

49731
H500-BER R

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

RÉSEAU DE VEILLE ZOOSANITAIRE DES MOLLUSQUES

REPAMO

Rapport d'activité pour l'année 1997

Station IFREMER de La Tremblade
Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02949

The IFREMER logo features a stylized grey fish or whale silhouette above the word "IFREMER" in a bold, italicized, sans-serif font. The logo is positioned on a yellow horizontal bar that spans the width of the page.

IFREMER

PLAN DU RAPPORT

Introduction	page 1
1. Rappel des objectifs et de la structure du réseau	page 1
1.1 Analyses effectuées en 1997	page 2
1.2 Informations	page 3
2. Principaux résultats des analyses réalisées en 1997	page 3
2.1 Analyses répondant à la directive 91/67/CE	page 3
- 2.2 Suivi de base minimal	page 5
2.3 Etude des cas de mortalité anormale	page 7
2.3.1. Rappel de la situation sur le terrain	page 7
2.3.2. Résultats des analyses	page 12
2.4 Contrôle des échanges avec les pays de l'Union Européenne	page 14
2.5 Contrôle des échanges avec les pays tiers	page 15
2.6 Résultats des analyses effectuées en cas de baisses de performances	page 15
3. Actions de soutien aux programmes de recherche	page 16
4. Essais interlaboratoires pour la détection du virus type herpès en PCR sur du naissain	page 17
4.1 Matériels et méthodes	page 18
4.2 Résultats	page 20
4.3 Discussion	page 23
5. Conclusion et perspectives	page 26

Introduction : pourquoi un réseau de veille zoosanitaire ?

Le réseau de veille zoosanitaire des mollusques, REPAMO, a été créé en 1992 afin de protéger les espèces d'intérêt économique des maladies susceptibles de les affecter.

En effet, de même que les autres productions animales, la conchyliculture est frappée par diverses maladies dont certaines se comportent comme des facteurs limitants de la qualité ou de la quantité des productions. L'histoire de l'ostréiculture française a connu de tristes expériences en la matière, notamment dans les années 70 pour l'huître creuse portugaise, *Crassostrea angulata* ou encore pour l'huître plate, *Ostrea edulis*.

En fait, nous ne disposons que de très peu de possibilités de protéger les mollusques bivalves vis à vis des maladies infectieuses. D'une part, les traitements, pour des espèces élevées en milieu ouvert, posent les problèmes des quantités de substances à utiliser, des fortes probabilités de recontamination et de l'accumulation de résidus dans le milieu. D'autre part, la vaccination, ou immunoprophylaxie, au sens conventionnel du terme, reste sans objet chez les invertébrés du fait de leur absence de réponse immune spécifique.

Au vu de ces éléments, les seules façons de protéger ces espèces vis à vis des maladies infectieuses sont de mettre au point des techniques de diagnostic rapides, sensibles et fiables, adaptées au suivi zoosanitaire des cheptels, ainsi que d'obtenir des populations d'animaux présentant une certaine résistance aux principales maladies susceptibles de les affecter.

Dans ce contexte, l'épidémio-surveillance et surtout l'épidémio-vigilance occupent donc une position centrale dans la lutte contre les maladies infectieuses des mollusques et la protection des cheptels conchylicoles.

1. Rappel des objectifs et de la structure du réseau :

Le réseau de surveillance zoosanitaire de l'Ifremer, REPAMO, répond aux Directives 91/67/CE du 28 janvier 1991, relative aux conditions de police zoosanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture (modifiée par les Directives 93/54/CE du 24 juin 1993 - nouvel article 14 - et 95/22/CE du 22 juin 1995), et 95/70/CE du 22 décembre 1995, établissant des mesures communautaires minimales de contrôle de certaines maladies des mollusques bivalves, et aux décrets d'application relatifs. Les activités du réseau font partie des missions institutionnelles de l'Ifremer.

Les objectifs de ce réseau sont les suivants :

- la réalisation des analyses permettant de classer les zones pour les maladies obligatoirement déclarables (bonamiose et martelliose),
- la surveillance de base pour l'ensemble du cheptel conchylicole français, espèces exploitées, ainsi que les populations naturelles,
- l'étude des cas de mortalité anormale,
- le contrôle des produits échangés entre les pays de l'Union Européenne et la France, ainsi qu'entre les pays tiers et la France.

Les analyses sont effectuées par trois cellules de veille zoosanitaire (Palavas, La Tremblade et La Trinité) qui ont en charge les zones du littoral français leur correspondant (méditerranée, atlantique sud et nord Loire). La coordination des trois cellules et l'animation du réseau sont actuellement assurées depuis le laboratoire de La Tremblade. En outre, les cellules d'analyse du REPAMO apportent un soutien à divers programmes de recherche de l'Ifremer.

Le fonctionnement du réseau, notamment, pour la collecte d'information ou l'acheminement des échantillons, s'appuie sur des collaborations avec les stations et laboratoires côtiers de l'Ifremer. Le fonctionnement de ce réseau est schématisé par la Figure 1.

Les productions du REPAMO sont donc d'une part des résultats d'analyse et d'autre part des informations sur la situation zoosanitaire et son évolution.

1.1. Analyses effectuées en 1997 :

Le nombre d'échantillons analysés au cours de l'année 1997 est consigné dans le Tableau 1.

Tableau 1 : analyses réalisées en 1997 pour les zones 1 à 10.

Zones	1/2/3/4 Méditerranée	5/6/7 Atlantique Sud Loire	8/9/10 Atlantique Nord Loire	Total
nombre d'analyses par apposition d'organe	1 786 (53 lots)	70 (2 lots)	2 225 (64 lots)	4 081
nombre d'analyses en histologie	500 (21 lots)	1 816 (72 lots)	1 460 (72 lots)	3 776
nombre d'analyses en PCR	1 643	1 384	1 638	4 665
nombre d'analyses par mise en culture en thioglycolate	-	60 (3 lots)	-	60
divers	-	10 états frais, 2 bactérios	-	12
Total	3 929	3 312	5 323	12 564

En 1997, un total de 12 564 analyses ont été réalisées par l'ensemble des trois cellules de veille zoosanitaire. Ce chiffre confirme une tendance très nette à l'augmentation du volume des analyses réalisées dans le cadre du REPAMO qui passait de 7 668 analyses en 1995 à 10 184 analyses en 1996. Cette augmentation semblait essentiellement due à l'utilisation d'une nouvelle technique, la PCR, en 1996. Toutefois, en 1997, le volume d'analyse pour toutes les techniques sans distinction a été augmenté (3362 à 4081 frottis ; 2763 à 3776 histologies ; 3715 à 4665 PCR ; 44 à 60 cultures en thioglycolate ; 0 à 12 divers).

1.2. Informations

Les supports d'information du réseau en 1997 sont schématisés sur la Figure 1. Ils sont de deux natures, essentiellement :

- papier (compte-rendus d'analyses, rapport annuel, points d'information bimensuel pendant les épisodes de mortalité anormale en période estivale),
- informatique (base de données et forum électronique).

En 1997, des compte-rendus d'examen ont été envoyés aux professionnels ayant soumis des lots pour analyse aux cellules de veille du réseau. Le rapport annuel pour 1996 a été rédigé et diffusé auprès du CNC, des SRC et de la DPM/CM. De même, pendant les épisodes de mortalité anormale en période estivale, 3 points d'information (15/07/97, 05/08/97 et 03/09/97) ont été transmis à la DPM/CM et le CNC (pour diffusion aux SRC).

La base de donnée REPAMO a été mise en place sur les trois cellules de veille dans une forme fixée si ce n'est définitive. Des aménagements et améliorations pourront être réalisés au cours de l'année 1998. L'administration de la base est assurée depuis La Tremblade par Anne Thébault. Cette base de données permet un accès en lecture aux résultats d'analyse réalisés sur l'ensemble des cellules pour les ayant-droit.

Un forum électronique a été mis en place (liste repamo) qui permet une diffusion des informations relatives aux épisodes de mortalité par messagerie électronique. Ce système présente l'avantage d'une diffusion rapide (quasiment en temps réel), exhaustive (l'ensemble des abonnés sont destinataires systématiques) et contrôlée (par le modérateur de la liste). En 1997, première année de fonctionnement de cette liste, 24 messages ont été diffusés sur ce forum.

