

**CONTRAT DE PLAN ETAT REGION POITOU
CHARENTES 1994-1998
CONVENTION 96 RPC R 70**

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

**PROGRAMME PATHOLOGIE
RAPPORT SCIENTIFIQUE ANNEE 1996**

**T. Renault, F. Berthe, B. Chollet, N. Cochenec, P. Haffner, R. M.
Le Deuff, C. Lipart et A. Thebault**



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

**CONTRAT DE PLAN ETAT REGION POITOU
CHARENTES 1994-1998
CONVENTION 96 RPC R 70**

**PROGRAMME PATHOLOGIE
RAPPORT SCIENTIFIQUE ANNEE 1996**

Redacteur : T. RENAULT

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

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION

II - OBJECTIFS ET PROGRAMME

III - RECHERCHE D'AGENTS PATHOGENES CHEZ LES BIVALVES

IV - ETUDE DU VIRUS DE TYPE HERPES OBSERVE CHEZ LES HUITRES

A/ MISE AU POINT D'OUTILS DE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION VIRALE

B/ UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PCR POUR RECHERCHER L'ADN VIRAL DANS DES ECHANTILLONS D'HUITRE

C/ ESSAIS DE REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE L'INFECTION VIRALE

I - INTRODUCTION

Le but de ce programme pathologie est de rechercher et d'étudier les agents pathogènes connus et inconnus chez les mollusques bivalves marins, plus particulièrement chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, afin d'identifier d'éventuels agents causant des mortalités, de proposer des mesures prophylactiques et de définir des conditions zootechniques permettant aux professionnels de limiter l'impact des maladies sur leur cheptel.

La présence de maladies, chez les mollusques bivalves marins dont l'impact socio-économique peut être catastrophique pour les productions conchylicoles, et l'accroissement des échanges de produits d'aquaculture entre les pays de la CEE et avec les pays tiers nécessitent le renforcement des recherches dans les domaines de la pathologie. En particulier, du fait du monoélevage de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, en France, il est aujourd'hui indispensable d'effectuer des contrôles zoosanitaires réguliers chez cette espèce.

Ces travaux ont d'autant plus d'importance qu'aujourd'hui, devant les pathologies rencontrées, les professionnels restent extrêmement démunis (traitements inapplicables ou inexistants). Dans ce cadre, la promptitude du diagnostic ainsi que l'acquisition de données épidémiologiques et biologiques concernant les agents pathogènes impliqués sont les meilleurs moyens d'éviter leur dissémination chez les mollusques bivalves marins.

Les travaux entrepris dans ce cadre par le Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie de La Tremblade, semblent d'autant plus indispensables qu'il n'existait pas jusqu'à ces dernières années de pathologies identifiées chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur le littoral français.

Cependant depuis 1991, sont apparus dans certaines écloséries françaises des épisodes de mortalité sur des larves de cette espèce. Il a été possible de détecter un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae* par ses caractères morphologiques (NICOLAS *et al.*, 1992) et de démontrer sa pathogénicité pour les larves (LE DEUFF *et al.*, 1994). Par ailleurs, chaque année depuis 1993, un virus de même type, a été observé en association à de fortes mortalités sur certains lots de naissain de la même espèce, originaires d'écloséries et de captage naturel.

II - OBJECTIFS ET PROGRAMME

Objectifs

Les principaux objectifs de ce programme, visent essentiellement à développer des travaux chez les mollusques bivalves marins dans les domaines de la pathologie : diagnostic, pathologie expérimentale et épidémiologie.

Programme

Pour tenter de répondre à ces objectifs, trois actions de recherche ont été proposées

- *Action 1 :*

- Recherche et purification d'agents pathogènes chez les bivalves.
- Essais de reproduction expérimentale de maladies au laboratoire.

- *Action 2 :*

- Tests de conditions stressantes et contrôle sur l'expression et/ou le développement de maladies au laboratoire.

- *Action 3 :*

- Essais de traitements (pathologies bactériennes en milieu confiné : écloséries-nurseries).

III - RECHERCHE D'AGENTS PATHOGENES CHEZ LES BIVALVES

Contrôles avant importation

118 animaux originaires de divers pays ont fait l'objet d'une analyse en microscopie photonique. Ces analyses ont concernées cinq espèces différentes : 30 *Crassostrea rizophorea* (Nouvelle Calédonie), 25 *Ostrea edulis* (Danemark), 28 *Crassostrea gasar* (Sénégal), 32 *Saccostrea commercialis* (Australie) et 15 *Crassostrea rivularis* (USA). Les analyses effectuées n'ont pas permis de mettre en évidence d'agents pathogènes particuliers.

