



HAL
open science

Epidémiologie de la nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) des salmonidés en France : suivi de l'infection naturelle par des techniques virologiques et sérologiques et tentatives d'éradication

A.M. Hattenberger-Baudouy, M. Danton, G. Merle, P. de Kinkelin

► To cite this version:

A.M. Hattenberger-Baudouy, M. Danton, G. Merle, P. de Kinkelin. Epidémiologie de la nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) des salmonidés en France : suivi de l'infection naturelle par des techniques virologiques et sérologiques et tentatives d'éradication. *Veterinary Research*, 1995, 26, pp.256-275. hal-02714643

HAL Id: hal-02714643

<https://hal.inrae.fr/hal-02714643>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Épidémiologie de la nécrose hématoïétique infectieuse (NHI) des salmonidés en France : suivi de l'infection naturelle par des techniques virologiques et sérologiques et tentatives d'éradication

AM Hattenberger-Baudouy ^{1*}, M Danton ¹,
G Merle ¹, P de Kinkelin ²

¹ CNEVA, laboratoire central de recherches vétérinaires, unité d'ichtyopathologie continentale, BP 67, 94703 Maisons-Alfort ;

² INRA, unité de virologie et immunologie moléculaires, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

(Reçu le 12 janvier 1995; accepté le 16 mars 1995)

Résumé — L'apparition en France de la nécrose hématoïétique infectieuse (NHI), rhabdovirose des salmonidés considérée jusqu'en 1987 comme une maladie exotique, a déclenché en France des travaux épidémiologiques fondés sur les diagnostics virologique, sérologique, expérimental ainsi que des mesures d'éradication. Cette étude portait sur 7 sites piscicoles, 1 545 poissons dont 848 sacrifiés et comprenait 262 épreuves diagnostiques virologiques et 1 782 sérologiques. Décélée pour la 1^{re} fois dans la région Picardie, la NHI a été rapidement retrouvée dans 4 autres régions. Dans 6 sur 7 des piscicultures atteintes, elle coexistait avec une autre rhabdovirose, la septicémie hémorragique virale. Seule la truite arc-en-ciel s'est révélée sensible à la NHI au cours de cette enquête et sa mortalité était d'autant plus importante que le poisson était jeune et la température de l'eau voisine de 10–12°C. Le virus, d'isolement facile à partir du rein, de la rate et de l'encéphale en cas de maladie clinique, devenait ensuite indécélable. Il se retrouvait beaucoup plus tard chez les adultes, principalement dans leurs produits sexuels qui le disséminaient. Les animaux survivant à l'infection synthétisaient des anticorps neutralisants (AcN) sériques. La détection de ces AcN chez des poissons suivis après leur infection clinique, comme chez ceux apparemment sains présents sur un site infecté connu ou encore inconnu, témoignait de manière constante de la présence du virus dans le site considéré. Cette détection devrait permettre une surveillance sanitaire anti-NHI. L'éradication de la NHI dans 3 piscicultures par destruction des cheptels et désinfection s'est soldée par une seule réussite après 5 années d'observation. Nos résultats diffèrent des connaissances acquises sur la NHI en Amérique du Nord et en Extrême-Orient sur les points suivants : la double infection rhabdovirale des piscicultures, l'unicité de l'espèce sensible, la température permissive plus basse, la non détection du virus dans le mucus des porteurs asymptomatiques et la possibilité de détection sérologique des cheptels infectés.

nécrose hématoïétique infectieuse / salmonidés / épidémiologie

* Correspondance et tirés à part

Summary — Epidemiology of infectious haematopoietic necrosis (IHN) of salmonid fish in France: study of the course of natural infection by combined use of viral examination and seroneutralization test and eradication attempts. *Infectious haematopoietic necrosis (IHN), a rhabdoviral infection of salmonid fish, was considered to be an exotic disease in Europe until it was recognized in France and Italy in 1987. In France, the existence of this new condition led the authorities in charge of animal health to order epidemiological studies to be undertaken. These studies were based upon virological, serological and experimental diagnostic methods and also encompassed disease eradication attempts. Studies were conducted at 7 fish farming sites, involved 1 545 salmonid fish, of which 848 were sacrificed, and represented 262 virological examinations and 1 782 serum neutralization tests. The presence of the IHN virus was detected in the 7 trout farm fish populations that were located in 5 regions, one of which was situated 600 km from the place where the first isolation of IHN virus was made. Moreover, 6 out of 7 rainbow trout populations reared in these farms also harboured viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) often resulting in overt disease. Rainbow trout was the only salmonid fish species found infected with IHN. Overt infection, which was observed in fish ageing less than 2 200 degrees-days, always occurred at water temperatures below 14° C, and the younger fish were more susceptible (mortality rate \geq 80%). Although the IHN virus is easily isolable from fish undergoing overt infection, it was hardly detectable in survivors until they were adults, at which stage the virus was shedded via sexual products which constituted suitable materials for virological examination and disease transmission assays. Survivors of overt and dormant IHN infection developed consistent immune response and special attention was paid to neutralizing antibodies (NAb) to IHN virus. The detection of such NAb in fish from infected farming sites or other NAb from presumably IHN-free sites, correlated fairly well with the presence and further detection of IHN virus among such fish populations. Our data provide arguments for considering the serological technique as a suitable means of completing fish health surveillance programmes for IHN. Although our results are in agreement with part of the existing knowledge on IHN, they differed in several points: rainbow trout was the only susceptible fish species; overt IHN was always recorded in juveniles and at water temperatures below 14° C; IHN virus could not be recovered from the mucus of infected broodfish; IHN infection usually coexisted with VHS infection in same fish population; and serology was widely and successfully used for the diagnosis of IHN.*

infectious haematopoietic necrosis / salmonid / epidemiology

INTRODUCTION

La nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) (Amend *et al*, 1969) est une maladie virale des salmonidés, due à un rhabdovirus. Elle atteint la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) y compris sous sa variété migratrice steelhead et certaines espèces de saumons du Pacifique : le sockeye (*O nerka*), le chinook (*O tshawytscha*), le chum (*O keta*), le yamame (*O masou*), l'amago (*O rhodurus*), le coho (*O kisutch*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*) (Wolf, 1988). Pour le saumon coho, il semble que le virus se soit adapté récemment tout comme fut démontré la réceptivité à la NHI de la truite fario (*Salmo trutta fario*) et de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) respectivement par La Patra et Fryer (1990) et Bootland *et al* (1994).

La NHI est restée localisée aux côtes américaines et asiatiques du Pacifique Nord jusqu'en 1987, date à laquelle elle est apparue en Europe, en commençant par la France (Office international des épizooties, 1987 ; de Kinkelin *et al*, 1987) et l'Italie (Bovo *et al*, 1987).

La maladie constituant une réelle menace pour les salmonidés, que ce soit en élevage ou dans les conditions naturelles, nous en avons averti les milieux professionnels dès qu'il en fut question (de Kinkelin, 1970) puis lors de son diagnostic en France (Hattenberger-Baudouy et de Kinkelin, 1988 ; Hattenberger-Baudouy *et al*, 1988).

L'infection est en effet fréquemment mortelle du fait de la multiplication virale qui se produit dans la paroi des capillaires sanguins, les tissus lymphoïdes et hémato-

poïétiques et dans les cellules des tubules urinaires. Il en résulte des troubles cliniques, constitués d'oedèmes, d'hémorragies et d'anémie. Chez les sujets résistant plus longtemps à l'infection, on observe une phase nerveuse d'évolution lente (Wolf, 1988).

Par ailleurs, les survivants développent une forte immunité protectrice dont les anticorps (Ac) circulants sont la base et le reflet. En même temps, nombre de ces animaux deviennent des porteurs asymptomatiques de virus que l'on peut détecter alors dans le système nerveux. Plus important pour la transmission est le fait que ces porteurs disséminent le virus dans leurs produits sexuels à l'âge adulte sachant notamment que le virus peut être transmis aussi, selon certains auteurs, à l'intérieur de l'œuf, même si cela est peu fréquent et controversé (Mulcahy et Pascho, 1984).

Ainsi dans la NHI comme dans la plupart des viroses, le virus est facile à mettre en évidence quand les poissons extériorisent les signes cliniques de la maladie, alors que le portage asymptomatique ne conduit que rarement à l'isolement du virus, en dehors des recherches effectuées sur les produits sexuels de poissons en période de reproduction.

