIN et LE BERRE 1974) contenait 9×10^8 unités formant plaque (u.f.p.) par ml.

Le diagnostic virologique consistait en l'isolement du virus en culture cellulaire suivi de son identification par séroneutralisation. Le virus était d'abord extrait des alevins entiers par homogénéisation de ces derniers, au moyen d'un broyeur électrique (Turax ND), tournant à la vitesse maximum pendant 30 secondes dans une solution saline de EARLE supplémentée de 2% de sérum d'embryon de bovin et de 10 µg/ml de fluméquine. Le volume de la solution correspondait à une dilution au 1/10^e de l'échantillon de poissons constitué de 3 alevins. Après une centrifugation de 15 mn à 3000g, à une température de + 4°C, les surnageants obtenus ont été congelés à +65°C. A l'issue de l'expérience, les échantillons ont été simultanément décongelés, dilués de 10 en 10 jusqu'à 1×10^{-7} et inoculés à des monocouches de cellules EPC en plaques à 24 puits (Nunc ND) sous un volume de 0,1 ml par puits (2 puits par dilution). Les cultures cellulaires incubées à 15°C ont été observées quotidiennement pour déceler l'apparition d'un effet cytopathogène.

Pour l'identification du virus par séroneutralisation, des suspensions virales titrant respectivement 1×10^3 , 1×10^4 et 1×10^5 ufp/ml ont été mélangées à parties égales (0,3 ml + 0,3 ml) avec du sérum de lapin anti-VPC dilué au 1/40^e et incubées pendant 1 heure à 20°C. Des dilutions identiques de virus étaient incubées en parallèle avec du milieu de culture cellulaire (milieu de Stoker supplémenté de 2% de sérum d'embryon de bovin). Des volumes de 0,1 ml de chacun de ces mélanges étaient ensuite inoculés à des cellules EPC et après une adsorption de 1 heure à 20°C, un volume complémentaire de milieu de culture y était ajouté dans chacun des puits et les plaques placées en incubation à 15°C comme précédemment.

2.3. Protocole d'infection

Cinq jours après leur arrivée, les alevins répartis en 2 lots de 50 sujets chacun ont été soumis à l'infection de la manière suivante : l'arrivée d'eau étant arrêtée et le volume d'eau ramené à 3 l par aquarium, les alevins ont été respectivement maintenus pendant 2 heures à 20°C dans une suspension aqueuse de virus titrant approximativement 3×10^5 ufp/ml (lot infecté) et dans le même volume d'eau additionné de 1 ml de milieu de Stoker à 2% (lot témoin) qui correspondait au volume de l'inoculum viral, lequel titrait 9×10^8 ufp/ml. Après rétablissement de la circulation de l'eau, les contrôles se sont poursuivis pendant 21 jours. Durant toutes les opérations, l'aération de l'eau était pratiquée au moyen d'un diffuseur.

L'expérience a été suivie des points de vue de la température et de la mortalité quotidiennes ainsi que par des prélèvements d'animaux mourants ou morts du 3^e au 7^e jour (3 sujets par prélèvement) et d'animaux non infectés (3 sujets au 4^e jour). De plus, le dernier jour, un contrôle virologique a été fait sur un pool de 6 sujets de chacun des lots, donc 10 jours après l'arrêt de la mortalité.

3. RÉSULTATS

La mortalité a commencé le troisième jour suivant l'infection pour augmenter régulièrement jusqu'au 10^e et cesser à partir du 12^e ayant atteint 66% de l'effectif initial (fig. 1). Dans le lot non infecté, seul un sujet a succombé le quatrième jour. L'expérience fut arrêtée le 21^e jour.

Les alevins malades présentaient les signes cliniques suivants : asthénie se traduisant par un maintien immobile en surface contre les parois de l'aquarium, inappétence, congestion des flancs et accumulation d'un liquide d'ascite hémorragique dans la cavité abdominale (fig. 2). Par opposition aux sujets malades dont le tube digestif presque vide donnait, à l'observation à la loupe binoculaire, un aspect transparent à l'abdomen, les sujets non infectés avaient une coloration ventrale jaunâtre du fait de la présence d'aliments dans le tube digestif. (fig. 3).

