

Identification génétique de souches de rhabdovirus isolées de perches et d'autres espèces de poissons

Chiraz Talbi, Joëlle Cabon, Marine Baud, Jeannette Castric, Laurent Bigarré (laurent.bigarre@anses.fr)

Anses, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané

Résumé

Les élevages de percidés (perche et sandre) se multiplient en Europe depuis quelques années. Avec l'intensification de la production, sont apparues des maladies à rhabdovirus qui entraînent parfois des mortalités importantes pouvant atteindre 40 % dans l'alevinage. Les outils de détection et d'identification de ces virus sont encore très limités faute de données suffisantes sur la structure génétique des populations virales. Nous avons donc initié la caractérisation moléculaire d'une série d'isolats associés à des épidémies en élevage en France depuis 1980 jusqu'à 2009. Les séquences obtenues montrent une forte diversité génétique se traduisant par la reconnaissance d'au moins deux génotypes. Par ailleurs, des isolats de rhabdovirus caractérisés à partir d'autres espèces de poissons d'eau douce (brochet, black-bass) montrent de fortes relations génétiques avec certains virus de percidés, suggérant une transmission horizontale inter-espèces. Autre résultat, des similarités génétiques aussi fortes qu'inattendues existent entre des isolats de régions géographiques distinctes en Europe démontrant des circulations de virus vraisemblablement liées à l'activité humaine. À ce jour, les données disponibles vont toutes dans le sens d'un vaste réservoir génétique de rhabdovirus portés par des poissons d'eau douce en milieu naturel, duquel émergent régulièrement des isolats virulents quand les géniteurs sont utilisés pour l'alevinage en ferme. Cette diversité génétique doit être mieux connue pour la mise au point de tests de diagnostic performants.

Mots clés

Transmission horizontale, transmission verticale, rhabdoviridés, vésiculovirus, pisciculture, diagnostic

Abstract

Genetic identification of rhabdovirus strains isolated in perch and other fish species

Percidae fish farming (perch and pike perch) has become more popular over the past few years in Europe. More intensive production has been accompanied by rhabdovirus diseases which can cause high mortality—up to 40 % among young fish. The tools needed to detect and identify these viruses are very limited due to a lack of data on the genetic structure of viral populations. We therefore initiated the molecular characterization of a series of isolates linked to epidemics in French fish farms from 1980 to 2009. The sequences obtained reveal broad genetic diversity, leading to the identification of at least two distinct genotypes. Rhabdovirus isolates characterized from other freshwater fish, such as pike and black bass, are genetically closely related to certain percidae viruses, suggesting horizontal transmission between species. We also found close, unexpected genetic similarities between isolates from geographically distinct European regions, revealing viral transmission most likely due to human activities. Data currently available support the idea of a vast genetic pool of rhabdoviruses carried by freshwater fish in their natural habitat from which virulent isolates regularly emerge when the when wild subjects are used for reproduction in fish farms are used in fish farms. This genetic diversity needs to be better identified to enable the development of efficient diagnostic tests..

Keywords

Horizontal transmission, vertical transmission, Rhabdoviridae, vesiculovirus, fish farming

En 2008, l'aquaculture a atteint le chiffre record de 46 % des apports dans la consommation de poissons dans le monde [1]. Cette part continuera de progresser avec la diminution des pêches de capture due à la surexploitation des stocks naturels et l'accroissement de la population mondiale. Voilà donc quatre décennies que le taux de croissance des productions aquacoles montre un rythme très soutenu, par exemple en Chine (11 % par an), en Amérique latine (20 %) et dans une moindre mesure en Europe (4,5 %). La France s'est distinguée par une forte croissance dans les années 1970 et 1980, suivie d'une stagnation, et même d'une régression ces 15 dernières années pour l'élevage de la truite. Dans ce contexte de forte concurrence internationale, l'une des réponses pour l'aquaculture française est la diversification des espèces élevées, associée à un effort soutenu pour la qualité des produits. Le pays est ainsi premier producteur européen d'alevins de bars et de daurades mais aussi premier producteur de caviar d'élevage.

