

MORTALITÉ ET PRODUCTION D'INTERFÉRON
CIRCULANT CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL
APRÈS INFECTION EXPÉRIMENTALE
AVEC LE VIRUS D'EGTVED :
INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

M. DORSON et P. de KINKELIN

avec la collaboration technique de Corinne TORCHY et de Monique LE BERRE

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

RÉSUMÉ

La Septicémie Hémorragique Virale (SHV) de la Truite Arc-en-Ciel est une maladie d'eau froide (température inférieure à 14°C) qui est causée par le virus d'Egtved. L'injection de ce virus à la Truite provoque l'apparition de taux élevés d'interféron circulant, parallèles à la virémie, et entraîne des mortalités aussi bien à 15°C qu'à 10°C. La synthèse d'interféron est plus précoce à 15°C (maximum au 2^e jour) qu'à 10°C (maximum au 4^e jour). Ceci est un argument en faveur de l'hypothèse d'une intervention de l'interféron dans la résistance de la Truite à la SHV quand la température de l'eau dépasse 14°C.

INTRODUCTION

Le virus d'Egtved (ZWILLENBERG, JENSEN et ZWILLENBERG, 1965), un rhabdovirus, est l'agent de la Septicémie Hémorragique Virale (SHV). Cette maladie est responsable de sévères mortalités chez les Truites Arc-en-Ciel des salmonicultures européennes. Bien que le virus se développe parfaitement *in vitro* à la température de + 15°C, la maladie ne s'observe pas en pisciculture quand la température de l'eau dépasse 14°C. D'autre part, si le virus est un très médiocre immunogène (VESTERGÅRD-JØRGENSEN, 1971), tout au moins pour l'induction d'anticorps neutralisants, il se révèle un bon inducteur d'interféron pour la Truite Arc-en-Ciel (de KINKELIN et DORSON, 1973). Il est donc nécessaire d'apprécier le rôle de la production

d'interféron dans la résistance du poisson à la maladie quand la température de l'eau dépasse + 14°C. L'importance de la température dans tout le métabolisme des poïkilothermes est connue, et en particulier celle-ci affecte la cinétique de production des anticorps chez les poissons (AVTALION *et al.*, 1973). D'autre part, la production d'interféron par des cellules de mammifères en culture est plus précoce à température élevée (LAI et JOKLIK, 1973).

Nous avons cherché à retrouver cette influence au niveau de la production d'interféron par la Truite, à des températures proches de la température critique (14°C) pour le développement de la maladie.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Poissons et prélèvements

Les Truites Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri* RICHARDSON) provenaient d'une pisciculture indemne des deux viroses qui affectent la salmoniculture européenne, la Septicémie Hémorragique Virale (SHV) et la Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI). Les animaux étaient maintenus dans des bacs de 150 l alimentés en eau de ville déchlorée et aérée par recyclage ; un groupe réfrigérant associé à un échangeur thermique assurait le refroidissement de l'eau d'un des bacs. Les poissons étaient identifiés grâce à des incisions des opercules réalisées suivant un code déterminé. Pour les essais de contagion les poissons pouvaient être isolés dans des cages flottantes confectionnées à l'aide d'un grillage en matière plastique.

Les prises de sang ont été effectuées en alternance, par ponction cardiaque et saignée à l'artère caudale. Le sérum destiné à la recherche d'interféron était obtenu par centrifugation (5 000 g, 10 mn) après formation du caillot (2 à 3 h à la température ambiante et une nuit à + 4°C). Le sang destiné à la mesure de la virémie était immédiatement dilué au 1/10 dans du milieu de Eagle maintenu à 0°C et le caillot éliminé deux heures après par centrifugation. Tous les prélèvements ont été systématiquement congelés avant titrages de façon à standardiser les conditions de ceux-ci.

