



HAL
open science

Etude du virus responsable de la maladie du sommeil de la carpe : analyses épidémiologiques et moléculaires

Laetitia Montacq

► To cite this version:

Laetitia Montacq. Etude du virus responsable de la maladie du sommeil de la carpe : analyses épidémiologiques et moléculaires. Médecine vétérinaire et santé animale. 2020. dumas-04533133

HAL Id: dumas-04533133

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04533133>

Submitted on 4 Apr 2024

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.



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/27333>

Montacq, Laetitia . *Étude du virus responsable de la maladie du sommeil de la carpe : analyses épidémiologiques et moléculaires.*
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 135 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ETUDE DU VIRUS RESPONSABLE DE LA MALADIE DU SOMMEIL DE LA CARPE : ANALYSES EPIDEMIOLOGIQUES ET MOLECULAIRES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MONTACQ Laetitia
Née le 14/03/1995 à MONT-DE-MARSAN (40)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Stéphane BERTAGNOLI
M. Guillaume LE LOC'H

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie –Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (HORS CLASSE)

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (CLASSE NORMALE)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie-Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie – Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

Remerciements

À Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

Virologie et bactériologie

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse,
Qu'il trouve ici l'expression de mes hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie et infectiologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer et de diriger cette thèse,
Pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet qui me tenait à cœur,
Pour sa bienveillance et sa disponibilité,
Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

À Monsieur le Docteur Guillaume LE LOC'H

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Médecine zoologique et de la faune sauvage

Pour m'avoir fait l'honneur d'être assesseur de cette thèse,
Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A l'équipe de la Pisciculture d'Estalens

Pour avoir rendu cette étude possible.
Qu'ils trouvent ici mes remerciements les plus sincères.

Table des matières

Table des tableaux	4
Table des illustrations	5
Abréviations et acronymes	7
Introduction	9
Partie I : Etat des connaissances.....	10
1. Généralités sur la carpe, <i>Cyprinus carpio</i>	10
1.1. <i>Cyprinus carpio</i> : identité et utilisations	10
1.2. Zoom sur les branchies	12
2. Carp edema virus et maladie du sommeil de la carpe	15
2.1. Découverte et distribution géographique	15
2.2. Caractéristiques générales du CEV	18
2.2.1. Morphologie et cycle viral	18
2.2.2. Tropisme viral.....	19
2.2.3. Génome	19
2.2.4. Isolement viral	20
2.2.5. Méthodes de détection.....	22
2.3. Maladie du sommeil de la carpe.....	24
2.3.1. Signes cliniques et lésions macroscopiques	24
2.3.2. Lésions microscopiques.....	26
2.3.3. Modes de transmission	27
2.3.4. Portage asymptomatique	29
2.3.5. Espèces sensibles	30
2.3.6. Importance des co-infections (bactériennes, parasitaires et virales).....	30
2.3.7. Traitements	32
Partie II : Etudes expérimentales	35
Chapitre 1 : Circulation du CEV et évaluation du risque de dissémination	
après importation	35
1. Introduction	35
2. Matériels et méthodes	36
2.1. Maintenance des carpes Koï à la Pisciculture d'Estalens	36
2.2. Détection du CEV dans des lots cliniquement suspects de la KSD en 2017 et 2018	
.....	37
2.2.1. Echantillons.....	37
2.2.2. Préparation des broyats de branchies	37

2.2.3. qPCR.....	38
2.3. Détection du CEV dans l'eau et les poches d'importation du Japon de 2019.....	40
2.4. Durée d'excrétion du CEV au niveau du lot après importation ou apparition de signes cliniques	41
2.4.1. Choix des échantillons	41
2.4.2. Réalisation et préparation des écouvillons de branchies.....	44
2.5. Suivi des contaminations inter-lots par comparaison des séquences nucléotidiques du CEV	45
2.5.1. Choix des échantillons	45
2.5.2. Séquençage SANGER (P4a partial cds) et analyse phylogénétique	49
3. Résultats.....	51
3.1. Détection du CEV dans des lots cliniquement suspects de KSD en 2017 et 2018 ..	51
3.2. Détection du CEV dans l'eau et les poches d'importation du Japon de 2019.....	54
3.3. Durée d'excrétion du CEV au niveau du lot après importation ou apparition de signes cliniques	57
3.3.1. Durée d'excrétion post-importation depuis le Japon.....	57
3.3.2. Durée d'excrétion après apparition de signes cliniques de KSD	61
3.4. Suivi des contaminations inter-lots	63
3.4.1. Séquences obtenues	63
3.4.2. Lots importés du Japon en avril 2019.....	66
3.4.3. Lots français ayant présenté des signes cliniques de KSD dans la semaine suivant l'importation du Japon d'avril 2019	70
3.4.4. Lots ayant présenté des signes cliniques de KSD 10 mois après leur importation (février 2020)	71
4. Conclusion et discussion	74
4.1. Techniques de prélèvement utilisables pour dépister le CEV	74
4.2. Rôle des importations de carpes Koï dans la circulation du CEV au sein de la Pisciculture d'Estalens.....	75
4.3. Détection du CEV après importation ou après apparition de signes cliniques de KSD et risque de dissémination en aval.....	78

Chapitre 2 : Tentative d'isolement du CEV sur culture cellulaire et sur embryons de carpe Koï..... 81

1. Introduction	81
2. Matériels et méthodes	82
2.1. Obtention des œufs embryonnés de carpe Koï.....	82
2.2. Préparation de la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï.....	85
2.3. Infection des œufs embryonnés de carpe Koï.....	89
2.4. Infection de la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï.....	90
2.4.1. Infection des cellules 24 heures après la préparation de la culture primaire.....	90

2.4.2.	Infection des cellules au moment du deuxième passage	91
3.	Résultats	92
3.1.	Infection des œufs embryonnés de carpe Koï	92
3.2.	Infection de la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï	94
3.2.1.	Infection des cellules 24 heures après établissement de la culture primaire	94
3.2.2.	Infection des cellules au cours du deuxième passage	94
4.	Conclusion et discussion	96
Chapitre 3 : Etude du génome du CEV		97
1.	Introduction	97
2.	Matériels et méthodes	98
2.1.	Amplification et séquençage des fragments codant partiellement P4b et P4a	98
2.2.	Amplification et séquençage de la zone inter-génique P4a – P4b	99
2.2.1.	Amplification initiale de la zone inter-génique P4b – P4a et séquençage	99
2.2.2.	Amplification interne de la zone inter-génique P4b – P4a et séquençage	100
2.3.	Alignement et assemblage des séquences nucléotidiques et recherche de cadres ouverts de lecture	102
2.4.	Analyses phylogénétiques	102
3.	Résultats	103
3.1.	Amplification et séquençage des fragments codant partiellement P4a et P4b ...	103
3.2.	Amplification et séquençage de la zone inter-génique P4b – P4a	104
3.2.1.	Amplification initiale et séquençage	104
3.2.2.	Amplification interne et séquençage	105
3.3.	Alignement et assemblage des séquences nucléotidiques obtenues et détection des cadres de lecture ouverts	108
3.4.	Analyses phylogénétiques	110
4.	Conclusion et discussion	111
4.1.	Eléments permettant de placer le CEV parmi les <i>Chordopoxvirinae</i>	111
4.2.	Vers la mise en place de nouvelles méthodes PCR	113
Conclusion		115
Bibliographie		119
Annexe A : Caractéristiques des amorces utilisées		129
Annexe B : Positionnement des amorces utilisées sur la séquence de la zone inter-génique P4b – P4a		131
Annexe C : Séquence de la zone inter-génique P4b – P4a		132

Table des tableaux

Tableau 1 : Résumé par pays des cas de CEV confirmés par PCR (au 27 septembre 2020)	17
Tableau 2 : Liste des principales lignées cellulaires testées sans succès pour isoler le CEV	21
Tableau 3 : Liste des méthodes PCR publiées	22
Tableau 4 : Prélèvements réalisés en 2019 dans le cadre de l'étude de la durée d'excrétion du CEV post-importation	43
Tableau 5 : Identité et origine des échantillons utilisés pour le séquençage nucléotidique (P4a partial cds)	47
Tableau 6 : Charges en CEV et observations cliniques associées aux échantillons issus des importations de 2017 et 2018	52
Tableau 7 : Nomenclature des nucléotides (ADN) selon l'IUPAC	63
Tableau 8 : Représentation des mutations ponctuelles des séquences nucléotidiques obtenues à partir des échantillons provenant de la Pisciculture d'Estalens (portion 182-685 de la séquence ADN codant P4a, numéro d'accèsion Genbank® MH645915)	64
Tableau 9 : Comparaison deux à deux des séquences nucléotidiques du CEV obtenues à partir des échantillons issus de l'importation depuis le Japon de 2019 (partie 182-685 de la séquence ADN codant le précurseur de la protéine 4a)	68
Tableau 10 : Comparaison deux à deux des séquences nucléotidiques du CEV obtenues à partir des échantillons 2019-FR21G1EBn°5 et 2019-mag1 avec les autres séquences détectées à la Pisciculture d'Estalens entre 2017 et 2019 (partie 182-685 de la séquence ADN codant P4a)	70
Tableau 11 : Comparaison deux à deux des séquences nucléotidiques du CEV obtenues à partir des échantillons 2020-fév-18G3EBn5 et 2020-fév-19D1EBn4 avec les autres séquences détectées à la Pisciculture d'Estalens entre 2017 et 2019 (partie 182-685 de la séquence ADN codant P4a)	71
Tableau 12 : Emplacement, historique vis-à-vis du CEV et statut clinique des carpes Koï présentes à la Pisciculture d'Estalens au moment de l'épisode clinique de KSD de février 2020.	73
Tableau 13 : Composition du milieu utilisé pour la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï	87
Tableau 14 : Copies ADN du CEV détectées par qPCR suite à l'infection des œufs embryonnés	92
Tableau 15 : Détection de l'ADN du CEV par qPCR dans le surnageant des puits contenant des cellules embryonnaires de carpe Koï infectées au cours de leur deuxième passage	95
Tableau 16 : Liste des cadres ouverts de lecture de plus de 200 pb détectés dans la zone inter-génique P4b – P4a du CEV et des familles de gènes conservés associées	109

Table des illustrations

Figure 1 : Photographies d'une carpe commune européenne (<i>Cyprinus carpio carpio</i>) et d'une carpe Koï de variété Kin Kikokuryu (<i>Cyprinus carpio haematopterus</i>). Clichés réalisés par Jérôme Blanc... 10	10
Figure 2 : Schéma des branchies chez les téléostéens, depuis (Campbell, Reece 2002)..... 12	12
Figure 3 : Représentation en trois dimensions d'une lamelle branchiale et d'une coupe de filament branchial associé à ses lamelles, depuis (Olson 1991) 13	13
Figure 4 : Particules virales intracellulaires matures (à gauche) et immatures (à droite) du CEV observées en microscopie électronique en transmission. D'après (Miyazaki et al. 2005)..... 18	18
Figure 5 : Position des amorces des différentes méthodes de PCR sur la séquence codant partiellement P4a publiée par Oyamatsu en 1996 sous le nom CyPP-3..... 23	23
Figure 6 : Branchies d'une carpe Koï infectée par le CEV (à gauche) et d'un individu sain (à droite) observées en microscopie photonique. D'après (Oyamatsu 1996). 26	26
Figure 7 : Composition des aquariums des allées 15 à 24 lors de l'épisode de KSD clinique de février - mars 2020..... 48	48
Figure 8 : Charge en CEV des échantillons de carpes Koï importées en 2017 et 2018 en fonction de la présomption clinique de KSD associée au lot. 51	51
Figure 9 : Charge en CEV des échantillons de carpes Koï importées en 2017 et 2018 en fonction du taux de mortalité du lot de provenance 53	53
Figure 10 : Charge en CEV des échantillons de carpes Koï importées en 2017 et 2018 en fonction du délai entre l'arrivée et la mort 53	53
Figure 11 : Détection de l'ADN du CEV dans les écouvillons de poche et l'eau de transport et répartition de l'ADN du CEV après centrifugation de l'eau de transport. 54	54
Figure 12 : Cinétique d'excrétion du CEV des lots SK1, SK2 et SK3 57	57
Figure 13 : Cinétique d'excrétion du CEV des lots OT3, OT4, Mi2, OZ1, YS et ST 59	59
Figure 14 : Cinétique d'excrétion du CEV du lot 2019-FR21G1 62	62
Figure 15 : Analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques partielles codant pour P4a (positions 226 – 633 du gène P4a) 65	65
Figure 16 : Emplacements des élevages japonais (préfecture de Niigata, bassins versant du fleuve Shinano) d'où proviennent les carpes Koï de la Pisciculture d'Estalens chez qui le CEV a été recherché (années 2017 à 2019) 69	69
Figure 17 : Injection intra-péritonéale réalisée sur une femelle carpe Koï anesthésiée afin d'induire le frai..... 83	83
Figure 18 : Récolte sous anesthésie de la laitance (en haut) et des œufs (en bas) de carpe Koï. 84	84
Figure 19 : Oeufs embryonnés de carpe Koï observés à la loupe binoculaire 2 heures (A) et 7 heures (B) après la fécondation. Chaque œuf mesure environ 0,7 mm 88	88
Figure 20 : Cellules embryonnaires (blastomères) de carpe Koï observées dans l'heure ayant suivi leur préparation (grossissement x100)..... 88	88
Figure 21 : Représentation schématique de l'emplacement des gènes codant pour P4a et P4b chez le Salmon gillpox virus et orientation présomptive des séquences CyPP-3 et CyPP-77 du CEV. 97	97

<i>Figure 22 : Gel d'électrophorèse des produits d'amplification P4a et P4b.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 23 : Gel d'électrophorèse des produits de la PCR P4a → P4b (produit 6 kb) (gel d'agarose à 1 %, marqueur de poids moléculaire EXACTLADDER® 2 log)</i>	<i>104</i>
<i>Figure 24 : Gel d'électrophorèse du produit d'amplification de l'échantillon 2019-OT3-EB13.4n4 de la seconde étape de la PCR nichée P4a → P4b</i>	<i>105</i>
<i>Figure 25 : Schéma représentant l'agencement des amorces CEV_P4ab_Fn et CEV_P4ab_Rn sur la séquence nanopore de 7 kb (échelle non respectée)</i>	<i>106</i>
<i>Figure 26 : Gel d'électrophorèse des produits PCR CEV_P4ab_Fn - CEV_P4ab_Rn.....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 27 : Gel d'électrophorèse des produits des PCR nichées CEV_P4ab_Fn – CEV_P4ab_Rn..</i>	<i>107</i>
<i>Figure 28 : Représentation schématique de l'alignement de la séquence de 11 kb originale avec les séquences de références.</i>	<i>108</i>
<i>Figure 29 : Représentation schématique des gènes supposés présents sur la séquence originale de 11 kb (zone inter-génique P4b – P4a du CEV).</i>	<i>109</i>
<i>Figure 30 : Arbre phylogénétique des séquences concaténées de protéines conservées chez tous les Poxviridae (P4a, VETF-L et RPO19).....</i>	<i>110</i>

Abréviations et acronymes

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

CEV : Carp edema virus

Ct : *Cycle threshold* – numéro du cycle qui dépasse le seuil de fluorescence en qPCR

DMEM : *Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*

FGF : *fibroblast growth factor* – facteur de croissance des fibroblastes

kb : kilobase, représente 1 000 paires de bases

KHV : *Koi herpes virus*, aussi appelé *Cyprinid herpes virus 3* [CyHV-3]

KSD : *Koi Sleepy disease* – maladie du sommeil de la carpe

NCLDVs : *Nucleocytoplasmic large DNA viruses* – groupe taxonomique des grands virus nucléocytoplasmiques à ADN

P4a : précurseur de la protéine de *core 4a* – famille de gènes conservés chez tous les *Poxviridae*, orthologues à Cop-A10L

P4b : précurseur de la protéine de *core 4b* – famille de gènes conservés chez tous les *Poxviridae* et chez certains *Mimiviridae*, orthologues à Cop-A3L

PaPV : *Plecoglossus altivelis* pox-like virus, synonyme d'Ayu pox-like virus

PBS : *phosphate buffer saline*

PCR : *polymerase chain reaction* – réaction en chaîne de polymérisation

qPCR : *quantitative PCR* – PCR quantitative

pb : paires de bases

RPA : *Recombinase Polymerase Amplification* – amplification par recombinaison et polymérase

RPO-19 : *RNA polymerase subunit 19* – famille de gènes conservés chez tous les *Poxviridae*, orthologues à Cop-A5R

SGPV : *Salmon gillpox virus*

SNP : *Single nucleotide polymorphisme* – polymorphisme d'un seul nucléotide

VETF-L : *Viral early transcription factor – large* - famille de gènes conservés chez tous les *Poxviridae* et chez certains *Mimiviridae*, orthologues à Cop-A7L

VITF-3 small : *Viral intermediate transcription factor 3, small* – famille de gènes conservés chez tous les *Chordopoxvirina*, orthologues à Cop-A8R

VMAP : *Viral membrane assembly protein* – famille de gènes conservés chez tous les *Chordopoxvirina*, orthologues à Cop-A6L

Introduction

La maladie du sommeil de la carpe, aussi appelée œdème de la carpe, est responsable de mortalités massives chez les carpes et a été décrite pour la première fois au Japon dans les années 1970 (Murakami et al. 1978). Hormis au Japon, très peu de cas ont été décrits dans le monde jusqu'au milieu des années 2010. Cette maladie, causée par le Carp edema virus (CEV), est aujourd'hui considérée comme une maladie émergente et refait l'objet de publications depuis quelques années (Lewisch et al. 2015 ; Way et al. 2017 ; Pragyan et al. 2019). De nombreuses infections expérimentales ont été effectuées, ainsi les formes cliniques et les voies d'inoculation sont bien décrites (Murakami et al. 1978 ; Suzuki, Fukuda 1987 ; Oyamatsu 1996 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Swaminathan et al. 2016 ; Zhang et al. 2017 ; Adamek, Oschilewski, et al. 2017) . Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à la circulation du CEV sur le terrain, notamment lors de formes asymptomatiques. D'autre part, l'isolement du CEV sur culture cellulaire reste à ce jour impossible et la connaissance de son génome est extrêmement limitée.

La Pisciculture d'Estalens (Gers – France), importe et vend aux animaleries des poissons d'ornement, dont des carpes Koï. En 2017 et 2018, certains lots de carpes Koï récemment importés du Japon ont présenté des signes cliniques quasi-pathognomoniques de la maladie du sommeil de la carpe. La présence du CEV dans des cadavres a été confirmée par le laboratoire de virologie de l'UMR IHAP (UMR 1225 – INRA - ENVT). Une collaboration a alors été mise en place pour étudier le CEV dans un contexte commercial.

Ainsi, ce manuscrit se découpe en deux parties : la première, bibliographique, fournit les éléments de base relatifs à la carpe (*Cyprinus carpio*) et l'état actuel des connaissances au sujet de la maladie du sommeil de la carpe et du CEV. La deuxième partie, expérimentale, est découpée en trois chapitres. Le premier chapitre s'intéresse à la circulation du CEV dans les infrastructures de la Pisciculture d'Estalens suite à une importation et au risque de dissémination associé. Le second chapitre fait état de nouveaux protocoles pour essayer d'isoler le CEV sur culture primaire de cellules embryonnaires et sur embryons de carpe Koï. Enfin, le génome du CEV est étudié dans le troisième chapitre.

Partie I : Etat des connaissances

1. Généralités sur la carpe, *Cyprinus carpio*

1.1. *Cyprinus carpio* : identité et utilisations

La carpe commune *Cyprinus carpio* fait partie de la famille des Cyprinidae, une des plus grandes familles de poissons à nageoires rayonnées vivant en eau douce.

Sa morphologie est assez classique, le corps est fusiforme et relativement profond. La bouche est terminale et comporte deux paires de barbillons. Les yeux sont situés de chaque côté de la tête et de relativement grande taille. Les nageoires sont au nombre de 7 : une paire de nageoires pectorales, une paire de nageoires pelviennes, une nageoire anale, une nageoire caudale et une nageoire dorsale. La forme du corps, la couleur et le nombre d'écaillés peuvent varier en fonction des zones géographiques et de la sélection humaine, notamment à des fins esthétiques (Peteri 2004 ; Hoole 2001).



Figure 1 : Photographies d'une carpe commune européenne (*Cyprinus carpio carpio*) et d'une carpe Koi de variété Kin Kikokuryu (*Cyprinus carpio haematopterus*). Clichés réalisés par Jérôme Blanc.

La distribution naturelle de la carpe commune *Cyprinus carpio* s'étend de l'Europe jusqu'à l'Asie du Sud-Est en passant par la Chine et le Japon. Plusieurs sous-espèces ont été proposées selon des caractères phénotypiques. D'un point de vue génétique, il existe une divergence nette entre les populations de l'Ouest et les populations de l'Est, les premières appartenant à la sous-espèce *Cyprinus carpio carpio* et les secondes à la sous-espèce *Cyprinus carpio haematopterus* (Chistiakov, Voronova 2009). Les carpes sauvages vivent dans des rivières, des zones inondées et divers types de plans d'eau peu profonds. Ce sont des poissons qui ont tendance à rester au fond de l'eau mais qui peuvent évoluer au milieu et à la surface, notamment pour se nourrir. Leur régime alimentaire est omnivore avec une préférence pour la nourriture

d'origine animale. Une alimentation à base de céréales est très bien tolérée, ce qui explique en partie le succès de la domestication de cette espèce et son élevage aujourd'hui mondial. La croissance est optimale pour des températures comprises entre 23 et 30°C, même si les périodes froides hivernales sont très bien supportées (Peteri 2004). Au Japon, des variétés colorées, connues sous le nom Koï, sont élevées depuis le début du 19^{ème} siècle (Balon 1995). Les carpes Koï ont visiblement été sélectionnées à partir d'un variant chinois rouge élevé depuis plus d'un millénaire (Wang, Li 2004) et appartiennent à la sous-espèce *Cyprinus carpio haematopterus*. L'appellation « carpe commune » est assez ambiguë et peut faire référence selon les cas à l'espèce toute entière *Cyprinus carpio*, à l'ensemble des individus élevés à des fins non-ornementales ou uniquement aux individus appartenant à la sous-espèce *Cyprinus carpio carpio*. On regroupera ici tous les individus non-Koï sous le terme « carpe commune ».

La carpe, *Cyprinus carpio*, est une des espèces de poissons les plus élevées dans le monde (4^{ème} en 2018), principalement pour la consommation humaine. Sa production au niveau mondial est en augmentation. En 2018, 4 190 milliers de tonnes ont été produits. A titre de comparaison, 2 345 milliers de tonnes de saumon atlantique (*Salmo salar*) ont été élevés en 2018, 848 de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), 4 525 de tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et 2 360 de Panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) (ANON. 2020).

Les carpes *Cyprinus carpio* sont aussi utilisées à des fins sportives (pêche), ornementale et comme modèle animal (Hoole 2001). Les carpes Koï, ornementales, ont une valeur économique individuelle plus élevée que les carpes communes ainsi qu'une valeur affective. Les carpes Koï commercialisées en France proviennent principalement d'Israël et d'élevages français, et dans une moindre mesure du Japon. Les carpes Koï élevées au Japon sont reconnues pour leur qualité esthétique et sont particulièrement recherchées par les collectionneurs, leur prix de vente est le plus souvent supérieur aux autres origines (OFFRA (Ornamental Fish France) 2020). Un rapport de la FAO indique qu'en 2008, 229 tonnes de poissons d'ornement, principalement des carpes Koï et des poissons rouges ont été exportées depuis le Japon pour un montant de 21 millions d'euros (Monticini 2010). En 2016 ce montant s'élevait à 41 millions de dollars américains, montrant un fort développement de ce marché (Dey 2016).

1.2. Zoom sur les branchies

Chez les poissons, l'intégralité du sang pompé par le cœur est dirigée vers la vascularisation branchiale avant d'atteindre l'aorte dorsale et la circulation systémique. De par leur structure complexe, les branchies possèdent une très grande surface qui leur permet d'assurer l'hématose dans un milieu où la pression partielle en oxygène est faible. Elles sont aussi un lieu d'échanges ioniques qui participe aux régulations osmotiques et acido-basiques ainsi qu'à l'élimination des déchets azotés. Les branchies ne doivent donc pas être uniquement vues comme la version aquatique des poumons des mammifères (Greenwell et al. 2003 ; Evans et al. 2005).

Les branchies sont constituées de quatre paires d'arcs branchiaux. Deux rangées de filaments branchiaux sont disposées sur chaque arc et portent de nombreuses lamelles. Les filaments branchiaux peuvent aussi être nommés lamelles primaires, dans ce cas les lamelles sont nommées lamelles secondaires. La vascularisation des filaments est constituée d'une artère filamentaire afférente et d'une artère filamentaire efférente, ces deux structures permettent l'apport sanguin vers les lamelles et leur drainage (Figure 2). Les lamelles ont une structure en sandwich : deux feuillets épithéliaux, recouverts d'une membrane basale, se font face. Des cellules pilier font la jonction entre les deux feuillets. Le cytoplasme de ces cellules se prolonge sur toute la membrane basale, isolant ainsi l'espace vasculaire (Figure 3). De vraies cellules endothéliales remplacent les cellules pilier à l'extrémité des lamelles où les deux feuillets épithéliaux se rejoignent (Olson 2002 ; Evans et al. 2005).

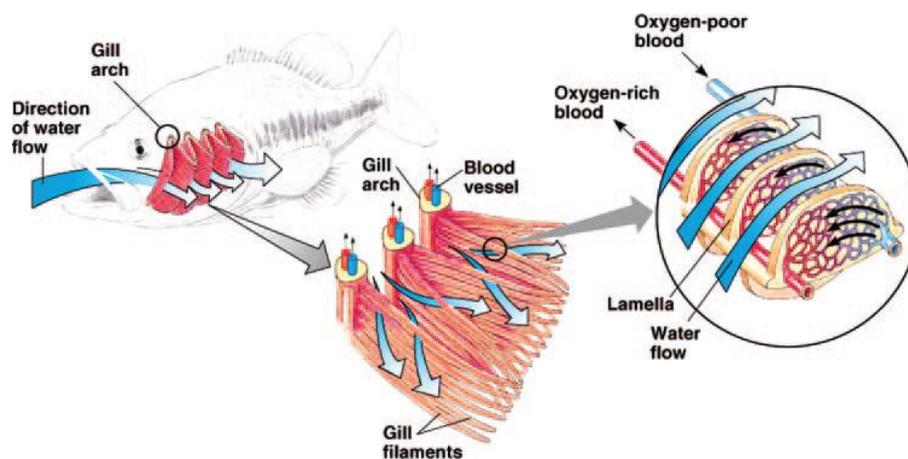


Figure 2 : Schéma des branchies chez les téléostéens, depuis (Campbell, Reece 2002)

L'épithélium branchial est composé de cellules pavimenteuses (> 90 %) et de cellules riches en mitochondries, aussi appelées cellules à chlorure car elles permettent l'excrétion de NaCl chez les poissons d'eau de mer. Ces dernières, en conditions physiologiques, sont exceptionnellement rencontrées au niveau des lamelles et se concentrent dans les espaces inter-lamellaires. Leur rôle chez les poissons d'eau douce n'est pas entièrement compris, il semblerait qu'elles participent aux échanges ioniques. Les cellules pavimenteuses sont majoritairement impliquées dans les échanges gazeux passifs au niveau des lamelles. Cependant, il a été montré que chez les poissons d'eau douce, elles participent également aux échanges ioniques, notamment d'ions sodium et chlorure (Greenwell et al. 2003 ; Evans et al. 2005).

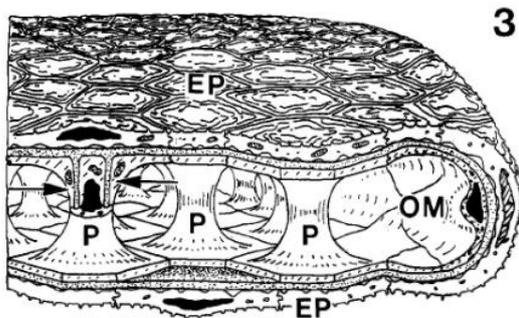


Fig. 3. Three-dimensional diagram of lamella. Pillar cells (P) delimit the vascular space and support the epithelium above (EP) and below (in cross section). The basement membrane (stippled) is interspersed between pillar cells and epithelium. Strands of collagenous fibers are enfolded within the pillar cell membranes (arrows, partial section at left) and connect the two basement membrane sheets. True endothelial cells line the outer marginal channel (OM).

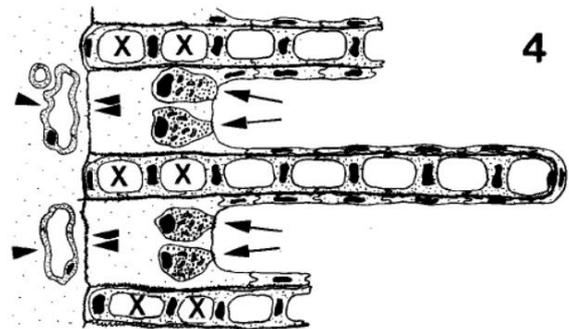


Fig. 4. Diagrammatic cross section through filament and lamellae showing relationships between lamellar sinusoids, chloride cells (arrows), interlamellar capillaries (arrowheads), and a small nutrient capillary (above, left). Inner marginal sinusoids of lamellae (X) are embedded within body of filament but remain exterior to basement membrane of filament (double arrowheads).

Figure 3 : Représentation en trois dimensions d'une lamelle branchiale et d'une coupe de filament branchial associé à ses lamelles, depuis (Olson 1991)

L'osmolarité du plasma des téléostéens d'eau douce varie entre 260 et 330 mOsm/l. Ils évoluent dans un milieu très hypotonique, l'eau douce ayant une osmolarité avoisinant les 40 mOsm/l. Ce gradient osmotique est en faveur d'une entrée d'eau dans l'organisme, l'absorption passive qui en découle se fait principalement au niveau des branchies, grâce à leur très grande surface en contact avec le milieu extérieur, et dans une moindre mesure à travers la peau. L'excès d'eau est éliminé par les reins¹ qui possèdent un débit de filtration glomérulaire élevé et une réabsorption efficace des

¹ On parle ici des reins (kidney), aussi appelés reins postérieurs (body kidney), à ne pas confondre avec les reins antérieurs (head kidney) qui sont à la fois des organes lymphoïdes primaires et secondaires et le lieu de la synthèse des catécholamines et des hormones thyroïdiennes chez les téléostéens.

ions grâce à des tubules développés. Les cellules pavimenteuses de l'épithélium branchial absorbent les ions sodium qui sont échangés activement contre des protons. Selon les espèces, les cellules riches en mitochondries peuvent jouer le même rôle. Il semblerait que les ions chlorures soient absorbés par les cellules pavimenteuses et les cellules riches en mitochondries par un échange contre des ions bicarbonates. Les mécanismes de régulation acido-basique sont encore mal compris mais il est évident que les branchies jouent un rôle majeur, notamment de par leur grande surface au contact du milieu extérieur et leur perfusion avec 100 % du débit cardiaque. Les dérivés du métabolisme azoté tels que l'urée et l'ammoniaque ($H^+, NH_3 / NH_4^+$), toxiques, sont aussi éliminés au niveau des branchies. Il semblerait que plusieurs mécanismes permettent l'excrétion des ions NH_4^+ . Les mécanismes précis sont discutés, cependant on notera que chez les téléostéens d'eau douce, l'absence d'ions Na^+ dans le milieu extérieur conduit à une forte diminution de l'excrétion des ions NH_4^+ . (Carpenter, Marion 2013 ; Greenwell et al. 2003 ; Evans et al. 2005).

Les branchies remplissent des rôles vitaux pour les téléostéens d'eau douce. On comprend aisément que toute altération des lamelles (destruction, hyperplasie, fusion, etc.) entraîne une baisse des échanges gazeux par diminution de la surface d'échange. Cette situation peut conduire à une hypoxémie associée à une hypercapnie et par conséquent à une acidose respiratoire. L'essentiel de la régulation acido-basique ayant lieu au niveau des branchies, cette acidose peut difficilement être compensée. Toute altération de la perméabilité des branchies aura pour conséquence d'augmenter le flux d'eau entrant par gradient osmotique. Lorsque les reins ne peuvent plus compenser cet apport, on observe la formation d'œdèmes et d'anasarques. Si l'excrétion des déchets azotés par les branchies est aussi compromise, le rein compensera très peu et ceux-ci vont s'accumuler. L'ammoniaque est notamment toxique pour le système nerveux.

2. Carp edema virus et maladie du sommeil de la carpe

La maladie causée par le Carp edema virus (CEV) a été nommée de deux manières différentes en fonction des signes cliniques majeurs : « Koi sleepy disease », traduit en français par maladie du sommeil de la carpe (Koï), et « Carp edema », traduit en français pas œdème de la carpe. Le premier nom est aujourd'hui beaucoup plus utilisé et s'abrège en anglais KSD. De ce fait, l'abréviation KSDv pour « Koi sleepy disease virus » peut aussi être rencontrée, bien que rare, et est synonyme de Carp edema virus.

Les abréviations CEV et KSD, les plus fréquemment rencontrées dans la littérature, seront utilisées par la suite.

2.1. Découverte et distribution géographique

Entre 1974 et 1976, plusieurs élevages japonais de carpe Koï ont été touchés par une nouvelle maladie causant une très forte mortalité chez les juvéniles. Ces jeunes individus présentaient comme signe clinique caractéristique une anasarque. La maladie fut en conséquence nommée maladie de l'œdème de la carpe (Hosoya, Suzuki 1976). Le nombre de foyers au Japon s'est multiplié avec une saisonnalité marquée au début de la saison des pluies (Murakami et al. 1978). En 1986, les observations au microscope électronique ont permis de mettre en évidence la présence de particules virales spécifiques dans les épithéliums des branchies (Ono et al. 1986). Les premières séquences du génome du CEV, ainsi que la première méthode de détection par PCR ont été publiées en 1996 (Oyamatsu 1996 ; Oyamatsu, Matoyama, et al. 1997).

Parallèlement, un foyer de forte mortalité de carpes Koï juvéniles fut détecté aux Etats-Unis en 1996. La microscopie électronique montra la présence de particules virales semblables à celles observées au Japon (Hedrick et al. 1997), ce qui laisse penser que le même virus était en cause. D'autre part, des échantillons britanniques archivés au CEFAS datant de 1998 ont été ultérieurement analysés par PCR et ont montré la présence d'ADN du CEV (Haenen et al. 2016). Les premiers articles avertissant de l'émergence de la KSD en Europe datent de 2013 (Way, Stone 2013 ; Haenen et al. 2013), or on a la preuve que le CEV était présent au Royaume-Uni et aux Etats-Unis au moins 15 ans plus tôt.

Le CEV est depuis les années 2010 davantage recherché et a à ce jour été détecté dans plusieurs pays en Europe, en Asie et en Amérique du Nord et du Sud. L'ensemble des détections par PCR du CEV publiées au 27 septembre 2020 est détaillé dans le Tableau 1 (page 17).

En France, le CEV est détecté chez des carpes communes depuis 2013, surtout chez des individus de grande taille après empoissonnement d'étangs et de manière plus ponctuelle chez des carpes Koï (Bigarré et al. 2016). Les grossistes et importateurs de poissons d'ornement membres de l'OFFRA (Ornamental Fish France) se déclarent peu impactés par la KSD. La plupart disent ne jamais avoir observé de signes cliniques ni de mortalité associés à cette maladie, y compris sur les lots importés du Japon ou d'Israël. Bien que quelques cas aient été rapportés lors d'importations depuis Israël au début des années 2010, seule la Pisciculture d'Estalens rapporte des foyers récurrents à la suite des importations de carpes Koï depuis le Japon (OFFRA (Ornamental Fish France) 2020).

Tableau 1 : Résumé par pays des cas de CEV confirmés par PCR (au 27 septembre 2020)

Période de détection	Pays	Variété	Références
1991-2005	Japon	Carpe Koï	(Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Amita et al. 2002 ; Miyazaki et al. 2005)
1998-2016	Royaume-Uni	Carpe Koï et Carpe commune	(Haenen et al. 2016 ; Way, Stone 2013 ; Way et al. 2017)
2009	Belgique (importées d'Israël)	Carpe Koï	(Way et al. 2017)
2013	Royaume-Uni (importées du Japon)	Carpe Koï	(Way, Stone 2013)
2013	Royaume-Uni (importées d'Israël)	Carpe Koï	(Way, Stone 2013)
2013	Pays-Bas	Carpe Koï	(Haenen et al. 2014)
2013-2019	Autriche	Carpe Koï et Carpe commune	(Lewisch et al. 2015 ; Soliman et al. 2019)
2013-2015	Pologne	Carpe Koï et Carpe commune	(Matras et al. 2017)
2013-2015	France	Carpe Koï et Carpe commune	(Bigarré et al. 2016)
2014	Allemagne	Carpe Koï	(Jung-Schroers et al. 2015)
2015	Inde	Carpe Koï	(Swaminathan et al. 2016)
2015	Brésil	Non communiqué	(Hesami et al. 2015)
2015-2018	USA	Carpe Koï et Carpe commune	(Stevens et al. 2018 ; Padhi et al. 2019 ; Lovy et al. 2018)
2015-2016	Chine	Carpe Koï	(Zhang et al. 2017 ; Ouyang et al. 2018 ; 2019)
Avant 2016	Allemagne (importées d'Asie)	Carpe Koï	(Adamek et al. 2016)
2016-2017	Hongrie	Carpe Commune	(Adamek, Baska, et al. 2018)
2017-2019	Corée du Sud	Carpe Koï	(Kim et al. 2018 ; 2020)
2017	Serbie	Non communiqué	Soumission directe Genbank® MG599473.1
2017	Inde	Carpe Koï	(Sahoo et al. 2020)
2018	Iraq	Carpe commune	(Toffan et al. 2019)
2018-2019	Croatie	Carpe commune	(Zrnčić et al. 2020)

2.2. Caractéristiques générales du CEV

2.2.1. Morphologie et cycle viral

Les particules virales matures du CEV ont une forme ovoïde avec un côté aplati et mesurent environ 300 - 400 nm de long pour 200-300 nm de large. Elles contiennent un nucléoïde en forme de haricot et un unique corps latéral. La membrane, sur ses aspects arrondis, est recouverte de formations globulaires / tubulaires qui mesurent 30 à 50 nm. Les particules immatures sont sphériques, souvent de plus grande taille (400 - 500 nm de diamètre). Les jeunes particules immatures intracellulaires ne possèdent pas ces formations globulaires. La réplication virale a lieu dans le cytoplasme. Des corps d'inclusion sont visibles à proximité des particules virales. De par ces caractéristiques, le CEV est considéré comme appartenant à la famille des *Poxviridae* (Ono et al. 1986 ; Oyamatsu 1996 ; Hedrick et al. 1997 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Miyazaki et al. 2005).

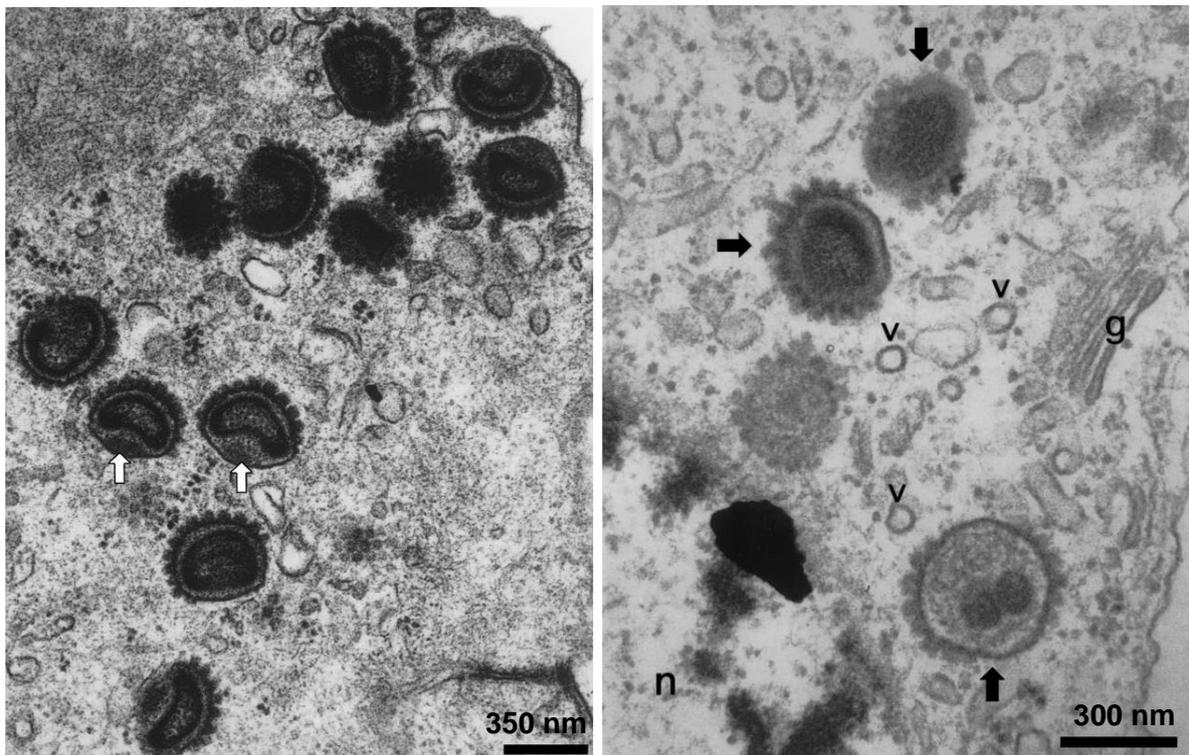


Figure 4 : Particules virales intracellulaires matures (à gauche) et immatures (à droite) du CEV observées en microscopie électronique en transmission. D'après (Miyazaki et al. 2005).