Rappelons que trois réunions de travail ont été organisées en 1997.

2. Principaux résultats des analyses réalisées en 1997:

2.1. Analyses répondant à la Directive 91/67/CE :

Ces analyses portent sur la recherche des parasites *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* chez l'huître plate, *Ostrea edulis*, d'élevage ou de gisements naturels. Les résultats de ces analyses sont donnés par le Tableau 2.



Figure 1 : structure et fonctionnement du réseau de surveillance zoonitaire des mollusques, REPAMO.

La lecture de ce tableau montre la grande diversité de l'effort d'analyse entre les zones qui passe de 0 à 1140 analyses réalisées. De même, les résultats de la recherche des parasites *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* peuvent être négatifs dans des zones réputées non indemnes de bonamiose et marteiliose. Ces remarques doivent amener une réflexion sur les stratégies d'échantillonnage en ce qui concerne ces deux maladies à recherche et déclaration obligatoires.

Tableau 2 : résultats de la recherche des parasites *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* sur l'huître plate, *Ostrea edulis*, dans les différentes zones du littoral français métropolitain, en 1997.

Zones	nombre de lots analysés	nombre d'individus analysés	<i>B. ostreae</i>	<i>M. refringens</i>
1	<i>pas d'analyses</i>			
2	1	93 frottis	1	non recherché
3	3 (1)	90 frottis	0	non recherché
	1 (1)	30 histologie	0	0
	1 (2)	30 frottis	2	non recherché
	35 (2)	934 frottis	55	non recherché
	4	120 histologie	non recherché	0/36
4	3	184	1	13/52
5	3	89 histologie	0	0
6	2	120 histologie	7	0
	2	70 frottis	-	4
7	2	50 histologie	0	5
8	27	1140	90	40/501
9	2	141	0	0
10	<i>pas d'analyses</i>			

(1) gisement naturel

(2) élevage

2.2. Suivi de base minimal :

Ce suivi s'attache aux autres espèces de mollusques bivalves, d'élevage ou de gisements naturels, et permet d'avoir une référence de l'état zoosanitaire des populations présentes sur le littoral français, année après année. En outre, ce suivi répond en partie à la Directive 95/70/CE établissant les mesures communautaire minimales de contrôle de certaines maladies des mollusques bivalves.

Le détail des résultats de ces analyses est consigné dans le Tableau 3.

Tableau 3 : principaux résultats des analyses réalisées dans le cadre du suivi de base des mollusques bivalves pour 1997.

Espèce	zone	lots analysés	individus analysés	technique d'analyse	résultats
<i>Donax</i> sp.	2	3	65	histologie	11 animaux avec des grégarines, 8 avec des rickettsies, 1 avec des trématodes.
<i>Donax</i> sp.	3	4	85	histologie	15 animaux avec des grégarines, 11 avec des rickettsies.
<i>Mytilus edulis</i>	5	2	60	histologie	4 animaux avec des <i>Mytilicola</i> , 4 animaux avec des ciliés, 2 animaux avec des rickettsies, 5 animaux avec des métazoaires dans les palpes et les branchies, 1 animal présentant une néoplasie, et 1 animal avec des grégarines.
<i>Mytilus edulis</i>	6	2	60	histologie	17 animaux avec des <i>Mytilicola</i> , 1 animal avec des rickettsies, 1 animal avec des sporocystes de métazoaire.
<i>Mytilus edulis</i>	7	2	88	histologie	9 animaux avec des <i>Mytilicola</i> , 22 animaux avec des ciliés, 4 animaux avec des grégarines, 1 animal avec des sporocystes de métazoaire, et 1 animal avec des rickettsies.
<i>Ruditapes philippinarum</i> et <i>R. decussatus</i>	5	2	80	histologie	34 animaux avec du <i>Perkinsus atlanticus</i> , 6 animaux avec des rickettsies, 8 animaux avec métazoaires, 2 animaux avec des spores de grégarines.
<i>R. philippinarum</i> et <i>R. decussatus</i>	5	1	20	culture thioglycolate	5 cas de <i>Perkinsus atlanticus</i> .
<i>Ruditapes philippinarum</i> et <i>R. decussatus</i>	6	1	30	histologie	1 animal avec des foyers bactériens dans les branchies, 2 animaux avec des rickettsies, 3 animaux avec métazoaires.
<i>Ruditapes philippinarum</i> et <i>R. decussatus</i>	7	4	120	histologie	13 animaux avec des foyers bactériens dans les branchies, 22 animaux avec des rickettsies, 3 animaux avec métazoaires, 2 animaux avec des grégarines, et 1 animal avec des haplosporidies.
<i>Cerastoderma edule</i>	5	2	60	histologie	18 animaux avec des grégarines, 4 avec des sporocystes de <i>Labratrema</i> , 8 avec des métacercaires de <i>Meiogymnophallus</i> , 2 animaux avec des métazoaires, 7 présentant des rickettsies, 12 animaux avec des foyers bactériens dans les branchies, et 1 animal avec des haplosporidies.
<i>Cerastoderma edule</i>	6	1	30	thioglycolate	rien à signaler sur ce lot.
<i>Cerastoderma edule</i>	6	1	30	histologie	26 animaux avec des spores de grégarines, 7 avec des sporocystes de <i>Labratrema</i> , 15 animaux avec des métacercaires de <i>Meiogymnophallus</i> .
<i>Cerastoderma edule</i>	7	3	90	histologie	69 animaux avec des grégarines, 3 avec des sporocystes de <i>Labratrema</i> , 2 avec des métacercaires de <i>Meiogymnophallus</i> , 16 animaux avec des métazoaires, 7 présentant des rickettsies, 4 animaux avec des rickettsies.

Tab. 3 suite

<i>Donax anatinum</i>	8	1	15	histologie	présence de <i>Nematopsis</i> , et de métazoaires.
<i>Cerastoderma edule</i>	8	4	120	histologie et frottis	métazoaires, grégarines, trématodes et rickettsies.
<i>Cerastoderma edule</i>	9	3	40	histologie	trématodes, grégarines, métazoaires et rickettsies.
<i>Mercenaria mercenaria</i>	8	2	20	histologie	rien à signaler sur ce lot.
<i>Venus verrucosa</i>	8	1	16	histologie	rickettsies.
<i>Mytilus edulis</i>	9	3	60	histologie	pinnothères, <i>Mytilicola</i> , trématodes.
<i>Mytilus edulis</i>	8	1	15	histologie	<i>Mytilicola</i> .
<i>Pecten maximus</i>	9	1	30	histologie	rickettsies.
<i>Tapes rhomboïdes</i>	8	1	15	histologie	rickettsies, grégarines.
<i>Ruditapes decussatus</i>	8	1	15	histologie	cestodes.
<i>Ruditapes philippinarum</i>	8	1	29	histologie	rickettsies, <i>Perkinsus atlanticus</i> .

2.3. Etude des cas de mortalité anormale :

Aux termes de l'article 2 de la Directive 95/70/CE du 22 décembre 1995, établissant des mesures communautaires minimales de contrôle de certaines maladies des mollusques bivalves, on entend par mortalité anormale : une mortalité subite qui affecte approximativement 15% des stocks et qui se produit au cours d'une période courte entre deux contrôles (avec confirmation dans les quinze jours). Dans une écloserie, une mortalité est considérée anormale lorsque l'éleveur ne peut obtenir de larves pendant une période qui couvre les pontes successives de plusieurs reproducteurs. Dans une nurserie, une mortalité est considérée comme anormale lorsqu'une soudaine mortalité relativement importante survient brusquement dans plusieurs tubes.

2.3.1. Rappel de la situation sur le terrain :

Ce rappel sera fait par secteurs de production :

Normandie

Pas de mortalité anormale signalée en Normandie, fin juin. Pas de mortalité constatée sur les lots expérimentaux du laboratoire conchylicole, sur estran ou en eau profonde. Les professionnels ont confirmé n'avoir aucun problème de ce point de vue mais restaient toutefois inquiets, début juillet, dans la mesure où ils ne sont pas les premiers touchés, en général, par les épisodes de mortalité estivale. La situation est restée stable au cours du mois de juillet.