L'élevage des percidés se place ainsi dans une niche économique encore peu importante, mais qui se développe progressivement en France et à l'échelle européenne pour répondre à une demande encore supérieure à l'offre, surtout en produits frais. Deux espèces, principalement la perche (*Perca fluviatilis*), mais aussi le sandre (*Sander lucioperca*), trouvent facilement des débouchés grâce à leurs qualités gustatives remarquables. À ce jour, la production nationale est faible (~ 120 tonnes/an) et l'on trouve sur les marchés des filets congelés issus de perches élevées ou pêchées en Russie, Estonie ou Pologne. Pour répondre à la demande, des élevages intensifs généralement basés sur des systèmes de production fonctionnant en circuit fermé, ont été créés (Irlande, Italie, Danemark, Suisse Pays-Bas et France).

Comme on pouvait le craindre, l'intensification des élevages de perche et des transports internationaux de géniteurs ont apporté leur lot de maladies infectieuses. Des épisodes de mortalités associés à des rhabdovirus ont été observés ces dernières années par exemple dans un élevage de perche irlandais ayant subi 40 % de pertes en 2005 ou dans un élevage de sandre danois qui a dû cesser son activité, la situation devenant incontrôlable. Historiquement, le premier rhabdovirus de perche (PRhV) a été isolé par hasard sur les sujets pré-adultes d'un étang de production de la région Centre, en France en 1980 [2]. Des perches de



Perches (*Perca fluviatilis*)

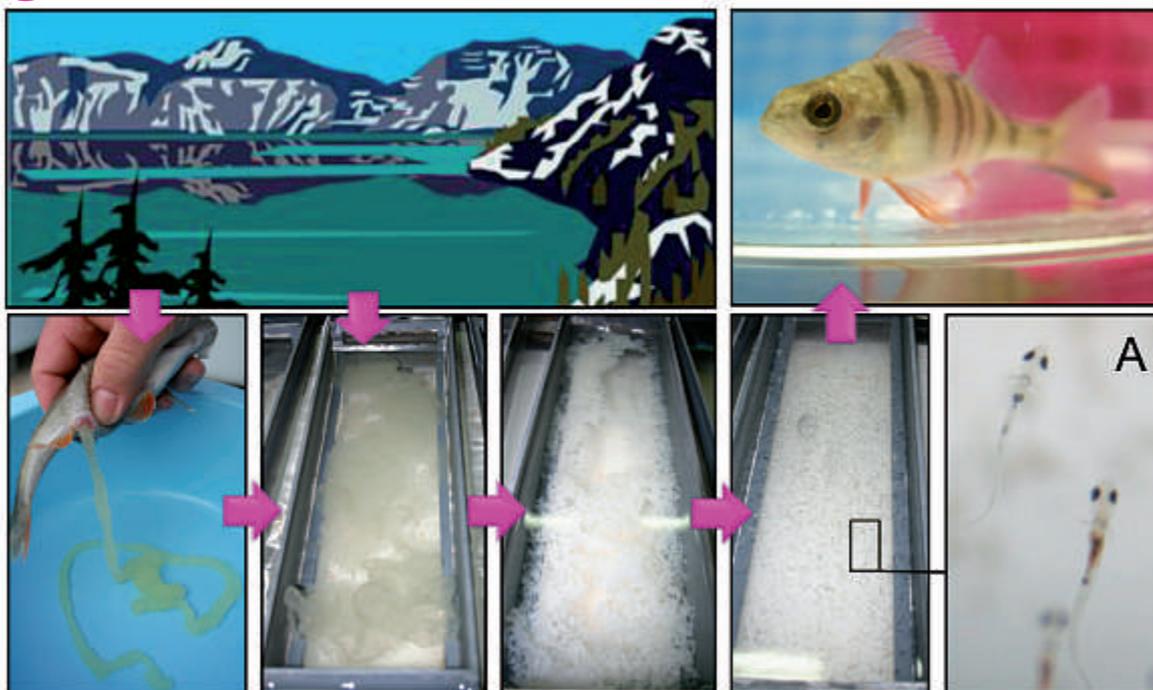


Figure 1. Étapes de la reproduction artificielle de la perche et incidence possible sur la transmission verticale des rhabdovirus. Des géniteurs ou des œufs en ruban sont prélevés dans le milieu naturel pour alevinage et grossissement. (A) stade alevin, particulièrement sensible à la maladie