La recherche du virus dans les cadavres a été opérée sur la rate et le rein antérieur. L'extraction du virus a été réalisée par broyage des organes en présence de milieu de Eagle et centrifugation (5 000 g, 10 mn), toutes les opérations étant réalisées à une température inférieure à + 10°C. Des prises de 0,1 ml du surnageant ont été inoculées à des cellules FHM et le virus identifié par séroneutralisation à l'aide d'un sérum de lapin monospécifique.

Cellules et virus

Deux lignées cellulaires ont été utilisées : des cellules de Truite Arc-en-Ciel, Rainbow Trout Gonad ou RTG 2 (WOLF et QUIMBY, 1962) et des cellules d'un cyprinidé, Fathead Minnow ou FHM (GRAVEL et MALSBERGER, 1965). Ces lignées ont été cultivées en milieu d'Eagle modifié par Stoker (Eurobio, Paris) dans des conditions déjà décrites, ainsi que la production du virus d'Egtved et son titrage par la méthode des plages en cellules FHM (de KINKELIN et SCHERRER, 1970). Le virus de la NPI (WOLF *et al.*, 1960) utilisé pour les titrages d'interféron appartient à la collection du laboratoire d'ichtyopathologie (souche 27.70). Ce virus est produit à 14°C en cellules RTG 2, âgées de deux jours et arrivées à la confluence. Après apparition d'un effet cytopathogène marqué, les cellules sont collectées, soumises à l'action des ultrasons et les débris cellulaires éliminés par centrifugation (5 000 g, 10 mn). Le virus de la NPI a été conservé à — 30°C dans un mélange à parties égales de milieu de Eagle et de glycérol. Les titrages sont réalisés sur cellules RTG 2 suivant des modalités identiques à celles décrites pour le virus d'Egtved.

Titrage de l'interféron

Les sérums sont préalablement chauffés (37°C, 2 h) de façon à éliminer totalement le pouvoir infectieux du virus d'Egtved circulant. Il a été démontré auparavant que le virus d'Egtved inactivé par chauffage était incapable d'induire la production d'interféron dans les cellules de titrage.

D'autre part, toutes les truites Arc-en-Ciel possédant dans leur sérum des anticorps neutralisant le virus de la NPI (DORSON et de KINKELIN, 1974), il a été vérifié que cette activité ne s'exerçait pas dans le test utilisé. Des monocouches de RTG 2 âgées de 24 h, en boîte de Pétri, sont traitées pendant une nuit (16 h) par 1 ml de la dilution du sérum. Après un double rinçage par du milieu de Eagle, elles sont éprouvées par 100 u.f.p. du virus de la NPI. L'effet interféron se manifeste par une réduction du nombre de plages par rapport à un témoin non traité ou traité pendant une nuit par un sérum normal dilué au 1/10^e. La conversion du pourcentage de réduction du nombre de plages en unités interféron a été réalisée d'une façon classique (WAGNER, 1961), une réduction de 50 p. 100 correspondant par définition à une unité interféron.

RÉSULTATS

A. — Production d'interféron, virémie et mortalité à + 10° et + 15°C

Dans deux bacs identiques, maintenus respectivement à des températures de 10° ± 1°C et 15° ± 1°C, ont été placées 30 truites (poids moyen, 80 g) et 10 truitelles (poids moyen, 20 g), ces dernières isolées dans des cages flottantes. Tous les poissons de la classe 80 g ont reçu par injection intrapéritonéale 5 × 10⁶ u.f.p. du virus d'Egtved au jour 0. Dans chacun des deux lots (10 et 15°C), 10 poissons furent saignés aux jours 3, 9, 14 (série 10_A et 15_A), 10 autres au jour 4, 11 et 17 (série 10_B et 15_B). Les 10 poissons restants (10_C et 15_C) étaient destinés à contrôler la mortalité sur des sujets non soumis à la saignée. Enfin, les 10 poissons maintenus en cage (série D) ont permis de suivre la mortalité dans des conditions « naturelles » de contagion. Dans le sang des poissons des séries A et B, furent suivies à la fois la production d'interféron et la virémie. Les quelques poissons ayant succombé aux manipulations ne furent pas comptés. D'autre part, les titrages d'interféron et la détermination de la virémie n'ont été effectués que sur une fraction des sujets d'expérience, choisis de façon à obtenir des résultats à la fois pour des poissons morts et survivants. Le tableau 1 fournit les mortalités observées au 20^e jour après la phase aiguë de la maladie. Aucun décès ne fut enregistré entre le 20^e et le 40^e jour (fin de l'expérience). Les sujets morts présentaient tous, à divers degrés, les lésions