Ces animaux ont été contrôlés avant introduction d'huîtres vivantes en salle de quarantaine du laboratoire IFREMER de La Tremblade, dans le cadre d'un programme de recherche pour le développement d'un conservatoire de souches appartenant au genre *Crassostrea*.

IV - ETUDE DU VIRUS DE TYPE HERPES OBSERVE CHEZ LES HUITRES

A/ MISE AU POINT D'OUTILS DE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION VIRALE

Mise au point d'un protocole de détection de l'ADN viral par PCR

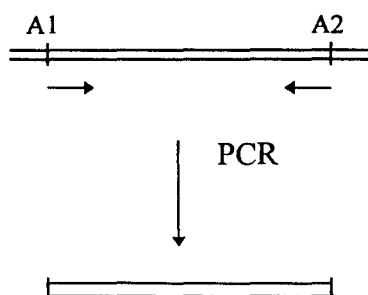
Obtention d'ADN viral cloné

La purification des particules virales à partir de larves de *Crassostrea gigas* infectées à la fin de l'été 1995 a permis d'extraire l'ADN viral. Cet ADN, dont la taille a été estimée à 180 kpb (ou 0,2 fg ou $1,2 \cdot 10^8$ Da), a été cloné dans un plasmide, sous forme de fragments (fragments de restriction *EcoRI*) de 1 à 4 kpb. Les fragments clonés d'ADN viral peuvent être produits à volonté dans des bactéries transformées, c'est à dire dans lesquelles les plasmides recombinants ont été introduits et peuvent se multiplier.

Séquençage et détermination de couples d'amorces pour la PCR

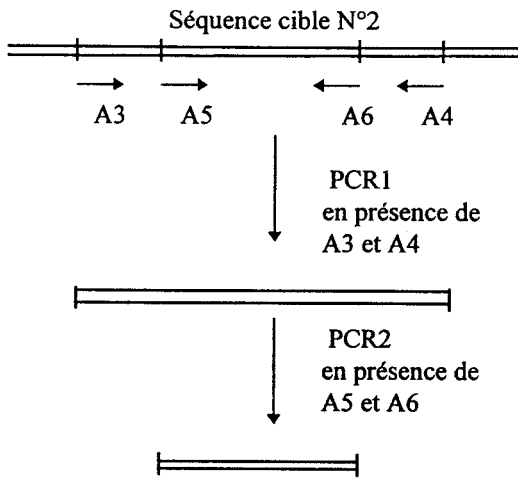
Parmi les fragments clonés d'ADN viral, certains ont été séquencés partiellement. Des séquences cibles pour l'amplification par PCR ont été choisies dans ces séquences d'ADN viral, puis plusieurs couples d'amorces (A1+A2 ; A3+A4 ; A5+A6) ont été déterminés en fonction de ces séquences cibles (C. Delsert, IFREMER Sète).

Séquence cible N°1



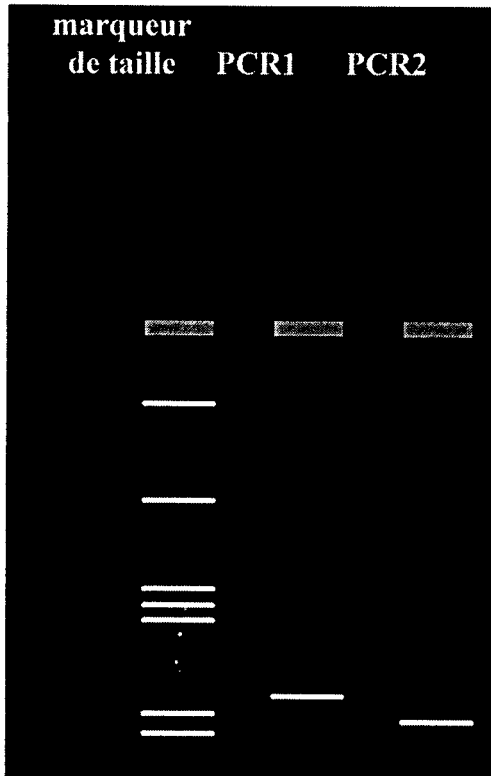
Le premier couple (A1+A2) testé n'a pas été retenu, car la sensibilité de l'amplification ne s'est pas avérée suffisante. De plus, du fait de leurs séquences, la spécificité de ces amorces n'était pas satisfaisante. En effet, si un fragment spécifique était amplifié à partir d'ADN viral, de façon intense, plusieurs autres fragments d'intensité plus faible et de taille

différente étaient amplifiés à partir d'ADN de *Crassostrea gigas*.



