

**Synthèse des résultats obtenus
concernant l'étude du virus de type herpès
et la mise au point de méthodes de
diagnostic de l'infection**

Juin - Septembre 1996

**Tristan RENAULT
Rose-Marie LE DEUFF
Cécile LIPART
Bruno CHOLLET
Philippe HAFFNER**

*Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade*



IFREMER

Cette note de synthèse des travaux réalisés au laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade, dans le cadre de l'étude du virus de type herpes et de la mise au point de méthodes de diagnostic fait suite à la précédente note (fin mai 1996). Les résultats obtenus concernant les analyses protocolaires et hors protocoles, ainsi que les résultats expérimentaux déjà disponibles sont donnés et commentés en quatre points.

Cette étude est soutenue par la Région Poitou Charente et la Région Pays de Loire.

1 - ESSAIS D'AMELIORATION DU PROTOCOLE DE PCR.....	2
1.1 - EFFET INHIBITEUR DES SURNAGEANTS DE BROYATS DE NAISSAIN.....	2
1.2 - EFFET INHIBITEUR DES PRODUITS DE LA REACTION DE PCR1 EN PCR2	5
1.3 - QUANTITE D'ADN POLYMERASE UTILISEE PAR TUBE DE REACTION.....	5
1.4 - NOMBRE DE CYCLES.....	8
1.5 - CONCLUSION	8
2 - ANALYSES EFFECTUEES EN PCR POUR LA RECHERCHE DE VIRUS DE TYPE HERPES DANS LE CADRE DU PROTOCOLE SMIDAP / IFREMER (PAYS DE LOIRE).....	10
2.1 - RESULTATS DES ANALYSES REALISEES POUR LES PRELEVEMENTS EFFECTUES A PEN BE LE 03/07/96	10
2.1 - RESULTATS DES ANALYSES REALISEES POUR LES PRELEVEMENTS EFFECTUES A PEN BE LES 31/07/96 ET 01/08/96	16
2.3 - CONCLUSION	21
3 - ANALYSES EFFECTUEES EN PCR POUR LA RECHERCHE DE VIRUS DE TYPE HERPES SUR DES LOTS PRELEVES EN 1996, DANS LE CADRE DE LA VEILLE ZOOSANITAIRE, AU LABORATOIRE DE LA TREMBLADE	23
4 - ESSAIS DE REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE LA MALADIE.....	32
4.1 - NAISSAIN D'HUITRE CREUSE	32
4.2 - LARVES DE PALOURDE JAPONAISE.....	38

Essais d'amélioration du protocole de PCR

1 - Essais d'amélioration du protocole de PCR

Différents paramètres ont été testés au laboratoire de La Tremblade afin d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité du diagnostic par PCR de l'infection à herpèsvirus. Les essais ont porté sur la recherche d'un effet inhibiteur des surnageants de broyats de naissain sur la réaction de PCR ainsi que d'un effet inhibiteur des produits de PCR1 sur la réaction de PCR2, sur les quantités d'ADN polymérase à utiliser, sur le nombre de cycles d'amplification ainsi que sur la définition d'un témoin positif correspondant au seuil de sensibilité de la méthode.

1.1 - Effet inhibiteur des surnageants de broyats de naissain

Pour rechercher un éventuel effet inhibiteur des surnageants de broyats sur la réaction de PCR, des essais ont été réalisés en utilisant des gammes de quantités connues d'ADN viral et des tissus de naissain indemne. Il a été ainsi possible de démontrer un effet inhibiteur net des broyats de tissus sur la réaction de PCR (cf. tableau 1). En effet, lorsqu'un μl de surnageant de broyat réalisé à partir de 6, 2 et 1 mg de tissus par μl d'eau distillée est introduit dans un tube de PCR, il est impossible de détecter 5.10^3 copies de génomes viraux en PCR2 et la détection de 5.10^4 , 5.10^5 et 5.10^6 copies est aléatoire. Par ailleurs, pour des broyats réalisés avec de plus petites quantités de tissus (0,1mg, 0,05mg et 0,01mg), la réaction est positive en PCR2 pour 5.10^3 copies de génomes viraux par tube (résultat identique à celui obtenu en l'absence de surnageant de broyat). L'amélioration de la sensibilité, en présence de plus faibles quantités de tissu, est de l'ordre d'un facteur 10 000 à 100 000 par rapport aux résultats obtenus jusqu'alors.

Tableau 1

Résultats obtenus en PCR2 en fonction de la quantité de tissu de naissain indemne incorporée dans le tube de réaction (1 μl de produit de PCR1 en PCR2)

Nombre de copies d'ADN viral/ Concentration des broyats de naissain (mg par μl)	5.10^3	5.10^4	5.10^5	5.10^6
6	-	-	-	+/-
2	-	-	-	+
1	-	+/-	+/-	+
0,5	+/-	+	+	+
0,1	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+
0 - Témoin	+	+	+	+

N.B. : +/-, résultat positif ou négatif en fonction des expériences

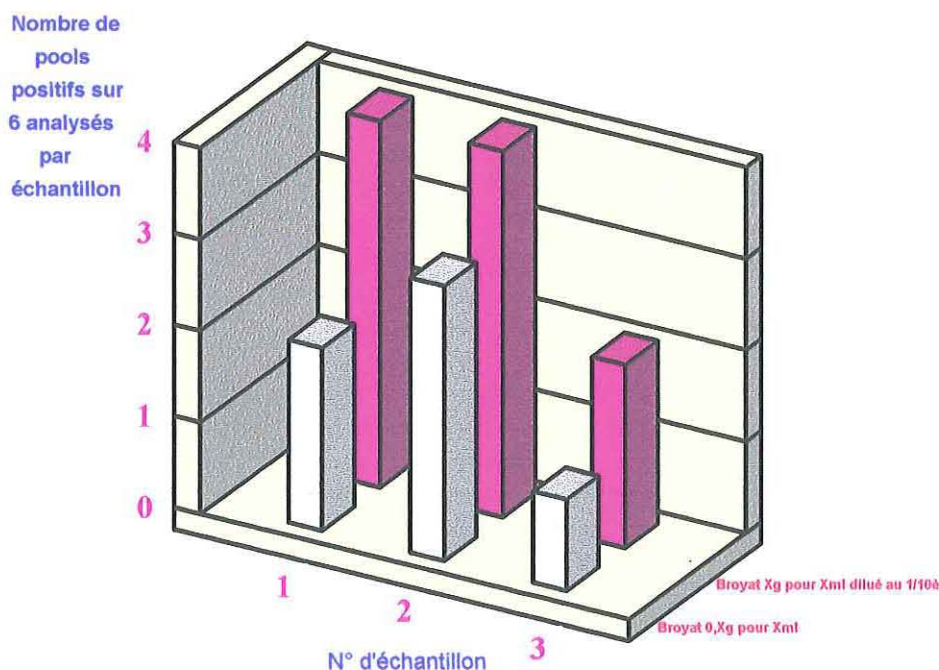
Pour limiter l'effet inhibiteur des surnageants de broyat au cours de la réaction de PCR et obtenir une amélioration de la sensibilité d'un facteur de 10 000 à 100 000, il semblait donc nécessaire de limiter la quantité de tissu dans les tubes.

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés en effectuant une dilution plus importante de l'échantillon (lots présentant des mortalités) par rapport à ce qui était préconisé dans le premier protocole de PCR. Les broyats ont été réalisés en utilisant 0,1g de tissus dilués dans 1ml d'eau distillée au lieu de 1g dans 1ml. Cette modification a permis d'obtenir une amélioration au niveau de la sensibilité.

Cependant, l'amélioration obtenue n'étant pas aussi importante que celle escomptée, d'autres essais ont été alors entrepris. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de broyats effectués à partir de 1g de tissus repris dans 1ml d'eau distillée et dilués au 1/10^e avant leur utilisation. Les résultats obtenus dans ce cas sont meilleurs. En effet, il est possible d'obtenir plus de résultats positifs pour un lot donné en utilisant ce protocole qu'en utilisant directement des broyats faits avec 0,1g dans 1 ml d'eau (cf. figure 1). De plus, ce type de protocole facilite le broyage des tissus.

Figure 1

Résultats obtenus en PCR2 en fonction du protocole de préparation des échantillons (réalisation des broyats)



D'autres essais ont par ailleurs été réalisés afin de tenter de réduire l'effet inhibiteur du surnageant de broyat par un traitement au Chelex et à la protéinase K.

Les microbilles de Chelex (5% en eau bidistillée) additionnées au surnageant de broyat permettent d'éliminer les ions divalents, inhibiteurs potentiels de la réaction de PCR. Dans le même temps, la protéinase K (10mg/ml) est ajoutée au surnageant de broyat afin de digérer les protéines pouvant elles, présenter une activité inhibitrice de la PCR et/ou une activité de dégradation de l'ADN. La réaction (56°C, 4h) est arrêtée par chauffage (100°C, 15 min.) et centrifugation (8000 rpm, 5 min.).

Un premier essai a été réalisé en utilisant 0,1µl d'enzyme (0,5 unité) par tube de PCR et 1mg de tissu par tube. La réaction de PCR est effectuée avec 30 cycles. 0,1µl de produit de PCR1 a été utilisé en PCR2. Cette expérience a été conduite en parallèle sur des surnageants traités ou non traités par le Chelex et la protéinase K. Les résultats obtenus montrent que ce traitement n'améliore pas la détection du virus de type herpès en PCR (cf. tableau 2).