TABLEAU I

Mortalités enregistrées après 20 jours parmi des truites de 80 g infectées au jour 0 par injection intrapéritonéale de 5 × 10⁶ UFP de virus de la SHV (séries A, B, C,) et des truitelles de 20 g infectées par contagion avec les précédentes (série D)

Température d'élevage	Lots expérimentaux		
	Truites infectées et saignées (séries A et B)	Truites infectées non saignées (série C)	Truitelles maintenues en cage (série D)
10° ± 1	9/20	5/10	9/10
15° ± 1	6/20	3/10	0/10

caractéristiques de la SHV : exophtalmie prononcée due à des hémorragies des espaces rétrooculaires, hémorragies dans la musculature. Enfin, le virus a été retrouvé et identifié dans les organes des poissons morts de toutes les séries. Dans les essais de contagion « naturelle » (série D), nous avons retrouvé ce qui est de règle en pisciculture : l'absence de maladie à + 15°C. En revanche, par injection, on peut provoquer une mortalité notable à 15°C, série A, B, C (tabl. 1). Le tableau 2 donne la production d'interféron et la virémie chez les mêmes poissons, et permet les remarques suivantes : des titres élevés en interféron circulant peuvent être obtenus aussi bien à 10° qu'à 15°, et il existe une grande hétérogénéité entre les divers individus dans l'intensité de la réponse. Ces titres élevés coïncident avec une virémie intense et les poissons meurent malgré un titre élevé en interféron dans leur sérum. Enfin, les survivants éliminent le virus de leur circulation. Les résultats précédents ne permettent pas d'établir une différence entre la cinétique de production à 10° et 15°C ; on note seulement à la seconde saignée que le titre en interféron a relativement baissé d'une façon plus importante chez les animaux maintenus à 15°C que chez ceux maintenus à 10°C.

TABLEAU 2

Virémie et production d'interféron chez des truitelles (poids moyen 30 g) infectées au jour 0 par injection intrapéritonéale de 5×10^6 UFP de virus de la SHV

- Virémie : Unités formant plage (UFP) par ml de sang
- Interféron : Unités interféron (UI) par ml de sérum

Température	N° de la truite	1 ^{er} prélèvement Jour 3 (A) et 4 (B)		2 ^e prélèvement Jour 9 (A) et 11 (B)		3 ^e prélèvement Jour 14 (A) et 17 (B)		Sort après 40 j
		Virémie	Interféron	Virémie	Interféron	Virémie	Interféron	
10°C ± 1°	10 B (3)	10 ⁴	39	0	24	0	25	Survivante
	10 B (4)	0	125	0	3,5	0	2,5	Survivante
	10 A (1)	2 × 10 ³	480	8 × 10 ⁵	900			† au jour 12
	10 B (2)	3 × 10 ⁴	2 100	1,5 × 10 ⁵	415			† au jour 16
	10 B (7)	10 ²	380	1,2 × 10 ⁵	300			† au jour 15
	10 B (9)	2 × 10 ³	300	4 × 10 ⁴	120			† au jour 17
15°C ± 1°	15 A (2)	4 × 10 ³	485	3 × 10 ³	92	0	3	Survivante
	15 A (3)	10 ³	2 300	0	0	0	0	Survivante
	15 B (1)	0	100	0	4,5	0	4,5	Survivante
	15 A (8)	3 × 10 ³	2 750	3 × 10 ⁴	240			† au jour 11
	15 A (10)	3 × 10 ⁴	> 3 000	10 ³				† au jour 10
	15 B (10)	8 × 10 ³	380					† au jour 8