Les deux autres couples d'amorces (A3+A4 et A5+A6) permettent l'amplification de séquences cibles de l'ADN viral de façon spécifique. Un seul fragment est amplifié pour chacun de ces couples d'amorces en présence d'ADN viral. Aucune amplification non spécifique n'est visible à partir d'ADN de *Crassostrea gigas* ou d'*Ostrea edulis*.

Ces couples d'amorces sont utilisés dans une réaction de nested PCR. Celle-ci consiste à réaliser une première amplification par PCR en présence du couple d'amorces A3+A4. Puis, 1µl des produits de cette première PCR est utilisé pour réaliser une deuxième amplification en présence du couple d'amorce A5+A6. La méthode de nested PCR permet ainsi d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection du virus dans des échantillons.



Les produits de PCR sont visualisés après électrophorèse en gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium.

Traitement des échantillons et réaction de PCR

Différents essais ont conduit, dans un premier temps, au protocole initial indiqué ci-dessous. Ce protocole permettait de détecter 5×10^6 copies de génome viral dans des échantillons de naissain. Il a fait ensuite l'objet d'améliorations afin d'abaisser le seuil de détectabilité de l'ADN viral.

Traitement des échantillons de larves

50 mg de larves sont pesés en portant des gants et à l'aide d'une pipette Pasteur neuve. Les larves sont ensuite broyées en présence de 50 μ l d'eau bidistillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique. Ce broyat est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000 rpm, 5 mn) et congelé à -20 °C.

Traitement des échantillons de naissain (animaux de moins de 3 mm)

Les animaux de moins de 3 mm peuvent difficilement être ouverts, ils sont donc broyés avec la coquille de la façon suivante. Les animaux (30 individus) sont séchés sur du papier absorbant, puis ils sont réunis par pools de 5 (6 pools) dans des tubes Eppendorf. Dans le même temps, ils sont pesés (X g).

Ces animaux sont broyés en présence de X ml d'eau bidistillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique. Le broyat obtenu est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000 rpm, 5 mn) et congelé à -20 °C.

Traitement des échantillons de naissain (animaux de plus de 3 mm)

Un échantillon de 30 animaux est analysé, quelle que soit leur taille. Ces animaux sont traités par pools de 5. Le traitement de ces pools et, en particulier, le broyage en eau bidistillée tient compte du poids de chair obtenu (0,5 ml pour 0,5 g de tissus ou X ml pour X g de tissus) de façon à "standardiser" le protocole.

30 animaux sont ouverts à l'aide d'un couteau à huître, au préalable longuement lavé, ou d'une lame de scalpel neuve. Les huîtres sont séchées sur du papier absorbant, puis elles sont réunies par pools de 5 (6 pools) dans des boîtes de Pétri. Les tissus sont dilacérés très finement à l'aide de lames de rasoir, puis conservés sur glace. Les lames ainsi que les gants sont changés entre chaque pool. 0,5 g (ou X g si les animaux sont petits) de tissus dilacérés sont pesés à l'aide d'une pipette Pasteur neuve. Ces tissus sont broyés en présence de 0,5 ml (ou X ml) d'eau distillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique. Le broyat obtenu est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000 rpm, 5 mn) et congelé à -20 °C.

Réaction de PCR

Un certain nombre de précautions doivent être prises. Globalement, ces précautions concernent l'utilisation d'un matériel adapté (gants, matériel jetable, cônes à filtres, etc...) et d'équipements réservés à l'usage exclusif de la PCR (pipettes, paillasse, ...).

De plus, il faut souligner l'importance de séparer les différentes étapes de l'analyse d'échantillons par PCR dans différentes pièces, de façon à limiter les contaminations entre différents lots ou la contamination des réactifs et du matériel. Ainsi, trois pièces sont nécessaires :

- une pièce réservée à la préparation des échantillons,
- une autre réservée à la préparation des réactifs,
- une troisième pour la mise en oeuvre de la réaction et la manipulation des produits de réaction.