cet étang avaient été introduites dans un laboratoire de l'Inra à des fins expérimentales mais rapidement des signes cliniques (pertes d'équilibre et nage désorganisée) sont apparus, pour aboutir à 30 % de mortalité. Le même scénario se reproduit en 2001 en Norvège avec des perches capturées dans un lac et acclimatées dans un laboratoire pour des études de reproduction [3]. Dans les deux cas cités, la présence d'un virus de la famille des *Rhabdoviridae* a été mise en évidence grâce à la culture cellulaire *in vitro*. En France, d'autres épisodes de mortalités se sont produits ces dernières années, non seulement en élevage, mais aussi en milieu naturel, notamment dans des lacs alpins (lac d'Annecy, lac Léman) [4]. En 1990, des mortalités massives d'alevins de sandre, corrélées à la présence de virus, ont été observées dans la région où avait été isolé à l'origine le PRhV. Cinq ans plus tard, toujours dans la même région, deux virus sérologiquement proches du PRhV étaient identifiés sur perche et black-bass. Ces éléments suggèrent une persistance de l'infection virale au sein des espèces réceptives de la région géographique concernée et la possibilité d'une transmission inter-espèces. En 2001, un virus a été isolé dans la Dombes sur des perches de 30 à 1000 g qui présentaient pour certaines de fines hémorragies sur le foie et des branchies pâles, démontrant que des poissons adultes sont également sensibles.

Comme pour toutes les viroses de poisson, la lutte repose avant tout sur la prévention en empêchant l'entrée des virus dans les sites de production, ce qui nécessite des outils de diagnostic performants et une bonne connaissance de la biologie, de l'épidémiologie et des possibles mouvements des populations virales existantes. Or, il n'existe pour ces rhabdovirus de percidés que des données encore très fragmentaires.

Transmission verticale

Bien qu'il n'existe pas de données expérimentales publiées à ce sujet, il semblerait que ces virus puissent être directement transmis des géniteurs aux œufs (ovo-contamination, interne ou externe) qui donnent alors naissance à des alevins contaminés. C'est ce schéma qui explique que nombre d'épisodes de mortalités aient lieu au stade alevin, après entrée dans l'élevage de matériel biologique provenant du

milieu sauvage (géniteurs, alevins ou œufs). En effet, les éleveurs et les chercheurs ont souvent recours au milieu naturel pour collecter des géniteurs ou des œufs. Le lac Léman et d'autres lacs alpins sont ainsi des sites privilégiés pour l'approvisionnement d'élevages aussi bien en Suisse, qu'en Italie ou en France. Les œufs, qui sont protégés par une gangue (on parle de « ruban »), peuvent être facilement prélevés dans l'eau et rapportés en élevage (Figure 1). Les progrès récents dans la biologie de la reproduction de la perche laissent présager l'abandon de ces pratiques d'approvisionnement à l'avenir, car il est désormais possible d'assurer le cycle complet de production en structure artificielle (utilisation de programmes photo-thermopériodiques) et de produire des pontes décalées hors saison (Fontaine, communication personnelle). Il devient par conséquent possible de limiter les risques d'introduction de virus dans un élevage intensif en sélectionnant d'emblée une population indemne. Une telle stratégie nécessite toutefois des outils de diagnostic spécifiques qui restent à développer.

Transmission horizontale

C'est le mode de contamination le plus fréquent chez les poissons. Les rhabdovirus aquatiques peuvent se transmettre horizontalement selon plusieurs modalités que l'on suppose valides pour les espèces virales affectant les percidés.