Les diagnostics virologiques effectués du 3^e au 7^e jour sur les morts et les mourants ont tous été positifs après 3 jours d'incubation à 15°C jusqu'à une dilution de 1×10^{-7} qui reflète la multiplication du virus chez les alevins. Inversement, aucun virus n'a été isolé des sujets non infectés même à partir du seul sujet mort spontanément. Enfin, les épreuves de séroneutralisation de 2 des virus réisolés aux jours 3 et 4 ont confirmé qu'il s'agissait bien du virus de VPC utilisé dans l'infection expérimentale.

En revanche, l'examen virologique du 21^e jour est resté négatif dans les deux lots.

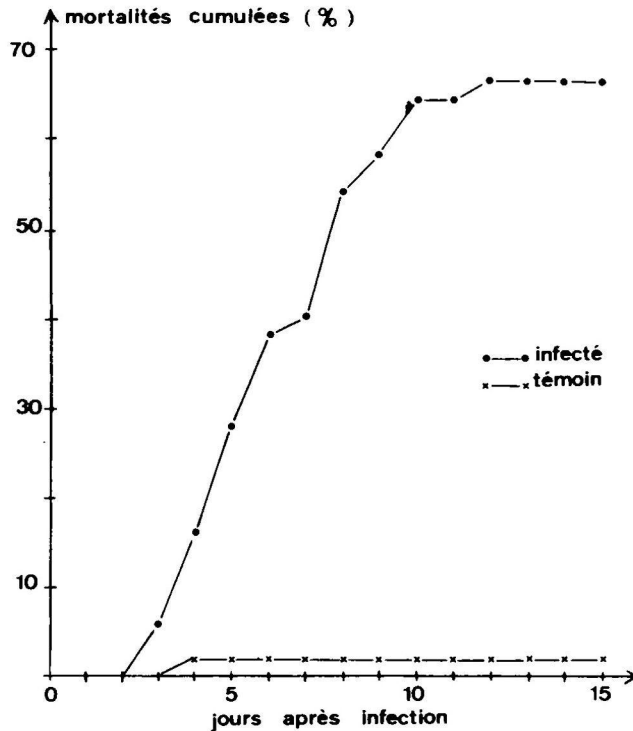


Figure 1 : Evolution de la mortalité faisant suite à l'infection d'alevins de silure de 25 jours par une immersion de 2 heures dans une suspension aqueuse de 3×10^5 ufp/ml de virus de la virémie printanière de la carpe et à une infection simulée (témoin). Température 20 °C ; nombre de poissons par lot : 50. Du fait de l'absence de mortalité pendant la 3^e semaine d'expérience, les courbes sont arrêtées au jour 15.

Figure 1 : Mortality resulting from water route infection by a 2 hours immersion of 25 days old sheatfish fry, into an aqueous suspension of spring viraemia of carp virus (SVCV) titrating 3×10^5 pfu/ml at 20 °C. The number of fish per group was 50. Mock infection is mentioned as "témoin". Since no mortality occurred during the 3rd week of the trial, the curves were stopped on day 15.



Figure 2 : Alevin infecté, de 15 mm de longueur, montrant une hydropisie due à un liquide d'ascite légèrement hémorragique.

Figure 2 : Clinical signs of SVCV infection in a 15 mm long sheatfish fry : dropsy and slightly haemorrhagic ascitis.



Figure 3 : Alevin non infecté.

Figure 3 : Uninfected fry.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

La contamination d'alevins de silure par immersion dans une suspension aqueuse de virus de la VPC a été rapidement suivie de l'apparition d'œdèmes et de congestions précédant la mort comme chez la carpe, et la multiplication virale démontrée chez les malades atteste de la réceptivité de l'alevin à la V.P.C., au moins dans les 4 premières semaines de sa vie.

Les signes cliniques étaient les mêmes que ceux décrits par JENEY *et al.* (1982) ou FIJAN *et al.* (1982) bien que ces derniers aient observé, puis reproduit expérimentalement avec le virus isolé, une mortalité de 90% chez des sujets âgés de 8 à 18 jours. Ce pourcentage de mortalités nettement supérieur au nôtre, pourrait s'expliquer par une différence de virulence de souche virale mais nous pensons plutôt que cette différence tient surtout à l'âge des alevins, ces derniers perdant leur sensibilité en vieillissant, hypothèse que confirmerait le fait que des silures encore plus âgés (6 à 8 semaines) se montraient réfractaires à l'infection expérimentale (BEKESI *et al.* 1986).