Compte tenu du fait que la vaccination n'apparaît efficace qu'à titre expérimental (Leong et Fryer, 1993), la seule possibilité de lutte actuelle contre la NHI est une prévention fondée sur des mesures de police et de prophylaxie sanitaires. Il s'agit globalement de reconnaître les cheptels infectés et les cheptels indemnes et d'éviter la contamination de ces derniers, d'une part, en réglementant les transferts d'animaux et, de l'autre, en assainissant les zones infectées par l'abattage des cheptels atteints. Ces opérations reposent donc sur la maîtrise de moyens diagnostiques spécifiques (Winton, 1991).

De ce point de vue, la seule méthodologie de lutte antivirale admise dans le monde, et tout spécialement encore dans le cadre

européen, repose sur le diagnostic direct (CEE 1991, 1992, 1993), soit par l'isolement du virus en culture cellulaire, suivi de son identification immunologique (par immunofluorescence, ELISA, co-agglutination, neutralisation), soit par la mise en évidence des antigènes viraux dans le matériel infecté à l'aide des techniques immunologiques précédentes. L'emploi de sondes nucléiques et de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) dans le diagnostic n'est pas encore entré dans la pratique courante (Winton, 1991).

Du fait de la législation française (décret du 3 septembre 1985, arrêtés des 16 mars, 25 mars et 9 novembre 1987), la NHI est définie comme maladie réputée contagieuse sous 2 conditions : l'existence de signes cliniques et la positivité du diagnostic virologique. Or, comme nous l'avons annoncé plus haut, le virus n'est aisément accessible à l'isolement que pendant la phase clinique ou au moment de la reproduction, ce qui laisse subsister le danger de la non-détection des porteurs asymptomatiques en dehors de ces périodes.

Telle était la situation quand, après que la NHI eut été détectée sur des alevins de truites arc-en-ciel, au printemps et en eau froide, il nous fut demandé de procéder à une enquête virologique pour circonscrire l'étendue de l'infection alors que les conditions thermiques devenaient estivales et que les alevinages étaient terminés dans la région.

Un travail expérimental antérieur (Amend et Smith, 1974), et des observations préliminaires de terrain effectuées sur les 2 premiers sites infectés nous montraient l'existence d'une neutralisation spécifique du virus par les sérums des poissons survivants (Hattenberger *et al*, 1989). C'est pourquoi nous avons décidé d'adjoindre l'examen sérologique aux techniques diagnostiques classiquement admises et de faire un premier pas vers sa validation en même temps que se déroulait notre enquête épidémiologique.

Nous présentons ici les résultats épidémiologiques d'un travail de terrain fondé sur des examens cliniques, virologiques et sérologiques réalisés pendant 3 ans sur des cheptels de salmonidés de bassins contaminés, pendant et hors épizootie. Il en découle une analyse du déroulement de l'infection dans les élevages et leurs cours d'eau, une première compréhension des circuits de contamination et enfin la possibilité de proposer la sérologie du poisson comme alternative future au seul diagnostic virologique dans le contrôle sanitaire des cheptels piscicoles.



Fig 1. Carte de France localisant les sites étudiés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Zones d'études

Sept systèmes piscicoles codés O, A, B1, B2, C, D et E et leurs secteurs de rivière amont et aval respectifs ont fait l'objet de la présente étude conduite entre 1987 et 1990 dans 5 régions géographiques et administratives françaises différentes : Nord (A), Basse-Normandie (B), Picardie (O, C), Rhône-Alpes (D) et Franche-Comté (E) (fig 1). Les renseignements sur les sites concernés sont regroupés dans le tableau I.

Les piscicultures hébergeaient des sujets de toutes les classes d'âge, appartenant principalement à l'espèce arc-en-ciel encore qu'en O, A et B1, il y eut présence, contemporanément à la maladie clinique, de truites fario et d'ombles de fontaine apparemment normaux. Les animaux produits dans les élevages étudiés étaient destinés dans tous les cas à la consommation humaine et au repeuplement des cours et plans d'eau. Dans les secteurs amont et (ou) aval des sites A et C, se trouvaient, en faible densité, les 3 espèces précédentes et en aval du site O, seulement des truites fario.

Observations cliniques et anamnèse

L'existence chez les poissons de troubles comportementaux (inappétence, asthénie, déséquilibres statiques et locomoteurs) et de lésions

macroscopiques (exophtalmie, anémie, mélanose, hémorragies sous-cutanées et/ou musculaires) a été relevée à chaque visite d'exploitation, au moment de la première intervention diagnostique (tableau II). En même temps, des renseignements sur l'origine des œufs et les mouvements de poissons entre les élevages concernés ont été collectés et retenus chaque fois qu'ils pouvaient être établis avec certitude (tableau I).

Échantillonnage et prélèvements (tableau II)

Dans chaque exploitation cliniquement atteinte au moment de notre première visite, des échantillons de 10 à 200 poissons malades ont été collectés pour donner lieu à des prélèvements destinés d'une part aux examens virologiques (rein, rate, cerveau) et d'autre part aux examens sérologiques (sang ou plasma). Dans les sites A et C, ces prélèvements ont été répétés à différents intervalles de temps après la phase d'infection clinique, dans les lots d'animaux survivants.

Parallèlement aux prélèvements faits chez les malades, d'autres ont été effectués chez les poissons asymptomatiques simultanément présents dans la pisciculture (truites de taille portion, reproducteurs) pour révéler, par examen virologique

Tableau I. Caractéristiques hydrobiologiques et piscicoles des sites étudiés.

	Nord	Haute-Normandie		Picardie		Rhône-Alpes	Franche-Comté
	A ^a	B1	B2	O	C	D	E
Source							
Parcours		2 km	1 km	0,5 km	80 km	2 km	2 km
Pisciculture							
Limites de l'étude	=	=	7 km	6 km	=	=	=
Estuaire ou confluent							
			8 km				
Espèces de ^b salmonidés présentes	arc. fario. omble	arc. fario. omble	arc	arc. fario	arc. fario. omble	arc	arc
Apport d'oeufs d'origine exogène	+	+	-	+	+	+	+
Classes d'âge présentes	toutes	toutes	> 8 mois	toutes	toutes	toutes	toutes
Production annuelle (tonnes)	60	150	150	75	150	650	50
Liens commerciaux entre piscicultures étudiées		aucun					

^a : Code des régions ; ^b : arc : truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ; fario : truite fario (*Salmo trutta fario*) ; omble : omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*).

ou sérologique, la présence de porteurs de virus (site A, B1, C, D). Chez les poissons adultes des sites B2 et C, les prélèvements sérologiques furent doublés de prélèvements virologiques portant sur les liquides coelomiques et les laitances

récoltés au moment de la reproduction. De plus, en C, la recherche virologique a également porté sur le mucus cutané des reproducteurs, cette voie d'excrétion ayant été décrite (La Patra *et al*, 1989).

Tableau II. Vue d'ensemble des observations cliniques et examens de laboratoire effectués dans les différents sites.

Critères observés	O		A		B		C		D		E				
	P	Aval	Amont	P	Aval	Amont	P	Secteur B1-B2	P	P	P	P			
Classes d'âges (mois) et espèces	2-3	arc farío omble	>12	1-3 →	7-10	≥18 >12 >12	>12	1-5 >12 >12	>12	>12 >12 >12	6-7 →	10-20 >30	>30	1-3 12-18 5	
Symptômes ^a	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	±	
Mortalité (%)	>80	0	0	>80	0	0	0	>80	0	0	25	0	0	>60 0 50	
Durée de la maladie clinique (mois)	3		3		3		3		2		2		1,5	1,5	
Épreuves diagnostiques et dates ^b	04/87 11/87	01/88	04/87 05/87	09/87 12/87	06/87 10/87	01/88	08/88 10/88	04/88 05/88	05/88 07/88	08/88 10/88	07/88 10/88	10/88 11/88	01/89 05/89	03/89 12/89	08/89 08/90
	05/87											10/88 01/89*	10/89		
												04/89 09/89	12/89		

a, + : présents ; ± : peu marqués ; - : absents ; B : caractères romains ; examen virologique seul ; caractères italiques : examen sérologique seul ; caractères romains gras : double examen ; * : examens suivis d'infection expérimentale d'alevins ; → : suivi sérologique des alevins après infection clinique ; P : pisciculture ; arc : truite arc-en-ciel ; farío : truite fario ; omble : omble de fontaine.

