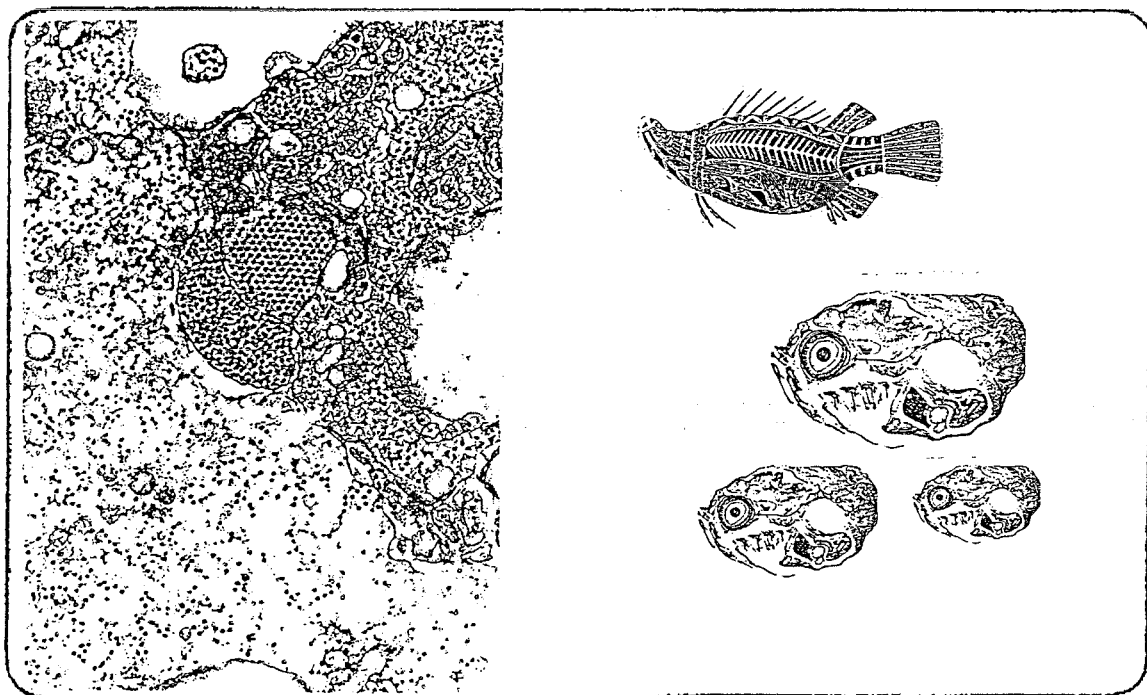


Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER

Département "Ressources Aquicoles"

MORTALITES MASSIVES EN ELEVAGE
LARVAIRE DE *Lates Calcarifer*
(Mise en évidence d'un virus neurotrope).

T. RENAULT, E. THOUARD et M. WEPPE



RIDRV-92-020-RA/COP TAHITI



Siège social 155, rue Jean-Jacques Rousseau 92188 Issy-les-Moulineaux Cedex
Tél. 46 48 21 00

Adresse : IFREMER
 Centre Océanologique
 du Pacifique
 B.P. 7004 TARAVALO
 TAHITI
 Polynésie Française

DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES

DEPARTEMENT "Ressources Aquacoles"

STATION/LABORATOIRE COP-Unité de Pathologie

AUTEURS (S) :		CODE :
T. RENAULT, E. THOUARD et M. WEPPE.		
TITRE :		Date : 27.07.92
Mortalités massives en élevage larvaire de <i>Lates calcarifer</i> (mise en évidence d'un virus neurotrope).		Tirage en nombre : 20
		Nb pages : 43
		Nb figures : 2
		Nb photos : 9
CONTRAT (intitulé)	Opération de recherche GCS/BAA 1990-1991	DIFFUSION
N° _____		libre <input checked="" type="checkbox"/>
		restreinte <input type="checkbox"/>
		confidentielle <input type="checkbox"/>

RESUME

Depuis 1986, l'élevage larvaire de *Lates calcarifer* se heurte au Centre Océanologique du Pacifique à d'importants problèmes de mortalités. Le suivi systématique en histologie classique a permis la mise en évidence de lésions particulières (vacuolisation et inclusions intracytoplasmiques) au niveau du tissu nerveux chez les animaux présentant des mortalités. L'examen en microscopie électronique de prélèvements provenant de sujets malades a révélé la présence de particules d'allure virale, de petite taille (25nm), de forme icosaédrique, isolées ou présentant un arrangement pseudo-cristallin, dans le cytoplasme de cellules nerveuses et rétinienne. Les différents caractères précédemment cités laissent penser que nous sommes en présence d'un virus appartenant à la famille des Picornaviridae. Ce virus a, 7 par ailleurs, été purifié à partir d'animaux présentant des mortalités. Cependant le rôle de ce dernier dans le processus pathologique observé reste à confirmer. Les divers essais de reproduction expérimentale de la maladie n'ont pas permis d'induire des mortalités ou des lésions caractéristiques chez les animaux injectés. Par contre, un effet cytopathogène discret, a pu être observé sur une lignée cellulaire (TO₂) inoculée avec du broyat de larves virosées. Enfin, il a été préparé des sérums et des ascites de souris, vis-à-vis d'immunoglobulines de *Lates Calcarifer* purifiées.

ABSTRACT

Since 1986 high mortality of hatchery-reared sea bass, *Lates Calcarifer*, larvae appeared in Ifremer's Pacific Oceanological Center (Tahiti). Light and electron microscopy show vacuolation and cells with cytoplasmic inclusion bodies in the brain, the cord and the eye retina of affected larvae. Numerous non-enveloped particles identified as viral units, icosahedral in morphology and measuring about 25 nm in diameter were found in the cytoplasm of the degenerating cells. In affected larvae, these particles were isolated by density gradient centrifugations. *In vitro* tests on cell lines and *in vivo* test on fish are performed with samples of diseased larvae. And immunisation of mice are made with purified immunoglobulins of *Lates calcarifer*.

mois clés : Aquaculture, élevage larvaire, *Lates calcarifer*, pathologie, virus, spongiose.

key words : Aquaculture, hatchery *Lates calcarifer*, pathology, virus, spongiosis.



DIFFUSION

1 copie J. CALVAS - Directeur Département "Ressources Aquacoles"
1 copie A. BODOY - Responsable Publication DRV-RA
1 copie DRV/D
1 copie DRV/PUB
2 copies Bibliothèque Nantes
2 copies Bibliothèque Brest
1 copie Bibliothèque COP - TAHITI
1 copie Directeur COP - TAHITI
1 copie M. WEPPE COP - TAHITI
1 copie E. TOUARD COP - TAHITI.

MORTALITES MASSIVES EN ELEVAGE LARVAIRE DE *Lates calcarifer* (MISE EN
EVIDENCE D'UN VIRUS NEUROTROPE)

T. RENAULT, E. THOUARD ET M. WEPPE

AQUACOP - IFREMER Centre Océanologique du Pacifique,
BP 7004, Taravao, Tahiti, Polynésie Française.

1/INTRODUCTION

Depuis 1986, l'élevage larvaire de *Lates calcarifer* se heurte au Centre Océanologique du Pacifique à d'importants problèmes de mortalités. Celles-ci surviennent à partir de 10-12 jours après éclosion et peuvent intéresser 90 à 100% des effectifs.

Le suivi systématique en histologie classique a permis la mise en évidence de lésions particulières (vacuolisation) au niveau du tissu nerveux (système nerveux central, moelle épinière et rétine) chez les animaux présentant des mortalités.

L'examen en microscopie électronique de prélèvements provenant de sujets malades a quant à lui révélé la présence de particules d'allure virale. Ces particules de petite taille (25nm), de forme icosaédrique, isolées ou présentant un arrangement pseudo-cristallin sont observées dans le cytoplasme des cellules nerveuses et rétinienne. La nature du matériel génétique de ce virus (ARN) a été déterminée par réaction nucléalce de Feulgen et de Rossenbeck, coloration par le vert de méthyl-pyronine et digestion enzymatique par la ribonucléase ou coloration à l'acridine orange. Les différents caractères précédemment cités laissent penser que nous sommes en présence d'un virus appartenant à la famille des Picornaviridae.

Ce virus a par ailleurs été purifié à partir d'animaux présentant des mortalités. Cependant la responsabilité de ce dernier dans le processus pathologique observé reste à confirmer.

De plus, des problèmes similaires existent en Australie (Glazebrook J.S., 1990. A virus association with sea bass mortalities. In "Fish Health Section", Newsletter, 1, 6.). Les lésions anatomopathologiques rencontrées sont comparables et l'observation en microscopie électronique d'encéphales et de rétines d'animaux malades âgés de 15, 17 et 18 jours montre la présence de particules virales similaires à celles observées sur des prélèvements provenant du COP. Ce type de problème semble également présent en Asie du Sud-Est, à Singapour en particulier (Chou R., comm. pers.).



Coupe sagittale d'une larve de *Lates calcarifer*, âgée de 15 jours, présentant vacuolisation (V) et inclusions basophiles intracytoplasmiques (I) au niveau de l'encéphale et la rétine - Coloration au Giemsa - x 100.

2/NATURE DES ETUDES ENVISAGEES ET OBJECTIF

Compte tenu de la nature de l'agent étiologique suspecté et de sa localisation, le champ d'investigation est vaste. Cependant, certains points semblent prioritaires et constituent des objectifs à court terme.

2.1 - CONFIRMATION DE L'ETIOLOGIE VIRALE DES MORTALITES OBSERVEES EN ELEVAGE LARVAIRE de *Lates calcarifer*.

- a/ Reproduction expérimentale de la maladie.
- b/ Recherche de l'origine et du mode de transmission du virus.

2.2 - MISE EN PLACE DE MOYENS DE DIAGNOSTIC.

Le protocole de purification des particules virales est déjà existant (RENAULT et al., 1991. Mass mortalities in hatchery reared sea bass, *Lates calcarifer*, larvae associated with the presence in the brain and eye retina of viral particles. Bull. Eur. Ass. Patho, 11, 1, 68-73). Le virus purifié permettant l'immunisation d'animaux de laboratoire et l'obtention d'immunsérum(s) spécifique(s), le diagnostic de la maladie en serait facilité.

Par ailleurs, au COP, aucun trouble particulier n'est observé chez les poissons en grossissement et les géniteurs, laissant suspecter l'existence d'un éventuel portage sans pathologie chez ces animaux. L'élimination de tels animaux permettrait d'établir un cheptel indemne de virus. Pour cela, la recherche d'une technique immunologique de dépistage des animaux porteurs sains semble très prometteuse. Dans ce but, le laboratoire de pathologie du COP a travaillé à la mise au point d'un protocole de purification des immunoglobulines de *Lates calcarifer* et de production d'immunsérum de souris anti-immunoglobulines de poisson.

3/RESULTATS

Dans ce chapitre, nous aborderons succinctement les résultats obtenus et pour plus de détails, il est possible de se référer aux annexes.

3.1 - REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE LA PATHOLOGIE OBSERVEE EN ELEVAGE LARVAIRE DE *Lates calcarifer*.

Divers essais de reproduction expérimentale de la maladie ont été effectués, en utilisant différentes voies d'injection (intrapéritonéale, rétro-oculaire, intracérébrale et intracardiaque) et plusieurs classes de poids d'animaux (poissons de 50-100g, poissons de 10g et poissons de 2,5g). Dans aucun cas de figure, nous n'avons reproduit des mortalités et/ou des lésions caractéristiques de spongiose chez les individus injectés.

Cependant, il est intéressant de noter que sur un individu d'environ 50g, des lésions comparables à celles observées chez les larves (lésions décelées le plus tardivement à 45 jours après éclosion), sont mises en évidence après injection rétro-oculaire de broyat d'alevins virosés (Cf. ANNEXE 1). En effet, dans les conditions d'élevage au Centre Océanologique, aucune mortalité en relation avec des lésions de spongiose n'a jamais été observée chez les poissons en pré-grossissement, en grossissement et chez les géniteurs. Il est donc possible que passé un certain âge, les animaux soient résistants à cette pathologie.

3.2 - RECHERCHE D'UN EFFET CYTOPATHOGENE SUR CULTURE CELLULAIRE DE BROYAT DE LARVES DE LATES VIROSEES.

Diverses manipulations ont été réalisées pour essayer de reproduire, en culture cellulaire, le virus mis en évidence chez les larves de *Lates calcarifer*. Plusieurs lignées cellulaires de poissons d'eau chaude (Gold Fish Ovary : GON, Tilapia Ovary : TO₂ et Banded Grouper Fin : GFI) ont été testées.

Des effets cytopathogènes limités et tardifs ont pu être observés sur monocouches de cellules TO₂ (Cf. ANNEXE 2).

3.3 - PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX DE SOURIS ANTI-IMMUNOGLOBULINES DE *Lates calcarifer*.

Il semblait intéressant d'étudier les capacités immunitaires du *Lates calcarifer*, en particulier pour mieux comprendre les moyens de défense mis en oeuvre par les animaux lors d'une virose et pour disposer de réactifs (anticorps polyclonaux anti-immunoglobulines) à des fins diagnostiques.