La température à laquelle nous avons opéré (20 °C) et celle de 22 °C à laquelle travaillaient FIJAN *et al.* (1982), étaient supérieures à la température à laquelle la virémie printanière survient chez la carpe dans les conditions naturelles (< 16°). Toutefois, dans ces dernières, la maladie a été observée chez des poissons âgés d'un été ou davantage et non sur des alevins. Or, si des alevins se trouvent exposés à l'infection virale au cours des 6 premières semaines de leur vie, ils meurent parfaitement de virémie printanière dans la plage thermique 20-22 °C. (HATTENBERGER-BAUDOY *et al.* 1987).

En effet, il est probable que dans de nombreuses espèces de poissons, les très jeunes sujets sont, comme chez les mammifères, sensibles à de nombreuses infections virales en raison d'un manque de maturité de certains mécanismes de défense non spécifique. Pour la virémie printanière, un des principaux mécanismes pourrait être la synthèse d'interféron, (BAUDOY 1978). L'exemple de l'alevin de brochet qui, dans ses premiers jours de vie libre, s'est montré cliniquement sensible à 3 virus ayant pour hôtes habituels les salmonidés et 1 virus isolé de la perche (DORSON *et al.* 1987), est un argument pour avancer que le virus de la V.P.C. est pour le silure un risque accidentel et temporaire plutôt qu'une menace permanente. L'alimentation en eau des dispositifs d'incubation devrait en tenir compte.

5. REMERCIEMENTS

Les alevins de silure nous ont été offerts par M. J. HEYMAN à 57930 FÉNÉTRANGE. La souche de virus V.P.C. et son sérum homologué, sont dus à Anne-Marie HATTENBERGER-BAUDOY. L'un et l'autre sont chaleureusement remerciés pour avoir rendu possible notre travail dont Marie-Claire LE COCHENNEC a assuré la dactylographie avec la qualité qu'on lui connaît.

6. BIBLIOGRAPHIE

- BAUDOUY A.M., 1978. Relation hôte-virus au cours de la virémie printanière de la carpe *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, série D, 286, 1225-1228.
- BAUDOUY A.M., DANTON M., MERLE G., 1980. Virémie printanière de la carpe : étude expérimentale de l'infection évoluant à différentes températures. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 131 E, 479-488.
- BEKESI L., PALFI V., 1986. Viral infections and their control in warm-water hatcheries in Medunarodni Simpozij Ihtiopatologija u Akvakultura, Dubrovnik, p. 22.
- DORSON M., DE KINKELIN P., TORCHY C., MONGE D., 1987. Sensibilité du brochet (*Esox lucius*) à différents virus de salmonidés et au rhabdovirus de la perche. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 307, 91-101.
- FIJAN N., PETRINEC Z., STANCL Z., KEZIC N., TESKEREDZIC E., 1977. Vaccination of carp against spring viremia: comparison of intraperitoneal and application of live virus to fish kept in ponds. *Bull. Off. int. Epiz.*, 87, 441-442.
- FIJAN N., MATASIN Z., JENEY Z., OLAH J., ZWILLENBERG L.O., 1982. Isolation of *Rhabdovirus carpio* from sheatfish (*Silurus glanis* L.) fry in ANDERSON D., DORSON M., DUBOURGET Ph., *Antigens of fish Pathogens*, Collection Fondation Marcel Mérieux, 265.
- FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L.O., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J.F., DE KINKELIN P., 1983. Some properties of the *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) line from carp, *Cyprinus carpio*. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 134 E, 207-220
- HATTENBERGER-BAUDOUY Anne-Marie, DANTON M., MERLE G., 1987. Note technique. Infection expérimentale de l'alevin de carpe (*Cyprinus carpio* L.) par le virus de la Virémie printanière de la carpe en eau chaude. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 307, 89-90.
- JENEY Z., JENEY G., OLAH J., MATASIN Z., ZWILLENBERG L.O., FIJAN N., 1982. Some characteristics of a virus isolated from sheatfish (*Silurus glanis*). *Dev. Comp. Immunol.*, suppl. 2, p. 242.
- DE KINKELIN P. et LE BERRE M., 1974. Rhabdovirus des poissons. II. Propriétés *in vitro* du virus de la virémie printanière de la carpe. *Ann. Microbiol (Inst. Pasteur)*, 125 A, 113-124.