

# ÉTUDE DE LA RÉCEPTIVITÉ D'HYBRIDES TRIPLOIDES TRUITE ARC-EN-CIEL × SAUMON COHO A LA NECROSE PANCRÉATIQUE INFECTIEUSE ET A LA SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE VIRALE

M. DORSON \*, B. CHEVASSUS \*\*

\* Laboratoire d'Ichtyopathologie, INRA. Route de Thiverval, 78850 THIVERVAL-GRIGNON, France.

\*\* Laboratoire de Physiologie des Poissons, INRA-CNRZ, 78350 JOUY-EN-JOSAS, France.

## RÉSUMÉ

Des ovules de truite arc-en-ciel ont été fécondés par du sperme de saumon coho, puis soumis à un choc thermique chaud provoquant la rétention du 2<sup>ème</sup> globule polaire, et ont donné naissance à des hybrides triploïdes. Des témoins truite arc-en-ciel diploïdes et triploïdes ont été obtenus simultanément avec du sperme de truite arc-en-ciel. Tous furent soumis à une épreuve virulente par bain dans le virus de la NPI (type Sp) et dans les virus de la SHV type 1 et 3. Les hybrides triploïdes se sont révélés sensibles à la NPI mais totalement résistants aux deux types de virus de la SHV tandis qu'une mortalité normale affectait les témoins truite arc-en-ciel diploïde et triploïde.

## SUMMARY

### STUDY OF THE SENSITIVITY OF TRIPLOID RAINBOW TROUT × COHO SALMON HYBRIDS TO INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS AND VIRAL HAEMORRHAGIC SEPTICAEMIA.

Rainbow trout ova were fertilized with milt collected from coho salmon and subsequently heat shocked in order to prevent second polar body extrusion, giving birth to triploid hybrids. Diploid and triploid rainbow trout controls were simultaneously obtained with milt from rainbow trout sires. They were all submitted to waterborne experimental challenge with IPN Virus, Sp type, and VHS Virus type 1 and 3. Triploid hybrids proved sensitive to IPN but totally resistant to both VHS virus types while expected mortalities developed in both diploid and triploid rainbow trout controls.

## INTRODUCTION

La pathologie virale représente un facteur limitant important pour la salmoniculture européenne avec deux maladies : la septicémie hémorragique virale et la nécrose pancréatique infectieuse.

La septicémie hémorragique virale (SHV), causée par le virus d'EGTVED (JENSEN, 1965) est considérée comme une maladie majeure en salmoniculture (DE KINKELIN, 1983). Trois sérotypes différents du virus ont été répertoriés (LE BERRE *et al.*, 1977), qui sont tous trois pathogènes pour la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), tandis que la truite fario (*Salmo trutta*) n'est sensible qu'aux types II et III (DE KINKELIN et LE BERRE, 1977). La résistance des diverses espèces de salmonidés à ces souches virales n'a fait l'objet que de peu d'études systématiques, cependant on peut considérer comme bien établie la résistance du saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) au virus de type I (DE KINKELIN *et al.*, 1974). Les hybrides "conventionnels" obtenus en inséminant des ovules de truite arc-en-ciel par du sperme de saumon coho présentent un très faible taux de survie (CHEVASSUS et PETIT, 1975 ; BLANC et CHEVASSUS, 1979, 1982) mais sont eux aussi résistants à la SHV de type I (ORD *et al.*, 1976).

La nécrose pancréatique infectieuse (NPI), (WOLF *et al.*, 1960, DORSON, 1982) a une incidence directe moindre du fait qu'elle n'affecte que les alevins, mais constitue néanmoins une source de préoccupation dans la mesure où son éradication est aléatoire. Là encore plusieurs sérotypes du virus sont connus, dont un (Sp) est dominant en Europe (VERSTERGARD-JORGENSEN et KEHLET, 1971). La truite arc-en-ciel, la truite fario, l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) sont sensibles, mais le saumon coho est là encore résistant à cette virose et représente donc un génotype intéressant pour limiter les pertes dues aux viroses, soit en tant que tel, soit en tant que parent d'hybrides.

La triploïdisation par choc chaud, mise au point chez la truite arc-en-ciel (CHOURROUT, 1980 ; CHOURROUT et QUILLET, 1982), s'est révélée comme un moyen d'augmenter notablement le rendement de certaines hybridations intergénériques, en particulier entre le saumon coho mâle et la truite arc-en-ciel femelle (CHEVASSUS *et al.*, 1983) et il est apparu intéressant de vérifier si le saumon coho transférait à l'hybride triploïde sa résistance à la NPI et à la SHV.