Après purifications des immunoglobulines de *Lates calcarifer* par dialyse à partir de sérum, nous avons immunisé des souris pour préparer des immun-sérums ou des ascites avec le produit de purification (Cf. ANNEXE 3). Les anticorps polyclonaux obtenus sont spécifiques des immunoglobulines de Lates (Cf. ANNEXE 3) et sont donc des réactifs utilisables aussi bien pour étudier les mécanismes de défense à médiation humorale mis en jeu par le poisson au cours d'une virose que pour faire du diagnostic indirect de cette infection virale (recherche d'anticorps anti-virus chez le poisson).

3.4 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Des analyse en microscopie électronique ont permis de retrouver le virus sur des larves âgées de sept jours, présentant peu ou pas de lésions en histologie classique. Jusqu'à présent le virus avait été décelé au plus tôt le 10ème jour après éclosion. Ces observations montrent que le virus est détecté précocément chez les larves de *Lates calcarifer* pouvant laisser suspecter une contamination verticale (existence de géniteurs porteurs sains).

ANNEXES

- ANNEXE 1 :ESSAI DE REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE LA PATHOLOGIE OBSERVEE EN ELEVAGE LARVAIRE DE *Lates calcarifer* (VIRUS NEUTROPE).
- ANNEXE 2 :RECHERCHE D'UN EFFET CYTOPATHOGENE DE BROYATS DE LARVES DE *Lates calcarifer* PRESENTANT DES LESIONS HISTOLOGIQUES DE SPONGIOSE.
- ANNEXE 3 :ETUDE DES IMMUNOGLOBULINES CHEZ LE LOUP TROPICAL (*Lates calcarifer*).
- ANNEXE 4 :PUBLICATION ET POSTER.

ANNEXE 1

ESSAI DE REPRODUCTION DE LA PATHOLOGIE OBSERVEE EN ELEVAGE LARVAIRE DE
Lates calcarifer (VIRUS NEUROTOPE).

ESSAIS DE REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE LA
PATHOLOGIE OBSERVEE EN ELEVAGE LARVAIRE DE
Lates calcarifer (VIRUS NEUROTROPE)

IFREMER COP, Unité Pathologie

1/ PAR INJECTION INTRAPERITONEALE

1.1 - MATERIEL ET METHODE

1.1.1 - Poissons

Les poissons utilisés sont des Lates (*Lates calcarifer*) d'un poids moyen de 42 g. Ils sont entretenus dans des bacs de 600 l, alimentés en eau de mer, et sont nourris quotidiennement avec du granulé.

1.1.2 - Broyat de larves de Lates

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des larves de Lates, âgées de 12 jours. Ils proviennent d'un bac d'élevage ayant présenté d'importantes mortalités. Le contrôle histologique montre la présence de lésions caractéristiques au niveau de l'encéphale et de la rétine (spongieuse et corpuscules basophiles).

Les larves *in toto* sont broyées au potter en PBS stérile à une dilution au 1/6e. La suspension réalisée est successivement centrifugée à 2500 tr/mn, 10 minutes à 4°C et à 3500 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu est collecté; il reste très chargé.

1.1.3 - Protocole expérimental

Les 22 poissons de 42 g de poids moyen sont séparés en deux lots: 12 animaux dans le bac A et 10 animaux dans le bac B.

Après une semaine d'adaptation, les poissons des deux lots reçoivent une injection intrapéritonéale de 0,1 ml de surnageant de broyat de larves de Lates (cf 1.1.2). Au préalable, deux animaux du bac A sont sacrifiés et divers organes prélevés. Ces deux individus servent de témoins négatifs.

Le suivi de l'expérience consiste à relever les mortalités et la température dans le bac B (les bacs A et B sont alimentés avec la même eau). Par ailleurs, des prélèvements de divers organes sont réalisés sur deux animaux du bac A à J3, J5, J9, J12 et J16 post-injection. Les poissons sont sacrifiés par anesthésie poussée au phénoxy-éthanol.

1.1.4 - Traitement des prélèvements

Sur chaque poisson, l'encéphale, les yeux, la rate, du foie, du rein et de l'intestin sont prélevés. Des échantillons d'encéphale et d'oeil sont fixés en Bouin Hollande, au Carnoy et pour la microscopie électronique. Rate, foie, rein et intestin sont uniquement fixés au Bouin Hollande.

1.2 - RESULTATS

Aucune mortalité et aucune lésion particulière ne sont observées dans le bac A.

Les animaux du bac B sont sacrifiés deux mois après injection (pas de mortalité au cours de ce laps de temps). Aucune lésion particulière n'est visible en histologie sur les organes prélevés.

Par ailleurs, il faut noter que l'ensemble des prélèvements traités pour la microscopie électronique n'a pas été analysé.

1.3 - DISCUSSION

Aucune mortalité et aucune lésion (histologie) ne sont apparues lors de cette expérience. Plusieurs hypothèses sont possibles:

- résistance des poissons de cette taille (42 g de poids moyen) au virus (causant lésions et mortalité chez les larves);
- voie d'injection inadéquate;
- virus en trop faible quantité dans le broyat pour induire des lésions et des mortalités;
- virus dénaturé ou détruit par la congélation ou lors de la réalisation du broyat.

2/ PAR INJECTION RETRO-OCULAIRE

2.1 - MATERIEL ET METHODE

2.1.1 - Poissons

2.1.1.1 - Protocole 1

Vingt cinq poissons (*Lates calcarifer*) sont utilisés pour cette expérience. Ils sont entretenus dans des bacs de 600 l, alimentés en eau de mer, et sont nourris quotidiennement avec du granulé.

2.1.1.2 - Protocole 2

Trente poissons (*Lates calcarifer*) de 2,5 g de poids moyen sont utilisés lors de ce protocole expérimental. Ils sont entretenus dans des bacs de 200 l, alimentés en eau de mer, et sont nourris quotidiennement avec du granulé.

2.1.2 - Broyat de poissons

2.1.2.1 - Protocole 1

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat pour l'injection rétro-oculaire sont des poissons de 12 jours (cf 1.1.2). Les larves entières sont broyées au potter en PBS stérile, à une dilution au 1/10e.

2.1.2.2 - *Protocole 2*

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat pour l'injection rétro-oculaire sont des poissons de 41 jours. Les poissons (tête et reste du corps séparés) sont broyées au potter en PBS stérile supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine), à une dilution 1/4e. Le broyat est centrifugé à 3500 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et soumis à une seconde centrifugation (13000 tr/mn - 30 minutes - 4°C).

2.1.3 - Protocoles expérimentaux

2.1.3.1 - *Protocole 1*

Les 25 poissons sont répartis en trois lots:

- Bac A: 10 animaux de 42 g de poids moyen.
- Bac B: 10 animaux de 49 g de poids moyen.
- Bac C: 5 animaux de 83 g de poids moyen.

Après un temps d'acclimatation de huit jours, les poissons des bacs A et B reçoivent une injection rétro-oculaire de 0,1 ml de surnageant de broyat de larves de Lates (cf 2.1.2.1). Les poissons du bac C reçoivent le même volume de PBS stérile.

Le suivi de l'expérience consiste à relever la température et les mortalités dans les bacs A et C. Dans le bac B, des prélèvements de divers organes sont réalisés sur deux animaux à J3, J9, J16, J25 et J37 post-injection. Les poissons des bacs A et C sont sacrifiés 45 jours après le début de l'expérience.

2.1.3.2 - *Protocole 2*

Les 30 poissons sont répartis en trois lots:

- Bac A': 8 animaux.
- Bac B': 10 animaux.
- Bac C': 12 animaux.

Les poissons du bac A' sont inoculés par voie rétro-oculaire avec du PBS stérile supplémenté en antibiotiques, à raison de 0,08 ml par animal. Les poissons du bac B' reçoivent une injection rétro-oculaire de 0,08 ml de broyat (cf 2.1.2.2) de larves de Lates (corps) et les animaux du bac C', un volume identique et par la même voie, de broyat de larves de Lates (tête).

L'ensemble des animaux est sacrifié 17 jours post-injection.

2.1.4 - Traitement des prélèvements

2.1.4.1 - *Protocole 1* (cf 1.1.4)

2.1.4.2 - *Protocole 2*

Les poissons sont fixés entiers en Bouin Hollande (sectionnés en trois parties).

2.2. - RESULTATS

2.2.1. - Protocole 1

Aucune mortalité et aucune lésion (histologie) ne sont observées chez les animaux des bacs A et C.

Un poisson du bac B, sacrifié le 9^e jour suivant l'injection, présente des lésions caractéristiques au niveau de l'encéphale: vacuoles et foyers de corpuscules basophiles au centre du cervelet. On note également la présence d'inclusions basophiles dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de l'encéphale (cervelet). Des lésions discrètes semblent existées au niveau de l'oeil (rétine). Cependant aucune mortalité n'est apparue dans le bac B au cours de l'expérience et aucun autre poisson n'a montré de lésions à l'examen histologique.

2.2.2 - Protocole 2

Aucune mortalité n'est observée dans les bacs A', B' et C'. L'examen histologique ne permet pas la mise en évidence de lésions caractéristiques de l'encéphale et de la rétine.

2.3 - DISCUSSION

2.3.1 - Protocole 1

Seul un animal, neuf jours après injection rétro-oculaire, montre des lésions semblables à celles observées chez les larves de Lates (vacuoles et corpuscules basophiles au niveau du cervelet). Ces lésions restent cependant limitées et le poisson ne présentait pas de comportement anormal (sacrifice).

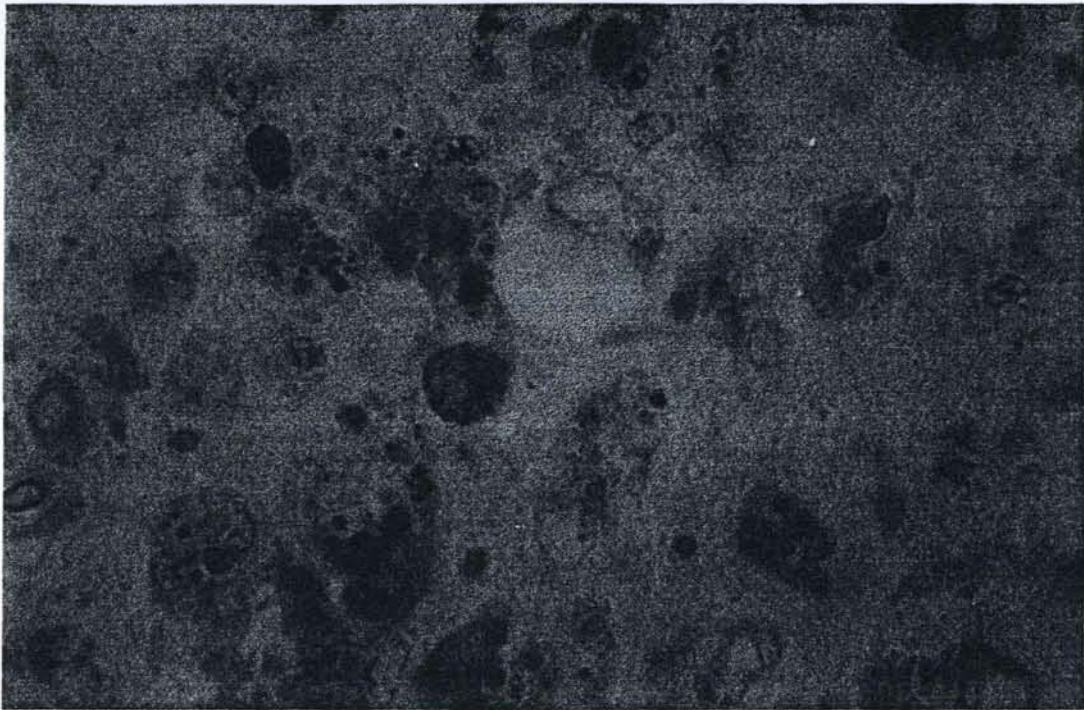
Le fait que les lésions observées apparaissent neuf jours après l'injection rétro-oculaire de broyat de poissons atteints peut laisser suspecter une reproduction par cette voie d'inoculation de la pathologie rencontrée chez les larves. Cependant, aucun autre poisson des bacs A et B n'a montré de symptômes ou d'anomalie en histologie. De ce fait, plusieurs hypothèses sont envisageables:

- l'animal présentant des lésions était déjà atteint avant la mise en route de l'expérience;
- il y a reproduction effective de la maladie chez un individu, mais la majorité des poissons peuvent se débarrasser du virus et aucune lésion n'est alors observée (bac A, sacrifice 45 jours post-injection);
- la voie rétro-oculaire est inadéquate ou non reproductible;
- le virus est dénaturé, détruit (congélation/broyat) ou en quantité insuffisante pour reproduire la maladie (suffisante pour un individu en mauvaise condition).