- La transmission horizontale directe est assurée par le contact entre un animal sain et un animal contaminé. Elle est particulièrement redoutable dans les élevages à forte densité ou parmi les espèces à comportement grégaire, ce qui est le cas de la perche.
- L'alimentation, qui utilise des poissons ou des déchets de poissons parfois contaminés, peut également favoriser une transmission directe [5]. C'est ce mode qui est à l'origine, il y a quelques décennies, de l'introduction du virus de la septicémie hémorragique (VHSV⁽¹⁾) dans des élevages de truites arc-en-ciel en Europe. Très vite, les procédés de préparation des aliments d'élevage (en granulés secs) ont neutralisé la propagation des virus par cette voie, mais il reste à l'échelle mondiale nombre d'élevages n'utilisant pas ces technologies.

(1) À déclaration obligatoire.

(2) La suspension virale est mélangée à l'eau dans laquelle baignent les animaux. Ce protocole se rapproche donc d'une contamination naturelle.

- Les autres modes de contamination horizontale sont indirects. L'eau est le principal véhicule de virus. C'est le cas pour les virus de la septicémie hémorragique, virus particulièrement redouté aussi bien dans les élevages de truites que dans le milieu sauvage (une épidémie affecte 18 espèces dans la région des grands lacs en Amérique du Nord depuis 2005 [6]) ainsi que pour celui de la nécrose hémato-poïétique infectieuse (IHNV). La transmission d'une virose entre deux élevages situés sur une même rivière illustre ce mode de transmission.
- La transmission de virus par l'intermédiaire de matériel contaminé (épuisettes, cuves de transport, matériel de tri, etc.) est également fréquemment mise en cause.
- En milieu sauvage ou en élevage extensif, la contamination, directe ou non, peut se faire par des appâts contaminés (pêche de loisir), tandis qu'en élevage extensif, elle peut se faire par l'introduction de poissons vivants lors d'opérations d'empoissonnement. Un tel scénario a été envisagé pour expliquer l'apparition récente d'un nouveau génotype de VHSV dans les grands lacs américains.

À ce jour, une seule expérimentation a été réalisée afin de tester le potentiel infectieux du PRhV sur perche [2] par voie horizontale. À partir de virus multiplié en culture cellulaire, des perchettes ont été infectées, soit par injection intracraniale, soit par injection intrapéritonéale ou encore par balnéation⁽²⁾, cette dernière voie simulant mieux une infection naturelle. Or, seules les infections par voie intracraniale ont provoqué des mortalités, ce qui suggère une virulence faible dans les conditions utilisées et avec les animaux testés. La possibilité de transmission par l'eau n'a donc pas pu être prouvée pour la perche, ce qui n'exclut pas ce mode de transmission en conditions naturelles, même s'il peut être modulé par des paramètres bien particuliers (charge virale, durée d'exposition, âge des alevins, température, etc.). En revanche, le virus s'est montré fortement pathogène par balnéation sur des alevins de brochet, entraînant une mortalité proche de 50 %. Toutefois, il n'a pas provoqué de mortalité sur des alevins de truite arc-en-ciel âgés de six semaines [7].

Porteurs sains

Les importances relatives de tous ces modes de transmission sont inconnues dans le cas des percidés. Quels qu'ils soient, un facteur épidémiologique clé est l'existence d'animaux porteurs de virus sans signe clinique. Ces porteurs sains circulent sans contrôle lors de transferts commerciaux, très fréquents aux échelles régionale et internationale. Faute d'outils performants pour diagnostiquer et écarter ces porteurs, les animaux suspects sont vraisemblablement introduits dans les élevages. Récemment, un isolat a été trouvé chez une perche saine pêchée dans un lac en Italie (Bovo, communication personnelle). Autre facteur mal connu, la température optimale de déclenchement de la maladie sachant que les variations saisonnières influencent fortement le déclenchement et l'intensité de la symptomatologie [3].

Enfin, une inconnue majeure reste la diversité génétique de ces virus de percidés. Combien de génotypes différents existe-t-il, avec quelle répartition géographique et quelle gamme d'hôtes ?