Toutefois, d'autres essais pourront être réalisés ultérieurement en appliquant les conditions optimales définies dans les paragraphes suivants concernant la quantité d'enzyme, le nombre de cycles de PCR et la quantité de tissus utilisée.

Tableau 2

Effet du traitement des échantillons au Chelex et à la protéinase K sur les résultats obtenus en PCR2 (0,1µl de produit de PCR1 en PCR2 ; 0,1µl d'enzyme/tube ; 30 cycles de PCR)

N° de l'échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total
1 mg de tissu traité au Chelex et à la protéinase K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1+/15
1 mg de tissu non traité (témoin)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	4+/15

1.2 - Effet inhibiteur des produits de la réaction de PCR1 en PCR2

Afin de vérifier si les produits de PCR1 pouvaient avoir un effet inhibiteur sur la réaction en PCR2, différents volumes (5, 1 et 0,1µl) de la réaction 1 ont été testés pour effectuer la seconde amplification. Les résultats obtenus indiquent qu'un effet inhibiteur semble exister pour les volumes 5 et 1 µl (cf. tableau 3).

De ce fait, il a été choisi de ne prendre que 0,1 µl de produits de PCR1 pour réaliser la seconde amplification, quel que soit le résultat d'amplification obtenu en PCR1.

Tableau 3

Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume de produit de PCR1 utilisé
(pour 5.10^3 copies de génomes viraux)

Volume de produits de PCR1/ Concentration des broyats de naissain (mg par µl)	5µl	1µl	0,1µl
6	-	-	(+)/-
2	-	-	+/-
0,1	-	-	+
0 - Témoin	-	-	+

N.B. : +/-, résultat positif ou négatif en fonction des expériences

1.3 - Quantité d'ADN polymérase utilisée par tube de réaction

Il avait été choisi dans un premier temps, par souci d'économie (prix élevé de l'enzyme), de n'utiliser que 0,1 µl d'ADN polymérase (soit 0,5 unité d'enzyme) par tube de PCR (PCR1 et PCR2). Des essais ont été réalisés afin de vérifier si cette quantité est adéquate et permet de disposer d'une méthode performante pour le diagnostic de l'infection virale. Ainsi, différents volumes d'enzyme par tube de PCR (0,1µl ; 0,3µl ; 0,5µl et 0,8µl) ont été testés sur des gammes de quantités connues d'ADN viral. Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux 4, 5 et 6. Dans un premier temps, nous avons fait varier de la même façon les quantités d'enzyme utilisées en PCR1 et en PCR2. Il apparaît que l'augmentation du volume d'enzyme utilisée par tube de PCR permet d'améliorer la sensibilité de la technique de façon importante (cf. tableau 4).

Dans un second temps, des volumes d'enzyme différents ont été testés en PCR1 et en PCR2 afin de vérifier si l'effet de la quantité d'ADN polymérase utilisée était plus important pour la réaction 1 ou la réaction 2. Il semble qu'il soit préférable d'utiliser 2,5 unités d'enzyme aussi bien pour la première que pour la seconde réaction d'amplification (cf. tableau 7).

Dans ces conditions, il a été choisi de réaliser les réactions de PCR1 et de PCR2 avec 2,5 unités d'ADN polymérase thermorésistante (soit un volume de 0,5µl par tube).

Tableau 4 (Expérience n°1)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé
(0,1µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Nombre de copies d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	5	5.10	5.10 ²	10 ³	2,5.10 ³	5.10 ³	10 ⁴
0,1µl (0,5U)	5-/5	5-/5	5-/5	5-/5	2+/5	5+/5	5+/5
0,5µl (2,5U)	5-/5	1+/5	2+/5	5+/5	NF	5+/5	NF

NB : pour chaque quantité de copies de génomes viraux et quantité d'enzyme, cinq répliquats ont été réalisés. Les résultats donnés dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2 - NF pour non fait.

Tableau 5 (Expérience n°2)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé
(0,1µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Nombre de copies d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	50	500	1000
0,1µl (0,5U)	3-/3	3-/3	3-/3
0,3µl (1,5U)	3-/3	3-/3	1+/3
0,5µl (2,5U)	3-/3	3-/3	1+/3
0,8µl (4U)	3-/3	3-/3	3-/3

NB : pour chaque quantité de copies de génomes viraux et quantité d'enzyme, trois répliquats ont été réalisés. Les résultats donnés dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2. Pour cette expérience, les quantités d'ADN viral par tube étant faibles, peu de résultats positifs sont observés.

Tableau 6 (Expérience n°3)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé
(0,1µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Nombre de copies d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	10 ³	2,5.10 ³
0,1µl (0,5U)	5-/5	4+/5
0,3µl (1,5U)	5-/5	5+/5
0,5µl (2,5U)	1+/5	5+/5

NB : pour chaque quantité de copies de génomes viraux et quantité d'enzyme, cinq répliquats ont été réalisés. Les résultats donnés dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2.

Tableau 7 (Expérience n°4)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé en PCR1 et PCR2
(pour 5.10³ copies de génomes viraux - 0,1µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Volume d'enzyme	
0,1µl PCR1 - 0,1µl PCR2	2+/5 dont 1 faible
0,1µl PCR1 - 0,5µl PCR2	5+/5 dont 3 faibles
0,5µl PCR1 - 0,1 µl PCR2	4+/5 dont 1 faible
0,5µl PCR1 - 0,5µl PCR2	5+/5

NB : pour chaque quantité d'enzyme, cinq répliquats ont été réalisés. Les résultats donnés dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2.

L'ensemble des résultats obtenus montre qu'il est plus adapté d'utiliser 2,5 unités d'ADN polymérase thermorésistante pour les réactions d'amplification aussi bien pour la première que pour la seconde réaction. Il est ainsi possible d'augmenter la sensibilité de la méthode, mais surtout la reproductibilité. En effet, de cette façon, pour des quantités données d'ADN viral, la totalité des répliquats réalisés donne une réponse positive.

Ce type de résultat a permis d'envisager l'incorporation d'un témoin positif interne donnant une indication sur le seuil de sensibilité de la méthode. En effet, pour chaque réaction de PCR, un tube témoin contenant une quantité d'ADN connue (soit 2500 copies de génomes viraux) est intégré à l'analyse. Ce tube doit donner une réaction positive et correspond à la plus faible quantité d'ADN détectable de façon systématique avec le protocole de PCR utilisé. Il est possible de détecter des quantités plus faibles d'ADN en PCR. Cependant, pour ces quantités, la réaction n'est pas fiable (pas de détection dans 100% des répliquats).

1.4 - Nombre de cycles

Des essais ont été réalisés en utilisant 40 et 35 cycles en PCR1 et en PCR2 afin de vérifier si l'augmentation du nombre de cycles pouvait apporter une amélioration. L'ensemble des expériences avait été réalisé jusqu'à présent en utilisant 30 cycles pour les séries d'amplification.

Les résultats obtenus montrent que les réactions avec 40 cycles ne semblent pas améliorer la sensibilité de la détection de l'ADN viral. Pour 35 cycles, il est possible d'observer une amélioration (intensité plus forte des bandes sur gel d'agarose). De ce fait, il est préconisé pour réaliser l'analyse d'échantillons, de réaliser des amplifications avec 35 cycles en PCR1 et en PCR2.

1.5 - Conclusion

L'ensemble des points étudiés (préparation du broyat, quantité de produit de PCR1 utilisée pour la réaction de PCR2, quantité d'ADN polymérase, nombre de cycles et incorporation d'un témoin positif donnant un seuil de sensibilité) permet d'obtenir une nette amélioration de la sensibilité et de la reproductibilité de la technique PCR pour détecter l'ADN du virus de type herpès observé chez les huîtres. L'ensemble des modifications apportées au protocole de PCR est donné dans la figure 2.

L'optimisation du protocole de PCR a été réalisée en faisant varier certains paramètres, un à un. Cette approche a permis d'obtenir une technique reproductible, avec un bon seuil de sensibilité. Toutefois, les résultats obtenus sont à confirmer en mettant en oeuvre un plan d'expérience permettant une analyse statistique adaptée.

L'analyse d'échantillons, en tenant compte de ces modifications a été réalisée et permet de confirmer les résultats obtenus à partir de gammes de quantités connues d'ADN viral.

Figure 2 : Protocole optimisé de PCR.

MODIFICATIONS APPORTEES AU PROTOCOLE DE PCR :

BROYAT : Xg d'échantillon / Xml d'eau distillée
dilution au 1/10^e du surnageant de broyat

congélation à -80°C

PCR1 : * Mix de PCR :

H ₂ O	31.5µl
Tampon 10x	5µl
MgCl ₂	5µl
dNTPs	5µl
Amorce 3	1µl
Amorce 4	1µl
Taq polymérase	0.5µl

* **Témoin interne** 2500 copies de génomes viraux

* **1µl d'échantillon**

* **35 cycles** de PCR dans le thermocycleur Crocodile III

PCR2 : * Mix de PCR :

H ₂ O	32.4µl
Tampon 10x	5µl
MgCl ₂	5µl
dNTPs	5µl
Amorce 5	1µl
Amorce 6	1µl
Taq polymérase	0.5µl

* **0.1µl de produit de PCR1**

* **35 cycles** de PCR dans le thermocycleur Crocodile III

**Analyses effectuées
dans le cadre du
protocole
IFREMER/SMIDAP**

2 - Analyses effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpès dans le cadre du protocole SMIDAP / IFREMER (Pays de Loire)

2.1 - Résultats des analyses réalisées pour les prélèvements effectués à Pen Bé le 03/07/96

Les résultats des analyses réalisées pour les prélèvements effectués à Pen Bé le 03/07/96 sont présentés dans cette première partie. Ces prélèvements ont fait l'objet d'une première analyse alors que la sensibilité de la technique de PCR n'était pas optimale (seuil de sensibilité : détection de 10^6 copies de génome viral pour les échantillons de naissain).