Flèche blanche : corps latéral. Flèche noire : particules virales. n : noyau. v : vacuole. g : appareil de Golgi.

2.2.2. Tropisme viral

Les particules virales du CEV ont pu être observées par microscopie électronique à transmission dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium des lamelles secondaires des branchies, notamment au niveau des zones de prolifération cellulaire (Ono et al. 1986 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Jung-Schroers et al. 2015 ; Swaminathan et al. 2016). Chez les poissons morts précocement (6 et 7 jours post-infection), de nombreuses particules virales immatures sont visibles dans des cellules hypertrophiées de l'épithélium des lamelles secondaires alors que chez les poissons morts plus tardivement (8 à 17 jours post-infection), les particules virales se situent dans la couche supérieure de l'épithélium hyperplasié des lamelles secondaires et sont présentes en plus faibles quantités (Miyazaki et al. 2005).

Le CEV se réplique quasi exclusivement dans les branchies (détection des ARNm du précurseur de la protéine de *core 4a*). Chez certains individus, il peut aussi se répliquer de manière anecdotique dans le cerveau, le foie, le rein antérieur, le cœur, la peau, la rate et les intestins (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). L'ADN du CEV a pu être détecté dans le sang de certains individus, ce qui suggère qu'une phase de virémie existe (Lewisch et al. 2015).

2.2.3. Génome

Le génome du CEV est constitué d'un ADN double brin de très grande taille : environ 450 kb (Oyamatsu 1996). A ce jour, seules deux courtes séquences sont connues, pour un total de moins de 4 kb.

La première est un fragment de 1246 pb du gène codant pour le précurseur de la protéine de *core 4b* (P4b), publiée dans la thèse universitaire de Takeshi Oyamatsu en 1996 sous le nom CyPP-77. A notre connaissance, cette séquence n'a jamais été utilisée dans les publications ultérieures. La seconde séquence code pour le précurseur de la protéine de *core 4a* (P4a). Une portion de 1272 pb a d'abord été publiée par Takeshi Oyamatsu dans sa thèse (CyPP-3). Les fragments publiés par la suite sous les noms « P4a partial cds » et « 5'UTR » correspondent à des parties de ce fragment. En août 2019, la séquence complète codant pour P4a, mesurant 2028 pb, a fait l'objet d'une soumission directe dans GenBank® (N° d'accèsion : MH645915). Cette dernière recouvre partiellement la séquence CyPP-3.

L'outil BLASTx (ANON. 2016) a été utilisé pour trouver des séquences proches. Ainsi les séquences protéiques les plus proches des transcriptions de ces deux séquences appartiennent au Salmon gillpox virus avec 26 % d'identité protéique pour P4a et 30 % pour le fragment de P4b.

Trois génogroupes distincts ont été identifiés en comparant une courte séquence de 357 pb du gène P4a (Soliman et al. 2019). Chaque génogroupe peut être rencontré chez des carpes Koï et des carpes communes. Cependant le premier est plutôt rencontré chez des carpes communes et le second chez des carpes Koï (Adamek, Baska, et al. 2018 ; Way, Stone 2013 ; Lovy et al. 2018 ; Padhi et al. 2019).

2.2.4. Isolement viral

A ce jour, aucune des lignées cellulaires testées n'a permis de multiplier le CEV. La liste des lignées testées est disponible dans le Tableau 2 (page 21). La seule méthode publiée ayant permis de produire le CEV in vitro est l'utilisation d'explants de branchies (Adamek, Oschilewski, et al. 2017).

Tableau 2 : Liste des principales lignées cellulaires testées sans succès pour isoler le CEV

Lignée cellulaire	Espèce	Tissu d'origine	Références
EPC [Epithelioma Papulosum Cyprini]	Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	Peau	(Murakami et al. 1978 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Lewisch et al. 2015 ; Jung- Schroers et al. 2015 ; Ouyang et al. 2019)
FHM	Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	Tissu conjonctif et muscle	(Murakami et al. 1978 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Ouyang et al. 2019)
RTG-2	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Ovaires et testicules	(Murakami et al. 1978 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Lewisch et al. 2015)
CLC (Carp Lymphocyte Cell)	Probablement <i>Cyprinus carpio</i>	Lymphocytes	(Oyamatsu 1996)
CF et CCF (Carp Fin et Common Carp Fin)	Probablement <i>Cyprinus carpio</i>	Nageoire	(Oyamatsu 1996)
GCF-5 (Grass Carp Fin)	Probablement <i>Ctenopharyngodon idella</i>	Nageoire	(Oyamatsu 1996)
CEK et CEA (Carp Embryo Kouhaku et Carp Embryo Asagi)	Probablement <i>Cyprinus carpio</i> var. Koi	Embryon de stade inconnu	(Oyamatsu 1996)
MCT (Mirror Carp Tumor)	Probablement <i>Cyprinus carpio</i>	Tumeur de type inconnu	(Oyamatsu 1996)
CHSE-214	Saumon royal (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	Embryon de stade inconnu	(Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Lewisch et al. 2015)
STE-137	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Embryon de stade inconnu	(Oyamatsu 1996)
SSE-5	Saumon rouge (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	Embryon de stade inconnu	(Oyamatsu 1996)
CHH-1	Saumon keta (<i>Oncorhynchus keta</i>)	Cœur	(Oyamatsu 1996)
RTB (Rainbow Trout Bladder)	Probablement <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Vessie	(Oyamatsu 1996)
BTG (Brown Trout Gonad)	Probablement <i>Salmo trutta</i>	Gonades	(Oyamatsu 1996)
EK-1 (Eel Kidney)	Anguille du Japon (<i>Anguilla japonica</i>)	Rein	(Oyamatsu 1996)
EO-2 (Eel ovary)	Anguille du Japon (<i>Anguilla japonica</i>)	Ovaire	(Oyamatsu 1996)
ET-1 et ET-2 (Eel testis 1 et 2)	Anguille du Japon (<i>Anguilla japonica</i>)	Testicule	(Oyamatsu, Hata, et al. 1997)
BF-2	Crapet arlequin (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Tronc caudal	(Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Lewisch et al. 2015)
BB	Barbotte brune (<i>Ictalurus nebulosus</i>)	Inconnue	(Oyamatsu 1996)
PG (Pike Gonad)	Brochet (<i>Esox lucius</i>)	Gonades	(Oyamatsu 1996)
TK-1 (Tilapia Kidney 1)	<i>Oreochromis mossambicus</i> x <i>Oreochromis niloticus</i>	Rein	(Oyamatsu, Hata, et al. 1997)
TO-2 (Tilapia Ovary 2)	<i>Oreochromis mossambicus</i> x <i>Oreochromis niloticus</i>	Ovaire	(Oyamatsu, Hata, et al. 1997)

2.2.5. Méthodes de détection

A ce jour, la détection par PCR de l'ADN du CEV dans les branchies est la méthode de référence. Une technique de RPA (Recombinase Polymerase Amplification) a été publiée (Soliman, El-Matbouli 2018) et permettrait de détecter l'ADN du CEV sur le terrain en moins d'une heure. La sensibilité de cette méthode est identique à la PCR nichée développée au CEFAS (Matras et al. 2017). Aucune lignée cellulaire permettant d'isoler le CEV n'a à ce jour été identifiée, rendant le diagnostic par culture sur lignée cellulaire impossible. La microscopie électronique n'est pas utilisée en routine.

A ce jour, aucune méthode permettant la détection des anticorps anti-CEV n'a été publiée.

Les méthodes PCR actuellement publiées ciblent des fragments de la séquence de 1272 pb codant partiellement P4a publiée par Oyamatsu sous le nom CyPP-3. Deux méthodes ciblent la portion 5'UTR de ce fragment : une PCR nichée (Oyamatsu, Matoyama, et al. 1997) et une PCR quantitative avec sonde d'hybridation (Adamek et al. 2016). Les autres méthodes ciblent l'autre portion du fragment : une PCR nichée (Matras et al. 2017), une PCR quantitative avec sonde (Matras et al. 2017) et une PCR quantitative SYBR®Green (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). Les méthodes sont listées dans le Tableau 3 et les amorces correspondantes positionnées sur le fragment du gène P4a publié par Oyamatsu dans la Figure 5.

Les deux méthodes ciblant la portion 5'UTR manquent de sensibilité, notamment lorsqu'il s'agit de détecter des variants appartenant au génogroupe I (Adamek, Matras, et al. 2017).

Tableau 3 : Liste des méthodes PCR publiées

Nom de la méthode de PCR	Type de PCR	Cible	Amorces
Oyamatsu end-point (Oyamatsu, Hata, et al. 1997)	Conventionnelle nichée	5'UTR	CEV-oya-F + CEV-oya-R (1) (548 pb) CEV-oya-nF + CEV-oya-nR (2) (181 pb)
TiHo probe qPCR (Adamek et al. 2016)	Quantitative avec sonde (Taqman®)	5'UTR	TiHo_qR + TiHo_qR (168 pb)
CEFAS end-point (Matras et al. 2017)	Conventionnelle nichée	P4a partial cds	CEV-for-B + CEV-rev-J (1) (528 pb) CEV-for-Bint + CEV-rev-Jint (2) (478 pb)
CEFAS probe qPCR (Matras et al. 2017)	Quantitative avec sonde (Taqman®)	P4a partial cds	CEFAS-qF + CEFAS_qR (81 pb)
TiHo SYBRGreen qPCR (Adamek, Oschilewski, et al. 2017)	Quantitative SYBR®Green	P4a partial cds	TiHo_Sybr_qF + TiHo_Sybr_qR (200 pb)

2.3. Maladie du sommeil de la carpe

2.3.1. Signes cliniques et lésions macroscopiques

Il semblerait que les signes cliniques d'appel diffèrent entre les jeunes individus et les individus plus âgés. La dichotomie semble se faire entre les très jeunes individus, âgés de moins de 2 mois et pesant au maximum quelques grammes pour une longueur de moins de 3 cm et les individus plus âgés, à partir de 5 - 10 cm de long. Il est possible que cette distinction soit au moins en partie biaisée par l'observateur dans le sens où il est plus difficile d'observer des signes cliniques individuels sur des poissons de petite taille, qui plus est lorsqu'ils sont maintenus en très grand nombre dans des étangs.

Chez les jeunes individus, les signes cliniques d'une infection par le CEV sont généralement : léthargie, agglomération à la surface ou sur les bordures des bassins, anorexie et anasarque. **L'anasarque bien que caractéristique n'est pas systématique**. La mortalité est très importante (76 à 100 %) et s'étale le plus souvent sur moins de 7 jours (maximum 20 jours) après le début des signes cliniques (Hosoya, Suzuki 1976 ; Murakami et al. 1978 ; Oyamatsu 1996 ; Seno et al. 2003 ; Hedrick et al. 1997).

Chez les individus plus âgés, un signe clinique pathognomonique est une altération du comportement qui donne **l'impression que la carpe est en train de dormir** : diminution ou absence de mouvement volontaire, **perte totale ou partielle de l'équilibration**, réponse diminuée aux stimuli tactiles (Miyazaki et al. 2005 ; Way, Stone 2013 ; Lewisch et al. 2015). Les carpes s'agrègent en surface ou au fond des bassins. Des lésions cutanées peuvent être visibles (ulcères, œdème intradermique, hémorragie). Une inflammation de l'anus est souvent rapportée. Les branchies apparaissent gonflées et peuvent présenter des plages nécrotiques blanchâtres (Miyazaki et al. 2005 ; Way, Stone 2013 ; Jung-Schroers et al. 2015). On peut aussi observer une énophtalmie et une surproduction de mucus cutané (Zhang et al. 2017 ; Miyazaki et al. 2005). Dans certaines conditions, une détresse respiratoire claire est visible : les carpes tentent alors de respirer directement l'air en surface (Adamek, Baska, et al. 2018).

La mortalité associée à cette forme aiguë est importante : 90 – 100 % des carpes Koï meurent en moins de 10 jours en l'absence de traitement (Miyazaki et al. 2005 ; Jung-Schroers et al. 2015 ; Swaminathan et al. 2016 ; Matras et al. 2017 ; Zhang et al.

2017). Le taux de mortalité chez les carpes communes est moins bien documenté : il est généralement supérieur à 50 % (Way, Stone 2013). De nombreux cas de co-infections CEV - [CyHV-3] sont rapportés, dans ce cas la mortalité atteint souvent 100 % (Toffan et al. 2019 ; Ouyang et al. 2018).

Certaines lignées de carpes sont moins sensibles. Lors d'infections expérimentales comparatives, les carpes communes sauvages originaires du bassin du fleuve Amour en Chine (*Cyprinus carpio haematopterus*) sont résistantes à la KSD et ne développent pas de signes cliniques bien que réceptives au virus, alors que d'autres souches de carpes communes et les carpes Koï présentent des signes cliniques et de la mortalité (Adamek, Oschilewski, et al. 2017).

Une forme subaiguë a été observée en Chine chez des carpes Koï adultes (3 ans) maintenues à relativement basse température (11 – 13 °C), le pic de mortalité a été atteint plus d'un mois après le début des signes cliniques, contre 3 à 10 jours habituellement. Les carpes Koï infectées expérimentalement avec ce virus (voie intrapéritonéale) et maintenues à 13 °C ont présenté des signes cliniques plus légers que dans la forme aiguë avec un taux de mortalité de seulement 15 % en 42 jours (Ouyang et al. 2019).

Une forme chronique de la maladie semble possible, au moins chez les carpes Koï adultes pour des températures relativement basses (moins de 22 °C). Dans ce cas, les individus présentent une léthargie intermittente pendant plusieurs mois. L'expression clinique de la maladie peut rester stable, s'améliorer ou s'aggraver et conduire aux signes cliniques de la forme aiguë puis à la mort (Lewisch et al. 2015 ; Stevens et al. 2018). Cette forme n'a jamais été reproduite lors d'infections expérimentales. On ne peut pas affirmer que le CEV soit seul responsable de cette forme clinique (possible co-infection) ni que le CEV persiste dans les tissus durant toute la durée de l'expression clinique.

Comme décrit précédemment, les **lésions macroscopiques** principales concernent les **branchies (gonflement, congestion, nécrose)** et moins fréquemment la **peau** (ulcération, œdème intradermique, hémorragie, congestion). De plus, une étude montre que les carpes Koï adultes atteintes de signes neurologiques (notamment troubles de l'équilibration) dans une forme subaiguë de la KSD et à basse température (13°C) présentent un **œdème cérébral** (Ouyang et al. 2019).

2.3.2. Lésions microscopiques

Les lésions microscopiques sont principalement retrouvées au niveau des branchies.

Les mêmes lésions histologiques sont retrouvées quel que soit l'âge des individus, qu'il s'agisse de carpes Koï ou de carpes communes, seule leur sévérité varie. Au début de l'infection, les filaments branchiaux sont épaissis. On observe également une hyperplasie des lamelles secondaires qui peut conduire à leur fusion, surtout à l'extrémité des filaments branchiaux. Les cellules de l'épithélium squameux sont absentes au niveau des lésions (Ono et al. 1986). Lorsque les signes cliniques de KSD sont sévères, les modifications gagnent la base des filaments branchiaux qui peuvent eux-mêmes fusionner entre eux. Les capillaires des lamelles secondaires peuvent être partiellement ou totalement oblitérés ce qui peut entraîner des nécroses (cellules en apoptose) mais il ne semble pas qu'il y ait d'hémorragie. Les capillaires congestionnés renferment des nombreux leucocytes, notamment des granulocytes éosinophiles et des mastocytes. Les granulocytes éosinophiles peuvent infiltrer la base des lamelles secondaires et un exsudat inflammatoire est parfois observé. Des inclusions éosinophiles peuvent être vues dans le cytoplasme des cellules épithéliales (Ono et al. 1986 ; Miyazaki et al. 2005 ; Lewisch et al. 2015 ; Zhang et al. 2017 ; Lovy et al. 2018 ; Ouyang et al. 2019).

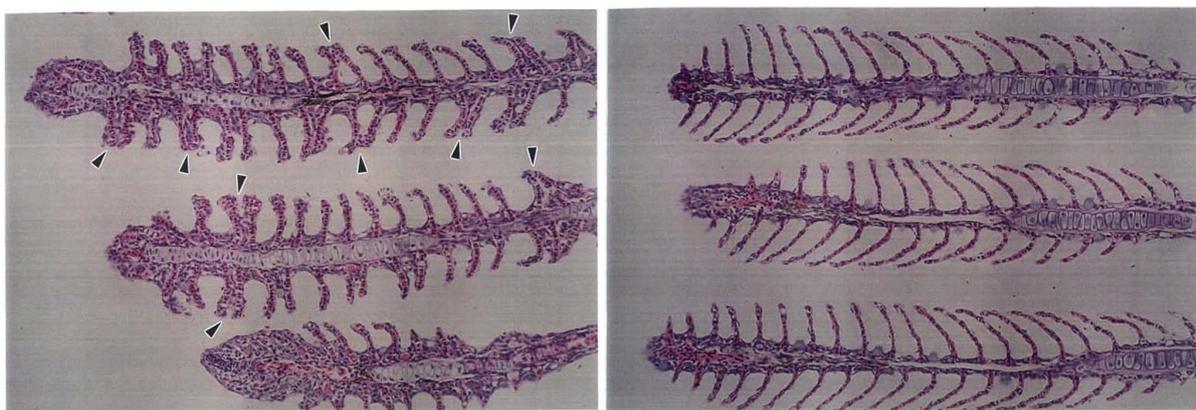


Figure 6 : Branchies d'une carpe Koï infectée par le CEV (à gauche) et d'un individu sain (à droite) observées en microscopie photonique. D'après (Oyamatsu 1996). La fusion de lamelles secondaires ainsi que l'hyperplasie et l'hypertrophie sont clairement visibles.

Chez les carpes Koï traitées par balnéation avec 0,5 % de NaCl et euthanasiées 25 jours post-infection, seule une légère prolifération épithéliale au niveau de l'épithélium inter-lamellaire est visible (Miyazaki et al. 2005). Ces modifications histologiques montrent que l'infection par le CEV a bien eu lieu mais que les conséquences structurelles sur les branchies sont minimales par rapport aux lots non traités.

Les lésions histologiques ne sont pas systématiques dans les autres organes. Cependant, on peut observer une infiltration par des cellules inflammatoires du rein antérieur et une dégénérescence des hépatocytes, des cellules épithéliales des tubules rénaux et des cardiomyocytes. Aucun corps d'inclusion n'est visible alors que les mitochondries sont altérées, il semblerait donc que cette dégénérescence soit consécutive à un état d'hypoxie et non directement au CEV. En outre, des images de phagocytose d'érythrocytes contenant de la méthémoglobine sont visibles dans le foie et la rate, ce qui peut traduire un défaut d'élimination des déchets azotés. Les cellules à mucus de la peau sont rares chez les poissons infectés par le CEV et un œdème du derme, voire des muscles sous-jacents, est souvent rapporté. Un œdème cérébral, associé ou non à une infiltration par des cellules inflammatoires, peut aussi être observé chez les individus présentant des signes neurologiques (Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Miyazaki et al. 2005 ; Lewisch et al. 2015 ; Swaminathan et al. 2016 ; Zhang et al. 2017 ; Ouyang et al. 2019).

2.3.3. Modes de transmission

Au Japon, la KSD se déclare souvent après le déplacement des carpes Koï d'un bassin à un autre, et ce même si le bassin de destination ne contenait plus de carpes. Deux hypothèses peuvent expliquer cela : le CEV est présent dans le bassin de destination (ou sur le matériel de pêche) et les carpes naïves se contaminent pendant ou après le déplacement, ou bien le CEV était porté par des individus asymptomatiques et le déplacement a déclenché une épizootie.

Au Japon, les premiers foyers de KSD sont apparus groupés. Lorsqu'un étang était touché, d'autres alentours présentaient des signes cliniques et de la mortalité dans les jours suivants. Il est apparu sur au moins une rivière que cette contamination se faisait d'amont en aval, probablement par contamination indirecte par l'eau. Cette voie de contamination a été confirmée par la contamination réussie de jeunes carpes Koï

naïves introduites dans un bassin où un foyer de KSD avait été confirmé peu de temps avant (sans contact avec des carpes Koï malades). De plus la contamination de jeunes carpes Koï par balnéation dans de l'eau d'un bassin contaminé concentrée par évaporation a aussi été possible. Cependant, cette contamination n'a été possible qu'avec de l'eau récoltée le jour du pic de mortalité ou le lendemain (Murakami et al. 1978). **L'eau peut donc servir de vecteur mécanique pour le CEV.**

Toujours au Japon, des carpes Koï asymptomatiques d'un an ont été transférées d'un bassin en terre où la KSD apparaissait annuellement vers un laboratoire de recherche. Le bassin dans lequel elles ont été introduites ne contenait pas d'autres poissons et avait été désinfecté, ce qui exclut la possibilité d'une contamination par l'environnement. Pour autant, elles ont présenté des signes cliniques 3 à 4 jours après ce transfert (Miyazaki et al. 2005). Ceci démontre que le CEV était présent dans le lot. Il est probable que le stress engendré par le déplacement et les modifications de la qualité de l'eau aient entraîné cette épizootie. **Le CEV peut être porté de manière asymptomatique et conduire à des épizooties récurrentes. Les déplacements sont un facteur favorisant l'apparition de foyer de KSD.**

En Autriche, des carpes Koï maintenues chez un particulier ont présenté des signes cliniques de KSD, confirmés par détection de l'ADN du CEV par qPCR, à l'automne 2013 et au printemps 2014. Aucune introduction n'avait été faite depuis plus d'un an. Le bassin était hydrographiquement isolé rendant très peu probable une contamination par l'environnement (Lewisch et al. 2015). Aucun facteur déclenchant n'a clairement été identifié dans ce cas, on peut toutefois se poser la question de l'influence de la température et de la pluie. En effet, ces deux paramètres ont été relevés lors des premières études sur la KSD réalisées au Japon de 1975 à 1977. Généralement pour les étangs atteints, un épisode de KSD était rencontré chaque année au début de la saison des pluies². La température diminuait et se situait alors autour de 21°C (18 – 23 °C). L'osmolarité de l'eau diminuait aussi (Murakami et al. 1978). **La baisse de température en début de saison des pluies (Japon) ou à l'automne (Europe) ainsi que son augmentation au printemps (Europe) semblent être des facteurs favorisant l'apparition de foyers de KSD.**

² La saison des pluies au Japon correspond généralement aux mois de juin et juillet.

Il est aussi possible d'inoculer le CEV par voie intrapéritonéale et intramusculaire (Swaminathan et al. 2016 ; Zhang et al. 2017 ; Ouyang et al. 2019).

Lors d'infections expérimentales de carpes Koï et de carpes communes, le CEV se réplique (détection des ARNm du précurseur de la protéine de *core 4a*) pendant au moins 15 jours chez les individus euthanasiés à ces dates-là (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). Cependant, lors des premières études sur le CEV, l'utilisation de broyat de branchies de carpes Koï mortes tardivement (plus de 7 jours après l'apparition des signes cliniques) n'a pas permis d'infecter de nouvelles carpes, contrairement à l'utilisation de broyat de branchies de carpes mortes précocement, comme si à ce moment-là le CEV était absent ou inactivé (Murakami et al. 1978).

2.3.4. Portage asymptomatique

Quelques cas de portage asymptomatique ont été publiés, notamment chez des carpes Koï récemment importées et dans des élevages de carpes communes et de carpes Koï.

En Allemagne, des carpes Koï récemment importées d'Asie en apparente bonne santé se sont révélées porteuses du CEV. L'ADN du CEV a en effet été détecté par qPCR dans 8 lots sur 12 (pool des broyats de branchies de deux carpes Koï par lot). Le nombre de copies ADN du CEV pour 250 ng d'ADN total était inférieur à 50 pour 6 lots, ce qui est très faible. Cependant la charge virale atteignait 5.10^3 et 12.10^4 copies CEV pour 250 ng d'ADN pour les deux derniers lots, ce qui correspond aux charges virales rencontrées lors de foyers avec signes cliniques ou de phase précoce d'infection expérimentale (Adamek et al. 2016 ; Adamek, Oschilewski, et al. 2017).

L'ADN du CEV a également été recherché dans des prélèvements réalisés dans le cadre du dépistage de l'herpès-virose de la carpe en Pologne. Ces carpes étaient en apparente bonne santé et aucun historique de KSD n'était rapporté. L'ADN du CEV a été détecté dans les 3 prélèvements faits dans des élevages de carpes Koï et dans 14 des 33 prélèvements faits dans des élevages de carpes communes (Matras et al. 2017).

De plus, l'ADN du CEV a pu être détecté dans le mucus d'une carpe Koï asymptomatique quatre mois après une cohabitation avec des individus excréteurs du CEV. Dans un autre contexte, des carpes Koï introduites dans un bassin ayant connu

un foyer de KSD un an plus tôt sont toutes mortes et ont été testées CEV-positives, alors que les carpes Koï déjà présentes n'ont pas présenté de signe clinique de KSD ni de mortalité (Haenen et al. 2016).

Toutes ces observations montrent qu'un portage asymptomatique est possible sur des périodes d'au moins plusieurs mois.

2.3.5. Espèces sensibles

A ce jour, aucune espèce autre que *Cyprinus carpio* n'a présenté de signes cliniques suite à une infection par le CEV. Lors de foyers naturels de KSD, aucun individu des espèces suivantes n'a présenté de signe clinique ni de mortalité : poissons rouges (*Carassius auratus*), esturgeons (*Acipenser* sp.), barbues de rivière (*Ictalurus punctatus*), achigans à grande bouche (*Micropterus salmoides*), meuniers noirs (*Catostomus commersonii*), crapets arlequin (*Lepomis macrochirus*), crapets soleil (*Lepomis gibbosus*), truites arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*) et ménés jaunes (*Notemigonus crysoleucas*) (Jung-Schroers et al. 2015 ; Lovy et al. 2018).

L'infection expérimentale de carassins communs (*Carassius carassius*), de tenches (*Tinca tinca*), de carpes prussiennes (*Carassius gibelio*), de perches européennes (*Perca fluviatilis*), de gardons (*Rutilus rutilus*) et d'ablettes (*Alburnus alburnus*) n'a pas donné lieu à des signes cliniques ni à de la mortalité. Cependant, l'ADN du CEV a pu être détecté en faible quantité au moins chez certains individus de ces espèces après cohabitation avec des carpes infectées, et ce à après le troisième jour post-infection et jusqu'à 42 jours post-infection pour certains individus. Ces détections ont été faites dans les branchies et dans la peau (Matras et al. 2019). Pour autant, ces résultats ne permettent pas de conclure que le CEV s'est répliqué chez ces espèces ni qu'il pourrait être transmis à partir de celles-ci.

2.3.6. Importance des co-infections (bactériennes, parasitaires et virales)

Une seule étude porte spécifiquement sur le rôle des co-infections bactériennes dans la KSD. Celle-ci identifie *Flavobacterium branchiophilum* comme un pathogène secondaire dont l'installation dans les branchies est favorisée par les lésions primaires causées par le CEV. Chez les carpes communes mortes des suites de la KSD analysées, il existe une corrélation directe entre la charge en ADN du CEV et celle en

ADN de flavobactéries. Un traitement antibiotique (florfénicol – Nuflor®) ciblant les flavobactéries permet de diminuer l'intensité des signes cliniques et le taux de mortalité, sans pour autant les faire disparaître (Adamek, Teitge, et al. 2018).

La présence de bactéries des genres *Aeromonas*, et dans une moindre mesure *Klebsiella*, *Proteus* et *Shewanella*, a été observée dans d'autres foyers de KSD. Le portage est très fréquemment cutané ou branchial mais *Aeromonas* sp. peut aussi être détectée dans le sang ou le rein antérieur. Ces infections semblent également être secondaires à l'infection par le CEV (Lewisch et al. 2015 ; Jung-Schroers et al. 2015 ; Swaminathan et al. 2016).

Certains foyers de KSD sont associés à un parasitisme massif, on retrouve notamment des parasites cutanés et branchiaux des genres *Trichodina*, *Gyrodactylus*, *Dactylogyrus*, *Ictyobodo*, *Argulus* et *Ichthyophthirius* et des parasites digestifs des genres *Bothriocephalus* et *Capillaria* (Amita et al. 2002 ; Haenen et al. 2013 ; Lewisch et al. 2015 ; Swaminathan et al. 2016). Le parasitisme est fréquent chez les poissons et est généralement bien toléré. Le fait que les individus d'un même foyer ne soient pas infestés par les mêmes parasites indique plutôt qu'il s'agit d'une infestation secondaire, possiblement consécutive aux lésions branchiales et cutanées causées par le CEV, voire à une baisse de l'immunité.

Plusieurs foyers de co-infections associant le Carp edema virus et l'Herpès cyprin de type 3, aussi appelé Koi Herpes Virus ont été détectés. L'herpès virose de la Koï est une maladie notifiable à l'OIE et réglementée dans de nombreux pays qui peut être associée à une mortalité massive.

Ces co-infections furent notamment détectées en Chine et en Allemagne chez des carpes Koï et aux Etats-Unis chez des carpes communes férales. Sachant que le [CyHV-3] peut entrer en latence, se pose la question d'une possible réactivation de celui-ci lors d'infection par le CEV (Ouyang et al. 2018 ; Adamek et al. 2019 ; Padhi et al. 2019).

Ainsi, le CEV semble favoriser les infections bactériennes secondaires, notamment la flavobactériose qui atteint aussi les branchies, la prolifération parasitaire et possiblement la réactivation de virus latents tels que [CyHV-3]. La flavobactériose augmente l'intensité des signes cliniques de KSD et la mortalité associée.

2.3.7. Traitements

Comme on vient de le voir, les infections secondaires bactériennes, parasitaires et virales semblent être favorisées lors d'infection par le CEV. Il est important de les rechercher et de les traiter quand cela est possible.

2.3.7.1. Effet de la température

L'influence de la température sur le taux de mortalité associé au CEV a été étudiée dès les premiers foyers détectés au Japon. Ainsi, chez des alevins de carpes Koï maintenues initialement à 24°C, augmenter après infection la température de l'eau à 32°C permet de réduire la mortalité (15 % ; groupe témoin : 100%) alors que la baisser à 11°C l'accélère (Murakami et al. 1978).

Des résultats semblables ont été observés lors d'une infection expérimentale par voie intra musculaire de carpes Koï (70 – 90 g) réalisée en Chine. Les carpes acclimatées à 28°C pendant une semaine puis infectées ont présenté des signes cliniques plus légers et une mortalité plus faible que les carpes acclimatées et infectées à 24°C : 26,7 % contre 100 % (Zhang et al. 2017).

La réponse immunitaire des poissons est étroitement liée à la température. Chez la carpe *Cyprinus carpio*, l'augmentation de la température est une méthode connue pour réduire les signes cliniques et la mortalité associés à la Virémie printanière de la carpe et à l'Herpès-virose de la Carpe en permettant d'améliorer la production d'anticorps spécifiques (Perelberg et al. 2008 ; Ahne et al. 2002). Cependant, on notera que la quantité de gaz dissout dans l'eau, et donc d'oxygène dissout, diminue avec l'augmentation de la température. Ainsi, dans le cas de la KSD qui entraîne une hypoxémie, cette solution paraît risquée et il faut s'assurer que l'aération de l'eau est suffisante pour ne pas aggraver l'hypoxémie. De plus, des foyers de KSD avec mortalité massive ont été rapportés à des températures entre 32 et 34 °C (Sahoo et al. 2020).

D'autre part, des infections expérimentales de carpes Koï plus âgées à basse température montrent des résultats étonnants. Pour des températures de maintenance de 13 et 19°C, le taux de mortalité n'était que de 15 et 33 % (Ouyang et al. 2019 ; Swaminathan et al. 2016). L'objectif de ces études n'était pas de tester les effets de différentes températures et aucune conclusion nette ne peut en être tirée. Cependant, on peut s'interroger sur des effets croisés entre la température de maintenance et d'autres paramètres tels que l'âge des individus, la souche virale et la lignée des carpes.

2.3.7.2. Balnéation dans de l'eau salée

Le traitement par adjonction de sel dans l'eau est un traitement fréquemment utilisé chez les poissons d'eau douce. Il est notamment préconisé dans les cas d'ectoparasitoses ou d'affections fongiques. Ce traitement a donc été testé dès l'apparition des premiers foyers de KSD au Japon. Une étude réalisée sur des alevins de carpes Koï, a conclu à un effet thérapeutique pour une balnéation continue dans une solution de NaCl comprise entre 0,4 et 0,6 %. Le taux de mortalité se situait alors entre 10 et 20 % contre 100 % pour le lot témoin (Murakami et al. 1978). De plus, l'ADN du CEV n'a pas pu être détecté, 25 jours post infection, par PCR nichée chez des individus traités par balnéation dans de l'eau salée à 0,5 % et ayant survécu, bien qu'ils aient présenté des modifications histologiques au niveau des branchies (Miyazaki et al. 2005).

Le mécanisme d'action de ce traitement a ensuite été étudié : le sel neutralise-t-il le CEV ou s'agit-il d'un traitement symptomatique ?

Aucune technique de réplication *in vitro* du CEV n'étant à ce jour connue, les tests d'infectivité ont été réalisés en exposant des alevins de carpes Koï à différentes dilutions d'un même homogénat de branchies CEV-positif. L'exposition de l'homogénat de branchies (avant dilution) à des solutions de NaCl 0,5 à 3,0 % réduit le titre d'infectivité. Cette réduction est d'autant plus marquée que la concentration en NaCl est élevée. Cependant le virus reste infectant (Seno et al. 2003).

L'exposition à des solutions contenant au minimum 0,5 % de NaCl diminue donc l'infectivité du CEV. Seno conclut que le virus reste infectant malgré cette exposition. Cependant, dans cette expérience, le temps d'exposition n'était que d'une heure, or le sel est utilisé en traitement par balnéation pendant plusieurs jours. Il est possible qu'une exposition prolongée diminue davantage le titre d'infectivité.

L'exposition à une solution de NaCl 0,5 % des carpes a aussi une incidence directe sur leur métabolisme. Ainsi une augmentation de la salinité (concentration maximale testée : NaCl 1,2 %) entraîne chez la carpe adulte saine, une diminution du débit de formation de l'urine, une augmentation de l'absorption active d'ions sodium au niveau des branchies (pompe Na^+/K^+ ATPase) suivie d'une forte augmentation de la concentration plasmatique en sodium et d'une augmentation de la concentration plasmatique en chlorure (Salati et al. 2011). L'osmolarité calculée était d'environ 260

mOsm/l pour le groupe contrôle, 290 mOsm/l pour une salinité de 0,3 % et 300 mOsm/l pour une salinité de 0,5 %.

Chez les alevins de carpe Koï infectés artificiellement par le CEV, le taux d'hématocrite augmente progressivement à partir de J5 post-infection (contrôle 32 % ; alevins infectés : 38 % à J5 et 43 % à J6) alors que l'osmolarité plasmatique diminue (contrôle : 250 mOsm/l ; alevins infectés 220 mOsm/l à J5 et 200 mOsm/l à J6) (Seno et al. 2003). On peut supposer que les lésions branchiales, notamment inflammatoires, entraînent une augmentation de la perméabilité branchiale et donc une augmentation de l'entrée d'eau dans l'organisme, l'eau douce étant hypotonique. Cette entrée d'eau supplémentaire, si elle n'est pas compensée par une augmentation du débit de formation de l'urine, entraîne une baisse de l'osmolarité plasmatique. Ce mécanisme pourrait expliquer la baisse de l'osmolarité plasmatique chez les alevins de carpes Koï infectés par le CEV. En ce qui concerne l'augmentation de l'hématocrite, il a été montré chez plusieurs espèces de téléostéens que l'hypoxie entraîne une augmentation rapide de l'hématocrite, probablement par contraction splénique (Silkin, Silkina 2005). Il est probable que les lésions branchiales consécutives à l'infection par le CEV entraînent une hypoxie, et que celle-ci entraîne en retour une augmentation de l'hématocrite par contraction splénique.

Lorsque les alevins de carpe Koï sont traités par balnéation dans de l'eau contenant 0,5 % de NaCl, leur hématocrite et leur osmolarité plasmatique se normalisent dans les 24 heures suivant l'initiation du traitement (Seno et al. 2003). On a vu que chez les carpes saines, l'augmentation de la salinité augmente l'osmolarité plasmatique. Il semble logique que la même réaction soit rencontrée chez les individus malades. Bien que le mécanisme d'action soit inconnu, la normalisation de l'hématocrite semble indiquer que ce traitement permet également de résoudre l'état hypoxique.

Partie II : Etudes expérimentales

Chapitre 1 : Circulation du CEV et évaluation du risque de dissémination après importation

1. Introduction

Dans le marché français du poisson d'ornement, les grossistes – importateurs ont une position cruciale dans la propagation des maladies. En effet, ils regroupent les importations du monde entier et redistribuent ensuite les poissons sur le territoire français. Ainsi, les pathogènes qu'ils importent ou qui circulent dans leurs installations peuvent ensuite être propagés à travers le pays via les ventes.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec la Pisciculture d'Estalens qui commercialise des carpes Koï et où la KSD a été cliniquement suspectée en 2017 et en 2018 sur des lots importés du Japon. La première étape consiste à confirmer la présence du CEV dans ces lots cliniquement suspects. L'ADN du CEV est ensuite recherché dans l'eau et les poches de transport de la commande en provenance du Japon de 2019 afin d'étudier la part des importations dans la circulation du CEV dans les infrastructures. Une troisième partie traite de la durée d'excrétion du CEV au niveau du lot après importation depuis le Japon mais aussi après l'apparition de signes cliniques de KSD dans un lot acheté en France 4 mois plus tôt. Enfin, une quatrième partie aborde le suivi des contaminations au sein de la Pisciculture d'Estalens en comparant différentes séquences nucléotidiques du CEV, obtenues suite à l'importation de 2019 (milieu de transport et prélèvements sur les carpes après leur arrivée) et suite à l'apparition de plusieurs foyers de KSD quelques mois après leurs achats (lots français et japonais).

2. Matériels et méthodes

2.1. Maintenance des carpes Koï à la Pisciculture d'Estalens

Les carpes Koï présentes à la Pisciculture d'Estalens sont maintenues à une température voisine de 25 °C (minimum 22 °C – maximum 29 °C). La circulation de l'eau dans les aquariums se fait en dérivation de manière à ce que l'eau d'un aquarium n'aille pas dans un autre avant d'avoir été filtrée et désinfectée (filtration mécanique, traitement à l'ozone et lampes UV). En dehors des périodes de traitement par balnéation, le volume d'eau est renouvelé en continu avec un renouvellement complet en 24 heures environ. Les aquariums ont un volume net de 500 litres et sont organisés en rangées de 3, chacun possède un filtre biologique individuel (mousse ou billes) ainsi qu'un diffuseur d'air.

En 2017, les carpes Koï ont reçu un traitement antiparasitaire et antibiotique à leur arrivée. La KSD n'était à ce moment-là pas connue par la Pisciculture d'Estalens et le traitement par balnéation dans de l'eau salée a débuté tardivement (2 semaines après l'importation, NaCl 0,3 %). En 2018, tous les lots importés du Japon ont été réceptionnés dans de l'eau salée à 0,3 % et ont également reçu un traitement antiparasitaire et antibiotique. En 2019, les lots ont été réceptionnés en suivant le même protocole qu'en 2018, excepté le sel qui a été doublé (concentration finale : NaCl 0,6 %) pour les lots cliniquement suspects de KSD ou pour ceux où la présence du CEV a été confirmée par PCR.

A partir de janvier 2019, tout lot, même non importé du Japon, présentant des signes cliniques reconnus par le personnel de la Pisciculture d'Estalens comme caractéristiques de la KSD est immédiatement placé dans un bain d'eau salée à 0,6 %.

2.2. Détection du CEV dans des lots cliniquement suspects de la KSD en 2017 et 2018

2.2.1. Echantillons

En 2017, des signes de KSD et de la mortalité ont été observés chez certaines carpes Koï importées du Japon par la Pisciculture d'Estalens. Les cadavres de 25 d'entre elles provenant des deux lots ayant eu les plus forts taux de mortalité (44 % et 100 %) ont été congelés sur place (- 20 °C) et envoyés au laboratoire pour dépistage du CEV. Les échantillons n'ayant pas été identifiés avant leur envoi, l'appartenance à un lot ou à l'autre a été établie lors de la dissection en fonction de la couleur des écailles : le lot HW comportait uniquement des carpes Kohaku (rouges et blanches) alors que le lot HI était un mélange de diverses couleurs dont des carpes Kohaku. Les cadavres de 34 carpes Koï importées du Japon en 2018 sont également congelés sur site (- 20 °C) avant d'être envoyés pour analyse. Les carpes Koï appartenant à un unique lot et mortes le même jour sont placées ensemble dans un sachet plastique et forment un même échantillon.

Lors d'infection expérimentale, les charges en ADN du CEV les plus élevées sont retrouvées dans les branchies (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). C'est pourquoi le CEV est ici recherché dans des broyats de branchies.