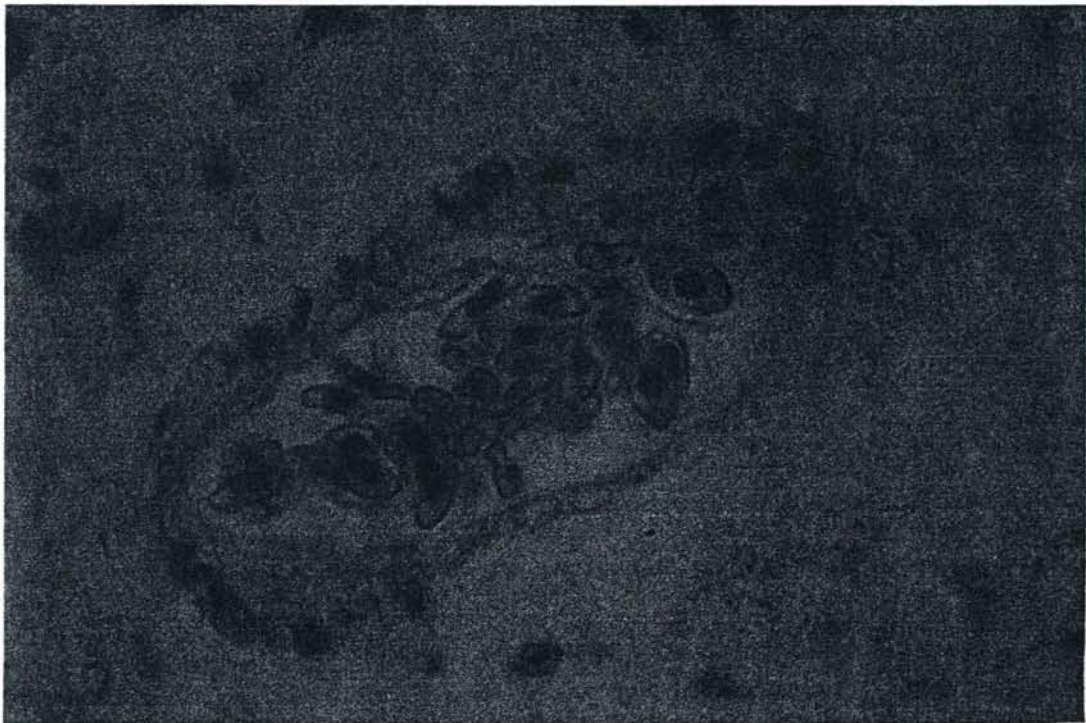
Cette expérience donne deux résultats intéressants:

D' une part, la mise en évidence de lésions comparables à celles observées sur les larves (observation la plus tardive à J34 post-éclosion) chez un individu appartenant à un lot de poissons de 49 g de poids moyen.

D'autre part, l'observation d'inclusions basophiles dans les cellules épithéliales des vaisseaux sanguins du cervelet laisse suspecter une pénétration du virus par voie sanguine au niveau de l'encéphale.



Coupe d'encéphale d'un poisson de 50g, ayant reçu neuf jours avant sacrifice une injection rétro-oculaire de broyat de larves virosées. Lésions de vacuolisation (V) et présence de corpuscules basophiles intracytoplasmiques (I) - Coloration au Giemsa - x 800.



Coupe d'encéphale d'un poisson de 50g, ayant reçu neuf jours avant sacrifice une injection rétro-oculaire de broyat de larves virosées. Présence de corpuscules basophiles intracytoplasmiques dans les cellules endothéliales d'un vaisseau sanguin - Coloration au Giemsa - x 800.

2.3.2 - Protocole 2 (cf 1.3)

3/ PAR INJECTION INTRA-CARDIAQUE

3.1 - MATERIEL ET METHODE

3.1.1 - Poissons

Seize Lates sont utilisés pour cet essai. Ils sont maintenus en bacs de 600 l, alimentés en eau de mer, et sont nourris quotidiennement avec du granulé.

3.1.2 - Broyat de poissons

Le broyat est effectué à partir de poissons de 41 jours, en PBS stérile supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine), à une dilution 1/4e. Suit une centrifugation à 3500 tr/mn (10 minutes, 4°C). Le surnageant est récupéré, puis soumis à une seconde centrifugation (13000 tr/mn, 30 minutes, 4°C).

3.1.3 - Protocole expérimental

Les 16 animaux sont répartis en deux bacs: 5 poissons de 73 g de poids moyen dans le bac A et 11 poissons de 89 g de poids moyen dans le bac B.

Après un temps d'acclimatation de huit jours, les animaux du bac A reçoivent chacun une injection intra-cardiaque de 0,25 ml de PBS stérile supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Les poissons du bac B reçoivent quant à eux un volume de 0,25 ml de broyat (cf 3.1.2) par voie cardiaque.

Le suivi de l'expérience consiste à relever la température et les mortalités dans les bacs A et B. L'ensemble des poissons est sacrifié 20 jours après injection.

3.1.4 - Traitement des prélèvements

Sur chaque poisson, l'encéphale, les yeux, le coeur, la rate et l'intestin sont prélevés et fixés en Bouin Hollande.

3.2 - RESULTATS

Six animaux du bac B sur 11 sont morts immédiatement après l'injection intra-cardiaque du broyat (cf 3.1.2). Dans le bac A, aucune mortalité n'est observée au moment de l'injection de PBS.

Par la suite, aucune mortalité n'est relevée dans les deux bacs (A et B). L'observation en histologie des prélèvements effectués ne permet de détecter aucune lésion aussi bien chez les animaux du bac B que chez les poissons du bac A.

3.3 - DISCUSSION

Le broyat de poissons (cf 3.1.2) semble avoir un effet léthal rapide sur les animaux lorsqu'il est injecté par voie intra-cardiaque. Certains animaux cependant supportent l'injection de broyat par cette voie. Dans ce cas, l'inoculation s'est peut être faite en région péricardiaque et non en intra-cardiaque.

Aucune mortalité n'est apparue dans les bacs A et B au bout de 20 jours. Et quelque soit l'origine du poisson (bacs A ou B), aucune lésion caractéristique n'est décelée en histologie. Plusieurs hypothèses sont possibles:

- résistance des poissons de cette taille (73 ou 89 g de poids moyen) au virus (causant lésions et mortalité chez les larves);
- voie d'injection inadéquate (de plus il existe une certaine toxicité du broyat par cette voie d'inoculation);
- virus en trop faible quantité dans le broyat pour induire des lésions et des mortalités;
- virus dénaturé ou détruit par la congélation (1 mois 1/2 à - 80°C) ou lors de la réalisation du broyat.

4/ PAR INJECTION INTRA-CRANIENNE

4.1 - MATERIEL ET METHODE

4.1.1 - Poissons

4.1.1.1 - Protocole 1

Seize Lates, d'un poids moyen de 57 g, sont utilisés pour cette expérience. Ils sont maintenus en bacs de 600 l, alimentés en eau de mer, et sont nourris quotidiennement avec du granulé.

4.1.1.2 - Protocole 2

Dix-neuf Lates, d'un poids moyen de 10 g, sont utilisés pour cette expérience. Ils sont entretenus en bacs de 200 l, alimentés en eau de mer, et sont nourris quotidiennement avec du granulé.

4.1.2 - Broyat de poissons

Les larves de Lates de 14 jours, présentant en histologie des lésions de spongieuse caractéristiques, sont broyées en PBS stérile supplémenté d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine), à une dilution 1/4e. Suit une centrifugation à 3500 tr/mn (10 minutes à 4°C). Le surnageant est récupéré et soumis à une nouvelle centrifugation (13000 tr/mn, 30 minutes, 4°C). Le surnageant recueilli est utilisé lors des deux protocoles expérimentaux.

4.1.3 - Protocoles expérimentaux

4.1.3.1 - Protocole 1

Les 16 poissons (poids moyen 57 g) sont répartis en deux bacs: 5 animaux (lot témoin) dans le bac A et 11 animaux dans le bac B.

Après un temps d'acclimatation de huit jours, les poissons du bac A reçoivent une injection intra-crânienne (par le plafond de la cavité buccale) de 0,1 ml de PBS stérile supplémenté d'antibiotiques. Les animaux du bac B reçoivent un volume identique de broyat de poissons (cf 4.1.2) par voie intra-crânienne.

Le suivi de l'expérience consiste à relever la température et les mortalités dans les bacs A et B. L'ensemble des poissons est sacrifié 34 jours après injection.

4.1.3.2 - Protocole 2

Les 19 poissons (poids moyen 10 g) sont répartis en deux bacs: 5 animaux (lot témoin) dans le bac A' et 14 animaux dans le bac B'.

Après un temps d'acclimatation de huit jours, les poissons du bac A' reçoivent une injection intra-crânienne (par le plafond de la cavité buccale) de 0,05 ml de PBS stérile supplémenté d'antibiotiques. Les animaux du bac B' reçoivent un volume identique de broyat de poissons (cf 4.1.2) par voie intra-crânienne.

Le suivi de l'expérience consiste à relever la température et les mortalités dans les bacs A' et B'. L'ensemble des poissons est sacrifié 25 jours après injection.

4.1.4 - Traitement des prélèvements

Sur l'ensemble des animaux des deux protocoles expérimentaux, l'encéphale et les yeux sont prélevés et fixés au Bouin Hollande.

4.2 - RESULTATS

4.2.1 - Protocole 1

Les animaux, immédiatement après injection (PBS seul ou broyat), présentent une nage anormale, hélicoidale. Un poisson du bac A et trois animaux du bac B sont morts le lendemain de l'injection intra-crânienne.

Ensuite, aucune mortalité n'a été relevé jusqu'au 34^e jour post-injection, jour du sacrifice. Par ailleurs, aucune lésion n'est visible à l'histologie aussi bien sur les animaux du bac B que sur les poissons du bac A.

4.2.2 - Protocole 2

Les animaux de 10 g, après injection intra-crânienne de PBS ou de broyat, ne présentent pas une nage anormale, hélicoidale, mais ont tendance à se poser sur le coté au fond du bac. Huit poissons du bac B' sur 14 sont morts rapidement après l'injection (dans l'heure suivant l'inoculation). Un animal du bac A' est mort au 8^e jour post-injection. Ensuite, aucune mortalité n'est observée jusqu'au 25^e suivant l'injection, jour du sacrifice.

Par ailleurs, aucune lésion en histologie n'est relevée aussi bien chez les animaux du bac B' que chez les poissons du bac A'.

4.3 - DISCUSSION (cf 3.3)

ANNEXE 2

RECHERCHE D'UNE EFFET CYTOPATHOGENE DE BROYATS DE LARVES DE *Lates calcarifer* PRESENTANT DES LESIONS HISTOLOGIQUES DE SPONGIOSE.

RECHERCHE D'UN EFFET CYTOPATHOGENE
DE BROYATS DE LARVES DE *Lates calcarifer*
PRESENTANT DES LESIONS HISTOLOGIQUES
DE SPONGIOSE

IFREMER COP, Unité Pathologie

1/ SUR CELLULES GON (Gold Carp Ovary)

1.1 - PROTOCOLE N°1

1.1.1 - Broyat de larves

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des larves âgées de 14 jours (lot 2812). Ils proviennent d'un bac d'élevage ayant présenté d'importantes mortalités. Le contrôle histologique montre la présence de lésions caractéristiques au niveau de l'encéphale et de la rétine (spongiose et corpuscules basophiles).

Les larves, *in toto*, sont broyées au potter en milieu minimum de Eagle, supplémenté à 2 % de sérum de veau foetal, à une dilution au 1/10e. La suspension réalisée est ensuite centrifugée à 2800 tr/mn pendant 15 minutes à 4°C, pour clarification.

1.1.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des cellules GON (93^e passage, culture de 11 jours). Les cellules, après trypsination, sont distribuées en plaque à 96 puits à la densité de 220 000 cellules par cupule (soit 200 μ l de milieu minimum de Eagle, supplémenté à 10 % de sérum de veau foetal), puis incubées 24 heures à 30°C.

1.1.3 - Protocole expérimental

Le broyat de larves (cf 1.1.1) est testé sur les cellules GON soit directement, soit après filtration à 0,65 μ m.

L'échantillon à analyser est distribué, à raison de 250 μ l par puits, dans l'ensemble des cupules de la première colonne des plaques contenant les cellules. Puis des dilutions sériées du broyat sont réalisées de cinq en cinq (sur 11 colonnes), directement dans les puits, en milieu minimum de Eagle supplémenté par 2 % de sérum de veau foetal, au moyen d'une pipette multicanaux (Titerteck ND), sous un volume de 50 μ l. les puits de la dernière colonne ne reçoivent que du milieu de culture (témoin cellules).

Les cellules sont ensuite incubées à 30°C et observées tous les jours pour rechercher l'apparition d'un éventuel effet cytopathogène (ECP).

1.1.4 - Résultats

Pour cette expérience, la densité de cellules GON par puits s'est avérée insuffisante: le témoin cellules (sans ajout de broyat à tester) est trop faiblement coloré (cristal violet).

1.2 - PROTOCOLE N°2

1.2.1 - Broyat de larves (cf 1.1.1)

1.2.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des GON (93^e passage, cultures de 13 jours, incubées à 20°C).

1.2.3 - Protocole expérimental

Le broyat de larves, filtré à 0,65 μm , est testé au 1/10^e et au 1/20^e sur des monocouches cellulaires en flacons de 25 cm² (0,5 ml de broyat par flacon). Les flacons sont vidés du milieu de culture, le broyat est ensuite ajouté et laissé au contact des cellules 1 heure à 30°C. Cinq ml de milieu 2 % de sérum de veau foetal sont ensuite introduits dans les flacons et les cellules sont incubées à 30°C. Dans le même temps, un témoin négatif est réalisé (inoculation de milieu de culture et non pas de broyat de larves).

Les monocouches cellulaires sont ensuite observées quotidiennement (recherche d'un ECP).

