

**RAPPORT SCIENTIFIQUE
ET TECHNIQUE**

**ANALYSES VIROLOGIQUES
DU POULAMON ATLANTIQUE
(*MICROGADUS TOMCOD*)
DU SAINT-LAURENT**

Rapport ST-4

Analyses virologiques du Poulamon atlantique (*Microgadus tomcod*) du Saint-Laurent

Laurent Berthiaume
Centre de recherche en virologie
Institut Armand-Frappier

Contamination du milieu aquatique
Centre Saint-Laurent
Conservation de l'environnement
Environnement Canada, Région du Québec

Septembre 1994

AVIS DE RÉVISION

Le présent rapport a été examiné par le Centre Saint-Laurent, Direction de la Conservation, Environnement Canada, région Québec, qui en a autorisé la publication. Cette autorisation ne signifie pas nécessairement que le contenu du rapport reflète les opinions et les politiques du Ministère. Les mentions de marques de commerce ou de produits commerciaux ne signifient aucunement que leur utilisation est recommandée.

On devra citer la publication comme suit :

Berthiaume, L. 1994. *Analyses virologiques du Poulamon atlantique (Microgradus tomcod) du Saint-Laurent*. Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, pour Environnement Canada, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent, Rapport scientifique et technique ST-4, 16 pages.

Perspective de gestion

La présente étude a été réalisée pour le volet Aide à la prise de décision de Saint-Laurent Vision 2000. Effectuée dans un projet multidisciplinaire de recherche pathologique et d'analyse de la contamination chimique du milieu, l'étude vise à mettre en évidence les causes de maladies observées chez le Poulamon atlantique, une ressource d'intérêt sportif et commercial, qui représente une espèce clé de l'écosystème du Saint-Laurent.

Management Perspective

This study was conducted under the Saint-Laurent Vision 2000 action plan as a support to decision making. Part of a multidisciplinary research project into the pathological and chemical contamination of the environment, the study is aimed at highlighting the causes of the disorders observed in Atlantic Tomcod, a key species in the ecosystem of the St. Lawrence and a resource of commercial and sports value.

Cette page est blanche dans le document original

Résumé

Dans le but de vérifier l'hypothèse étiologique à l'effet qu'une infection serait la cause d'ulcères oraux ou corporels observés chez le Poulamon atlantique (*Microgadus tomcod* Walbaum), une étude virologique a été effectuée sur 36 spécimens capturés dans le Saint-Laurent en janvier 1993. L'analyse virologique a porté sur des morceaux de tissus épidermiques prélevés autour d'ulcères externes et sur des parties de différents organes internes. La recherche de virus s'est avérée négative dans tous les cas et l'évidence d'une infection virale n'a pu être confirmée. Un virus ne semble donc pas être l'agent infectieux des ulcères observés chez les Poulamons du Saint-Laurent.

Abstract

Thirty-six specimens of Atlantic Tomcod (*Microgadus tomcod* Walbaum) from the St. Lawrence River were examined to verify the hypothesis of viral infection as causative agent of oral and body ulcers in this species. Samples of skin around ulcerative lesions and of various internal organs were analysed. Negative results were obtained in all cases and viral infection could not be confirmed. The presence of virus does not appear to be the causative agent of ulcers observed in tomcod from the St. Lawrence River.

Remerciements

Nos remerciements vont à Yves Mailhot et à son équipe du ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec pour la récolte et la sélection des poissons qui ont servi à la présente étude ainsi qu'à Daniel Martineau et Stéphane Lair de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, pour les diagnostics pathologiques. Nous désirons aussi remercier Christiane Hudon pour ses commentaires sur une version préliminaire du document, Henrique Martins pour la dactylographie et Michèle Létienne-Prévost pour l'édition du texte.

La présente étude a été financée par le Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Environnement Canada, région du Québec. Yves de Lafontaine, de la section Contamination du milieu aquatique, a agi à titre de délégué scientifique et a assuré la révision scientifique et la production du rapport.