A signaler, à la mi-Août, un épisode de mortalité de moules pêchées sur le gisement de Barfleur et reparquées sur le chenal d'Isigny. Le taux de mortalité était de l'ordre de 30%. Les analyses d'eau réalisées par les services vétérinaires ont révélé une charge importante de phytoplancton caractéristique d'eaux douces. Les conditions météorologiques du moment ont pu conduire à un phénomène de doussain et d'anoxie (notamment vent d'Est, biomasse

importante de phytoplancton et basses pressions atmosphériques). Un phénomène analogue avait été constaté à la même période en 1996. Un épisode de mortalité d'huîtres adultes a été signalé par un professionnel, sur la même zone au cours de cette marée. Une visite faite sur le site a permis de confirmer la mortalité avec un taux de 22% (coquilles vides). Aucun problème n'a été signalé sur les naissains.

Bretagne Nord

Aucun fait particulier signalé de la part des professionnels ou observé par les agents de l'équipe de Concarneau au cours du mois de juin. A signaler, une mortalité de 19% constatée sur le lot REMORA de 18 mois de Cancale à cette période.

En juillet, quelques épisodes de mortalité ont été signalés en baie de Morlaix affectant des élevages sur sol avec des taux de mortalité de l'ordre de 15 à 50%. Une commission de visite s'est rendue sur les concessions de ce secteur le 22 Août. En revanche, la situation restait satisfaisante pour les huîtres en poche à la même période.

En août, deux nouveaux cas ont été signalés sur l'ensemble des concessions de la rivière de Morlaix. Une mortalité de l'ordre de 50% a touché un lot de naissain à plat sur une concession découvrant à coefficient de 105. Un autre lot de naissain placé en poche sur une concession découvrant à coefficient de 90/95 a connu une mortalité avant dédoublement (1650 huîtres par poche) et estimée à plus de 30% après dédoublement (700 huîtres par poche).

Rien n'a été signalé en ce qui concerne les secteurs de la rivière de Penzé, des Abers et de la Rade de Brest, ni sur Paimpol ou Cancale.

Bretagne Sud

Après la grande marée de fin juin, plusieurs cas de mortalité étaient signalés sur des lots d'huîtres creuses, notamment dans la partie amont de la rivière d'Auray. Des taux de mortalité de l'ordre de 40% ont été constatés pour 3 lots, et de 80% pour 1 lot. Des lots suivis par le laboratoire conchylicole de La Trinité ont montré un début de mortalité de 20 à 35% sur ce secteur, mais pas le lot aval. Lors de la marée de début juillet, la mortalité semblait se tasser sur les lots suivis par ce laboratoire sur les deux secteurs amont.

Au total, 12 professionnels ont contacté l'IFREMER. 16 lots déclarés touchés par des mortalités allant de 15 à 80 %, survenues entre fin mai et début juillet, et plus précisément entre mi juin et fin juin pour la majorité des lots. Des cas ont été signalés sur différentes origines (2 lots d'écloseries sur les 16) et différents types d'élevage, mais la majorité des lots concernés sont des lots de naissain de captage 1996 sur tubes. Les prélèvements de fin juillet sur les lots suivis le laboratoire de La Trinité montraient que la situation était stabilisée.

Des mortalités de 100% de naissains (origine captage naturel) ont été signalées sur trois lots en Rivière d'Auray au cours du mois d'Août.

Pour la baie de Quiberon, en eau profonde, des mortalités de 5 à 65% ont été signalées sur

plusieurs lots. Ces mortalités semblent être survenues au cours de la seconde quinzaine de juin. Un seul cas signalé en découvrant mi-juin. Les lots REMORA placés en baie de Quiberon (18 mois) présentaient des taux de 30 à 35% de mortalité.

Pour le golfe du Morbihan, 2 cas ont été signalés dont l'un de 30%, fin mai. Un cas de mortalité a été enregistré en rivière d'Étel, fin juin, (11% de mortalité au comptage).

Aucun nouveau cas n'était signalé en Baie de Quiberon ou dans l'intérieur du Golfe du Morbihan en juillet.

Un cas était signalé en rivière de Penerf en juin. Le lot de naissain REMORA de Penerf amont présentait une mortalité de l'ordre de 22% à la même période.

Des mortalités massives de coques sont apparues au Croisic à partir du 15 août 1997, essentiellement limitées au secteur Nord (Petit traict) dans un premier temps, puis se sont étendues rapidement (quelques jours) à l'ensemble du secteur de production.

A la demande des réparateurs, une mission d'enquête s'est réunie sur le terrain, le vendredi 22 août 1997. Cette mission était composée de représentants des Affaires Maritimes (Q.M. Saint-Nazaire), de l'IFREMER (La Trinité /mer), des Services Vétérinaires, de la Direction Départementale de l'Agriculture, d'élus du Croisic et du Conseil Général, et de professionnels.

La commission de visite a constaté :

- . dans le secteur de Sissable et du Petit traict : environ 40 concessions (43 ha) ont présenté une mortalité de 100% facilement repérable par la remontée de toutes les coques hors du sédiment,
- . dans le secteur de la balise et du Gros banc : peu ou pas de mortalité,
- . dans le secteur de la Croix : 40 à 80% de mortalité pour 7 concessions (8 ha) et 80 à 90% de mortalité pour 4 concessions (12 ha).

Il faut préciser que les concessions non recensées correspondent, soit à des concessions non visitées, soit à des concessions non exploitées ou exploitées pour d'autres activités (huîtres, moules, palourdes)

Des comptages précis ont été réalisés ensuite les 2, 3 et 4 septembre par les Affaires Maritimes et l'Ifremer avec des échantillonnages de 2 à 3 points de 1/4 m² sur chaque parc où une mortalité avait été signalée par les professionnels. Le constat est une mortalité de 100% sur les parcs du Petit traict et au centre du Grand traict. Les chiffres sont un peu plus faibles (en général 80 à 90%) au Sud et à l'Est du Grand traict. Des mortalités plus faibles traduisent davantage une situation encore évolutive début septembre que des chiffres définitifs. Les parcs où aucune mortalité n'est enregistrée sont seulement ceux qui venaient d'être récoltés, et il est intéressant de signaler qu'aucune mortalité n'a été signalée sur les coques récemment expédiées à la consommation.

Les animaux touchés sont pratiquement tous de taille marchande. Par ailleurs, les huîtres (en poches sur tables), les moules (à plat sur le sol) et les palourdes (enfouies dans le sédiment, un peu plus profond que les coques) ne semblent pas avoir souffert.

Pour mémoire, l'élevage de la coque, *Cerastoderma edule*, dans le traict du Croisic produit

bon an mal an quelque 2 000 tonnes d'animaux commercialisables. Comme la plupart des élevages conchylicoles, il s'agit d'un élevage typiquement semi-intensif (les animaux puisant leur nourriture dans le milieu) mais à caractère intensif compte tenu des biomasses semées et produites (plusieurs kg/m²).

L'élevage concerne le seul grossissement à plat des adultes enfouis dans la couche superficielle du sédiment ; les juvéniles (6 mois, taille 1 cm en moyenne) sont achetés aux pêcheurs des gisements naturels voisins, surtout celui de la Vilaine, au Nord, dont l'exploitation est à l'origine du réel développement de cet élevage dans les années 70. On trouve également un peu de naissain naturel sur le traict du Croisic lui-même. La récolte est effectuée 18 mois à 2 ans après le semis, avec des rendements de l'ordre de 5 kg /m², soit quelques 600 coques /m².

En 1997, l'élevage des coques au Croisic se pratique sur 132 ha des 180 ha concédés au Croisic et occupe 24 concessionnaires à titre principal sur 34. C'est l'activité conchylicole principale du secteur ; et la principale, sinon la seule, zone d'élevage de coques en France.

Vendée

En juin, aucun problème n'était signalé en écloserie ou nurserie. Sur l'ensemble de la baie de Bourgneuf, quelques épisodes de mortalité sporadique ont toutefois été signalés sur naissains ou adultes, notamment sur le secteur Paillard (un épisode signalé mi-juin sur ce secteur avec une mortalité de l'ordre de 50 à 60% du naissain, pour la tête de lot).