1.2.4 - Résultats

Aucun ECP n'est apparu après 13 jours post-inoculation. Un second passage est de ce fait envisagé (cf 1.3 - PROTOCOLE N°3).

1.3 - PROTOCOLE N°3 (second passage)

1.3.1 - Echantillons testés

Les cellules utilisées pour le protocole n° 2 (cf 1.2) sont détruites par congélation/décongélation successives. Suit une centrifugation à 3500 tr/mn, 15 minutes à 4°C. Les surnageants sont récupérés.

1.3.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des GON (93^e passage, cultures de 27 jours).

1.3.3 - Protocole expérimental

Les surnageants de cultures cellulaires (témoin cellules, broyat de larves 1/10^e et 1/20^e du protocole n° 2) sont testés sur des monocouches de cellules GON en flacons de 25 cm² (0,8 ml de surnageant par flacon). Le protocole expérimental est comparable à celui utilisé précédemment (cf 1.2.3).

1.3.4 - Résultats

Cinq jours après inoculation, les cellules sont en mauvais état quelque soit le surnageant considéré. Un troisième passage est alors envisagé.

1.4 - PROTOCOLE N°4 (troisième passage)

1.4.1 - Echantillons testés

Les cellules utilisées au cours du protocole n°3 sont détruites par congélation/décongélation successives. Une centrifugation est ensuite réalisée pour recueillir les surnageants (8000 tr/mn, 10 minutes, 4°C).

1.4.2 - Cellules (cf 1.3.2)

1.4.3 - Protocole expérimental (cf 1.3.3)

Les surnageants testés sont laissés au contact des cellules 1 heure à 20°C, puis les flacons sont incubés à 20°C.

1.4.4 - Résultats

Après huit jours d'incubation à 20°C, on observe la destruction des cellules dans tous les flacons, également pour le surnageant témoin cellules (cellules trop vieilles).

1.5 - PROTOCOLE N°5

1.5.1 - Broyat de poissons

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des poissons âgées de 41 jours (lot 2882). Ils proviennent d'un bac d'élevage ayant présenté d'importantes mortalités. Le contrôle histologique montre la présence de lésions caractéristiques au niveau de l'encéphale et de la rétine (spongieuse et corpuscules basophiles).

Les poissons, *in toto*, sont broyées au potter, en PBS stérile, supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine), à une dilution au 1/5e. La suspension réalisée est ensuite centrifugée à 3000 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C, pour clarification. Puis une seconde centrifugation est réalisée (15000 tr/mn, 30 minutes, 4°C).

1.5.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des cellules GON (93^e passage, culture de 40 jours). Les cellules, après trypsination, sont distribuées en plaque à 24 puits à la densité de $2,1 \times 10^6$ cellules par cupule (soit 800 μ l de milieu minimum de Eagle, supplémenté à 10 % de sérum de veau foetal), puis incubées 24 heures à 30°C.

1.5.3 - Protocole expérimental

Les plaques sont vidées du milieu de culture et le surnageant du broyat à analyser est distribué, à raison de 100 μ l par puits, et laissé au contact des cellules 45 minutes à 30°C. Deux ml de milieu de culture, supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal sont ensuite ajoutés et les cellules sont placées à l'étuve à 30°C. Les monocouches sont examinées tous les jours en vue de mettre en évidence l'apparition d'un éventuel ECP.

1.5.4 - Résultats

Aucun ECP n'est visible cinq jours post-inoculation.

1.6 - PROTOCOLE N°6

1.6.1 - Broyat de poissons

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des poissons âgées de 41 jours (lot 2882, cf 1.5.1).

La tête et le reste du corps des poissons sont broyés séparément au potter, en PBS stérile, supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine), à une dilution au 1/4e. La suspension réalisée est ensuite centrifugée à 3000 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C, pour clarification. Puis une seconde centrifugation est réalisée (13000 tr/mn, 30 minutes, 4°C).

1.6.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des cellules GON (94^e passage, culture de 12 jours, en flacons de 25 cm²).

1.6.3 - Protocole expérimental

Les broyats de larves, têtes ou reste du corps, sont testés au 1/4^e sur des monocouches cellulaires en flacons de 25 cm² (0,25 ml de broyat par flacon). Les flacons sont vidés du milieu de culture, le broyat est ensuite ajouté et laissé au contact des cellules 1 heure à 30°C. Cinq ml de milieu 2 % de sérum de veau foetal sont ensuite introduits dans les flacons et les cellules sont incubées à 30°C. Dans le même temps, un témoin négatif est réalisé (inoculation de PBS stérile supplémenté en antibiotiques et non pas de broyat de larves).

Les monocouches cellulaires sont ensuite observées quotidiennement (recherche d'un ECP).

1.6.4 - Résultats

Aucun ECP n'est visible 15 jours post-inoculation. Cependant, les cellules du témoin négatif (PBS stérile seul) sont en mauvais état, alors que les cellules ayant reçu du broyat de larves semblent être en bon état.

2/ SUR CELLULES TO₂ (Tilapia Ovary Hybride)

2.1 - PROTOCOLE N°1

2.1.1 - Broyat de larves

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des larves âgées de 14 jours (lot 2812). Ils proviennent d'un bac d'élevage ayant présenté d'importantes mortalités. Le contrôle histologique montre la présence de lésions caractéristiques au niveau de l'encéphale et de la rétine (spongiose et corpuscules basophiles).

Les larves, *in toto*, sont broyées au potter en milieu minimum de Eagle, supplémenté à 2 % de sérum de veau foetal, à une dilution au 1/10^e. La suspension réalisée est ensuite centrifugée à 2800 tr/mn pendant 15 minutes à 4°C, pour clarification.

2.1.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des cellules TO² (culture de 12 jours, en flacons de 25 cm² et incubées à 22°C).

2.1.3 - Protocole expérimental

Le broyat de larves, filtré à 0,65 µm, est testé au 1/20^e sur des monocouches cellulaires en flacons de 25 cm² (0,5 ml de broyat par flacon). Les flacons sont vidés du milieu de culture, le broyat est ensuite ajouté et laissé au contact des cellules 1 heure à 30°C. Cinq ml de milieu 2 % de sérum de veau foetal sont ensuite introduits dans les flacons et les cellules sont incubées à 30°C. Dans le même temps, un témoin négatif est réalisé (inoculation de milieu de culture et non pas de broyat de larves).

Les monocouches cellulaires sont ensuite observées quotidiennement (recherche d'un ECP).

2.1.4 - Résultats

Aucun ECP n'est visible 15 jours post-inoculation. Un second passage est alors envisagé.

2.2 - PROTOCOLE N°2 (second passage)

2.2.1 - Echantillons testés

Les cellules utilisées pour le protocole n° 1 (cf 2.1) sont détruites par congélation/décongélation successives. Suit une centrifugation à 3500 tr/mn, 15 minutes à 4°C. Les surnageants sont récupérés.

2.2.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des TO² (cultures de 27 jours, en flacons de 25 cm²).

2.2.3 - Protocole expérimentale

Les surnageants de cultures cellulaires (témoin cellules, broyat de larves 1/20e du protocole n° 1) sont testés sur des monocouches de cellules TO² en flacons de 25 cm² (0,8 ml de surnageant par flacon). Le protocole expérimental est comparable à celui utilisé précédemment (cf 2.1.3).

2.2.4 - Résultats

Cinq jours après inoculation, les cellules sont en mauvais état quelque soit le surnageant considéré. Un troisième passage est alors envisagé.

2.3 - PROTOCOLE N°3 (troisième passage)

2.3.1 - Echantillons testés

Les cellules utilisées au cours du protocole n°2 sont détruites par congélation/décongélation successives. Une centrifugation est ensuite réalisée pour recueillir les surnageants (8000 tr/mn, 10 minutes, 4°C).

2.3.2 - Cellules (cf 2.2.2)

2.3.3 - Protocole expérimental (cf 2.2.3)

Les surnageants testés sont laissés au contact des cellules 1 heure à 20°C, puis les flacons sont incubés à 20°C.

2.3.4 - Résultats

Après huit jours d'incubation à 20°C, on observe la destruction des cellules dans tous les flacons, également pour le surnageant témoin cellules (cellules trop vieilles).

2.4 - PROTOCOLE N°4

2.4.1 - Broyat de poissons

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des poissons âgées de 41 jours (lot 2882). Ils proviennent d'un bac d'élevage ayant présenté d'importantes mortalités. Le contrôle histologique montre la présence de lésions caractéristiques au niveau de l'encéphale et de la rétine (spongieuse et corpuscules basophiles).

Les poissons, *in toto*, sont broyées au potter, en PBS stérile, supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine), à une dilution au 1/5e. La suspension réalisée est ensuite centrifugée à 3000 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C, pour clarification. Puis une seconde centrifugation est réalisée (15000 tr/mn, 30 minutes, 4°C).

2.4.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des cellules TO² (cultures de 42 jours). Les cellules, après trypsination, sont distribuées en plaque à 24 puits à la densité de $1,9 \times 10^6$ cellules par cupule (soit 800 μ l de milieu minimum de Eagle, supplémenté à 10 % de sérum de veau foetal), puis incubées 24 heures à 30°C.

2.4.3 - Protocole expérimental

Les plaques sont vidées du milieu de culture et le surnageant du broyat à analyser est distribué, à raison de 100 μ l par puits, et laissé au contact des cellules 45 minutes à 30°C. Deux ml de milieu de culture, supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal sont ensuite ajoutés et les cellules sont placées à l'étuve à 30°C. Les monocouches sont examinées tous les jours en vue de mettre en évidence l'apparition d'un éventuel ECP.

2.4.4 - Résultats

Aucun ECP n'est visible cinq jours post-inoculation.

2.5 - PROTOCOLE N°5

2.5.1 - Broyat de poissons

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des poissons âgées de 41 jours (lot 2882, cf 2.4.1).

La tête et le reste du corps des poissons sont broyées séparément au potter, en PBS stérile, supplémenté en antibiotiques (pénicilline/streptomycine), à une dilution au 1/4e. La suspension réalisée est ensuite centrifugée à 3000 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C, pour clarification. Puis une seconde centrifugation est réalisée (13000 tr/mn, 30 minutes, 4°C).

2.5.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des cellules TO² (culture de 12 jours, en flacons de 25 cm²).

2.5.3 - Protocole expérimental

Les broyats de larves, têtes ou reste du corps, sont testés au 1/4e sur des monocouches cellulaires en flacons de 25 cm² (0,25 ml de broyat par flacon). Les flacons sont vidés du milieu de culture, le broyat est ensuite ajouté et laissé au contact des cellules 1 heure à 30°C. Cinq ml de milieu 10 % de sérum de veau

foetal sont ensuite introduits dans les flacons et les cellules sont incubées à 30°C. Dans le même temps, un témoin négatif est réalisé (inoculation de PBS stérile, supplémenté en antibiotiques et non pas de broyat de larves).

Les monocouches cellulaires sont ensuite observées quotidiennement (recherche d'un ECP).

2.5.4 - Résultats

Sept jours après inoculation, il semble qu'un ECP soit apparu sur les monocouches cellulaires ayant reçu du broyat de tête de poissons. De nouvelles plages de lyse se sont formées au court du temps, cependant l'évolution de cet ECP reste lente.

Aucun ECP n'est visible dans le témoin cellules et sur la monocouche inoculée avec du broyat de corps de poissons.



Effet cytopathogène observé sur cellules TO₂, sept jours après inoculation de broyat de larves de *Lates calcarifer* présentant des lésions de spongiose.

3/ CELLULES GFI (Banded Grouper Fin)

3.1 - PROTOCOLE N°1

3.1.1 - Broyat de larves

Les animaux ayant servi à la réalisation du broyat sont des larves, âgées de 14 jours (lot 2812, cf 1.1.1). Le broyat est filtré, puis conservé à 4°C, pendant sept jours.

3.1.2 - Cellules

Les cellules utilisées sont des GFI (74^e passage, cultures de six jours, en flacons de 25 cm²).

3.1.3 - Prococole expérimental

Le broyat de larves, filtré à 0,65 µm, est testé au 1/10^e sur des monocouches cellulaires en flacons de 25 cm² (0,7 ml de broyat par flacon). Les flacons sont vidés du milieu de culture, le broyat est ensuite ajouté et laissé au contact des cellules 2 heures à 30°C. Cinq ml de milieu 2 % de sérum de veau foetal sont ensuite introduits dans les flacons et les cellules sont incubées à 30°C. Dans le même temps, un témoin négatif est réalisé (inoculation de milieu de culture et non pas de broyat de larves).

Les monocouches cellulaires sont ensuite observées quotidiennement (recherche d'un ECP).

3.1.4 - Résultats

Le broyat dilué au 1/10^e a un effet toxique sur les cellules GFI: les cellules se décollent très rapidement du fond des flacons, après inoculation du broyat.

3.1 - PROTOCOLE N°2

3.2.1 - Broyat de larves (cf 3.1.1)

3.2.2 - Cellules (cf 3.1.2)

3.2.3 - Prococole expérimental

Le broyat de larves, filtré à 0,65 µm et refiltré ou non à 0,45 µm, est testé au 1/50^e sur des monocouches cellulaires en flacons de 25 cm² (0,5 ml de broyat par flacon).