Des témoins négatifs (eau bidistillée) sont réalisés : un témoin entre chaque lot de naissain ou tous les 10 lots de larves, plus le premier et l'avant dernier tube de la série. Un autre témoin négatif est réalisé (un tube), il contient de l'ADN extrait d'huîtres saines, *C. gigas* ou *O. edulis*. Un témoin positif correspondant à 5.10^7 copies de génome viral, est réalisé, c'est le dernier tube.

1 μ l du surnageant de chaque broyat ou des témoins est utilisé pour réaliser la réaction de PCR1, en présence des amorces A3 et A4.

Le résultat de la réaction de PCR1 est analysé par électrophorèse en gel d'agarose :

* Si une bande intense est visualisée sur gel, les produits de la réaction de PCR1 doivent être dilués au $1/50^e$ pour ne pas inhiber la réaction de PCR2.

* Si la bande amplifiée est faible ou non visible, les produits de la réaction de PCR1 ne sont pas dilués.

1 μ l des produits de la réaction de PCR1, dilués ou non, est utilisé pour réaliser la réaction de PCR2.

Le résultat de la réaction de PCR2 est analysé par électrophorèse en gel d'agarose :

* Témoins : les témoins négatifs doivent être négatifs (contrôle de l'absence de contaminations), les témoins positifs doivent être positifs (contrôle de la qualité de la réaction). Ceci est contrôlé en PCR1 et en PCR2.

Si ces deux critères ne sont pas remplis, les analyses ne peuvent et ne doivent pas être interprétées.

* Echantillons : si une bande intense ou faible est visualisée sur gel, le résultat est positif. C'est à dire, l'ADN viral est présent dans l'échantillon analysé.

Si aucune bande n'est visible, le résultat est négatif. Dans ce cas, rien ne permet d'affirmer que l'ADN viral est absent de l'échantillon. Il peut en effet être présent, mais en quantité trop faible pour être détectée.

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 détectabilité de l'ADN viral.

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'abaisser le seuil de détectabilité de la méthode, mais surtout sa 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).

L'ensemble des points étudiés (préparation du broyat, quantité de produits 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 détection de l'ADN du virus de type herpès observé chez les huîtres) permet d'obtenir une nette amélioration de la technique de PCR. L'ensemble des modifications apportées au protocole de PCR est donné dans la Figure 5. Le protocole amélioré complet est donné en annexe.

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 détection.

Améliorations apportées au protocole de PCR

BROYAT : X g d'échantillon / X ml d'eau distillée
dilution au 1/10^è du surnageant de broyat
congélation à -80 °C

PCR1 : * Mix de PCR :

H ₂ O	31.6 µl
Tampon 10x	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTPs	5 µl
Amorce 3	1 µl
Amorce 4	1 µl
Taq polymérase	0.4 µl **

Soit : 49 µl de mix par tube réactionnel

* Témoin interne 2500 copies de génomes viraux

* 1 µl d'échantillon

* 35 cycles de PCR dans le thermocycleur Crocodile III

PCR2 : * Mix de PCR :

H ₂ O	32.6 µl
Tampon 10x	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTPs	5 µl
Amorce 5	1 µl
Amorce 6	1 µl
Taq polymérase	0.4 µl **