2.2.2. Préparation des broyats de branchies

Après décongélation à température ambiante, les branchies sont disséquées sous poste de sécurité microbiologique à l'aide de pinces et de ciseaux. L'équivalent de 2 arcs branchiaux d'une carpe de 15 cm est broyé alors que le reste est placé dans des tubes de 2 ml et stocké à - 20 °C. Le broyage s'effectue avec un mortier et un pilon stériles en ajoutant une petite quantité de sable de Fontainebleau stérile. Le broyat est lavé 4 fois avec 500 µl de milieu de culture cellulaire (Gibco - OptiMEM®) contenant pénicilline et streptomycine à 4X (Gibco) et 1X d'amphotéricine B. La solution de lavage est placée dans un tube Eppendorf® de 2 ml puis centrifugée 10 minutes à 400 g Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de 2 ml et stocké à - 20 °C. Le culot est jeté.

2.2.3. qPCR

L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide du kit ONE-4-ALL genomic DNA minipreps (Bio Basic Inc.) en suivant le protocole pour culture cellulaire dont la première étape a été modifiée ainsi : mélanger 200 µl de tampon CL + 20 µl de protéinase K + 200 µl d'échantillon en solution. La mesure de la concentration en ADN des échantillons est réalisée par spectrophotométrie (CLARIOSTAR Plus – BMG Labtech).

Les échantillons sont analysés en duplicats. Pour chaque réaction, un contrôle négatif (eau nanopure) et une gamme plasmidique de 10^1 à 10^7 copies par 2 µl sont ajoutés aux échantillons. Si la quantification n'est pas nécessaire, un second contrôle négatif (broyat de branchies 2018-41) et un contrôle positif (broyat de branchies 2017-6) remplacent la gamme. Si les extraits ADN obtenus à partir de broyats de branchies sont trop concentrés, ils sont dilués au dixième ou au centième afin de ne pas inhiber les réactions de polymérisation. Cependant, diluer des échantillons diminue la sensibilité.

Deux couples d'amorces ont été comparés (CEV-PCRq-F1 – CEV-PCRq-R1 et CEV-TiHo-F1 – CEV-TiHo-R1) afin de choisir le plus sensible et spécifique (résultats non présentés). Les caractéristiques de toutes les amorces utilisées ainsi que leurs positions sont disponibles en annexes A et B (pages 129 et suivantes). La sensibilité des deux couples était similaire mais le couple TiHo présentait moins d'amplifications non spécifiques, il a donc été choisi. Après optimisation des conditions de qPCR, le seuil de détection est estimé à 10 copies pour 2 µl d'extrait ADN lorsque le volume réactionnel est de 25 µl et de 50 à 100 copies pour 2 µl d'extrait ADN lorsque le volume réactionnel est de 10 µl. Le mélange réactionnel pour un volume de réaction de 10 µl (ou 25 µl) est préparé ainsi : 1X de SYBR®Green Master Mix (Bio Rad Laboratories Inc.), 200 nM de chacune des deux amorces (TiHo_Sybr_qR – TiHo_Sybr-qF), 2 µl (ou 5 µl) d'échantillon et de l'eau nanopure qsp 10 µl (ou 25 µl). La réaction est d'abord réalisée dans 10 µl. Si aucune amplification n'est visible, celle-ci est répétée dans 25 µl, la sensibilité étant meilleure pour ce volume réactionnel.

Le programme d'amplification comporte une phase de dénaturation initiale de 2 minutes à 95 °C, 45 cycles en deux étapes (dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes et hybridation + élongation à 58 °C pendant 30 secondes), une phase de fusion (95 °C pendant 5 secondes, 65 °C pendant 60 secondes, 97 °C pendant 1 seconde) puis une étape de refroidissement à 40 °C. La fluorescence SYBR®Green est mesurée à chaque étape d'hybridation + élongation et durant l'étape de fusion finale. Les résultats sont traités à l'aide du logiciel associé au LightCycler® 96 Instrument : LightCycler® 96 software version 1.1.0.1320 – Roche Diagnostic International Ltd.

Trois conditions sont nécessaires pour considérer que l'amplification est spécifique et quantifier le nombre de copies ADN du CEV présentes :

- Les courbes de fluorescence des duplicats sont identiques (température et profil des courbes) ;
- Les courbes de fusion sont identiques à celles du contrôle positif ;
- Le Ct est inférieur à 40.

Si aucune amplification n'est visible ou si l'amplification est tardive (Ct > 40) et présente une courbe de fusion différente du contrôle positif, l'échantillon est considéré CEV-négatif.

Si le Ct est inférieur à 40 et que la courbe de fusion est différente de celle du contrôle positif, ou si le Ct est supérieur à 40, alors le résultat brut est douteux. Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % de ces produits est réalisée afin de conclure sur la positivité de l'échantillon (sans quantification). Le produit attendu mesure 200 pb. Pour des quantités de copies génome calculées inférieures à 10 copies, le résultat sera aussi considéré comme douteux (risque de contamination de l'échantillon).

2.3. Détection du CEV dans l'eau et les poches d'importation du Japon de 2019

L'objectif de cette partie est de déterminer si les importations de carpes Koï du Japon participent à la présence du CEV dans les infrastructures de la Pisciculture d'Estalens. Une fois lâchées dans les aquariums, les carpes Koï pourraient être contaminées par des particules virales qui circuleraient dans les installations. Ainsi, seuls les cadavres des carpes Koï arrivées mortes et l'intérieur des poches de transport (eau et écouvillons de poches de transport) peuvent être utilisés ici. Lors de l'importation de 2019, aucune carpe Koï n'est morte durant le transport, le CEV est donc recherché uniquement dans les prélèvements d'eau et les écouvillons de poches de transport.

Pour chaque lot importé ($n = 21$), environ 30 ml de l'eau de la poche de transport sont récoltés dans des pots dès l'ouverture de celle-ci. Une fois la poche vide et modérément égouttée, un écouvillon sec en bois recouvert de coton est frotté contre les parois internes de la poche, puis le bout est découpé et placé dans un tube Eppendorf® de 1,5 ml. Les pots et les tubes sont identifiés et congelés à -20 °C . Une fois transmis au laboratoire, 500 μl de PBS (phosphate buffered saline) sont ajoutés dans le tube contenant le bout de l'écouvillon et le tout est vortexé 3 fois 30 secondes. Le bout d'écouvillon est ensuite retiré et jeté. Les analyses ultérieures sont réalisées sur la suspension, avec ou sans stockage préalable à -20 °C . L'eau peut être analysée en l'état ou centrifugée. Dans ce cas, 25 ml d'eau sont centrifugés 4 min à 3000 rpm. Le surnageant est analysé en l'état alors que le culot muqueux est resuspendu dans du surnageant pour atteindre un volume total de 200 μl . L'ADN du CEV est recherché dans les différentes solutions selon le protocole de qPCR habituel (partie 2.2, page 37).

2.4. Durée d'excrétion du CEV au niveau du lot après importation ou apparition de signes cliniques

2.4.1. Choix des échantillons

L'évaluation de la durée d'excrétion post-importation du CEV (au niveau du lot) est réalisée sur quelques lots importés du Japon en 2019 pour lesquels la présence du CEV est confirmée. Une semaine après cette importation, des lots achetés quatre mois plus tôt chez un éleveur français sans antécédents de KSD ont présenté des signes cliniques évocateurs (perte d'équilibre marquée et « nage à reculons »), laissant supposer une contamination depuis les lots japonais. La durée d'excrétion du CEV après apparition de signes cliniques hors contexte d'importation est évaluée à partir d'un de ces lots français (2019-FR21G1). Dès l'apparition de signes cliniques de KSD chez un individu du lot, les carpes Koï sont placées dans un bain d'eau salée à 0,6 % et de bleu de méthylène (concentration non communiquée). Si le traitement est appliqué précocement, les signes cliniques disparaissent en moins de 24 heures. Pour les carpes Koï importées du Japon, celles-ci sont placées dans de l'eau salée à 0,3 % et reçoivent un traitement antiparasitaire et antibiotique dès leur arrivée, la concentration en sel est augmentée à 0,6 % si des signes cliniques de KSD apparaissent ou si le CEV est détecté dans l'eau ou les écouillons de poche de transport. Seuls certains individus des lots SK1 et ST ont présenté des signes cliniques de KSD (perte d'équilibre partielle et « nage à reculons ») parmi les lots importés du Japon en 2019. Le lot SK1 a présenté des signes cliniques sévères alors que le lot ST a présenté des signes cliniques légers.

Rechercher le CEV dans les cadavres permet uniquement d'évaluer la durée d'excrétion chez les poissons malades. Or ce sont les lots asymptomatiques qui sont les plus à même de propager le virus à l'extérieur des infrastructures par les ventes. A ce jour, aucune technique de détection non létale du CEV n'est publiée. Dans le cas de l'herpès-virose de la carpe [CyHV-3], il a été montré qu'il n'existe pas de différence significative de détection de l'ADN viral par qPCR entre des écouillons de branchies et des broyats de branchies (Bergmann et al. 2010). On recherche donc l'ADN du CEV dans les écouillons de branchies des carpes vivantes et, pour les lots à fort taux de mortalité, dans les broyats de branchies des cadavres.

Afin de limiter le stress des carpes Koï lors de la réalisation des écouvillons de branchies, il a été décidé en concertation avec la direction de la Pisciculture d'Estalens de ne pêcher que 5 carpes au hasard par lot, ce qui peut être fait en un à deux coups d'épuisettes. Si ces cinq prélèvements sont négatifs, on peut conclure avec 5 % d'erreur qu'au moins 50 % des individus sont CEV-négatives. Cela ne signifie donc pas que le CEV ne circule pas dans le lot.

Les écouvillons de branchies sont réalisés à partir de J+3 pour des lots provenant des éleveurs :

- Mi : ADN du CEV détecté dans des cadavres originaires de cet éleveur en 2018 ;
- SK : ADN du CEV détecté dans l'écouvillon de poche (résultats de la qPCR obtenus dans les 48 heures post-importation), mortalité et signes cliniques de KSD dans les 48 heures post-importation.

Sont ajoutés à partir de J+10 des lots provenant des éleveurs :

- OT : ADN du CEV détecté dans des cadavres originaires de cet éleveur en 2018 mais carpes Koï trop petites pour pouvoir être écouvillonnées à J+3 ;
- ST : apparition de signes cliniques de KSD à J+8 ;
- YS et OZ : ADN du CEV détecté dans l'eau d'importation.

Les lots SK1 et SK2 présentent des taux de mortalité élevés : le CEV est également recherché dans les broyats de branchies des cadavres de ces lots (mêmes protocoles que dans la partie 2.2, page 37). Le détail des prélèvements réalisés est donné dans le Tableau 4 (page 43).

Tableau 4 : Prélèvements réalisés en 2019 dans le cadre de l'étude de la durée d'excrétion du CEV post-importation

Eleveur	Mortalité dans les 48 heures post-importation	ADN du CEV détecté dans l'écouvillon de poche d'importation	ADN du CEV détecté les années précédentes	ADN du CEV détecté dans l'eau d'importation	Choix d'échantillonnage (EB : écouvillon de branchies)
SK (6 lots)	5 lots Signes cliniques de KSD dans le lot SK1	5 lots	Non (1 ^{ère} importation)	Oui pour les 6 lots	- EB des lots SK1, SK2 et SK3 à partir de J+3 - Broyat de branchies de tous les cadavres des lots SK1, SK2 et SK3
OT (4 lot)	1 lot	Uniquement lot OT3 (sur 4 lots)	Oui (2018)	Non	EB des lots OT3 et OT4 à partir de J+10 (trop petites à J+3)
Mi (2 lots)	Non	Non	Oui (2018)	Oui pour Mi1	EB du lot Mi2 à partir de J+3
YS (1 lot)	Non	Non	Non (1 ^{ère} importation)	Oui	EB du lot YS à partir de J+10
ST (1 lot)	Non	Non	Non (1 ^{ère} importation)	Oui	EB du lot ST à partir de J+10
OZ (4 lots)	Non	Oui	Non	Oui	EB du lot OZ1 à partir de J+10

Parmi les lots achetés en France et ayant présenté des signes clinique évocateurs de la KSD la semaine suivant l'importation de carpes Koï du Japon de 2019, le lot 2019-FR21G1 est choisi pour réaliser des écouvillons de branchies et pour analyser les broyats de branchies de tous les individus morts de ce lot. Les signes cliniques sont apparus 8 jours après l'importation des carpes Koï japonaises. Les écouvillons de branchies sont réalisés en même temps que pour les lots japonais, soit 10, 15, 24 et 39 jours post-importation.

2.4.2. Réalisation et préparation des écouvillons de branchies

Une attention particulière est portée sur le risque de transmission de pathogènes, notamment du CEV, d'un lot à l'autre. Le manipulateur se lave les mains et les avant-bras à l'eau et au savon, puis les désinfecte avec du gel hydro-alcoolique avant et après manipulation d'un lot. Tout le matériel utilisé doit être à usage unique ou désinfecté par trempage dans une solution de Virkon® S à 1 % pendant 10 min.

Les carpes Koï sont légèrement anesthésiées (début de perte d'équilibration) par bain dans une solution de phénoxyéthanol (dosage par titration). Les écailles et la couche de mucus sont fragiles, le manipulateur doit donc impérativement porter des gants pour limiter les lésions cutanées lorsqu'il tient les carpes (Noga 2010). Les individus sont ici de petite taille et peuvent être maintenus dans la paume d'une main. Alors que le pouce de cette main soulève l'opercule, l'écouvillon préalablement humidifié est glissé par l'autre main entre l'opercule et l'arc branchial externe, puis tourné sur lui-même une dizaine de fois. La présence de sang sur l'écouvillon n'est pas souhaitée. Le bout de l'écouvillon est ensuite coupé et placé dans un tube Eppendorf® de 1,5 ml. Chaque tube est identifié et congelé à -20°C .

Une fois transmis au laboratoire, 500 μl de PBS (Phosphate buffered saline) sont ajoutés dans le tube contenant le bout de l'écouvillon et le tout est vortexé 3 fois 30 secondes. Le bout d'écouvillon est ensuite retiré et jeté et les analyses ultérieures sont réalisées sur la suspension. Des pools des surnageants des cinq écouvillons sont réalisés pour les lots japonais alors que les écouvillons du lot français sont analysés individuellement. Les extractions d'ADN et les amplifications par qPCR sont réalisées en suivant le protocole de la partie 2.2.3 (page 38).

2.5. Suivi des contaminations inter-lots par comparaison des séquences nucléotidiques du CEV

2.5.1. Choix des échantillons

L'objectif de cette partie est de déterminer l'origine de la contamination des différents lots CEV positifs. Trois cas de figure se présentent :

1. Lots importés du Japon en avril 2019 et testés CEV-positifs dans le mois suivant l'importation ;
2. Lots français ayant présenté des signes cliniques de KSD une semaine après cette importation du Japon ;
3. Lots japonais et français ayant présenté des signes cliniques de KSD en février 2020.

Dans le premier cas de figure, la question est de savoir si les carpes Koï ont été contaminées avant leur expédition, auquel cas le CEV détecté dans les prélèvements de carpe après leur arrivée devrait être génétiquement identique à ceux présents dans l'eau et les écouvillons de poche d'importation. Dans le second cas, une contamination des lots français par les lots japonais récemment importés et excréant du CEV est fortement soupçonnée. Si tel est le cas, le CEV détecté chez les carpes Koï françaises devrait être génétiquement identique à celui détecté chez des carpes Koï japonaises. Enfin, dans le troisième cas, des signes cliniques de KSD ont été observés dans plusieurs lots originaires du Japon (importation d'avril 2019) ou de France. Le CEV avait été détecté dans plusieurs des lots japonais au moment de leur importation, soit 9 mois plus tôt. Deux hypothèses peuvent expliquer cette épizootie : le CEV circulait à bas bruit dans chaque lot et un facteur externe a entraîné l'apparition de signes cliniques (pour chaque aquarium, CEV génétiquement identique à celui détecté lors de l'importation) ou bien un premier lot a été contaminé et le CEV s'est propagé de proche en proche (un seul variant génétique détecté dans tous les aquariums, potentiellement différent du CEV détecté lors de l'importation de chaque lot).

Plusieurs échantillons datant de 2017 (éleveurs Hi et HW) et de 2018 (éleveurs Mi et OT) sont analysés afin de servir de base de comparaison au cas où le CEV circulerait à bas bruit dans les infrastructures indépendamment des importations en provenance du Japon.

Afin de déterminer si les lots importés du Japon étaient contaminés avant leur importation, l'idéal aurait été pour chaque lot de pouvoir comparer la séquence nucléotidique du CEV détectée dans l'eau ou les écouvillons de poche d'importation avec celle détectée sur des carpes Koï (broyats ou écouvillons de branchies). Cependant, les charges virales de certains échantillons étaient trop faibles pour permettre ce séquençage. Ainsi, cette comparaison n'est réalisable que pour l'éleveur OT et l'éleveur SK (Tableau 5, page 47). Deux échantillons obtenus à partir des lots français ayant présenté des signes cliniques de KSD la semaine suivant l'importation du Japon sont également analysés : 2019-FR21G1.EB13.4n°5 et 2019-mag.n°1.

En février et mars 2020, des carpes Koï réparties dans 14 aquariums, majoritairement importées du Japon en avril 2019, ont présenté des signes cliniques évocateurs de la KSD (perte d'équilibration partielle, nage « à reculons »). Dès lors qu'un individu présente au moins un de ces signes, l'aquarium entier est traité par bain d'eau salée (NaCl 0,6 %) et de bleu de méthylène. De plus l'aliment est enrichi en spiruline et en vitamines (spécialités non communiquées). Les signes cliniques régressent dans les 24 heures suivant l'application du traitement, bien que la mortalité puisse perdurer plus longtemps. Les lots initiaux ont pu être divisés ou regroupés en fonction de la croissance des individus et des ventes. La Figure 7 (page 48) donne la composition de chaque aquarium en février – mars 2020 en reprenant les codes des lots d'importation ainsi que la chronologie d'apparition des signes cliniques de KSD. Pour des raisons logistiques, peu de prélèvements ont pu être réalisés : eau de l'aquarium après détection des signes cliniques et avant traitement pour les aquariums 19D3 (lot OZ1) et 18G3 (lot ST) ; écouvillons de branchies de carpes Koï pour les aquariums 17D1 (lot OT3), 18G3 (lot ST) et 19D1 (lot OZ3). L'ADN du CEV a été recherché dans ces prélèvements par qPCR et détecté dans l'eau de l'aquarium et les 5 écouvillons de branchies de l'aquarium 18G3, dans 1 écouvillon de branchies sur 5 de l'aquarium 17D1 et dans 3 écouvillons de branchies sur 4 de l'aquarium 19D1. L'idéal aurait été de séquencer tous ces prélèvements afin de les comparer entre eux et aux séquences nucléotidiques des échantillons CEV-positifs des lots d'origine. Cependant, les charges virales de nombreux échantillons étaient trop faibles pour permettre ce séquençage.

Tableau 5 : Identité et origine des échantillons utilisés pour le séquençage nucléotidique (P4a partial cds)

EP : écouvillon de poche. Eau : eau de poche. EB : écouvillon de branchie. Les autres : broyats de branchies.

Fournisseur	Année	Lot	Environnement de transport	Carpe Koï post-importation	Carpe Koï hors importation
Hi et/ou HW	2017	NA		2017-6 2017-9 2017-11 2017-16	2017-8 2017-10 2017-14 2017-17
Mi	2018	2018-Mi5		2018-33	
K	2019	2019-K2	2019-K2-eau		
OZ	2019	2019-OZ1	2019-OZ1-eau		2020-fév-19D1EBn°4
		2019-OZ4	2019-OZ4-eau		
SK	2019	2019-SK1	2019-SK1-eau	2019-SK1-23.4 n°1 2019-SK1-25.4 n°2	
		2019-SK2	2019-SK2-eau		
		2019-SK3	2019-SK3-eau		
		2019-SK4		2019-SK4-3.4	
		2019-SK6	2019-SK6-eau		
OT	2018	2018-OT		2018-19	
	2019	2019-OT3	2019-OT3-EP	2019-OT3-EB.13.4n°4	
		2019-OT4		2019-OT4-EB.13.4n°2	
ST	2019	2019-ST	2019-ST-eau		2020-fév-18G3EBn°5
France	2019	2019-FR21G1	Non importé du Japon		2019-FR21G1-EB.13.4n°5
France	2019	2019 - Mag	Non importé du Japon		2019-mag.n°1

24D1 : vide	24D2 : vide	24D3 : vide
23G1 : OT 29/02/2020 (12)	23G2 : ♂ repros 03/03/2020 (13)	13G3 : vide
Allée numéro 23		
23D1 : vide	23D2 : vide	23D3 : vide
22G1 : vide	22G2 : vide	22G3 : vide
Allée numéro 22		
22D1 : vide	22D2 : vide	22D3 : vide
21G1 : vide	21G2 : vide	21G3 : vide
Allée numéro 21		
21D1 : vide	21D2 : vide	21D3 : vide
20G1 : vide	20G2 : vide	20G3 : vide
Allée numéro 20		
20D1 : SK3	20D2 : SK2	20D3 : SK1
19G1 : SK6 22/02/2020 (8)	19G2 : SK5	19G3 : SK2 + SK4 + SK5
Allée numéro 19		
19D1 : OZ3 21/02/2020 (7) *	19D2 : OZ2 + OZ3 14/02/2020 (3)	19D3 : OZ1 11/02/2020 (1) +
18G1 : OZ4	18G2 : vide	18G3 : ST 11/02/2020 (2) * +
Allée numéro 18		
18D1 : vide	18D2 : ST 15/02/2020 (4)	18D3 : YS
17G1 : K2 + K1 23/02/2020 (10)	17G2 : OT1 17/02/2020 (5)	17G3 : vide
Allée numéro 17		
17D1 : OT3 27/02/2020 (11)*	17D2 : OT2 19/02/2020 (6)	17D3 : vide
16G1 : vide	16G2 : vide	16G3 : OT1+OT4 22/02/2020 (9)
Allée numéro 16		
16D1 : MK 05/03/2020 (14)	16D2 : SK3	16D3 : vide
15G1 : SK1	15G2 : SK2 + SK4 + SK6	15G3 : SK2 + SK4 + SK5 + SK6
Allée numéro 15		
15D1 : FR	15D2 : vide	15D3 : vide

Figure 7 : Composition des aquariums des allées 15 à 24 lors de l'épisode de KSD clinique de février - mars 2020

La composition des aquariums est fondée sur la nomenclature des lots lors de l'importation du Japon d'avril 2019. Les lots non issus de cette importation sont regroupés sous le nom « FR » s'ils sont issus d'élevages français et « ♂ repros » pour un regroupement d'individus importés en 2017 et 2018 issus d'éleveurs japonais. Les lots ayant présenté des signes cliniques de KSD précédemment ou pour lesquels l'ADN du CEV a été détecté soit dans l'eau ou l'écouvillon de poche d'importation soit dans un ou plusieurs écouvillons de branchies/cadavres sont soulignés et en gras ; les autres sont en italique. Lors de signes cliniques de KSD en février-mars 2020, la date (et l'ordre) d'apparition de ces signes est notée. En rouge : signes cliniques apparus entre le 11 et le 15 février 2020. En orange foncé : signes cliniques apparus entre le 17 et le 22 février 2020. En orange clair : signes cliniques apparus entre le 23 et le 29 février 2020. En Jaune : signes cliniques apparus entre le 3 et le 5 mars 2020. En bleu : absence de signes cliniques de KSD. * : aquariums pour lesquels des écouvillons de branchies ont été réalisés. + : aquariums pour lesquels un prélèvement d'eau a été fait.

2.5.2. Séquençage SANGER (P4a partial cds) et analyse phylogénétique

Afin de pouvoir comparer les séquences nucléotidiques obtenues ici avec celles précédemment publiées, le séquençage est fait sur une partie du gène codant le précurseur de la protéine de *core 4a*. La PCR nichée utilisée pour obtenir cette partie permet d'amplifier tous les génogroupes du CEV connus à ce jour (Adamek, Matras, et al. 2017 ; Soliman et al. 2019). Les couples d'amorces utilisés sont CEV-for-B – CEV-rev-J (amplicon de 538 pb attendu) et CEV-for-B-int – CEV-rev-J-int (produit de 488 pb attendu). Les caractéristiques des amorces sont en annexe A, le positionnement des amorces sur la séquence CyPP-3 publiée par Oyamatsu dans la Figure 5 (page 23).

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume de 50 µl contenant 1,0 µl de Kapa Taq (Sigma Aldrich), 1X du tampon A associé, 1 µl de dNTP à 10 mM, 2 µl de MgCl₂ à 25 mM, 2,5 µl de chacune des deux amorces à 10 µM, 28 µl d'eau nanopure et 4 µl de l'extrait ADN à amplifier. Le programme d'amplification est le même pour les deux couples d'amorces utilisés et comporte une phase de dénaturation de 2 minutes à 95 °C suivie de 40 cycles (dénaturation : 30 secondes à 95°C ; hybridation 1 minute à 55°C ; élongation 30 secondes à 72°C) et d'une phase d'élongation finale de 30 secondes à 72°C.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % de 5 µl des produits de la première étape de la PCR nichée est réalisée. Si la bande attendue à 538 pb n'est pas visible ou difficilement visible, la seconde étape de la PCR nichée est faite et une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée avec 5 µl des nouveaux produits (taille attendue : 488 pb). Pour chaque produit, si une bande est clairement visible sur le gel d'agarose à la taille attendue, alors une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % est réalisée avec le volume restant du produit puis la bande est découpée et l'ADN purifié grâce au kit NucleoSpin® gel and PCR clean up (Macherey-Nagel). La concentration en ADN du produit purifié ensuite est mesurée par spectrophotométrie (CLARIOStar Plus – GMB Labtech). Pour chaque échantillon, deux séquençages SANGER sont faits : un avec l'amorce sens (CEV-for-B ou CEV-for-B-int) et un autre avec l'amorce anti-sens (CEV-rev-J ou CEV-rev-J-int).

La séquence codante complète du gène P4a, mesurant 2028 pb, a été publiée dans la base de données GenBank® en août 2019 sous le numéro d'accès MH645915. Cette séquence est utilisée comme référence pour aligner les séquences

obtenues et numéroter la position des SNP. Le logiciel MegaX (Kumar et al. 2018) est utilisé pour aligner les séquences et réaliser les comparaisons deux à deux.

De la même manière, ces séquences sont alignées avec les séquences « P4a partial cds » et « P4a complete cds » présentes dans la base de données Genbank®, ainsi qu'avec la séquence CyPP-3 publiée par Oyamatsu dans sa thèse de doctorat. Les séquences ne recouvrant pas la plus courte séquence obtenue dans notre étude ainsi que les séquences présentant des polymorphismes sont exclues. Parmi les séquences restantes, 37 séquences réparties parmi les génogroupes I et II et provenant de différents pays sont choisies. Les quelques séquences considérées comme appartenant au génogroupe III détectées en Autriche (Soliman et al. 2019) étaient trop courtes pour être intégrées dans cette analyse. Parmi les séquences obtenues dans notre étude, les séquences présentant un seul site polymorphique sont dédoublées, les séquences présentant plusieurs sites de polymorphisme sont exclues.

Toutes les séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique (n = 56) sont tronquées de manière à être de même taille et alignées (408 nucléotides, positions 226 – 633). L'analyse phylogénétique est effectuée à l'aide du logiciel MegaX (Kumar et al. 2018) en utilisant la méthode de vraisemblance maximale et le modèle Tamura – 3 paramètres (Tamura 1992) avec une distribution gamma discrète (+G, 5 catégories) et des sites invariants (+I).

3. Résultats

3.1. Détection du CEV dans des lots cliniquement suspects de KSD en 2017 et 2018

Les 15 échantillons de carpes Koï issus de l'importation de 2017 sont CEV-positifs (moyenne : $9,8 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^5$ copies CEV pour 250 ng d'ADN ; min = $5,3 \cdot 10^2$; max = $4,0 \cdot 10^5$). La suspicion clinique était forte pour les deux lots d'origine des échantillons de 2017. Au contraire, les échantillons de 2018 provenaient de lots aux statuts variables : sur les 25 échantillons de 2018, 4 échantillons sont CEV-positifs (Tableau 6, page 52).

La plupart (15/16) des échantillons associés à des lots fortement suspects de la KSD (++) sont CEV-positifs. Tous les échantillons (7) associés à un lot non-suspect de la KSD (-) sont CEV-négatifs. Cependant, 5/6 échantillons provenant de lots moyennement (+) suspects de la KSD sont CEV-négatifs et 3/9 échantillons provenant de lots faiblement suspects (+/-) sont CEV-positifs (Figure 8). **Bien que l'on retrouve plus d'échantillons CEV-positifs parmi les lots les plus cliniquement suspects de la KSD et uniquement des échantillons CEV-négatifs parmi les lots cliniquement non-suspects de la KSD, il n'existe pas de dichotomie franche.**

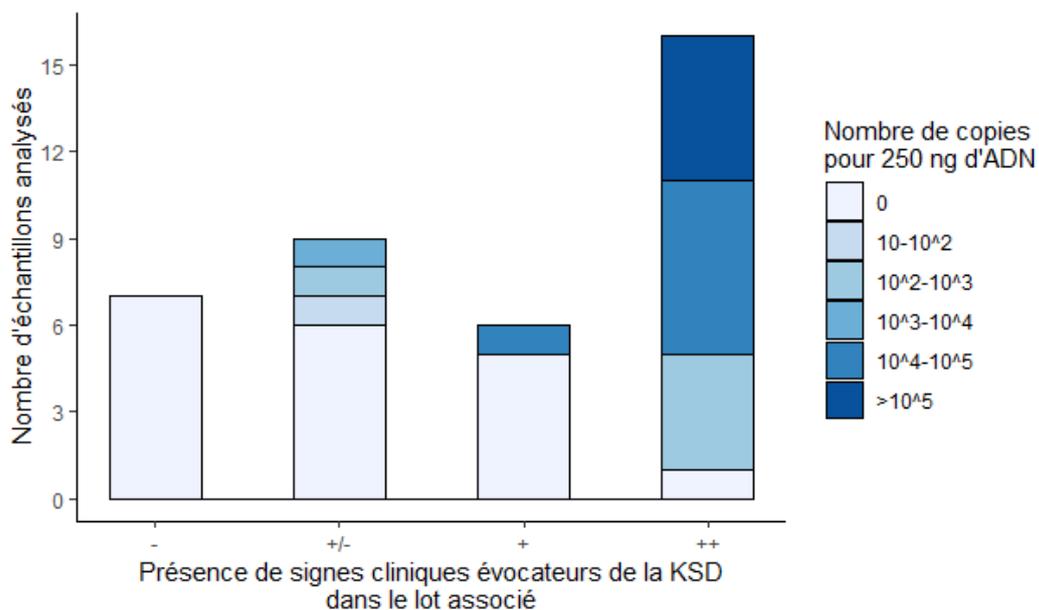


Figure 8 : Charge en CEV des échantillons de carpes Koï importées en 2017 et 2018 en fonction de la présomption clinique de KSD associée au lot.

Tableau 6 : Charges en CEV et observations cliniques associées aux échantillons issus des importations de 2017 et 2018

Surlignés en bleu : échantillons de 2017 CEV-positifs ; surlignés en rose : échantillons de 2018 CEV-positifs

Identification des prélèvements	Code lot	Nombre de carpes par échantillon	Délai entre l'arrivée et la mort (en jours)	Signes cliniques KSD dans le lot (-, +/-, +, ++)	Taux de mortalité du lot	Copies ADN (CEV) pour 250 ng d'ADN
2017-1	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	1,66E+04
2017-2	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	6,04E+02
2017-6	HI	1	10 à 21	++	44 %	4,58E+04
2017-7	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	2,12E+04
2017-8	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	1,90E+05
2017-9	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	3,03E+05
2017-10	HI	1	10 à 21	++	44 %	3,60E+04
2017-11	HI	1	10 à 21	++	44 %	1,74E+05
2017-12	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	5,28E+02
2017-13	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	8,97E+02
2017-14	HI	1	10 à 21	++	44 %	4,01E+04
2017-15	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	9,95E+04
2017-16	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	4,02E+05
2017-17	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	9,70E+02
2017-18	HW ou HI	1	10 à 21	++	100 ou 44 %	1,44E+05
2018-19	OT	8	7	+	5 % (9/175)	1,00E+04
2018-20	Mi1	2	0	+/-	2 % (2/100)	0,00E+00
2018-21	Mi2	1	4	+/-	1 % (1/100)	1,79E+02
2018-22	SK1	1	66	-	8 % (6/79)	0,00E+00
2018-23	Ym	1	67	-	6 % (3/50)	0,00E+00
2018-24	Mi3	3	0	+/-	4 % (4/100)	0,00E+00
2018-25	OZ	1	63	-	5 % (7/140)	0,00E+00
2018-26	KD	1	64	+	58 % (35/60)	0,00E+00
2018-27	Mi4	1	6	+/-	3 % (3/100)	0,00E+00
2018-28	Mi4	1	9	+/-	3 % (3/100)	0,00E+00
2018-29	Mi4	1	5	+/-	3 % (3/100)	0,00E+00
2018-31	Mi3	1	4	+/-	4 % (4/100)	0,00E+00
2018-32	MK	1	59	+	42% (59/140)	0,00E+00
2018-33	Mi5	1	1	+/-	1 % (1/100)	4,30E+03
2018-34	Mi6	1	4	+/-	1 % (1/100)	1,80E+01
2018-36	KD	1	56	+	58 % (35/60)	0,00E+00
2018-37	KD	1	61	+	58 % (35/60)	0,00E+00
2018-38	KD	1	63	+	58 % (35/60)	0,00E+00
2018-39	YG	1	94	-	7 % (3/43)	0,00E+00
2018-40	ST	1	59	-	1 % (9/80)	0,00E+00
2018-41	SK2	1	100 (A sauté hors de l'aquarium)	-	20 % (18/90)	0,00E+00
2018-42	YG	1	67	-	7 % (3/43)	0,00E+00
2018-43	MR	1	95	++	4 % (4/100)	0,00E+00

Bien que la majorité des lots CEV-positifs (15/19), correspondant aux échantillons de 2017, soient associés à des taux de mortalités supérieurs à 44 %, on observe également des échantillons CEV-positifs (4) parmi les lots présentant moins de 10 % de mortalité (échantillons de 2018). De plus, les échantillons CEV-négatifs proviennent de toutes les classes de mortalité (Figure 9). **La positivité des échantillons n'est pas corrélée au taux de mortalité.**

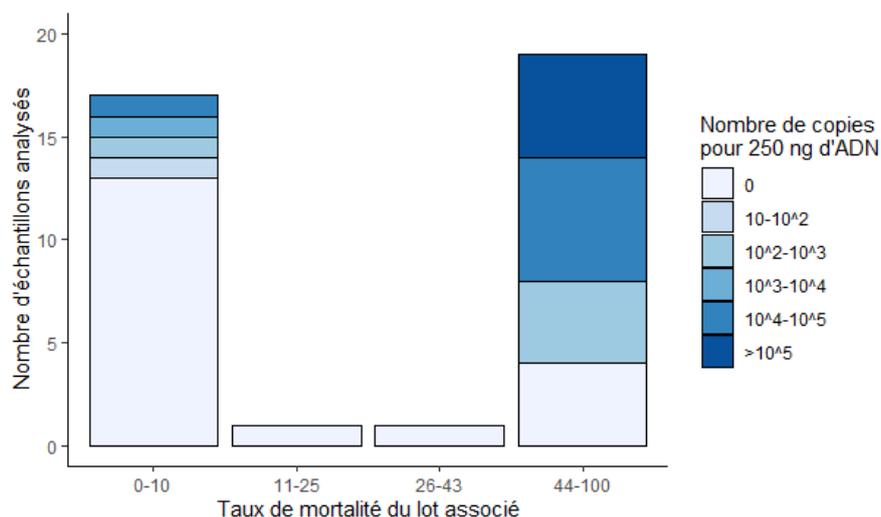


Figure 9 : Charge en CEV des échantillons de carpes Koï importées en 2017 et 2018 en fonction du taux de mortalité du lot de provenance

Tous les échantillons CEV-positifs correspondent à des carpes Koï mortes dans les 21 jours suivant leur importation (Figure 10). Les 6 échantillons CEV-négatifs correspondant à des carpes mortes moins de 10 jours après leur importation sont associés à des lots ayant présenté peu de signes évocateurs de la KSD (+/-) et peu de mortalité (maximum 4 %). Les échantillons CEV-négatifs associés à des délais arrivée-mort supérieurs à 21 jours sont associés à des taux de mortalité et des signes cliniques variables (Tableau 6, page 52).

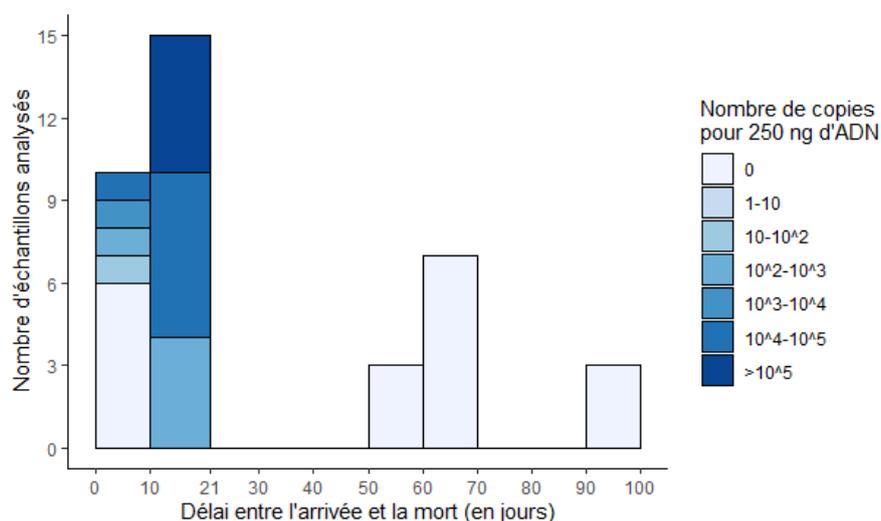


Figure 10 : Charge en CEV des échantillons de carpes Koï importées en 2017 et 2018 en fonction du délai entre l'arrivée et la mort

3.2. Détection du CEV dans l'eau et les poches d'importation du Japon de 2019

Sur 21 échantillons analysés, l'ADN du CEV est détectable dans l'eau de transport pour 13 d'entre eux et dans l'écouvillon de la poche de transport pour 10. Pour 4 échantillons, l'ADN du CEV est détectable dans l'eau de transport mais pas dans l'écouvillon de poche. Au contraire, l'ADN du CEV est détectable uniquement dans l'écouvillon de poche pour un échantillon (Figure 11a).

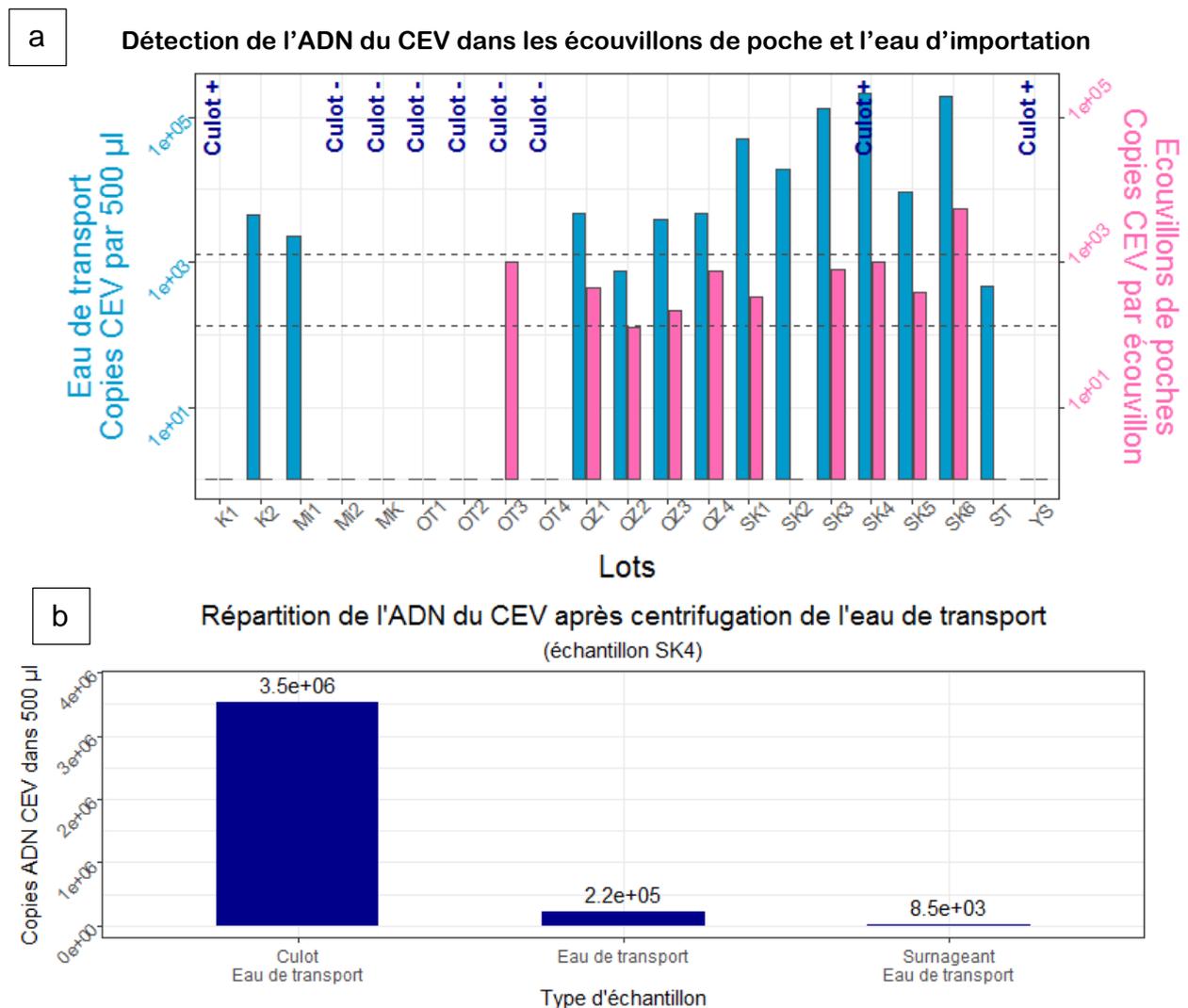


Figure 11 : Détection de l'ADN du CEV dans les écouvillons de poche et l'eau de transport et répartition de l'ADN du CEV après centrifugation de l'eau de transport.