3.2.4 - Résultats

Pas de toxicité du broyat à la dilution 1/50^e. Pas d'apparition d' ECP.

ANNEXE 3

ETUDE DES IMMUNOGLOBULINES CHEZ LE LOUP TROPICAL (*Lates calcarifer*).

ETUDE DES IMMUNOGLOBULINES CHEZ LE LOUP TROPICAL (*Lates calcarifer*)

IFREMER COP, Unité Pathologie

A/ MATERIEL ET METHODES

1/ANIMAUX

Les poissons utilisés sont des *Lates calcarifer* : les animaux sont élevés sur le centre et appartiennent à différentes classes d'âges : des animaux pesant en moyenne 4,5 kg, âgés de quatre ans, des poissons de deux et un an et des juvéniles d'environ 50 jours.

2/PREPARATION D'IMMUN-SERUM ANTI-IMMUNOGLOBULINE DE LATES

2.2 - PRISE DE SANG

Les poissons sont saignés, après anesthésie dans une solution de phénoxy éthanol, par ponction cardiaque. Le sang recueilli est laissé à coaguler deux heures à température du laboratoire, puis une nuit à 4°C. Suit une centrifugation (3000t/mn, 4°C). Le sérum est recueilli, aliquoté et conservé à -20°C.

2.2 - PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES DE LATES

La première purification d'immunoglobulines a été effectuée à partir de sang hépariné (0,2-0,3% d'héparine), centrifugé (5000 t/mn-15mn).

Les purifications suivantes sont effectuées à partir de sérums obtenus selon le protocole indiqué au paragraphe 2.1.

2.2.1 - Protocole de purification

Le protocole de purification des immunoglobulines consiste à dialyser des sérums de poissons, tout venant, non immunisés, pendant 72 heures sous agitation dans cinq litres d'un tampon Tris-HCl (5mM; pH 6,5) à 4°C. Le tampon est changé toutes les 24 heures.

Le contenu de la membrane de dialyse est ensuite centrifugé (5000t/mn, 10mn, 4°C) et le surnagant éliminé. Le culot, après trois lavages en tampon Tris-HCl 5mM, pH 6,5 (5000t/mn, 10mn) est redissous en Tris-HCl 0,1 M à pH 8,6 (1/10^e de volume initial de sérum). La préparation d'immunoglobulines est alors dialysée 24 heures en PBSm à 4°C.

La quantité de protéines de l'échantillon est mesurée par lecture en densité optique (DO) à 280 nm.

2.2.2 - Analyse par électrophorèse en SDS-PAGE du produit de purification

a/ Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) en conditions réductrices

Le protocole dérive de la méthode originale décrite par LAEMLI (1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 297, 680-685). La séparation se fait en gel 12% d'acrylamide ou en gradient exponentiel 8%-17,5%. Les immunoglobulines Lates sont dénaturées en présence d'un détergent anionique (SDS) et simultanément réduites par le β mercaptoéthanol. Incubés trois minutes à 100°C, les échantillons prérefroidis sont déposés dans des puits ménagés dans la partie supérieure du gel de concentration à 5,2% d'acrylamide.

La migration électrophorétique s'effectue sous ampérage constant (22 mA/gel) en présence de tampon de migration.

Les spectres électrophorétiques sont visualisés après coloration du gel au bleu de COOMASSIE. L'excès de colorant étant éliminé par rinçages successifs dans un mélange éthanol-acide acétique-H₂O (2/1/17). La masse moléculaire des protéines est appréciée par calcul de leur mobilité en référence à une gamme de marqueurs standards d'après la technique de WEBER *et al.* (1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem, 224, 4406-4412).

b/Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) en conditions non réductrices

Le protocole est comparable à celui décrit au paragraphe 3.2.2 a/. Cependant le gel de séparation est constitué dans ce cas d'un gradient exponentiel d'acrylamide 3-15% ou 5-15%. Les immunoglobulines de Lates sont dénaturées en présence de SDS, mais en absence de β mercaptoéthanol. Les échantillons sont déposés dans des puits au niveau du gel de concentration de 3% ou 4% d'acrylamide.

2.3 - IMMUNISATIONS

Les souris âgées de six à huit semaines reçoivent une première injection intrapéritonéale d'antigène (50µg d'immunoglobulines purifiées mélangées à de l'adjuvant complet de FREUND sous un volume total de 0,5 ml par souris). Une seconde injection est faite dix jours plus tard par la même voie (75 µg d'Ig purifiées + adjuvant incomplet de FREUND + eau distillée = volume total de 0,5 ml souris). Un second rappel est effectué 30 jours après la première injection (IP; 150 µg d'immunoglobulines purifiées + eau distillée sous un volume total de 0,5 ml par souris). Les animaux sont sacrifiés et saignés trois jours après cette dernière injection.

Le sang est maintenu deux heures à température du laboratoire, puis une nuit à 4°C. Le sérum est recueilli après centrifugation à 5000t/mn pendant 15 mn, aliquoté et conservé à -20°C.

Rq 1: Le même protocole d'immunisation, mais en doublant à chaque injection la dose d'antigène est également effectué.

Rq 2: Un protocole d'immunisation associé à l'injection de cellules tumorales ascitiques est également effectué.

2.4 - CARACTERISATION DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI- IMMUNOGLOBULINES DE LATES

2.4.1 - Immunodiffusion

L'activité précipitante est testée par double diffusion en gélose (A 37 1,5%-NaCl 0,15 M additionnée d'azide à 0,01%) coulée sur lame histologique.

2.4.2 - Analyse immunoélectrophorétique (A.I.E.)

Les sérums anti-immunoglobulines de Lates sont analysés par immunoélectrophorèse en gel d'agarose 1% (1h-250v-9mA), en tempon véronal ($C_8 H_{11} N_2 O_3$; 0,05 M; pH 8,6). Les arcs de précipitation formés sont mis en évidence après coloration au noir amide 0,2%.

2.4.3 - Western blotting

Les protéines (immunoglobulines de Lates purifiées par dialyse) séparées par électrophorèse monodimensionnelle sont soumises à un transfert destiné à réaliser des "empreintes" sur feuille de nitrate de cellulose. Les transferts sont effectués sur des membranes ($0,45 \mu m$ SCHLEICHER & SCHUELL) par électrophorèse transversale (TRANSFOR, LKB; 1h; 100V; 0,6 A) en présence d'un tampon de blotting. Après transfert, la feuille de nitrate de cellulose est séchée à température ambiante et peut être conservée à 4°C dans une pochette plastique scellée.

Pour la révélation, le blots sont immergés une heure dans du PBS_M - 5% Régilait. Ainsi saturé, le nitrate de cellulose est incubé une heure à température ambiante en présence des sérums polyclonaux dilués en PBS_M - 0,05% Tween 20. Trois opérations de lavage (PBS_M , 0,5% Régilait, 0,05% Tween 20) précèdent l'incubation du second anticorps conjugué (anticorps de porc anti-IgG de souris couplés à la peroxydase) dilué au 1/500ème. Après une heure d'incubation à l'obscurité, trois lavages successifs sont effectués dont le dernier en PBS_M seul. L'activité peroxydasique est révélée par la 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride diluée à 0,05% en PBS_M et en présence de 0,3% d' H_2O_2 .

Rq : Les immun-sérums anti-immunoglobulines de Lates sont épuisés 30 minutes à 4°C, volume à volume, sur des culots d'erythrocytes. En fin d'incubation, les sérums sont récupérés après centrifugation (2000 t/mn, 10 mn, 4°C) et utilisés pour les tests de Western blotting et les marquages sur coupes.

3/ ETUDE DE LA LOCALISATION DES CELLULES PORTANT OU SYNTHETISANT DES IMMUNOGLOBULINES CHEZ *Lates calcarifer* A L'AIDE DE SERUMS POLYCLONAUX : IMMUNOCYTOLOGIE

3.2 - COUPES D'ORGANES

Les organes (rein: partie antérieure et postérieure, foie, rate, intestin, muscle, branchie, coeur et encéphale) sont prélevés par dissection sur des Lates de quatre, deux et un an. Ils sont aussitôt fixés au PLP (paraformaldéhyde, lysine, périodate de Na) pendant une heure à 4°C. Ils sont ensuite lavés une nuit en PBS_M à 4°C, puis placés une nuit en isopropanol (4°C). Après immersion de 15 mn dans le chloroforme à 4°C, ils sont imprégnés dans la paraffine (1 heure à 58°C, en changeant une fois le bain de paraffine). Les organes sont enfin inclus dans la

paraffine à 58°C. Les blocs sont refroidis sur la paillasse, puis conservés à 4°C.

L'inclusion de larves entières et de tronçons de poissons d'environ 50 jours est également réalisée.

Des coupes de 5 à 7 μm sont effectuées à partir des blocs d'inclusion au moyen d'un microtome. Elles sont disposées sur des lames histologiques dans de la poly-L-lysine 0,01%, puis séchées 48 heures à température ambiante.

3.2 - IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE SUR COUPES D'ORGANES

Les coupes sont déparaffinées par immersion dans un bain de xylène (5 mn), puis dans un bain d'alcool 100° (5 mn). Deux rinçages successifs sont effectués en PBS_M durant 10 mn sous agitation. Toutes les manipulations ultérieures, réalisées en atmosphère humide, sont prolongées par des étapes de lavage sous agitation. Saturées 30 mn (PBS_M-3% de Régilait), les coupes sont incubées en présence d'anticorps anti-immunoglobulines de Lates (immun-sérums) diluées au 1/20ème, pendant une heure à température ambiante. Suit l'incubation avec l'anticorps marqué à la fluoréscéine (anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris) dilué au 1/100ème. Au terme d'une incubation d'une heure à température ambiante et à l'obscurité, trois lavages dont le dernier en présence de bleu d'EVANS (RAL) qui colore en rouge les structures non marquées par les anticorps et élimine ainsi les effets du bruit de fond, sont effectués.

Le montage entre lame et lamelle est réalisé en présence d'une goutte de Mowiol. Les coupes sont observées au microscope à épifluorescence UV.

3.3 - IMMUNOPEROXYDASE SUR COUPES D'ORGANES

Le protocole utilisé est comparable à celui décrit au paragraphe 3.2. Une étape supplémentaire après deparaffinage est cependant nécessaire, afin d'inhiber les peroxydases endogènes: immersion des lames 30 mn dans un bain de méthanol contenant 0,3% de H₂O₂.

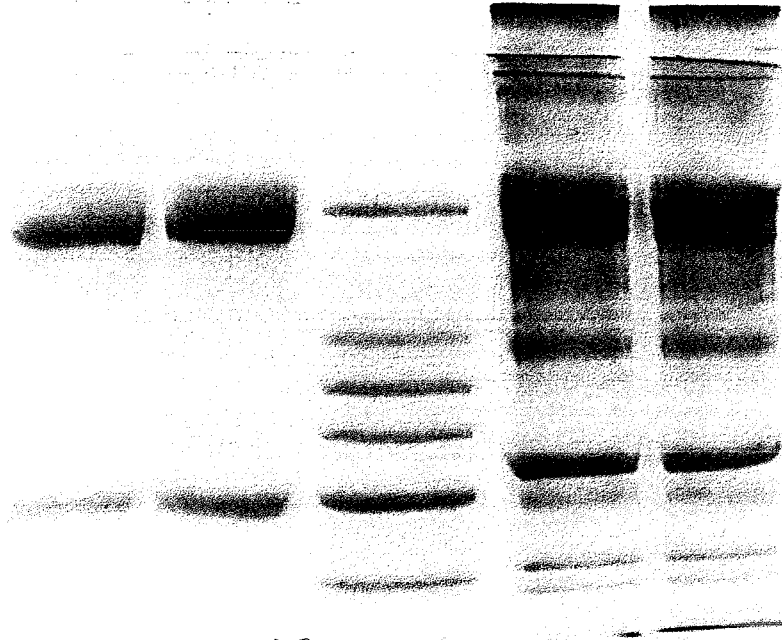
La révélation de l'activité peroxydase s'effectue par immersion de dix minutes dans un bain de PBS_M contenant 0,06% de 3,3' Diaminobenzidine tétrahydrochloride et 0,03% de H₂O₂. Les coupes sont ensuite contre colorées au bleu de UNNA, deshydratées par l'isopropanol et le toluène, puis montées entre lame et lamelle.