Lors l'optimisation du protocole de PCR, ces échantillons ont été utilisés de nombreuses fois, ce qui signifie des congélations (-20°C) et des décongélations fréquentes.

Après divers essais, la technique de PCR optimisée permet d'obtenir une sensibilité équivalente à la détection de 2500 copies de génomes de virus par tube de PCR, dans des échantillons de naissain.

Les analyses des prélèvements du 03/07/96, ont été réalisées avec ce dernier protocole, et donnent les résultats présentés dans les pages suivantes.

96 R 89 : 3R 1J = S4

Site 6 b

Les prélèvements ont été effectués sur le même site pour cette ponte S4, sur 7 poches différentes.

- 1- Comptage sur le terrain : 50% de mortalité (42 vivants/ 43 morts).
Comptage au laboratoire : 68% de mortalité (16 vivants/ 34 morts).

Analyses PCR : 2 pools de 5 animaux, 1 pool de 6 : **1 positif sur 3 pools**

- 2- Comptage sur le terrain : 34% de mortalité (47 vivants/ 24 morts).
Comptage au laboratoire : 43% de mortalité (25 vivants/ 19 morts).

Analyses PCR : 5 pools de 6 animaux, **tous les pools sont négatifs**.

- 3- Poche située à proximité de la poche n°2.
Comptage sur le terrain : 31% de mortalité (31 vivants/ 14 morts).
Comptage au laboratoire : 23% de mortalité (30 vivants/ 9 morts).

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **1 positif sur 6 pools**.

- 4- Pas de comptage sur le terrain : prélèvement sur deux poches, situées à proximité de la poche n°1.
Comptage au laboratoire : 63% de mortalité (22 vivants/ 38 morts).

Analyses PCR : 2 pools de 5 animaux, 2 pools de 6, **tous les pools sont négatifs.**

- 5- Comptage sur le terrain : 42% de mortalité (70 vivants/ 52 morts).
Poche située en bout de parc.
Comptage au laboratoire : 16% de mortalité (42 vivants/ 8 morts).

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **3 pools positifs sur 6.**

- 6- Comptage sur le terrain : 21% de mortalité (22 vivants/ 6 morts).
Comptage au laboratoire : 48% de mortalité (23 vivants/ 22 morts).

Analyses PCR : 4 pools de 5 animaux, 1 pool de 3, **2 pools positifs sur 5.**

- 7- Comptage sur le terrain : 40% de mortalité récente.
Comptage au laboratoire : 32% de mortalité (35 vivants/ 17 morts).

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **2 pools positifs sur 6.**

Tous ces résultats ont été confirmés par une ou plusieurs autres analyses PCR.

96 R 93 : 2J 2R 6a haut = S4

Site 6 a

Prélèvement sur deux poches.

Mortalités importantes, pas de comptage sur le terrain.

Comptage au laboratoire :

1- 16% de mortalité (138 vivants/ 28 morts)

2- 45% de mortalité (91 vivants/ 75 morts)

Résultats PCR : le prélèvement 1 n'a pas été analysé. Le prélèvement 2 a été analysé (5 pools de 6 animaux), **1 pool positif sur 6.**

96 R 111 : 2J 2R 6a haut = S4

Site 6 a

Prélèvement réalisé sur 3 poches, **sans mortalité.**

Analyses PCR : **4 pools positifs sur 6.**

NB : les prélèvements 96R93 et 96R111 correspondent à la même ponte sur le même parc mais avec des mortalités pour le prélèvement 96R93 et sans mortalité pour le prélèvement 96 R 111.

96 R 90 : 4 J = FB

Site 4

Prélèvement sur 5 poches : pas de comptage de mortalité sur le terrain.

Comptage au laboratoire :

- 1- 35% de mortalité (31 vivants/ 17 morts).
- 2- 34% de mortalité (40 vivants/ 21 morts).
- 3- 48% de mortalité (45 vivants/ 42 morts).
- 4- 58% de mortalité (41 vivants/ 57 morts).
- 5- 37% de mortalité (41 vivants/ 25 morts).

Analyses PCR : les poches n°1, 2, 3 et 5 n'ont pas été analysées. 6 pools de 5 animaux sur la poche n°4 donnent **2 pools positifs sur 6.**

Tous ces résultats ont été confirmés par une ou plusieurs autres analyses PCR.

96 R 96 : 1R 2V = FB

Site 2

Pas de comptage sur le terrain.

Comptage au laboratoire : 88% de mortalité (26 vivants/ 202 morts).

Analyses PCR : 5 pools de 5 animaux, **1 pool positif sur 5 répliquats lors d'une analyse de confirmation.**

96 R 112 : 2B 1J = FB

Site 8

Prélèvements sur 2 fois 5 poches, **pas de mortalité.**

Analyses PCR : - prélèvement 1, **1 pool positif sur 6.**
- prélèvement 2, **tous les pools sont négatifs.**

96 R 113 : 3B = FB

Site 7

Prélèvements sur 3 poches, **pas de mortalité.**

Analyses PCR : **4 pools positifs sur 6.**

96 R 114 = S6

Site 4

- 1- poche à forte densité
- 2- poche à densité moyenne
- 3- poche à forte densité

Pas de mortalité sur les 3 poches.

Analyses PCR non réalisées.

96 R 115 Captage naturel proche de S4 = 3R 1J

Site 6b

Analyses en PCR non réalisées.

96 R 116 = Forte mortalité sur captage naturel proche du site 5

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **1 pool positif sur 6.**

96 R 95 = Grattis d'Arcachon, placé à côté de la FB site 7 (à Pen Bé depuis le 18/01/96).

Comptage sur le terrain : 26% de mortalité (40 vivants/ 14 morts).

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **tous les pools sont négatifs.**

96 R 107 = Prélèvements sur 3 poches de grattis d'Arcachon (identique à 96R95)

1- parc bas : 4% de mortalité (50 vivants/ 2 morts)

2- parc haut : 4% de mortalité (50 vivants/ 2 morts)

3- parc du milieu : 2.5% de mortalité (76 vivants/ 2 morts)

Analyses PCR non réalisées.

96 R 108 : Captage naturel proche de FB sur le site 2

Analyses PCR non réalisées.

96 R 109 = Captage naturel proche du site 6

Mortalités moins importantes que sur le lot 96 R 116.

Analyses PCR non réalisées.

Tous les résultats obtenus montrent que les pontes FB et S4 sont porteuses de l'herpèsvirus, et que celui-ci est détectable lors d'épisodes de mortalité mais aussi, comme le confirment les analyses, en l'absence de mortalité, notamment pour la FB placée sur le site 8 (96 R 112) ou la FB placée sur le site 7 (96 R113).

Au vu de ces résultats, obtenus grâce à un protocole optimisé de PCR, tous les prélèvements des pontes FB et S4 antérieurs au transfert des animaux à Pen Bé, ont été de nouveau analysés depuis le stade larvaire (J10).

Il s'avère que toutes ces analyses sont négatives, même pour celles concernant les prélèvements effectués juste avant le transfert à Pen Bé.

FB						
Date de prélèvement	J10 27/03/96	800µm 01/04/96 04/04/96	T500 17/04/96	06/05/96	Avant 1er transfert à Pen Bé 23/05/96	Avant 2ème transfert à Pen Bé 06/06/96
Nb de tubes analysés	2	2	1	6	6	6
Résultats PCR	2 -	2 -	-	6 -	6 -	6 -

S 4							
Date de prélèvement	J10 27/03/96	850µm 04/04/96	850µm 09/04/96	1000-1500 µm 19/04/96	Mortalités 13/05/96	Avant 1er transfert à Pen Bé 23/05/96	Avant 2ème transfert à Pen Bé 06/06/96
Nb de tubes analysés	1	1	5	5	5	6	6
Résultats PCR	-	-	5 -	5 -	5 -	6 -	6 -

Remarque : cependant, il faut signaler que l'ensemble des échantillons a été conservé à -20°C et non à -80°C et que de ce fait l'ADN viral a pu être altéré.

2.1 - Résultats des analyses réalisées pour les prélèvements effectués à Pen Bé les 31/07/96 et 01/08/96

L'ensemble de ces analyses a été réalisé avec le protocole de PCR optimisé.
Les comptages de mortalité ont été réalisés sur le terrain.

2 R 1 V = FB (01/08/96)

Site 2

* 48% de mortalité.

Analyses PCR : 2 pools de 6 animaux, **tous les pools sont négatifs.**

3 B = FB (31/07/96)

Site 7

* 27% de mortalité.