(a) Lorsque l'ADN du CEV n'est pas détectable dans l'eau, celle-ci a été centrifugée et le résultat de la qPCR sur culot est ajouté. Les lignes horizontales montrent les limites de sensibilité du protocole de qPCR utilisé : le seuil de détection est estimé à $1,3 \cdot 10^3$ copies ADN du CEV pour 500 µl d'eau / par écouvillon (10 copies génome pour 2 µl d'extrait ADN). La ligne à $1,3 \cdot 10^2$ copies ADN du CEV pour 500 µl d'eau / par écouvillon correspond à 1 copie génome pour 2 µl, seuil en dessous duquel l'ADN du CEV ne peut jamais être détecté. (b) La centrifugation de l'eau de transport permet de concentrer l'ADN dans le culot : par rapport à l'eau de transport, la concentration en ADN du CEV est 16 fois plus grande dans le culot et 25 fois plus faible dans le surnageant.

La concentration en ADN du CEV la plus élevée est obtenue à partir de l'échantillon SK4. Cet échantillon est utilisé pour tester l'hypothèse selon laquelle le CEV se concentre dans le culot muqueux après centrifugation de l'eau de transport. Le culot apparait 16 fois plus concentré que l'eau de transport et le surnageant est 25 fois moins concentré que l'eau de transport (Figure 11b). L'ADN du CEV peut donc être recherché dans le culot de l'eau de transport lorsqu'il est non détectable dans l'eau de transport.

L'ADN du CEV est détecté dans le culot de l'eau de transport de 2 lots (K1 et YS) pour lesquels il n'était pas détectable ni dans l'eau de transport avant centrifugation ni dans l'écouvillon de poche. Les quantités d'ADN du CEV étaient trop faibles pour permettre une quantification. Au contraire, il n'est pas détecté dans 6 lots dont un (OT3) pour lequel l'écouvillon de poche était pourtant CEV-positif (Figure 11, page 54).

La ligne tracée dans la Figure 11a à $1,3 \cdot 10^2$ copies pour 500 μ l d'eau / par écouvillon de poche correspond à 1 copie pour 2 μ l d'extrait ADN alors que la ligne tracée à $1,3 \cdot 10^3$ copies correspond à 10 copies pour 2 μ l d'extrait ADN, soit le seuil de détection de la qPCR utilisée. La spécificité de toutes ces amplifications a été confirmée par l'analyse des courbes de fusion et par la présence d'une bande de taille attendue (200 pb) lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Des concentrations aussi faibles pourraient être la conséquence de contaminations lors du traitement des échantillons. Les échantillons d'eau K2, OZ1, OZ4, SK1, SK2, SK3, SK6 et ST ainsi que l'écouvillon de poche OT3 ont cependant été séquencés et présentent des séquences nucléotidiques différentes entre les éleveurs, voire entre les lots d'un même éleveur, ce qui exclut une contamination (cf. Tableau 8, page 64). Pour les lots OZ2 et OZ3, le fait que le CEV ait été détecté dans deux prélèvements indépendant pour chaque lot, ainsi que le fait d'avoir une séquence propre aux lots OZ1 et OZ4 est en défaveur d'une contamination. Concernant le lot Mi1, le CEV détecté n'a pas été séquencé donc on ne peut exclure avec certitude une contamination. Cependant, le CEV a été détecté dans des cadavres de plusieurs lots provenant de cet éleveur en 2018 (cf. Tableau 6, page 52), il ne serait donc pas étonnant de détecter de l'ADN du CEV dans l'eau d'importation d'un lot provenant de cet éleveur en 2019. Les charges virales présentes dans les culots K2 et YS étaient trop faibles pour être séquencées. Toutefois, le culot SK4 ayant été réalisé précédemment, seuls des échantillons pour lesquels l'ADN du CEV n'était pas détectable dans l'eau ont été traités simultanément

et une contamination à partir de ces échantillons est peu vraisemblable, tout comme une contamination lors de la préparation de la qPCR par la gamme qui est déposée dans des barrettes séparées et ce après avoir fermé les barrettes contenant les échantillons. De plus, l'ADN du CEV ayant été détecté (et séquencé) dans l'eau du lot K2, le détecter aussi dans le lot K1 semble logique. L'ADN du CEV ayant déjà été détecté en provenance de 6 éleveurs, géographiquement proches (Figure 16, page 69), sur un total de 8, et ce souvent dans des concentrations très faibles, il n'est pas étonnant de le détecter dans le culot du lot provenant de l'éleveur YS. Bien qu'une contamination de paillasse ne puisse être exclue avec certitude, la présence du CEV dans le lot YS est vraisemblable.

Bien que la présence du CEV ait pu être démontrée dans les poches de transport de la majorité des lots importés, les charges virales étaient souvent très faibles, en dessous du seuil de détection de la qPCR utilisée, ce qui semble montrer un manque de sensibilité de ce protocole. Il est ainsi probable que plusieurs échantillons paraissant CEV-négatifs soient de faux-négatifs pour lesquels les charges présentes sont trop faibles pour être détectées. Il apparaîtrait donc inapproprié d'utiliser ce protocole pour exclure la présence du CEV dans un lot.

<p>Lors de cette importation de carpes Koï en provenance du Japon, l'ADN du CEV est détecté dans l'eau (culot compris) ou l'écouvillon de poche de 16 lots sur 21, provenant de 7 éleveurs différents sur un total de 8.</p>

3.3. Durée d'excrétion du CEV au niveau du lot après importation ou apparition de signes cliniques

3.3.1. Durée d'excrétion post-importation depuis le Japon

Les lots SK1, SK2 et SK3 proviennent tous trois de l'éleveur SK : le lot SK1 contient 60 individus de 13 – 15 cm d'une variété en couleur pure ; les lots SK2 et SK3 contiennent chacun 70 individus de 12 – 14 cm de deux autres variétés.

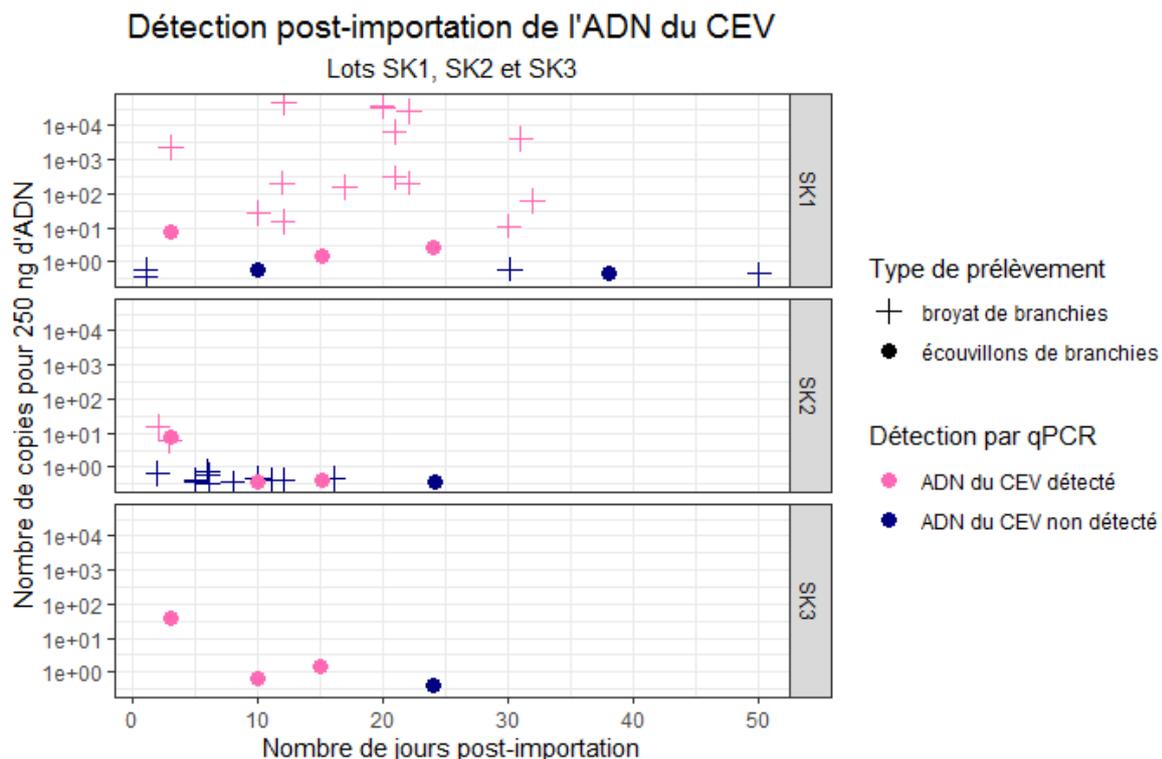


Figure 12 : Cinétique d'excrétion du CEV des lots SK1, SK2 et SK3
L'ADN du CEV a été recherché par qPCR dans les broyats de branchies de toutes les carpes Koï des lots SK1, SK2 et SK3 mortes dans les 50 jours ayant suivi leur arrivée ainsi que dans les pools d'écouvillons de branchies de 5 carpes Koï vivantes asymptomatiques réalisés à J+3, J+10, J+15, J+24, et J+39 pour le lot SK1. La mortalité des lots SK1, SK2 et SK3 dans les 60 jours ayant suivi l'importation s'élève respectivement à 30 %, 18,6 % et 0 %. Seul le lot SK1 présentait des signes cliniques évocateurs de la KSD.

La plupart des individus du **lot SK1** ont présenté une léthargie modérée à marquée, une dysorexie marquée et une bradypnée légère accompagnée de phases de quelques secondes d'absence de mouvement et de perte d'équilibre. Dans les 50 jours suivant l'importation, 18 carpes de ce lot sont mortes (taux de mortalité : 30 %). L'ADN du CEV a été détecté dans les branchies de 14 carpes Koï sur 18 mortes. Les concentrations en ADN du CEV étaient comprises entre 10¹ et 10⁵ copies pour 250 ng d'ADN total extrait. Les pools d'écouvillons de branchies contenaient moins de 10

copies CEV pour 250 ng d'ADN total extrait à J+3, J+15 et J+24 et étaient négatifs à J+10 et J+39. La spécificité de l'amplification des échantillons faiblement positifs a été confirmée par l'analyse de la courbe de fusion de la qPCR et par la présence d'une bande de taille attendue lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Bien qu'une contamination ne puisse être écartée sur des charges aussi faibles, il est logique de détecter l'ADN du CEV dans un lot présentant des signes cliniques de KSD, d'autant plus que certains échantillons prélevés aux mêmes dates présentent des charges élevées. Le fait que 5 écouvillons de branchies soient négatifs implique que le lot contient entre 0 et 50 % de poissons excréteurs. Ainsi, à J+10, moins de la moitié des poissons étaient excréteurs, alors même que le CEV a pu être détecté dans des cadavres jusqu'à J+31. Ainsi, de nombreux prélèvements peuvent être négatifs ou faiblement positifs alors même que certains individus du même lot présentent des signes cliniques de KSD et que de la mortalité (avec charge élevée en CEV) est observée.

Aucun signe clinique évocateur de la KSD n'a été observé chez les individus du **lot SK2**. Cependant 13 individus sont morts (taux de mortalité : 18,6 %). L'ADN du CEV n'a pu être détecté qu'en petite quantité (moins de 10^1 copies pour 250 ng d'ADN) dans les broyats de branchies des 2 carpes Koï mortes à J+2 et J+3 et dans les écouvillons de branchies entre J+3 et J+15. Le lot **SK3** n'a pas présenté de signes cliniques évocateurs de KSD ni de mortalité. L'ADN du CEV a été détecté dans les écouvillons de branchies entre J+3 et J+15 dans des concentrations comparables à celles retrouvées dans les écouvillons des lots SK1 et SK2. Là encore, on ne peut exclure que des charges aussi faibles ne soient le résultat de contaminations. Compte tenu des charges virales importantes (10^4 à 10^5 copies CEV pour 500 μ l d'eau) détectées dans l'eau des poches provenant de l'éleveur SK, il est étonnant de ne pas détecter des charges virales importantes dans les écouvillons de branchies et dans les broyats de branchies, au moins dans les premiers jours ayant suivi l'importation.

Les lots OT3 et OT4 proviennent tous les deux de l'éleveur OT et contiennent chacun 150 carpes Koï de 5 - 7 cm en mélange de variétés. Les lots Mi2 et YS proviennent de deux éleveurs différents, respectivement Mi et YS et contiennent chacun 100 individus de 10 - 12 cm. Les lots YS et ST proviennent de deux éleveurs différents du même nom et contiennent chacun 70 carpes de 12 - 15 cm.

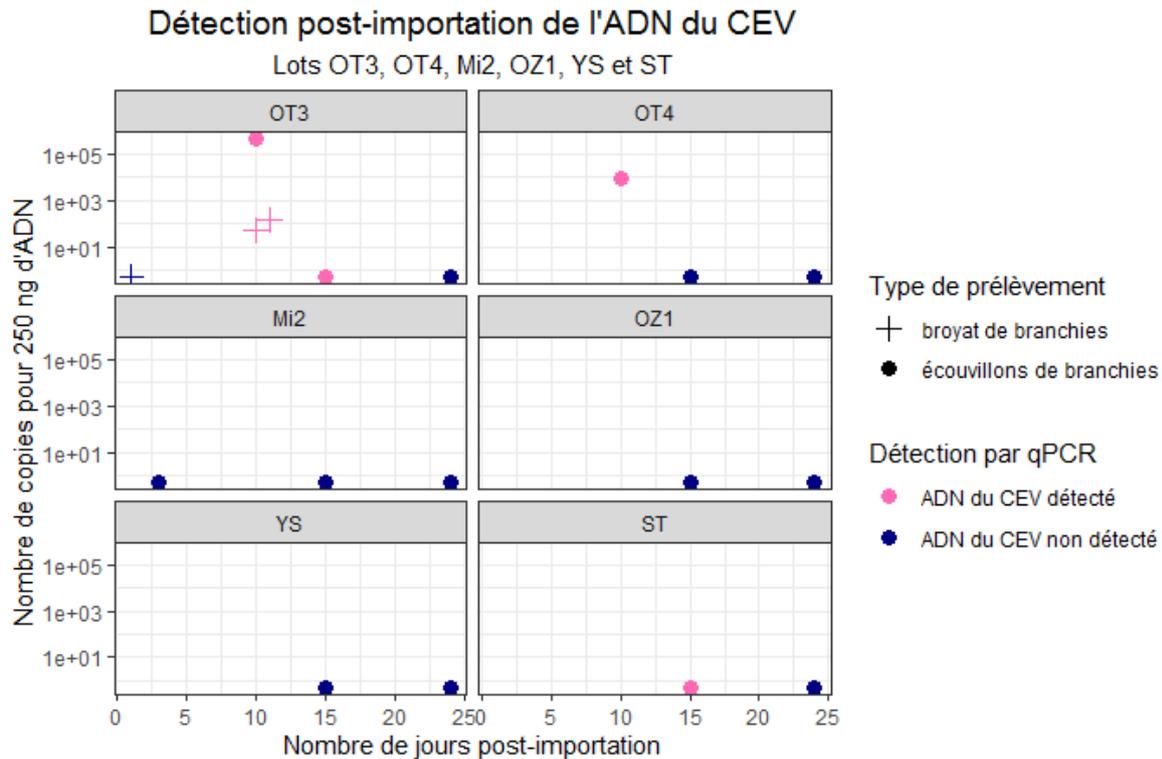


Figure 13 : Cinétique d'excrétion du CEV des lots OT3, OT4, Mi2, OZ1, YS et ST
 L'ADN du CEV a été recherché par qPCR dans les pools d'écouvillons de branchies de 5 carpes Koï vivantes asymptomatiques réalisés à J+3, J+10, J+15 et J+27. L'ADN du CEV n'a pas été recherché dans les branchies des carpes Koï mortes de ces lots, excepté pour trois carpes du lot OT3.

Aucun signe clinique évocateur de la KSD n'a été observé dans les lots **OT3** et **OT4**. Aucune mortalité n'a été observée dans le lot OT4 alors que 6 carpes (4 %) du lot OT3 sont mortes entre J+0 et J+31. L'ADN du CEV a été détecté dans les écouillons de branchies réalisés à J+10 des lots OT3 et OT4. Après analyse individuelle, les écouillons des 5 carpes Koï réalisés à cette date étaient tous positifs : entre $8 \cdot 10^2$ et $2 \cdot 10^6$ copies CEV pour 250 ng d'ADN ont été détectées pour le lot OT3 et entre $2 \cdot 10^3$ et $3 \cdot 10^4$ pour le lot OT4. Deux cadavres du lot OT3 morts à J+10 et J+11 ont été analysés en plus afin de comparer les charges virales dans les cadavres avec celles des écouillons de branchies : les charges sont beaucoup plus faibles : $5 \cdot 10^1$ et $1 \cdot 10^2$ copies pour 250 ng d'ADN. Des traces ADN du CEV ont été détectées dans le

pool d'écouvillons de branchies du lot OT3 réalisé à J+15. Compte tenu de la très forte positivité des écouvillons réalisés à J+10, il peut paraître logique de détecter des traces ADN du CEV 5 jours plus tard mais nous ne pouvons pas exclure une contamination des échantillons. Les pools d'écouvillons de branchies réalisés à J+15 pour OT4 et à J+24 pour OT3 et OT4 sont CEV-négatifs.

L'ADN du CEV a été détecté dans l'eau de transport et l'écouvillon de poche de transport du lot OZ1, indiquant que les individus de ce lot ont été en contact avec le CEV. Cependant, l'ADN du CEV n'a pas pu être détecté dans les écouvillons de branchies réalisés à J+15 et J+24.

En ce qui concerne le lot YS, l'ADN du CEV a été détecté en petite quantité dans le culot de l'eau de transport de ce lot. Bien que nous n'ayons pu exclure une contamination dans ce cas, il est possible que les poissons du lot YS aient rencontré le CEV avant leur importation. Cependant, l'ADN du CEV n'a pas été détecté dans les écouvillons de branchies réalisés à J+15 et J+24.

L'eau de transport et l'écouvillon de poche du lot Mi2 ne contenaient pas d'ADN du CEV, cependant l'eau de transport de l'autre lot acheté au même éleveur contenait de l'ADN du CEV. On ne peut pas affirmer que le lot Mi2 ait déjà rencontré le CEV même si cela est probable. L'ADN du CEV n'a pas été détecté dans les écouvillons de branchies réalisés à J+10, J+15 et J+24.

Le lot ST a présenté des signes cliniques de KSD entre 8 et 10 jours post-importation. L'ADN de CEV était détectable dans l'eau de transport ainsi que dans les écouvillons de branchies à J+15 en très faible quantité (non quantifiable) mais pas dans les écouvillons de branchies à J+24. La charge présente dans les écouvillons de branchies à J+15 est tellement faible qu'on ne peut exclure qu'elle soit le résultat d'une contamination. Cependant, ce lot ayant présenté des signes cliniques de KSD 10 jours plus tôt, le fait de détecter des traces du CEV dans les écouvillons est cohérent.

La durée d'excrétion post-importation est variable et la charge virale retrouvée dans les poissons morts diffère de celle retrouvée chez les poissons vivants (non moribonds). Ainsi, dans le lot SK1 la mortalité a été importante et durable, les cadavres présentaient des charges virales élevées alors que les écouvillons de branchies étaient faiblement positifs, voire négatifs. L'excrétion a duré au moins 32 jours post-importation. Dans les lots SK2 et SK3, les écouvillons de branchies étaient également faiblement CEV-positifs jusqu'à 15 jours post-importation. Cependant, le lot SK3 n'a pas présenté de mortalité et l'ADN du CEV n'était pas détectable dans la plupart des cadavres du lot SK2. Dans les lots OT3 et OT4, tous deux asymptomatiques, la charge virale sur les écouvillons de branchies était très élevée à J+10 puis très faible ou négative à partir de J+15. Dans ce cas, les quelques cadavres analysés présentaient des charges virales beaucoup plus faibles que les écouvillons de branchies réalisés aux mêmes dates. Enfin, en ce qui concerne les lots Mi2, OZ1, YS et ST, l'ADN du CEV n'a pu être détecté qu'à J+15 dans le lot ST qui avait présenté des signes cliniques de KSD entre J+8 et J+10.

On retiendra que la durée d'excrétion du CEV d'un lot de carpes Koï récemment importées est très variable et peut atteindre plus d'un mois dans certains lots symptomatiques tels que SK1 et au moins 10 à 15 jours dans des lots asymptomatiques tels que OT3 ou OT4.

3.3.2. Durée d'excrétion après apparition de signes cliniques de KSD

Le lot FR21G1 est un lot qui n'a pas été acheté au Japon mais en France. Il était maintenu à la Pisciculture d'Estalens depuis plusieurs mois. Huit jours après l'importation de 2019 des lots japonais, plusieurs individus du lot FR21G1 ont présenté des signes cliniques de KSD. Deux jours (J+2) après apparition des signes cliniques, 4 écouvillons de branchies sur 5 sont positifs avec des concentrations de l'ordre de 10^2 à 10^3 copies d'ADN du CEV pour 250 g d'ADN total. Un seul écouvillon de branchies sur 5 est positif à J+16 avec une charge virale faible. Deux écouvillons de branchies à J+31 sont négatifs, deux écouvillons positifs sont très faiblement positifs alors que le dernier compte 23 copies de l'ADN du CEV pour 250 ng d'ADN total extrait. Parmi les carpes Koï mortes, celles mortes à J+6 et J+7 ainsi que deux mortes à J+16 sont CEV-positives. Cependant l'ADN du CEV n'a pas pu être détecté dans les

branchies d'une carpe Koï morte à J+16 ni dans celle morte à J+31. Là encore, on observe des points aux charges virales très faibles pour lesquels on ne peut exclure une contamination. Il apparaît cependant logique de détecter l'ADN du CEV pendant plusieurs semaines après l'apparition de signes cliniques, et ce même si un traitement (NaCl 0,6 %) a été mis en place. Le résultat inattendu est l'absence de forte positivité des échantillons, notamment de certains cadavres et la présence d'échantillons CEV-négatifs à toutes les dates de prélèvements, ce qui est différent des descriptions faites lors d'infections expérimentales sans mise en place de traitement (Adamek, Oschilewski, et al. 2017).

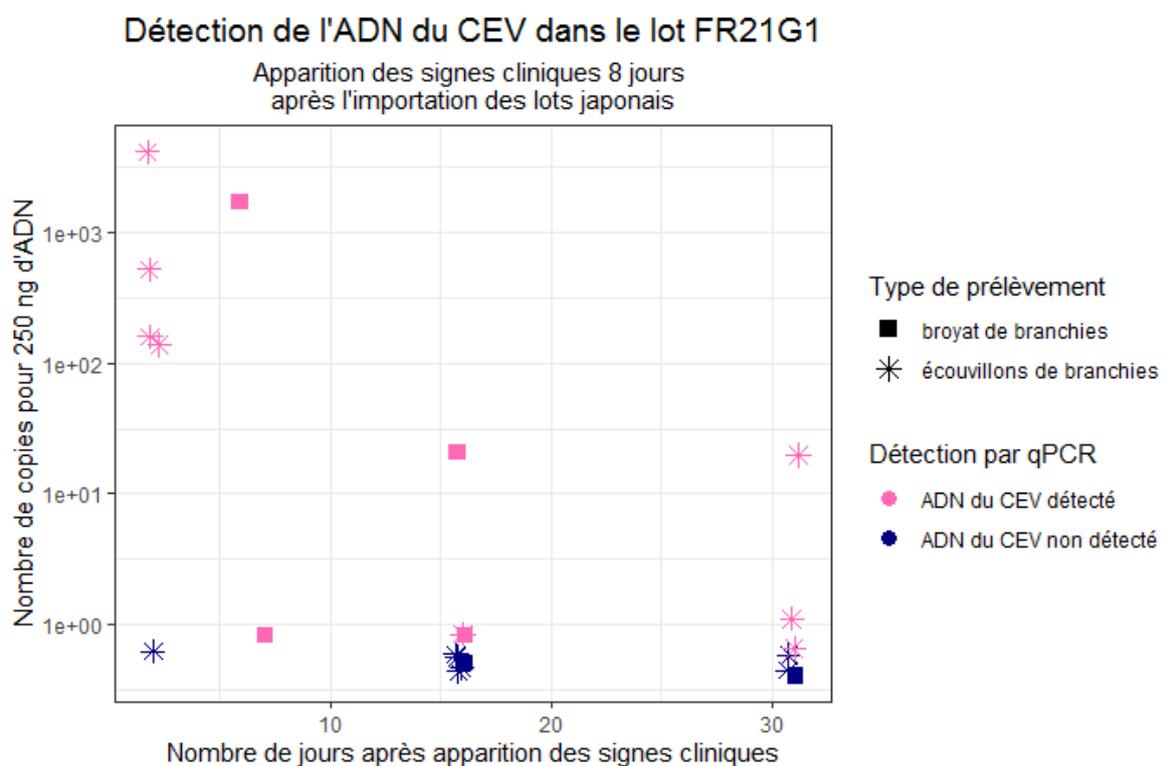


Figure 14 : Cinétique d'excrétion du CEV du lot 2019-FR21G1

Dans ce cas, l'excrétion du CEV au niveau du lot dure au moins 31 jours après l'apparition des signes cliniques. La charge virale est très variable, que ce soit entre les broyats ou entre les écouvillons de branchies. Bien que les charges les plus élevées soient retrouvées dans la semaine suivant l'apparition des signes cliniques, d'autres prélèvements réalisés à ces dates-là ne contiennent pas ou peu d'ADN du CEV. La forte proportion d'écouvillons de branchies CEV-négatifs et l'existence de cadavres de carpes Koï où l'ADN du CEV n'a pas été détecté montre qu'il est, du moins dans ces conditions de maintenance, facile d'écarter à tort une infection par le CEV si peu de prélèvements sont réalisés.

3.4. Suivi des contaminations inter-lots

3.4.1. Séquences obtenues

Les séquences obtenues sont alignées sur la séquence codante complète du précurseur de la protéine de *core 4a* (numéro d'accèsion Genbank® MH645915). Pour certains échantillons, l'électrophorégramme laisse apparaître deux courbes superposées à une position donnée (polymorphisme), indiquant que deux nucléotides coexistent et donc que deux séquences différentes sont présentes. Lorsqu'il existe plusieurs positions où deux nucléotides coexistent, cela signifie qu'au moins deux séquences différentes sont présentes dans l'échantillon mais il n'est pas possible de connaître leurs compositions individuelles. Les nucléotides sont représentés par une lettre conformément à la nomenclature IUPAC (Tableau 7). On remarque que les mutations observées sur la portion 182-685 du gène codant pour P4a sont exclusivement de type « substitution » et qu'elles concernent 18 positions. Le détail est repris dans le Tableau 8, page 64.

L'analyse phylogénétique est conduite sur une courte séquence (408 pb) du gène P4a. Deux génogroupes distincts sont visibles : toutes les séquences issues d'échantillons obtenues à la Pisciculture d'Estalens, importés du Japon ou non, appartiennent au génogroupe II (Figure 15, page 65). Le génogroupe I étant plutôt inféodé à la carpe commune et le génogroupe II à la carpe Koï, ce résultat est concordant avec les publications précédentes (Way, Stone 2013 ; Adamek, Baska, et al. 2018 ; Padhi et al. 2019).

Tableau 7 : Nomenclature des nucléotides (ADN) selon l'IUPAC

Code	Nucléotide	Code	Nucléotide
A	Adénine	R	A ou G
		Y	C ou T
C	Cytosine	S	G ou C
		W	A ou T
G	Guanine	K	G ou T
		M	A ou C
T	Thymine	B	C ou G ou T
		D	A ou G ou T
. ou -	Vide	H	A ou C ou T
		V	A ou C ou G
		N	N'importe quelle base

Tableau 8 : Représentation des mutations ponctuelles des séquences nucléotidiques obtenues à partir des échantillons provenant de la Pisciculture d'Estalens (portion 182-685 de la séquence ADN codant P4a, numéro d'accèsion Genbank® MH645915)

Fournisseur	Nombre de séquences	Position Identité de l'échantillon	Début séquence	Position																	Fin séquence	
				231	269	309	313	314	375	393	408	435	451	452	522	534	552	567	579	591		618
/	1	MH645915	1	T	C	G	A	A	A	T	G	A	G	C	A	T	T	T	A	G	T	2028
Hi ou HW	1	2017-6	191	C	T	G	T	C	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	654
	1	2017-8	182	C	T	G	T	C	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	647
	1	2017-9	182	C	T	G	T	C	T	C	G	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	647
	1	2017-10	191	C	T	G	T	C	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	647
	1	2017-11	179	C	T	G	T	C	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	647
	1	2017-14	191	C	T	G	T	C	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	647
	1	2017-16	191	C	T	G	T	C	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	647
	1	2017-17	191	C	T	G	T	C	T	C	G	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	647
K	2	2019-K2-eau	193	C	T	G	T	C	W	C	G	A	T	C	T	T	C	C	G	A	C	644
Mi	1	2018-33	193	C	T	G	T	C	T	C	G	A	T	C	T	T	C	C	G	A	T	646
OT	1	2018-19	191	C	T	G	T	C	T	C	G	A	T	C	T	T	C	C	G	A	T	647
	1	2019-OT3-EP	202	C	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	T	T	C	C	G	A	T	647
	1	2019-OT3-EB.13.4n°4	182	C	T	G	T	C	T	C	G	A	T	C	T	C	C	C	G	A	T	685
	1	2019-OT4-EB.13.4n°2	193	C	T	G	T	C	T	C	G	A	T	C	T	T	C	C	G	A	T	641
OZ	1	2019-OZ1-eau	227	C	T	G	T	C	A	C	G	A	T	C	T	T	C	C	G	A	T	659
	1	2019-OZ4-eau	193	C	T	G	T	C	A	C	G	A	T	C	T	T	C	C	G	A	T	641
SK	2 à 8	2019-SK1-eau	190	Y	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	T	Y	C	C	R	A	T	646
	1	2019-SK1-23.4n°1	224	T	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	T	T	C	C	G	A	T	655
	1	2019-SK1-25.4n°2	226	C	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	T	T	C	C	G	A	T	685
	2 à 4	2019-SK2-eau	193	Y	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	T	Y	C	C	G	A	T	644
	2 à 4	2019-SK3-eau	193	Y	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	W	T	C	C	G	A	T	644
	1	2019-SK4-3.4	181	C	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	T	C	C	C	G	A	T	685
	1	2019-SK6-eau	230	C	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	T	C	C	C	G	A	T	671
ST	1	2019-ST-eau	181	T	T	A	T	C	A	C	G	G	G	T	T	T	C	C	G	A	C	658
FR	2	2019-FR21G1-EB.13.4n°5	190	Y	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	A	T	T	T	G	A	T	646
	2 à 8	2019-mag.n°1	191	Y	T	G	T	C	T	C	G	A	K	C	W	T	T	T	G	A	/	615
ST	1	2020-fév-18G3EBn°5 (ST)	191	C	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	A	T	T	T	G	A	T	658
OZ	1	2020-fév-19D1EBn°4 (OZ3)	198	C	T	G	T	C	T	C	G	A	G	C	A	T	T	T	G	A	T	658



Figure 15 : Analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques partielles codant pour P4a (positions 226 – 633 du gène P4a)

Les séquences obtenues à partir des échantillons récoltés à la Pisciculture d'Estalens dans le cadre de cette étude sont en gras. Les séquences présentant un site polymorphique sont dédoublées et notées 1/2 et 2/2. Les séquences présentant plusieurs sites polymorphiques ont été exclues de l'analyse.

L'analyse phylogénétique a été réalisée grâce au logiciel MegaX (Kumar et al. 2018) en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle Tamura – 3 paramètres (Tamura 1992) avec une distribution gamma discrète (5 catégories (+G, paramètre = 0,5010)) et la présence de sites invariables (+I, 43,50 % des sites). La longueur des branches est proportionnelle au nombre de substitutions par site. Cinquante-six séquences de 408 nucléotides ont été analysées. Les valeurs de bootstrap ont été (en pourcentage) ont été calculée à partir de 100 répliques.

La séparation des génogroupes I et II concorde avec les précédentes publications (Way, Stone 2013 ; Matras et al. 2017 ; Adamek, Baska, et al. 2018 ; Padhi et al. 2019).

3.4.2. Lots importés du Japon en avril 2019

Le séquençage de la partie 182-685 du gène codant le précurseur de la protéine de *core 4a* du CEV présent dans les différentes poches d'importations de carpes Koï a mis en évidence la présence de séquences différentes. Plusieurs séquences peuvent être détectées en provenance d'un même éleveur, voire d'un même lot. C'est notamment le cas pour les éleveurs K et SK. D'autre part, une même séquence peut parfois être détectée en provenance de deux éleveurs différents, ainsi, une même séquence est détectée dans l'écouvillon de poche OT3 et dans l'eau d'importation des lots SK1, SK2 et SK3 (Tableau 9, page 68). Le fait de retrouver une séquence identique chez deux éleveurs peut s'expliquer, entre autres, par des échanges commerciaux entre eux et par leurs positions géographiques. Les éleveurs OT et SK sont situés dans la même vallée, OT étant quelques centaines de mètres en amont de SK, ce qui peut expliquer la présence de virus génétiquement identiques en provenance de ces deux éleveurs (Figure 16, page 69). Au contraire, l'éleveur ST est isolé géographiquement (Figure 16, page 69). La séquence détectée dans l'eau de transport de cet éleveur est la plus éloignée des autres : 5 à 8 substitutions en comparaison avec les autres séquences alors que ces dernières présentent entre elles au maximum 4 sites de substitution (Tableau 9, page 68).

La possibilité de retrouver plusieurs séquences chez un même éleveur et la même séquence chez plusieurs éleveurs complique l'évaluation de l'origine du CEV détecté dans les lots de carpes Koï post-importation.

Ainsi, les séquences détectées dans les écouvillons de branchies des lots OT3 et OT4 diffèrent respectivement de un et deux nucléotides de la séquence obtenue à partir de l'écouvillon de poche du lot OT3 (Tableau 9, page 68). Bien que ces séquences soient différentes, on ne peut pas en déduire immédiatement que le CEV détecté dans les branchies des carpes Koï 10 jours post-importation ne provient pas de l'élevage OT. On a vu que plusieurs séquences peuvent être détectées dans l'eau d'importation d'un même lot. Une des limites du séquençage SANGER post-PCR est qu'il permet d'obtenir uniquement la ou les séquences majoritaires à l'issue de la PCR. Il est donc possible que d'autres séquences aient été présentes dans ces lots dès l'importation, mais qu'elles n'aient simplement pas été détectées. La séquence détectée dans l'écouvillon de branchie du lot OT3 est identique à une séquence

détectée en 2017 dans des branchies des carpes Koï achetées chez les éleveurs Hi et/ou HW. Il est donc possible que le lot OT3 se soit contaminé après son arrivée. Ces éleveurs (HW et Hi) se situent à moins de 10 km de l'éleveur OT (Figure 16, page 69), ce qui appuie la possibilité que cette séquence ait aussi été présente chez l'éleveur OT, bien que non détectée dans l'environnement de transport. En ce qui concerne la séquence obtenue à partir de l'écouvillon de branchie réalisée 10 jours post-importation sur le lot OT4, elle est identique à la séquence détectée en 2018 chez une carpe Koï achetée chez l'éleveur Mi un jour après son importation et chez une carpe achetée chez l'éleveur OT 7 jours après son importation. Là encore, on ne peut exclure aucune des deux hypothèses. On ne peut pas conclure avec certitude quant à l'origine du CEV détecté dans les branchies des carpes Koï des lots OT3 et OT4 analysées.

En ce qui concerne les séquences détectées dans les branchies des carpes Koï provenant de l'éleveur SK, elles sont toutes identiques à des séquences présentes dans l'eau de transport des lots SK1, SK2, SK3 et/ou SK6 et différentes de toutes les autres séquences détectées (Tableau 9, page 68). Cela confirme donc que la contamination a eu lieu avant l'exportation. On notera cependant que les deux individus du lot SK1 morts à 2 jours d'écart étaient infectés par des CEV génétiquement différents et que la séquence détectée dans les branchies de l'individu du lot SK4 mort dans les 24 heures ayant suivi son arrivée est également différente des deux précédentes.