B/ RESULTATS

1/ PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES DE LATES

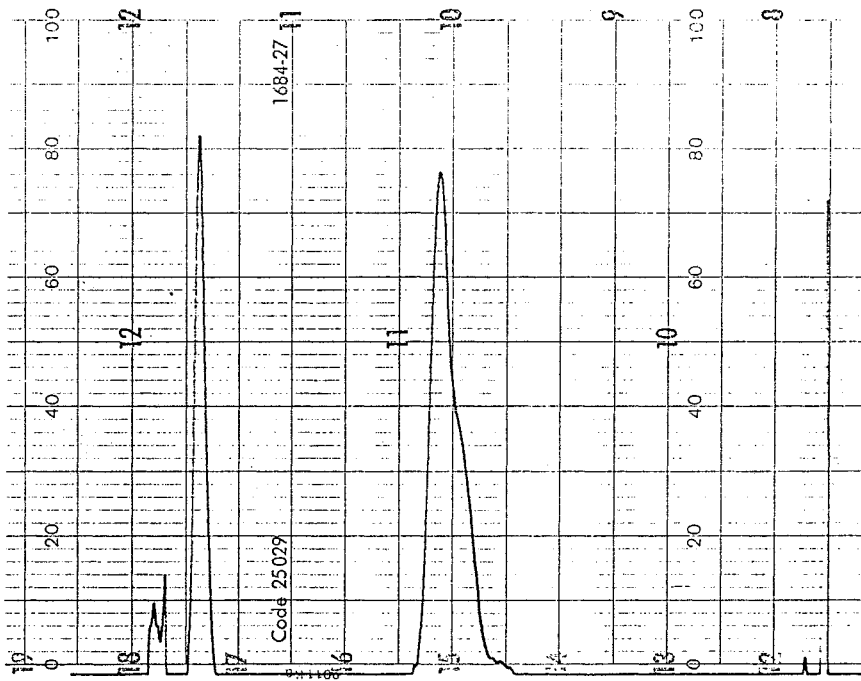
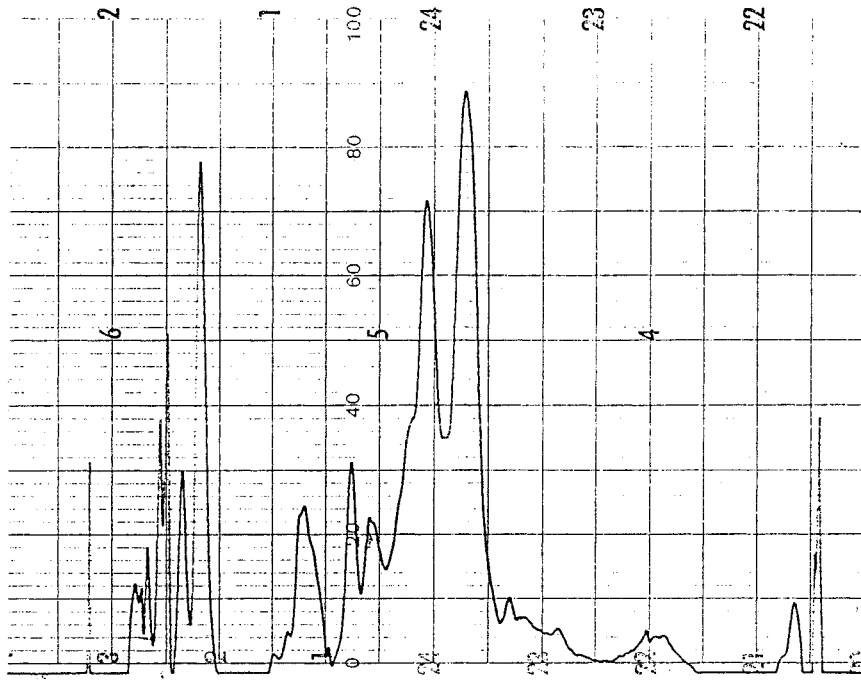
Le protocole utilisé semble satisfaisant puisque le produit de purification analysé par électrophorèse en SDS-PAGE sur gel 12% d'acrylamide ou gradient 8%-17,5% donne deux bandes en conditions réductives (une correspondant à une masse moléculaire de 66 kDa pouvant être la chaîne lourde (H) des immunoglobulines et une autre bande correspondant à une masse moléculaire d'environ 25 kDa pouvant être interprétée comme étant la chaîne légère (L). Dans le spectre électrophorétique du sérum total de Lates, ces deux bandes sont retrouvées.

L'analyse par électrophorèse en SDS-PAGE en conditions non réductrices semble confirmer les résultats précédents ; disparition ou très nette amoindrissement des bandes à 66 kDa et 25 kDa observées en conditions réductrices et apparition de bandes plus lentes au nombre de trois pouvant être interprétées au vue des masses moléculaires comme 2 H associées à 2 L, 2 H associées à 1 L et 2 H associées seules.



Spectres de migration électrophorétique en SDS-PAGE, sous conditions réductrices, de sérums (piste d et e) et d'immunoglobulines purifiées de *Lates calcarifer* (pistes a et b). Piste c : kit de calibration de masse moléculaire (Pharmacia LMW).

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| - Phosphorylase b : | 94.000 daltons |
| - Albumine : | 67.000 daltons |
| - Ovalbumine : | 43.000 daltons |
| - Anhydrase carbonique : | 30.000 daltons |
| - Soybean Trypsin inhibitor : | 20.000 daltons |
| - - lactalbumine : | 14.000 daltons. |

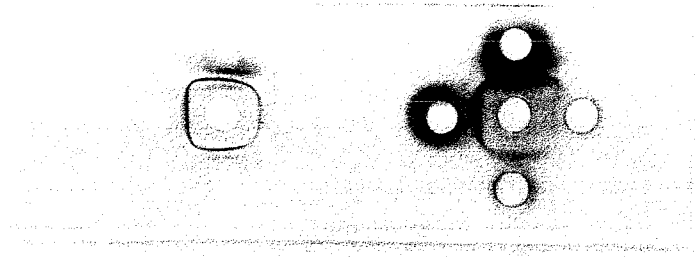


Profils (lecture au densitomètre) des sérums (A) et des immuoglobuline purifiées par dialyse (B) de *Lates calcarifer*, après séparation électrophorétique en SDS-PAGE, sous conditions réductrices.

2/PREPARATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-IMMUNOGLOBULINES DE LATES

2.1 - IMMUNODIFFUSION EN GEL

Les sérums et les ascites de souris anti-immunoglobulines de *Lates calcarifer* avant d'être utilisés en Western blotting sont testés en double diffusion et en immunoélectrophorèse. Les sérums et les ascites préparés précipitent l'antigène ayant servi à immuniser les animaux.



Activité précipitante en Ouchterlony de sérums (A) ou d'ascites (B) de souris anti-immunoglobulines natives de *Lates calcarifer*. Au centre : antigène, immunoglobulines purifiées par dialyse (4mg/ml). Puits périphériques : sérum ou ascite de souris anti-immunoglobulines ; 1 : pur; 2 : 1/2è; 3 : 1/4è; 4 : 1/8è.



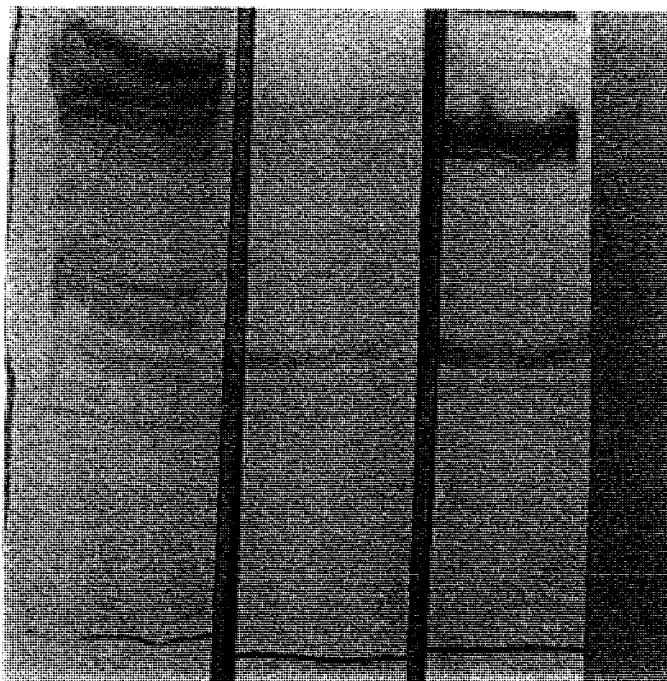
Analyse, par immunoélectrophorèse, de sérum de souris anti-immunoglobulines de *Lates calcarifer* : 1 : sérum total de Lates; 2 : sérum de souris anti-immunoglobulines pur; 3 : anticorps anti-immunoglobulines G de souris (H + L).

2.2 - WESTERN BLOTTING

Les sérums de souris anti-immunoglobulines sont testés sur transferts d'immunoglobulines purifiées et de sérums totaux de *Lates calcarifer*, après séparation des chaînes H et L par électrophorèse en SDS-PAGE sous conditions réductrices. Ils sont utilisés aux 1/100^e, 1/500^e et 1/1000^e.

Il apparaît trois bandes principales pour les transferts d'immunoglobulines purifiées de *Lates calcarifer* : deux dans la zone des masses moléculaires élevées et une dans la région des faibles masses moléculaires. Pour les transferts de sérum total, seule la bande observée dans la zone des masses moléculaires réduites pour les transferts d'immunoglobulines purifiées est visible (quantité d'immunoglobulines certainement plus petite dans le dépôt de sérum total).

Les images ainsi obtenues ressemblent au profil général de migration des immunoglobulines de *Lates* en SDS-PAGE sous conditions réductrices. Les sérums et les ascites de souris préparés semblent donc spécifiques des immunoglobulines de *Lates* : ils ne révèlent que les chaînes H et L en Western blotting et la présence de deux bandes au niveau de la région 65 kDa peut être interprétée comme l'existence d'une certaine hétérogénéité dans la migration des chaînes H (phénomène existant pour les immunoglobulines de truite arc-en-ciel).



Test de l'activité de sérums de souris anti-immunoglobulines de *Lates calcarifer* sur transfert de sérum total ou d'immunoglobulines purifiées natives, préalablement séparées par électrophorèse en SDS-PAGE, sous conditions réductrices.

- a) Transfert de sérum total de *Lates* coloré au noir amide.
- b) Transfert de sérum total de *Lates* révélé par sérum de souris anti-immunoglobulines, dilué au 1/100^e.
- c) Transfert d'immunoglobulines purifiées de *Lates* révélé par sérum de souris anti-immunoglobulines, dilué au 1/100^e.

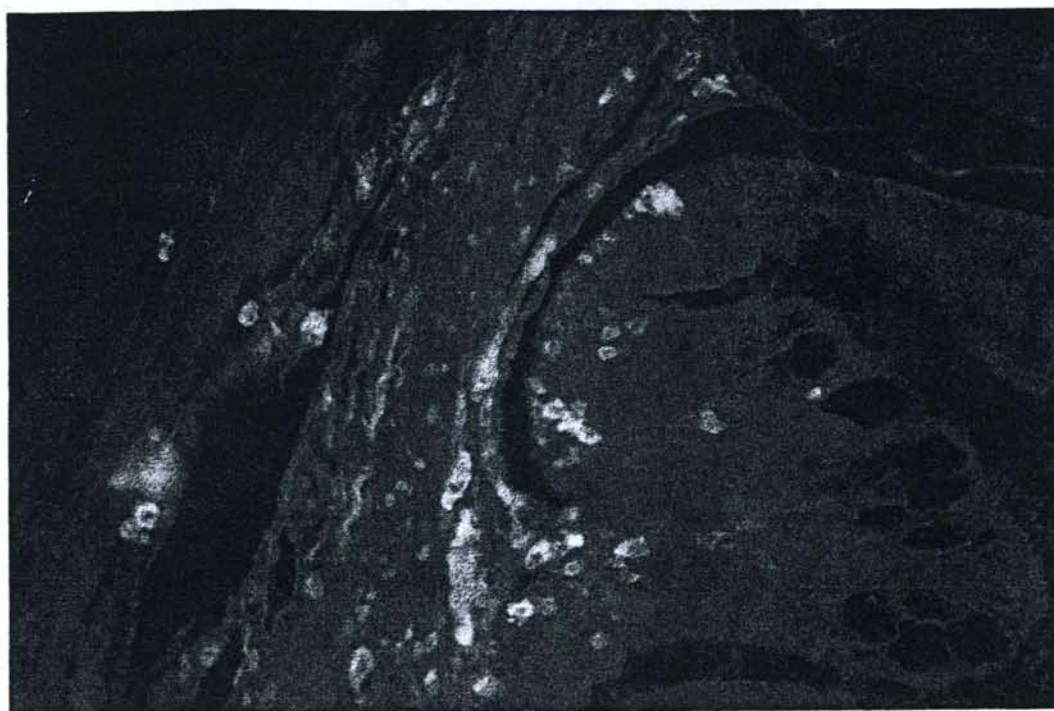
3/LOCALISATION DES CELLULES PORTANT OU SYNTHETISANT DES IMMUNOGLOBULINES A L'AIDE DE SERUMS POLYCLONAUX SPECIFIQUES

3.1 - IMMUNOFLUORESCENCE SUR COUPES D'ORGANES

La réactivité des anticorps polyclonaux anti-immunoglobulines de Lates est testée sur coupes de rein, d'intestin et de foie. Les sérums sont testés au 1/20^e, 1/50^e, 1/100^e et 1/500^e. Les marquages les plus lisibles sont obtenus pour la dilution la plus faible (1/20^e).

Sur coupes de rein, de nombreuses cellules lymphoïdes du tissu interstitiel sont fortement marquées. Les tubules rénaux, les glomérules ainsi que les hématies et les centres mélanomacrophages restent négatifs. Cependant, un léger marquage des endothéliums vasculaires est observable.

Au niveau de l'intestin, des cellules marquées à allure leucocytaire sont détectées dans la *Lamina propria* et entre les faisceaux des fibres musculaires de la couche musculaire la plus externe, et également les leucocytes intraépithéliaux présentent un marquage net. Enfin, au niveau du foie, un marquage discret et diffus est observable dans certaines zones limitées alors que le tissu pancréatique ne présente aucune fluorescence spécifique.