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **3 pools positifs sur 6.**

2 B 1 V = FB (31/07/96)

Site 7

* 25% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **3 pools positifs sur 6.**

4 J = FB (01/08/96)

Site 4

* 19% de mortalité

Analyses PCR : 5 pools de 5 animaux, **1 pool positif sur 5.**

2 B 1 J = FB (31/07/96)

Site 8

* 38% de mortalité

Analyses PCR : 5 pools de 5 animaux, **2 pools positifs sur 5.**

1 R 2 V = FB (01/08/96)

Site 2

* 42% de mortalité

Analyses PCR : 4 pools de 5 animaux, **tous les pools sont négatifs.**

R J B = FG (30/07/96)

Site 1

* 40% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **tous les pools sont négatifs.**

R B J = FG (30/07/96)

Site 1

* 57% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **1 pool positif sur 6.**

2 B 1 R = FG (30/07/96)

Site 7

* 20% de mortalité

Analyses PCR : 5 pools de 5 animaux, **5 pools positifs sur 5.**

R B R = FG (30/07/96)

Site 7

*37.5% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **2 pools positifs sur 6.**

2 B 2 R = FG (30/07/96)

Site 6

*28% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **2 pools positifs sur 6.**

2 R 2 B = FG (30/07/96)

Site 6

* 32% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **4 pools positifs sur 6.**

J V B = FG 30/07/96

Site 8

* 31% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **3 pools positifs sur 6.**

3 V 1 R = FG (01/08/96)

Site 4

* 33% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **2 pools positifs sur 6.**

3 R 1 J = S4 (31/07/96)

Site 6

* 54% de mortalité

Analyses PCR : 3 pools de 5 animaux, **2 pools positifs sur 3.**

2 R 2 J = S4 (30/07/96)

Site 6 (5 poches en provenance du site 6, placées sur site 5)

* 22% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **4 pools positifs sur 6.**

2 V 1 B = FF (31/07/96)

Site 5

* 13.5% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **4 pools positifs sur 6.**

3 V = FF (31/07/96)

Site 5

* 22% de mortalité

Analyses PCR : 6 pools de 5 animaux, **2 pools positifs sur 6.**

FB
**Comparaison des résultats obtenus en PCR entre deux
prélèvements, à 28 jours d'intervalle**

Premier prélèvement à Pen Bé le 03/07/96	Deuxième prélèvement à Pen Bé le 30/07/96
<u>FB Site 4 - 4 J</u> - 58 % de mortalité 2+ / 6	<u>FB Site 4 - 4 J</u> - 19% de mortalité 1+ / 5
<u>FB Site 2 - 1R 2V</u> - 88% de mortalité 1+ / 5	<u>FB Site 2 - 1R 2V</u> - 42% de mortalité 5- / 5
<u>FB Site 8 - 2B 1J</u> - 0% de mortalité 1+ / 6	<u>FB Site 8 - 2B 1J</u> - 38% de mortalité 2+ / 5
<u>FB Site 7 - 3B</u> - 0% de mortalité 4+ / 6	<u>FB Site 7 - 3B</u> -27% de mortalité 3+ / 6

S4**Comparaison des résultats obtenus en PCR entre deux
prélèvements, à 28 jours d'intervalle**

Premier prélèvement à Pen Bé le 03/07/96	Deuxième prélèvement à Pen Bé le 30/07/96
<u>S4 Site 6 - 3R 1J</u> - 40-60% de mortalité 9+ / 35	<u>S4 Site 6 - 3R 1J</u> - 54% de mortalité 2+ / 3
<u>S4 Site 5 - 2R 2J bas</u> - 45% de mortalité 1+ / 6	<u>S4 Site 5 - 2R 2J</u> - 22% de mortalité 4+ / 6
<u>S4 Site 5 - 2J 2R haut</u> - 0% de mortalité 4+ / 6	

2.3 - CONCLUSION

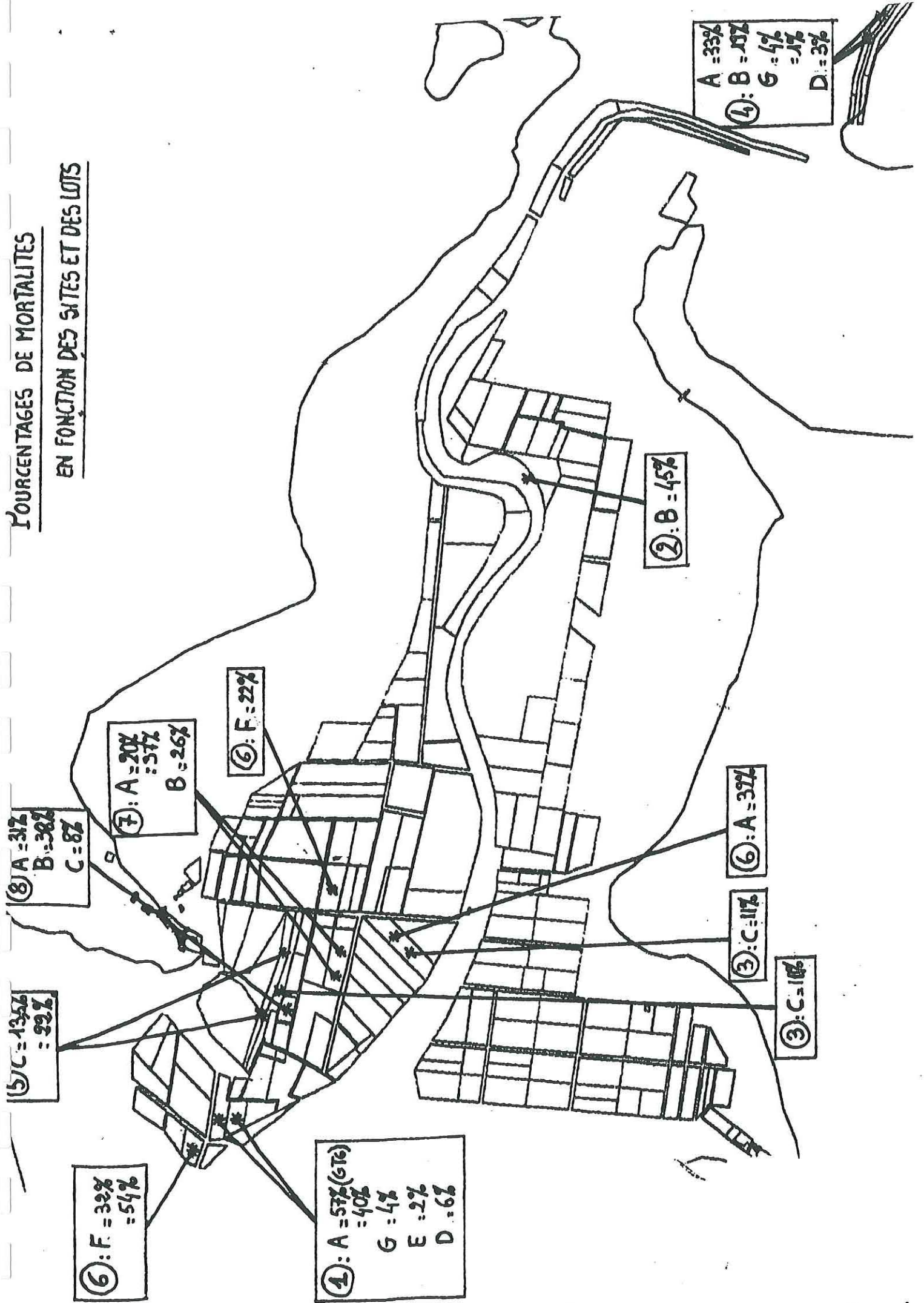
Le tableau concernant la ponte FB montre qu'au 03/07/96, des mortalités apparaissent sur la FB placée sur le site 4 et la FB placée sur le site 2. Ces mortalités peuvent être corrélées avec la détection d'herpèsvirus par PCR. De plus, 28 jours plus tard, malgré la baisse du pourcentage de mortalité pour ces deux pontes, sur ces sites, l'herpèsvirus reste détectable à 19% de mortalité pour la FB (site 4), alors qu'il ne l'est plus pour la FB placée sur le site 2 (animaux très dégradés). Cette variabilité dans les résultats est le fait d'animaux trop dégradés ainsi que d'un échantillonnage réduit (<30 animaux).

Par ailleurs, cette même ponte placée sur les sites 7 et 8, ne présentait pas de mortalité au 03/07/96, cependant le virus a été détecté en PCR pour les prélèvements effectués à cette date. Des mortalités importantes (27-38%) sont survenues dans le mois qui a suivi (prélèvement le 30/07/96), et de nouveau la détection d'herpèsvirus a été possible pour ces lots. Ce résultat peut être interprété comme une détection possible de stades d'infection précoce non accompagnés de phénomènes de mortalité ou bien comme une mortalité faible non détectée au moment du prélèvement. Cependant, il ne semble pas possible, à l'heure actuelle, de poser l'hypothèse d'une détection possible du virus en phase de latence avec le protocole de PCR utilisé.

L'ensemble des résultats obtenus semble indiquer que l'herpèsvirus est facilement détecté pour des échantillons présentant de faibles taux de mortalité, au début des mortalités, lorsque les animaux ne sont pas trop dégradés. Par contre, lorsque les pourcentages de mortalités sont élevés (40-50%), la détection du virus semble plus aléatoire. En effet, des animaux morts, il ne reste que les coquilles, les survivants pouvant être peu ou pas infectés par le virus.