## MATÉRIELS ET TECHNIQUES

### 1. Source des gamètes

*Première série* (résultats : tableaux 2 et 3)

Les animaux utilisés correspondent à un croisement entre un mélange des œufs issus de 9 géniteurs femelles de truite arc-en-ciel âgées de 2 ans (souche SY 79 produite à la pisciculture de Gournay-sur-Aronde) et, d'une part, un mélange des spermés de 6 mâles arc-en-ciel de même souche (lot A.C.), d'autre part un mélange des spermés de 10 mâles coho de 2 ans venant de la SODAB (TREGUIER, Côtes-du-Nord).

*Deuxième série* (résultats : tableau 4)

28 géniteurs femelles de truite arc-en-ciel, âgés de 3 ans (même souche et même origine que la première série), 15 mâles de truite arc-en-ciel âgés de 2 ans (souche SY 80, même origine) et 20 mâles coho de 2 ans (origine M. BELLET, RUELLE, Charente) ont été utilisés selon le même protocole que la première série.

### 2. Protocole d'obtention des triploïdes

Le protocole précédemment décrit (CHEVASSUS *et al.*, 1983, CHEVASSUS, QUILLET et CHOURROUT, 1983) a été suivi : les ovules égouttés ont été arrosés de sperme (5 à 10 cc pour 20.000 ovules) puis recouverts de dilueur pour insémination (BILLARD, 1977). Après 10 mn les œufs ont été rincés dans une eau à 10° C dans laquelle ils furent laissés 25 mn avant d'être transférés dans un bain thermorégulé à 26,5° C  $\pm$  0,5° C pour une durée de 20 mn. Les œufs ont alors été placés avec ménagements dans les auges d'incubation à 10° C. A l'issue de ce traitement les œufs fécondés par du sperme de truite arc-en-ciel fournissent un lot "arc-en-ciel triploïde" (A.C. triploïde), un échantillon témoin étant conservé sans traitement (A.C. diploïde) ; les œufs fécondés par du sperme de saumon coho fournissent le lot "Hybride triploïde". Il n'a pas été conservé de lot témoin compte tenu de la faible viabilité des hybrides diploïdes précédemment mentionnée. Les œufs fécondés ont été ensuite incubés dans un recyclage thermorégulé à 10° C + 0,5 à Jouy puis transférés pour partie au stade œillé à Grignon, l'autre fraction étant transférée à la pisciculture de Gournay-sur-Aronde pour étude de la survie et de la croissance précoce.

### 3. Souches virales

Le virus de la NPI (sérotype Sp) utilisé a pour origine un isolement sur alevins malades (souche 31/75). Il est entretenu sur alevins et produit et titré sur cellules en culture RTG<sub>2</sub> comme cela a été décrit précédemment (DORSON *et al.*, 1978).

Les virus de la SHV de types 1 et 3 provenaient d'isollements pathologiques en pisciculture (souches 07/71 et 23/75 respectivement) et étaient produits sur cellules en culture EPC à 14° C suivant des techniques décrites précédemment (DE KINKELIN et LE BERRE, 1979).

### 4. Protocole d'infection

Les poissons étaient maintenus dans des aquariums de 8 l. alimentés en eau de ville déchlorée à 10° C  $\pm$  1° C avec un débit de 1 l./mn. Une aération supplémentaire était assurée grâce à des diffuseurs alimentés par un surpresseur. Lors de l'infection l'arrivée d'eau était coupée, le volume d'eau ramené à 3 l. et le virus ajouté à raison de 5 x 10<sup>4</sup> unités formant plage (ufp) par ml. L'arrivée d'eau était rétablie après 3 h. Les poissons étaient nourris à l'aide de granulés du commerce deux fois par jour et les morts enregistrés quotidiennement avec vérification des lésions (distension abdominale pour la NPI, hémorragies et exophtalmie dans le cas de la SHV). Les animaux étaient suivis jusqu'à cessation complète des mortalités.

## RÉSULTATS

Les taux de survie et les poids moyens des différents lots conservés à Gournay sont donnés dans le tableau 1.

Après infection par le virus de la NPI la mortalité due au virus est apparue dans les délais attendus (10 jours) avec les symptômes et lésions caractéristiques (nage en vrille et distension abdominale) de façon tout à fait parallèle chez les hybrides et les témoins diploïdes. Le virus fut aisément réisolé dans les deux cas. Deux mois après infection les mortalités avaient cessé. Il faut noter

Série	Lot	Survie au stade oeillé	Survie à 3 mois		Poids moyen (g)
			s1	s2	
1ère	A.C. diploïde	97,0	77,0	-	0,358
	HYB triploïde	86,5	69,1	89,7	0,189
2ème	A.C. diploïde	96,0	89,7	-	0,347
	A.C. triploïde	79,1	56,9	63,4	0,476
	HYB triploïde	67,7	44,2	49,3	0,283

**Tableau 1 :** Taux de survie au stade œillé et 3 mois après la fécondation (90 jours pour la 1ère série, 105 jours pour la 2ème) et poids moyen à 3 mois :  
s1 : survie en % des ovules inséminés.  
s2 : survie en % du lot A.C. diploïde.