Tableau 9 : Comparaison deux à deux des séquences nucléotidiques du CEV obtenues à partir des échantillons issus de l'importation depuis le Japon de 2019 (partie 182-685 de la séquence ADN codant le précurseur de la protéine 4a)

Les chiffres indiquent le nombre de substitutions sur la partie 182-685. Lorsque deux nucléotides coexistent à une position, les deux séquences sont séparées et notées 1/2 et 2/2. * : indique que plusieurs nucléotides coexistent à plus d'une position

	Date (jours post-importation)	2017-variant1	2017-variant2	2018-33-Mi	2018-19-OT	2019-K2-eau_1/2	2019-K2-eau_2/2	2019_OT3-EP	2019-OT3EB13.4n4	2019-OT4EB13.4n2	2019-OZ1-eau	2019-OZ4-eau	2019-SK1-eau*	2019-SK1-23.4n1	2019-SK1-25.4n2	2019-SK2-eau*	2019-SK3-eau*	2019-SK4-3.4	2019-SK6-eau	2019-ST-eau
Date (jours post-importation)		/	/	1	7	0	0	0	10	10	0	0	0	20	22	0	0	0	0	0
2017-variant1	/		1	1	1	3	2	2	0	1	2	2	1	3	2	1	2	1	1	8
2017-variant2	/	1		2	2	4	3	3	1	2	3	3	2	4	3	2	3	2	2	9
2018-33-Mi	1	1	2		0	2	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	2	2	7
2018-19-OT	7	1	2	0		2	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	2	2	7
2019-K2-eau_1/2	0	3	4	2	2		1	3	3	2	1	1	3	4	3	3	3	4	4	5
2019-K2-eau_2/2	0	2	3	1	1	1		2	2	1	2	2	2	3	2	2	2	3	3	6
2019_OT3-EP	0	2	3	1	1	3	2		2	1	3	2	0	2	1	0	0	2	2	7
2019-OT3EB13.4n4	10	0	1	1	1	3	2	2		1	2	2	1	3	2	1	2	1	1	8
2019-OT4EB13.4n2	10	1	2	0	0	2	1	1	1		1	1	1	2	1	1	1	2	2	7
2019-OZ1-eau	0	2	3	1	1	1	2	3	2	1		0	2	3	2	2	2	3	3	6
2019-OZ4-eau	0	2	3	1	1	1	2	2	2	1	0		2	3	2	2	2	3	3	6
2019-SK1-eau*	0	1	2	1	1	3	2	0	1	1	2	2		0	0	0	0	0	0	5
2019-SK1-23.4n1	20	3	4	2	2	4	3	2	3	2	3	3	0		1	0	0	2	2	5
2019-SK1-25.4n2	22	2	3	1	1	3	2	1	2	1	2	2	0	1		0	0	1	1	6
2019-SK2-eau*	0	1	2	1	1	3	2	0	1	1	2	2	0	0	0		0	0	0	5
2019-SK3-eau*	0	2	3	1	1	3	2	0	2	1	2	2	0	0	0	0		1	1	5
2019-SK4-3.4	0	1	2	2	2	4	3	2	1	2	3	3	0	2	1	0	1		0	7
2019-SK6-eau	0	1	2	2	2	4	3	2	1	2	3	3	0	2	1	0	1	0		7
2019-ST-eau	0	8	9	7	7	5	6	7	8	7	6	6	5	5	6	5	5	7	7	

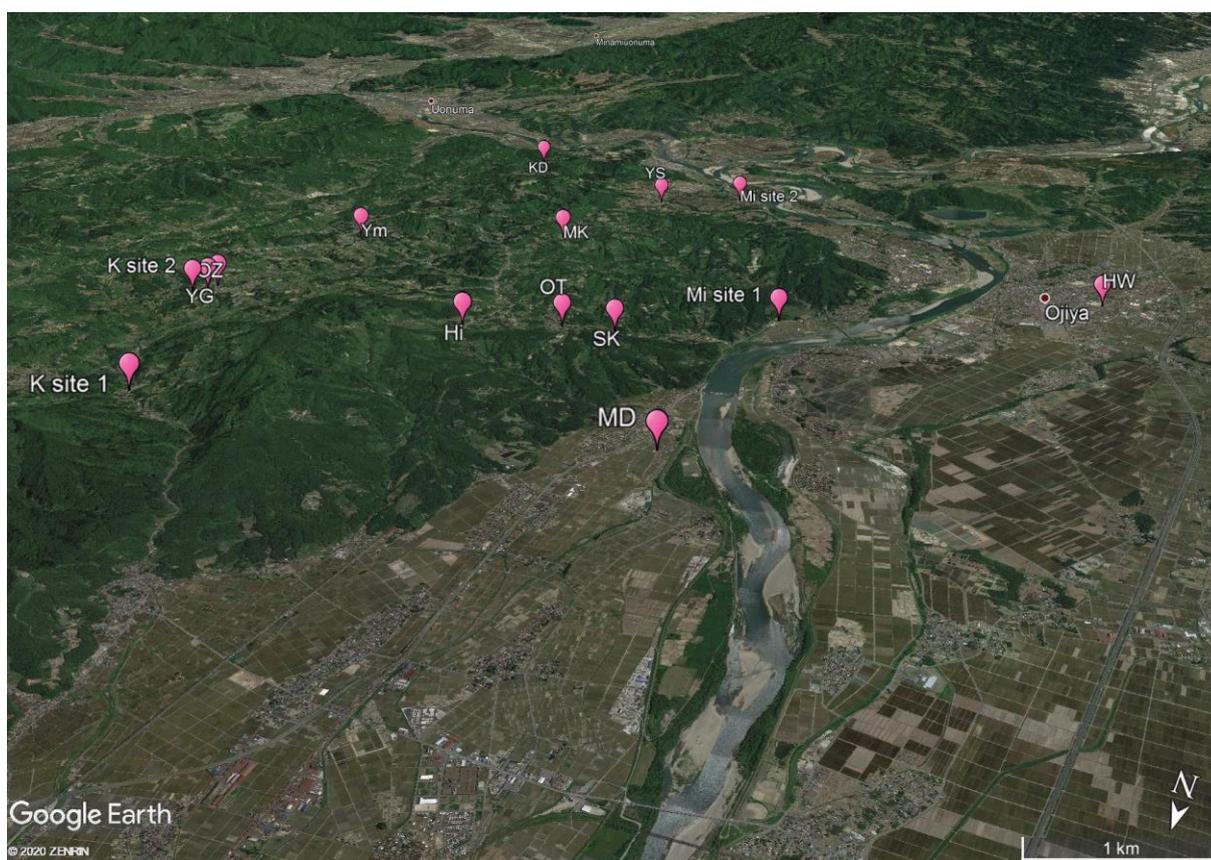
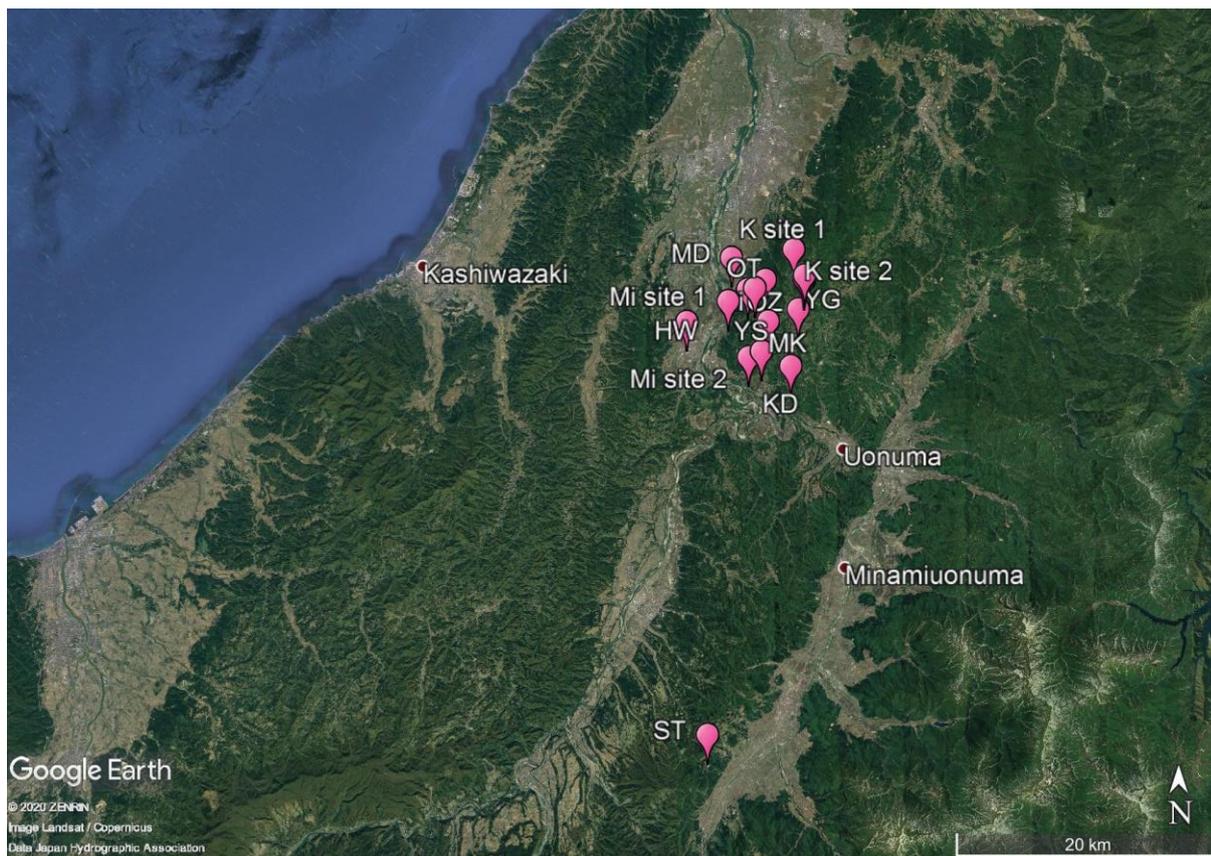


Figure 16 : Emplacements des élevages japonais (préfecture de Niigata, bassins versant du fleuve Shinano) d'où proviennent les carpes Koï de la Pisciculture d'Estalens chez qui le CEV a été recherché (années 2017 à 2019)

3.4.3. Lots français ayant présenté des signes cliniques de KSD dans la semaine suivant l'importation du Japon d'avril 2019

La partie 182 - 685 du gène codant le précurseur de la protéine de core 4a de deux échantillons a été séquencée. Le premier correspond à un écouvillon de branchies réalisé sur un lot présentant des signes cliniques de KSD (2019-FR21G1EBn°5) et le second au broyat de branchies d'une carpe Koï morte après avoir présenté des signes cliniques de KSD (2019-mag1). Dans les deux cas, les individus n'ont pas été achetés au Japon mais en France (même éleveur) et étaient hébergés à la Pisciculture d'Estalens depuis plusieurs mois lorsque des signes cliniques sont apparus, et ce la semaine suivant l'importation de carpes Koï du Japon de 2019.

Deux séquences différant d'un nucléotide en position 231 ont été détectées dans l'écouvillon de branchies. Dans le broyat de branchies, deux nucléotides coexistent au niveau de trois positions, ce qui montre qu'au moins deux séquences différentes sont présentes (Tableau 8, page 64). Les séquences détectées à partir de ces carpes Koï achetées en France sont très proches. Cependant, elles diffèrent de toutes les autres séquences détectées à la Pisciculture d'Estalens, notamment par la présence de thymine en positions 552 et 567 au lieu d'une cytosine (Tableau 8 et Tableau 10). Les lots français ont été contaminés par des CEV génétiquement proches. Cependant, on ne peut pas conclure quant à l'origine de cette contamination. En effet, il est possible que des virus possédant ces séquences aient été importés en 2019, ou avant, mais n'aient pas été séquencés. Il est aussi possible que ces individus aient été contaminés avant d'être achetés par la Pisciculture d'Estalens et n'aient pas présenté de signes cliniques pendant plusieurs mois. Enfin, on ne peut pas non plus écarter une introduction de ces CEV par un autre biais que l'achat de carpes Koï.

Tableau 10 : Comparaison deux à deux des séquences nucléotidiques du CEV obtenues à partir des échantillons 2019-FR21G1EBn°5 et 2019-mag1 avec les autres séquences détectées à la Pisciculture d'Estalens entre 2017 et 2019 (Nb de différences sur la partie 182-685 de la séquence ADN codant P4a) Lorsque deux nucléotides coexistent à une position, les deux séquences sont séparées et notées 1/2 et 2/2. * : indique que plusieurs nucléotides coexistent à plus d'une position

	2017-variant 1	2017-6-variant 2	2018-33-Mi	2018-19-OT	2019-K2-eau_2/2	2019-K2-eau_1/2	2019_OT3-EP	2019-OT3EB13.4n4	2019-OT4EB13.4n2	2019-OZ1-eau	2019-OZ4-eau	2019-SK1-eau*	2019-SK1-23.4n1	2019-SK1-25.4n2	2019-SK2-eau*	2019-SK3-eau*	2019-SK4-3.4	2019-SK6-eau*	2019-ST-eau	2019-FR21G_1/2	2019-FR21G1_2/2	2019-mag1*
2019-FR21G1 EBn5_1/2	6	7	5	5	6	7	4	6	5	6	6	3	3	4	3	2	5	5	8		1	0
2019-FR21G1 EBn5_2/2	5	6	4	4	5	6	3	5	4	5	5	3	4	3	3	2	4	4	9	1		0
2019-mag1*	3	4	2	2	2	3	2	3	2	3	3	2	2	2	2	2	3	3	6	0	0	

3.4.4. Lots ayant présenté des signes cliniques de KSD 10 mois après leur importation (février 2020)

En février et mars 2020, des individus importés du Japon en avril 2019 ont présenté des signes cliniques très fortement évocateurs de la KSD. La plupart de ces individus proviennent de lots pour lesquels l'ADN du CEV avait été détecté dans les poches d'importation et / ou dans des branchies de carpes Koï (détails dans le Tableau 12, page 73). En février – mars 2020, des prélèvements d'eau et des écouvillons de branchies ont confirmé la présence de l'ADN du CEV dans les aquariums 19D1, 18G3 et 17D1. Le séquençage d'une partie de la séquence codant pour P4a a été possible à partir d'écouvillons de branchies réalisés dans les aquariums 18G3 et 19D1. La même séquence a été détectée dans ces deux aquariums. Elle correspond exactement à une séquence détectée dans les lots français ayant montré des signes cliniques de KSD la semaine ayant suivi l'importation de carpes Koï japonaises en avril 2019 (Tableau 11). L'aquarium 18G3 contenait des individus provenant de l'éleveur ST (lot 2019-ST) alors que l'aquarium 19D1 contenait des individus provenant de l'éleveur OZ (lot 2019-OZ3). Aucune séquence n'est disponible pour les lots 2019-ST et 2019-OZ3 post-importation. Cependant, les séquences issues de l'eau d'importation des lots 2019-ST, 2019-OZ1 et 2019-OZ4 sont différentes de cette séquence détectée en 2020. Le CEV présent dans l'eau d'importation du lot OZ3 n'a pas été séquençé mais sachant que les quatre lots provenant de cet éleveur contenaient des individus de la même variété et donc probablement élevés ensemble, et que la même séquence a été détectée dans l'eau d'importation des lots 2019-OZ1 et 2019-OZ4, il est probable que le CEV présent dans l'eau d'importation du lot 2019-OZ3 était identique à ceux des lots 2019-OZ1 et 2019-OZ4.

Tableau 11 : Comparaison deux à deux des séquences nucléotidiques du CEV obtenues à partir des échantillons 2020-fév-18G3EBn5 et 2020-fév-19D1EBn4 avec les autres séquences détectées à la Pisciculture d'Estalens entre 2017 et 2019 (Nb de différences sur la partie 182-685 du gène P4a) Lorsque deux nucléotides coexistent à une position, les deux séquences sont séparées et notées 1/2 et 2/2. * : indique que plusieurs nucléotides coexistent à plus d'une position

	2017-variant 1	2017-variant 2	2018-33-Mi	2018-19-OT	2019-K2-eau_1/2	2019-K2-eau_2/2	2019_OT3-EP	2019-OT3EB13.4n4	2019-OT4EB13.4n2	2019-OZ1-eau	2019-OZ4-eau	2019-SK1-eau*	2019-SK1-23.4n1	2019-SK1-25.4n2	2019-SK2-eau*	2019-SK3-eau*	2019-SK4-3.4	2019-SK6-eau*	2019-ST-eau	2019-FR21G1_1/2	2019-FR21G1_2/2	2019-mag1*	2020_fev_18G3EBn5	2020_fev_19D1EBn4
2020_fev_18G3EBn5	5	6	4	4	6	5	4	5	4	5	5	3	4	3	3	2	4	4	9	1	0	0		0
2020_fev_19D1EBn4	5	6	4	4	6	5	4	5	4	5	5	3	4	3	3	2	4	4	9	1	0	0		

Ces données génétiques, associées à l'apparition des signes cliniques de proche en proche à partir des aquariums 19D3 et 18G3 (Figure 7, page 48), confortent, sans pouvoir la confirmer, l'hypothèse d'une nouvelle contamination par le CEV. Pour rappel, l'autre hypothèse était une circulation à bas bruit du CEV dans chaque aquarium et une apparition synchrone de signes cliniques suite à un facteur déclenchant non identifié.

Le fait de retrouver la même séquence que pour la contamination des carpes Koï françaises peut être expliqué de deux manières : soit le CEV a persisté dans les infrastructures pendant plusieurs mois (vecteur biologique ou mécanique), soit le CEV a été introduit deux fois.

D'autre part, ces résultats confirment que des individus d'un même lot peuvent exprimer plusieurs phases cliniques de KSD. C'est ici le cas des individus de l'aquarium 18G3 (lot 2019-ST). Ils ont en effet présenté des signes cliniques de KSD dans la semaine suivant leur importation en avril 2019 et de nouveau en février 2020. Dans les deux cas la suspicion clinique a été confirmée par la détection de l'ADN du CEV par qPCR dans des écouvillons de branchies (Tableau 12). Le suivi n'est pas individuel donc on ne peut pas affirmer qu'un même individu a présenté deux fois des signes cliniques mais il est sûr que les individus ayant présenté des signes cliniques en 2020 avaient déjà rencontré le virus.

Le fait que les individus de la plupart des aquariums (9 sur 10) contenant des carpes Koï issues de l'élevage SK n'aient pas présenté de signes cliniques de KSD, alors même que certains étaient situés à proximité immédiate d'aquariums où des signes cliniques de KSD ont été observés, est assez surprenant (Figure 7, page 48 et Tableau 12, page 73). Cette absence de signes cliniques peut s'expliquer soit par une absence d'introduction du CEV dans ces aquariums, soit de manière biologique avec des carpes Koï qui auraient été contaminées mais non infectées ou infectées asymptomatiques. Ces observations soulèvent la question de l'existence d'une immunité adaptative contre le CEV et de son efficacité.

Tableau 12 : Emplacement, historique vis-à-vis du CEV et statut clinique des carpes Koï présentes à la Pisciculture d'Estalens au moment de l'épisode clinique de KSD de février 2020.

En gras : les aquariums pour lesquels la présence du CEV en 2020 a été confirmée (qPCR sur eau ou écouvillons de branchies). Soulignés : séquençage SANGER d'une partie de la séquence codant pour P4a réalisé.

Eleveur	CEV détecté dans l'eau ou la poche d'importation	Signes cliniques de KSD – CEV porté par des carpes Koï suite à l'importation (avril 2019)	Aquariums contenant des individus provenant de cet éleveur en février – mars 2020 (mortalité suite aux signes cliniques)
OZ	4 lots sur 4	Pas de signes cliniques ni de mortalité suite à l'importation. Ecouvillons de branchies du lot OZ1 à J+15 et J+21 : ADN du CEV non détecté.	19D1 : OZ3 – symptomatique (0 / 32 – 0 %) 19D2 : OZ2 + OZ3 – symptomatique (6 / 41 – 14,6 %) 19D3 : OZ1 – symptomatique (4 / 76 – 5,2 %) 18G1 : OZ4 – pas de signes cliniques de KSD
ST	1 lot sur 1	Signes cliniques suite importation sans mortalité. CEV détecté dans les écouvillons de branchies à J+15	18G3 : ST – symptomatique (3 / 35 – 8,6 %) 18D2 : ST – symptomatique (3 / 24 – 8 %)
OT	1 lot sur 4	Pas de signes cliniques. Mortalité entre 0 et 4 %. Ecouvillons de branchies des lots OT3 et OT4 fortement positifs à J+10	17G2 : OT1 – symptomatique (1 / 85 – 1,2 %) 17D2 : OT2 – symptomatique (2 / 84 – 2,4 %) 16G3 : OT1 + OT4 – symptomatique (6 / 84 : 7,1 %) 17D1 : OT3 : symptomatique (0 / 140 – 0 %) 23G1 : OT1 + OT2 + OT3 + OT4 – symptomatique (0 %)
SK	6 lots sur 6	Lot SK1 symptomatique (taux de mortalité : 30 %). Mortalité entre 1,4 % et 18,6 % pour les autres lots. ADN du CEV détecté dans des cadavres des lots SK1, SK2, SK3 et SK4 ainsi que dans les écouvillons de branchies des lots SK1, SK2 et SK3 (autres lots non prélevés)	19G1 : SK6 – symptomatique (0 / 23 – 0 %) 20D1 : SK3 – pas de signes cliniques de KSD 20D2 : SK2 – pas de signes cliniques de KSD 20D3 : SK1 – pas de signes cliniques de KSD 19G2 : SK5 – pas de signes cliniques de KSD 19G3 : SK2 + SK4 + SK5 – pas de signes cliniques de 16D2 : SK3 – pas de signes cliniques de KSD 15G1 : SK1 – pas de signes cliniques de KSD 15G2 : SK2+SK4+SK5+SK6 – pas de signes cliniques de KSD 15G3 : SK2+SK4+SK5+SK6 – pas de signes cliniques de KSD
MK	0 lot sur 1	Une carpe Koï morte sans signe clinique et CEV-négative. Pas d'écouvillon de branchies fait.	16D1 : symptomatique (0 / 50 – 0 %)
YS	1 lot sur 1	Pas de mortalité ni de signe clinique Ecouvillons de branchies à J+15 et J+21 CEV-négatifs	18D3 : symptomatique (0 / 48 – 0 %)
K	2 lots sur 2	Un seul individu mort dans le lot K1, non analysé. Pas de signes cliniques de KSD. Pas d'écouvillon de branchies fait.	17G1 : symptomatique (0 / 88 – 0 %)
♂	Importés en 2017 et 2018 du Japon Pas de signes cliniques du CEV observé en 2019		23G2 : symptomatique (0 / 5 – 0 %)
FR	Achetés en France – signes cliniques de KSD suite à l'importation d'avril 2019. Pas de confirmation par qPCR sur ce lot.		15D1 : pas de signes cliniques de KSD

4. Conclusion et discussion

4.1. Techniques de prélèvement utilisables pour dépister le CEV

Compte tenu du peu de connaissances disponibles à propos du CEV, et notamment de l'absence de lignée cellulaire permettant son isolement, aucune technique de détection des anticorps dirigés contre le CEV n'a été développée. Le CEV est donc recherché uniquement de manière directe. La technique de référence actuelle consiste à rechercher l'ADN du CEV par qPCR.

Jusqu'à présent, les publications faisaient uniquement référence à des dépistages du CEV post-mortem. L'ADN du CEV était le plus souvent recherché dans des broyats de branchies. Notre étude montre qu'il est également possible de détecter l'ADN du CEV dans des écouvillons de branchies. Cette dernière technique est non-létale, et permet d'envisager le dépistage de davantage d'individus, notamment de ceux à forte valeur économique ou sentimentale. Néanmoins, nous n'avons pas pu comparer la charge virale d'un écouvillon et d'un broyat de branchies d'un même individu. Ainsi, une éventuelle différence de sensibilité de ces deux méthodes n'a pas été déterminée.

A notre connaissance, aucune publication n'évoque la recherche du CEV dans l'eau ou sur les surfaces immergées. Cependant, le CEV a pu être transmis, de manière non systématique, à partir de l'eau de bassins contenant des carpes Koï présentant des signes cliniques de KSD (Murakami et al. 1978). Nous avons dans notre étude pu détecter l'ADN du CEV dans l'eau et les écouvillons de poches d'importation de certains lots, ainsi que dans l'eau d'un aquarium contenant des carpes Koï en phase clinique. Prélever de l'eau, que ce soit dans une poche de transport ou dans un aquarium, est facile et ne nécessite pas de manipuler les carpes. Néanmoins, les charges virales détectées étaient souvent faibles et à la limite du seuil de détection, ce qui dans ce cas particulier ne permet pas vraiment de tirer des conclusions (prélèvement non approprié et impossibilité d'exclure une contamination post-prélèvement). De plus, lors des infections expérimentales réalisées par Murakami, l'infection à partir de l'eau d'un bassin infecté était aléatoire, et ce même en concentrant l'eau par évaporation, ce qui laisse penser que peu de particules virales sont présentes dans l'eau. Ainsi, les résultats des qPCR réalisées sur des échantillons d'eau ou des écouvillons environnementaux doivent être interprétés avec précaution et ne peuvent pas permettre d'exclure la présence du CEV dans le lot.

4.2. Rôle des importations de carpes Koï dans la circulation du CEV au sein de la Pisciculture d'Estalens

L'ADN du CEV a été détecté en 2019 dans l'eau et/ou les écouvillons de poche d'importation de 16 lots sur 21, provenant de 7 éleveurs différents sur un total de 8. Ce résultat montre que le CEV est présent dans de nombreux élevages de la préfecture de Niigata au Japon. Les premiers foyers de KSD ont été détectés au Japon dans les années 1970s, et ce dans plusieurs préfectures, notamment celles de Niigata et d'Hiroshima (Hosoya, Suzuki 1976 ; Murakami et al. 1978 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997). De plus, le CEV a été détecté dans les années 2000 dans plusieurs élevages de la province de Niigata (Amita et al. 2002). Les élevages de carpes Koï de cette province semblent être un réservoir du CEV depuis plusieurs décennies.

Le fait de pouvoir détecter l'ADN du CEV dans l'eau de transport suggère une réplication virale pendant le transport. Cependant, la seule détection de l'ADN du CEV ne permet pas d'affirmer que les poches contenaient des virions infectants. Ne disposant pas de méthode d'isolement du CEV *in vitro*, seule l'analyse génétique du CEV détecté dans l'eau d'importation puis dans les carpes Koï post-importation peut conforter l'hypothèse d'une importation de virions infectants du CEV. Des séquences du CEV obtenues à partir de l'eau d'importation et de carpes Koï de lots provenant de l'éleveur SK sont identiques entre elles, et différentes de toutes les autres séquences détectées à la Pisciculture d'Estalens. On peut considérer, au moins pour les lots provenant de cet éleveur, que l'origine de l'infection par le CEV se situe en amont de l'importation, et que des virions infectants ont été importés en même temps que les carpes Koï.

Les analyses phylogénétiques réalisées précédemment montrent une association entre les génogroupes et les hôtes : ainsi le génogroupe I est inféodé aux carpes communes alors que le génogroupe II est rencontré très majoritairement chez les carpes Koï (Way, Stone 2013 ; Matras et al. 2017), et ce bien que la démonstration ait été faite que les virus des deux génogroupes puissent infecter aussi bien les carpes communes que les carpes Koï (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). Le cas décrit aux Etats-Unis est particulièrement marquant car la carpe *Cyprinus carpio* n'est pas une espèce endémique du continent. Le CEV détecté chez les carpes communes appartient au génogroupe I alors que celui détecté chez les carpes Koï appartient au

génogroupe II (Padhi et al. 2019). L'hypothèse principale avancée est que le CEV a co-évolué avec les populations de carpes. La carpe sauvage présente une divergence génétique nette entre les populations de l'ouest (*Cyprinus carpio carpio*) et les populations de l'est (*Cyprinus carpio haematopterus*). Les carpes Koï ont été sélectionnées à partir d'une souche colorée de carpes présentes en Chine et appartiennent donc à la sous-espèce *Cyprinus carpio haematopterus*. L'hypothèse est donc que les deux génogroupes du CEV sont la conséquence évolutive d'une séparation géographique de ces deux populations virales, comme cela a été le cas pour les carpes *Cyprinus carpio*. Les échanges commerciaux, aussi bien de carpes communes (provenant principalement d'Europe de l'Est) que de carpes Koï (originaires du Japon) auraient ensuite réparti le CEV au niveau mondial. Comme on peut le voir dans la Figure 15 (page 65), des séquences identiques sont détectées dans des prélèvements séparés de plusieurs années. C'est notamment le cas entre les séquences CyPP-3 (Japon – 1996) et KX254021 (Royaume-Uni – 2013) ou bien les séquences 2018-33-MI, 2018-19-OT et 2019-OT4EB13.4n°2 qui sont identiques à deux séquences détectées au Royaume-Uni en 2013 et aux Etats-Unis en 2014. Ainsi, il semblerait que l'évolution génétique du CEV, du moins sur cette partie du gène P4a, soit lente.

Nos résultats montrent avec certitude que les achats de carpes Koï, notamment depuis certains élevages japonais, sont une porte d'entrée pour le CEV dans les infrastructures des grossistes – importateurs de carpes Koï. Ceci conforte l'hypothèse d'une répartition aujourd'hui mondiale du CEV consécutive aux échanges commerciaux de carpes. Notre étude est néanmoins trop restreinte pour estimer l'impact de ces importations sur la circulation réelle du CEV en France.

D'autre part, nous avons observé l'apparition de signes cliniques de KSD sur certains lots présents à la Pisciculture d'Estalens en dehors de la phase post-importation. Ce fut notamment le cas de lots achetés en France en décembre 2018 qui ont exprimé une forme clinique de KSD en avril-mai 2019 et des lots achetés au Japon en avril 2019 qui ont exprimé des signes cliniques de KSD en février-mars 2020. Dans les deux cas, la suspicion clinique a été confirmée par la détection de l'ADN du CEV dans des broyats, des écouvillons de branchies et/ou l'eau des aquariums. Dans les deux cas, presque tous les aquariums contenant des carpes Koï ont vu apparaître des signes cliniques de KSD. De plus, deux autres épisodes de KSD clinique, sans

confirmation par qPCR, ont été observés en dehors de toute importation en janvier 2019 et août 2020. L'étude des séquences nucléotidiques du CEV impliqué en février – mars 2020 est en défaveur d'une réactivation synchrone du CEV qui a été importé avec les carpes japonaises. Cependant, l'origine de ces contaminations demeure inconnue.

Les aquariums ne communiquent pas directement entre eux mais sont suffisamment proches pour permettre des projections de gouttes d'eau entre voisins. La première question qui se pose est de savoir si un premier aquarium est contaminé puis que le CEV se propage de proche en proche, ou si une source contamine tous les aquariums en parallèle. La chronologie d'apparition des signes cliniques, à chaque fois de proche en proche, est en faveur de la première hypothèse. Cependant, même dans ce cas, la question de l'origine de la contamination du premier aquarium reste entière. Le CEV provient-il de l'intérieur des infrastructures ou de l'extérieur ? S'il provient de l'intérieur, existe-t-il une forme latente, une circulation à bas-bruit dans certains lots ou chez d'autres espèces, ou bien des particules virales infectantes résistent-elles dans l'environnement plusieurs mois ?

Les importations de carpes Koï depuis le Japon participent à l'introduction de CEV dans les infrastructures de la Pisciculture d'Estalens. Cependant, il est clair que les importations ne sont pas directement impliquées dans toutes les épizooties de KSD qui ont eu lieu à la Pisciculture d'Estalens. De nouvelles études sont nécessaires pour comprendre comment le CEV persiste dans les infrastructures.

4.3. Détection du CEV après importation ou après apparition de signes cliniques de KSD et risque de dissémination en aval

Pour rappel, du sel (concentration finale : 0,6 %) a été ajouté dans les aquariums de tous les lots de carpes Koï achetés en 2019 dès leur arrivée et à tous les lots présentant des signes cliniques de KSD dès leur apparition. Les individus importés ont également reçu un traitement antibiotique et antiparasitaire.

Le suivi de l'excrétion du CEV hors contexte d'importation n'a été réalisé que sur un seul lot (lot 2019-FR21G1), ce qui ne permet pas d'être représentatif. **Dans ce cas, l'ADN du CEV a été détecté dans les branchies de carpes Koï vivantes ou mortes pendant 31 jours après l'apparition des signes cliniques.** Les signes cliniques de KSD avaient disparu dans les 24 heures suivant l'initiation de traitement par balnéation dans de l'eau salée et n'étaient pas reparus à l'arrêt du traitement. Les charges virales les plus importantes ont été détectées dans les écouvillons de branchies réalisés deux jours après l'apparition des signes cliniques.

Une seule étude expérimentale montre un suivi de la charge virale en CEV dans les branchies de carpes Koï infectées après cohabitation. Dans cette étude, les charges virales présentes dans les broyats de branchies des carpes Koï entre 2 et 15 jours post-infection sont de l'ordre de 10^4 à 10^5 copies ADN du CEV pour 250 ng d'ADN total (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). Dans le cas du lot 2019-FR21G1, les charges virales sont beaucoup plus faibles. Ainsi, deux jours après le début des symptômes un écouvillon de branchies est CEV-négatif alors que les charges virales dans les autres sont de l'ordre de 10^2 à 10^3 copies CEV pour 250 ng d'ADN. Pour les autres dates, moins de 50 copies CEV pour 250 ng d'ADN sont détectées et de nombreux prélèvements sont CEV-négatifs, y-compris pour certains cadavres.

Le traitement par balnéation dans 0,5 % de sel permet de réduire l'expression des signes cliniques et les lésions branchiales (Suzuki, Fukuda 1987 ; Oyamatsu 1996 ; Seno et al. 2003). Il est donc probable que ce traitement permette aussi de réduire la charge virale présente dans les branchies, ce qui pourrait expliquer ces résultats.

En ce qui concerne les importations, la survenue de signes cliniques de KSD, le taux de mortalité et la durée de la détection du CEV dans les branchies sont très variables et aucun schéma ne semble se dessiner. **L'ADN du CEV est détecté jusqu'à 10 - 15 jours post-importation pour certains lots asymptomatiques et 31 jours post-importation pour le lot symptomatique SK1.** De manière générale, les charges virales détectées sont très faibles : de l'ordre de 10 à 100 copies CEV pour 250 ng d'ADN total. On notera cependant deux exceptions chez qui les charges virales ont pu atteindre 10^4 à 10^5 copies pour 250 ng d'ADN total :

- Certains cadavres du lot 2019-SK1, dont les individus ont montré des signes cliniques de KSD et 30 % de mortalité ;
- Les écouvillons de branchies à J+10 des lots 2019-OT3 et 2019-OT4.

Lors des importations, l'historique des carpes Koï n'est pas connu. Ainsi il est possible que les individus achetés aient déjà été infectés par le CEV. De plus, les méthodes d'élevage et d'emballage sont différentes en fonction des éleveurs. D'autre part, il est possible que certaines lignées de carpes Koï soient moins sensibles à la KSD que d'autres. En effet, il a déjà été montré que toutes les carpes *Cyprinus carpio* ne présentent pas la même sensibilité à cette infection, et notamment que certaines carpes communes asiatiques (*Cyprinus carpio haematopterus*) originaires du fleuve Amour sont résistantes au CEV et ne développent pas de signes cliniques lorsqu'elles sont infectées par le CEV (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). Enfin, bien que les CEV détectés dans les prélèvements réalisés à la Pisciculture d'Estalens semblent proches, il est possible que certaines variations génétiques entraînent une modification de la pathogénicité.

On notera la présence dans notre étude de nombreux prélèvements CEV-négatifs. Dans une moindre mesure, une campagne d'épidémiologie-surveillance réalisée au Japon a également montré la présence de prélèvements CEV-négatifs, et ce alors même que les individus présentaient des signes cliniques de KSD. Seuls 87 % des échantillons contenaient l'ADN du CEV (Amita et al. 2002). Lorsque ce sont des écouvillons de branchies d'individus asymptomatiques, on peut penser que tous les individus ne sont pas infectés en même temps. Cependant lorsqu'il s'agit de poissons morts au sein d'un lot où le CEV a été détecté et/ou présentant des signes cliniques de KSD, le rôle du CEV dans cette mortalité doit être questionné. Le cas du lot 2019-SK2 est étonnant :

pratiquement tous les individus morts sont CEV-négatifs alors qu'en parallèle l'ADN du CEV est détecté dans les écouvillons de branchies. Les lésions causées par le CEV sont-elles trop sévères pour permettre une guérison, et ce même si le CEV est éliminé par le système immunitaire, ou bien cette mortalité est-elle imputable à une autre cause ?

Suivre la présence (ADN), la multiplication (ARNm) et le statut immunologique (anticorps anti-CEV) de manière individuelle et suivie au cours du temps pourrait permettre de mieux comprendre si le CEV est impliqué dans ces cas de mortalité où les cadavres sont CEV-négatifs. De plus, une telle étude permettrait de comprendre la dynamique d'infection des différents individus d'un lot. Le fait de détecter l'ADN du CEV ne signifie pas que les poissons excrètent une forme infectante du CEV, il pourrait s'agir de traces résiduelles. L'idéal serait de disposer d'une méthode d'isolement viral *in vitro* pour confirmer que les échantillons contiennent des particules infectantes.

L'état actuel des connaissances ne permet pas d'estimer précisément la durée d'excrétion du CEV, ni de savoir si tous les individus infectés réussissent à éliminer le virus de leur organisme. La durée d'excrétion au niveau du lot est d'au moins 10 – 15 jours pour certains lots asymptomatiques et d'au moins un mois pour certains lots symptomatiques. A la lumière de ces éléments, une quarantaine de plus de deux semaines est conseillée lors d'achats de carpes Koï susceptibles d'être infectées par le CEV. Pour les carpes Koï ayant présenté des signes cliniques de KSD, surtout si de la mortalité a eu lieu, une quarantaine de plus d'un mois est conseillée.

Cette quarantaine a deux objectifs : éviter la contamination d'autres lots au sein des infrastructures et limiter la dissémination du CEV via les ventes.

L'eau et le matériel entrant en contact avec les carpes Koï peuvent servir de vecteur mécanique. Il est donc nécessaire de désinfecter tout le matériel en contact direct ou indirect avec les individus importés, ainsi que l'eau de sortie des aquariums, et ce à minima durant la période de quarantaine ou en présence de signes cliniques de KSD. Ces désinfections visent à limiter les risques de contamination entre les lots mais aussi de l'environnement.

Chapitre 2 : Tentative d'isolement du CEV sur culture cellulaire et sur embryons de carpe Koï

1. Introduction

L'isolement du CEV a été essayé sans succès sur de nombreuses lignées cellulaires et cultures primaires (cf. Tableau 2, page 21). Seule l'utilisation d'explants de branchies a permis la réplication *ex vivo* du CEV (Adamek, Oschilewski, et al. 2017). Dans les régions où la carpe est consommée, il est possible de récupérer des branchies après abattage pour réaliser ces explants. Ce n'est pas le cas dans le Sud-Ouest de la France et cette méthode nécessiterait d'euthanasier des carpes dans ce seul but. De plus, la réplication virale obtenue par cette méthode est faible. Cette technique nécessiterait donc l'utilisation de nombreux explants. C'est pourquoi elle ne sera pas utilisée ici. La réplication *in vitro* du CEV pourrait néanmoins connaître de nombreuses applications, tant en recherche que sur le terrain. On peut notamment citer le séquençage du génome qui serait plus facile qu'à partir d'échantillons de terrain relativement peu concentrés en ADN du CEV, le développement d'un vaccin ou encore la détection d'anticorps neutralisants dans des échantillons. Nous rechercherons donc une méthode alternative permettant d'isoler le CEV *in vitro*.

En ce qui concerne le Salmon gillpox virus, plus proche parent connu du CEV, un variant canadien a pu être isolé sur une lignée cellulaire obtenue à partir d'embryons de saumon royal : CHSE-214 (LeBlanc et al. 2019), lignée sur laquelle le CEV n'a pas pu être isolé (Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Lewisch et al. 2015). Par analogie, on peut supposer que l'isolement viral du CEV serait possible sur des cellules embryonnaires de carpe *Cyprinus carpio*. Deux lignées cellulaires obtenues à partir d'embryons de carpe Koï ont été testées sans succès par Oyamatsu dans le cadre de sa thèse universitaire. Cependant, l'expérience réalisée par Oyamatsu n'a duré que 2 semaines alors que l'effet cytopathique n'a été visible qu'au bout de 21 jours dans l'étude sur le Salmon gillpox virus. De plus, les caractéristiques des cellules utilisées par Oyamatsu ne sont pas précisées, or de nombreux types cellulaires peuvent être obtenus à partir d'embryons de poisson. Nous essaierons de multiplier le CEV sur une culture primaire de cellules embryonnaires issues de blastulas. A notre connaissance, aucune tentative n'a été faite sur des œufs embryonnés de carpe, nous essaierons donc également d'en infecter.

Les œufs embryonnés sont fournis par la Pisciculture d'Estalens. Un protocole d'induction de la ponte est mis en place pour permettre d'obtenir les œufs à la date souhaitée et de pouvoir, si besoin, réaliser une fécondation artificielle.

2. Matériels et méthodes

2.1. Obtention des œufs embryonnés de carpe Koï

Les œufs embryonnés de carpes Koï sont obtenus auprès de la Pisciculture d'Estalens. Les procédures de synchronisation de la ponte et de fécondation artificielle permettent d'obtenir des alevins issus de croisements contrôlés et d'augmenter le nombre d'alevins viables par rapport à un frai naturel. Le nombre d'œufs obtenu est supérieur aux besoins de la Pisciculture et une partie est détruite. Parmi les œufs devant être détruits, une partie est récupérée et transférée au laboratoire.

La synchronisation hormonale du frai peut suivre deux approches (Yaron 1995) :

- **l'approche hypophysaire** qui consiste en pratique à administrer de l'hypophyse de carpe, ce qui a pour effet d'apporter de grandes quantités de gonadotrophines, stimulant directement les gonades ;
- **l'approche hypothalamique** qui consiste à stimuler l'hypophyse en mimant l'action de la GnRh et en inhibant l'action de la dopamine, ce qui entraîne la production de gonadotrophines endogènes puis la stimulation des gonades.

La seconde approche évite l'utilisation de produits issus de carpes qui pourraient hypothétiquement transmettre des pathogènes. De plus, l'extrait hypophysaire de carpe est un produit cher non disponible en petit conditionnement, ce qui le rend économiquement non utilisable pour cette application. Un protocole utilisant de la Gonadoréline (Cystoréline® - CEVA santé animale) et du métoclopramide (Primperan® 10 mg – solution injectable – Laboratoire Sanofi Aventis France ou Metomotyl® 5 – solution injectable – Dechra veterinary products) en une injection pour les mâles et deux injections pour les femelles a été choisi à partir des différents protocoles étudiés chez la carpe argent (Abd Ellatif, Akar 2013).

Pour chaque ponte, des carpes Koï âgées de 2 à 3 ans sont sélectionnés. Une attention particulière est portée au choix des femelles qui doivent présenter un abdomen distendu, signe de la possible présence d'ovocytes matures. Les injections sont réalisées par voie intrapéritonéale sous anesthésie légère au phénoxyéthanol en titration.

Les femelles reçoivent deux injections à 8 heures d'intervalle. La première contient 2 µg/kg de gonadoréline et 20 mg/kg de métoclopramide. La seconde contient 18 µg/kg de gonadoréline et 10 mg/kg de métoclopramide. Les mâles reçoivent une injection unique contenant 20 µg/kg de gonadoréline et 20 mg/kg de métoclopramide.



Figure 17 : Injection intra-péritonéale réalisée sur une femelle carpe Koï anesthésiée afin d'induire le frai

Dans un premier temps, on a essayé de récupérer les œufs fécondés après un frai naturel dans un bassin. Les œufs de carpes étant adhérents, une solution contenant 12 g/l de lait de vache et 1 g/l de sel a été utilisée pour décoller les œufs de leurs supports (El-Gamal, El-Greisy 2008). Les œufs ont ensuite été lavés de multiples fois avec de l'eau minérale. Une fois transporté au laboratoire, ces œufs se sont révélés contaminés par des champignons (genre *Saprolegnia*) et des bactéries. L'utilisation d'amphotéricine B et d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, Ciprofloxacine et Cyclines) n'a pas permis d'éliminer ces contaminations. Cet échec a motivé la mise en place d'une fécondation artificielle et la désinfection des œufs.

Pour les pontes suivantes, les mâles et les femelles sont maintenus séparés de manière à éviter un frai naturel. Dans les 12 à 24 heures suivant la dernière injection, la laitance et les œufs sont récoltés par stripping (taxis externe) sous anesthésie (bain de phénoxyéthanol en titration).

Lorsqu'elle rentre en contact avec l'eau, la laitance forme rapidement un gel, il est donc nécessaire de ne pas la diluer avant de la mettre en contact avec les œufs. Quant aux œufs, ils se collent entre eux et aux substrats lorsqu'ils rentrent en contact avec de l'eau. Les œufs sont immédiatement déposés dans des boîtes en couche unique, puis la laitance et de l'eau minérale sont ajoutées afin de recouvrir les œufs. Les boîtes seront déplacées après 2 heures de repos, et ce afin de ne pas perturber la fécondation et les premières divisions cellulaires. Pendant ce délai, les œufs gonflent et se collent aux parois et entre eux.



Figure 18 : Récolte sous anesthésie de la laitance (en haut) et des œufs (en bas) de carpe Koi.

2.2. Préparation de la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï

Aucun protocole de culture primaire de cellules embryonnaires de carpe *Cyprinus carpio* n'a à notre connaissance été publié. Cependant, plusieurs protocoles ont permis d'obtenir des lignées cellulaires à partir de cellules embryonnaires d'autres espèces de poissons. L'obtention des cellules embryonnaires peut être effectuée à différents stades de développement. Si l'on prélève des cellules à partir de gastrulas, les cellules sont déjà partiellement différenciées. Cela conduit à l'obtention de lignées cellulaires différenciées, comme ce fut par exemple le cas chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) à partir duquel des lignées épithélioïdes et fibroblastiques ont pu être développées (Driever, Rangini 1993). Au contraire, les cellules de blastula (blastomères) permettent d'obtenir des lignées de cellules souches embryonnaires pluripotentes. Néanmoins, ces cellules nécessitent des milieux de cultures plus complexes pour permettre leur division et éviter leur différenciation.