Table des matières

RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	v
REMERCIEMENTS	vi
1 INTRODUCTION	1
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	2
3 RÉSULTATS	4
4 DISCUSSION ET CONCLUSION	6
RÉFÉRENCES	7
TABLEAU Résultats de l'analyse virologique d'échantillons de Poulamon atlantique	4

Cette page est blanche dans le document original

1 Introduction

Poisson anadrome de la famille des *Gadidae*, le Poulamon atlantique (*Microgadus tomcod* Walbaum) du Saint-Laurent forme une population génétiquement homogène, dont l'aire de distribution s'étend depuis les sites de frai dans les rivières Batiscan et Sainte-Anne, en amont, jusqu'à Rivière-du-Loup dans l'estuaire du Saint-Laurent, en aval (Fortin *et al.*, 1990; Baby, 1993). L'espèce fait l'objet d'une pêche sportive et commerciale principalement en hiver au cours de la période de reproduction en eau douce. Après leur éclosion, les larves de Poulamon dérivent vers les zones de nutrition et de croissance dans l'estuaire du Saint-Laurent (Able, 1978; Laprise et Dodson, 1989; de Lafontaine, 1990). L'espèce, au stade juvénile et adulte, représente une espèce-clé de l'estuaire moyen du Saint-Laurent.

Jadis abondant, le Poulamon du Saint-Laurent a subi une baisse importante de ses effectifs depuis 1986 (Mailhot *et al.*, 1988). Les causes précises de ce déclin demeurent méconnues et pourraient être attribuables à un faible recrutement, à la perte d'aires de reproduction et(ou) à la pollution (Fortin *et al.*, 1990). Les informations disponibles sur la contamination chimique du Poulamon indiquent la présence de diverses substances inorganiques et organiques toxiques chez des spécimens capturés au milieu des années 1970 (Sloterdijk, 1978) et à la fin des années 1980 (Gagnon *et al.*, 1990). Plus récemment, la présence d'ulcères oraux et corporels chez des individus adultes en migration de frai dans la rivière Sainte-Anne a été rapportée (Lair *et al.*, 1994). La prévalence relativement élevée de ces types d'ulcères chez les poissons (6,6 % des spécimens examinés), qui n'avaient pas été notés chez le Poulamon auparavant, a conduit à l'hypothèse d'une cause infectieuse.

Le présent rapport fait état des résultats d'une recherche virologique effectuée dans le cadre d'un projet multidisciplinaire d'étude pathologique et d'évaluation de la contamination du Poulamon du Saint-Laurent par des substances chimiques.

2 Matériel et méthodes

À la mi-janvier 1993, des Poulamons ont été capturés à l'aide de verveux placés à l'embouchure de la rivière Sainte-Anne. Au moment de leur capture, les poissons ont été examinés vivants, et 36 spécimens qui présentaient, à divers degrés, les symptômes d'ulcères décrits par Lair *et al.* (1994) à la bouche ou au corps ont été sélectionnés pour analyse virologique. Parmi les 36 poissons, 15 avaient des lésions externes, alors que les autres individus ne présentaient que des symptômes précoces d'ulcères (sans lésion externe). Tous les spécimens ont été congelés après leur capture et ont été expédiés au laboratoire du Centre de recherche en virologie de l'Institut Armand-Frappier en avril 1993.