Quand notre intervention portait sur des sites sans maladie clinique du fait de l'âge des animaux (A amont et aval, B1 amont et aval, B2, D), les examens concernaient essentiellement la recherche sérologique des anticorps neutralisants.

L'ensemble de ces examens arrêté au 15/05/90 a représenté un total de 262 examens virologiques et 1 782 analyses sérologiques pratiqués sur 1 545 poissons dont 848 furent sacrifiés.

Techniques virologiques et sérologiques

Les détails des techniques employées ont été publiés précédemment (de Kinkelin *et al*, 1985). En bref, les prélèvements destinés aux examens virologiques étaient constitués par les organes ou tissus tels que rein, rate, encéphale ou produits sexuels.

Le diagnostic virologique reposait sur l'isolement du virus dans des cultures cellulaires sensibles de poissons, de la lignée EPC (Fijan *et al*, 1983) suivi d'une identification immunologique dans le surnageant de culture, fondée dans le cas présent, sur une technique de neutralisation par anticorps anti-NHI et anti-septicémie hémorragique virale (SHV).

Parallèlement aux examens virologiques, nous avons recherché, chez les survivants d'infection, et d'une manière générale sur les poissons présents dans les piscicultures la trace sérologique de la NHI sous la forme d'anticorps neutralisants (AcN) circulants. Ces techniques sérologiques reposaient sur une épreuve de séroneutralisation en microplaques précédemment décrite (Hattenberger-Baudouy *et al*, 1989).

Les techniques virologiques et sérologiques précédentes sont maintenant définies dans le cadre des programmes n°112 et 109 du réseau national d'essai (Hattenberger-Baudouy, 1993a, b, c, d).

Étude de l'évolution de l'infection chez les truites arc-en-ciel, lots expérimentaux

Après une première expérience conduite dans le site A (Hattenberger-Baudouy *et al*, 1989), l'évolution de la réponse en AcN fut suivie dans la

population des truites arc-en-ciel d'un bassin de la pisciculture C, pendant les 12 mois suivant la NHI clinique. L'absence d'AcN ayant été constatée à partir des pools de sérums des animaux utilisés pour le diagnostic virologique, des prélèvements sanguins ultérieurs, portant successivement sur 61, 42 et 60 poissons, furent respectivement effectués aux mois de janvier, mai et octobre 1989. Les prélèvements de janvier et octobre comportaient en outre des examens virologiques.

Au site B2, certaines truites ayant révélé leur séropositivité en octobre 1988, le cheptel de l'exploitation devait être éliminé le plus vite possible, par vente à la consommation. Pour maintenir notre surveillance épidémiologique, une centaine de poissons fut transférée, le 21 décembre, au laboratoire du Centre national d'études vétérinaires et alimentaires à Maisons-Alfort (France). Identifiés par marquage operculaire (Pressadom France), ils furent installés dans 2 bacs de 400 l alimentés en eau de ville déchlorée dont la température a varié, selon la saison, entre 9 et 23°C. À l'issue d'une période d'acclimatation de 19 j correspondant à une certaine mortalité et à l'élimination de sujets en mauvais état, 75 poissons furent retenus pour l'expérience. À ce moment, le 9 janvier 1989, 57 de ces animaux étant matures, l'examen virologique de 36 liquides cœlomiques et 21 laitances fut possible et combiné aux examens sérologiques de tous les poissons.

Au cours du temps, la quantité de poissons rescapés de blessures souvent compliquées de mycoses a diminué et les prélèvements sérologiques portèrent respectivement sur 59, 21, 12 poissons les 18 avril, 12 septembre et 15 décembre 1989. Les examens virologiques concernaient les produits sexuels des sujets morts dans les semaines suivant les manipulations de janvier, ceux des survivants de décembre 1989 ainsi que leur mucus, et, quand l'état de conservation le permettait, certains mélanges de rein et rate de sujets morts.

Comme les examens virologiques du 9 janvier étaient positifs, il fut décidé de vérifier le potentiel de contamination des truites ainsi infectées. À cet effet, 50 truites arc-en-ciel, indemnes de virus et âgées de 1 200 degrés-jours, furent placées pendant 2 mois dans une cage flottante disposée dans 1 des 2 bacs de grosses truites et suivies cliniquement avec contrôle virologique. Un essai identique fut répété 11 mois plus tard avec les adultes survivants revenus en période de reproduction.

Tentatives d'éradication

Le dispositif réglementaire régissant la lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons, constitué du décret du 3 septembre 1985 et des arrêtés des 16 et 25 mars et 9 novembre 1987, venait d'être promulgué au moment de la mise en évidence des premiers foyers de NHI en France.

Une tentative d'éradication de la maladie, alors considérée comme exotique, était possible dans les 3 premières exploitations atteintes O, A et B1. Leur localisation au voisinage de la source semblait faciliter l'élimination des poissons vivant dans le cours d'eau et ainsi limiter les risques de recontamination des futurs cheptels implantés après désinfection.

Aux termes de la réglementation, l'observation de signes cliniques accompagnée de l'isolement d'un rhabdovirus a donc conduit à la mise sous arrêtés d'infection des 3 piscicultures et de certains secteurs de cours d'eau.

Les arrêtés, établis par les directions des services vétérinaires départementales respectives, ont ainsi mis en place des zones de séquestration et d'observation autour des élevages. Les premières incluaient les piscicultures et leurs zones amont et aval immédiates, dans lesquelles tous mouvements de poissons ou de leurs œufs étaient proscrits. Les secondes définissaient un périmètre plus vaste, englobant dans les 3 cas la zone s'étendant des sources à une distance d'une dizaine de kilomètres à l'aval des exploitations.

L'élimination par incinération des petits poissons atteints a été réalisée le plus rapidement possible. Les poissons de 180 g ou plus ont été commercialisés. L'éviscération a été effectuée sur les sites pour éviter des risques de propagation du virus par les organes contaminés. Le transfert des grosses truites vers les usines de transformation pour filetage a été permis, sous réserve des garanties des transporteurs quant à la décontamination des camions.

Tous les poissons éliminés ont été pesés en vue de l'estimation financière de l'opération d'abattage, l'indemnisation étant plafonnée à 75% du montant de l'estimation sous réserve de déduction des produits de la vente à la consommation qui représentaient respectivement 370, 537 et 645 KF pour O, A et B1.

Les installations ont été complètement vidangées puis désinfectées par application de chlore (30 mg/l), de chaux vive, voire du lance-flammes

dans certaines anfractuosités. L'assec a été maintenu pendant une durée minimum d'un mois sauf en B1, où l'on attendit 4 mois pour qu'une deuxième pêche électrique permette l'élimination d'un maximum de truites arc-en-ciel du cours d'eau. La désinfection était prise en charge pour moitié par l'État, jusqu'à concurrence de 2 000 F par site.

Des pêches électriques mises en œuvre par les personnels de la 1^{re} Région piscicole du Conseil supérieur de la pêche ont permis la capture des salmonidés vivant dans les cours d'eau alimentant les sites infectés et les contrôles virologique et sérologique de ces poissons en même temps que leur élimination. Toutefois, en B1, l'élimination des truites fario et des ombles de fontaine rencontra l'opposition formelle de la fédération départementale de pêche, limitant les recherches aux examens sérologiques.

À l'issue de leur assec et des pêches électriques, les 3 élevages assainis ont été repeuplés avec des produits provenant de zones indemnes de rhabdoviroses.

RÉSULTATS

Site O (Picardie)

Les alevins arc-en-ciel présentaient une mortalité élevée précédée de l'apparition de lésions œdémato-hémorragiques et d'exophtalmies se déroulant à 10°C. Le virus en fut isolé à 2 reprises à partir de lots de 10 alevins aux mois d'avril et de mai et suite au premier isolement diagnostique effectué en mars. Les signes cliniques s'estompèrent après la forme nerveuse terminale à base de troubles locomoteurs, l'ensemble de l'infection aboutissant à des pertes cumulées voisines de 80%. À aucun moment les truitelles et truites fario de la pisciculture ne présentèrent d'anomalies.

Les mesures d'éradication portèrent sur 24 t de truites arc-en-ciel indemnisées, indépendamment de celles qui ont pu être vendues à la consommation (environ 5 t).

La réussite ne fut que provisoire puisque la NHI réapparut 3 années plus tard.