Les mortalités sont associées à la détection d'herpèsvirus et certaines pontes (FB, FG, S4, FF) présentent des épisodes de mortalité alors que d'autres peuvent sembler "épargnées" (S1, S2, S6).

POURCENTAGES DE MORTALITES
EN FONCTION DES SITES ET DES LOTS



**Analyses effectuées
dans le cadre de la
veille zoosanitaire
(laboratoire de La
Tremblade)**

3 - Analyses effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpès sur des lots prélevés en 1996, dans le cadre de la veille zoosanitaire, au laboratoire de La Tremblade

Les analyses par PCR sur cas de mortalité (huître creuse et huître plate), mises en stand by fin juillet, ont été reprises au mois d'août. Ces analyses concernent les mortalités observées sur les secteurs de Marennes-Oléron et de la Baie de Bourgneuf (57 lots).

Les résultats obtenus (cf. tableaux joints) tendent à confirmer la corrélation entre mortalité et détection possible d'ADN viral par PCR, pour les lots de naissain (cf. figures 3a et 3b). Cependant, pour certains lots présentant de fortes mortalités, la technique de PCR donne des résultats négatifs. Pour certains de ces lots, une explication des mortalités peut être facilement trouvée (problème zootechnique, etc.). Par ailleurs, les analyses en PCR donnent pour certains échantillons, hors mortalité, un résultat positif. Pour ces échantillons, il est possible que le prélèvement ait été réalisé en début d'infection, en l'absence de mortalité déclarée.

Figure 3a
Analyses en PCR de lots de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*

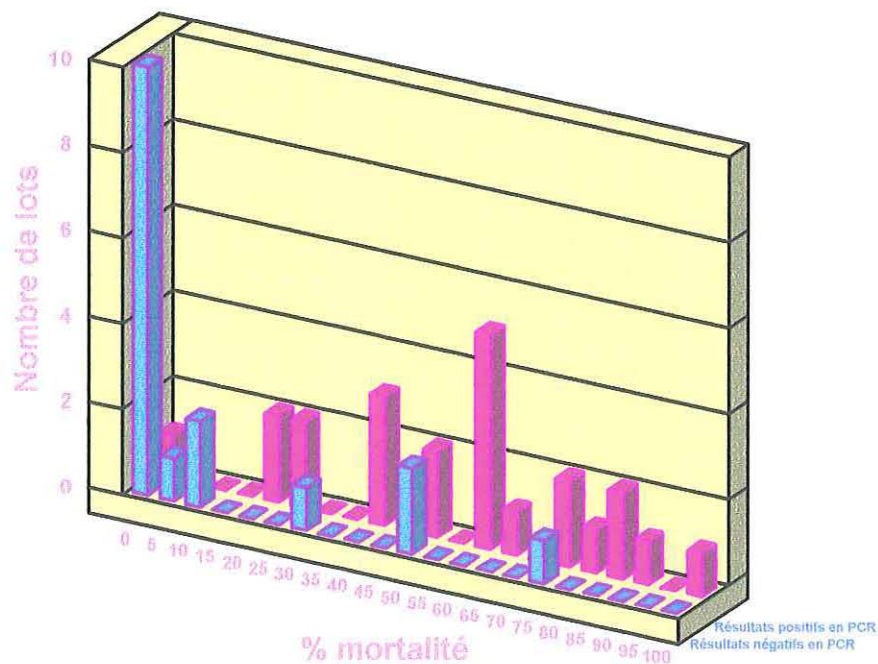
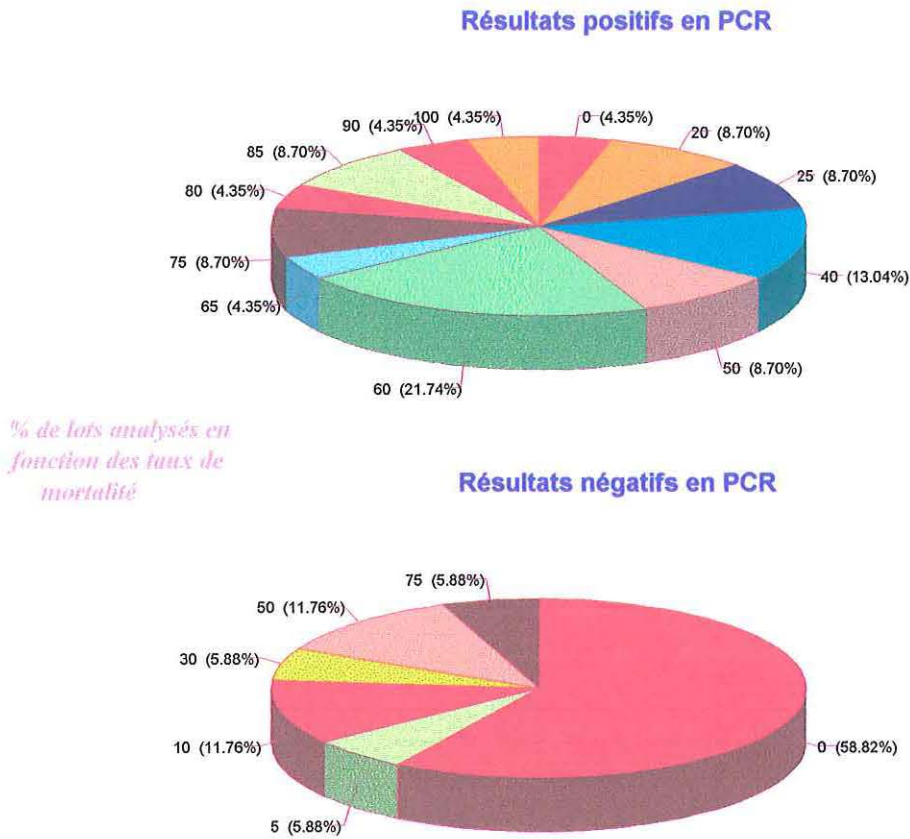


Figure 3b
Analyses en PCR de lots de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*



Pour les mortalités observées sur animaux adultes (banc de Ronce les Bains), il n'a pas été possible de détecter le virus par PCR.

Des lots provenant du laboratoire IFREMER de La Trinité et présentant de fortes mortalités ont fait l'objet d'une analyse en PCR au cours du mois de juillet. Un seul des lots examinés avait alors été trouvé positif. Afin de vérifier ces résultats, certains lots font l'objet d'une seconde analyse, en intégrant l'ensemble des modifications apportées au protocole de PCR.

Une première analyse statistique a été réalisée pour les résultats concernant 40 lots analysés. Ainsi, aussi bien le test du χ^2 qu'un test de comparaison de moyennes montrent de manière significative une forte corrélation entre mortalité et détection d'ADN viral par la technique de PCR.

En effet, la valeur du χ^2 est de 16,9 (cf. tableau 8). Cette valeur est supérieure à 10,8 (ddl =1 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées entre lots à mortalité et sans mortalité, concernant les résultats des analyses réalisées en PCR sont significatives.

Pour le test de comparaison de moyennes, la valeur de l'écart réduit est égale à 4,1 lorsque l'on compare les pourcentages de lots présentant une réaction positive ou négative en PCR (aussi bien pour les lots présentant des mortalités que pour les lots ne présentant pas de mortalité). Cette valeur est supérieure à 1,96. Les différences observées sont donc significatives.

Tableau 8

	Résultats positifs en PCR2	Résultats négatifs en PCR2	Total
Nombre de lots présentant $\leq 5\%$ de mortalité	1 - [8,3%] (6,9)	11 - [91%] (5,1)	12
Nombre de lots présentant $> 5\%$ de mortalité	22 - [78%] (16,1)	6 - [22%] (11,9)	28
Total	23	17	40

N. B. : () : effectifs théoriques (calculés)

Ces résultats ne permettent en aucun cas de conclure à une relation de cause à effet entre mortalité observée et détection possible d'ADN de virus de type herpès par la technique de PCR. Seuls les essais de reproduction de l'infection virale qui sont en cours au laboratoire de La Tremblade permettront de trancher et de savoir si le virus de type herpès peut être ou non un agent causal de mortalité.

De plus, il est important de rappeler que nous avons utilisé des valeurs de pourcentages de mortalité pour réaliser des comparaisons, mais que ces valeurs correspondent à une donnée ponctuelle dans le temps et que par ailleurs, leur source n'est pas toujours identique (professionnels, laboratoires préleveurs, comptage à réception des échantillons au laboratoire de La Tremblade).