Des portions de tissus d'un poids humide variant entre 2 et 5 g ont été prélevées des lésions autour de la bouche et(ou) sur la peau des nageoires des Poulamons qui montraient des signes cliniques de la maladie. Les tissus ont été homogénéisés au moyen d'un appareil Sorvall en présence d'un tampon phosphate (PBS) et centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 minutes¹. Les surnageants ont été retirés, dilués à 2 % dans du PBS et filtrés sur filtres Millipore à mailles de 0,45 µm. Les filtrats ont été inoculés tels quels et dilués à 1/10 sur différentes lignées cellulaires de poissons (RTG-2, FHM, CHSE-214, BB, BF2) dans des microplateaux de 24 ou 96 puits et incubés à 10, 15 ou 20 °C. Les lignées cellulaires choisies sont faciles à se procurer chez les fournisseurs et sont les plus communément utilisées en analyse virologique. Les organes internes (foie, pancréas, portion antérieure du rein, caecum et branchies) ont également été prélevés chez tous les poissons reçus et traités séparément de la même façon que les tissus des lésions. Les cellules infectées ont été observées à tous les jours ou aux deux jours afin de détecter l'apparition d'effets cytopathogènes. Lorsqu'une dégénérescence cellulaire était observée, un deuxième passage était effectué sur les mêmes lignées cellulaires à partir des cellules infectées et remises en suspension dans le milieu de culture.

¹ Les normes du *Règlement sur la protection de la santé des poissons - Guide de procédure*, Publication diverse spéciale 31 (édition révisée), de Pêches et Océans, ont servi de normes minimales, avec l'ajout de variations dans les paramètres d'isolement viral et de techniques supplémentaires de diagnostic virologique (comme la microscopie électronique).

Une recherche plus approfondie, impliquant un deuxième passage sur lignées cellulaires, a été faite dans le cas de 11 spécimens, c'est-à-dire chaque fois qu'un doute se manifestait quant à la présence possible de virus (effet cytopathogène et[ou] cytotoxique). Des examens ont également été effectués en microscopie électronique, soit en coloration négative à partir de surnageant de cellules infectées et dégénérées, soit en coupes ultraminces à partir de tissus ulcérés et de cellules infectées. Les 25 Poulamons restants ont subi un examen normalisé, mais qui impliquait quatre lignées cellulaires différentes (au lieu des deux habituellement recommandées) et trois températures (10, 15 et 20 °C) au lieu d'une seule (15 °C) et deux dilutions (2 % et 0,2 %) au lieu du 2 % habituel, pour minimiser un effet cytotoxique possible.

3 Résultats

Une dégénérescence cellulaire tardive, après trois à cinq jours d'infection, a été observée sur de nombreux prélèvements de poissons, tant à partir des lésions externes que des organes internes (tableau). Malgré sa progression relativement lente, cette dégénérescence ne s'est jamais présentée comme une dégénérescence typique d'une infection virale, avec foyers d'infection aléatoires. Par ailleurs, la dilution à 1/10 du matériel d'infection (filtrat de tissus de poissons à 2 %) a souvent eu pour effet de diminuer la dégénérescence cellulaire. Un deuxième passage à partir des cellules dégénérées et effectué dans les mêmes conditions s'est toujours (27 cas sur 27) avéré négatif, c'est-à-dire sans effet cytopathogène et(ou) cytotoxique. Aucune relation n'a pu être établie entre la présence ou l'absence de lésions chez le Poulamon et l'effet observé en cultures cellulaires. L'utilisation de différentes températures de croissance n'a également produit aucune différence dans les effets observés. La recherche virologique effectuée en microscopie électronique à partir de plusieurs surageants de cellules dégénérées, à partir d'enrobages de ces cellules ou encore directement à partir des tissus de poissons n'a révélé la présence d'aucun virus.

Tableau
Résultats de l'analyse virologique d'échantillons de Poulamon

Poulamons					Passages sur cellules					Microscopie électronique	
N° du spécimen	Sexe	Longueur (cm)	Poids (g)	Tissu prélevé	CHSE	RTG2	FHM	BB	BF2	Col. nég.	Coupes u.m.
1	F	30	292,1	Organes	?	-	?/-	-	-	N	
1a				Lésions	?	?	?/-	-	-		
2	M	24	29,4	Organes	?	-	?/-	-	-		
2a				Lésions	?	?	?/-	-	-	N	
3	M	18	156	Organes	?/-	?	?	?	-		
3a				Lésions	-	?	-	-	-		N
4	F	25	109,9	Organes	?/-	?	?	?	-	N	
4a				Lésions	-	?	-	-	-		N
5		21	94,2	Organes	?/-	-	-	-	-		
6		19	73,7	Organes	?/-	-	-	-	-		
7		19	67,3	Organes	?/-	-	-	-	-		
8		16	52,5	Organes	?/-	-	-	-	-		N