Afin d'obtenir des cellules embryonnaires pluripotentes, notre protocole est inspiré de trois publications qui ont permis l'élaboration de lignées cellulaires pluripotentes à partir de cellules embryonnaires de Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), de Bar du Japon (*Lateolabrax japonicus*), et de Morue de l'Atlantique (*Gadus Morhua*) (Fan et al. 2017 ; Chen et al. 2003 ; Holen et al. 2010).

Certains éléments nécessaires à la fabrication de ce milieu de culture ne sont pas commercialisés. Il s'agit du sérum de poisson et de l'extrait d'embryon de poisson. Il a été montré que les cellules souches embryonnaires de Tilapia du Nil ont une meilleure croissance lorsque le sérum et l'extrait d'embryon utilisés proviennent de la même espèce. Cependant, il est possible d'utiliser du sérum d'une autre espèce de poisson en remplacement sans compromettre la viabilité cellulaire (Fan et al. 2017). Obtenir des œufs embryonnés de carpe Koï auprès de la Pisciculture d'Estalens pour fabriquer l'extrait d'embryon de carpe n'a pas posé de problème. Cependant, la carpe n'est pas une espèce fréquemment consommée dans le sud-ouest de la France et il était donc impossible de récupérer du sang de carpe au moment d'un abattage pour la consommation humaine. Il a donc été décidé d'utiliser du sérum de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

Le sang de truite a été obtenu auprès de la Ferme du Ciron (47 420 – Allons), qui élève des truites, les abat et les transforme sur site. Ce sang a été immédiatement placé dans des tubes pour centrifugation de 50 ml et transportés vers le laboratoire. Afin de séparer le sérum du culot globulaire, le sang est d'abord centrifugé 10 minutes à 2000 rpm. Toutes les manipulations suivantes sont faites sous poste de sécurité biologique. Le sérum est filtré à 0,22 µm et placé 30 minutes dans un bain marie à 56°C afin d'inactiver le complément. Au cours de la phase de chauffage, le sérum se gélifie. Il reste cependant manipulable et les pipetages le liquéfient. Des aliquots de 5 ml sont faits et stockés au congélateur (- 20 °C).

L'extrait d'embryon est réalisé à partir des œufs embryonnés de carpes Koï obtenus à la Pisciculture d'Estalens. Les manipulations suivantes sont réalisées sous poste de sécurité microbiologique. Environ 24 heures après fécondation, maintenus à des températures comprises entre 20 et 25 °C, les œufs embryonnés sont lavés 3 fois avec du PBS stérile (phosphate buffered saline). Ils sont ensuite placés dans une boîte de pétri et immergés 2 minutes dans une solution d'eau de Javel diluée dans de l'eau bi-distillée (concentration finale en hypochlorite de sodium : 1,0 %). Les œufs sont de nouveau rincés 3 fois avec du PBS stérile, en respectant un temps de trempage d'environ 3 minutes après le premier rinçage. Les œufs sont ensuite homogénéisés sur glace à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce. L'homogénat est transféré dans des tubes de 2 ml et centrifugé 30 min à 13 000 rpm. Le surnageant est ensuite filtré à 0,22 µm, aliquoté et stocké à – 20 °C.

La composition du milieu de culture est détaillée dans le Tableau 13, page 87. Compte tenu des problèmes de contamination fongique rencontrés lors de la première ponte, il a été décidé d'ajouter de l'amphotéricine B au milieu. Dans les protocoles appliqués aux cellules embryonnaires de Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), Bar du Japon (*Lateolabrax japonicus*), et Morue de l'Atlantique (*Gadus Morhua*), la concentration en extrait d'embryon homologue et en sérum variait respectivement entre 0,1 et 1,0 % et entre 0,2 et 1,0 % (Fan et al. 2017 ; Chen et al. 2003 ; Holen et al. 2010). Dans ce protocole, l'extrait d'embryon de carpe sera utilisé à 0,2 % et le sérum de truite à 1,0 %. En l'absence de comparaison publiée des effets de différentes concentrations de ces deux éléments sur la croissance des cellules embryonnaires, ce choix est principalement motivé par les quantités disponibles de ces deux produits.

Composant	Quantité pour 500 ml	Concentration finale
DMEM High glucose (Gibco)	Qsp 500 ml	/
HEPES solution à 1M (Gibco)	10,0 ml	20 mM
Pénicilline – Streptomycine 100 X (Gibco)	5,0 ml	1 X
Amphotéricine B 250 X (Gibco)	2,0 ml	1 X
Sérum de veau fœtal (Gibco)	75,0 ml	15 %
FGF-basic human recombinant (Sigma) en solution à 10 µg/ml	0,5 ml	10 ng/ml
Extrait embryon de carpe	1,0 ml	0,2 %
Sérum de truite (complément inactivé par traitement thermique)	5,0 ml	1 %
Glutamine 200 mM (Sigma)	5,0 ml	2 mM
Na-Pyruvate 100 mM (Sigma)	5,0 ml	1 mM
Non essential amino acids 100 X (Sigma)	5,0 ml	1 X
β-mercapto-éthanol (Sigma) 55 mM en solution dans DMEM high glucose (Gibco)	0,5 ml	55 nM
Na-selenite 2 mM (Sigma)	0,5 ml	2 nM

Tableau 13 : Composition du milieu utilisé pour la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe *Koi*

Les œufs sont observés sous loupe binoculaire deux heures après la fécondation pour vérifier qu'ils soient bien fécondés (Figure 19 (A), page 88). Environ 4 heures après fécondation, les embryons sont de jeunes blastulas. Les œufs sont alors transférés sous poste de sécurité microbiologique et lavés 3 fois avec du PBS (phosphate buffered saline), immergés 2 minutes dans une solution d'eau de Javel diluée dans de l'eau bi-distillée (concentration finale en hypochlorite de sodium : 1,0 %), puis rincés trois fois avec du PBS. Chaque puits d'une plaque de culture de 96 puits (P96) est rempli avec 100 µl de PBS. A l'aide de deux pinces fines, 3 à 6 œufs sont placés dans chaque puits et ouverts de manière à laisser le contenu des œufs se répandre dans le puits. Le chorion vide est retiré et jeté. Les cellules sont dissociées par pipetage délicat. Le contenu des chaque puits est ensuite transféré vers les puits d'une P96 à fond en U. La plaque est centrifugée 8 minutes, le surnageant est retiré et le culot cellulaire délicatement suspendu dans 100 µl de PBS. Deux nouveaux rinçages avec du PBS sont réalisés, puis un rinçage avec le milieu de culture. Les cellules sont ensuite transférées vers une P96 à fond plat préalablement recouverte de gélatine³ et contenant 100 µl de milieu de culture (volume total de milieu : 200 µl). Deux P96 sont ainsi préparées. Une est placée à température ambiante et l'autre en

³ Une solution stérile de gélatine de peau de porc diluée dans de l'eau bi-distillée est chauffée à 37 °C puis déposée de manière à recouvrir le fond de chaque puits. L'excédent est ensuite retiré laissant une très fine couche de gélatine au fond des puits.

incubateur à 37 °C avec 4 % de CO₂. Les premières cellules obtenues sont des blastomères : cellules de grande taille hétérogènes (Figure 20). Les cellules adhèrent en quelques heures à la couche de gélatine. Les blastomères se divisent en cellules de plus en plus petites. En 24 à 48 heures, de nombreuses cellules de très petite taille tapissent le fond des puits.

Le milieu de culture est partiellement changé une à deux fois par semaine. Les cellules sont rapidement confluentes à l'issue de la préparation et forment plusieurs couches cellulaires. Les cellules sont dissociées en utilisant une solution de trypsine – 0,05 % / EDTA 0,02 % à température ambiante pendant 5 à 10 minutes. L'inactivation de la trypsine est réalisée à l'aide de l'ancien milieu de culture. Une fois les cellules transférées dans les nouveaux puits, du milieu de culture neuf est ajouté si nécessaire.

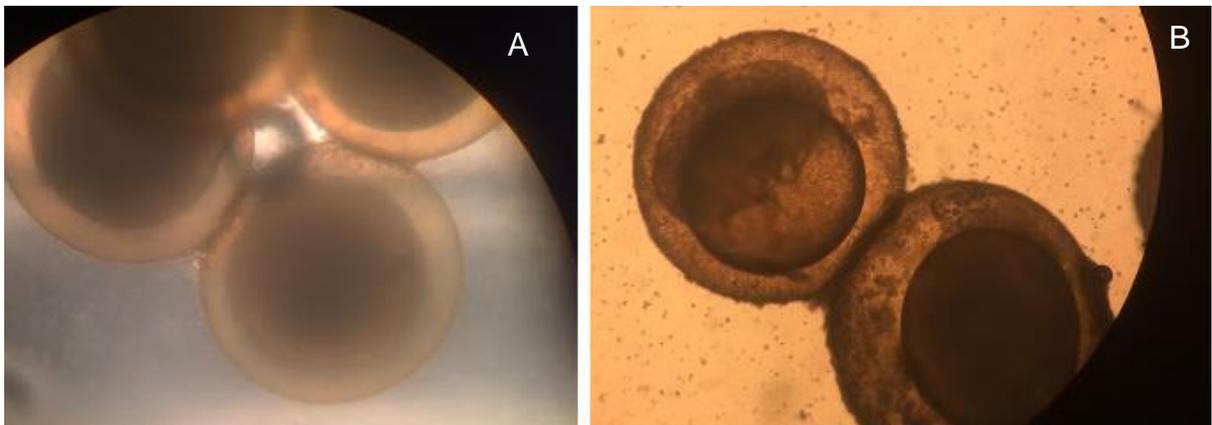


Figure 19 : Oeufs embryonnés de carpe Koï observés à la loupe binoculaire 2 heures (A) et 7 heures (B) après la fécondation. Chaque œuf mesure environ 0,7 mm

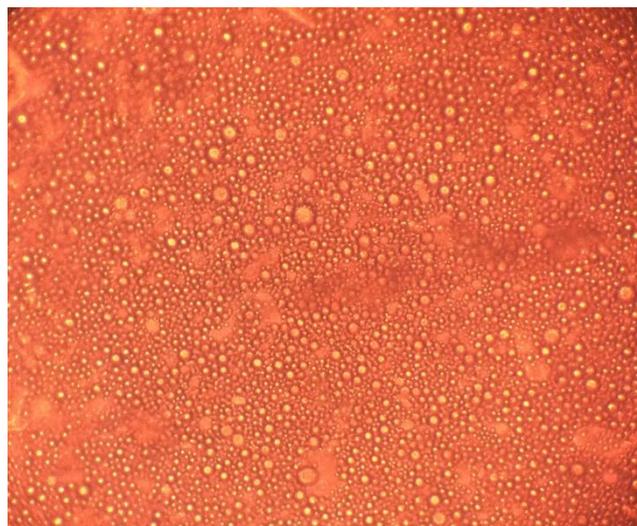


Figure 20 : Cellules embryonnaires (blastomères) de carpe Koï observées dans l'heure ayant suivi leur préparation (grossissement x100)

2.3. Infection des œufs embryonnés de carpe Koï

Les œufs de carpe sont entourés par une enveloppe de fertilisation qui se durcit au contact de l'eau et se transforme en chorion. Le chorion est une structure composée de quatre couches perforées par des pores mesurant moins d'un micromètre de diamètre intérieur (Renard et al. 1990). Il est possible que cette protection empêche la pénétration du CEV à l'intérieur de l'œuf et donc l'infection des embryons. La digestion du chorion par une solution de trypsine sans atteinte de l'intégrité de l'embryon est possible (Renard et al. 1990 ; Suzuki et al. 1997). Le chorion des œufs embryonnés sera donc altéré par l'action de la trypsine afin de permettre l'entrée des virions dans l'œuf.

Après désinfection à l'eau de Javel, une partie des œufs n'est pas utilisée pour la culture primaire de cellules embryonnaires de carpes et est conservée pour l'infection des œufs embryonnés. Les œufs sont alors de nouveau placés dans de l'eau minérale et maintenus à 15 °C jusqu'à ce que les vésicules optiques soient visibles. Les embryons viables ayant atteint ce stade sont transférés vers des puits de P48 (10 œufs par puits). Ils sont rincés deux fois avec de l'eau minérale puis de nouveau désinfectés par trempage 2 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1,0 %. Les œufs sont ensuite rincés 3 fois avec du PBS. Le PBS est ensuite retiré et 200 µl de trypsine 0,05 % - EDTA 0,02 % sont ajoutés et laissés agir 5 minutes à température ambiante afin d'altérer le chorion. A l'issue des 5 minutes, l'excès de trypsine – EDTA est retiré et 500 µl de milieu de culture complet utilisé pour la culture primaire des cellules embryonnaires (cf. Tableau 13, page 87) sont ajoutés.

La mortalité embryonnaire précoce a été très importante et très peu d'embryons ont atteint le stade « vésicule optique ». Ainsi seulement 50 embryons ont pu être infectés 72 heures post-fécondation. Le milieu de culture est retiré et remplacé par 200 µl d'inoculum issu de broyats de branchies (cf. Chapitre 1 partie 2.2.2, page 37 pour la préparation). Les cinq puits contiennent respectivement 200 µl de broyat de branchies des échantillons 2018-41 (contrôle négatif), 2017-16 (positif), 2019-SK1.15.4n°3 et 200 µl de broyat de branchies de l'échantillon 2019-SK1.15.4n°3 dilué à 1/2 dans du milieu de culture complet pour les deux derniers puits. Au bout d'une heure, l'inoculum est retiré et 700 µl de milieu de culture sont ajoutés. Les œufs embryonnés sont maintenus à 15 °C afin de ralentir le développement embryonnaire et de retarder l'éclosion.

Compte tenu du faible nombre d'embryons infectés, peu de prélèvements peuvent être faits. Ainsi, un œuf embryonné et 200 µl de surnageant sont prélevés le lendemain de l'infection. Le volume de milieu était insuffisant pour pouvoir en prélever quotidiennement une partie sans avoir à rajouter du milieu de culture neuf. Afin d'éviter des manipulations supplémentaires aux embryons, il a été décidé de ne pas renouveler le milieu ni d'effectuer d'avantage de prélèvements. Les embryons sont contrôlés quotidiennement et la mortalité embryonnaire est relevée. L'expérience doit être interrompue avant l'éclosion des embryons. A ce moment-là, les embryons et le milieu sont récoltés. L'ADN du CEV est recherché dans chaque prélèvement par qPCR.

2.4. Infection de la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï

L'infection des cellules obtenues à partir des embryons de carpe Koï est réalisée à deux moments : 24 heures après la préparation de la culture primaire et au moment du deuxième passage de la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï.

2.4.1. Infection des cellules 24 heures après la préparation de la culture primaire

Les échantillons 2017-41 (contrôle négatif), 2017-16, 2019-OT3.EB13.4n°5, 2019-FR21G1.EB13.4n°5 et 2019-SK1.15.4n3 sont utilisés pour infecter la culture primaire 24 heures après sa préparation. Chaque inoculum est utilisé pour infecter 8 puits. Pour se faire, le milieu est entièrement retiré et remplacé par 50 µl de milieu neuf et 2 µl de broyat de branchies ou de suspension d'écouvillon de branchies. Des prélèvements de surnageant sont réalisés 3 heures après l'infection des cellules : 25 µl par puits, les prélèvements infectés par un même inoculum sont mélangés. Après ce prélèvement, du milieu de culture neuf est ajouté et le milieu est partiellement changé une à deux fois par semaines. L'apparition d'effet cytopathique est contrôlée au moins trois fois par semaine pendant 35 jours. Les cellules d'un puits par type n'inoculum sont prélevés 23 jours post-infection. Le surnageant est de nouveau prélevé 35 jours post-infection (pool des 7 puits restants). L'ADN du CEV est recherché par qPCR dans tous les prélèvements.

2.4.2. Infection des cellules au moment du deuxième passage

Des cellules embryonnaires ayant déjà été passées une fois et maintenues à 37°C sont dissociées par action de la trypsine 0,05 % et de l'EDTA 0,02 % à température ambiante pendant 5 à 10 minutes. L'ancien milieu est conservé et utilisé pour stopper l'action de la trypsine. Les cellules en suspension sont transférées vers les puits préalablement gélatinés d'une P48 (confluence 50 – 70 %). L'inoculum est immédiatement ajouté (100 µl par puits) ainsi que 200 µl de milieu de culture neuf (volume total par puits : 400 µl). Les échantillons utilisés pour réaliser cette infection sont les échantillons 2018-41 (contrôle négatif), 2017-11, 2017-16, 2019-SK1-15.4n°3, 2019-SK1-23.4n°1, 2019-SK1-25.4n°2, 2019-FC2-29.5 et le mélange surnageant – embryons obtenu après l'infection des œufs embryonnés avec le broyat de branchies 2017-16. Pour chaque inoculum, trois puits sont infectés. Les cellules infectées sont maintenues à température ambiante, le CEV pouvant perdre sa capacité infectante lorsqu'il est maintenu à 37 °C (Oyamatsu 1996).

Une partie du surnageant est récoltée 30 minutes, 2, 7, 10 et 14 jours post-infection. A chaque récolte, 50 µl par puits sont retirés et remplacés par 50 µl de milieu de culture neuf. Les prélèvements des trois puits infectés par le même inoculum sont mélangés. L'ADN du CEV est recherché par qPCR après extraction.

3. Résultats

3.1. Infection des œufs embryonnés de carpe Koï

Dans chaque puits, entre 6 et 8 embryons sont morts dans les 24 heures ayant suivi l'infection des œufs embryonnés, y-compris pour le témoin négatif 2018-41. Ce marqueur n'a donc pas pu être utilisé. Tous les embryons sont morts au bout de trois jours et une prolifération cellulaire est apparue. La présence de cellules se divisant a motivé la poursuite de l'expérience un jour supplémentaire. L'expérience a donc été stoppée au bout de quatre jours par le prélèvement du contenu total de chaque puits. Les masses embryonnaires n'étant plus entourées par leur chorion, celles-ci n'ont pas pu être prélevées séparément du surnageant.

Les résultats de qPCR sont présentés dans le Tableau 14, ci-dessous.

Tableau 14 : Copies ADN du CEV détectées par qPCR suite à l'infection des œufs embryonnés

Inoculum	Copies CEV présentes dans l'inoculum	Copies CEV détectées dans le surnageant à J+1	Copies CEV détectées à J+4 (surnageant + masses embryonnaires)
2018-41 (200 µl)	Contrôle négatif	ADN du CEV non détecté	NA
2017-16 (200 µl)	$3,4 \cdot 10^7 / 200 \mu\text{l}$	$4,5 \cdot 10^4 / 700 \mu\text{l}$	$3,0 \cdot 10^4 / 500 \mu\text{l}$
2019-SK1* (200 µl)	$2,0 \cdot 10^4 / 200 \mu\text{l}$	$9,4 \cdot 10^4 / 700 \mu\text{l}$	ADN du CEV non détecté
2019-SK1* (100 µl) + milieu (100 µl)	$1,0 \cdot 10^4 / 200 \mu\text{l}$	ADN du CEV non détecté	ADN du CEV non détecté
	$1,0 \cdot 10^4 / 200 \mu\text{l}$	ADN du CEV non détecté	ADN du CEV non détecté
*2019-SK1 : échantillon 2019-SK1-15.4n°3 NA : non analysé			

Le lendemain de l'infection, l'ADN du CEV n'a pas pu être détecté dans le surnageant du puits infecté avec le contrôle négatif (2018-41). Cependant, des traces de l'ADN du CEV ont été détectées dans l'œuf provenant de ce même puits. Il est très probable que cette positivité résulte de contaminations. Des traces ADN du CEV ont également été détectées dans les œufs des puits infectés prélevés à J1. Les charges détectées sont insuffisantes pour pouvoir exclure une contamination et les résultats sur les œufs prélevés à J+1 ne peuvent pas être interprétés.

Bien que l'inoculum ait été retiré après infection, l'ADN du CEV est détecté dans le milieu de culture des puits 2017-16 et 2019-SK1-15.4n°3 (noté 2019-SK1 par la suite) le lendemain de l'infection. La quantité d'ADN viral détecté dans le puits 2017-16 est inférieure à la quantité présente dans l'inoculum. Cependant, la quantité d'ADN viral présent dans le puits 2019-SK1 est du même ordre de grandeur que la quantité inoculée. A J+4, l'ADN du CEV n'est détectable que dans le puits 2017-16 (charge similaire à celle détectée à J+1).

Compte tenu de la concentration élevée en ADN du CEV de l'inoculum 2017-16, il est vraisemblable que la charge détectable à J+4 soit le reflet des restes de l'inoculum. Pour les autres puits, l'ADN du CEV n'est plus détectable à J+4. Ainsi, aucune multiplication virale n'a pu être mise en évidence au cours de cette expérience.

3.2. Infection de la culture primaire de cellules embryonnaires de carpe Koï

3.2.1. Infection des cellules 24 heures après établissement de la culture primaire

Aucun effet cytopathique n'a été observé dans les 35 jours suivant l'infection des cellules. L'ADN du CEV n'a pas été détecté dans le surnageant de culture cellulaire trois jours après infection, et ce quel que soit l'inoculum utilisé.

Vingt-trois jours post-infection, l'ADN du CEV a été détecté dans les cellules (sans le milieu) d'un puits par type d'inoculum, y-compris pour le contrôle négatif. Les charges virales sont du même ordre de grandeur pour les 5 puits ($1,6 \cdot 10^2$ à $7,8 \cdot 10^2$ copies par puits (P96)). La positivité du contrôle négatif est probablement due à une contamination, d'autant plus que les puits contrôle négatifs sont dans la même boîte que les puits infectés. La quantité d'ADN du CEV présente dans les cellules des puits infectés est inférieure ou du même ordre de grandeur que la quantité inoculée. En l'absence d'augmentation significative du nombre de copies de l'ADN du CEV dans un puits, on ne peut pas conclure à une multiplication virale.

3.2.2. Infection des cellules au cours du deuxième passage

Aucun effet cytopathique n'a été observé dans les 14 jours ayant suivi l'infection. Les résultats des qPCR réalisées sur des pools de surnageant sont repris dans le Tableau 15, page 95.

L'ADN du CEV n'est pas détecté dans le surnageant du contrôle négatif. Les puits infectés avec le broyat d'embryons infectés par l'inoculum 2017-16 ont présenté une acidification intense du milieu 48 heures post-infection, associée à la mort de la totalité des cellules. Un des trois puits infectés avec l'inoculum 2017-11 a présenté une acidification du milieu le dixième jour post infection. Le milieu a donc été retiré, les cellules rincées deux fois avec du milieu de culture puis 400 µl de milieu neuf ont été mis dans ce puits.

On observe dans les puits ayant connu une mortalité cellulaire une légère augmentation de la charge virale (Tableau 15, ci-dessous). Cependant, du fait de la mortalité cellulaire, une partie des cellules mortes en suspension ont été prélevées. Ces prélèvements sont donc différents des prélèvements de surnageant et sont difficilement comparables.

Globalement, la charge virale présente dans le surnageant diminue fortement (Tableau 15, ci-dessous). Dans certains puits (2019-SK1-15.4n°3, 2019-SK1-23.4n°1, 2019-SK1-25.4n°2), une légère variation de la charge virale présente dans le surnageant entre J7 et J14 est observée. Celle-ci est cependant trop faible, notamment en comparaison aux charges détectées à J0 et J2, pour être jugée significative.

*Tableau 15 : Détection de l'ADN du CEV par qPCR dans le surnageant des puits contenant des cellules embryonnaires de carpe Koi infectées au cours de leur deuxième passage
Nombre de copies ADN du CEV pour 150 µl de surnageant (pool de trois puits)*

Jours post-infection	J0	J2	J7	J10	J14
2018-41	0,0.10 ⁰	0,0.10 ⁰	0,0.10 ⁰	0,0.10 ⁰	0,0.10 ⁰
Contrôle négatif					
2017-11	1,1.10 ⁵	6,4.10 ⁴	3,8.10 ²	1,9.10 ³⁺	1,1.10 ²
2017-16	1,1.10 ⁵	9,8.10 ⁴	8,5.10 ²	1,5.10 ³	7,0.10 ²
2019-SK1-15.4n°3	1,0.10 ⁴	1,6.10 ⁴	4,8.10 ²	7,3.10 ²	1,3.10 ³
2019-SK1-23.4n°1	3,0.10 ⁴	7,8.10 ³	3,8.10 ²	2,8.10 ²	5,5.10 ²
2019-SK1-25.4n°2	1,6.10 ⁴	1,0.10 ⁴	1,7.10 ²	7,0.10 ²	7,3.10 ²
2019-FC2	4,0.10 ⁴	1,6.10 ³	4,2.10 ¹	0,0.10 ⁰	0,0.10 ⁰
Embryons 16	0,0.10 ⁰	2,8.10 ^{2*}			
* : mortalité cellulaire complète dans les trois puits à J2					
+ : mortalité cellulaire partielle dans un des 3 puits à J10, le milieu a donc été changé					

4. Conclusion et discussion

L'ADN du CEV a pu être détecté dans des embryons et des cellules embryonnaires de carpe Koï ayant reçu le contrôle négatif. Considérant que dans les deux cas les groupes ayant reçu le contrôle négatif étaient dans les mêmes boîtes que les groupes infectés, il est possible qu'il s'agisse d'une contamination lors des manipulations. Cependant, sachant que ces embryons et ces cellules proviennent de la même ponte obtenue à la Pisciculture d'Estalens où le CEV est présent et sont issus du même croisement, on ne peut pas exclure une contamination des œufs avant leur transfert vers le laboratoire, bien que cela soit très peu probable. Compte tenu du faible nombre d'œufs disponibles lors de cette ponte, tous les œufs ont été utilisés pour ces expériences et la présence du CEV dans ces œufs n'a pas été testée en amont. Cependant, des cultures cellulaires non infectées et maintenues à 37°C ont été testées après leur deuxième passage et le CEV n'a pas pu être détecté. Il conviendrait de renouveler ces expériences en s'assurant que le CEV n'est pas initialement présent dans les œufs utilisés. Ainsi, le rechercher dans la laitance et les œufs semble approprié pour les prochaines expériences utilisant des œufs embryonnés de carpes.

Les résultats obtenus précédemment sont en défaveur d'une multiplication efficace du CEV dans les cultures primaires de cellules embryonnaires et dans les embryons déchorionnés. En effet, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la charge virale, ni d'effet cytopathique spécifique qui seraient des indices de multiplication virale. Bien que l'ADN du CEV puisse être détecté dans les cultures primaires de cellules embryonnaires pendant au moins 25 jours, et dans certains œufs embryonnés jusqu'à la fin de l'expérience, ceci n'est pas un indice de multiplication virale.

Dans le cas du Salmon gillpox virus, seul le variant canadien a pu être isolé sur culture cellulaire de CHSE-214 (LeBlanc et al. 2019). On peut supposer par analogie que tous les variants du CEV ne se comportent pas de la même manière quant à la possibilité de les isoler sur culture cellulaire. Or, les principaux essais d'isolement du CEV réalisés ont été faits avec des variants appartenant au génogroupe II (variants génotypés ou provenant du Japon où seul le génogroupe II a été détecté à ce jour) (Murakami et al. 1978 ; Oyamatsu 1996 ; Oyamatsu, Hata, et al. 1997 ; Lewisch et al. 2015 ; Jung-Schroers et al. 2015 ; Ouyang et al. 2019). Il pourrait donc être intéressant d'essayer d'isoler sur différentes lignées cellulaires des variants du génogroupe I.

Chapitre 3 : Etude du génome du CEV

1. Introduction

A ce jour, très peu d'informations sont disponibles à propos du génome du CEV. Au total, moins de 3 500 pb sont séquencées : le gène P4a (N° accession Genbank® MH645915.1), une partie de la région non traduite en 5' (5' UTR) de ce même gène et une partie du gène P4b (Oyamatsu 1996). Ces deux protéines présentent respectivement 26 % et 38 % d'identité avec les protéines éponymes du Salmon gillpox virus, faisant de ce-dernier le virus connu le plus proche du CEV.

Bien que ces virus aient tous les deux un tropisme pour les branchies d'actinoptérygiens (poissons à nageoires rayonnées), ils présentent néanmoins des différences importantes. En effet, la taille d'un virion mature de Salmon gillpox virus est de l'ordre de 200 nm en longueur et la surface de son enveloppe est lisse (Gjessing et al. 2015). Selon les études, la taille du CEV varie entre 200 nm (Ouyang et al. 2019) et 300 - 400 nm (Miyazaki et al. 2005). L'enveloppe du CEV est recouverte de formations tubulaires d'environ 50 nm (Miyazaki et al. 2005), ce qui lui donne un aspect de mûre caractéristique : « Mulberry-like profile » (Ono et al. 1986). La taille du génome du Salmon gillpox virus est de 241 565 pb (taille obtenue par séquençage (Gjessing et al. 2015)), contre environ 450 kb pour le CEV (taille estimée par électrophorèse sur champ pulsé (Oyamatsu 1996)).

Le séquençage complet du génome du CEV, sans *a priori*, demanderait de grandes quantités d'ADN du CEV, et s'avère impossible en l'absence d'échantillons de terrain très concentrés ou d'une méthode de réplification *in vivo* ou *ex vivo* efficace. Seul le séquençage post-amplification est envisageable et sera tenté à partir des séquences déjà connues. Chez le Salmon gillpox virus, environ 6 kb sont situées entre les gènes P4b et P4a (Gjessing et al. 2015). Si l'on suppose que l'organisation des gènes est identique chez le CEV, l'amplification de la zone inter-génique P4b – P4a est envisageable. La Figure 21 représente les emplacements des gènes P4b et P4a chez le Salmon gillpox virus et l'orientation supposée des séquences du CEV CyPP-77 et CyPP-3. Ce séquençage partiel du génome du CEV pourrait permettre de le classer et notamment de confirmer son appartenance à la famille des *Poxviridae*.

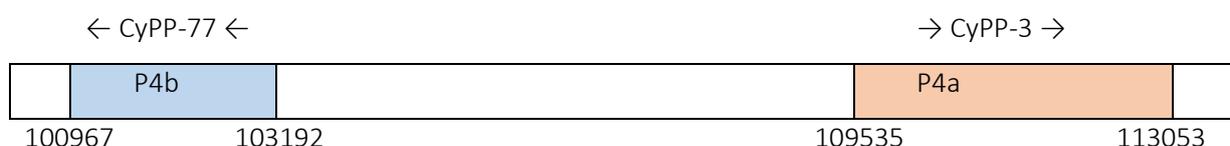


Figure 21 : Représentation schématique de l'emplacement des gènes codant pour P4a et P4b chez le Salmon gillpox virus et orientation présomptive des séquences CyPP-3 et CyPP-77 du CEV.

2. Matériels et méthodes

La première étape consiste à vérifier que l'amplification par PCR d'une partie des gènes P4b et P4a est possible (amorces dessinées sur les séquences CyPP-3 et CyPP-77 publiées par Oyamatsu en 1996). Si ces deux amplifications sont possibles, on essaiera dans un second temps d'amplifier la partie du génome du CEV comprise entre ces deux séquences. Si cette longue amplification fonctionne, l'amplicon sera ensuite séquencé, la présence de cadres ouverts de lecture (ORF) recherchées et une analyse phylogénétique sera conduite sur les séquences d'acides aminés obtenues par traduction des ORF.

2.1. Amplification et séquençage des fragments codant partiellement P4b et P4a

Les extraits ADN des échantillons 2017-16 (dilution à 1/100), 2019-OT3-EB13.4n°4 (dilution à 1/10), 2019-FR21G1-EB13.4n°5 (dilution à 1/10) et 2019-OZ4-eau (sans dilution) ont été sélectionnés car leurs concentrations absolues et relatives en ADN du CEV étaient élevées. Deux contrôles négatifs sont ajoutés : 2018-41 et eau nanopure. Les amorces sont dessinées à partir des séquences nucléotidiques CyPP-3 et CyPP-77 publiées par Oyamatsu en 1996. Ces séquences proviennent d'un virus appartenant au génogroupe II, tout comme nos échantillons, néanmoins il est génétiquement différent (cf. analyse phylogénétique page 63 et suivantes). Il est possible que les amorces soient dessinées sur des parties variables, auquel cas elles ne pourraient pas s'hybrider et l'amplification serait impossible. Plusieurs échantillons génétiquement différents sont donc testés afin de limiter ce risque.

Le choix des amorces doit permettre de couvrir le maximum de chaque séquence. De plus, il est préférable de réaliser les deux amplifications en parallèle. Il est donc nécessaire que les températures d'hybridation soient proches pour les quatre amorces et que chaque paire ne forme pas de dimères d'amorces. Pour P4a, les amorces publiées CEV-for-B-int (T_m : 55 °C) et CEV-Oya-R (T_m : 53 °C) sont choisies. Pour P4b, une paire d'amorces est dessinée en utilisant l'outil en ligne Primer-BLAST (Ye et al. 2012). Ces dernières sont nommées CEV-P4b-F (T_m : 59 °C) et CEV-P4b-R (T_m : 63 °C). Les caractéristiques et les publications d'origine des différentes amorces sont données dans l'annexe A, page 129. Les positions des amorces sont en annexe B, page 131.

Le mélange réactionnel est composé de 0,1 µl de Kapa taq (Sigma Aldrich), 1,0 µl de tampon A 10X, 0,2 µl de dNTP à 10 mM, 0,4 µl de MgCl₂ à 25 mM, du couple d'amorces concerné à 500 nM, 2,0 µl d'extrait ADN et d'eau nanopure qsp 10 µl.

Le programme d'amplification comporte une étape de dénaturation initiale d'une minute à 95°C, 40 cycles (dénaturation : 30 secondes à 95°C ; hybridation : 1 minute à 50°C ; élongation : 30 secondes à 72°C) et une étape d'élongation finale d'une minute à 72°C.

Les produits PCR d'intérêt sont purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose (Kit NucleoSpin® gel and PCR clean up – Macherey-Nagel) puis séquencés (méthode SANGER).

2.2. Amplification et séquençage de la zone inter-génique P4a – P4b

Chez le Salmon gillpox virus, environ 6 kb sont présentes entre les gènes P4b et P4a. Compte tenu du fait que la position de la séquence CyPP-77 sur le gène P4b du CEV n'est pas connue et que le génome du CEV est donné pour être deux fois plus grand que celui du Salmon gillpox virus, on s'attend à obtenir un amplicon d'au moins 6 kb. Les amplicons aussi grands sont difficiles à obtenir et requièrent l'utilisation de polymérases spécifiques et d'échantillons suffisamment concentrés en ADN cible. Les échantillons les plus concentrés en ADN du CEV pour lesquels l'amplification des d'une partie des gènes P4a et P4b a été possible sont alors choisis.

Lors des premières PCR, l'amplicon formé ne recouvrait pas entièrement la séquence cible. Cependant le séquençage de ces premiers amplicons a permis de dessiner de nouvelles amorces internes ciblant une séquence plus courte, et donc plus facile à amplifier.

2.2.1. Amplification initiale de la zone inter-génique P4b – P4a et séquençage

Les extraits ADN des échantillons 2017-16 (dilution à 1/100), 2019-OT3-EB13.4n°4 (dilution à 1/10) et 2019-FR21G1-EB13.4n°5 (non dilué) sont utilisés. Deux contrôles négatifs sont ajoutés : 2017-41 et eau nanopure.

Le mélange réactionnel comprend 0,4 µl de PrimeSTAR GXL polymerase (takara), 2 µl de tampon GXL (5X) associé, 0,8 µl de dNTP à 10 mM, 200 nM de l'amorce CEV-P4b-R et 200 nM de l'amorce CEV-oya-R à 200 nM, 4,0 µl d'extrait ADN et de l'eau nanopure qsp 10 µl.

Le programme d'amplification comporte 30 cycles (10 secondes de dénaturation à 98°C, 15 secondes d'hybridation à 55°C, 1 minute d'élongation à 68°C), ainsi qu'une étape d'élongation finale d'une minute supplémentaire à 68°C.

Les produits PCR d'intérêt sont purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose (Kit NucleoSpin® gel and PCR clean up – Macherey-Nagel). Les extrémités de l'amplicon sont séquencées par la méthode SANGER en utilisant les amorces CEV-oya-R et CEV-P4b-R pour les extrémités et CEV-rev-J-int pour une partie manquante du gène P4a. Une autre partie du gène codant pour P4a a précédemment été séquencée (cf. Chapitre 1, partie 2.5.2, page 49).

2.2.2. Amplification interne de la zone inter-génique P4b – P4a et séquençage

Après séquençage des extrémités du premier amplicon, des amorces intérieures sont dessinées à l'aide de l'outil Primer-BLAST (Ye et al. 2012) afin d'amplifier une séquence plus courte qui sera par la suite séquencée.

L'amplification de la séquence comprise entre les gènes P4b et P4a était inconstante, ce qui a motivé la mise en place d'une PCR semi-nichée utilisant de nouvelles amorces internes : CEV-P4b-R – CEV-P4a-2R lors de la première étape et CEV-P4b-2R et CEV-P4a-2R lors de la deuxième étape. L'utilisation d'une PCR semi-nichée permet de réaliser d'avantage de cycles d'amplification et donc d'augmenter le rendement tout en augmentant la spécificité de la réaction. Les caractéristiques des amorces sont disponibles en annexe A, page 129 et leurs positions en annexe B, page 131.

Les échantillons 2019-FR21G1-27.4n°1 (contrôle négatif), 2019-OT3EB13.4n°4, 2019-OT3EB13.4n°5 et 2019-SK6-eau sont amplifiés.

Le mélange réactionnel contient 0,8 µl de PrimeSTAR GXL polymerase (takarabio), 4,0 µl du tampon (5X) associé, 1,6 µl de dNTP à 10 mM, 200 nM de chaque amorce du couple, 80 ng d'ADN pour la première étape ou 4 µl de produit de la première étape, pur et dilué au dixième, pour la deuxième étape, eau qsp 20 µl.

Le programme d'amplification comporte 30 cycles d'une étape de dénaturation de 10 secondes à 98°C, d'une étape d'hybridation de 15 secondes à 60°C et d'une étape d'élongation de 6 minutes à 68°C, suivis d'une élongation finale d'une minute à 68°C. La durée de l'étape d'élongation est allongée à 1 minute par kb, conformément aux recommandations du fabricant lorsque le protocole « rapide » de 10 secondes par kb ne fonctionne pas.

Les produits PCR d'intérêt sont purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose. Les extrémités de l'amplicon sont séquencées par la méthode SANGER en utilisant les amorces CEV-P4a-2R et CEV-P4b-2R. Ce séquençage permet de confirmer l'hybridation spécifique des amorces sur le génome du CEV. Si l'amplicon correspond bien au génome du CEV, celui-ci est séquencé par séquençage de troisième génération (MinION – Oxford Nanopore Technologies).

La séquence obtenue par séquençage nanopore est ensuite confirmée par séquençage SANGER. Pour se faire, de nouvelles amorces sont dessinées grâce à l'outil en ligne « Sequencing Primer Design » proposé par Eurofins Genomics⁴ : CEV_P4ab_F1, CEV_P4ab_R1, CEV_P4ab_F2, CEV_P4ab_R2, CEV_P4ab_F3, CEV_P4ab_R3, CEV_P4ab_F4, CEV_P4ab_R4, CEV_P4ab_F5, CEV_P4ab_R5, CEV_P4ab_F6, CEV_P4ab_F7. Les caractéristiques des amorces sont disponibles en annexe A, page 129 et leurs positions représentées schématiquement en annexe B, page 131. Chaque couple CEV_P4ab_Fn – CEV_P4ab_Rn est utilisé pour réaliser une PCR conventionnelle conformément aux recommandations du fabricant de la polymérase Kapa taq (Sigma Aldrich). Si une amplification en une étape ne fonctionne pas, une PCR nichée est réalisée en respectant les recommandations d'utilisation de la polymérase PrimeStar GXL (Takara bio).

⁴ <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/sequencing-primer-design/>

2.3. Alignement et assemblage des séquences nucléotidiques et recherche de cadres ouverts de lecture

Les séquences obtenues par séquençage SANGER sont alignées et assemblées à l'aide du logiciel Mega X (Kumar et al. 2018). Les séquences CyPP-3 et CyPP-77 (Oyamatsu 1996) codant pour une partie des précurseurs des protéines de *core 4a* et *4b* ainsi que la séquence complète codant pour le précurseur de la protéine de *core 4a* (n° d'accèsion Genbank MH645915.1) sont utilisées pour aligner les premières séquences obtenues. L'assemblage de la séquence complète est réalisé en alignant manuellement les extrémités des séquences internes obtenues.

Une fois la séquence nucléotidique assemblée, les cadres ouverts de lecture (ORF – Open Reading Frame) sont recherchés grâce à l'outil NCBI ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). D'éventuelles correspondances entre les séquences d'acides aminés obtenues par traduction de ces ORF et des protéines connues sont recherchées en utilisant les outils Blastp et PSI-Blast (Altschul 1997).

Pour les gènes n'appartenant pas à des familles de gènes conservés chez le *Poxviridae*, des protéines homologues ou analogues sont recherchées en utilisant l'outil PHYRE 2 disponible à l'adresse <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/> (Kelley et al. 2015).