Trois semaines après la destruction totale du cheptel une pêche électrique effectuée en novembre 1987 sur 2 km de cours d'eau aval permit la capture de 63 truites fario ne présentant aucun indice virologique ou sérologique de contamination.

Site A (Nord)

Comme en O, la NHI touchait les alevins arc-en-ciel dans l'écloserie avec les mêmes symptômes et lésions pour conduire à la même mortalité finale. Le virus fut également isolé 2 fois de lots de 10 alevins prélevés aux mois d'avril et de juin en eau froide et les troubles disparurent après une durée totale de 11 sem. Aucune réponse sérologique ne fut décelée à ce moment là. Les rescapés de NHI firent l'objet d'une attaque de SHV du mois de mai au mois d'août 1987. Cinquante de ces poissons marqués individuellement firent l'objet de prélèvements sérologiques aux mois de septembre et décembre et présentaient respectivement 29 (59%) et 18 (36%) de réponses anti-NHI positives, assorties de 10% d'anti-SHV.

Les sondages sérologiques réalisés sur les truites arc-en-ciel subadultes et adultes présentes dans l'élevage depuis plus de 18 mois en avril ont respectivement donné 15/20 ($75 \pm 19\%$) positifs (dont 13 à des titres de 128-512) au mois de juin et 53/73 ($72 \pm 10\%$) positifs en octobre 1987. Lors de cette 2^e séroneutralisation, une partie des titres neutralisants dépassait 1 000.

L'assainissement subventionné fut effectué en décembre, représentant la vente pour consommation de 25 t et la destruction de 35 t de truites arc-en-ciel.

L'exploitation est restée indemne de rhabdoviroses depuis sa désinfection.

Pendant le vide sanitaire, en janvier 1988, soit 9 mois après la détection de la maladie, des pêches électriques ont permis la capture et l'examen de quelques truites

arc-en-ciel du cours d'eau. Deux sur 5 de ces truites étaient sérologiquement positives en amont mais aucune des 12 prélevées en aval ne présentaient d'anticorps neutralisants. Tous les diagnostics virologiques furent négatifs.

Les examens virologiques et sérologiques pratiqués sur 20 truites fario et 20 ombles de fontaine de la pisciculture, âgés de plus de 1 an au mois de décembre 1987 furent négatifs de même que ceux effectués en janvier 1988, à partir de 27 truites fario et 24 ombles subadultes capturés sur un parcours de 2 km en aval de la pisciculture.

Site B (Basse-Normandie)

En B1, la maladie clinique sévissait chez les alevins arc-en-ciel dans les mêmes conditions qu'en A (fig 2), et provoquait les mêmes taux de mortalité (tableau II). Deux prélèvements successifs révélèrent le virus en avril et mai 1988 sur des pools de 10 sujets mais, en plus, des diagnostics virologiques positifs se révélèrent sur des sujets asymptomatiques de 100-150 g. Tout l'alevinage fut détruit en juin.

Les épreuves sérologiques de juillet sur des truites arc-en-ciel révélèrent que 87 sur 189 subadultes ($46 \pm 7\%$) et 46 sur 199 adultes ($23 \pm 6\%$) présentaient des titres d'AcN significatifs dont 84 étaient compris entre 128 et 512 (fig 3).

Comme en O et A, les doubles examens de 30 truites fario et ombles de fontaine de la pisciculture n'ont rien révélé. En amont et aval, du fait de l'opposition de la fédération de pêche, il fut impossible de sacrifier les truites fario et ombles pour les études virologiques. Seule la sérologie fut permise sur 14 truites fario et 2 ombles pêchés en amont et 9 truites fario pêchées en aval B1-B2 et demeura également négative. Les 2 truites arc-en-ciel capturées en amont au

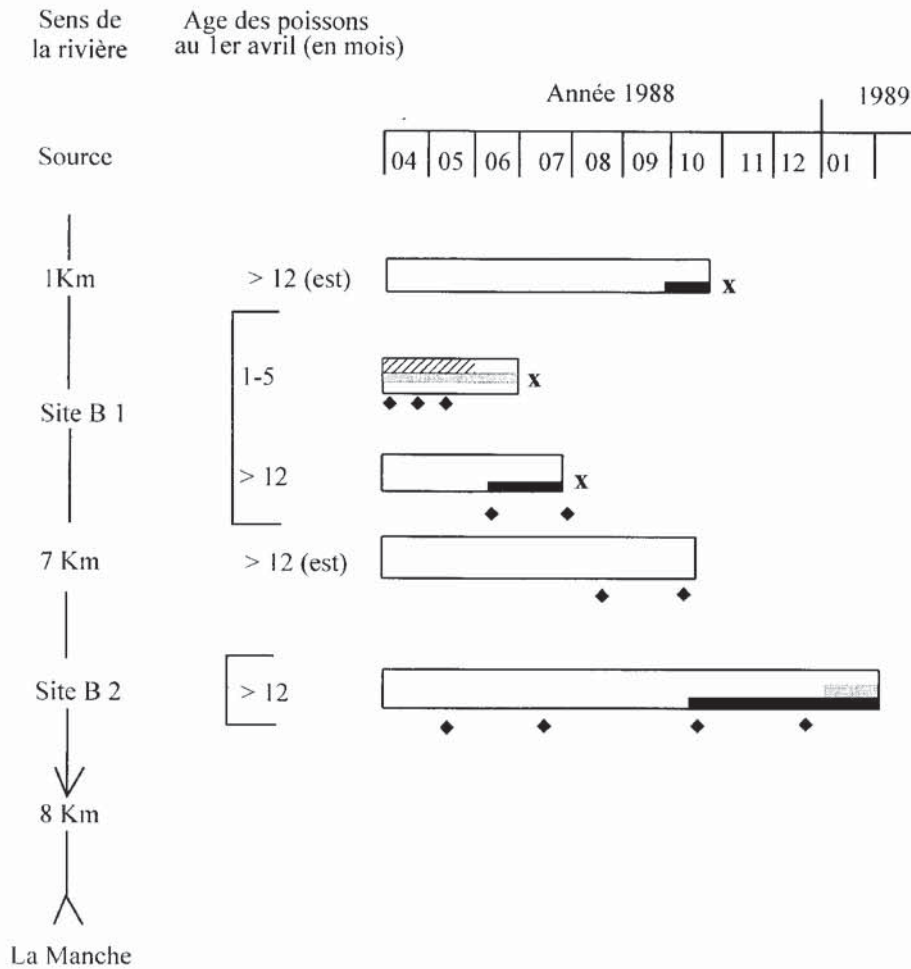


Fig 2. Suivi de l'infection dans une pisciculture et dans la rivière à travers les résultats des observations cliniques, des analyses virologiques et sérologiques de populations de truites arc-en-ciel. Séquence des événements = ▨ phase de mortalité, ▩ période d'isolement du virus, ■ période de détection des anticorps. ♦ Prélèvements, x Destruction du cheptel, (est) estimé.

cours de la pêche d'août étaient séro-négatives mais, en octobre, il y avait 2/52 (3,85 ± 5,25%) séropositifs alors qu'en aval les diagnostics restaient négatifs sur les 10 poissons pêchés.

Le cheptel de la pisciculture B1 fut totalement abattu en juillet, ce qui représentait

environ 40 t. L'exploitation fut alors désinfectée mais se recontaminait 3 années plus tard.

La pisciculture B2 ne renfermait que des truites arc-en-ciel en grossissement. Jamais la maladie clinique n'y fut observée et les doubles examens pratiqués en

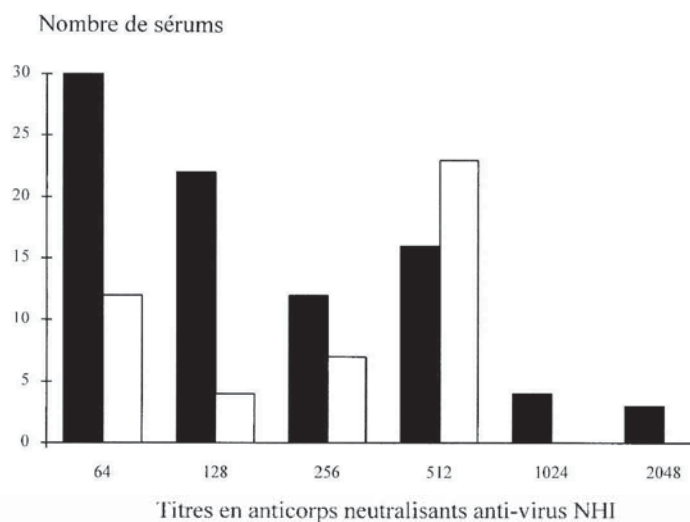


Fig 3. Prévalence des anticorps neutralisants anti-NHI dans les sérums de truites sub-adultes (87 positifs sur 189 poissons) ■ et adultes (46 positifs sur 199 poissons) □ de la pisciculture B1.

mai et juillet sur respectivement 30 et 50 truites furent négatifs. En octobre, soit 3 mois après la destruction du cheptel d'amont, 5 sérologies positives sur 50 ($10 \pm 8\%$) furent enregistrées, la virologie restant négative (fig 2).