Poulamons					Passages sur cellules					Microscopie électronique	
N° du spécimen	Sexe	Longueur (cm)	Poids (g)	Tissu prélevé	CHSE	RTG2	FHM	BB	BF2	Col. nég.	Coupes u.m.
9		12	30,2	Organes	?	-	-	?	?/-		N
10		22	111,1	Organes	?	-	-	?	?/-		N
10a				Lésions	-	-	-	-	-		
11		19	82,8	Organes	?/-	-	-	-	-		
11a				Lésions	?/-	-	-	-	-		
12	M	22	97,1	Organes	-	-	-	-	-		
13	M	22	107,3	Organes	-	-	-	-	-		
14	F	18,5	94	Organes	-	-	-	-	-		
15	M	18	61,5	Organes	-	-	-	-	-		
16	F	18	61,5	Organes	-	-	-	-	-		
17	F	16,5	50,5	Organes	-	-	-	-	-		
18	F	21,5	109,6	Organes	-	-	-	-	-		
19	F	18	55,1	Organes	-	-	-	-	-		
20	M	22	95,3	Organes	-	-	-	-	-		
21	F	21	96,6	Organes	-	-	-	-	-		
22	F	21	97,3	Organes	?/-	-	-	-	-		
23	F	19	72,8	Organes	-	-	-	-	-		
24	F	20,5	91,5	Organes	-	-	-	-	-		
25	F	22	124,8	Organes	-	-	-	-	-		
26	F	19	86,8	Organes	-	-	?/-	-	-		
27	F	22,5	97	Organes	-	-	?/-	-	-		
28	F	25,5	184,7	Organes	-	-	?/-	-	-		
28a				Lésions	-	-	-	-	-		
29	M	23,5	136	Organes	-	-	?/-	-	-		
29a				Lésions	-	-	?/-	-	-		
30	F	23	103,9	Organes	-	-	?/-	-	-		
30a				Lésions	-	-	-	-	-		
31	F	25	147,3	Organes	-	-	?/-	-	-		
31a				Lésions	?/-	-	?/-	-	-		
32	F	22	89	Organes	-	-	-	-	-		
32a				Lésions	-	-	-	-	-		
33	F	17	57,2	Organes	-	-	-	-	-		
33a				Lésions	-	-	-	-	-		
34	M	19	61,5	Organes	-	-	-	-	-		
34a				Lésions	-	-	-	-	-		
35	M	24	124,5	Organes	-	-	-	-	-		
35a				Lésions	-	-	-	-	-		
36	M	18	63,5	Organes	?/-	-	?/-	-	-		
36a				Lésions	?/-	-	-	-	-		

Légende. - Le type de tissu prélevé pour analyse provenait soit d'organes internes (Organes), soit de lésions externes (Lésions). Les résultats des premier et deuxième passages sont indiqués comme */*. Le point d'interrogation (?) signifie un effet cytopathogène douteux (dégénérescence cellulaire tardive), alors que le tiret (-) indique un résultat négatif (absence d'effet cytopathogène). Les analyses en microscopie électronique avec coloration négative (Col. nég.) ou sur coupes ultra minces (Coupes u.m.) n'ont été réalisées que sur les 11 premiers spécimens, et la lettre N indique la non-observation de virus.