PRELEVEMENTS LABORATOIRE LA TREMBLADE (analyses PCR)

CHARENTE MARITIME

Naissain				Adultes					
N°	Espèce	Origine	Mortalité	Analyses	N°	Espèce	Origine	Mortalité	Analyses
96R16	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	Mortalité	+ (4/4 pools)	96R65	<i>C. gigas</i>	Perquis (Ronce)	23%	-
96R22 (<i>Idem</i> 96R16)	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	Mortalité	+ (4/4 pools)	96R84	<i>C. gigas</i>	Ronce	33%	-
96R29	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	0%	- (6/6 pools)	96R87	<i>C. gigas</i>	Ronce	33%	-
96R30	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	0%	- (20/20 pools)	96R88	<i>C. gigas</i>	Ronce	30%	-
96R31	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	0%	- (6/6 pools)	96R99	<i>C. gigas</i>	Seudre	40%	+ (1/30 Ax)
96R35	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	0%	- (6/6 pools)					
96R38	<i>O. edulis</i>	Ectoserie	Mortalité (animaux inoculés avec <i>Bonamia</i>)	- (6/6 pools)					
96R41 (<i>Idem</i> 96R33)	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	0%	+ (2/10 pools)					
96R44 (<i>Idem</i> 96R31)	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	Présence d'animaux baillants	- (3/3 pools)					
96R58	<i>C. gigas</i>	Ectoserie	0%	- (6/6 pools)					

96R61 (<i>Idem</i> 96R58 - 6 jours après)	<i>C. gigas</i>	Écloserie	65% (24-48H)	+ (6/13 pools)
96R63 (<i>Idem</i> 96R16)	<i>C. gigas</i>	Écloserie	30%	En cours
96R64	<i>C. gigas</i>	Captage naturel (Seudre)	10%	- (6/6 pools)
96R67	<i>C. gigas</i>	Écloserie	70-80% à l'ouverture	+ (3/3 pools)
96R73	<i>C. gigas</i>	Oléron (origine écloserie)	60%	+ (1/6 pools)
96R74	<i>C. gigas</i>	Oléron (origine écloserie)	Lot Tè (0%)	- (6/6 pools)
96R76	<i>C. gigas</i>	Seudre (captage naturel)	10-20% par jour	+ (11/25 AX)

96R77	<i>C. gigas</i>	Seudre (captage naturel)	73%	+ (3/6 pools)
96R83	<i>C. gigas</i>	Seudre (captage naturel)	40-60%	- (6/6 pools)
96R91	<i>C. gigas</i>	Ile d'Aix	26% à l'ouverture	+ (4/6 pools)
96R92	<i>C. gigas</i>	Ile d'Aix	Lot Tè 4,5%	- (3/3 pools)
96R94	<i>C. gigas</i>	Bourcefranc	85%	+ (3/15 pools)
96R97	<i>C. gigas</i>	Seudre (Trompe-Sot)	Lot Tè (20%)	+ (2/6 pools)
96R98	<i>C. gigas</i>	Seudre (Trompe-Sot)	40%	+ (9/15 pools)
96R100	<i>C. gigas</i>	Seudre (Petit Barrat)	50%	-
96R120	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	90%	- (5/5 pools)
96R121	<i>C. virginica</i>	Ecloserie	0%	-
96R131	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	Mortalité 0% à 60% en trois jours	+

PRELEVEMENTS LABORATOIRE LA TREMBLADE (analyses PCR)

VENDEE - BAIE DE BOURGNEUF

Naissain

<u>N°</u>	<u>Espèce</u>	<u>Origine</u>	<u>Mortalité</u>	<u>Analyses</u>
96R32	<i>O. edulis</i>	Ecloserie	0%	- (100 animaux analysés individuellement)
96R33	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	Mortalité 8 à 100% en quelques jours	+ (6/6 pools)
96R47	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	7 - 15%	- (animaux très abîmés)
96R48	<i>O. edulis</i>	Ecloserie	0%	-

96R57	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	50% sur 15 jours	-
96R59 (<i>Idem</i> 96R48)	<i>O. edulis</i>	Ecloserie	Mortalité associée à zootéchnie	-
96R62	<i>O. edulis</i>	Ecloserie	10 - 15% tous les 15 jours	En cours
96R68	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	60%	+ (4/10 pools)
96R69	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	0% (Lot Tè)	+ (1/6 pools)
96R70	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	51%	+ (6/6 pools)
96R71	<i>C. gigas</i>	Arcachon (captage naturel)	0% (Lot Tè)	-
96R75	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	50% (84% à l'ouverture)	+ (3/4 pools)
96R85	<i>C. gigas</i>	La Bernerie (captage naturel)	25%	+ (4/6 pools)
96R86	<i>C. gigas</i>	Arcachon (captage naturel)	27%	En cours
96R101	<i>C. gigas</i>	Fouras (captage naturel)	30%	-

96R102	<i>C. gigas</i>	Fouras (captage naturel)	70-80%	-
96R103	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	50%	+ (1/6 pools)
96R104	<i>O. edulis</i>	Ecloserie (même raceway que lot 96R103)	0%	-
96R118	<i>O. edulis</i>	Ecloserie (même lot que 96R104, huit jours plus tard)	28%	-
96R126	<i>C. gigas</i>	Fouras (captage naturel)	10-30%	+ (4/6 pools)
96R127	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	79%	+ (5/6 pools)
96R128	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	39,4%	+ (1/6 pools)
96R129	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	0%	-
96R130	<i>C. gigas</i>	Ecloserie	0,2%	-

**Essais de
reproduction
expérimentale de la
maladie**

4 - Essais de reproduction expérimentale de la maladie

4.1 - Naissain d'huître creuse

Des essais d'infection de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été réalisés par balnéation en présence de larves d'huître creuse virosées vivantes, produites expérimentalement. L'ensemble du protocole expérimental d'infection est représenté sur la figure 4.

Ce protocole a été élaboré en fonction des résultats obtenus lors de nos précédents essais d'infection expérimentale de naissain et d'adultes. Ceux ci avaient été réalisés par balnéation de naissain en présence de broyats ultrafiltrés de larves et de naissain virosés, conservés congelés à -20°C, et chez les adultes, par inoculation intracardiaque de ces mêmes broyats. Aucun phénomène de mortalité n'avait alors été observé. Il faut noter que les particules virales présentes dans les broyats de larves virosées, sont libérées par dissociation mécanique des tissus larvaires et peuvent, de ce fait, avoir été altérées. De plus, les particules virales infectieuses (nucléocapsides enveloppées extracellulaires) présentes dans les tissus larvaires sont relativement peu nombreuses, par rapport à l'ensemble des particules (capsides, nucléocapsides nues et enveloppées).

Au vu de ces résultats, les essais ultérieurs d'infection de naissain d'huître ont été réalisés par contact avec des larves virosées vivantes, produites expérimentalement (figure 4). De cette façon, des particules virales infectieuses sont produites dans les tissus larvaires et sont libérées dans le milieu extérieur, à mesure que l'infection des larves se poursuit. La mise au point préalable d'une méthode d'infection de larves conventionnelles en grand volume a permis de réaliser ces essais.

Une première expérience a été conduite sur un lot de naissain âgé de huit mois, issu de captage naturel en Seudre et élevé à Mornac (Charente-Maritime). Les animaux ont été acclimatés à 20°C, sur une période de deux semaines. Aucune mortalité anormale n'a alors été observée. A l'issue de cette période et avant infection expérimentale, l'analyse en PCR d'un échantillon de trente animaux n'a pas permis de révéler la présence de virus de type herpès.

Deux bacs d'élevage ont été inoculés avec des larves virosées vivantes, deux autres bacs avec des larves saines vivantes (témoin). Chaque bac contenait 100 animaux au début de l'expérience. Les animaux ont été maintenus sans renouvellement d'eau pendant toute la durée de l'expérience (18 jours), ils ont été alimentés quotidiennement. Deux fois par jour, les animaux morts ont été prélevés dans les bacs, puis stockés individuellement à -20°C.

Figure 4 : Essais de reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès chez le naissain de *Crassostrea gigas*.