Le détail des réponses virologique et sérologique des 75 truites marquées transférées au laboratoire est donné dans le tableau III. Aux épreuves du 9 janvier, 15 poissons répondaient positivement à la NHI et 5 à la SHV ; 2 des 15 étaient doubles répondeurs. Le virus de la NHI fut isolé du liquide cœlomique de 9/36 femelles ($25 \pm 14\%$) et 2/21 ($9,5 \pm 12,5\%$) mâles. Dix des sujets ainsi infectés étaient séronégatifs mais 5 possédaient à la fois AcN et virus. Par ailleurs, le virus SHV avait été isolé du mélange rein-rate d'un poisson mort avant le 9 janvier confirmant bien les antécédents de cette virose dans l'exploitation B2.

Chez des poissons morts entre le 9 janvier et le 18 avril, le virus de la NHI fut retrouvé dans les liquides cœlomiques 508 et 519, alors qu'ils étaient négatifs le 9 janvier, et dans les reins-rates de 4 femelles

dont 3 étaient déjà viropositives le 9 janvier. Le virus de la SHV ne fut isolé qu'à partir des reins-rates de la femelle 555.

En avril 25/59 truites ($42 \pm 12,5\%$) étaient positives pour la NHI dont 2 (femelles 516 et 576) étaient doubles répondeurs tandis que 2 sujets supplémentaires (femelles 557 et 583) ne réagissaient qu'à la SHV. Parmi les 25 NHI positifs, 14 étaient des nouveaux répondeurs et 11 des anciens dont 6 montraient des titres d'AcN en baisse par rapport à la 1^{re} épreuve.

Le 9 juin, il ne restait que 41 survivants. La température de l'eau, alors de 20°C , s'est encore élevée ensuite pendant 43 j à plus de 22°C . Des sursaturations gazeuses firent encore disparaître 20 poissons.

Lors des prélèvements de septembre les 2/3 des poissons restants avaient perdu leurs marques operculaires, limitant ainsi les suivis individuels. Néanmoins 3/21 ($14 \pm 15\%$) des animaux répondaient toujours à la NHI aux titres de 64, 128 et 256.

Au mois de décembre seul 1 poisson sur 12 réagissait à la NHI au titre de 256 et l'examen virologique de 8 liquides cœlo-

Tableau III. Suivi de l'infection des truites adultes de la pisciculture B2 transférées au laboratoire en décembre 1988 (seuls sont représentés les résultats des 41 poissons ayant répondu positivement sur les 75 testés.)

N° de l'animal, sexe	9 janvier 1989		I	18 avril 1989		II
	s	v/ps	vx/r	s	vx/r	
505, f	—	o		64		
506, m	—	—		128		nf
508, f	—	o	x+,r-			
510, f	—, (32)	—		256		nf
514, f	64	+	r-			
516, ?	—	o		128, (128)		nf
517, f	64	+		512		
518, m	—	—		128		
519, f	—	—	x+,r+			
520, m	—	—		64		nf
521, f	64	+		256		nf
525, m	—	+	r+			
528, m	128	—		64		nf
529, ?	—	o		64		nf
530, m	—	—		128		
531, f	—	+		256		
533, m	—	—		128		
534, m	—, (32)	+	r+			
536, f	64	+		128		r-
537, f	64	o		—		nf
540, f	—	+	r+			
541, m	—, (64)	—	r-			
542, f	—	—		64		nf
543, f	—	+		64		
547, ?	64	o		64		
551, f	64	—	r-			
552, f	128	—		(64)		
555, f	—	—	(r shv)			
557, f	—	—		64		
558, f	64, (64)	o	x-,r-			
559, f	—	—, (shv)		—		
565, f	—	—		128		nf
556, f	128	—		64		
567, f	256	—		128		nf
571, f	—	—		—		
576, f	128, (64)	—		64, (128)		
579, ?	—	o		128		
580, f	64	—		—		
581, m	—	—		64		
582, ?	128	o		128		nf
583, ?	—	o		—, (128)		

I : période entre les 2 premières prises de sang ; II : période entre les 2^e et 3^e prises de sang ; ? : immature ; s : examen sérologique ; v/ps : examen virologique des liquides cœlomiques et de la laitance des poissons vivants ; vx/r : examen virologique des poissons morts ; x : liquides cœlomiques et laitance ; r : rein-rate ; - : négatif ; + : positif ; o : absent ; nf : pas fait ; les données en italiques et entre parenthèses concernent les résultats de SHV.

miques et 2 laitances fut négatif. De même, un essai de contamination de truitelles pratiqué de décembre 1989 à février 1990 dans les mêmes conditions que le précédent ne permit pas la transmission de l'infection, le virus n'ayant été réisolé ni des 7 morts enregistrés ni de 2 pools de 5 poissons prélevés en fin d'expérience à la mi-février.

Site C (Picardie)

Des échanges commerciaux avec A et une importation d'œufs d'une région fortement infectée de NHI avaient été effectués. Par ailleurs, la pisciculture C connaissait la SHV à l'état endémique.

La NHI clinique y atteignait de façon modérée des truitelles de 7-8 mois (tableau II), sorties du laboratoire vers la mi-septembre. Des mortalités modérées avec lésions à dominance mélanique s'étalèrent sur les mois d'octobre et de novembre 1988 (température 9–12°C) entraînant 25% de

pertes. Deux examens virologiques successifs à un mois d'intervalle mirent le virus en évidence et un essai de sérologie sur 10 sujets resta négatif en novembre. Le suivi des poissons survivants révéla respectivement 24 sur 61 ($39 \pm 12\%$), 10 sur 42 ($24 \pm 13\%$) et 1 sur 60 ($1,8 \pm 3,2\%$) répondeurs en AcN aux mois de janvier, mai et octobre 1989, ce dernier contrôle étant effectué un an après l'instauration des troubles cliniques (fig 4). D'un autre côté le virus non isolé des prélèvements de janvier fut retrouvé sur 3/4 des pools de 3 poissons étudiés en octobre 1989.

Dans ce contexte d'infection, les 60 femelles contrôlées en décembre, au moment de la reproduction, ont révélé la présence des 2 virus dans les liquides coelomiques à raison de 8 sur 60 pour celui de la NHI et de 1 sur 60 pour celui de la SHV, ainsi que la présence d'AcN anti-NHI chez 5 d'entre eux compris entre 64 et 512. En revanche, les examens virologiques de mucus ont été négatifs.

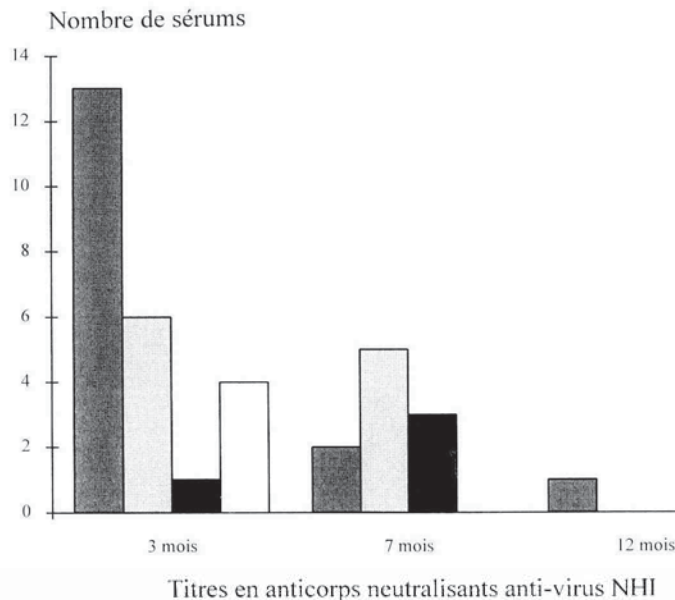


Fig 4. Évolution de la réponse immunitaire anti-NHI évaluée par séroneutralisation, dans une population de truites arc-en-ciel ayant survécu à l'infection clinique dans la pisciculture C. Titres d'anticorps 3 mois après l'infection clinique (24/61 positifs) ; titres après 7 mois (10/42 positifs) ; titres après 12 mois (1/60 positif), ■ 64, ■ 128, ■ 256, □ 512.