**Table 1 :** : Survival rate at eyed stage and 3 months after fertilization (90 days for first series, 105 days for second series) and mean weight at 3 months. S<sub>1</sub> : Survival expressed as percent of inseminated ova. S<sub>2</sub> : Survival expressed as percent of rainbow trout (AC) diploid survival.

que dans le même temps les témoins non infectés subissaient une mortalité discrète due à des causes diverses (mort d'animaux malformés, compétition) éliminant 22 % des hybrides et 20 % des A.C. diploïdes. Cette mortalité était sans commune mesure avec celle des lots infectés (68 % et 72 % respectivement, tableau 2).

Génotype	Nombre de morts (%)	
	Témoins non infectés	Infectés
Hybride A.C. x Coho triploïde	66 (22)	203 (68)
A.C. diploïde	61 (20)	216 (72)

**Tableau 2 :** Mortalité totale deux mois après infection dans des lots de 300 poissons infectés par le virus de la NPI (type Sp) six semaines après éclosion.

**Table 2 :** Total mortality two months after infection in groups of 300 fish infected by IPN (Sp type) Virus six weeks post-hatch.

Après infection par la SHV types 1 et 3 des poissons appartenant aux lots précédents, mais âgés cette fois-ci de cinq mois, les mortalités sont apparues dès le cinquième jour après infection, avec observation des lésions hémorragiques, chez les témoins A.C. diploïdes, éliminant en un mois 36 % (type 1) et 92 % (type 3) des animaux (tableau 3), tandis que les hybrides infectés ne subissaient aucune mortalité de même que les témoins non infectés.

Génotype	Nombre de morts (%)		
	Témoins non infectés	Infectés type 1	Infectés type 3
Hybride A.C. x Coho triploïde.	1 (2)	0 (0)	0 (0)
A.C. diploïde	1 (2)	18 (36)	46 (92)

**Tableau 3 :** Mortalité totale un mois après infection dans des lots de 50 poissons infectés par le virus de la SHV de type 1 et 3, 5 mois après éclosion.

**Table 3 :** Total mortality one month after infection in groups of 50 fish infected by VHS Virus type 1 and 3, five months post-hatch.

Les résultats obtenus avec la SHV type 1 ont été confirmés sur des poissons provenant d'une seconde série de fécondations qui comprenait cette fois des témoins arc-en-ciel triploïdes (tableau 4). L'épreuve par le virus SHV type 1 fut cette fois plus efficace, éliminant 70 % des témoins diploïdes et 80 % des témoins triploïdes, tandis que les hybrides résistaient encore totalement à l'épreuve. Le virus ne fut pas retrouvé sur dix hybrides sacrifiés en fin d'expérience.

Génotype	Nombre de morts (%)	
	Témoins non infectés	Infectés
Hybride A.C. x Coho triploïde	0 (0)	0 (0)
A .C. triploïde	0 (0)	24 (80)
A .C. diploïde	1 (3)	21 (70)

**Tableau 4 :** Mortalité totale un mois après infection dans des lots de 30 poissons infectés par le virus de la SHV type 1, 6 mois après éclosion.

**Table 4 :** Total mortality one month after infection in groups of 30 fish infected by VHS Virus type 1, six months post-hatch.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans les expériences exposées ci-dessus qui ont porté sur 2 séries de fécondations, les hybrides triploïdes truite arc-en-ciel x saumon coho ont été soumis à trois souches de virus (NPI et 2 sérotypes de SHV) qui représentent les souches virales répandues dans les salmonicultures françaises.

Dans la première série d'expériences les hybrides se sont révélés tout à fait sensibles à la NPI, mais résistants au deux sérotypes du virus de la SHV. Le type 3 présente régulièrement un pouvoir pathogène plus élevé que le type 1 pour la truite arc-en-ciel. Cette différence s'est trouvée ici augmentée du fait que l'épreuve par le type 1 a été particulièrement peu dévastatrice. La deuxième série a confirmé la résistance totale au sérotype 1, avec cette fois une épreuve plus conforme à ce qui était attendu. Il va de soi que ces résultats sont préliminaires et que des expériences sont en cours pour les confirmer à plus grande échelle. Cependant les premières observations en pisciculture confirment la résistance à la SHV. Le fait que les hybrides héritent de la résistance de leurs pères à la SHV, mais pas de leur résistance à la NPI, suggère que les mécanismes présidant à la résistance du saumon coho

à ces deux virus, très différents tant par leur structure que par leur pathogénie, sont eux aussi différents. Les taux de survie précoce de ces hybrides apparaissent plus élevés que ceux rapportés précédemment (respectivement 89,7 % et 49,3 % du témoin A.C. diploïde dans les séries 1 et 2 contre 15,6 % dans l'expérience de CHEVASSUS *et al.*, 1983). De tels rendements, s'ils se confirment, autoriseraient la production de ces animaux de manière économiquement acceptable. Par contre, les performances de croissance apparaissent inférieures et devront être mieux précisées avant d'envisager la diffusion à grande échelle d'une telle technique de lutte contre la SHV.

### Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une Action Thématique Programmée "Génétique et résistance aux maladies" et a bénéficié d'un soutien du Conseil Supérieur de la Pêche.

La collaboration technique de Corinne TORCHY \* et de G. BURGER \*\* a été précieuse. Nous remercions Monique BEARZOTTI pour la production du virus de la SHV utilisé et Marie-Claire LE COCHENNEC \* pour la frappe du manuscrit

### BIBLIOGRAPHIE

- BILLARD R., 1977. Utilisation d'un système Tris-Glycocolle pour tamponner le dilueur d'insémination pour truite. *Bull. Fr. Pisc.*, 264 : 102-112.
- BLANC J.M., CHEVASSUS B., 1979. Interspecific hybridization of salmonid fish. I. Hatching and survival up to the 15th day after hatching in F 1 generation hybrids. *Aquaculture*, 18 : 21-34.
- BLANC J.M., CHEVASSUS B., 1982. Interspecific hybridization of salmonid fish. II. Survival and growth up to the 4th month after hatching in F 1 generation hybrids. *Aquaculture*, 29, 383-387.
- CHEVASSUS B., GUYOMARD R., CHOURROUT D., QUILLET E., 1983. Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. *Genet. Sel. Evol.*, 15 (4) : 519-532.
- CHEVASSUS B., PETIT J., 1975. Hybridation artificielle entre la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* Richardson) et le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Ann. Genet. Sel. Anim.*, 7 : 1-11.
- CHEVASSUS B., QUILLET E., CHOURROUT D., 1983. Note technique : obtention d'animaux triploïdes chez la truite arc-en-ciel. *Bull. Fr. Pisc.*, 290 : 161-164.
- CHOURROUT D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod. Nutr. Dev.*, 20, 727-733.
- CHOURROUT D., QUILLET E., 1982. Diploid gynogenesis in the rainbow trout : early survival and sex of the progenies. Production of all-triploid populations. *Theor. Appl. Genet.*, 63, 201-205.
- DORSON M., 1982. Nécrose pancréatique infectieuses des salmonidés : état des connaissances concernant les virus et les possibilités de lutte contre la maladie. *Bull. Fr. Pisc.*, 285 : 195-209.
- DORSON M., CASTRIC J., TORCHY C., 1978. Infectious pancreatic necrosis virus of salmonids : biological and antigenic features of a pathogenic strain and of a non pathogenic variant selected in RTG<sub>2</sub> cells. *Journal of Fish Diseases*, 1 : 309-320.
- JENSEN M.H., 1965. Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 126 : 422-426.
- DE KINKELIN P., LE BERRE M., MEURILLON A., 1974. Septicémie hémorragique virale : démonstration de l'état réfractaire du saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) et de la truite fario (*Salmo trutta*). *Bull. Fr. Pisc.*, 253 : 166-176.

- DE KINKELIN P., LE BERRE M., 1977. Isolement d'un rhabdovirus pathogène de la truite fario (*Salmo trutta*). *C.R. Acad. Sc. Paris*, 284, série D, 101-104.
- DE KINKELIN P., LE BERRE M., 1979. Mass virus production in fish cell system. *Develop. Biol. Standard.*, 42 : 99-104.
- DE KINKELIN P., 1983. Viral haemorrhagic septicaemia. Antigens of fish pathogens. Collection Fondation Marcel Mérieux, p. 51-62.
- LE BERRE M., DE KINKELIN P., METZGER A., 1977. Identification sérologique des rhabdovirus des Salmonidés. *Bull. Off. int. Epiz.*, (5-6) : 391-393.
- ORD W., LE BERRE M., DE KINKELIN P., 1976. Viral hemorrhagic septicaemia : comparative susceptibility of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and hybrids (*S. gairdneri* x *Oncorhynchus kisutch*) to experimental infection. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 33, (6) : 1205-1208.
- VESTERGARD-JORGENSEN P.E., KEHLET N.P., 1971. Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in danish rainbow trout : their serological and pathogenic properties. *Nord. Vet. Med.*, 23 : 568-575.
- WOLF K., SNIESZKO S.F., DUNBAR C.E., PYLE E.A., 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 104 : 105-108.