Réactivité de sérums de souris anti-immunoglobulines de *Lates calcarifer* en immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes. Marquages obtenus sur intestin avec sérum dilué au 1/20^e.

3.2 - IMMUNOPEROXYDASE SUR COUPES D'ORGANES

Dans le but de confirmer, voire d'affiner les résultats obtenus avec la technique d'immunofluorescence sur matériel fixé, les sérums de souris anti-immunoglobulines de *Lates calcarifer* sont testés en immunoperoxydase sur coupes d'organes (rate, rein, foie, intestin, muscle et gonade). Les marquages obtenus (sérums dilués au 1/20^e) sont comparables à ceux observés en immunofluorescence sur coupe, en particulier un marquage intense du rein interstitiel et un absence de réactivité des hématies, des centres mélanomacrophages et des tubules rénaux. Le muscle et la gonade ne présentent également aucune fluorescence spécifique.

Les sérums de souris anti-immunoglobulines donnent des marquages reproductibles, quelle que soit la technique utilisée (immunofluorescence ou immunopéroxydase sur coupes d'organes). Ils possèdent une spécificité assez nette : ils reconnaissent en effet une sous population de leucocytes, ayant l'aspect morphologique de lymphocytes, de lymphoblastes ou de plasmocytes.

C/PERSPECTIVES

A plus long terme, les sérums polyconaux anti-immunoglobulines de Lates peuvent être d'un grand intérêt pour le diagnostic. Dans le cas de la pathologie virale chez le Lates, il serait possible par test de sérums en Western blotting de séparer les animaux indemnes d'éventuels animaux porteurs sains.

Il serait également possible de savoir quelle structure protéique du virus du *Lates* est la plus immunogène et de prévoir la production de vaccin recombinant.

ANNEXE 4

PUBLICATION ET POSTER.

MASS MORTALITIES IN HATCHERY-REARED SEA BASS (*Lates calcarifer*) LARVAE ASSOCIATED WITH THE PRESENCE IN THE BRAIN AND RETINA OF VIRUS-LIKE PARTICLES

BY RENAULT, T.*, HAFFNER, PH.*, BAUDIN LAURENCIN, F**, BREUIL, G.*** AND BONAMI, J.R.****

Introduction

Since 1986, an unknown disease causing high mortalities appeared in Ifremer's Pacific Oceanological Center (Tahiti) nursery of sea bass (*Lates calcarifer*).

Pathology of lesions involving both central nervous system (CNS) and eye retina, and the tuatua exists in South-East Asian countries (Indonesia, Philippines, Malaysia and Singapore), and in northern Australia.

This paper describes the histomorphology of a new fish virus, which is believed to be the aetiological agent of high mortalities among sea bass larvae.

Materials and methods.

Animals

Affected fish were sampled from five successive lots of larvae reared at the Center from February 1989 to February 1990. Samples were taken daily from day 8 to day 40 after hatching and were processed for histology or stored at -80°C for virus purification.

Light and electron microscopy

The affected live larvae were fixed *in toto* in Holland Bouin fluid, embedded in paraffin and the 4' and methyl green - pyronin staining, fluorescence examination after acridine orange binding technique.

For electron microscopy, the larvae were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in Sorensen buffer and post-fixed in 1 % osmium tetroxide in Palade buffer. Ultrathin sections of the epon embedded specimens were contrasted according to Reynolds (1963) and examined in a Hitachi HU11B electron microscope operating at 75 Kv.

Virus suspensions were negatively stained with 2 % phosphotungstic acid (PTA), pH 7.0.

Virus extraction and purification

Frozen larvae were homogenized in standard PBS buffer using a glass tissue blender. After two clarifications (1,000 g for 10 min. followed by 18,000 g for 30 min.), the final supernatant was filtered on a Celite bed and pelleted at 150,000 g for 2 hrs on a Beckman L7-55 ultracentrifuge. Pellets were resuspended in PBS and 3 times extracted with freon 113 (1,1,2-trichloro 1,2,2-trifluoroethane) before being re-pelleted at 150,000 g for 2 hrs.

The final pellet was resuspended in PBS and layered onto a 20-40 % (w/w) sucrose gradient and centrifuged at 150,000 g for 2.30 hrs. One ml fractions were recovered from the gradient using a Büchler autodensiflow equipped with a UV absorbance monitor (ISCO UA 5) recording the optical density at 254 nm wavelength. Bands were diluted in PBS and pelleted at 200,000 g for 2 hrs in a Beckman SW 40.1 rotor. These pellets and the sucrose gradient pellet too, were layered on a 30-40 % (w/w) CsCl gradient in PBS and isopically centrifuged (220,000 g for 15 hrs) in a SW 40.1 rotor. Finally, bands obtained were diluted in PBS and pelleted at 285,000 g for 1.30 hr.

Results

Clinical signs

The main symptoms of the disease are "bleaching" of the 10 - 15 day old larvae, abnormal behaviour, loss of equilibrium and disoriented swimming near the surface. Subsequently, affected fish sink to

the bottom and die.

Histopathology

Histological examination of the larvae revealed abnormal neurons in different parts of the brain (mainly optic tectum, cerebellum, tegmentum, vagal lobes, medulla oblongata and spinal cord). This abnormality consisted of enlarged basophilic cells with very basophilic round-shaped inclusion bodies and cytoplasmic vacuolation (Fig. 1). The vacuoles were often very extensive and the destruction of the affected cells complete. The resulting loss of neural substance gave a spongiform appearance to the tissue ("spongiosis"). The retina itself displayed the spongiotic aspect and the cells containing inclusion-bodies (Fig. 2). The lesions were limited to the neuronal layers. In all cases, the inflammatory response was very discrete. The cerebellum, the optic tectum and the retina appeared to be the primary sites of the lesions.

These histopathological changes were visible in 10 to 20-22 day old larvae. The extent of the lesions varied considerably from fish to fish, although the "spongiosis" appeared to be more extensive as the larvae were affected younger. 35 day old larvae showed the same lesions, but only in the cerebellum.

All the other organs examined by light microscopy, namely gills, heart, digestive system, liver, exocrine pancreas, kidney, spleen, skin and skeletal muscles showed no conspicuous lesions (Fig. 3).

The inclusions present in affected tissues were Feulgen negative and stained red with pyronin-methyl green. This coloration disappeared after enzymatic digestion with ribonuclease. Observation after acridine orange staining showed a red fluorescence of the inclusions revealing the presence of RNA.

Electron microscopy

Electron microscopy showed the presence of round-shaped osmiophilic inclusion-bodies in the cytoplasm of degenerating cells from the brain and retina (Fig. 4). The inclusion bodies appeared to be limited by a unit-membrane and

filled with small (25 nm) regular-shaped (icosahedral) particles. These particles sometimes showed a pseudo-crystalline arrangement and are identified as viral units. The particles were often free in the cytoplasm of affected cells.

Virus isolation and purification

In the sucrose gradient, two bands were evident containing particles (full and empty particles) and some tubular shaped structures with a diameter identical to the viral particles; but the majority of the material was found in the pellet, associated with the cell debris.

After the CsCl gradient, purified full and empty virus particles showed a typical icosahedral shape with a diameter of 25 nm. Small projections were often visible at the edges of isolated particles (Fig. 5).

Discussion

The existence of virus affecting the CNS and the retina of hatchery reared sea bass is demonstrated in the present study. This virus seems to be intrinsically neurotropic. In fact, there is no evident tissue lesions in other organs. Because of the viral distribution, the association of the clinical and histological signs and the absence of other specific tissue lesions, a viral aetiology of the mass mortalities among sea bass fry is suspected. There is very little information on the existence of neurotropic fish viruses (Wolf, 1984; Dorson *et al.*, 1984). In addition, the present virus affecting the CNS and the retina of sea bass has a very small size, and is one of the smallest fish viruses recorded. Recently, the existence of small viruses affecting the CNS of different marine fish was demonstrated (Bellance Gallet de Saint-Aurin, 1988; Glazebrook, 1990; Yoshikoshi Inoue, 1990). In all these cases, the symptomatology and the virus morphology are very similar.

The virus found in the present work is tentatively identified as a member of the family Picornaviridae based on its ability to replicate in the cytoplasm, the presence of a unit-membrane, its size (25 nm) and RNA content (large Feulgen ne-

gative and RNA positive inclusions formed entirely by virions). Further investigations on viral properties are necessary to classify the virus more precisely.

This virus seems to be very virulent and causes high losses. Extensive research in virology and immunology is needed to find a long term solution to this problem.

Summary

Since 1986 high mortality of hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae appeared in Ifremer's Pacific Oceanological Center (Tahiti). Light and electron microscopy show vacuolation and cells with cytoplasmic inclusion bodies in the brain, spinal cord and retina. Numerous non-enveloped particles identified as viral units, icosahedral in morphology and measuring about 25 nm in diameter were found in the cytoplasm of the degenerating cells. The brain and the retina degeneration seem to be the cause of the high mortalities of hatchery-reared sea bass larvae.

References

- Bellance, R. and Gallet de Saint-Aurin, D. (1988). L'encéphalite virale du loup de mer. *Carabes Medical*, 105-114.
- Dorson, M., Torchy, C., Chilmonczyk, S., de Kinkelin, P. and Michel, C. (1984). A rhabdovirus pathogenic for perch (*Perca fluviatilis* L.): isolation and preliminary study. *J. Fish Dis.*, 7, 241-245.
- Glazebrook, J.S. (1980). A virus associated with sea bass mortalities. In "Fish Health Section". Newsletter, 1, 6.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.
- Wolf, K. (1984). Diseases caused by microorganisms: In "Diseases of Marine Animals". Ed. O. Kinne, Helgoland, 4(1), 17-47.
- Yoshikoshi, K. and Inoue, K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck and Schegel). *J. Fish Dis.*, 13, 69-77.

Author's address:

- * Aquacoop - Ifremer Centre Océanologique du Pacifique, BP 7004, Taravao, Tahiti, Polynésie Française.
- ** Laboratoire de Pathologie des Animaux Aquatiques, CNEVA, BP 70, 29280 Plouzané, France.
- *** Ifremer Gie-Ra: Station expérimentale d'aquaculture, 23 chemin de Maguelone, 34250 Palavas-les-Flots, France.
- **** Laboratoire de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place Eugène Bataillon, 34060 Montpellier Cedex 05, France.

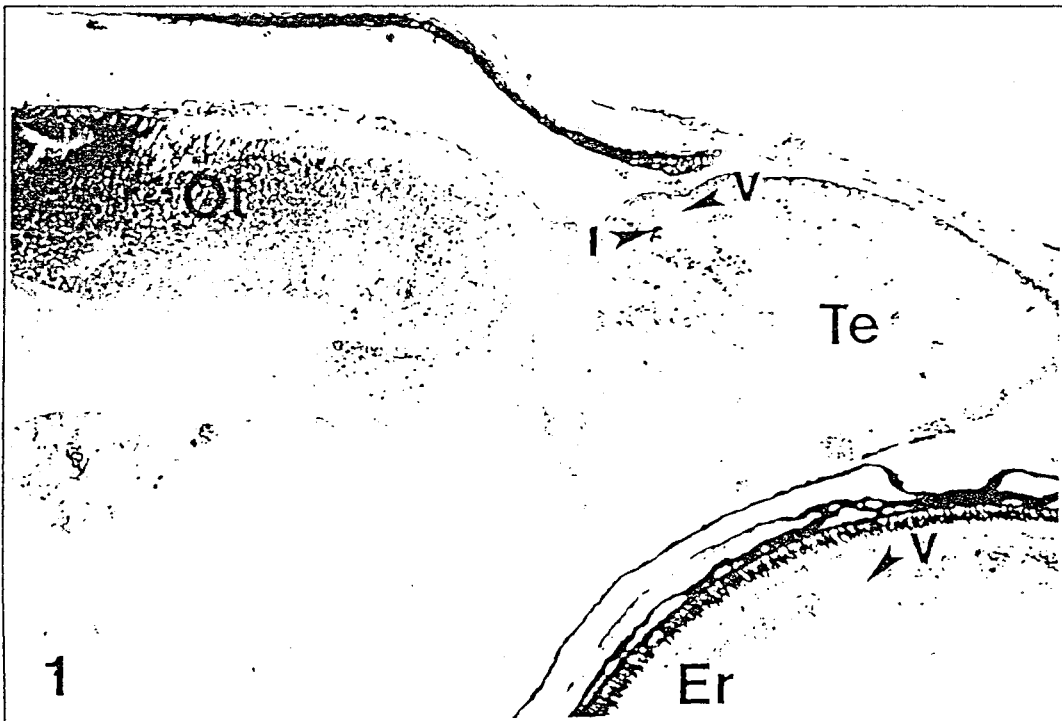


Fig. 1. Light micrograph of a sagittal section of a 15 day old larva showing vacuolation (V) and basophilic inclusions (I) in the brain and the eye (Te: telencephale; Ot: optic tectum; Er: eye retina). Giemsa stain.



Fig. 2. Light micrograph of a sagittal section of a 12 day old larva: extensive vacuolation (V) in the eye retina. Toluidine blue.