B. — Cinétique de production d'interféron à + 10° et + 15°C

Une seconde expérience a été réalisée dans des conditions d'élevage similaires (11° ± 1°C et 15° ± 0,5°C pour les températures) avec, dans chaque lot, 10 sujets d'un poids plus élevé (200 g), recevant $1,5 \times 10^5$ u.f.p. de virus, et chez lesquels seule la production d'interféron a été recherchée au cours de 6 saignées successives. La courbe de production d'interféron chez trois sujets de chaque lot montre une

nette différence dans la cinétique (fig. 1). Pour les poissons maintenus à 15°C, le maximum de production est atteint à la seconde saignée (2^e jour), alors qu'il faut attendre la troisième saignée (4^e jour) pour les sujets maintenus à 11°C.

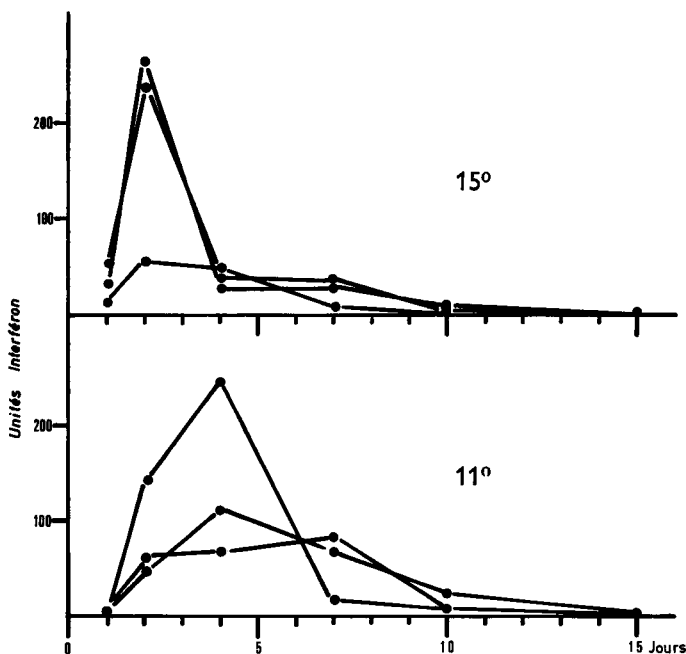


FIG. 1. — Production d'interféron dans deux lots de 3 truites Arc-en-Ciel (poids moyen 200 g) infectées au jour 0 avec $1,5 \times 10^6$ UFP du virus de la SHV, et maintenues à $11^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et $15^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ respectivement

DISCUSSION

L'injection de doses élevées de virus d'Egtved à des truites Arc-en-Ciel provoque une mortalité importante à 10°C, et ceci correspond bien à ce qui est observé en pisciculture. Cependant l'infection par voie parentérale a provoqué aussi la maladie aiguë à 15°C, ce qui était moins attendu. En fait, les conditions d'infection sont très différentes, et l'introduction brutale de plusieurs millions de virions déborde le mécanisme réactionnel éventuel jouant lors d'une contagion « ordinaire ». En effet, les truitelles infectées par contagion ont fourni des résultats plus conformes aux observations de terrain : mortalité très forte à 10° et nulle à 15°C. Des titres en interféron circulant élevés (plus de 2 000 chez plusieurs poissons) ont été obtenus aussi bien à + 10°C qu'à + 15°C et ces titres élevés coïncident avec une virémie importante, ce qui est classique chez les mammifères (BARON *et al.*, 1966). Cependant, une forte production d'interféron n'empêche pas les poissons de succomber : on assiste en quelque sorte à une course de vitesse entre la production d'interféron et le développement du virus, de l'issue de laquelle dépend sans doute le sort du poisson. Aucune différence marquante ne peut être mise en évidence dans l'intensité de la production d'interféron entre les poissons maintenus à 10°C et ceux maintenus à