Identification et gamme d'hôte des rhabdovirus de percidés

La vaste famille des *Rhabdoviridae* comprend six genres et des dizaines d'espèces, affectant des hôtes aussi différents que des végétaux, des mammifères (exemple, le virus de la rage) et les poissons (ictvonline.org). Deux genres peuvent affecter ces derniers : les novirhabdovirus et les vésiculovirus. Le premier comprend plusieurs espèces, dont le VHSV et l'IHNV. Les vésiculovirus incluent, outre quelques virus de mammifères (exemple, le virus de la stomatite vésiculeuse), le virus de la virémie printanière de la carpe (SVCV). D'autres isolats issus d'autres poissons d'eau douce tels que le virus de l'alevin de brochet (PFRV) sont fortement apparentés à ce genre, même s'ils n'y sont pas encore officiellement rangés à ce jour. La classification est cependant

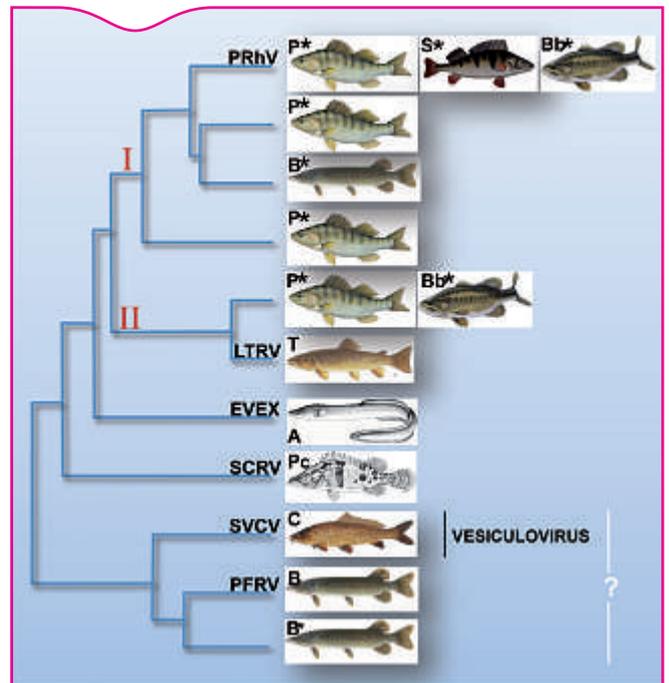


Figure 2. Relations génétiques (nucléoprotéine) entre plusieurs rhabdovirus isolés de poissons d'eau douce en France (*) et dans d'autres régions. Les isolats de perche des génogroupes I et II se distinguent par de faibles relations sérologiques inter-groupes. A : Anguille, B : Brochet, Bb : Black-bass, C : Carpe, P : perche, Pc : Perche chinoise, S : Sandre, T : Truite de lac (illustrations Wikipedia et FAO, échelle non respectée). PRhV : Perch Rhabdovirus; LTRV : Lake trout rhabdovirus; EVEX : *Eel virus european X*; SCRv : *Siniperca chuatsi rhabdovirus*; SVCV : *Spring viremia of carp virus*; PFRV : *Pike fry rhabdovirus*.

plus problématique pour une autre série de virus isolés de poissons d'eau douce (percidés, black-bass, ombre, brochet, truite sauvage, etc.), qui certes se rapprochent génétiquement des vésiculovirus, mais s'en distinguent au niveau sérologique et génétique [3, 8, 9]. Faute de séquençage complet du génome de ces isolats et de caractérisation biologique approfondie, leur classification reste encore incertaine.