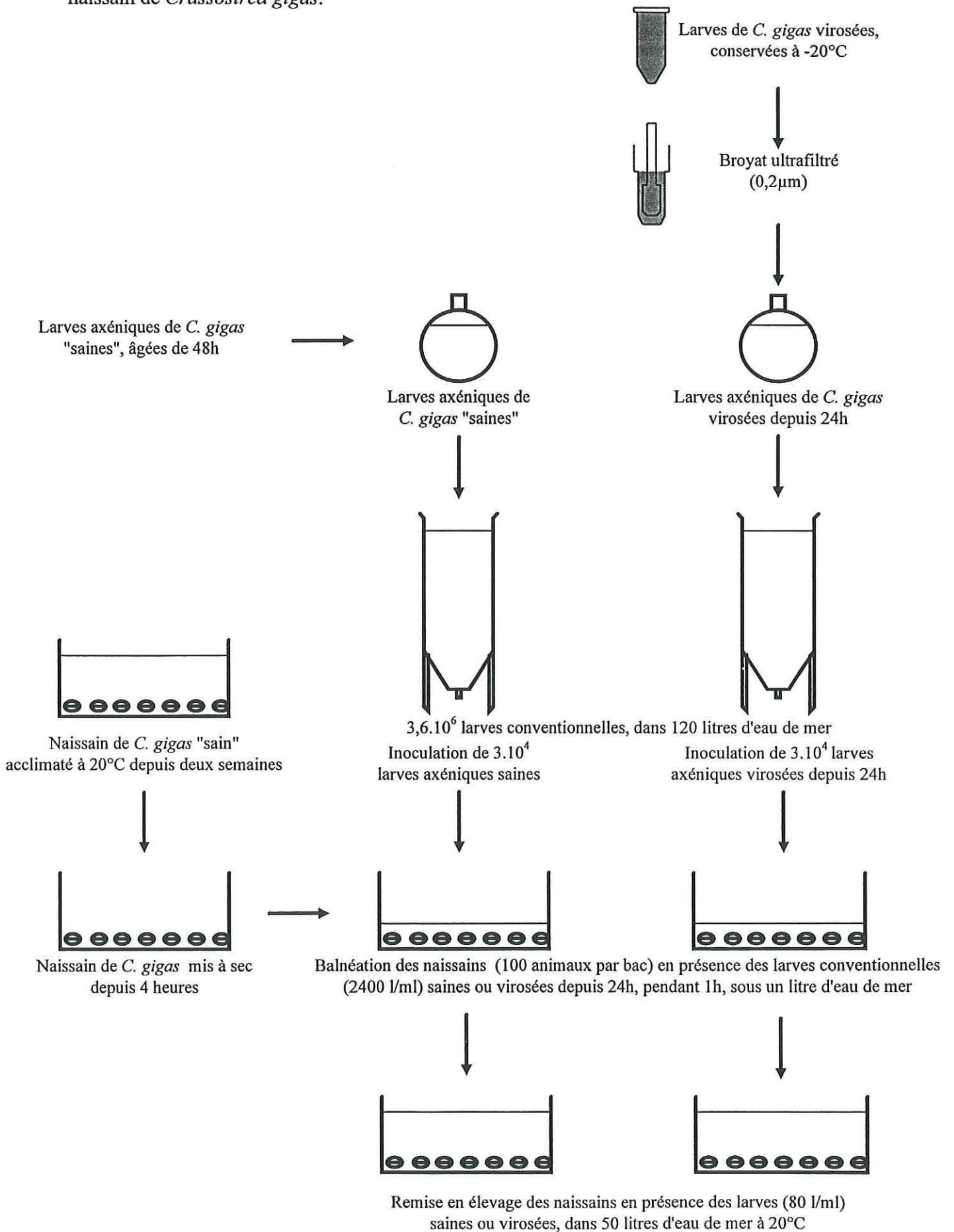


Figure 5 : Essais de reproduction expérimentale du virus de type herpès chez le naissain de *Crassostrea gigas*. Les taux de mortalité ont été déterminés quotidiennement pour chaque bac et sont représentés dans cette figure, ainsi que les taux moyens pour les bacs en répliquat.

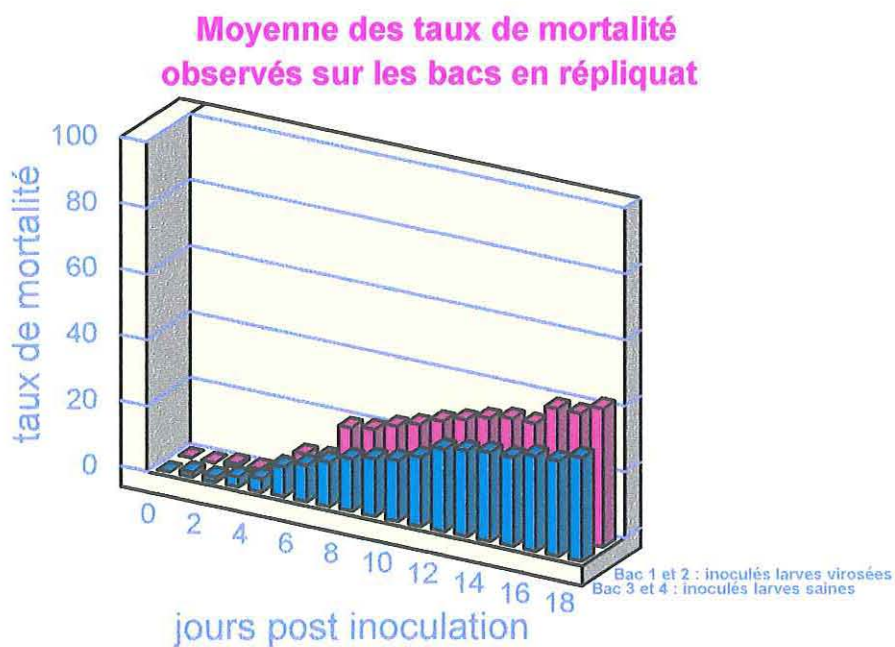
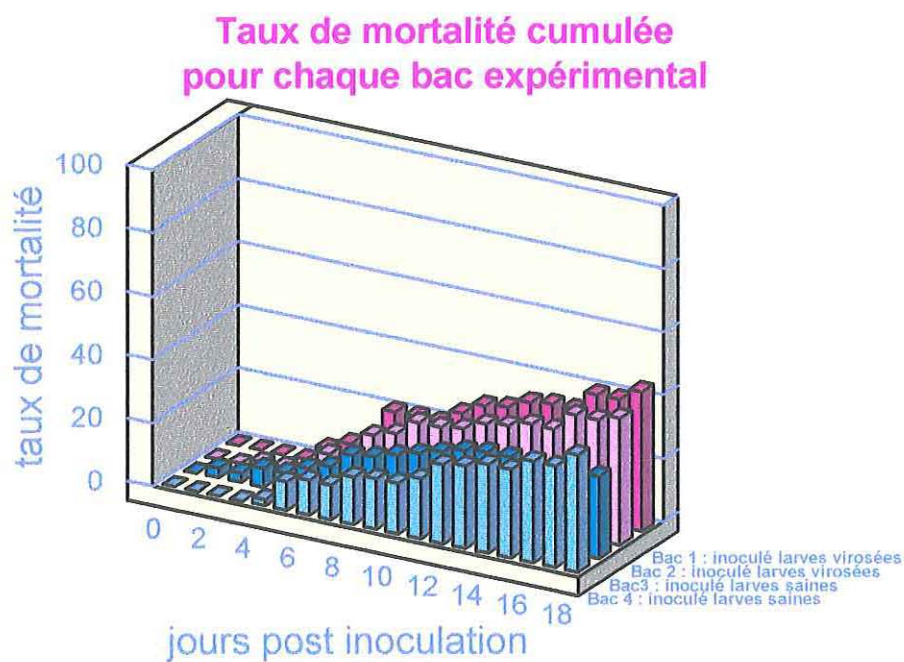
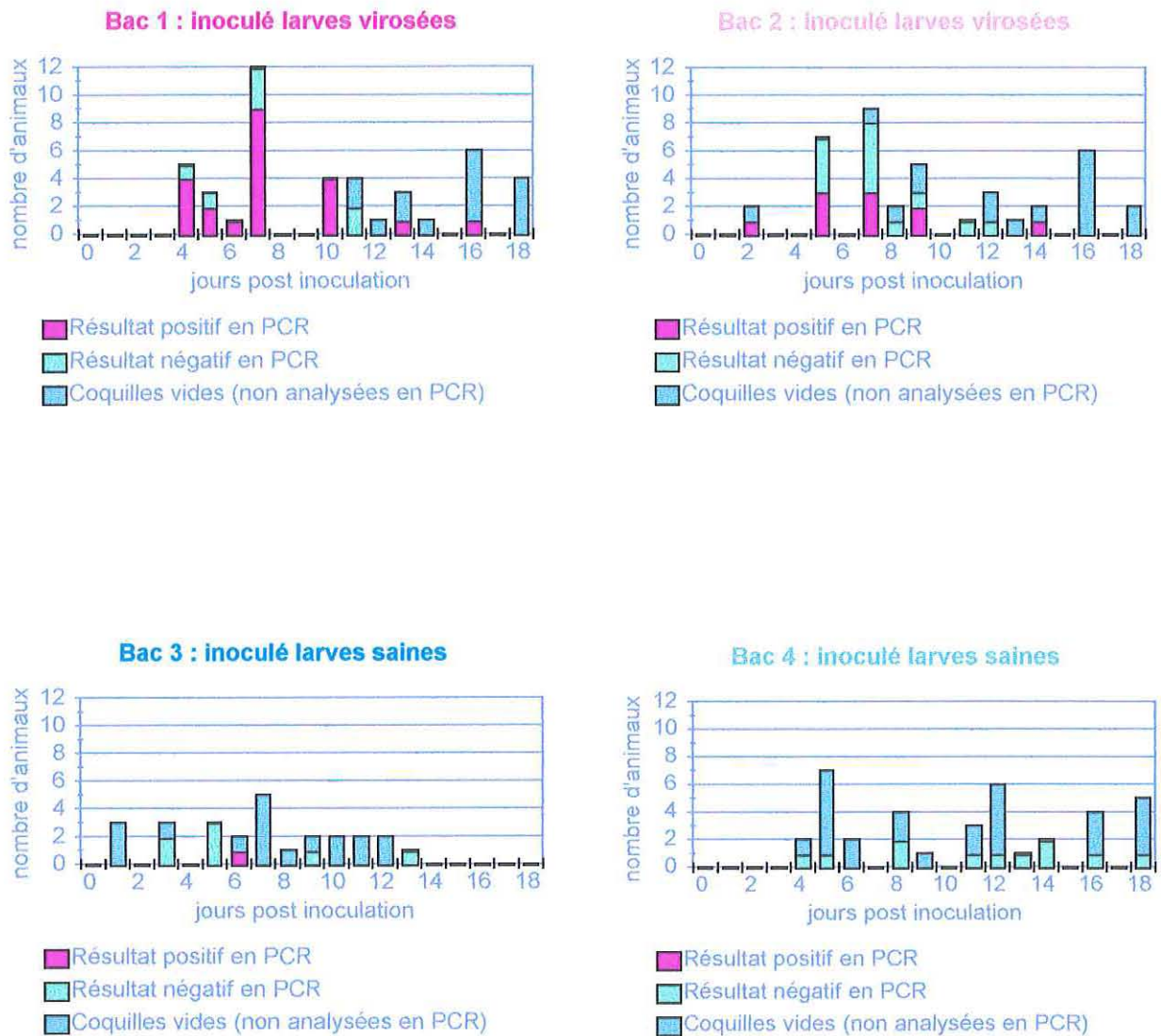


Figure 6 : Essai de reproduction expérimentale du virus de type herpès chez le naissain de *Crassostrea gigas*. Les individus morts, prélevés dans les bacs expérimentaux, ont été analysés individuellement en PCR pour la détection du virus.