15°C. Si une telle différence existe, elle est masquée par la grande hétérogénéité dans les réponses individuelles et le petit nombre d'animaux d'expérience. Cette hétérogénéité est constante : en effet, de même qu'il existe des lignées de souris bonnes et mauvaises productrices d'interféron (DE MAEYER et DE MAEYER-GUIGNARD, 1968), il doit exister des truites bonnes et mauvaises productrices. Mais l'équivalent des lignées pures de mammifères de laboratoire n'existe pas chez les poissons, et la population ayant fourni les sujets expérimentaux est génétiquement très hétérogène. Cependant, une différence nette apparaît dans la cinétique de production (fig. 1). Malgré le petit nombre de cinétiques individuelles (seuls ont été retenus les animaux ayant fourni suffisamment de sang à toutes les saignées), la production d'interféron apparaît plus tardive et plus étalée dans le temps à + 10°C qu'à + 15°C. Les dates correspondant au maximum de production d'interféron (2^e jour à 15°C et 4^e jour à 10°C pour l'expérience rapportée) ne sont pas absolues : des saignées quotidiennes auraient permis d'obtenir une image plus précise. La synthèse d'interféron chez la truite est beaucoup plus précoce — avec les moyens de détection dont nous disposons — que celles des anticorps chez le même animal : à 18°C les anticorps sériques antibactériophages ne sont détectables qu'à partir de 15 jours après l'immunisation (DORSON, 1972). On retrouve une différence comparable à celle qui existe chez les mammifères pour ces deux phénomènes : la production d'interféron est décelable dans le sérum avant celle des anticorps. Cependant, les cinétiques obtenues pour la truite infectée avec le virus d'Egtved sont comparables à des cinétiques obtenues chez la souris infectée avec le virus MP (PADNOS, SHIMONASKI et CAME, 1971) ou le virus de Germiston (BARON *et al.*, 1966). On peut néanmoins supposer que la synthèse d'interféron — après injection du même inducteur — sera plus tardive chez la Truite que chez les mammifères. La comparaison ne pourra être faite que grâce à l'emploi d'inducteurs non viraux (POLY IC, Statolon). On peut remarquer des différences importantes entre les résultats de l'expérience 1 (tabl. 2) et ceux de l'expérience 2 (fig. 1). Ces différences portent sur l'intensité de la production moyenne d'interféron et la durée de celle-ci (dans le tableau 2, on constate des titres en interféron encore élevés aux jours 9 et 11, ce que nous ne trouvons pas sur la figure 1). Il s'agissait en fait de deux expériences totalement indépendantes, et les animaux, leur taille, les doses de virus injectées étaient différents. Il sera intéressant de réaliser ces mêmes cinétiques avec plusieurs doses de virus. En effet, des expériences préliminaires consistant en l'injection de doses croissantes de virus ont montré que les doses les plus fortes provoquent une mortalité moins importante que des doses modérées (DORSON et de KINKELIN, observations non publiées).

Il n'y a rien de surprenant à retrouver pour la production d'interféron circulant les différences de cinétique en fonction de la température déjà connues chez le poisson pour la production des anticorps sériques (AVTALION *et al.*, 1973). Ces résultats confortent l'hypothèse, déjà formulée (de KINKELIN et DORSON, 1973), selon laquelle la production d'interféron pourrait être responsable de la résistance du poisson au-dessus de 14°C : l'équilibre production de virus — synthèse d'interféron mentionné plus haut serait déplacé dans un sens favorable à la survie du poisson infecté. La confirmation de cette hypothèse nécessite de réaliser la protection des truites contre la SHV par injection soit d'interféron sérique, soit d'un inducteur non viral.