Soit : 50 µl de mix par tube réactionnel

* 0.1 µl de produit de PCR1

* 35 cycles de PCR dans le thermocycleur Crocodile III

** : 0.4 µl de Taq polymérase correspond en fait à 2 unités d'enzyme et non pas à 2,5 (souci d'économie)

B/ UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PCR POUR RECHERCHER L'ADN VIRAL DANS DES ECHANTILLONS D'HUITRE

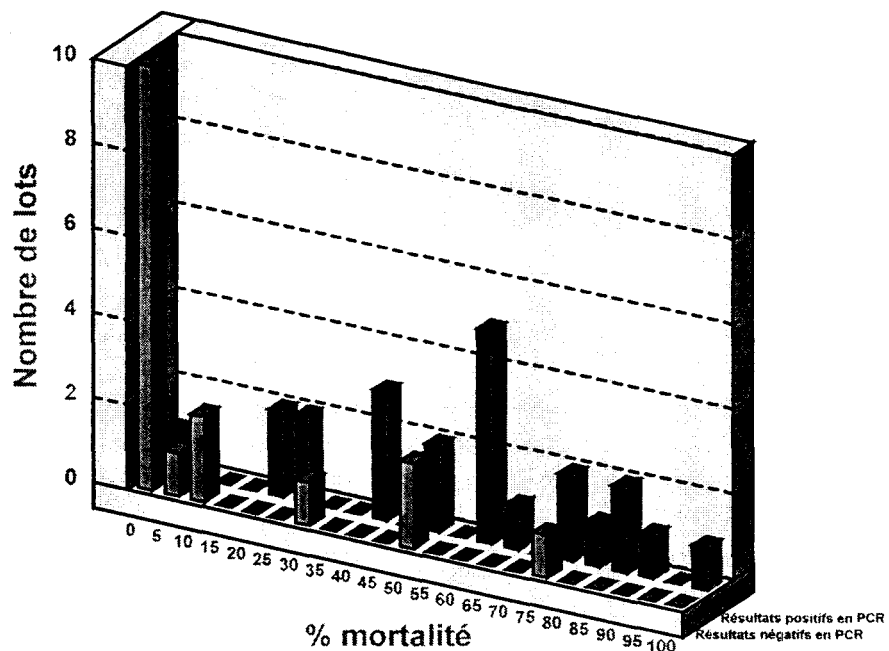
Analyses réalisées dans le cadre de la Cellule de Veille Zoosanitaire de La Tremblade

Des analyses ont été 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 IFREMER de La Tremblade. Ces analyses concernent les mortalités observées sur les secteurs de Marennes-Oléron et de la Baie de Bourgneuf (57 lots).

Les résultats obtenus tendent à confirmer la corrélation entre mortalité et détection possible d'ADN viral par PCR, pour les lots de naissain (cf. figures jointes). 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 proposée (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.

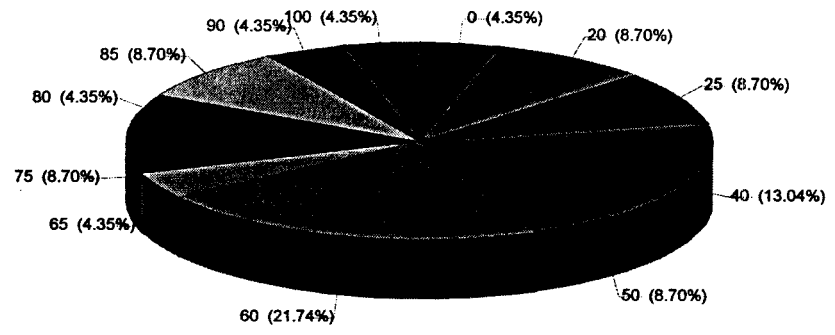
Pour les mortalités observées sur animaux adultes (banc de Ronce les Bains), il n'a pas été possible de détecter le virus par PCR.

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



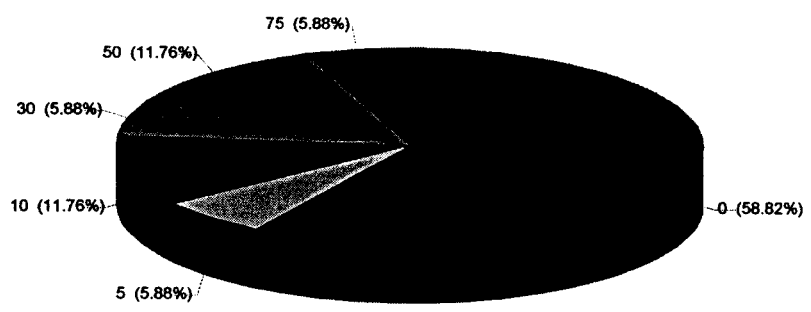
Analyses en PCR de lots de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Résultats positifs en PCR



% de lots analysés en fonction des taux de mortalité

Résultats négatifs en 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. 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.

	Résultats positifs en PCR2	Résultats négatifs en PCR2	Total
Nombre de lots présentant moins de 5% de mortalité	1 - [8,3%] (6,9)	11 - [91,7%] (5,1)	12
Nombre de lots présentant plus de 5% de mortalité	22 - [78,6%] (16,1)	6 - [21,4%] (11,9)	28
Total	23	17	40

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

[] : pourcentages en fonction du total de lots par ligne

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).