2.4. Analyses phylogénétiques

L'organisation des gènes hypothétiques détectés sur l'assemblage nucléotidique de cette zone du génome du CEV est comparée à celles du Salmon gillpox virus et d'autres *Poxviridae*.

D'autre part, une analyse phylogénétique est conduite sur les séquences protéiques obtenues à partir des cadres ouverts de lecture détectés et pour lesquelles des protéines orthologues sont connues. Les séquences de protéines orthologues des *Poxviridae* sont obtenues à partir de la base de données VOC's, téléchargeable à partir du site www.4virology.net (Upton et al. 2003). L'analyse phylogénétique est conduite à l'aide du logiciel MegaX (Kumar et al. 2018) sur la concaténation de plusieurs protéines conservées chez tous les *Poxviridae*.

3. Résultats

3.1. Amplification et séquençage des fragments codant partiellement P4a et P4b

Les amplifications réalisées avec les couples d'amorces CEV-P4b-F – CEV-P4b-R et CEV-for-B-int – CEV-oya-R ont permis d'obtenir deux amplicons de tailles attendues (environ 1000 pb) pour chacun des échantillons 2019-OT3-EB13.4n°4 et 2017-16. Aucune amplification spécifique n'a été observée pour 2019-OZ4-eau et 2019-FR21G1-EB13.4n°5.

Les séquences (méthode SANGER) obtenues à partir des produits d'amplification de l'échantillon 2019-OT3-EB13.4n°4 présentent 99,98 % d'identité avec la séquence CyPP-77 et 99,97 % d'identité avec la séquence CyPP-3, ce qui confirme la spécificité de ces amplifications.

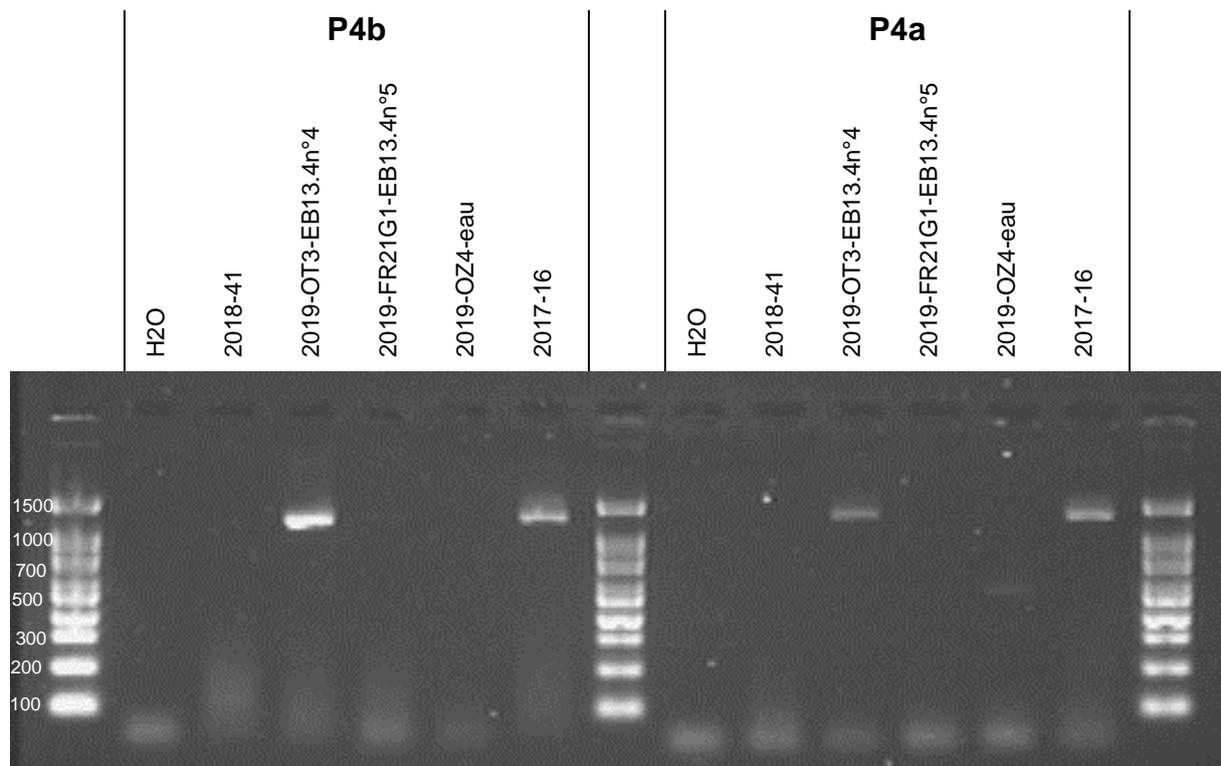


Figure 22 : Gel d'électrophorèse des produits d'amplification P4a et P4b (gel d'agarose à 1 %, marqueur de poids moléculaire, marqueur de poids moléculaire EXACTLADDER® 100 pb, les tailles sont donnée en pb)

3.2. Amplification et séquençage de la zone inter-génique P4b – P4a

3.2.1. Amplification initiale et séquençage

Un produit peu concentré d'environ 6 kb est obtenu suite à l'amplification de l'extrait ADN 2019-OT3-EB13.4n°4 (OT3) avec les amorces CEV-oya-R et CEV-P4b-R. Aucune amplification n'a été observée pour les échantillons 2019-FR21G1-EB13.4n°5 (FR), 2018-41 (contrôle négatif) et 2017-16.

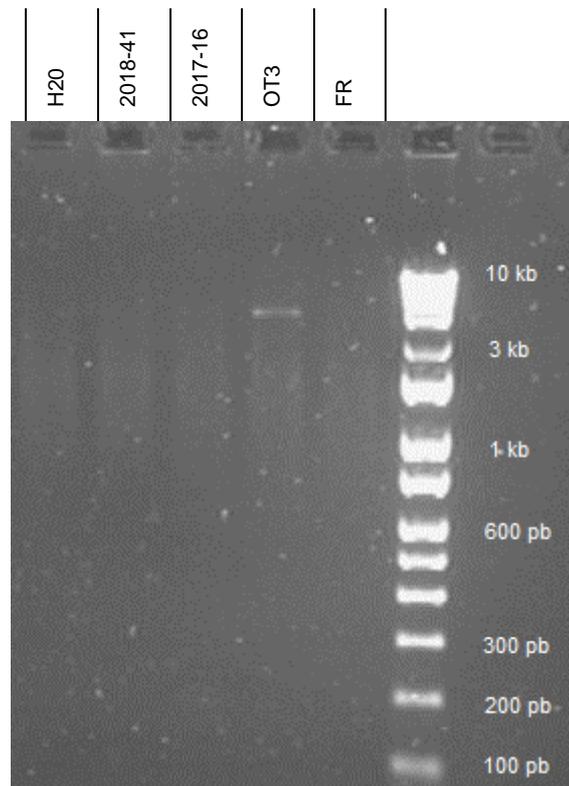


Figure 23 : Gel d'électrophorèse des produits de la PCR P4a → P4b (produit 6 kb) (gel d'agarose à 1 %, marqueur de poids moléculaire EXACTLADDER® 2 log)

La quantité de produit après la première amplification était insuffisante pour permettre le séquençage. Une nouvelle amplification (mêmes conditions) est alors réalisée à partir du même échantillon et du produit de la première amplification. Aucune bande n'est visible suite à la nouvelle amplification de l'échantillon 2019-OT3-EB13.4n°4 alors qu'une bande à 3 kb est observée pour l'amplification du premier produit. La séquence obtenue (méthode SANGER) à partir de cet amplicon de 3 kb est identique (> 99 %) avec la séquence MH645915 codant pour la protéine P4a du CEV, confirmant la spécificité de la réaction. Il semblerait que l'amorce CEV-P4b-R se soit hybridée ailleurs que sur la séquence ciblée, entraînant l'amplification d'une zone plus restreinte qu'attendu.

3.2.2. Amplification interne et séquençage

3.2.2.1. Amplifications CEV-P4b-R – CEV-P4a-2R et CEV-P4b-2R – CEV-P4a-2R et séquençage nanopore

Les produits d'amplification ne sont visibles qu'après la seconde étape de la PCR semi-nichée, pour les échantillons 2019-OT3-EB13.4n°4 et dans une moindre mesure 2019-OT3-EB13.4n°5. Ils forment une bande au niveau du marqueur de poids moléculaire de 10 kb. La Figure 24 présente le gel d'électrophorèse du produit d'une nouvelle amplification de l'échantillon 2019-OT3-EB13.4n°4 en utilisant la même PCR nichée. La taille de cet amplicon est très supérieure à la taille attendue (env. 3 kb). Cependant, cette zone n'ayant jamais été séquencée, il est possible que l'estimation de la taille attendue soit erronée. Les extrémités de cet amplicon ont donc été séquencées (méthode SANGER). Celles-ci se superposent avec les extrémités des séquences utilisées pour dessiner les amorces internes, ce qui confirme le succès de l'amplification interne de la zone inter-génique P4b – P4a (P4b et P4a partiellement inclus).

L'erreur faite dans l'estimation de la taille de la zone ciblée pour cette amplification peut expliquer les difficultés précédemment rencontrées pour l'amplifier, notamment par la sous-estimation du temps d'élongation nécessaire.

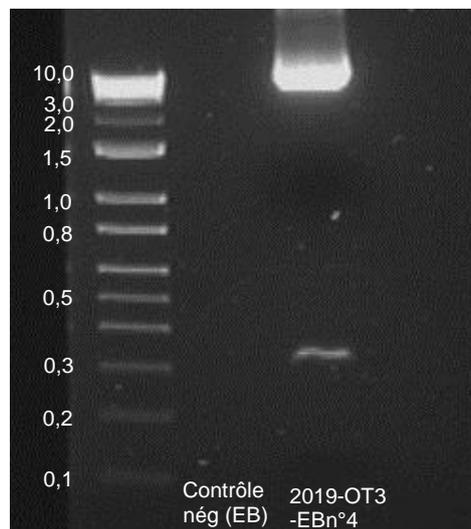


Figure 24 : Gel d'électrophorèse du produit d'amplification de l'échantillon 2019-OT3-EB13.4n4 de la seconde étape de la PCR nichée P4a → P4b (Gel d'agarose à 1%, marqueur de poids moléculaire EXACTLADDER® 2 log, les tailles sont données en kb)

Le séquençage nanopore de cet amplicon (à partir de l'échantillon 2019-OT3-EB13.4n°4) a produit une séquence assemblée *de novo* de 21 kb. L'estimation de la taille des grands fragments (> 10 kb) par électrophorèse sur gel d'agarose est difficile, il n'est donc pas surprenant de visualiser un amplicon de 21 kb au niveau du marqueur de 10 kb. L'analyse de cette séquence a montré une concaténation en palindrome d'un même motif de 7 kb répété 3 fois. Ce genre de concaténation peut notamment se produire lors de PCR semi-nichée et/ou lorsque la durée de l'étape d'élongation est trop longue.

3.2.2.2. Amplifications CEV_P4ab_Fn – CEV_P4ab_Rn et séquençage SANGER de la partie interne de la zone inter-génique P4b – P4a

La Figure 25 reprend l'agencement schématique des amorces utilisées dans cette sous-partie. Les positions exactes des amorces sont disponibles en annexe B, page 131. Par souci de clarté, les amorces CEV_P4ab_Fn et CEV_P4ab_Rn seront abrégées dans cette partie Fn et Rn. Par exemple, l'amorce CEV_P4ab_F1 est abrégée F1.

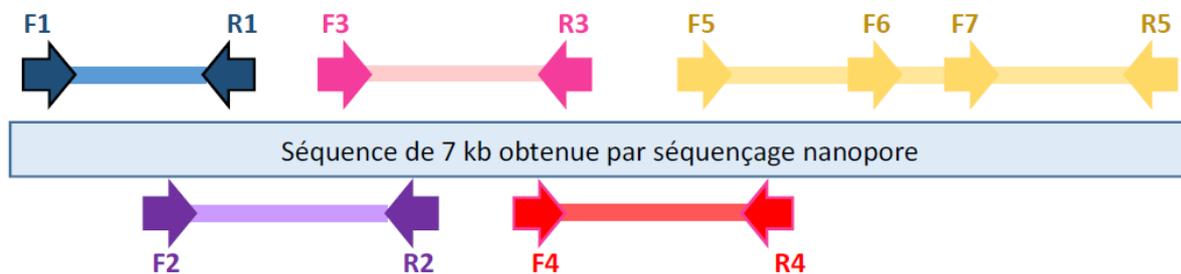


Figure 25 : Schéma représentant l'agencement des amorces CEV_P4ab_Fn et CEV_P4ab_Rn sur la séquence nanopore de 7 kb (échelle non respectée)

Trois PCR conventionnelles ont permis d'obtenir suffisamment de produit pour permettre le séquençage des amplicons. Il s'agit des réactions réalisées avec les couples d'amorces F1 – R1, F3 – R3 et F4 – R4 (Figure 26). L'amplification avec le couple F2 – R2 a permis d'amplifier la cible mais le rendement était insuffisant pour séquencer l'amplicon. Aucun produit de l'amplification avec le couple F5 – R5 n'est visible sur le gel d'électrophorèse. Les amorces des couples F1 - R1, F3 - R3 et F4 - R4 ont été utilisées pour séquencer (méthode SANGER) les amplicons associés.

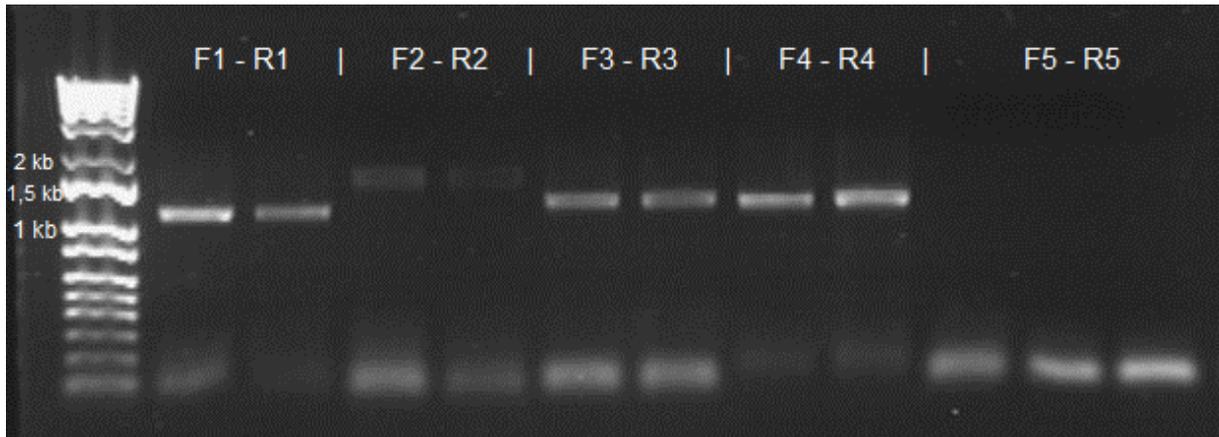


Figure 26 : Gel d'électrophorèse des produits PCR CEV_P4ab_Fn - CEV_P4ab_Rn (gel d'agarose à 1%, marqueur de poids moléculaire EXACTLADDER® 2 log)

Une PCR nichée utilisant les amorces F1 – R3 pour la première étape et F2 – R2 pour la deuxième étape a permis d'amplifier la zone ciblée (Figure 27). Les amorces F2 et R2 ont été utilisées pour le séquençage (méthode SANGER) de cet amplicon.

Des PCR nichées utilisant les amorces CEV-revJ-int et F4 pour la première étape et F5 – R5, F6 – R5 et F7 – R5 ont permis d'amplifier la cible des amorces F5 - R5 (Figure 27). Afin de réduire le risque de défaut d'hybridation entre les amorces F6 / F7 et le produit d'amplification au cours du séquençage, trois amplifications distinctes sont réalisées lors de la deuxième étape. Les amorces F5, F6 et F7 sont utilisées pour séquencer les produits associés. Le séquençage à l'aide de l'amorce R5 est réalisé sur le produit F5 - R5.

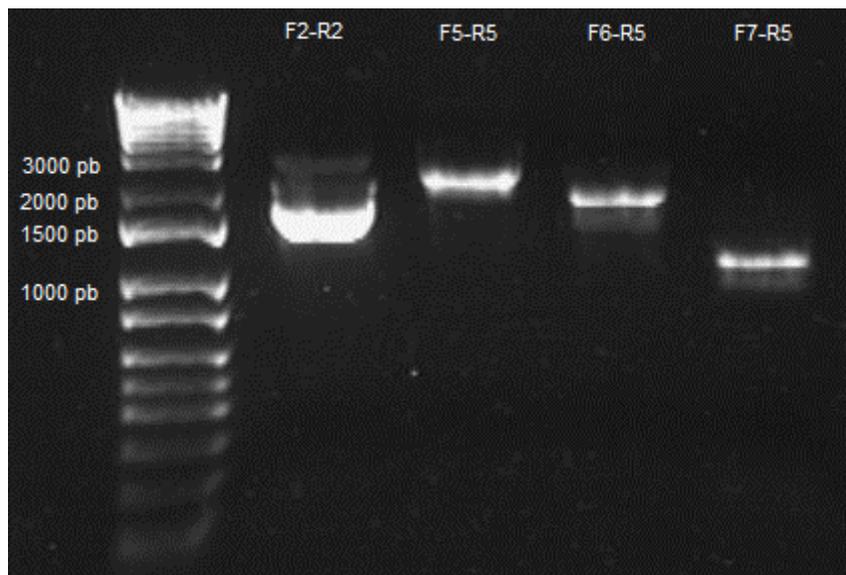


Figure 27 : Gel d'électrophorèse des produits des PCR nichées CEV_P4ab_Fn – CEV_P4ab_Rn (gel d'agarose à 1 %, marqueur de poids moléculaire EXACTLADDER® 2 log)

3.3. Alignement et assemblage des séquences nucléotidiques obtenues et détection des cadres de lecture ouverts

Tous les séquençages nucléotidiques ont été réalisés à partir de produits d'amplification de l'échantillon 2019-OT3-EB13.4n°4.

La séquence nucléotidique assemblée à partir des séquençages SANGER mesure 10 951 pb et est disponible en annexe C, page 132. Cette séquence s'aligne avec les séquences de référence : CyPP-3, CyPP-77 (Oyamatsu 1996) et avec la séquence codante complète du gène P4a (N° d'accèsion GenBank® MH645915). Des polymorphismes, exclusivement de type substitution, sont observés. Le positionnement schématique de ces séquences est disponible dans la Figure 28.

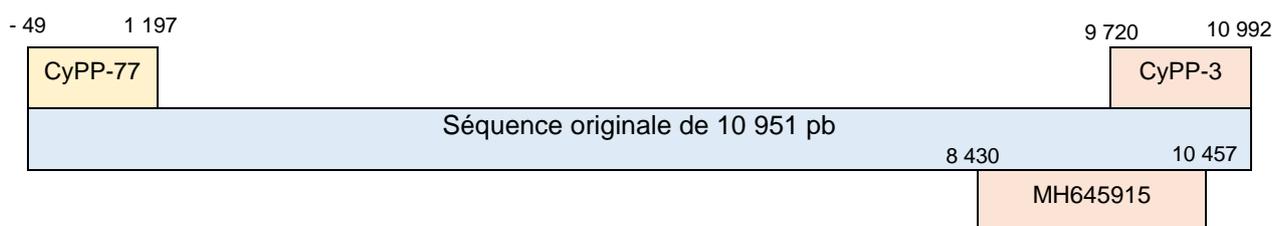


Figure 28 : Représentation schématique de l'alignement de la séquence de 11 kb originale avec les séquences de références.

Les positions des séquences de références sont données par rapport à la séquence originale.

Huit ORF de plus de 200 pb ont été détectées (Tableau 16 et Figure 29 page 109). Les protéines codées par ces ORF partagent toutes au moins 25 % d'identité avec des protéines du SGPV et les gènes supposés sont organisés de manière identique.

Six gènes supposés s'inscrivent dans des familles de gènes conservés (génomme de référence : Vaccinia virus – souche Copenhague), à savoir les familles *P4b precursor* (Cop-A3L), *RNA polymerase subunit 19* (Cop-A5R), *viral membrane assembly protein* (Cop-A6L), *viral early transcription factor large* (Cop-A7L), *viral intermediate transcription factor-3 small* (Cop-A8R) et *P4a precursor* (Cop-A10L). Les deux ORF qui ne correspondent pas à des familles de gènes conservés codent tout de même pour des protéines apparentées aux protéines du Salmon gillpox virus SGPV-102 et SGPV-107.

Tableau 16 : Liste des cadres ouverts de lecture de plus de 200 pb détectés dans la zone inter-génique P4b – P4a du CEV et des familles de gènes conservés associées

N° d'ORF	Sens	Début	Fin	Longueur en nucléotides	Longueur en acides aminés (SGPV)	Famille de gènes conservés associée	Conservation de la famille de gènes parmi les NCLDV
1	-	1 722	< 1	> 1 722	> 573 (742)	P4b precursor (Cop-A3L)	Tous les <i>Poxviridae</i> , <i>Mimiviridae</i>
2	-	2 505	1 756	750	249 (238)	∅ (30 % d'identité avec la protéine SGPV-102)	
3	+	2 540	3 073	534	177 (181)	RPO-19 (COP-A5R)	Tous les <i>Poxviridae</i>
4	-	4 383	3 244	1 140	379 (412)	VMAP (COP-A6L)	Tous les <i>Chordopoxvirinae</i>
5	-	6 644	4 419	2 226	741 (738)	VETF-L (early transcription factor large) (Cop-A7L)	Tous les <i>Poxviridae</i> , <i>Mimiviridae</i>
6	+	6 604	8 148	1 545	514 (436)	VITF-3 34kda subunit (Cop-A8R)	Tous les <i>Chordopoxvirinae</i>
7	-	8 421	8 128	294	97 (86)	∅ (27 % d'identité avec la protéine SGPV-107)	
8	-	10 458	8 431	2 028	675 (1173)	P4a precursor (Cop-A10L)	Tous les <i>Poxviridae</i>

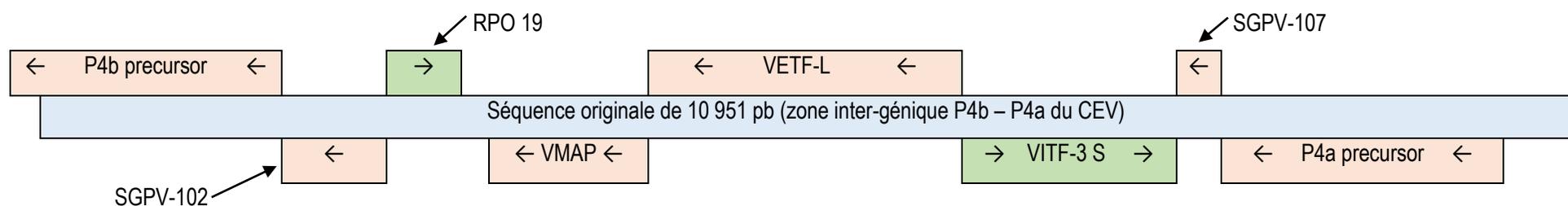


Figure 29 : Représentation schématique des gènes supposés présents sur la séquence originale de 11 kb (zone inter-génique P4b – P4a du CEV). Les gènes supposés sont nommés à l'aide du nom de la famille de gènes conservés ou à l'aide du gène supposé du Salmon gillpox virus (SGPV) orthologue quand aucune famille de gènes conservés n'est détectée.

L'organisation de cette zone est conservée chez les *Chordopoxvirinae* qui partagent tous le même agencement des gènes, excepté le SGPV et le CEV. Pour ces-derniers, les gènes appartenant aux familles *core protein* (Cop-A4L) et *late virion membrane protein* (Cop-A9L) sont absents. En leurs lieux et places sont présents respectivement un gène (SGPV-102 et son homologue chez le CEV) appartenant à la famille homologue des co-chaperonnes DNAj – hsp-40 (SGPV : 16 % de couverture, 88 % de confiance ; CEV : 67 % de couverture, 96 % de confiance) et un gène (SGPV-107 et son homologue chez le CEV) codant pour des protéines de petite taille possédant un (CEV) ou deux (SGPV) domaines transmembranaires pour lesquelles aucun homologue n'a pu être trouvé.

Des gènes orthologues à Cop-A3L, Cop-A5R, Cop-A7L, Cop-A9L et Cop-A10L sont également présents chez les *Entomopoxvirinae* (Upton et al. 2003). Cependant, l'ordre de ces gènes, observé grâce à l'outil VOC's, sur les génomes des *Entomopoxvirinae* est très différent de celui observé chez les *Chordopoxvirinae*.

3.4. Analyses phylogénétiques

L'analyse phylogénétique réalisée à partir de la concaténation des protéines P4a, VETF-L et RPO19 (Figure 30) place le CEV parmi les *Chordopoxvirinae*, sur la même branche que le SGPV.

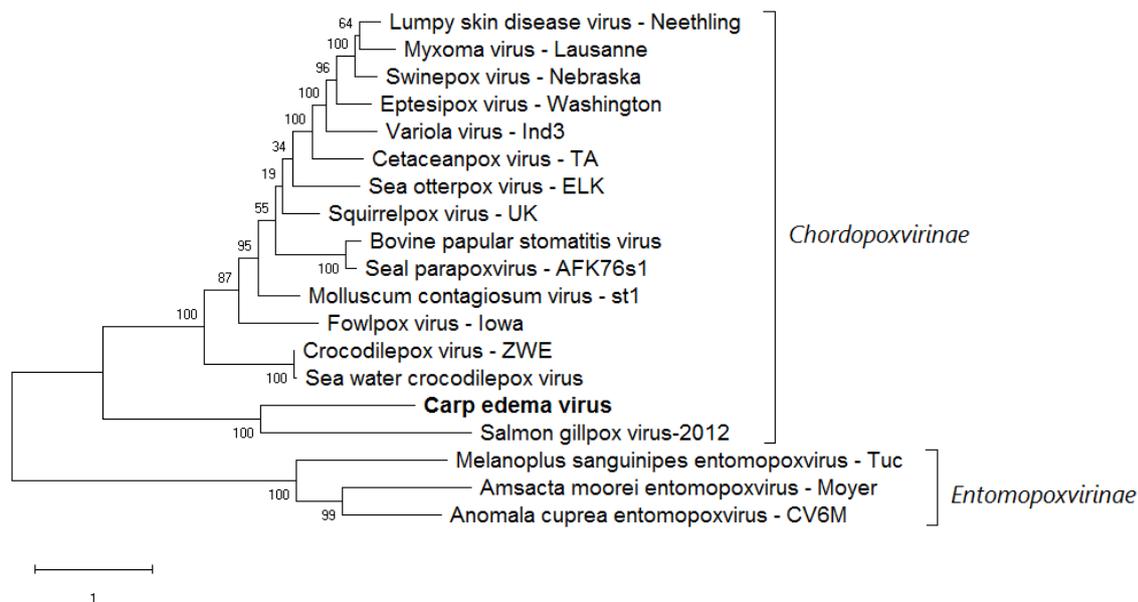


Figure 30 : Arbre phylogénétique des séquences concaténées de protéines conservées chez tous les Poxviridae (P4a, VETF-L et RPO19) Analyse réalisée en utilisant la méthode de vraisemblance maximale, le modèle (Le, Gascuel 2008) et une distribution gamma discrète (5 catégories (+G, parameter = 1.1320)). L'arbre est à l'échelle, la longueur des branches représente le nombre de substitutions par position. Les valeurs de bootstrap (sur les branches, en pourcentage) ont été calculées à partir de 100 répliques.

4. Conclusion et discussion

Le séquençage de la zone inter-génique P4b – P4a permet de confirmer l'appartenance du CEV aux *Poxviridae* et la précise. Il permet également d'envisager la mise en place de nouvelles méthodes PCR pour amplifier l'ADN du CEV, que ce soit dans un objectif de dépistage ou pour réaliser des analyses phylogénétiques, mais aussi pour amplifier l'ADN de possibles autres *Poxviridae* de poissons en ciblant des régions très conservées entre le CEV et le SGPV.

4.1. Éléments permettant de placer le CEV parmi les *Chordopoxvirinae*

Dès les premières observations en microscopie électronique, le CEV a été considéré comme un membre de la famille des *Poxviridae*, bien qu'il n'ait pas été officiellement classifié (Ono et al. 1986 ; Hedrick et al. 1997). En effet, le CEV présente de nombreux points communs avec certains *Entomopoxvirinae* tels qu'Amsacta moorei entomovirus : forme ovoïde, présence d'un nucléoïde, d'un unique corps latéral et de structures globulaires à la surface des particules matures qui leur donne un aspect de mûre (Granados, Roberts 1970) et remplit les conditions morphologiques d'appartenance à la famille des *Poxviridae* établies par l'ICTV en 1974 (Fenner et al. 1974). La première étude portant sur le génome du CEV a apporté de nouveaux éléments concordants : le génome du CEV est en effet constitué d'ADN double brin et de grande taille (env. 450 kb) (Oyamatsu 1996).

Le séquençage de la zone inter-génétique P4b – P4a réalisé dans notre étude conforte la classification du CEV parmi les *Poxviridae* et la précise. En effet, sur les 8 cadres de lecture ouverts de plus de 200 pb détectés, 3 correspondent à des familles de gènes conservées chez tous les *Poxviridae* et 3 à des familles de gènes conservées chez tous les *Chordopoxvirinae*. Les deux derniers sont apparentés à des gènes présents uniquement chez le Salmon gillpox virus. L'agencement de ces 8 gènes est identique chez le CEV et chez le SGPV. De plus, l'agencement des 6 gènes conservés chez les *Chordopoxvirinae* est identique chez le CEV, le SGPV et les autres membres de cette sous-famille. Ces éléments positionneraient le CEV parmi les *Chordopoxvirinae*. D'autre part, la présence de deux gènes homologues chez le SGPV et le CEV, mais pas chez les autres *Chordopoxvirinae* indiquerait la présence d'un ancêtre commun au CEV et au SGPV.

L'analyse phylogénétique menée sur les gènes P4a, VETF-L et RPO19 (familles de gènes conservés chez tous les *Poxviridae*) confirme le positionnement du CEV à la base des *Chordopoxvirinae*, sur la même branche que le SGPV. Ces deux virus semblent cependant distants et il est peu probable qu'ils appartiennent au même genre.

La position du CEV sur la même branche que le SGPV à la base des *Chordopoxvirinae* conforte l'hypothèse d'une coévolution entre les *Poxviridae* et leurs hôtes (Gjessing et al. 2015). En effet, la branche portant les Actinoptérygiens (poissons à nageoires rayonnées) se situe à la base de l'arbre phylogénétique des chordés (divergence estimée à 410 millions d'années avant notre ère). Au-dessus de cette branche, se trouve la branche portant les sauropsides (oiseaux-reptiles) qui ont divergé des ancêtres des mammifères plus récemment, soit environ 310 millions d'années avant notre ère (Legendre et al. 2013). De même, les branches portant les *Crocodylopoxvirus* et les *Avipoxirus* se situent juste au-dessus de la branche portant le CEV et le SGPV, mais en dessous des branches portant les *Chordopoxvirinae* qui infectent des mammifères (Figure 30, page 110). Si l'on s'intéresse plus précisément aux hôtes du CEV et du SGPV, leur dernier ancêtre commun aurait vécu environ 250 millions d'années avant notre ère (Betancur-R et al. 2017). Cet élément est concordant avec la distance phylogénétique relativement grande qui existe entre le CEV et le SGPV et l'hypothèse de coévolution entre les *Poxviridae* et leurs hôtes.

Le SGPV et le CEV se répliquent tous deux quasi exclusivement dans l'épithélium branchial de leurs hôtes et provoquent une hypertrophie et une hyperplasie des branchies (Miyazaki et al. 2005 ; Adamek, Oschilewski, et al. 2017 ; Gjessing et al. 2018). Un autre virus est responsable de lésions comparables chez un autre poisson d'eau de mer : *Plecoglossus altivelis*, aussi appelé Ayu. Ce virus possède d'autres points communs avec le CEV et le SGPV : particule virale de grande taille, virus à ADN, présence d'un nucléoïde et d'un unique corps latéral (Wada et al. 2008). De plus, les deux séquences ADN publiées à ce jour (n° d'accèsion Genbank® LC541736.1 et AB747357.1) codent partiellement pour des protéines comparables aux protéines Cop-A16 et Cop-L1R de nombreux *Chordopoxvirinae* (utilisation de l'outil Blastx (ANON. 2016), résultats non présentés). Ainsi, il est probable que ce virus appelé *Plecoglossus altivelis* pox-like virus (PaPV) ou Ayu pox-like virus se place sur la même branche que le CEV et le SGPV, à la base des *Chordopoxvirinae*.

La présence d'un unique corps latéral n'est pas courante chez les *Chordopoxvirinae*, qui en présentent généralement deux, et il semblerait que cette particularité soit rencontrée uniquement chez les trois *Chordopoxvirinae* qui infectent des poissons. Les *Entomopoxvirinae* présentent quant à eux un à deux corps latéraux. D'autre part, les particules virales matures du CEV, tout comme celles du PaPV, présentent des formations globulaires à leur surface, alors que les particules virales matures du SGPV, tout comme celles des autres *Chordopoxvirinae* en sont dépourvues. Seuls quelques *Entomopoxvirinae* présentent une structure externe irrégulière pouvant se rapprocher de ces formations. Le fait de retrouver ces formations chez certains *Entomopoxvirinae* et chez certains *Chordopoxvirinae* de poissons, mais pas tous, interroge sur l'origine de ces formations et sur leurs éventuelles fonctions (Miyazaki et al. 2005 ; Nylund et al. 2008 ; Wada et al. 2008 ; Bergoin, Dales 1971 ; Arif 1984 ; Williams et al. 2017).

4.2. Vers la mise en place de nouvelles méthodes PCR

Le séquençage de la zone inter-génique P4b – P4a permet d'envisager la mise en place de nouvelles méthodes PCR, que ce soit pour réaliser des analyses phylogénétiques sur les différentes souches du CEV ou pour dépister le CEV, mais aussi potentiellement d'autres *Chordopoxvirinae* de poissons.

En ce qui concerne le dépistage du CEV, il est aujourd'hui réalisé par amplification d'une partie du gène P4a ou sa région non traduite 5'UTR. Un manque de sensibilité pour les méthodes ciblant la région 5'UTR, notamment pour les souches du génogroupe I est connu (Adamek, Matras, et al. 2017). Le gène P4a est conservé chez tous les *Poxviridae* et sa région codante apparaît donc comme une cible peu variable et fiable pour dépister le CEV. On ne peut cependant pas exclure que certains variants du CEV, très éloignés des souches connues possédant donc plus de polymorphismes au niveau de ce gène, ne puissent pas être détectés par les PCR habituelles.

Cibler un gène plus conservé permettrait alors de cibler des variants plus distants, voire des espèces différentes. Ainsi, le gène VETF-L (Cop-A7L) apparaît bon candidat. En effet, celui-ci est conservé chez tous les *Poxviridae* mais aussi chez les *Mimiviridae*. De plus, les alignements réalisés à partir de ce gène du CEV et du SGPV présentent 49 % de sites conservés en protéines et 57 % en nucléotides (analyses réalisées à

l'aide de MegaX, (Kumar et al. 2018), résultats non présentés), ce qui confirme que ce gène est peu variable. Ainsi, la mise en place de nouvelles PCR avec des amorces classiques (non dégénérées) pour cibler le CEV ou de type CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (Rose et al. 1998)) pour cibler d'autres *Chordopoxvirinae* de poissons pourrait permettre un meilleur dépistage des *Chordopoxvirinae* infectant des poissons.

Cette nouvelle séquence pourrait également permettre de réaliser des analyses phylogénétiques des différents échantillons de CEV récoltés en utilisant une nouvelle cible. Jusqu'à présent, les analyses phylogénétiques sont réalisées sur de courtes séquences (< 500 pb) de la région codante de P4a ou de manière plus anecdotique, de sa région 5'UTR (Adamek, Matras, et al. 2017 ; Soliman et al. 2019 ; Padhi et al. 2019). L'utilisation de séquences aussi courtes rend l'interprétation des analyses phylogénétiques délicates car celles-ci se fondent sur peu de polymorphismes.

L'analyse des futurs échantillons de CEV pourrait porter sur une cible plus grande mais incluant la région de P4a utilisée jusqu'à présent (entre les positions 9 774 à 10 301 de la séquence publiée ici). Ceci permettrait d'améliorer la qualité des analyses phylogénétiques futures sans pour autant perdre la possibilité de comparer les nouvelles séquences avec celle publiées précédemment. Les amorces CEV-for-B, CEV-rev-J, CEV-for-B-int et CEV-rev-J-int utilisées jusqu'à présent pour séquencer cette région de P4a ne sont pas optimales pour le séquençage SANGER et il conviendrait d'en dessiner de nouvelles dans cet objectif. Ceci pourrait permettre d'augmenter la longueur de chaque séquençage réalisé et donc d'obtenir des séquences plus longues avec le même nombre de séquençages.

D'autre part, de nouvelles analyses phylogénétiques pourraient être réalisées sur les échantillons déjà analysés à partir d'une ou de plusieurs cibles différentes, et ce afin de confirmer le découpage actuel des génogroupes. La région inter-génique P4b – P4a n'ayant été séquencée que chez un seul échantillon du CEV, les sites conservés et les sites variables ne sont pas encore connus. On peut cependant raisonnablement penser que les régions codantes, notamment des gènes les plus conservés parmi les *Poxviridae*, sont les régions les moins variables et donc les meilleures candidates pour dessiner des amorces susceptibles de s'hybrider avec tous les variants du CEV.

Conclusion

Le CEV est responsable de mortalités massives chez les carpes de l'espèce *Cyprinus carpio*, et notamment chez les carpes Koï (Rehman et al. 2020). Une telle mortalité a pu être observée à la Pisciculture d'Estalens en 2017 où deux lots récemment importés du Japon ont présenté des taux de mortalité de 44 et 100 %. L'implication du CEV lors de tels événements est rapidement suspectée, d'autant plus que les signes cliniques sont très évocateurs étant donné que les individus ont l'air de dormir, soit en surface soit au fond des aquariums. Notre étude montre néanmoins que des lots asymptomatiques, présentant peu ou pas de mortalité, peuvent également être infectés par le CEV, et notamment que certains individus asymptomatiques peuvent excréter plus de particules virales que des individus symptomatiques. D'autre part, lors de l'importation de carpes Koï en provenance du Japon de 2019, l'ADN du CEV a été détecté dans 16 poches de transport sur 21, et ce alors qu'aucun individu importé n'a présenté de signe clinique de KSD à son arrivée, et qu'aucune mortalité n'a été observée durant le transport. De plus, le CEV détecté dans certains lots post-importation était identique à celui détecté dans la poche d'importation correspondante, ce qui démontre que les importations de carpes Koï sont une voie de propagation efficace du CEV, et ce même si les carpes Koï sont en apparente bonne santé.

Il apparaît donc primordial, si l'on souhaite limiter la propagation du CEV, de mettre en place des mesures d'épidémiologie-surveillance et de biosécurité.

Parmi celles-ci on notera l'intérêt du traitement des eaux de sortie des structures importatrices et d'une quarantaine pour tous les individus récemment importés ou ayant présenté des signes cliniques de KSD. Nos résultats montrent que cette quarantaine devrait durer au moins 2 semaines pour les lots asymptomatiques et 1 mois pour les lots symptomatiques. Il faut cependant noter que cette étude a été réalisée dans une seule structure et à la suite d'une seule importation. Il est probable que la durée d'excrétion dans d'autres conditions soit différente et potentiellement plus longue.

Concernant l'épidémiologie-surveillance, les techniques nécessitant l'euthanasie des individus sont rarement acceptées par les propriétaires, que ce soit pour des raisons économiques ou bien affectives. De plus, les prélèvements létaux ne peuvent être réalisés que sur un petit nombre d'individus, ce qui augmente le biais d'échantillonnage. C'est pourquoi des méthodes non létales apparaissent indispensables. Nous avons montré que le CEV peut efficacement être détecté dans des écouvillons de branchie. Cette procédure nécessite tout de même que les carpes soient d'une taille suffisante (au moins 5 cm) et légèrement anesthésiées pour être réalisée dans de bonnes conditions, tant pour le bien être du poisson que pour la qualité du prélèvement. Les écouvillons de branchies présentent également l'avantage de pouvoir être répétés dans le temps, ce qui permet de suivre l'évolution d'un individu ou d'un lot.

Dans un contexte d'importation, la recherche de l'ADN du CEV dans les poches de transport peut également s'avérer très utile. Nous avons en effet pu détecter l'ADN du CEV dans de l'eau de transport (ou dans son culot après centrifugation) et dans des écouvillons de l'intérieur des poches de transport. Bien que la sensibilité de cette méthode semble limitée, elle présente deux avantages majeurs : elle ne nécessite pas de manipuler les poissons et évite le biais d'échantillonnage. Cela en fait donc une technique prometteuse pour la surveillance de CEV, notamment lors d'importations. Il serait tentant de rechercher le CEV dans l'eau des aquariums pour éviter de manipuler les carpes. Les essais que nous avons faits (données non présentées) n'ont permis de détecter que des traces de l'ADN du CEV, et ce dans un seul aquarium contenant des carpes cliniquement atteintes de KSD. Analyser l'eau des aquariums n'est donc pas une solution envisageable pour rechercher l'ADN du CEV dans des lots asymptomatiques. Il est probable que la quantité de particules virales du CEV présente dans l'eau qui entoure les carpes soit proportionnelle à la densité des individus et inversement proportionnelle au renouvellement de l'eau. Ceci expliquerait pourquoi le CEV était détectable dans les poches de transport de carpes asymptomatiques en relative abondance alors que seules des traces ont été détectées dans un aquarium de carpes symptomatiques. En effet, la densité de carpes Koï dans une de ces poches de transport est environ 30 fois supérieure à la densité en aquarium de maintenance et la durée estimée du trajet entre les fermes d'origine au Japon (moment de l'emballage) et les aquariums de la Pisciculture d'Estalens est d'environ 72 heures.