En juillet, plusieurs appels de professionnels ont été enregistrés relatant d'importantes mortalités dans différents secteurs de production de la baie de Bourgneuf. Des visites ont été faites par le laboratoire de Bouin sur 5 secteurs de la baie lors de la dernière grande marée :

Sur le secteur Ouest de Noirmoutier, une mortalité globale de 25% sur les huîtres de collecteur âgées de 1 an était constatée. Cette mortalité était en réalité une mortalité survenue courant juin et déjà répertoriée.

Pour le secteur Est de Noirmoutier, un cas de mortalité ponctuelle chez un ostréiculteur et touchant 25% des huîtres de ses collecteurs de 1 an était signalé.

Sur le secteur Nord de la baie, trois points ont été visités. Sur le premier point visité, une mortalité globale, sur un parc, estimée à 50% sur des adultes était constatée. Apparemment la montée importante de sédiment vaseux pourrait expliquer ces mortalités sur ce parc bas (90 à 100 de coefficient). Quelques parcs très bas ont été également touchés. Pas de mortalité récente n'a été constatée sur les deux autres points visités.

En conclusion, la situation étaient stable et plutôt satisfaisante par rapport aux années antérieures, compte tenu du peu de difficultés rencontrées dans les nurseries.

En août, une augmentation sensible de la mortalité s'est produite en baie de Bourgneuf. Contrairement aux années antérieures la mortalité semble s'être étalée dans le temps. Elle touchait principalement les juvéniles avec cependant pendant la période de forte chaleur et d'orage une mortalité constatée sur du 18 mois et des adultes.

Pour les juvéniles des mortalités ponctuelles et variables (de 15 à 60%) ont été recensées sur des lots de une à une provenant d'écloserie ou/et de "grattis" d'Arcachon. Sur les collecteurs une mortalité d'environ 20% a été enregistrée par les affaires maritimes dans le secteur Est de la baie de Bourgneuf. Les professionnels notaient une mortalité homogène sur les lots de juvéniles en une à une quelque soit le site de production. Les nurseries ne semblent pas avoir été particulièrement touchées cette année, et n'accusent pas de fortes mortalités comme les années précédentes.

Pour les adultes, 10 à 15% de mortalité étaient constatés et ne semblaient pas préoccuper outre mesure les professionnels.

Charente maritime

En ce qui concerne les huîtres adultes, les signalements de taux de mortalité concernaient uniquement les bancs de Ronce-Perquis. D'après les estimations du laboratoire conchylicole, le taux maximal observé était de 25% avec une moyenne d'environ 15% (15 stations de suivis). Les taux de mortalité en 1997 étaient similaires aux 2 dernières années. Les mortalités sont apparues plus tardivement que les années précédentes avec les premiers signalements fin juin.

En ce qui concerne les juvéniles (captage 96), des mortalités anormales ont été signalées début juillet en Charente, Ile d'Aix et Bonne Anse. La mortalité est apparue brutalement et concernait 20 à 40% du cheptel. Ces mortalités restaient très ponctuelles et n'avaient pas un caractère de grande ampleur. Sur Bonne-Anse, zone de captage, de forts taux de mortalité ont été signalés (40-50%).

Dans le cadre du Réseau REMORA, 3 stations charentaises sur 9 présentaient des taux de mortalité élevés de 36 à 38% sur les juvéniles ; les taux sur les autres sites étant inférieurs à 1%. Les adultes du réseau de croissance Marennes-Oléron et du réseau REMORA présentaient des taux de mortalité inférieurs à 10%.

En juillet, la situation restait stable sur l'ensemble de la zone. Toutefois, un épisode de mortalité de juvéniles sur l'île de Ré à été signalé, estimé à 30-40%. Une commission de visite a été organisée par les Affaires Maritimes. Des taux de mortalité de l'ordre de 15 à 20% ont été constatés sur des juvéniles (parcs de coefficient 70). Du grattis en poche placé sur des parcs de coefficient 90 a connu des taux de mortalité de l'ordre de 48% début Août. Un épisode de mortalité à 60% sur collecteur placé depuis peu sur ce site a été signalé par un professionnel sur le secteur de Fort Laprée.

Arcachon

Un cas de mortalité a été signalé début juillet sur un parc situé dans le secteur nord-ouest du bassin. Les animaux touchés étaient des huîtres d'un an, en place depuis le mois d'avril, et présentaient des taux de mortalité de 9 à 22% sur l'ensemble du lot.

Méditerranée

Quelques cas de mortalité de naissains avaient été signalés en mai et juin, concernant des lots de captage naturel ou d'écloserie. Ces mortalités touchaient le naissain de 1 à 3 semaines après mise en eau. Toutefois, ces épisodes semblent avoir cessé depuis fin juin.

Un épisode de mortalité plus important, associé à une forte élévation de la température de l'eau, a été signalé sur Leucate.

En juin et juillet, très peu de professionnels ont signalé des mortalités importantes sur Thau. La situation était confirmée par les premiers résultats de la campagne d'évaluation des stocks du laboratoire conchylicole de Palavas, dans le cadre de laquelle plus de 160 tables de l'étang de Thau ont été visitées. On peut retenir de cette étude de stock que sur les tables visitées, aucune mortalité d'adulte n'a été observée. En ce qui concerne le naissain, moyen et petit, quel que soit le type de captage, deux cas de mortalité - de l'ordre de 30% - ont été constatés pour des tailles de 4 cm environ. Ces mortalités devaient être relativement anciennes puisqu'aucun individu moribond n'a été trouvé mais uniquement des coquilles vides et sales. Un seul cas de mortalité d'adulte a été signalé au cours de cette période (20 à 25% de mortalité).

Au mois d'août, l'étang de Thau a connu des mortalités massives de coquillages, catastrophiques pour certains ostréiculteurs qui ont pu tout perdre. D'après les premières constatations, environ 850 tables sur les 2 600 que compte le bassin de Thau étaient touchées avec une destruction au 4/5^e soit environ 4 000 tonnes de coquillages.

Les conditions météorologiques extrêmes qui ont régné depuis le début du mois d'août (température élevée, absence de vent et basses pressions ont provoqué une désoxygénation des eaux) ont été l'origine de la mortalité des coquillages. L'arrivée massive d'eau douce, probablement très riche en matière organique, suite aux orages sur le bassin versant du Nègue Vaques a pu favoriser la progression d'une « malaïgue de bordure » à la zone d'élevage elle-même. La richesse de la biomasse constituée par les parcs conchylicoles et le maintien de conditions météo défavorables ont fait que le phénomène a pu se propager sur l'ensemble de la zone B (460 ha sur les 7500 au total). La qualité initiale du milieu n'est pas en cause, pas plus qu'il n'y a de lien avec la qualité sanitaire des coquillages comme le confirme le suivi REMI.

2.3.2. Résultats des analyses effectuées dans le cadre de l'étude des épisodes de mortalité anormale :

Les résultats des analyses effectuées sont présentés dans le Tableau 4. Ce tableau présente les résultats avec une référence à la zone géographique des lots analysés, à la classe d'âge (naissain, adulte), ainsi qu'au type de technique d'analyse utilisée (histologie, PCR, etc...).

Tableau 4 : résultats des analyses réalisées lors d'épisodes de mortalité anormale en 1997.