C/ ESSAIS DE REPRODUCTION DE L'INFECTION VIRALE

Essais de reproduction expérimentale de la maladie chez le 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 infectées vivantes, produites expérimentalement. Le choix du mode de transmission (utilisation de matériel vivant infecté expérimentalement) a été dicté par le fait que le virus étudié (virus enveloppé) doit être dégradé facilement dans le milieu extérieur. Des expériences menées au laboratoire IFREMER de La Tremblade, en 1996, ont montré que l'ADN viral (ultrafiltrat de broyat de larves infectées) n'était plus détectable par PCR, après 48 heures de contact avec de l'eau de mer non stérile. Lorsque l'ultrafiltrat est dilué en eau de mer stérile, il est par contre possible de détecter en PCR l'ADN viral après 13 jours.

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 infectés, 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 infectées, 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 infectées vivantes, produites expérimentalement (cf. figure). 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 infectées 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.

Les mortalités cumulées observées 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. 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 infectées ou saines. Cette valeur est supérieure à 1,96. Les différences observées sont donc significatives.

	Nombre d'animaux morts	Nombre d'animaux vivants	Total
Nombre d'animaux inoculés par des larves infectées	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 infecté et la détection d'ADN viral par la technique de PCR. En effet, la valeur du χ^2 est de 15,67. Cette valeur est supérieure à 10,8 (ddl = 1 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées entre lots inoculés par des larves infectées 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.

	Résultats positifs en PCR2	Résultats négatifs en PCR2	Total
Nombre de naissains inoculés par des larves infectées	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)

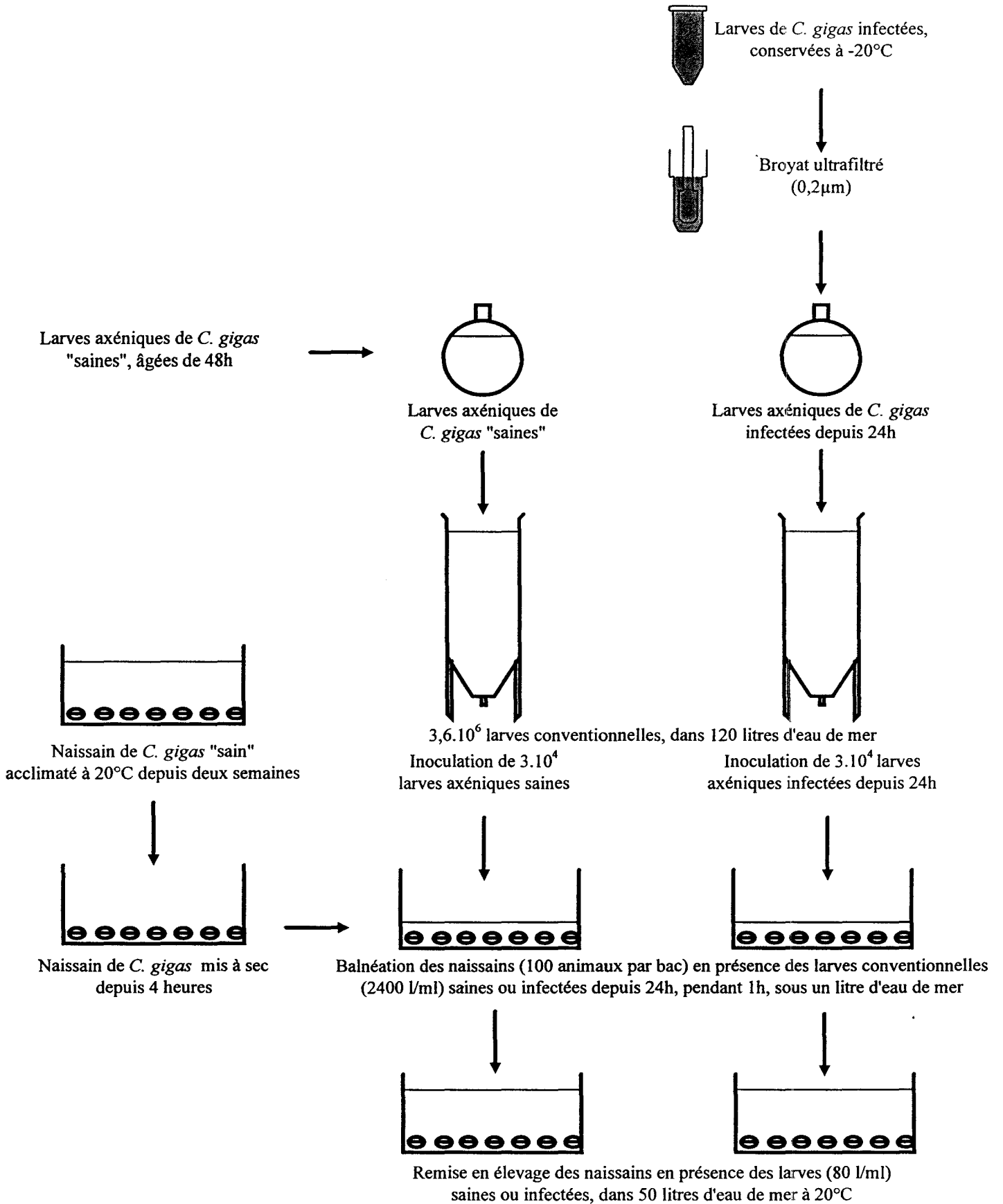
Un deuxième essai de reproduction expérimentale de l'infection a été réalisé sur un lot de naissain provenant d'écloserie. Le même protocole expérimental a été appliqué dans cet essai.