Un travail précurseur de séquençage d'une courte portion du gène de la polymérase a montré que le virus de perche PRhV isolé en France en 1980 présente moins de 86 % de similarité avec deux autres espèces de vésiculovirus, les SVCV (carpe) et PFRV (brochet) ce qui explique l'absence de relations sérologiques observée [3, 10]. Un taux de similitude du même ordre a été trouvé entre le PRhV et un rhabdovirus de truite de lac sauvage de Finlande (LTRV), même si dans ce cas des relations sérologiques, faibles certes, ont été remarquées. En revanche, une forte similitude, supérieure à 97 %, a été mise en évidence entre le PRhV et un isolat de brochet du Danemark, un isolat de sandre de la région Centre et un isolat d'ombre (*Thymallus thymallus*) du Jura suggérant l'existence d'un complexe viral porté par plusieurs espèces dans des zones géographiques variées en Europe. Nous avons récemment apporté des éléments complémentaires en faveur de cette hypothèse grâce à de nouvelles sondes qui ont permis d'étudier la collection d'isolats viraux enrichie depuis trois décennies par plusieurs équipes nationales et internationales. Ainsi, des génotypes très similaires au PRhV sont trouvés chez d'autres espèces hôtes, telles que le black-bass de la région Centre, confirmant une gamme d'hôte élargie pour des virus fortement apparentés au PRhV. En poursuivant la caractérisation d'autres isolats de percidés, au moins deux génogroupes majeurs I et II ont été identifiés, l'un (I) étant séparé en trois branches dont l'une porte le PRhV (Figure 2). Le génogroupe II inclut deux isolats de black-bass et de perche de France, mais aussi deux isolats de truite sauvage du nord de l'Europe (LTRV).

Une telle diversité génétique implique des difficultés pour le développement d'outils de diagnostic très spécifiques, et indique une situation épidémiologique très complexe entre tous ces isolats issus de

poissons d'eau douce en Europe. Quels sont les facteurs à considérer pour comprendre cette situation? Les réservoirs viraux restent à identifier. En effet, les percidés coexistent avec d'autres espèces dans le milieu sauvage, et parfois en élevage, et peuvent sans doute échanger des virus. Par ailleurs, les transferts de poissons d'un environnement à un autre sont très fréquents, entre régions mais aussi de la ferme vers le milieu naturel (empoissonnement) et vice-versa (alevinage). En outre, certaines espèces sauvages réceptives telles que la truite de lac (*Salmo trutta*), sont susceptibles de véhiculer des virus du milieu marin vers le milieu dulçaquicole continental au cours de leur migration, ce qui élargit considérablement le réservoir viral potentiel. La détection en France d'un virus de perche génétiquement proche d'un virus de truite sauvage de Finlande pose la question du risque de propagation aux élevages de truite arc-en-ciel. La surveillance doit donc être accrue pour éviter l'émergence d'un virus potentiellement aussi virulent et contagieux que le VHSV, virus dont le contrôle a un coût important.

À cette fin, les efforts pour compléter le tableau global de la diversité génétique virale doivent être poursuivis, notamment à l'occasion de prélèvements de routine, sans lien obligatoire avec des épisodes de mortalités. C'est par hasard, au cours d'une surveillance de routine du VHSV, que le premier rhabdovirus de brochet a été isolé en France en 2008 à partir d'un poisson adulte asymptomatique. Après séquençage, le virus s'est révélé différent des deux autres virus de brochet connus à ce jour, dont le virus de brochet danois proche du PRhV. En revanche, de fortes similitudes ont été trouvées avec un virus de brochet identifié en Allemagne. Il semble donc probable que des campagnes de dépistage dans le milieu naturel ou en élevage semi-intensif permettraient de mettre en évidence de nouveaux virus.

Même si aucune séquence complète de rhabdovirus de percidés n'est encore disponible à ce jour, les informations génétiques acquises confortent l'idée d'une séparation entre les vésiculovirus et les isolats de percidés. Selon toute probabilité, ces virus seront classés dans un nouveau genre viral encore à créer, avec pour membre type un virus de poisson isolé en chine, le *Siniperca chuatsi* Rhabdovirus.

Remerciements

Les auteurs remercient les collègues français et étrangers qui, depuis 1986, ont fourni des isolats viraux ou des informations épidémiologiques (LDA 39, LDA 40, GDSAA, Inra-VIM, URAFPA Nancy Université, DTU Aarhus, IZS Padoue), particulièrement Pascal Fontaine, Pierre de Kinkelin et Françoise Pozet.