Espèce	Lots	Individus	Age	Zone	Technique	Résultats
<i>Crassostrea gigas</i>	45	219	naissains	Méditerranée	PCR	détection + (14/45).
<i>C. gigas</i>	21	108	naissains	Méditerranée	PCR	pas de données.
<i>C. gigas</i>	9	33	juvéniles	Méditerranée	PCR	détection + (1/6).
<i>C. gigas</i>	44	216	naissains	Méditerranée	PCR	détection + (27/44).
<i>C. gigas</i>	6	30	juvéniles	Méditerranée	PCR	pas de détection d'ADN viral.
<i>C. gigas</i>	6	29	naissains	Méditerranée	PCR	détection + (3/6).
<i>C. gigas</i>	14	69	naissains	Méditerranée	PCR	pas de données.
<i>C. gigas</i>	6	180	naissains	Vendée	PCR	pas de détection.
<i>C. gigas</i>	3	69	adultes	Vendée	histologie	6 animaux avec des ciliés.
<i>C. gigas</i>	20	380	naissains	Charente Maritime	PCR	détection + (2/113).
<i>C. gigas</i>	2	60	naissains	Charente Maritime	histologie	2 animaux avec anomalies nucléaires des cellules du tissu conjonctif (suspicion herpès), 1 individu avec des <i>Mytilicola</i> .
<i>C. gigas</i>	4	120	adultes	Charente Maritime	histologie	4 animaux avec des <i>Mytilicola</i> , 2 avec <i>Mytilicola</i> , 20 animaux présentent une dégradation d'origine indéterminée de divers organes.
<i>C. gigas</i>	1	30	naissains	Arcachon	PCR	pas de détection d'ADN viral.
<i>C. gigas</i>	4	120	adultes	Arcachon	histologie	3 animaux avec des ciliés, 3 avec des <i>Mytilicola</i> et 1 avec des <i>Mytilicola</i> .
<i>C. gigas</i>	4	110	naissains	Vendée	PCR	détection d'ADN viral (8/22).
<i>Cerastoderma edule</i>	1	360	adultes	Vendée	histologie	189 animaux avec des grégaires, 9 avec sporocystes de <i>Labratrema</i> , 48 avec des metacercaires de <i>Meiogymnophallus</i> et 1 animal avec des "Coccidies-like" dans les reins.
<i>C. edule</i>	1	10	adultes	Vendée	états frais	2 animaux avec des metacercaires de <i>Meiogymnophallus</i>
<i>C. edule</i>	1	30	adultes	Vendée	PCR	Sur les 6 pools analysés aucun n'a révélé de l'ADN viral.
<i>C. edule</i>	1	30	adultes	Charente maritime	histologie	29 animaux avec des grégaires, 1 animal avec des sporocystes de <i>Labratrema</i> , 7 animaux avec des metacercaires de <i>Meiogymnophallus</i> , 5 animaux avec des colonies de rickettsie et 10 animaux avec des métazoaires.
<i>C. gigas</i>	1	20	adultes	Cancale	histologie PCR	animaux avec <i>Mytilicola</i> , chlamydies et suspicion herpès virus.
<i>C. gigas</i>	2	24	adultes	Blainville	histologie PCR	animaux avec des rickettsies et ciliés.

Tab. 4 suite

<i>C. gigas</i>	2	30	adultes	PenBé	histologie PCR	animaux avec des <i>Mytilicola</i> et <i>Polydora</i> .
<i>C. gigas</i>	1	30	naissains	Auray	PCR	détection d'ADN viral.
<i>C. gigas</i>	1	30	naissains	Auray	PCR	détection d'ADN viral.
<i>C. gigas</i>	1	30	naissains	Auray	PCR	détection d'ADN viral.
<i>C. gigas</i>	2	50	naissains	Etel	histologie PCR	animaux avec des ciliés, <i>Mytilicola</i> , suspicion herpès virus non confirmée.
<i>C. gigas</i>	4	120	naissains	Quiberon	histologie	animaux avec des ciliés, <i>Mytilicola</i> , suspicion herpès virus.
<i>C. gigas</i>	3	90	naissains	Auray	histologie PCR	RAS
<i>C. gigas</i>	6	180	naissains	Morlay	histologie PCR	animaux avec des ciliés, <i>Mytilicola</i> , suspicion herpès virus confirmée en PCR.
<i>C. gigas</i>	2	60	naissains	Le Pô	histologie PCR	animaux avec <i>Mytilicola</i> , et ciliés.
<i>C. gigas</i>	4	39	naissains	PenBé	histologie PCR	animaux avec <i>Mytilicola</i> , et PCR+.
<i>C. gigas</i>	2	60	juvéniles	Cancale	histologie PCR	RAS
<i>C. gigas</i>	6	130	juvéniles	Abers	histologie PCR	suspicion infection virus herpes.
<i>C. gigas</i>	4	37	adultes	Baie des Veys	histologie	animaux avec <i>Mytilicola</i> , suspicion infection virus herpes.
<i>C. edule</i>	2	60	naissains	Vilaine	histologie	animaux avec des grégarines, rickettsies, trématodes et métazoaires.
<i>C. edule</i>	2	30	adultes	Etel	histologie	animaux avec des grégarines, rickettsies, trématodes.
<i>R. philippinar.</i>	1	15	adultes	Le Croisic	histologie	animaux avec des anneaux bruns, rickettsies, et <i>Perkinsus atlanticus</i> .
<i>R. philippinar.</i>	1	20	adultes	Le Croisic	histologie	animaux avec des cestodes.

2.4. Contrôle des échanges avec les pays de l'union Européenne :

Quelques lots de coquillages en provenance des pays membres de l'Union Européenne ont été contrôlés au cours de l'année 1997. Les résultats de ces contrôles sont récapitulés dans le tableau suivant (Tableau 5).

Tableau 5 : analyses réalisées dans le cadre d'importations à partir de pays membres de l'Union Européenne en 1997.

Espèce	lots	origine :	méthode d'analyse :	individus analysés :	résultats :
<i>O. edulis</i>	1	Irlande	PCR	30 (6 pools)	non encore analysés
<i>C. gigas</i>	1	Irlande	PCR	30 (6 pools)	négatifs.
<i>C. gigas</i>	1	Irlande	histologie	30	1 animal avec des ciliés et 1 animal avec bactéries dans les branchies.

2.5. Contrôle des échanges avec les pays tiers :

Quelques lots d'animaux en provenance des pays tiers ont été contrôlés avant leur entrée sur le territoire national. Ces lots étaient destinés à la consommation directe (sans retrempage) en ce qui concerne *Ostrea puelchana*, ou à des fins expérimentales en zones de quarantaine (laboratoire Ifremer/GAP) pour les lots de *Crassostrea gigas* originaire de Taïwan, et *rhizophorea* du Sénégal.

Tableau 6 : analyses réalisées dans le cadre d'importations à partir de pays tiers en 1997.

Espèce	lots	origine :	méthode d'analyse :	individus analysés :	résultats :
<i>C. gigas</i>	1	Taïwan	histologie	29	6 animaux avec métazoaires et 1 avec des rickettsies.
<i>C. rhizophorea</i>	1	Sénégal	histologie	30	gégarines et rickettsies.
<i>O. puelchana</i>	1	Argentine	histologie	30	rien à signaler.

2.6. Résultats des analyses effectuées en cas de baisses de performances zootechniques

Tableau 7 : Résultats des analyses effectuées en cas de baisses de performances zootechniques en 1997.

Espèce :	Lot :	Motif :	Méthode :	nombre d'individus analysés :	résultats :
<i>Mytilus edulis</i>	3	défaut de fixation	histologie	90	10 animaux avec des grégaires, 28 animaux avec des ciliés, 5 animaux avec des métazoaires non déterminés, 5 animaux avec des <i>Mytilicola</i> et 1 animal avec des haplosporidies-like
<i>Ruditapes philippinarum</i>	1	problème de maturation	histologie	30	5 animaux avec des Haplosporidies-like, 1 animal avec des mycoplasmes-like
<i>Ruditapes philippinarum</i>	1	anomalies musculaires	culture en milieu thioglycolate	10	4 animaux positifs pour la détection de <i>Perkinsus atlanticus</i> .
			bactériologie sur anomalies	2	recherche de VPI négative
			histologie	30	20 animaux avec du <i>Perkinsus atlanticus</i> , 2 animaux avec des rickettsies, 2 animaux avec des amas minéraux soit dans muscle adducteur soit dans le manteau.

On peut définir la maladie comme toute perturbation physiologique non compensée se

traduisant au minimum par une baisse des performances zootechniques attendues et fréquemment par l'apparition d'anomalies du comportement (symptômes) ou de l'intégrité corporelle (lésions), pouvant aboutir à la mort des sujets atteints. Si ce sont les aspects lésionnels et léthaux qui retiennent le plus souvent l'attention, les baisses de performances ont une incidence économique évidente. Quelques lots d'animaux ont été analysés en 1997 pour ce type de motifs.