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 "infectées" et de 0 et 3% dans les bacs inoculés par des larves saines. Après contrôle des larves "infectées" 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).

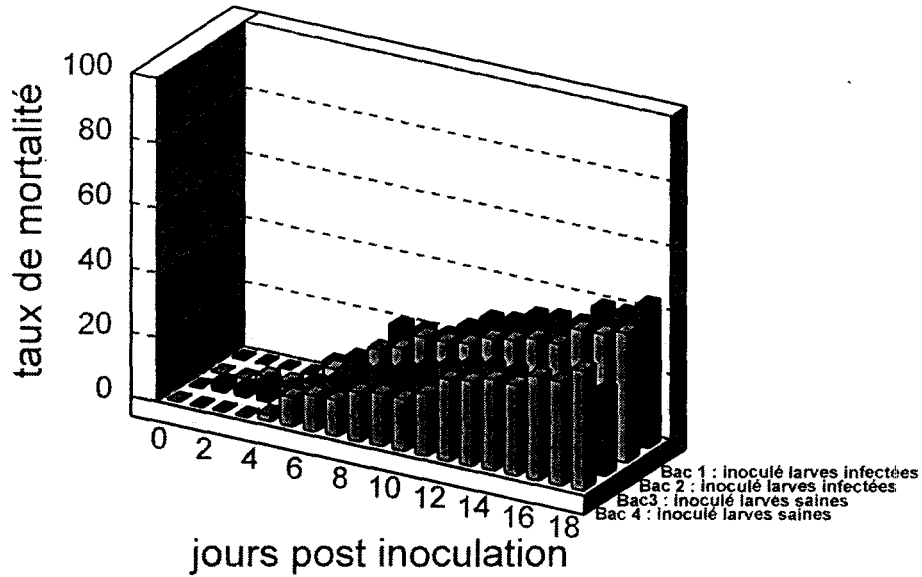
Il apparaît, d'après ces résultats, que l'utilisation de larves infectées vivantes permet de reproduire expérimentalement l'infection au stade naissain. De plus, l'infection de ces animaux est associée à des mortalités significatives. D'autres expériences seront réalisées afin de confirmer ce résultat, en prenant tout particulièrement en compte les conditions zootechniques, afin de limiter les mortalités dues à d'autres facteurs.