Site D (Rhône-Alpes)

Le sondage sérologique pratiqué en mars 1989 sur 40 reproducteurs de truite arc-en-ciel cliniquement sains, hors période de reproduction, a révélé 24 réponses positives ($60 \pm 15\%$) à des titres répartis entre 64 et 512 dont 9 réponses à 128 et 8 à 256. Neuf mois plus tard, à l'occasion d'une mortalité d'alevins accompagnée de signes cliniques de NHI, le virus fut isolé par le CNEVA Brest à partir de 20 sujets traités par pools de 5.

Site E (Franche-Comté)

Une sérologie positive fut enregistrée au mois d'août 1989 chez 17 sur 50 ($34 \pm 13\%$) truites arc-en-ciel subadultes asymptomatiques dont 7 répondaient à 128 et 4 à 256. L'année suivante (août 1990), une attaque de NHI clinique modérée dans ses manifestations emporta tout de même 50% de l'effectif des truitelles de 5 à 6 mois, en 6 sem. Le virus en fut réisolé facilement. Certains des adultes provenaient du site D mais des animaux d'autres origines avaient également été introduits.

DISCUSSION

Au travers de nos études épidémiologiques menées essentiellement sur le terrain, la NHI est apparue en France comme une virose clinique atteignant uniquement la truite arc-en-ciel en eau froide ($t \leq 14^\circ\text{C}$) et qui est d'autant plus grave que le poisson est jeune. Passé le stade clinique, le virus connaît une éclipse avant de se retrouver dans les produits sexuels au moment de la reproduction. Les examens virologiques ont également montré la présence du virus de la SHV au sein des populations contrôlées, les 2 viroses pouvant coexister ou se suc-

céder dans une exploitation. D'ailleurs, les sites A, B1, B2, C et D avaient des antécédents de SHV très récents. La présence du virus de la NHI dans une population s'accompagne de l'apparition d'anticorps neutralisants anti NHI détectables sur une fraction des individus. Ces anticorps ont été mis en évidence soit en suivant la séroconversion de survivants d'infection clinique (en A, C), soit par l'examen sérologique des subadultes et adultes présents dans l'élevage lors de nos visites (A, B, C, D). La détection des anticorps neutralisants chez certains sujets d'une population de truites arc-en-ciel correspond toujours à la présence du virus dans cette population, présence virologiquement décelable à un moment donné de son existence. Des 3 entreprises d'assainissement conduites suite aux 3 premiers cas de NHI rencontrés, une seule a réussi.

Le fait que 2 exploitations se soient recontaminées dans la 3^e année suivant la destruction de leur cheptel ne remet pas en cause le bien-fondé du choix géographique de l'intervention ni celui de la prophylaxie sanitaire en général. Il souligne seulement la difficulté d'approvisionnement en produits piscicoles indemnes. En effet, pour faire face à ses besoins en œufs et poissons vivants, la nécessité commerciale prime parfois chez l'aquaculteur sur la rigueur qu'il conviendrait d'avoir concernant les garanties sanitaires des nouveaux produits choisis.

Les observations et contrôles n'ont pu être systématiquement effectués dans les secteurs amont et aval de chaque site, faute de disposer de moyens de pêche électrique comme ce fut le cas en O, A et B. Il est même arrivé que, malgré la disposition de tels moyens, le sacrifice des truites fario après capture soit rendu impossible par l'opposition de la fédération de pêche (en B) ! D'un autre côté la technique de séro-neutralisation n'était pas encore fiable à l'époque du diagnostic virologique dans la pisciculture O et c'est pourquoi la sérologie

n'a été faite que sur les poissons capturés en aval 6 mois après l'infection clinique. La séroconversion n'a donc pas été suivie en O, ni en B1 car les juvéniles ont été détruits de même qu'en D, ou en E, site dans lequel on connaissait l'infection des subadultes une année avant celle des jeunes (tableau II).

L'origine de la NHI en France n'a pas été déterminée. Six des 7 piscicultures contrôlées avaient, au moins une fois au cours des 3 dernières années, introduit dans leur écloserie des œufs d'origine extérieure et éventuellement étrangère, les animaux de B2 s'étant simplement contaminés avec les effluents de B1. Par ailleurs, du fait de la ressemblance clinique entre NHI et SHV, le virus de la NHI peut avoir été présent sans qu'on l'identifie dans la mesure où les établissements n'étaient pas soumis à une surveillance virologique systématique et leur état de contamination antérieur ne nous était connu qu'en fonction des diagnostics ponctuels qui nous avaient été demandés. Les liens commerciaux déclarés entre les piscicultures (tableau I) peuvent évidemment avoir servi à propager l'infection de l'une à l'autre à un moment donné mais l'origine primitive de l'entrée des virus sur le territoire français demeure inconnue.

Pour ce qui concerne l'aspect virologique de l'infection de la truite arc-en-ciel, nos résultats cadrent généralement avec ceux obtenus aux États-Unis : la NHI est une infection d'eau froide des alevins dont le virus est facilement accessible au diagnostic en phase clinique, puis ultérieurement dans les produits sexuels et les liquides de la cavité abdominale dans les jours qui suivent la fraie.

Le rôle des géniteurs en période de reproduction dans la transmission du virus (Amend, 1975 ; Mulcahy et Pascho, 1986) est souligné par les poissons des piscicultures B2 et C. En B2, la démonstration du portage par les adultes s'assortit d'une vérification de sa dissémination contaminante

par ces derniers : on ne voit apparaître le virus dans leurs produits sexuels qu'en janvier 1989, soit 6 mois après la destruction du cheptel contaminé de B1 ; en janvier 1989, les poissons précédents de B2, toujours porteurs de virus détectable, contaminent des alevins mis à leur contact, qui développent alors l'infection clinique. Selon les termes du décret n°85-935, base légale de la lutte contre les rhabdoviroses de salmonidés, l'existence de la NHI dans un cheptel n'est admise que si elle a une forme clinique dont un virus est isolé, ce qui laisse ainsi la part belle à la dissémination périodique de l'infection par ses porteurs asymptomatiques. En C le virus est trouvé chez les géniteurs au mois de décembre après qu'on l'a isolé de truitelles en octobre.

En revanche, le 2^e essai de transmission de la NHI aux jeunes truites, effectué en décembre 1989 à partir des survivants de B2, est resté négatif et le virus n'était d'ailleurs plus isolé des produits sexuels des adultes. Cette «disparition» chez les individus ayant vécu dans une promiscuité favorisant leur forte contamination peut surprendre. On peut se demander si le fait d'avoir connu pendant 43 j une température $\geq 22^{\circ}\text{C}$, condition qui suffit pour inactiver le virus *in vitro*, n'agirait pas de même *in vivo*.

Comme dans la NHI américaine (Roberts, 1986), nous avons aussi observé que des truites âgées de 8 à 10 mois (2 500-3 200 degrés jours) pouvaient faire une infection clinique (en C) bien qu'à des taux de mortalité modérés. En revanche, jamais la maladie apparente ne fut trouvée chez des sujets d'un poids supérieur à 100 g comme c'est le cas en Amérique du Nord (Armstrong *et al*, 1993). De même, nos résultats diffèrent des données américaines sur la contamination virale des mucus, la température permettant la maladie, les espèces sensibles.

L'examen virologique des mucus externes des reproducteurs du site C fut négatif alors que leurs produits sexuels ren-

fermaient le virus et que les animaux étaient séropositifs. Comme le nombre des mucus examinés n'était que de 60, originaires d'un seul site, d'autres prélèvements sont nécessaires pour savoir si la technique de contrôle du mucus cutané est applicable à la détection du virus de la NHI dans les cheptels français comme cela est suggéré pour les cheptels américains (La Patra *et al*, 1989).