Les mortalités observées au cours de l'expérience sont représentées sur la figure 5. Les mortalités cumulées sont indiquées pour chaque bac expérimental ainsi que les mortalités moyennes obtenues dans les bacs en répliquats.

Les animaux morts ont été analysés individuellement en PCR, pour la recherche de virus de type herpès. Le résultat de ces analyses est indiqué dans la figure 6, pour chaque bac expérimental.

Un contrôle en histologie a été réalisé sur sept animaux positifs en PCR, afin de confirmer ou d'infirmer le résultat. L'observation des tissus a révélé, pour tous les animaux analysés la présence d'anomalies nucléaires caractéristiques de l'infection à virus de type herpès.

Une première analyse statistique a été réalisée pour les résultats concernant les mortalités ainsi que les résultats de PCR obtenus pour l'ensemble des bacs expérimentaux.

Ainsi, dans le test de comparaison de moyennes, la valeur de l'écart réduit est égale à 2,42 lorsque l'on compare les pourcentages d'animaux morts et d'animaux vivants pour les bacs inoculés par des larves virosées ou saines. (tableau 9). Cette valeur est supérieure à 1,96. Les différences observées sont donc significatives.

Tableau 9

	Nombre d'animaux morts	Nombre d'animaux vivants	Total
Nombre d'animaux inoculés par des larves virosées	84	118	202
Nombre d'animaux inoculés par des larves saines	63	146	209
Total	147	264	411

Le test du χ^2 montre de manière significative une forte corrélation entre l'inoculation de matériel virosé et la détection d'ADN viral par la technique de PCR. En effet, la valeur du χ^2 est de 15,67 (cf. tableau 10). Cette valeur est supérieure à 10,8 (ddl =1 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées entre lots inoculés par des larves virosées et lots inoculés par des larves saines, concernant les résultats des analyses réalisées en PCR sont significatives.

Il faut noter par ailleurs la présence d'un résultat positif dans le bac N°3. Celui ci est interprété comme le résultat d'une probable contamination du prélèvement. Toutefois, ce résultat "positif" ne remet pas en cause la signification statistique des résultats.

Tableau 10

	Résultats positifs en PCR2	Résultats négatifs en PCR2	Total
Nombre de naissains inoculés par des larves viroisées	32 (24,75)	22 (29,25)	54
Nombre de naissains inoculés par des larves saines	1 (8,25)	17 (9,75)	18
Total	33	39	72

N. B. : () : effectifs théoriques (calculés)

Un deuxième essai de reproduction expérimentale de l'infection a été réalisé sur un lot de naissain provenant d'écloserie. Le même protocole expérimental a été appliqué dans cet essai.

Les animaux ont été maintenus en élevage pendant 30 jours après l'inoculation. Les mortalités observées au cours de cette période sont respectivement de 1 et 2% dans les bacs inoculés par des larves "viroisées" et de 0 et 3% dans les bacs inoculés par des larves saines. Après contrôle des larves "viroisées" inoculées, il s'est avéré que l'infection des larves elles mêmes avait échoué. Une explication de cet échec peut être apportée par la qualité médiocre de la ponte.

De plus, il semble important de noter que la difficulté majeure rencontrée lors des ces essais repose sur l'approvisionnement en naissains indemnes. En effet, deux autres essais ont été réalisés sur des lots d'animaux provenant de captage naturel. Ces derniers étant déjà infectés par le virus, ont présenté des mortalités importantes au début de la période d'acclimatation (contrôles réalisés en PCR).

Il apparaît, d'après ces résultats, que l'utilisation de larves viroisées vivantes permet de reproduire expérimentalement l'infection au stade naissain. De plus, l'infection de ces animaux est associée à des mortalités significatives.

D'autres expériences seront réalisées afin de confirmer ce résultat, en prenant tout particulièrement en compte les conditions zootechniques, afin de limiter les mortalités dues à d'autres facteurs.

4.2 - Larves de palourde japonaise

Des essais d'infection expérimentale de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, par le virus de type herpès ont été réalisés. En effet, des mortalités concomitantes de larves de palourde japonaise et d'huître creuse avaient été observées en 1991, en éclosérie. Le virus de type herpès avait alors été détecté dans les larves d'huître creuse, les larves de palourdes n'ayant elles, pas été analysées lors de cet épisode de mortalité (J.L. Nicolas, communication personnelle).

Des larves de palourde âgées de huit jours (J8) ont été gracieusement fournies par une éclosérie privée. Elles ont été inoculées à J9 par des larves d'huître creuse axéniques, virosées vivantes (J3, 24 heures post infection). Les conditions expérimentales sont résumées dans la figure 7.

Des prélèvements de larves et d'eau d'élevage ont été réalisés à J3, J4, J7 et J10 après l'infection pour une analyse en PCR. Les larves ont été tamisées sur des filtres en papier et rincées trois fois par 200ml d'eau de mer stérile avant d'être congelées à -20°C. L'eau d'élevage, passée sur un filtre en papier afin d'éliminer les larves, a été congelée à -20°C.

Des prélèvements de larves ont été réalisés à J0, J3, J4, J7 et J10 après l'infection pour une analyse en microscopie électronique. Les larves recueillies sur un filtre en papier ont été fixées par le glutaraldéhyde 3% et conservées à 4°C avant d'être traitées selon une procédure classique.

L'ensemble des observations réalisées et des résultats d'analyse est donné dans le tableau 11.

L'observation au microscope inversé, réalisée à J0, J3, J4, J7 et J10 après l'infection, n'a pu révéler aucune anomalie macroscopique chez les larves de *R. philippinarum* jusqu'au septième jour post infection. Dix jours post infection, 90 à 100% de mortalité ont été notées parmi les larves de *R. philippinarum* inoculées par des larves de *C. gigas* virosées, alors que les larves témoin ne présentent pas de mortalité ni d'anomalie macroscopique.

L'analyse des échantillons en PCR a été réalisée uniquement pour les élevages inoculés par des larves virosées à J4, J7 et J10. La présence d'ADN viral est détectée dans les larves à J4, mais plus à J7 et J10. La présence d'ADN viral est détectée dans l'eau d'élevage à J4 et J7. A J10, la PCR ne permet plus de détecter l'ADN viral dans l'eau d'élevage. Ces résultats semblent indiquer une "disparition" de l'ADN viral présent dans les larves et, de façon plus tardive, dans l'eau d'élevage.

Ce phénomène est interprété comme le reflet de l'évolution de l'infection dans les larves d'huître virosées (l'inoculum), plutôt que comme celui de l'infection des larves de palourde. L'ADN viral détecté à J4 post infection correspondrait alors à des larves d'huître virosées. Puis, les coquilles des larves d'huîtres se vident et, à J7 et J10, l'ADN n'est plus détecté dans les prélèvements de larves, celles-ci étant rincées trois fois par de l'eau de mer stérile. La détection d'ADN viral dans l'eau d'élevage à J4 et J7, mais plus à J10, correspond à cette interprétation.

L'analyse des échantillons en microscopie électronique à transmission a été réalisée pour les élevages inoculés par des larves virosées à J3, J4, J7 et J10 ainsi qu'à J10 pour les élevages témoins. Aucune anomalie caractéristique de l'infection à virus de type herpes n'a pu être visualisée chez les larves de palourde. Néanmoins, dès J3, de nombreux noyaux anormaux ont été observés dans les cellules épithéliales des larves de palourdes inoculées par des larves d'huîtres virosées.

En conclusion, l'infection à virus de type herpes n'a pas pu être reproduite chez les larves de *R. philippinarum*, dans les conditions expérimentales choisies. Les mortalités et les lésions nucléaires observées pourraient éventuellement correspondre à une toxicité de l'inoculum (larves d'huîtres virosées).

Tableau 11 : Observations et analyses réalisées sur les larves de *R. philippinarum* inoculées par des larves de *C. gigas* saines et virosées.

jour post infection	observations macroscopiques		analyses en PCR				observations en microscopie électronique	
	inoculum larves saines	inoculum larves virosées	inoculum larves saines larves eau		inoculum larves virosées larves eau		inoculum larves saines	inoculum larves virosées
J0	RAS	RAS	NF	NF	NF	NF	NF	NF
J3	RAS	RAS	NF	NF	NF	NF	NF	RAS (pas de noyaux typiques de l'infection à virus de type herpès, pas de particules virales)
J4	RAS	RAS	NF	NF	positif en PCR2	positif en PCR2	NF	
J7	RAS	RAS	NF	NF	négatif en PCR2	positif en PCR2	NF	
J10	RAS	90 à 100% mortalité	NF	NF	négatif en PCR2	négatif en PCR2	RAS	

RAS : Rien à signaler.

NF : Analyse non faite.

Figure 7 : Essais de reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpes chez les larves de *Ruditapes philippinarum*.