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

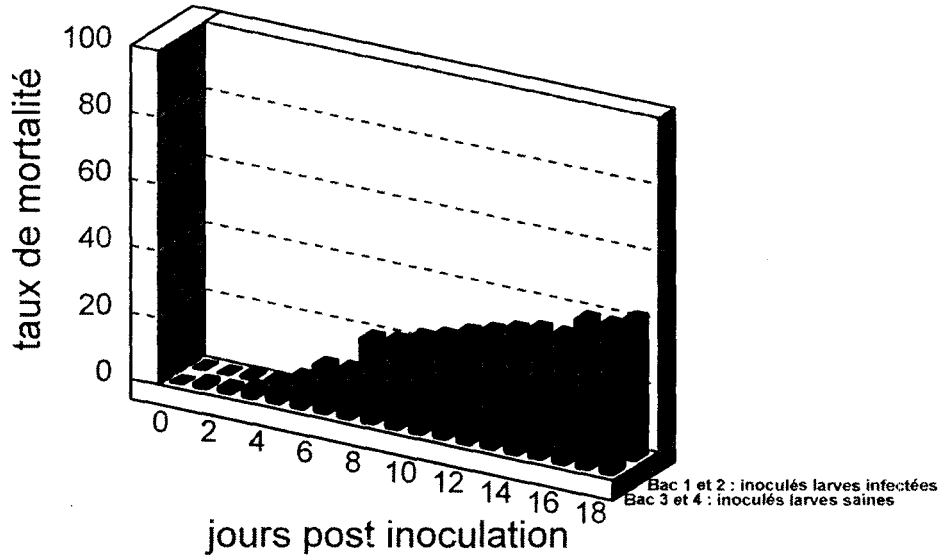


**Essais de reproduction expérimentale du virus de type herpès
chez le naissain de *Crassostrea gigas*.**

**Taux de mortalité cumulée
pour chaque bac expérimental**



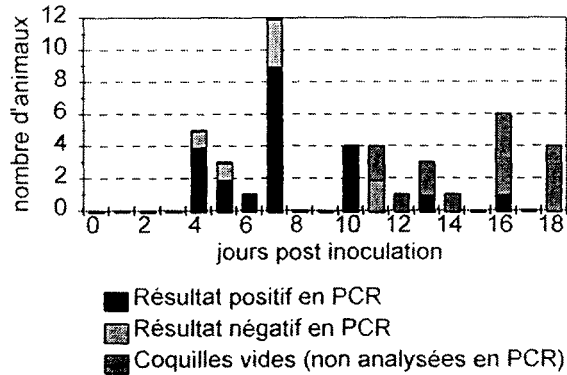
**Moyenne des taux de mortalité
observés sur les bacs en répliquat**



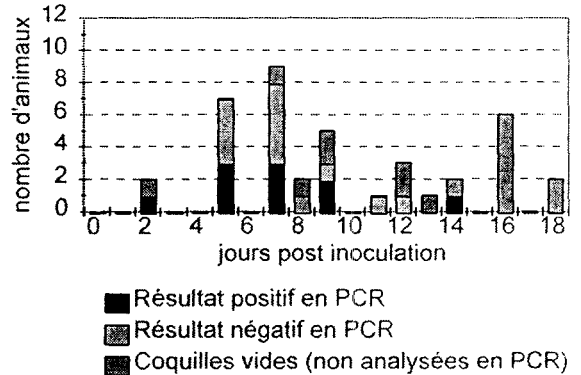
Les taux de mortalité ont été déterminés quotidiennement pour chaque bac et sont représentés dans cette Figure, ainsi que les taux moyens pour les bacs en répliquat.

Essai de reproduction expérimentale du virus de type herpès chez le naissain de *Crassostrea gigas*.

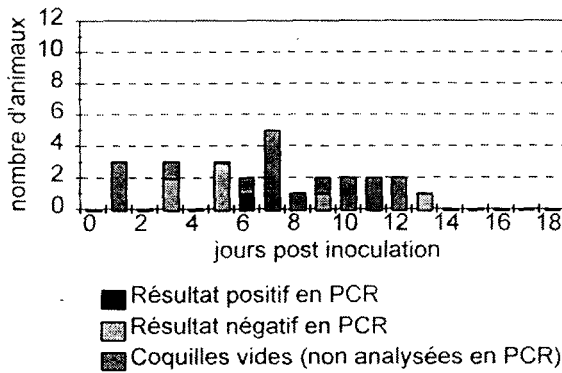
Bac 1 : inoculé larves infectées



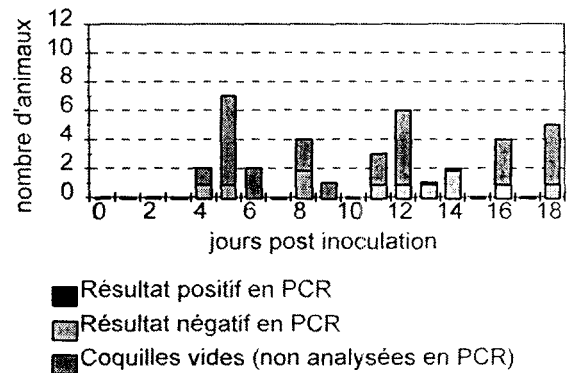
Bac 2 : inoculé larves infectées



Bac 3 : inoculé larves saines



Bac 4 : inoculé larves saines



Les individus morts, prélevés dans les bacs expérimentaux, ont été analysés individuellement en PCR pour la détection du virus.