3. Actions de soutien aux programmes de recherche :

Les trois cellules d'analyse du REPAMO apportent un soutien à divers programmes de recherche de l'Ifremer en marge de leur activité de veille zoosanitaire. Les résultats des analyses réalisées dans ce cadre sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 8 : analyses réalisées en soutien aux programmes de recherche au cours de l'année 1997.

Espèce :	nbre de lot	programme :	méthode d'analyse :	nombre d'individus analysés :	résultats :
<i>O. edulis</i>	42	Plates étang de Thau	frottis cardiaques	1142	55 <i>Bonamia ostreae</i> .
<i>O. edulis</i>	9	Plates étang de Thau	histologie	240	2 animaux avec des infiltrations hémocytaires, et 1 animal avec des rickettsies sur 120.
<i>O. edulis</i>	1	Plates étang de Thau	PCR	30 (6 pools)	2 pools positifs.
<i>C. gigas</i>	1	REMORA	PCR	30 (6 pools)	1 pool positif.
<i>O. edulis</i>	1	Pré-développement	PCR	101 (20 pools)	3 pools positifs.
<i>C. gigas</i>	-	essais interlaboratoires	PCR	496	-
<i>O. edulis</i>	-	suivi nurserie Bouin	PCR	170 (8 pools)	pas de détection d'ADN viral.
<i>C. gigas</i>	1	suivi nurserie Bouin	PCR	15	1 pool positif.
<i>C. gigas</i>	4	Genephys	PCR	63 (35 pools)	7 pools positifs sur 35.
<i>C. gigas</i>	2	suivi banc de Ronce	histologie	58	4 animaux avec des <i>Mytilicola</i> et 2 avec des ciliés.
<i>C. gigas</i>	2	REMORA	histologie	54	RAS
<i>C. gigas / angulata</i>	1	conservatoire de souches	PCR	30 (6 pools)	pas de détection d'ADN viral.
<i>Tiostrea lutaria</i>	1	conservatoire de souches	histologie	7	RAS

Tab. 8

<i>C. gigas</i>	5	REMORA	PCR	45	RAS
<i>C. gigas</i>	6	REMORA	histologie	90	Rickettsies, <i>Mytilicola</i> , et ciliés
<i>C. gigas</i>	10	essais stress La Trinité	PCR	132	RAS
<i>C. gigas</i>	21	étude rivière d'Auray	PCR	630	détection d'ADN viral.
<i>C. gigas</i>	2	étude rivière d'Auray	histologie	20	RAS
<i>C. gigas</i>	1	essai Barret conditionnement génétique	PCR	10	RAS
<i>C. gigas</i>	1	essai Barret conditionnement génétique	histologie	10	suspicion virus de type herpès
<i>O. edulis</i>	27	génétique	frottis	824	<i>Bonamia ostreae</i> , haplosporidies, cilié, et bactéries
<i>O. edulis</i>	6	génétique	PCR	68	RAS

4. Essais interlaboratoires pour la détection du virus type herpès en PCR.

Il existe en fait très peu de références bibliographiques sur les essais interlaboratoires et particulièrement concernant les techniques de PCR. Deux essais interlaboratoires européens sur des virus peuvent illustrer notre propos :

- diagnostic de l'Herpèsvirus bovin type 1 : 12 prélèvements et leurs réplicats ont été analysés dans 17 laboratoires (avec différents niveaux et une souche de référence) par 3 techniques sérologiques différentes. (Kramps 1996).
- essais interlaboratoires en pathologie des poissons : 5 ampoules de différents virus ont été analysées dans 21 laboratoires avec 3 techniques diagnostiques différentes. (Olesen 1997). l'analyse statistique de ces essais n'a pas été faite car les effectifs étaient trop faibles (par exemple pour le test kappa l'effectif total doit être au minimum de 30 individus).

Pour le diagnostic par PCR les publications sont encore plus rares. Cette technique est utilisée dans des cas particuliers en médecine humaine (diagnostic hépatite C, mycobactéries) et en France elle n'est pas utilisée en routine en médecine vétérinaire. Les réactifs et les matériels utilisés ne sont pas non plus garantis par les fabricants pour ce type d'usage.

Les nombreux avantages de la technique PCR dans le diagnostic du virus de type Herpès du naissain *de C. gigas* (cf travaux de T. Renault), son utilisation au sein des trois cellules de veille depuis 1997, et les exigences de standardisation nous ont cependant amené à envisager la réalisation de ces essais interlaboratoires. La formation des personnes au sein des cellules de veille et la standardisation du protocole avaient été effectués par l'équipe qui avait mis au point la technique. Mais il fallait confirmer différents points : la bonne marche du matériel, l'homogénéité des réactifs et le niveau de technicité des participants. Dans un second temps il fallait vérifier la répétabilité des résultats obtenus au sein de chaque cellule, vérifier la reproductibilité entre deux manipulateurs lorsque plusieurs personnes étaient susceptibles d'effectuer ce type d'analyse et de vérifier la reproductibilité dans le temps des résultats au sein d'une même cellule. Surtout il fallait vérifier la reproductibilité des résultats d'un

laboratoire à l'autre.

A un premier stade il semblait judicieux de s'affranchir d'une part sans doute importante de variabilité et qui concerne le traitement des échantillons. Les essais ont donc concerné des surnageants issus de matériel infecté ou non naturellement. Le manque de matériel biologique disponible à la Tremblade ne nous aurait pas permis, de toute façon, de tester la technique diagnostique par PCR en entier.

Au cours de l'été 1997, un nouveau protocole de diagnostic en PCR a été mise au point avec de nouvelles amorces par T. Renault. Dans la mesure où ce protocole est plus rapide, moins coûteux et prometteur en terme de sensibilité, il a été décidé de profiter de ces essais pour comparer les deux techniques.

Le contrôle a été réalisé à différents niveaux :

Essai 1 : sources de variabilité liées aux réactifs, au matériel (thermocycleur), au manipulateur, etc...

Essais 2, 3, 4 : sources de variabilité liée aussi à l'échantillon biologique après préparation de celui-ci...

Essai 5 (non réalisé par manque de matériel biologique, mais prévu au départ) : source de variabilité à partir du prélèvement.

4.1. Matériels et méthodes :

Les thermocycleurs sont tous des Crocodile III (Appligène) qui ont été testés au moment de leur mise en route. Les cônes utilisés pour les pipettes sont des cônes à filtre, limitant le risque de contamination. Les fournisseurs et les réactifs achetés par les trois cellules étaient les mêmes (Taq DNA polymerase Goldstar Eurogentec). Par contre le type de pipetman utilisé pour mettre 0,1µl de produits de PCR1 pour la PCR2 n'était pas standardisé (la cellule de la Tremblade utilisait un pipetman de 20µl, tandis que les deux autres cellules utilisaient un pipetman de 1µl). En effet toutes les analyses réalisées au cours de l'été avaient été faites pour chaque cellule de cette façon et ces essais voulaient contrôler la validité des analyses réalisées. Par contre, avec l'utilisation des nouvelles amorces les trois cellules se sont standardisées par l'utilisation exclusive de la pipette de 20µl.

L'analyse des résultats comporte un X2 corrigé de Yates, qui peut avoir l'interprétation suivante : lorsque celui-ci est non significatif, cela veut dire que les différences observées ne sont pas orientées ; dans notre cas que personne n'a tendance à conclure plus négativement (respectivement positivement) qu'une autre.

Elle comporte aussi un taux kappa de concordance ; celui-ci estime le sens et la force du lien de concordance entre des données catégorielles, dépend pour partie du taux de prévalence, mais pas de l'effectif des mesures. Une échelle de kappa est donnée dans la discussion pour juger de la qualité du kappa comparée à une moyenne des kappa des techniques diagnostiques utilisées en routine en médecine humaine.

Essai 1 : test des appareils, répétabilité, témoin 2500 copies.

54 tubes de PCR, correspondant à la capacité du thermocycleur (27 avec de l'eau, 27 avec du témoin 2500 copies de génome viral alternativement), sont passés en PCR 1 et 2 avec les amorces A3-A4 et A5-A6. Une deuxième expérience remplace les tubes d'eau par du témoin et vice versa. La position sur le thermocycleur est fixée.