Nous avons toujours observé la NHI clinique à des températures d'eau inférieures à 14°C et voisines de 10°C dans le cas des alevins, alors qu'aux États-Unis, si de nombreux cas de NHI se déroulent effectivement en eau froide, il s'en produit également à 16-17°C et tout spécialement dans la vallée d'Hagerman dans l'Idaho (Vestergaard-Jorgensen *et al*, 1991).

La NHI n'a pas été retrouvée chez la truite fario et l'omble de fontaine, espèces respectivement démontrées sensibles par La Patra et Fryer (1990) et Bootland *et al* (1994). Le nombre de truites fario et d'ombles de fontaine compris dans cette étude est notablement inférieur à celui des truites arc-en-ciel (275 vs 1 270). Cependant, elles avaient vécu pendant plusieurs mois dans un environnement infecté par le virus émis par les truites arc-en-ciel malades sans jamais extérioriser de signes cliniques de NHI ni permettre la détection du virus ou celle d'anticorps au cours des examens de laboratoire. Bien plus, des essais d'infections expérimentales pratiquées sur des alevins de truites fario (d'un poids allant de 0,7 à 2 g) par M Dorson à l'INRA (Jouy-en-Josas) et J Castric au CNEVA (Brest), et sur des hybrides d'omble de fontaine et de truite arc-en-ciel, avec la souche virale initialement isolée au site O (de Kinkelin *et al*, 1987) ont échoué (résultats non publiés).

L'utilisation de souches virales différentes peut expliquer ces différences, même si on considère que les différents isolats collectés à ce jour dans le monde appartiennent à un même sérotype. Sur les bases de la mobilité relative des protéines virales en élec-

trophorèse (électrophérotypage), une classification a été proposée (Hsu *et al*, 1986). De même, après étude par les anticorps monoclonaux (AcMx), des possibilités de groupement ne cadrant pas forcément avec les précédents ont été offertes en même temps que se révélaient des différences antigéniques entre les isolats, y compris de même origine géographique et animale (Ristow et Arnzen, 1991). Le virus isolé en France (isolats INRA 32-87 et CNEVA Alfort 69-87) ne correspond à aucun des types définis ci-dessus (Arkush *et al*, 1989). Plus récemment, les isolats français étudiés en immunofluorescence avec des AcMx américains (Danton *et al*, 1994) n'ont, pour la plupart, pas réagi avec l'AcM considéré comme universel alors qu'ils répondaient tous à l'AcM révélant les virus de l'électrophérotypage 2 (Ristow et Arnzen, 1989) sans appartenir eux-mêmes à ce type. Le virus NHI isolé en France présente donc des différences certaines avec les différents isolats américains et ces différences méritent des études ultérieures.

La NHI observée en France apparaît limitée à la truite arc-en-ciel. La dissémination du virus et l'extension géographique de l'infection ne dépendent donc que des transferts de la truite arc-en-ciel et de ses produits sexuels (œufs et liquide coelomique et laitance). Dans la zone Pacifique la circulation périodique ou permanente de salmonidés migrateurs que sont les saumons du Pacifique remonte chaque année l'infection dans les zones frayères et, de là, envoie le virus vers l'aval et les élevages qui s'y trouvent ou fournissent simplement des animaux et produits virocontaminés aux salmonicultures de repeuplement qui les hébergent provisoirement. Dans de telles conditions, la persistance de la maladie est inéluctable à moins de lui opposer des individus génétiquement réfractaires ou vaccinés, objectifs de plusieurs programmes de recherche menés aux États-Unis et au Japon.

Une originalité de l'évolution de la NHI en France est qu'elle se déroule dans un cadre piscicole déjà occupé par la SHV. Les sites O, A, B, C et D étaient connus pour leurs antécédents de SHV et nous avons pu voir les 2 infections rhabdovirales se succéder cliniquement (NHI puis SHV en A) ou coexister (en B1 et C). Par ailleurs, le diagnostic de SHV avait été fait en A et C, dans les 5 mois précédant celui de NHI. Ces états de double infection ont confirmé l'absence d'immunité protectrice croisée entre NHI et SHV (en A) puisque des individus y ont subi successivement les 2 atteintes cliniques et y ont réagi de même par 2 réponses immunitaires spécifiques différentes (Hattenberger-Baudouy *et al*, 1989).

La double infection constitue un élément favorisant la dissémination de la NHI. En effet, comme cette dernière est cliniquement semblable à la SHV, seule rhabdovirose connue jusqu'alors en France, les éleveurs ont continué logiquement d'opérer les échanges de poissons comme pour la SHV. La pratique consiste à ne transférer des animaux vers les zones contaminées de SHV que lorsqu'on est sûr que ce sont des survivants de cette maladie, donc des animaux immunisés naturellement. Les doubles infections compliquent le diagnostic virologique. En effet, l'un des virus peut échapper à la détection s'il est trop faiblement représenté. Pour surmonter cette difficulté dans la surveillance sanitaire des cheptels, 2 solutions apparaissent. D'une part, effectuer l'examen virologique des produits sexuels des reproducteurs au moment de la ponte car les 2 virus y sont présents et disséminés simultanément d'après nos observations personnelles (non publiées) et les données classiques sur la NHI (Amend, 1975 ; Mulcahy *et al*, 1983 ; Mulcahy et Pascho, 1986) ; d'autre part, utiliser la sérologie.

La mise en évidence constante d'anticorps neutralisants offre un intérêt diagnostique pour la surveillance sanitaire comme le laissait présager une étude pré-

liminaire (Hattenberger-Baudouy *et al*, 1989). Ainsi la primo-infection de l'animal entraîne la synthèse d'AcN qui sont détectables pendant plus de 8 mois chez 20% des survivants d'infection clinique (en A et C). Chez les adultes et subadultes, le pourcentage de répondeurs peut être plus élevé (72% en A, 54% en B1) quand les poissons avaient été l'objet d'une stimulation de plusieurs mois par le virus résultant de la NHI clinique des jeunes. Les adultes de D avaient sans doute connu semblable situation sans que nous en ayons été prévenus. Les poissons de B2 transférés au laboratoire ont offert l'image de la situation en pisciculture où les premiers reproducteurs infectés, qui peuvent être peu nombreux, contaminent progressivement les autres avant de contrôler leur propre infection. Ainsi aux premières épreuves trouve-t-on des sujets sans AcN ni virus, d'autres avec virus ou AcN, et d'autres enfin avec les 2 sans oublier les animaux avec AcN contre la SHV et la NHI et les sujets infectés de SHV, seule. Lors de la 2^e série d'épreuves sérologiques, on s'aperçoit que les titres d'AcN baissent chez certains poissons, montent ou se maintiennent chez d'autres ou apparaissent pour la 1^{re} fois. Ces états correspondent à l'ancienneté de la contamination mais, d'une manière globale, on voit monter le taux de réponse dans la population : ceci traduit que la stimulation antigénique, due à la dissémination dans l'eau des bacs du virus issu des produits sexuels, a été forte dans les 6 premières sem de captivité. Ainsi, lors d'un contrôle sanitaire effectué en phase clinique, on isole évidemment le virus à partir des malades mais, si l'on cherche les anticorps chez les subadultes et adultes, on les trouve au même moment (sites A et B1) ou un peu plus tard (site C). Inversement, si l'on intervient en dehors de la phase clinique, la détection d'anticorps neutralisants chez des poissons cliniquement normaux est suivie à un moment donné de celle du virus chez les mêmes sujets (B2) ou chez les alevins qui en sont issus (site D), ou

vivent à leur contact (site E). La réponse sérologique anti-NHI apparaît bien corrélée avec la présence du virus dans la population de truites arc-en-ciel d'un site donné, dans laquelle elle a une valeur diagnostique et prédictive. De plus, au cours des suivis de groupes de poissons, la valeur basse de la fourchette d'estimation du pourcentage des répondeurs 6-8 mois après le diagnostic de la NHI dans un cheptel, n'a jamais été inférieure à 10% chez les survivants d'infection clinique récente (truitelles en A et C) et de 20% chez les subadultes et adultes asymptomatiques (transférés B2). Quant aux adultes en général, évalués sur contrôle unique, 20% constituait l'estimation la plus basse trouvée (en E). Dans de telles conditions, l'examen de 60 échantillons qui permet la mise en évidence théorique de 5% de répondeurs au sein d'une population $\geq 1\ 000$ individus avec un coefficient de sécurité de 95% (Ossiander et Wedemeyer, 1977) devrait suffire au contrôle d'une pisciculture, comme nous l'avons effectivement fait.