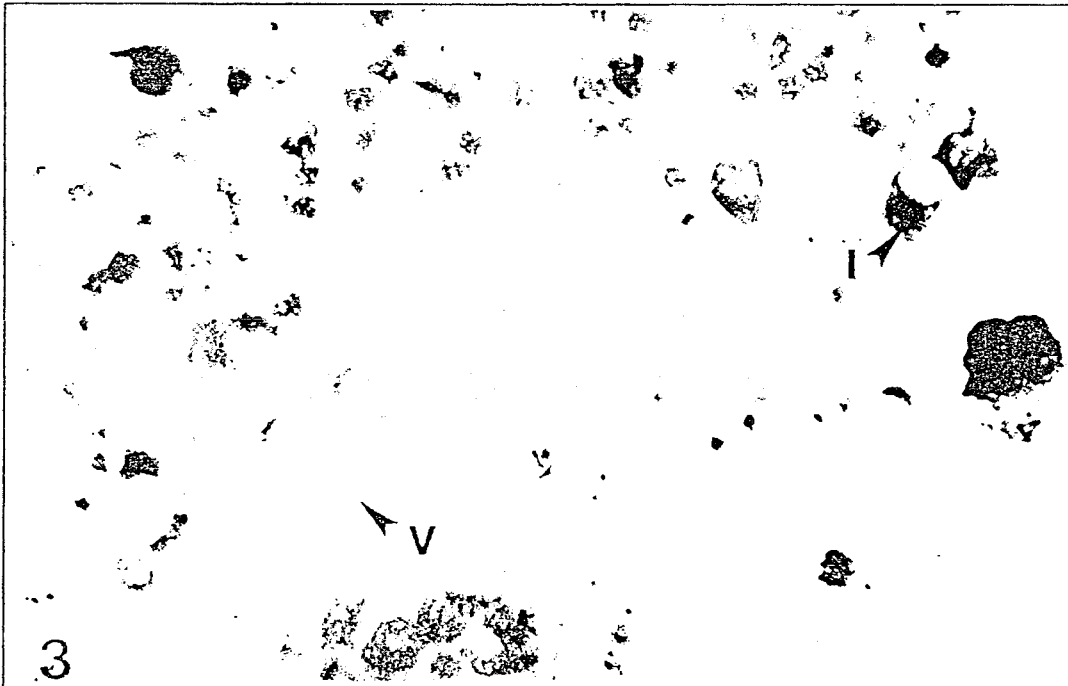


Fig. 3. Light micrograph of a sagittal section of a 15 day old larva showing vacuolation (V) and abnormal cells containing inclusion bodies (I). Giemsa stain.



Fig. 4. Electron micrograph showing the presence of inclusion bodies within the cytoplasm of a nervous cell: paracrystalline arrays of virions (P). (Bar = 0.1 μ).

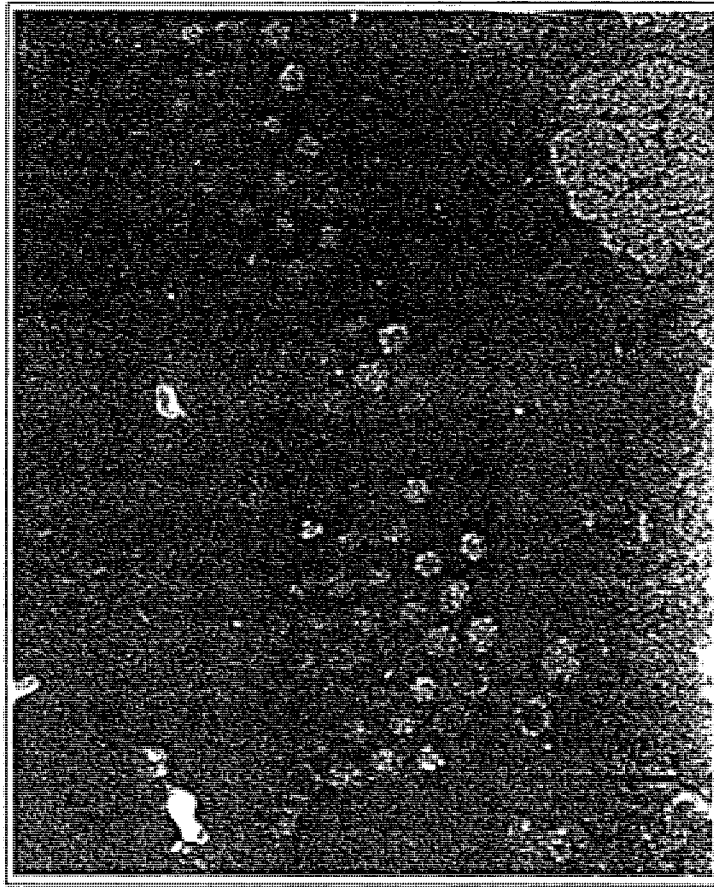
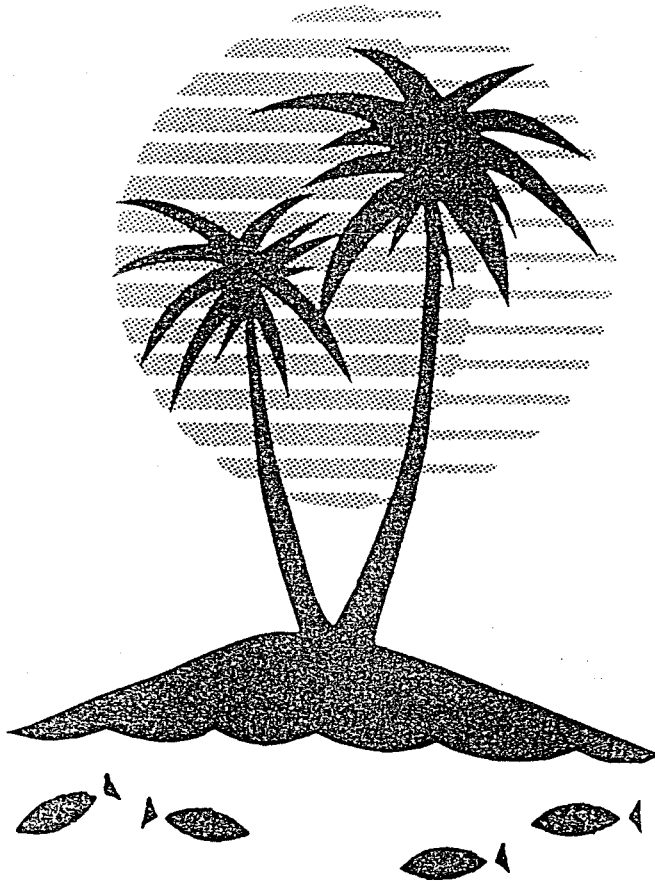


Fig. 5. Electron micrograph of negatively stained (PTA) purified virions. (Bar = 0.1 μ).

PROGRAM &
ABSTRACTS

22nd ANNUAL CONFERENCE
& EXPOSITION

WORLD AQUACULTURE SOCIETY



SAN JUAN, PUERTO RICO

JUNE 16-20, 1991

sostrea gigas, *C. corteziensis* and even *Ostrea edulis* up to a certain extent, in five northwestern states of the country. In the Gulf of Mexico, American oyster *C. virginica* is bottom cultured in the five coastal states.

Focusing on 1983-1989 production, an annual growth rate of 9% is recorded, with a total yield of 64,000 metric tons in 1989. In 1990, 18,000 tons were registered from January to May.

There exist some 40 oyster production units, fishermen formerly grouped in cooperatives in the Gulf of Mexico, and another 58 in the Pacific Coast. Many other fishermen grouped in cooperatives just collect oyster from natural populations in coastal lagoons; these are not considered here.

By using intensive culture devices like trays, rafts or racks, the whole weight production of oysters yield from 20 to 800 kilograms, per growing cycle per device. The bottom growth system or extensive method yields 30 to 50 tons per hectare per year.

With the construction of the "parques ostrícolas" (oyster production parks) by the government, and the incorporation of private investors to this activity, actually supported by the new policies on aquaculture in Mexico, the annual growth rate is expected to reach 15% for future oyster culture.

The commercial application of a recirculating raceway aquaculture system for shrimp and fish production.

BART REID, AQUAMAR PRODUCTION RESEARCH CORPORATION, P.O. BOX 27099, PANAMA CITY, FL 32411 USA.

A pilot scale commercial recirculating raceway system based on the experimental system at the University of Texas—Marine Science Institute was built and operated near Panama City, Florida. *Penaeus vannamei* were cultured at stocking densities from 680-2,200 PL8/m³ for six to eight months. Survivals ranged from 11%-80% with production from 3-11 kg/m³. Shrimp average size varied from 18-26 grams. Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) and yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*) were also cultured in this system with preliminary results suggesting good economic potential.

System design, start up, problems and needs will also be discussed.

Ozonation as a water treatment method in intensive recirculating marine culture systems.

BART REID AND DR. C. R. ARNOLD, UNIVERSITY OF TEXAS MARINE SCIENCE INSTITUTE, PORT ARANSAS, TX 78323 USA.

Ozonation was tested as a water treatment method for the intensive culture of *Penaeus vannamei* and *Sciaenops ocellatus* in recirculating raceway systems. Ozone was diffused directly into the culture water and its effects on BOD, anaerobic, aerobic and heterotrophic bacteria were monitored weekly. Fish and shrimp ozone tolerance levels were also tested.

Pearson correlation coefficient analysis showed a negative correlation between ozone level and BOD and bacteria counts within the raceway systems. Shrimp had ozone tolerance levels of up to 1 ppm ozone and fish of up to 0.1 ppm ozone.

Mass mortalities in hatchery-reared sea bass, *Lates calcarifer*, larvae associated with the presence in the brain and eye retina of particles identified as viral units.

TRISTAN RENAULT,* LABORATOIRE DE PATHOLOGIE, IFREMER-CENTRE OCEANOLOGIQUE DU PACIFIQUE, BP 7004 TARAVALO, TAHITI, POLYNESIE FRANCAISE, FELIX BAUDIN LAURENCIN, LABORATOIRE DE PATHOLOGIE DES ANIMAUX AQUATIQUES, CNEVA, BP 70 PLOUZANE, FRANCE, GILLES BREUIL, STATION EXPERIMENTALE D'AQUACULTURE, IFREMER GIE-RA, PALAVAS-LES-FLOTS, FRANCE, JEAN ROBERT

BONAMI, LABORATOIRE DE PATHOLOGIE COMPAREE, UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES, MONTPELLIER, FRANCE.

Since 1986 high mortality of hatchery-reared sea bass, *Lates calcarifer*, larvae appeared in Ifremer's Pacific Oceanological Center (Tahiti).

Light and electron microscopy show vacuolation and cells with cytoplasmic inclusion bodies in the brain, the cord and the eye retina of affected larvae. Numerous non-enveloped particles identified as viral units, icosahedral in morphology and measuring about 25 nm in diameter were found in the cytoplasm of the degenerating cells. In affected larvae, these particles were isolated by density gradient centrifugations. Negatively stained preparations exhibit full and empty icosahedral particles 25 nm in diameter.

In vitro tests on cell lines and immunization of mice are performed with samples of diseased larvae (results expected in January 1991).

The virus found in the present work is probably the main cause of the mass mortality of sea bass larvae according to the neurotropic location and the importance of cytopathological effects compared with the lack of lesions in other organs. This virus is tentatively identified as a member of the family Picornaviridae based on its ability to replicate in the cytoplasm, the presence of a unit-membrane, its size and RNA content (large DNA negative and RNA positive inclusions formed entirely by virions).

Business planning for small-scale aquaculture ventures: an introduction.

RAYMOND J. RHODES,* DIVISION OF MARINE RESOURCES, SOUTH CAROLINA WILDLIFE AND MARINE RESOURCES DEPARTMENT, P.O. BOX 12559, CHARLESTON, SC 29422-2559 USA.

Business plans for a small-scale aquaculture business can be beneficial in a wide variety of situations including (1) the evaluation and control of the project's performance; (2) communication of funding needs to potential investors and/or lenders; and (3) evaluation of the overall commercial feasibility "on paper." When preparing and implementing a business plan for a new aquaculture business, problem areas may be encountered due to unrealistic market analysis, expensive marketing tactics, and inappropriate financing relative to the current and future needs.

A small-scale aquaculture business must also seek out cost-effective marketing tactics. Aquaculture entrepreneurs seeking start-up capital for a small-scale operation need to be especially creative in developing financing strategies. Last but not least, the manager of a small-scale operation must be prepared to perform a wide variety of tasks, ranging from minor equipment repairs to product distribution. Microcomputer technology also offers the manager of a small aquabusiness the opportunity to increase his effective control over financial and non-financial tasks.

Financial performance of commercial small-scale marine shrimp culture in South Carolina.

RAYMOND J. RHODES,* ALVIN D. STOKES AND J. STEPHEN HOPKINS, DIVISION OF MARINE RESOURCES, SOUTH CAROLINA WILDLIFE AND MARINE RESOURCES DEPARTMENT, CHARLESTON, SC 29412 USA.

In 1990, commercial small-scale (<6 ha of total water surface area) marine shrimp (mainly *Penaeus vannamei*) farms produced about 60,000 kg of whole shrimp with yields as high as 13,300 kg/ha/year. In order to analyze the financial performance of S.C. small-scale shrimp farms, an economic-engineering approach based upon commercial operating experience was utilized in estimating costs and returns in the 1988-1990