DISPOSITION SUR LE THERMOCYCLEUR

	1	2	3	4	5	6
A	E	T	E	T	E	T
B	T	E	T	E	T	E
C	E	T	E	T	E	T
D	T	E	T	E	T	E
E	E	T	E	T	E	T
F	T	E	T	E	T	E
G	E	T	E	T	E	T
H	T	E	T	E	T	E
I	E	T	E	T	E	T

Essai 2 : reproductibilité au bout de 8 jours en intralaboratoire (amorces A3-A4 et A5A6)

6 lots positifs (soit 30 pools) appartenant à la zone du laboratoire sont repassés une semaine après analyse.

Essai 3 : répétabilité sur des lots de terrain intralaboratoire (amorces A3-A4 et A5-A6) et reproductibilité intralaboratoire à La Tremblade

Les surnageants de 10 pools positifs et 10 pools négatifs de chaque cellule de veille ont été centralisés à la Tremblade pour être aliquotés en 3 (soit 60 tubes) puis les surnageants ont été ré-étiquetés, randomisés et renvoyés aux cellules de veilles participant. Les conditions d'envoi et de stockage depuis la mise sous aliquot jusqu'à l'analyse ont été standardisées (essai randomisé, synchronisé et en aveugle, 2 manips identiques: 15 tubes et leur répliat, 3 témoins d'eau, 2 témoins positifs, 0 pools ont donc été testés pour cet essai).

Essais 4 et 5 : reproductibilité entre cellules (Amorces A3-A4, A5-A6), comparaison avec OHV3 et OHV4.

Comme précédemment on passait 30 tubes issus des 60 sans répiats, avec toujours les témoins eau et virus, en nested PCR pour A3-A4 A5-A6 et en simple PCR pour OHV3-OHV4.

4.2. Résultats

Essai 1 : test des appareils, répétabilité, témoin 2500 copies.

Palavas : Un tube d'eau positif sur 108 tubes.

La Trinité : une erreur de manip sur un tube sur 108.

La Tremblade : après 4 essais infructueux en Juillet (Anne et Bruno); manip refaite par Bruno en Novembre : 4 tubes d'eau positifs sur 108.

Taux de répétabilité supérieur à 96% +/- 3,6% au niveau des pools.

Essai 2 : reproductibilité au bout de 8 jours en intralaboratoire (amorces A3-A4 et A5A6)

Palavas : 16 pools repassés avec un délai de 15 jours maximum. 2 pools positifs deviennent négatifs et deux pools négatifs deviennent positifs.

La Trinité : 7 lots soit 42 pools repassés avec un délai de 8 jours.

La Tremblade : abandonné car trop de difficultés en Juillet et pas assez de pools positifs.

1/2	POSITIFS	NEGATIFS
POSITIFS	6	4
NEGATIFS	4	28

Test : comparaison de séries appariées petits échantillons avec X2 corrigé de Yates:

$\frac{((a-b)-1)^2}{a+b}$ et forcément $X^2=0$ à comparer à 3,84 (ddl=1) donc **non significatif**.

19% de résultats discordants. On trouve une concordance **kappa=0,47**, erreur standard de la concordance aléatoire $sk_0=0,2$. (SAS.version 6.11)

Essai 3 : répétabilité sur des lots de terrain intralaboratoire (amorces A3-A4 et A5-A6) et reproductibilité intralaboratoire à La Tremblade

Pour Pichot, Thébault et Hirata, les résultats peuvent s'exprimer sous le tableau ci-dessous, 0 pour résultats négatifs, 1 pour résultat positif, en colonnes résultats du premier répliat et en ligne du second.

	0	1
0	17	0
1	1	12

On observe 1 résultat/30 non répétable, **test corrigé de Yates non significatif**, concordance **kappa 0,93** et $sk_0=0,184$.

Pour B.Chollet

	0	1
0	20	1
1	3	6

4/30 non répétable ; test corrigé de Yates non significatif, concordance kappa **0,67** et **sk0=0,22**. La différence avec les autres n'est pas significative.

Reproductibilité intralaboratoire à La Tremblade

5 résultats discordants /30 ; X2 non significatif et concordance de **0,63**.

Essais 4 et 5 : reproductibilité entre cellules (Amorces A3-A4, A5-A6), comparaison avec OHV3 et OHV4.

problèmes de contamination pour la Trinité (un témoin eau et un seul positif...). Manip refaite.

Essai La Tremblade-La Trinité :

✓ A3A4A5A6 :

en colonnes La Trinité et en lignes pour La Tremblade

9 résultats discordants/60. X2 corrigé non significatif. Concordance **kappa=0,67** et **sk0=0,14**.

	0	1
0	35	7
1	2	16

(en colonnes résultats Trinité en lignes Tremblade.)

✓ OHV3-OHV4 :

	0	1
0	40	1
1	5	14

(en colonnes résultats Trinité en lignes Tremblade.)

6 résultats discordants/60. X2 corrigé non significatif. Concordance **kappa=0,76** et **sk0=0,155**.

Essai La Tremblade-Palavas :

✓ A3A4-A5A6

En colonnes Palavas et en ligne La Tremblade

	0	1
0	31	11
1	4	14

15 résultats discordants/60. X2 non corrigé non significatif(3,3). Concordance **kappa=0,48** et **sko=0,46**.

✓OHV3OHV4 :

	0	1
0	41	0
1	9	10

9 résultats discordants /60. **X2 corrigé significatif** : Palavas répond davantage négativement ; problème de réactifs ? Concordance **kappa=0,65** et **sk0=0,1655**.

Essai La Trinité-Palavas

✓A3A4-A5A6 :

en colonnes Palavas en lignes La Trinité

	0	1
0	31	6
1	4	19

10 résultats discordants/60. **X2 corrigé non significatif**. Concordance **kappa=0,65** et **sk0=0,123**.

✓OHV3-OHV4

	0	1
0	44	1
1	6	9

7 résultats discordants /60. **X2 corrigé non significatif (2,3)**. Concordance **kappa=0,67+/-0,18**.

Une autre comparaison sur les 31 derniers donne des résultats comparables .

On trouve une concordance moyenne de 0,6 pour la nested PCR et une concordance moyenne de 0,7 pour la PCR simple.

Comparaison nombre de positifs entre OHV3-OHV4 et A3A4-A5A6 , compatibilité avant/après.

20 lots positifs /60 avec OHV3-OHV4.
30 lots positifs /60 avec A3-A4 et A5-A6.

Pour OHV3-OHV4 :Concordance avant-après kappa =0,35 (20 résultats discordants/60).

Concordance A3-A4 et A5-A6 avant-après :
kappa=0,66 (10 résultats discordants/60)

Entre les 2 types de PCR 18 résultats discordants 14 positifs pour A5-A6 et pas pour OHV.X2 significatif à 5% et concordance 0,42.

Parmi les lots qui ont été trouvés positifs par A5A6 et pas par OHV, 8 venaient de Palavas, 5 de La Trinité et 1 de La Tremblade. Parmi ceux qui ont changé de statut : sur 10 lots, 6 venaient de Palavas, 3 de La Trinité et un de La Tremblade. Ce n'est pas significatif.

4.3 Discussion

Classification des kappa (GRENIER 1989) :

- 1 à 0,8 excellent
- 0,8 à 0,6 bonne
- 0,6 à 0,4 moyenne
- 0,4 à 0,2 faible
- en dessous mauvais

La répétabilité et le fonctionnement des appareils semblent corrects, lorsqu'on travaille avec un témoin dilué à 2500 copies (essai 1).

Par contre la reproductibilité au cours du temps, mesurée à La Trinité sur des surnageants issus d'infection naturelle est moyenne (essai 2). Plusieurs facteurs sont à prendre en compte ; les facteurs inhibiteurs de réaction de PCR ne sont pas quantitativement voire qualitativement les mêmes sur le témoin 2500 copies issus de matériel génomique purifié et sur les surnageants. Les conditions de stockage et les réactifs n'ont pas forcément la même qualité d'une fois sur l'autre, de même que les manipulations d'ailleurs.

L'essai de reproductibilité au bout des 8 jours (essai 2) sera abandonné car sa réalisation dépendait trop de la disponibilité du matériel biologique et devait se réaliser au moment du pic des analyses.