SUMMARY

MORTALITY AND INTERFERON PRODUCTION
IN RAINBOW TROUT EXPERIMENTALLY INFECTED
WITH EGTVED VIRUS : ROLE OF TEMPERATURE

Virus haemorrhagic Septicemia (VHS), disease of Rainbow Trout, typically occurs in cold water (temperature under 14°C). The causative agent is a rhabdovirus, Egtved virus. Injection of Egtved virus in trout results in high levels of circulating interferon, corresponding to a strong viremia, and is followed by mortalities at 15°C as well as at 10°C. In contrast, natural infection (by placing healthy fish in the same water as infected fish) provokes mortalities only at 10°C. Interferon synthesis is earlier at 15°C (maximum yield at 2 nd day) than at 10°C (maximum yield at 4th day). This fact is in agreement with the hypothesis of an important role of interferon synthesis in resistance of trout to the disease when water temperature rises over 14°C.

РЕЗЮМЕ

Смертность и выделение циркулирующего интерферона у пеструшки при экспериментальном заражении вирусом Эгтведа : влияние температуры.

Септическое вирусное кровоизлияние /С.В.К./ петрушки — болезнь холодной воды /при температуре ниже 14°, вызываемая вирусом Эгтведа. Впрыскивание вируса петрушке вызывает увеличение содержания интерферона, соответствующее развитию вирусной болезни, оно же вызывает смерть при 15° и при 10°. Синтез интерферона происходит скорее при 15° /максимум на второй день/, чем при 10° /максимум на четвёртый день/.

Указанные факты подтверждают гипотез о роли интерферона в устойчивости пеструшки к С.В.К., когда температура воды превышает 14°.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AVTALION R. R., WOJDANI A., MALIK Z., SHAHRABANI R., DUCZYMINER M., 1973. Influence of environmental temperature on the immune response in Fish. *Curr. Topics in Microbiol. Immunol.*, **61**, 1-35.
- BARON S., BUCKLER C. E., McCLOSKEY R. V., KIRSCHSTEIN R. L., 1966. Role of interferon during viremia. I. Production of circulating interferon. *J. Immunol.*, **96** (1), 12-16.
- DE KINKELIN P., DORSON M., 1973. Interferon production in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *J. gen. Virol.*, **19**, 125-127.
- DE KINKELIN P., SCHERRER R., 1970. Le virus d'Egtved. I. Développement, stabilité et structure de la souche danoise F. *Ann. Rech. vétér.*, **1** (1), 17-30.
- DE MAYER E., DE MAYER-GUIGNARD J., 1968. Influence of animal genotype and age on the amount of circulating interferon induced by Newcastle disease virus. *J. gen. Virol.*, **2**, 445-449.
- 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** (1), 93-107.
- DORSON M., DE KINKELIN P., 1974. Nécrose pancréatique infectieuse des Salmonidés : enquête sérologique dans les populations domestiques et sauvages. *Ann. Rech. vétér.*, **5** (2), 249-256.
- GRAVEL M., MALSBERGER R. G., 1965. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. New York Acad. Sci.*, **126**, 555-565.

- LAI M. H., JOKLIK W. K., 1973. The induction of interferon by temperature sensitive mutants of Reovirus, UV irradiated Reovirus and subviral Reovirus particles. *Virology*, **51** (1), 191-204.
- PADNOS M., SHIMONASKI G., CAME P. E., 1971. Interferon in Mice acutely infected with MP virus. *J. gen. Virol.*, **13**, 163-165.
- VESTERGÅRD-JØRGENSEN P. E., 1971. Egtved virus : demonstration of neutralizing antibodies in serum from artificially infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board. Canada*, **28** (6), 875-877.
- WAGNER R. R., 1961. Biological Studies of interferon. I. Suppression of cellular infection with Eastern Equine Encephalomyelitis virus. *Virology*, **13**, 323-337.
- WOLF K., QUIMBY M. C., 1962. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science, U. S. A.*, **135**, 1065-1066.
- 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.
- ZWILLENBERG L. O., JENSEN M. H., ZWILLENBERG H. L., 1965. Electron microscopy of the virus of viral haemorrhagic septicemia of rainbow trout. *Arch. ges. Virusforsch.*, **17**, 1-19.
-