Références bibliographiques

- [1] Anonyme (2010) La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, Département des pêches et de l'aquaculture, FAO.
- [2] M. Dorson, C. Torchy, Chilmonczyk S., De Kinkelin P., Michel C. (1984) A rhabdovirus pathogenic for perch (*Perca fluviatilis* L.): isolation and preliminary study. *J Fish Dis*, 7: 241-245.
- [3] Dannevig B. H., Olesen N. J., Jentoft S., Kvellestad A., Taksdal T., Håstein T. (2001) The first isolation of a rhabdovirus from perch (*Perca fluviatilis*) in Norway. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 21(5): 186-194.
- [4] Pozet F., Morand M. (2005) Pathologie de la perche. *Aquafilia*, 9: 23-27.
- [5] Oidtmann B., Joiner C., Reese R. A., Stone D., Dodge M., Dixon P. (2011) Risks Associated with Commodity Trade: Transmission of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) to Rainbow Trout Fry from VHSV-Carrying Tissue-Homogenates. *Transboundary and Emerging Diseases*, in press.
- [6] Kim R., Faisal M. (2010) Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (Novirhabdovirus, *Rhabdoviridae*, Mononegavirales). *Journal of Advanced Research*.
- [7] Dorson M., De Kinkelin P., Torchy C., Monge D. (1987) Sensibilité du brochet *Esox lucius* à différents virus de salmonidés (NPI, SHV, NHI) et au rhabdovirus de la perche. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 307: 91-101.
- [8] Johansson T., Nylund S., Olesen N. J., Bjorklund H. (2001) Molecular characterisation of the nucleocapsid protein gene, glycoprotein gene and gene junctions of rhabdovirus 903/87, a novel fish pathogenic rhabdovirus. *Virus Res*, 80(1-2): 11-22.
- [9] Johansson T., Ostman-Myllyoja L., Hellstrom A., Martelius S., Olesen N. J., Bjorklund H. (2002) A novel fish rhabdovirus from sweden is closely related to the Finnish rhabdovirus 903/87. *Virus Genes*, 25(2): 127-138.
- [10] Betts A. M., Stone D. M., Way K., Torhy C., Chilmonczyk S., Benmansour A., De Kinkelin P. (2003) Emerging vesiculo-type virus infections of freshwater fishes in Europe. *Dis Aquat Organ*, 57(3): 201-212.

Le *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* est désormais consultable sur Internet.

Recherchez un article
du *Bulletin épidémiologique* sur:
www.anses.fr/bulletin-epidemiologique/index.htm

The screenshot shows the search results page of the ANSES Bulletin épidémiologique website. At the top, there is a search bar with the text "Rechercher un article" and a search button. Below the search bar, there is a list of search results. Each result is displayed in a table-like format with columns for the title, date, author, and keywords. The results are sorted by date, with the most recent at the top. The page also features a navigation menu at the top with links for "Accueil", "À propos", "Articles", "Revue de presse", and "Contact".

Titre de l'article	Date de publication	Auteur	Mots-clés / Mots-clés
Nouveaux articles de vulgarisation - séminaires de l'Institut	18/04/11	Jeanne Lerguez, Hélène Sedone, Ludovic Bédier, Nicolas Fréchet, Mathieu Chénou, Sylvain Dreyfus	Nouveaux articles, Séminaires
Étude de la contamination des huiles d'olive	10/01/11	Marcelle Cochereau-Laurin, Jean-Pierre Bessy	Huiles d'olive, Contamination, Huiles, Huiles d'olive
Étude de la contamination des huiles d'olive	10/01/11	Yves Benoit-Bellet, Ludovic Bédier, Marie-Dominique Bédier	Contamination, Huiles, Huiles d'olive
Polio - En France de nouvelles formes de la maladie ont été observées	10/01/11	Brigitte Goulet, Annette Fournier	Polio, France, Nouvelles formes
Étude de la susceptibilité génétique des salmonelles dans les élevages de volailles	10/01/11	Mélaine Puthod, Françoise Dubois, Mathieu Pithon, Coline Sarrat, Simon Le Hen, Sylvie Fontaine	Salmonelles, Élevages de volailles, France
20 ans de la maladie de la vache folle	10/01/11	Philippe Bessy	Maladie de la vache folle