4 Discussion et conclusion

La recherche de virus chez les Poulamons du Saint-Laurent qui montraient des lésions ulcéreuses s'est avérée entièrement négative. Il n'a jamais été possible de reproduire dans un deuxième passage les effets cytopathogènes observés lors d'un premier passage. Il est fort possible que l'effet observé soit de nature cytotoxique et qu'il soit dû à une substance inconnue contenue dans les extraits de poissons. Par ailleurs, tous les examens en microscopie électronique se sont montrés négatifs, aucune particule ou structure virale n'ayant pu être mise en évidence.

Toutefois, il demeure possible, même si la probabilité est faible dans l'état d'avancement actuel de nos travaux, que nous soyons en présence d'un agent infectieux inconnu qui causerait un effet cytopathogène au premier passage mais qui ne supporterait pas un deuxième passage *in vitro* dans les conditions de laboratoire utilisées. L'histoire de la virologie abonde en virus qui ont résisté longtemps à l'isolement en culture cellulaire. Il existe peu de lignées de cellules de poissons, et il est connu qu'elles ne supportent pas toujours la réplication d'agents viraux provenant d'espèces de poissons différentes. Par ailleurs, il est possible qu'il s'agisse d'un agent viral de morphologie inconnue, en plus d'être difficile à isoler, c'est-à-dire qui n'entre pas dans les grandes familles virales décrites dans la littérature. La taxonomie virale établit régulièrement de nouvelles familles et de nouveaux genres, et les virus des organismes marins commencent à peine à être découverts et identifiés, étant donné leur très grande diversité et la difficulté d'accès des milieux aquatiques.

Dans l'état actuel de nos travaux, il faut conclure qu'aucun virus connu n'est à l'origine des ulcères observés chez les Poulamons du Saint-Laurent au cours de l'hiver 1992-1993. En dépit de cela, il faut conserver l'hypothèse d'un virus en attendant que soient effectués des travaux plus poussés.

Références

- Able, K.W. (1978). «Ichthyoplankton of the St. Lawrence Estuary: Composition, distribution and abundance», *J. Fish. Res. Bd Can.*, 35 : 1517-1531.
- Baby, M.-C. (1993). «Variabilité génétique et discrimination des populations de Poulamon atlantique (*Microgadus tomcod*) par l'analyse de l'ADN mitochondrial». Thèse de maîtrise (M. Sc.), Université Laval, Québec, 47 p.
- de Lafontaine, Y. (1990). «Ichthyoplankton communities in the St. Lawrence Estuary: Composition and dynamics», dans M.I. El-Sabh et N. Silverberg (éd.), *Oceanography of a Large-scale Estuarine System, the St. Lawrence*. Coastal and Estuarine Studies, vol. 39, Springer-Verlag, New York, pp. 321-343.
- Fortin, R., M. Léveillé, P. Laramée et Y. Mailhot (1990). «Reproduction and year-class strength of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) in the Sainte-Anne River, at La Pérade, Québec», *Can. J. Zool.*, 68 : 1350-1359.
- Gagnon, M.M., J.J. Dodson, M.E. Comba et K.L.E. Kaiser (1990). «Congener-specific analysis of the accumulation of polychlorinated biphenyls (PCB's) by aquatic organisms in the maximum turbidity zone of the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada», *Sci. Total Environment*, 97/98 : 739-759.
- Lair, S., Y. Mailhot, R. Higgins, D. Bélanger, L. Berthiaume, Y. de Lafontaine et D. Martineau (1994). «Ulcerative lesions in Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod Walbaum*) from the St. Lawrence River», *J. Fish. Diseases* (soumis pour publication).
- Laprise, R. et J.J. Dodson (1989). «The mechanism of retention of pelagic tomcod, *Microgadus tomcod*, larvae and juveniles in the well-mixed part of the St. Lawrence estuary», *Env. Biol. Fish* 29 : 293-302.
- Sloterdijk, H. (1978). *Contamination des organismes de l'estuaire*. Rapport d'étude sur le tronçon en aval de Montmagny soumis au Comité d'étude sur le fleuve Saint-Laurent, Environnement Canada, vol 4., chap. 9, pp. 709-820.

Cette page est blanche dans le document original