La répétabilité sur des lots de terrain est très bonne (kappa 0,67-0,93) ce qui est rassurant (essai 3). C'est à dire qu'à des réactifs, du matériel, des manipulateurs et un temps donné le résultat est répétable. Il faut noter que la reproductibilité entre manipulateurs est un peu moins bonne (0,63) ce qui nous amène à réfléchir sur une meilleure standardisation du protocole, entre deux manipulateurs d'un même site, même s'il existe d'autres sources de variabilité (telles : réactifs et réactions différentes) et si dans ce cas se surajoutent les manques de répétabilité propres à chaque manipulateur.

La reproductibilité en termes de concordance entre cellules (essai 4) avec la nested PCR est de 0,6 en moyenne, ce qui peut être considéré comme bon. D'autant plus que les différences ne sont pas orientées. Il faut tenir compte de la différence de pipetman entre La Tremblade et les autres cellules ce qui implique vraisemblablement une différence de volume pipeté.

La reproductibilité est meilleure avec les amorces OHV (essai 5) en simple PCR; ce qui est logique, car le protocole est alors plus simple et plus rapide, standardisé au niveau des pipetman.

Par contre il n'a pas été possible de démontrer que ces amorces détectaient mieux, mais plutôt différemment que la nested PCR le virus de type herpès. Mais il faut tenir compte d'une erreur du protocole des amorces OHV utilisées au cours de ces essais : le protocole optimisé pour les amorces OHV3-OHV4 comporte une dilution au demi supplémentaire au moment de la préparation des échantillons. Les différences de résultats entre les deux techniques en fonction des amorces de PCR peuvent aussi venir de différences génomiques (d'où l'intérêt qu'il y aurait d'explorer la variabilité génétique des virus de type herpès que l'on peut trouver sur le littoral français). Il faut noter qu'entre La Tremblade et Palavas les différences sont orientées et que peut être un problème de réactif en est la cause. Il sera de toute façon justifié de recommencer cet essai comparatif l'année prochaine.

Par rapport aux résultats obtenus au cours de l'été, il faut souligner une concordance relativement satisfaisante : 10 résultats seulement sur 60 ne sont pas retrouvés, ce qui n'est pas très étonnant vu les difficultés rappelées plus haut.

Ces résultats sont à considérer avec certaines précautions, s'il n'y a pas de différences majeures entre laboratoires, la mesure de la concordance dépend du taux de prévalence de l'échantillon ; l'échantillon, d'une part n'est pas représentatif d'une prévalence moyenne (qui est aujourd'hui inconnue). D'autre part, l'échantillon a été choisi en fonction des amorces de la nested PCR en fixant vraisemblablement un niveau de prévalence plus élevé que celui observé en routine.

Il aurait aussi fallu travailler à l'échelle des lots et non des pools, mais alors les essais auraient été trop lourds à mettre en place.

Le fait d'utiliser des surnageants de pools venant des laboratoires d'analyses eux-mêmes et non fournis par le laboratoire de référence a offert plusieurs avantages. D'une part on a pu tenir compte de la diversité d'origine des lots et avoir une meilleure représentation de la diversité des pools et peut être de leur préparation, d'accroître la motivation des participants, et a permis un contrôle par échantillonnage des résultats obtenus au cours de l'été par ces mêmes laboratoires.

L'essai 2 serait avantageusement remplacé par un essai prenant en compte la préparation des échantillons.

Les essais ont aussi révélé toutes sortes de difficultés : des problèmes de réactifs, de pipetage, de contamination, de manipulation.

Trois surnageants issus de larves infectées naturellement ont été inclus dans l'essai : les résultats n'ont pas été différents que pour le naissain, mais peut être faudra-t-il confirmer cela par des effectifs plus équilibrés.

Il faut aussi souligner l'intérêt que pourrait avoir un témoin interne qui nous aurait permis de détecter un problème réactionnel et de détecter des faux négatifs.

Cela n'empêche pas l'intérêt de disposer d'un témoin génomique, qui se rapproche davantage de l'ADN recherché. Les travaux de T. Renault sur ce sujet nous permettront de disposer de ce type d'outil (témoin interne) au cours de l'année 1998.

Pour les contaminations, des méthodes sont disponibles comme celles utilisant l'Uracyl DNA Glycosylase.

Ces essais nous ont aussi obligés à centraliser et à conserver des surnageants de diverses origines qui pourront servir à des fins de recherche. Ces essais sont apparus lourds pour les participants mais, on le voit, sont nécessaires. Les avantages et les résultats des amorces OHV en simple PCR, comparées à la nested nous conduisent à les adopter en routine, en sachant que le prochain essai pourra encore comparer d'autres amorces avec les OHV.

5. Conclusion et perspectives :

REPAMO continue de voir son volume d'analyse croître régulièrement avec pour cette année encore plus de 20% d'augmentation du nombre d'examens réalisés par rapport à 1996. Cette augmentation souligne en fait deux tendances principales qui sont la diversification progressive des techniques de diagnostic utilisées d'une part, et d'autre part l'attention plus grande portée au suivi de base des cheptels. Ces tendances devraient se confirmer en 1998.

Il apparaît de même qu'un réel effort a été porté pour doter le réseau des outils nécessaires à son bon fonctionnement. La mise en place de la base de données REPAMO dans les trois cellules de veille devrait permettre d'en tester la toute dernière version et d'y apporter les améliorations nécessaires. Elle constitue un outil d'archivage bien sûr mais aussi et surtout d'exploitation d'une masse grossissante de résultats d'examens.

De même, la mise en place d'une liste électronique s'est avérée être une aide considérable à la normalisation des flux d'information montant (des acteurs de terrain vers la coordination) et descendant (de la coordination vers l'ensemble des acteurs). Sa simplicité de fonctionnement devrait permettre une plus grande utilisation de ce mode de transmission en 1998.

L'effort de structuration du réseau s'est aussi traduit au niveau analytique par la mise en place d'un premier réseau d'essai pour le diagnostic en PCR de l'infection par le virus de type herpès. L'intérêt de cette démarche est apparue dès l'analyse des premiers résultats. Il sera nécessaire de reporter cet effort en 1998. Les informations fournies par ce réseau d'essai inter-laboratoires permettent, en amont, d'améliorer les outils de diagnostic et, en aval, de clarifier les idées sur la validité des résultats annoncés. La mise en place de toute nouvelle technique de diagnostic devra passer par une phase de validation et être accompagnée, lors de son transfert aux cellules d'analyse, d'un réseau d'essai inter-laboratoires.

Dans l'ensemble et hormis les cas de la malaigue de Thau et des coques du Croisic notamment, les épisodes de mortalité anormale ont été limités. Les conditions climatiques semblent jouer un rôle important dans ces épisodes en période estivale. Plus de 12 000 analyses n'ont pas mis en évidence de nouvel agent pathogène ou d'agent pathogène exotique.

Un effort particulier devrait être porté sur les stratégies d'échantillonnage pour la recherche des parasites *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*, en 1998. La difficulté de trouver des animaux, les échanges effectifs entre zones, l'état des stocks naturels et d'élevage, ainsi que de nouvelles données biologiques pourront alimenter la réflexion sur ce point, de sorte à établir une procédure de suivi adéquate à la situation actuelle.

Remerciements :

Ce rapport d'activité a été réalisé par Franck Berthe, à partir des rapports annuels des trois cellules de veille zoosanitaire du réseau, préparés par Yves Pichot pour la zone Méditerranée, Bruno Chollet et Anne Thébault pour la zone Atlantique Sud, Grégoire Kuntz et Gilbert Tigé pour la zone Atlantique Nord. Anne Thébault a rédigé la partie relative au réseau d'essai. Les données de Pierre-Gildas Fleury, Toshio Hirata, Yvonne Le Coguc, Tristan Renault et Cécile Lipart disponibles sous forme de rapport interne ou note d'information ont également été utilisées. Les informations et données transmises par Henri Grizel, Jean-Pierre Joly, Joseph Mazurié, Jean-Pierre Baud, Philippe Gouletquer, Jean-Pierre Dreno, Dominique Buestel, et par les laboratoires côtiers RA et DEL, ont été utiles à la réalisation de ce rapport.