Dans le but de vérifier nos premiers résultats publiés (Hattenberger-Baudouy *et al*, 1989), Vestergaard-Jorgensen *et al* (1991) ont effectué une étude comparative de la réponse immunitaire anti-NHI et anti-SHV chez 20 truites survivantes d'infections naturelles respectivement contractées aux États-Unis et au Danemark. Les résultats obtenus confortent les nôtres en montrant que seule la séroneutralisation donnait des réponses spécifiques alors que, en fluorescence et en ELISA, 1 sérum de truite arc-en-ciel réagissait avec le virus de la SHV et qu'inversement il y avait respectivement 7 et 16 sérums anti-SHV qui réagissaient avec le virus de la NHI en fluorescence et en ELISA. Le bien-fondé de la méthode employée ainsi établi, la séroneutralisation et les sérums neutralisants suscitent de l'intérêt aux États-Unis où la cinétique d'apparition de ces anticorps a été étudiée (La Patra *et al*, 1993 ; Ristow *et al*, 1993). Les sérums neutralisants ont été utilisés, d'une part, dans une

étude antigénique des virus NHI (Basurco *et al*, 1993) et, de l'autre, dans des perspectives de sérothérapie (La Patra *et al*, 1994).

Ce travail faisant ressortir le parallélisme des résultats diagnostiques entre les examens virologique et sérologique, nous mettons maintenant en œuvre, en opérant à plus grande échelle au plan national, les démarches nécessaires à une validation de la méthode sérologique dans le contrôle sanitaire des élevages de truites vis-à-vis des rhabdoviroses.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les équipes des laboratoires vétérinaires départementaux et des directions des services vétérinaires du Jura, du Pas-de-Calais et de la Seine-Maritime pour les prélèvements virologiques et sérologiques qu'elles ont effectués à plusieurs reprises. De même, nous sommes redevables aux ingénieurs et techniciens de la 1^{re} région piscicole du Conseil supérieur de la pêche, des opérations de pêche électriques sans lesquelles nous n'avions pas accès aux poissons sauvages. Enfin, nous sommes particulièrement reconnaissants à Mme V Del Moral pour le soin apporté à la préparation de ce manuscrit et sa patience envers ses auteurs.

REFERENCES

- Amend DF (1975) Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. *J Wildlife Dis* 11, 471-478
- Amend DF, Smith L (1974) Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): early changes in blood and aspects of the immune response after injection of IHN virus. *J Fish Res Board Can* 31, 1371-1378
- Amend DF, Yasutake W, Mead R (1969) A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans Am Fish Soc* 98, 796-804
- Arkusk KD, Bovo G, de Kinkelin P, Winton JR, Wingfield WH, Hedrick RP (1989) Biochemical and antigenic properties of the first isolates of infectious hematopoietic necrosis virus from salmonid fish in Europe. *J Aquat Anim Health* 1, 148-153

- Armstrong R, Robinson J, Aymes C, Needham T (1993) Infectious hematopoietic necrosis in Atlantic salmon in British Columbia. *Can Vet J* 34, 312-313
- Arrêté du 16 mars 1987 relatif à la lutte contre les maladies réputées contagieuses des salmonidés. *JO* 24 avril 1987, 4621-4622
- Arrêté du 25 mars 1987 relatif aux mesures de lutte contre les maladies réputées contagieuses des salmonidés en rivière. *JO* 24 avril 1987, 4622-4623
- Arrêté du 9 novembre 1987 relatif à l'indemnisation des propriétaires de salmonidés éliminés dans le cadre du plan d'assainissement des exploitations atteintes de maladies réputées contagieuses des salmonidés. *JO* 25 novembre 1987, 13729
- Basurco B, Yun S, Hedrick RP (1993) Comparison of selected strains of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) using neutralizing trout antisera. *Dis Aquat Org* 15, 229-233
- Bootland LM, Lorz HV, Rohovec JS, Leong JC (1994). Experimental infection of brook trout with infectious hematopoietic necrosis virus types 1 and 2. *J Aquat Anim Health* 6, 144-148
- Bovo G, Giorgetti G, Vestergaard-Jorgensen PE (1987) Infectious hematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 7, 24-26
- CEE 1991 Directive du Conseil n°91/67. *J O Comm Eur L* 46, 1-18
- CEE 1992 Décision de la commission n°92/532. *J O Comm Eur L* 337, 18-27
- CEE 1993 Directive du Conseil n°93/54. *J O Comm Eur L* 175, 34-37
- Danton M, Ristow J, Hattenberger-Baudouy AM, de Kinkelin P (1994) Typing of French isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) with monoclonal antibodies using indirect fluorescence. *Dis Aquat Org* 18, 223-226
- Décret n° 85-935 du 3 septembre 1985 ajoutant les rhabdoviroses : septicémie hémorragique virale et nécrose hématopoïétique infectieuse des salmonidés à la nomenclature des maladies des animaux réputées contagieuses. *JO* du 5 septembre 1985, p 10257
- Fijan N, Sulimanovic D, Bearzotti M *et al* (1983) Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann Virol (Inst Pasteur)* 134 E, 207-220
- Hattenberger-Baudouy AM (1993a). Isolement sur culture cellulaire et identification par neutralisation du virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) (salmonidés). CNEVA, Maisons-Alfort, France. Réseau national d'essais. Virologie animale. Pr 112/VA/160, 6 p
- Hattenberger-Baudouy AM (1993b) Isolement sur culture cellulaire et identification par neutralisation du virus de la septicémie hémorragique virale (SHV) (salmonidés). CNEVA, Maisons-Alfort, France; Réseau national d'essais. Virologie animale. Pr112/VA/170. 6 p
- Hattenberger-Baudouy AM (1993c) Détection d'anticorps neutralisant le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse dans le sérum des salmonidés par la technique de séroneutralisation en culture cellulaire. CNEVA, Maisons-Alfort, France. Réseau national d'essais. Immunologie - sérologie animale. Pr 109/IS/290. 7 p
- Hattenberger-Baudouy AM (1993d) Détection d'anticorps neutralisant le virus de la septicémie hémorragique virale dans le sérum des salmonidés par la technique de séroneutralisation en culture cellulaire. CNEVA, Maisons-Alfort, France. Réseau national d'essais. Immunologie - sérologie animale. Pr 109/IS/410. 7 pp
- Hattenberger-Baudouy AM, de Kinkelin P (1988) La nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) des salmonidés. I. Données générales sur la maladie. *Pisciculture Fr* 91, 7-9
- Hattenberger-Baudouy AM, Danton M, Merle G (1988) La nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) des salmonidés. II. Données épidémiologiques en France. *Pisciculture Fr* 91, 10-13
- Hattenberger-Baudouy AM, Danton M, Merle G, Torchy C, de Kinkelin P (1989) Serological evidence of infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout from a French outbreak of disease. *J Aquat Anim Health* 1, 126-134
- Hsu YL, Engelking M, Leong J (1986) Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl Environ Microbiol* 52, 1353-1361
- de Kinkelin P (1970) La nécrose hématopoïétique infectieuse des salmonidés. *Pisciculture Fr* 24, 35-38
- de Kinkelin P, Michel C, Ghittino P (eds) (1985) *Précis de pathologie des poissons*. Office international des épizooties, INRA, Paris, 348 p
- de Kinkelin P, Hattenberger AM, Torchy C, Liefbrig F (1987) Infectious haematopoietic (IHNV): first report in Europe. *European Association of Fish Pathologists, Third international conference* (Abstract 57)
- La Patra SR, Fryer JL (1990) Susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 10, 125-127
- La Patra SE, Rohovec JS, Fryer JL (1989). Detection of infectious hematopoietic virus in fish mucus. *Fish Pathol* 24, 197-202
- La Patra SE, Turner T, Lauda KA, Walker SC, Jones GR (1993) Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *J Aquat Anim Health* 5, 165-171
- La Patra SE, Lauda KA, Jones GR, Shewmaker WD, Walker SC (1994) Development of passive immunotherapy for control of infectious hematopoietic necrosis. *Dis Aquat Org* 20, 1-6
- Leong JC, Fryer JL (1993) Viral vaccines for aquaculture. *In : Annual Rev of Fish Diseases* (M Faisal, FM Hetrick, eds), Pergamon Press, New York, Oxford, Seoul, Tokyo, 3, 225-240