Plusieurs épizooties de KSD ont eu lieu à la Pisciculture d'Estalens, en dehors de tout contexte d'importation. Dans chaque cas, la grande majorité des lots de carpes Koï présents ont montré des signes cliniques de KSD, ce qui montre une capacité de contamination importante de la part du CEV. La propagation a vraisemblablement eu lieu de proche en proche, probablement par la projection de gouttelettes d'eau entre aquariums. L'origine de chaque épizootie reste cependant inexpliquée. Il est néanmoins certain que des lots ayant déjà été CEV-positifs ont présenté des signes cliniques de KSD plusieurs mois plus tard. Ceci pose la question de la mise en place d'une immunité adaptative contre le CEV et de son efficacité, ainsi que la question de l'origine de ces épizooties. Existerait-il une réplication à bas bruit du CEV chez certains individus ? En ce qui concerne le Salmon gillpox virus, l'étude du transcriptome suite à une infection naturelle n'a donné aucun signe de mise en place d'une immunité adaptative (Gjessing et al. 2020). La question d'une réplication à bas bruit, échappant à la réponse immunitaire, dans des tissus autres que l'épithélium branchial est également posée chez le SGPV (Gjessing et al. 2018).

Les traitements aujourd'hui mis en place pour lutter contre la KSD sont symptomatiques (on peut notamment citer l'utilisation du sel à 0,5 – 0,6 % (Murakami et al. 1978 ; Seno et al. 2003)). Le développement d'un médicament antiviral spécifique ou d'un vaccin pourraient constituer un nouvel axe de lutte contre le CEV. De telles applications, tout comme le développement d'un test sérologique permettant de vérifier la présence d'anticorps anti-CEV, sont néanmoins inenvisageables sans méthode d'isolement sur lignée cellulaire ou sans la séquence complète du génome du CEV. L'isolement du Salmon gillpox virus, *Chordopoxvirinae* situé sur la même branche que le CEV, est également impossible sur de nombreuses lignées cellulaires, excepté pour un variant canadien (LeBlanc et al. 2019). On peut espérer que cette découverte récente permettra de savoir si des anticorps anti-SGPV sont produits lors d'une infection par le SGPV mais aussi de mieux comprendre la réplication du SGPV (notamment pourquoi seul ce variant a pu être isolé). Ces résultats pourraient potentiellement être transposés au CEV.

Le séquençage de la zone inter-génique P4b – P4a a permis de placer le CEV parmi les *Chordopoxvirinae*, sur la même branche que le SGPV. De nombreux arguments sont en faveur d'une coévolution entre les *Poxviridae* et leurs hôtes (Gjessing et al. 2015). Cela signifierait donc que le CEV existe depuis aussi longtemps

que l'espèce *Cyprinus carpio* et conforte l'hypothèse selon laquelle les génogroupes I et II seraient apparus suite à la séparation des sous-espèces *Cyprinus carpio carpio* (à l'est, génogroupe I) et *Cyprinus carpio haematopterus* (à l'ouest, génogroupe II). Si l'origine du CEV est aussi ancienne, il est surprenant de constater que les cas de mortalité massive de carpes Koï atteintes d'une anasarque ou de signes cliniques de maladie du sommeil n'aient été rapportés qu'à partir des années 1970 au Japon, qui plus est dans plusieurs provinces de manière concomitante (Hosoya, Suzuki 1976 ; Murakami et al. 1978). Si l'on compare avec le SGPV, celui-ci provoque de nombreuses formes asymptomatiques chez le saumon, et la forme clinique touche essentiellement des individus stressés (Thoen et al. 2020). Chez les carpes communes *Cyprinus carpio carpio* et les carpes communes *Cyprinus carpio haematopterus* du fleuve Amour, le CEV semble provoquer peu de signes cliniques et les cas de mortalité massive sont souvent associés à des co-infections, notamment avec [CyHV-3] (Adamek, Oschilewski, et al. 2017 ; Toffan et al. 2019 ; Ouyang et al. 2018).

Ainsi, on peut se demander si le CEV était présent au Japon dès les premiers élevages de carpes Koï, soit depuis le début du 19^{ème} siècle (Balon 1995) et qu'un élément extérieur, tel que l'arrivée d'un nouveau pathogène, un changement climatique ou une modification des pratiques d'élevage, a rompu l'équilibre établi, ou si le CEV n'était pas originellement présent dans les élevages de carpes Koï et aurait été introduit dans les années 1970.

Les analyses phylogénétiques que nous avons menées laissent penser qu'un lien existe entre l'emplacement de l'élevage et la séquence nucléotidique du CEV présent. La séquence utilisée était cependant trop courte pour présenter suffisamment de polymorphismes pour étudier ce phénomène avec exactitude. Une analyse approfondie de séquences nucléotidiques plus longues des différents échantillons de CEV présents dans les élevages de carpes Koï au Japon, mais aussi chez les carpes communes asiatiques, pourrait peut-être permettre de connaître l'origine des épizooties de KSD ayant eu lieu au Japon à partir des années 1970.

Bibliographie

ABD ELLATIF, Ashraf et AKAR, Adel, 2013. Spawning induction in silver carp using CPE , receptal and cystorelin with or without dopamine antagonists. In : المؤتمر السادس لبحوث المصايد والاستزراع السمكي [en ligne]. 1. الغردقه. septembre 2013. Disponible à l'adresse : https://www.researchgate.net/publication/283722978_spawning_induction_in_silver_carp_using_CPE_receptal_and_cystorelin_with_or_without_dopamine_antagonists.

ADAMEK, Mikolaj, BASKA, Ferenc, VINCZE, Boglárka et STEINHAGEN, Dieter, 2018. Carp edema virus from three genogroups is present in common carp in Hungary. In : *Journal of Fish Diseases*. mars 2018. Vol. 41, n° 3, pp. 463 - 468. DOI 10.1111/jfd.12744.

ADAMEK, Mikolaj, JUNG-SCHROERS, Verena, HELLMANN, J, TEITGE, Felix, BERGMANN, Sven M, RUNGE, Martin, KLEINGELD, Dirk Willem, WAY, Keith, STONE, David Michael et STEINHAGEN, Dieter, 2016. Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD). In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 26 mai 2016. Vol. 119, n° 3, pp. 245-251. DOI 10.3354/dao02994.

ADAMEK, Mikolaj, MATRAS, Marek, JUNG-SCHROERS, Verena, TEITGE, Felix, HELING, Max, BERGMANN, Sven M, REICHERT, Michal, WAY, Keith, STONE, David Michael et STEINHAGEN, Dieter, 2017. Comparison of PCR methods for the detection of genetic variants of carp edema virus. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 20 septembre 2017. Vol. 126, n° 1, pp. 75-81. DOI 10.3354/dao03152.

ADAMEK, Mikolaj, OSCHILEWSKI, Anna, WOHLSEIN, Peter, JUNG-SCHROERS, Verena, TEITGE, Felix, DAWSON, Andy, GELA, David, PIACKOVA, Veronika, KOCOUR, Martin, ADAMEK, Jerzy, BERGMANN, Sven M. et STEINHAGEN, Dieter, 2017. Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture. In : *Veterinary Research* [en ligne]. décembre 2017. Vol. 48, n° 1. DOI 10.1186/s13567-017-0416-7. Disponible à l'adresse : <http://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-017-0416-7>.

ADAMEK, Mikolaj, TEITGE, Felix, JUNG-SCHROERS, Verena, HELING, Max, GELA, David, PIACKOVA, Veronika, KOCOUR, Martin et STEINHAGEN, Dieter, 2018. Flavobacteria as secondary pathogens in carp suffering from koi sleepy disease. In : *Journal of Fish Diseases*. novembre 2018. Vol. 41, n° 11, pp. 1631 - 1642. DOI 10.1111/jfd.12872.

ADAMEK, Mikolaj, TEITGE, Felix et STEINHAGEN, Dieter, 2019. Quantitative diagnostics of gill diseases in common carp: not as simple as it seems. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 23 mai 2019. Vol. 134, n° 3, pp. 197 - 207. DOI 10.3354/dao03374.

AHNE, W, BJORKLUND, Hv, ESSBAUER, S, FIJAN, N, KURATH, G et WINTON, Jr, 2002. Spring viremia of carp (SVC). In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 2002. Vol. 52, pp. 261-272. DOI 10.3354/dao052261.

ALTSCHUL, S., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In : *Nucleic Acids Research*. 1 septembre 1997. Vol. 25, n° 17, pp. 3389-3402. DOI 10.1093/nar/25.17.3389.

AMITA, Kenjiro, OE, Mitsuhiro, MATOYAMA, Hisato, YAMAGUCHI, Noriko et FUKUDA, Hideo, 2002. A survey of Koi Herpesvirus and Carp Edema Virus in Colorcarp Cultured in Niigata Prefecture, Japan. In : *Fish Pathology*. 2002. Vol. 37, n° 4, pp. 197-198. DOI 10.3147/jsfp.37.197.

ANON., 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. In : *Nucleic Acids Research*. 4 janvier 2016. Vol. 44, n° D1, pp. D7-D19. DOI 10.1093/nar/gkv1290.

ANON., 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020* [en ligne]. S.I. : FAO. [Consulté le 5 juillet 2020]. ISBN 978-92-5-132692-3. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>.

ARIF, Basil M., 1984. The Entomopoxviruses. In : LAUFFER, Max A. et MARAMOROSCH, Karl (éd.), *Advances in Virus Research* [en ligne]. S.I. : Academic Press. pp. 195-213. ISBN 0065-3527. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352708604091>.

BALON, Eugene K., 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. In : *Aquaculture*. janvier 1995. Vol. 129, n° 1-4, pp. 3-48. DOI 10.1016/0044-8486(94)00227-F.

BERGMANN, Sven M., RIECHARDT, Meike, FICHTNER, Dieter, LEE, Peiyu et KEMPTER, Jolanta, 2010. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. In : *Journal of Virological Methods*. février 2010. Vol. 163, n° 2, pp. 229-233. DOI 10.1016/j.jviromet.2009.09.025.

BERGOIN, Max et DALES, Samuel, 1971. Comparative Observations on Poxviruses of Invertebrates and Vertebrates. In : *Comparative Virology* [en ligne]. S.I. : Elsevier. pp. 169 - 205. ISBN 978-0-12-470260-8. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124702608500117>.

BETANCUR-R, Ricardo, WILEY, Edward O., ARRATIA, Gloria, ACERO, Arturo, BAILLY, Nicolas, MIYA, Masaki, LECOINTRE, Guillaume et ORTÍ, Guillermo, 2017. Phylogenetic classification of bony fishes. In : *BMC Evolutionary Biology*. décembre 2017. Vol. 17, n° 1, pp. 162. DOI 10.1186/s12862-017-0958-3.

BIGARRÉ, Laurent, BAUD, Marine, PALLANDRE, Laurane, MEUNIER, Emmanuel et LEGUAY, Emmanuel, 2016. Maladie du sommeil de la carpe : état des lieux des connaissances et situation épidémiologique en France. In : *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*. décembre 2016. n° 76.

CAMPBELL, Neil A. et REECE, Jane B., 2002. *Biology*. 6th ed. San Francisco : Benjamin Cummings. ISBN 978-0-8053-6624-2. QH308.2 .C34 2002

CARPENTER, James W. et MARION, Christopher J. (éd.), 2013. *Exotic animal formulary*. 4th ed. St. Louis, Mo : Elsevier. ISBN 978-1-4377-2264-2. SF917 .C27 2013

CHEN, Song-Lin, SHA, Zhen-Xia et YE, Han-Qing, 2003. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos. In : *Aquaculture*. mars 2003. Vol. 218, n° 1 - 4, pp. 141 - 151. DOI 10.1016/S0044-8486(02)00570-7.

CHISTIAKOV, Dimitry et VORONOVA, Natalia, 2009. Genetic evolution and diversity of common carp *Cyprinus carpio* L. In : *Open Life Sciences*. 1 septembre 2009. Vol. 4, n° 3, pp. 304-312. DOI 10.2478/s11535-009-0024-2.

DEY, VK, 2016. THE GLOBAL TRADE IN ORNAMENTAL FISH. In : *INFOFISH INTERNATIONAL*. 2016. n° 4/2016, pp. 52-55.

DRIEVER, Wolfgang et RANGINI, Zehava, 1993. Characterization of a cell line derived from zebrafish (*brachydanio rerio*) embryos. In : *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. septembre 1993. Vol. 29, n° 9, pp. 749 - 754. DOI 10.1007/BF02631432.

EL-GAMAL, A.H.E. et EL-GREISY, Z.A., 2008. Effect of removal of egg adhesiveness on hatchability and effect of different levels of salinity on survival and larval development in common carp, *Cyprinus carpio*. In : *Journal of Applied Sciences Research*. 1 janvier 2008. Vol. 4, pp. 1935-1945.

EVANS, David H., PIERMARINI, Peter M. et CHOE, Keith P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. In : *Physiological Reviews*. janvier 2005. Vol. 85, n° 1, pp. 97-177. DOI 10.1152/physrev.00050.2003.

FAN, Zhenhua, LIU, Linyan, HUANG, Xiaohuan, ZHAO, Yang, ZHOU, Linyan, WANG, Deshou et WEI, Jing, 2017. Establishment and growth responses of Nile tilapia embryonic stem-like cell lines under feeder-free condition. In : *Development, Growth & Differentiation*. février 2017. Vol. 59, n° 2, pp. 83-93. DOI 10.1111/dgd.12341.

FENNER, Frank, PEREIRA, Helio G., PORTERFIELD, James S., JOKLIK, Wolfgang K. et DOWNIE, Allan W., 1974. Family and Generic Names for Viruses Approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses, June 1974. In : *Intervirology*. 1974. Vol. 3, n° 3, pp. 193-198. DOI 10.1159/000149755.

GJESSING, M C, CHRISTENSEN, D H, MANJI, F, MOHAMMAD, S, PETERSEN, P E, SAURE, B, SKJENGEN, C, WELI, S C et DALE, O B, 2018. Salmon gill poxvirus disease in Atlantic salmon fry as recognized by improved immunohistochemistry also demonstrates infected cells in non-respiratory epithelial cells. In : *Journal of Fish Diseases*. juillet 2018. Vol. 41, n° 7, pp. 1103-1110. DOI 10.1111/jfd.12802.

GJESSING, Mona C., KRASNOV, Aleksei, TIMMERHAUS, Gerrit, BRUN, Svante, AFANASYEV, Sergey, DALE, Ole Bendik et DAHLE, Maria K., 2020. The Atlantic Salmon Gill Transcriptome Response in a Natural Outbreak of Salmon Gill Pox Virus Infection Reveals New Biomarkers of Gill Pathology and Suppression of Mucosal Defense. In : *Frontiers in Immunology*. 4 septembre 2020. Vol. 11, pp. 2154. DOI 10.3389/fimmu.2020.02154.

GJESSING, Mona C., YUTIN, Natalya, TENGS, Torstein, SENKEVICH, Tania, KOONIN, Eugene, RØNNING, Hans Petter, ALARCON, Marta, YLVING, Sonja, LIE, Kai-Inge, SAURE, Britt, TRAN, Linh, MOSS, Bernard et DALE, Ole Bendik, 2015. Salmon Gill Poxvirus, the Deepest Representative of the Chordopoxvirinae. In : MCFADDEN, G. (éd.), *Journal of Virology*. 15 septembre 2015. Vol. 89, n° 18, pp. 9348-9367. DOI 10.1128/JVI.01174-15.

GRANADOS, Robert R. et ROBERTS, Donald W., 1970. Electron microscopy of a poxlike virus infecting an invertebrate host. In : *Virology*. février 1970. Vol. 40, n° 2, pp. 230-243. DOI 10.1016/0042-6822(70)90398-3.

GREENWELL, Martin G, SHERRILL, Johanna et CLAYTON, Leigh A, 2003. Osmoregulation in fish. In : *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. janvier 2003. Vol. 6, n° 1, pp. 169-189. DOI 10.1016/S1094-9194(02)00021-X.

HAENEN, Olga, WAY, Keith, GORGOGNONE, Bartolomeo, ITO, Takafumi, PALEY, Richard, BIGARRÉ, Laurent et WALTZEK, Thomas, 2016. Novel viral infections threatening Cyprinid fish. In : *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 15 février 2016. Vol. 36, pp. 11-23.

HAENEN, Olga, WAY, Keith, STONE, David et ENGELSMA, Marc, 2014. « Koi Sleepy Disease » voor het eerst in Nederland aangetoond in koikarpers. In : *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. avril 2014. Vol. 139, n° 4, pp. 26-29.

HAENEN, O.L.M., WAY, K., STONE, D. et ENGELSMA, M. Y., 2013. Koi Sleepy Disease (KSD) door 'Carp Edema virus' : eerste detectie in Nederlandse Koi. In : *Aquacultuur*. 2013. n° 5, pp. 27-29.

HEDRICK, R. P., ANTONIO, DB et MUNN, RJ, 1997. Poxvirus like agent associated with epizootic mortality in juvenile koi (*Cyprinus carpio*). In : *FHS Newsl.* 1997. Vol. 25, n° 3, pp. 1-3.

HESAMI, Shohreh, VIADANNA, Pedro, STECKLER, Natalie, SPEARS, Staci, THOMPSON, Patrick, KELLEY, Karen, YANONG, Roy, FRANCIS-FLOYD, Ruth, SHELLEY, Johnny, GROFF, Joseph, GOODWIN, Andy, HAENEN, Olga et WALTZEK, Thomas, 2015. Carp Edema Virus Disease (CEVD) / Koi Sleepy Disease (CEV). In : *Gainesville : University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences* [en ligne]. octobre 2015. n° FA189. Disponible à l'adresse : <https://edis.ifas.ufl.edu/fa189>.

HOLEN, E., KAUSLAND, A. et SKJÆRVEN, K., 2010. Embryonic stem cells isolated from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and the developmental expression of a stage-specific transcription factor ac-Pou2. In : *Fish Physiology and Biochemistry*. décembre 2010. Vol. 36, n° 4, pp. 1029-1039. DOI 10.1007/s10695-010-9381-z.

HOOLE, David (éd.), 2001. *Diseases of carp and other cyprinid fishes*. Oxford : Fishing News Books [u.a.]. ISBN 978-0-85238-252-3.

HOSOYA, H. et SUZUKI, M., 1976. Effect of NaCl solution bath to a disease of juvenile colorcarp accompanied by mass mortality, arising at rainy season. In : *Report of Niigata Prefectural Inland Fisheries Experimental Station*. août 1976. n° 4, pp. 69-70.

JUNG-SCHROERS, Verena, ADAMEK, Mikolaj, TEITGE, Felix, HELLMANN, John, BERGMANN, Sven Michael, SCHÜTZE, Heike, KLEINGELD, Dirk Willem, WAY, Keith, STONE, David, RUNGE, Martin, KELLER, Barbara, HESAMI, Shohreh, WALTZEK, Thomas et STEINHAGEN, Dieter, 2015. Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. In : *BMC Veterinary Research* [en ligne]. décembre 2015. Vol. 11, n° 1. DOI 10.1186/s12917-015-0424-7. Disponible à l'adresse : <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/114>.

KELLEY, Lawrence A, MEZULIS, Stefans, YATES, Christopher M, WASS, Mark N et STERNBERG, Michael J E, 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. In : *Nature Protocols*. 1 juin 2015. Vol. 10, n° 6, pp. 845-858. DOI 10.1038/nprot.2015.053.

KIM, S. W., JUN, J. W., GIRI, S. S., CHI, C., YUN, S., KIM, H. J., KIM, S. G., KANG, J. W. et PARK, S. C., 2018. First report of carp oedema virus infection of koi (*Cyprinus carpio haematopterus*) in the Republic of Korea. In : *Transboundary and Emerging Diseases*. avril 2018. Vol. 65, n° 2, pp. 315-320. DOI 10.1111/tbed.12782.

KIM, Sang Wha, GIRI, Sib Sankar, KIM, Sang Guen, KWON, Jun, OH, Woo Taek et PARK, Se Chang, 2020. Carp Edema Virus and Cyprinid Herpesvirus-3 Coinfection is Associated with Mass Mortality of Koi (*Cyprinus carpio haematopterus*) in the Republic of Korea. In : *Pathogens*. 17 mars 2020. Vol. 9, n° 3, pp. 222. DOI 10.3390/pathogens9030222.

KUMAR, Sudhir, STECHER, Glen, LI, Michael, KNYAZ, Christina et TAMURA, Koichiro, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. In : BATTISTUZZI, Fabia Ursula (éd.), *Molecular Biology and Evolution*. 1 juin 2018. Vol. 35, n° 6, pp. 1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096.

LE, S. Q. et GASCUEL, O., 2008. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. In : *Molecular Biology and Evolution*. 3 avril 2008. Vol. 25, n° 7, pp. 1307-1320. DOI 10.1093/molbev/msn067.

LEBLANC, Francis, DITLECADET, Delphine, ARSENEAU, Jean-René, STEEVES, Royce, BOSTON, Linda, BOUDREAU, Pascal et GAGNÉ, Nellie, 2019. Isolation and identification of a novel salmon gill poxvirus variant from Atlantic salmon in Eastern Canada. In : *Journal of Fish Diseases*. février 2019. Vol. 42, n° 2, pp. 315 - 318. DOI 10.1111/jfd.12922.

LEGENDRE, Lucas, LE ROY, Nathalie, MARTINEZ-MAZA, Cayetana, MONTES, Laetitia, LAURIN, Michel et CUBO, Jorge, 2013. Phylogenetic signal in bone histology of amniotes revisited: Phylogenetic signal in bone histology. In : *Zoologica Scripta*. janvier 2013. Vol. 42, n° 1, pp. 44-53. DOI 10.1111/j.1463-6409.2012.00564.x.

LEWISCH, E., GORGOGLIONE, B., WAY, K. et EL-MATBOULI, M., 2015. Carp Edema Virus/Koi Sleepy Disease: An Emerging Disease in Central-East Europe. In : *Transboundary and Emerging Diseases*. février 2015. Vol. 62, n° 1, pp. 6 - 12. DOI 10.1111/tbed.12293.

LOVY, J, FRIEND, Se, AL-HUSSINEE, L et WALTZEK, Tb, 2018. First report of carp edema virus in the mortality of wild common carp *Cyprinus carpio* in North America. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 20 novembre 2018. Vol. 131, n° 3, pp. 177-186. DOI 10.3354/dao03296.

MATRAS, M, BORZYM, E, STONE, D, WAY, K, STACHNIK, M, MAJ-PALUCH, J, PALUSIŃSKA, M et REICHERT, M, 2017. Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). In : *Journal of Fish Diseases*. mars 2017. Vol. 40, n° 3, pp. 319-325. DOI 10.1111/jfd.12518.

MATRAS, Marek, STACHNIK, Magdalena, BORZYM, Ewa, MAJ-PALUCH, Joanna et REICHERT, Michal, 2019. Potential vector species of carp edema virus (CEV). In : *Journal of Fish Diseases* [en ligne]. 23 avril 2019. DOI 10.1111/jfd.13000. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfd.13000>.

MIYAZAKI, T, ISSHIKI, T et KATSUYUKI, H, 2005. Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio koi* in Japan. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 2005. Vol. 65, pp. 197-207. DOI 10.3354/dao065197.

MONTICINI, Pierluigi, 2010. 102 : *The Ornamental Fish Trade - Production and Commerce of Ornamental Fish: technical-managerial and legislative aspects* [en ligne]. GLOBEFISH Research Programme. Rome, Italy. FAO. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/3/a-bb206e.pdf>.

MURAKAMI, Y, SHITANAKA, M, TOSHIDA, S et MATSUZATO, T, 1978. コイの穴あき病並びにコイ稚魚の大量死に関する研究 - 昭和50~52年度3ケ年のとりまとめ (*Etude de l'œdème et de la mortalité massive de carpes juvéniles - résumé des années 1975 à 1977*) [en ligne]. S.l. : 広島県淡水魚指導所. 指定調査研究総合助成事業病害研究報告書. Disponible à l'adresse : <http://id.ndl.go.jp/bib/000001717490>.

NOGA, Edward J., 2010. *Fish disease: diagnosis and treatment*. 2nd ed. Oxford : Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-8138-0697-6. SH171 .N64 2010

NYLUND, Are, WATANABE, K., NYLUND, S., KARLSEN, M., SÆTHER, P. A., ARNESEN, C. E. et KARLSBAKK, E., 2008. Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. In : *Archives of Virology*. juillet 2008. Vol. 153, n° 7, pp. 1299 - 1309. DOI 10.1007/s00705-008-0117-7.

OFFRA (ORNAMENTAL FISH FRANCE), 2020. *Impact de la maladie du sommeil de la carpe Koi sur le marché Français. Destinataire: Laetitia MONTACQ. Communication personnelle*. 25 septembre 2020. S.l. : s.n.

OLSON, Kenneth R., 1991. Vasculature of the fish gill: Anatomical correlates of physiological functions. In : *Journal of Electron Microscopy Technique*. décembre 1991. Vol. 19, n° 4, pp. 389-405. DOI 10.1002/jemt.1060190402.

OLSON, Kenneth R., 2002. Vascular anatomy of the fish gill. In : *Journal of Experimental Zoology*. 1 août 2002. Vol. 293, n° 3, pp. 214 - 231. DOI 10.1002/jez.10131.

ONO, Shin-ichi, NAGAI, Akira et SUGAI, Noriaki, 1986. A histopathological study on juvenile colorcarp, *Cyprinus carpio*, showing edema. In : *Fish Pathology*. 1986. Vol. 21, n° 3, pp. 167-175. DOI 10.3147/jfsp.21.167.

OUYANG, Ping, YANG, Ruixue, CHEN, Junjie, WANG, Kaiyu, GENG, Yi, LAI, Weiming, HUANG, Xiaoli, CHEN, Defang, FANG, Jing, CHEN, Zhengli, TANG, Li et YIN, Lizi, 2018. First detection of carp edema virus in association with cyprinid herpesvirus 3 in cultured ornamental koi, *Cyprinus carpio* L., in China. In : *Aquaculture*. mars 2018. Vol. 490, pp. 162-168. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.02.037.

OUYANG, Ping, ZHOU, Yaojia, YANG, Ruixue, YANG, Zhuangzhi, WANG, Kaiyu, GENG, Yi, LAI, Weiming, HUANG, Xiaoli, CHEN, Defang, FANG, Jing, CHEN, Zhengli, TANG, Li, HUANG, Chao et YIN, Lizi, 2019. Outbreak of carp edema virus disease in cultured ornamental koi in a lower temperature in China. In : *Aquaculture International* [en ligne]. 7 novembre 2019. DOI 10.1007/s10499-019-00476-1. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/s10499-019-00476-1>.

OYAMATSU, Takeshi, 1996. コイの浮腫症に関する研究 (*Etude sur l'oedème de la carpe*) [en ligne]. Thèse de doctorat. Tokyo : Université des sciences et technologies marines. Disponible à l'adresse : <http://id.nii.ac.jp/1342/00000816/>.

OYAMATSU, Takeshi, HATA, Naotsugu, YAMADA, Kazuo, SANO, Tokuo et FUKUDA, Hideo, 1997. An Etiological Study on Mass Mortality of Cultured Colorcarp Juveniles Showing Edema. In : *Fish Pathology*. 1997. Vol. 32, n° 2, pp. 81 - 88. DOI 10.3147/jfsp.32.81.

OYAMATSU, Takeshi, MATOYAMA, Hisao, YAMAMOTO, Ken-ya et FUKUDA, Hideo, 1997. A trial for the Detection of Carp Edema Virus by Using Polymerase Chain Reaction. In : *Aquaculture Science*. 1997. Vol. 45, n° 2, pp. 247 - 251. DOI 10.11233/aquaculturesci1953.45.247.

PADHI, Soumesh K., TOLO, Isaiah, MCEACHRAN, Margaret, PRIMUS, Alexander, MOR, Sunil K. et PHELPS, Nicholas B. D., 2019. Koi herpesvirus and carp oedema virus: Infections and coinfections during mortality events of wild common carp in the United States. In : *Journal of Fish Diseases*. novembre 2019. Vol. 42, n° 11, pp. 1609 -1621. DOI 10.1111/jfd.13082.

PERELBERG, Ayana, ILOUZE, Maya, KOTLER, Moshe et STEINITZ, Michael, 2008. Antibody response and resistance of *Cyprinus carpio* immunized with cyprinid herpes virus 3 (CyHV-3). In : *Vaccine*. juillet 2008. Vol. 26, n° 29-30, pp. 3750-3756. DOI 10.1016/j.vaccine.2008.04.057.

PETERI, A, 2004. *Cyprinus carpio* [en ligne]. Cultured Aquatic Species Information Programme. Rome, Italy. FAO. [Consulté le 18 août 2020]. FAO Fisheries Division [online]. Disponible à l'adresse : http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/en.

PRAGYAN, Divya, BAJPAI, Vertika, SUMAN, Kirty, MOHANTY, Jyotirmaya et SAHOO, Pramoda Kumar, 2019. A review of current understanding on carp edema virus (CEV): A threatful entity in disguise. In : . 2019.

REHMAN, Tayyab, YIN, Lizi, LATIF, Muhammad Bilal, ZHOU, Yaojia, WANG, Kaiyu, GENG, Yi, HUANG, Xiaoli, CHEN, Defang, FANG, Jing, CHEN, Zhengli, GUO, Hongrui, LAI, Weiming et OUYANG, Ping, 2020. Current findings on carp edema virus, control challenges, and future outlook. In : *Aquaculture International*. octobre 2020. Vol. 28, n° 5, pp. 2015-2026. DOI 10.1007/s10499-020-00573-6.

RENARD, P., FLECHON, B., BILLARD, R. et CHRISTEN, R., 1990. Biochemical and morphological changes in the chorion of the carp (*Cyprinus carpio*) oocyte, following the cortical reaction. In : *Journal of Applied Ichthyology*. juin 1990. Vol. 6, n° 2, pp. 81-90. DOI 10.1111/j.1439-0426.1990.tb00505.x.

ROSE, T. M., SCHULTZ, E. R., HENIKOFF, J. G., PIETROKOVSKI, S., MCCALLUM, C. M. et HENIKOFF, S., 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. In : *Nucleic Acids Research*. 1 avril 1998. Vol. 26, n° 7, pp. 1628 - 1635. DOI 10.1093/nar/26.7.1628.

SAHOO, Pramoda Kumar, PATTANAYAK, Sabyasachi, PAUL, Anirban, SAHOO, Manoj Kumar et KUMAR, Pasim Rajesh, 2020. Carp edema virus in ornamental fish farming in India: A potential threat to koi carps but not to co-cultured Indian major carp or goldfish. In : . 2020.

SALATI, A. P., BAGHBANZADEH, A., SOLTANI, M., PEYGHAN, R. et RIAZI, G., 2011. Effect of different levels of salinity on gill and kidney function in common carp *Cyprinus carpio* (Pisces: Cyprinidae). In : *Italian Journal of Zoology*. septembre 2011. Vol. 78, n° 3, pp. 298-303. DOI 10.1080/11250003.2011.567400.

SENO, Ryuichiro, HATA, Naotsugu, OYAMATSU, Takeshi et KUHUDA, Hideo, 2003. Curative effect of 0.5% salt water treatment on carp, *Cyprinus carpio*, infected with carp edema virus (CEV) results mainly from reviving the physiological condition of the host. In : *Aquaculture Science*. 2003. Vol. 51, n° 1, pp. 123 - 124. DOI 10.11233/aquaculturesci1953.51.123.

SILKIN, Yu A. et SILKINA, E. N., 2005. Effect of hypoxia on physiological-biochemical blood parameters in some marine fish. In : *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2005. Vol. 41, n° 5, pp. 527-532.

SOLIMAN, H et EL-MATBOULI, M, 2018. Rapid detection and differentiation of carp oedema virus and cyprinid herpes virus-3 in koi and common carp. In : *Journal of Fish Diseases*. mai 2018. Vol. 41, n° 5, pp. 761-772. DOI 10.1111/jfd.12774.

SOLIMAN, H, LEWISCH, E et EL-MATBOULI, M, 2019. Identification of new genogroups in Austrian carp edema virus isolates. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 17 octobre 2019. Vol. 136, n° 2, pp. 193-197. DOI 10.3354/dao03408.

STEVENS, Brittany N., MICHEL, Adam, LIEPNIEKS, Molly L., KENELTY, Kirsten, GARDHOUSE, Sara M., GROFF, Joseph M., WALTZEK, Thomas B. et SOTO, Esteban, 2018. OUTBREAK AND TREATMENT OF CARP EDEMA VIRUS IN KOI (*CYPRINUS CARPIO*) FROM NORTHERN CALIFORNIA. In : *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. septembre 2018. Vol. 49, n° 3, pp. 755-764. DOI 10.1638/2017-0189.1.

SUZUKI, Masato, YAMAHA, Etsuro et YAMAZAKI, Fumio, 1997. Eucleation of Visualized Nuclei from Dechorionated Fertilized Eggs in Goldfish. In : *Fisheries science*. 1997. Vol. 63, n° 3, pp. 474-475. DOI 10.2331/fishsci.63.474.

SUZUKI, Sakae et FUKUDA, Kazue, 1987. Effect of NaCl solution bath and experimental infection on mass mortality of juvenile carp. In : *Report of Saitama Prefectural fisheries experimental station*. 1987. Vol. 46, n° 4, pp. 49-55.

SWAMINATHAN, T. Raja, KUMAR, Raj, DHARMARATNAM, Arathi, BASHEER, V. S., SOOD, Neeraj, PRADHAN, P. K., SANIL, N. K., VIJAYAGOPAL, P. et JENA, J. K., 2016. Emergence of carp edema virus in cultured ornamental koi carp, *Cyprinus carpio* koi, in India. In : *Journal of General Virology*. 16 décembre 2016. Vol. 97, n° 12, pp. 3392-3399. DOI 10.1099/jgv.0.000649.

TAMURA, K, 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. In : *Molecular Biology and Evolution* [en ligne]. juillet 1992. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752. Disponible à l'adresse : <https://academic.oup.com/mbe/article/9/4/678/1254082/Estimation-of-the-number-of-nucleotide>.

THOEN, Even, TARTOR, Haitham, AMUNDSEN, Marit, DALE, Ole Bendik, SVEINSSON, Karoline, RØNNING, Hans Petter, GRØNNEBERG, Estelle, DAHLE, Maria Krudtå et GJESSING, Mona Cecilie, 2020. First record of experimentally induced salmon gill poxvirus disease (SGPVD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In : *Veterinary Research*. décembre 2020. Vol. 51, n° 1, pp. 63. DOI 10.1186/s13567-020-00787-9.

TOFFAN, Anna, MARSELLA, Andrea, ABBADI, Miriam, ABASS, Salah, AL-ADHADH, Basem, WOOD, Gareth et STONE, David Michael, 2019. First detection of koi herpesvirus and carp oedema virus in Iraq associated with a mass mortality in common carp (*Cyprinus carpio*). In : *Transboundary and Emerging Diseases* [en ligne]. 9 décembre 2019. DOI 10.1111/tbed.13428. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.13428>.

UPTON, Chris, SLACK, Stephanie, HUNTER, Arwen L., EHLERS, Angelika et ROPER, Rachel L., 2003. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. In : *Journal of Virology*. 1 juillet 2003. Vol. 77, n° 13, pp. 7590-7600. DOI 10.1128/JVI.77.13.7590-7600.2003.

WADA, Shinpei, KURATA, Osamu, HATAI, Kishio, ISHII, Hideo, KASUYA, Kohichi et WATANABE, Yuhsuke, 2008. Proliferative Branchitis Associated with Pathognomonic, Atypical Gill Epithelial Cells in Cultured Ayu *Plecoglossus altivelis*. In : *Fish Pathology*. 2008. Vol. 43, n° 2, pp. 89-91. DOI 10.3147/jsfp.43.89.

WANG, Cheng-hui et LI, Si-fa, 2004. Phylogenetic relationships of ornamental (koi) carp, Oujiang color carp and Long-fin carp revealed by mitochondrial DNA COII gene sequences and RAPD analysis. In : *Aquaculture*. mars 2004. Vol. 231, n° 1-4, pp. 83-91. DOI 10.1016/j.aquaculture.2003.10.040.

WAY, Keith, HAENEN, Olga, STONE, David Michael, ADAMEK, Mikolaj, BERGMANN, Sven M, BIGARRÉ, Laurent, DISERENS, N, EL-MATBOULI, Mansour, GJESSING, Mona Cecilie, JUNG-SCHROERS, Verena, LEGUAY, Emmanuel, MATRAS, M, OLESEN, Niels Jørgen, PANZARIN, Valentina, PIAČKOVÁ, Veronika, TOFFAN, Anna, VENDRAMIN, Niccoló, VESELÝ, T et WALTZEK, Thomas, 2017. Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 18 octobre 2017. Vol. 126, n° 2, pp. 155-166. DOI 10.3354/dao03164.

WAY, Keith et STONE, David, 2013. Emergence of carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK. In : *Finfish News*. 2013. Vol. 15, pp. 32-34.

WILLIAMS, Trevor, BERGOIN, Max et VAN OERS, Monique M., 2017. Diversity of large DNA viruses of invertebrates. In : *Journal of Invertebrate Pathology*. juillet 2017. Vol. 147, pp. 4-22. DOI 10.1016/j.jip.2016.08.001.

YARON, Zvi, 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. In : *Aquaculture*. janvier 1995. Vol. 129, n° 1 - 4, pp. 49 - 73. DOI 10.1016/0044-8486(94)00229-H.

YE, Jian, COULOURIS, George, ZARETSKAYA, Irena, CUTCUTACHE, Ioana, ROZEN, Steve et MADDEN, Thomas L, 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In : *BMC Bioinformatics*. décembre 2012. Vol. 13, n° 1, pp. 134. DOI 10.1186/1471-2105-13-134.

ZHANG, Xiaodong, NI, Yingying, YE, Jian, XU, Hui, HOU, Yuefeng, LUO, Wen et SHEN, Wenying, 2017. Carp edema virus, an emerging threat to the carp (*Cyprinus carpio*) industry in China. In : *Aquaculture*. mai 2017. Vol. 474, pp. 34 - 39. DOI 10.1016/j.aquaculture.2017.03.033.

ZRNČIĆ, Snježana, ORAIĆ, Dražen, ZUPIČIĆ, Ivana Giovanna, PAVLINEC, Željko, BRNIĆ, Dragan, ROGIĆ, Žaklin Acinger, SUČEC, Ivica, STEINHAGEN, Dieter et ADAMEK, Mikolaj, 2020. Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia. In : *Journal of Fish Diseases*. juin 2020. Vol. 43, n° 6, pp. 673-685. DOI 10.1111/jfd.13163.

Annexe A : Caractéristiques des amorces utilisées

Nom de l'amorce	Séquence	Tm (°C)*	Position de l'amorce +	Cible Type PCR	Référence
CEV-PCRq-F1	ATG GCA AGA AAC AAA CTC TCT TT	57	9 981 – 10 003	P4a (249 pb) qPCR	IHAP, non publié
CEV-PCRq-R1	ACG TTG ATA CAA TTC CAG AGC A	57	10 229 – 10 208		
CEV_TiHo_qF	CAT TTC CTA GTT TGT ATG GCA AG	59	9 966 – 9 988	P4a (200 pb) qPCR	(Adamek, Matras, et al. 2017)
CEV_TiHo_qR	TGA TGA TTG GAA TAA GAT GTC TGT C	63	10 165 – 10 141		
CEV-for-B	ATG GAG TAT CCA AAG TAC TTA G	55	9 774 – 9 795	P4a (528 pb) PCR nichée 1	(Way et al. 2017)
CEV-rev-J	CTC TTC ACT ATT GTG ACT TTG	53	10 301 – 10 281		
CEV-for-B-int	GTT ATC AAT GAA ATT TGT GTA TTG	55	9 802 – 9 825	P4a (478 pb) PCR nichée 2	
CEV-rev-J-int	TAG CAA AGT ACT ACC TCA TCC	55	10 279 – 10 259		
CEV-oya-R	TGC AGG TTG CTC CTA ATC C	53	<i>[11 022 – 11 040]</i>	P4a partie 5'UTR PCR conventionnelle avec CEV-for-B (1219 pb) ou CEV-for-B-int (1191 pb)	(Oyamatsu, Matoyama, et al. 1997), original
CEV-P4b-F	ACT TGG TCT TCA GTT TAG TGC AA	59	1 135 – 1 113	P4b (1170 pb)	Original
CEV-P4b-R	GCA ATT TCA TAT GTG CTT CCA TAA C	63	<i>[-34 – -10]</i>		
CEV-P4b2-R	AGC GAA GCT ATC GAG ACT ATG	57	961 – 981	Amplification du fragment situé entre les gènes P4a et P4b (7511 pb)	Original
CEV-P4a2-R	AGA GTG AGG AAC TAG AAG CTG	57	8 471 – 8 451		
CEV-P4a3-F	CAA CTG ACA ATG TAT CTC CAC C	59	9 360 – 9 381	P4a partie codante pour séquençage, PCR conventionnelle avec CEV- rev-J-int (899 pb)	Original

* : calculé à l'aide de la formule : $T_m = 2 * (nA + nT) + 4 * (nC + cG) - 5$

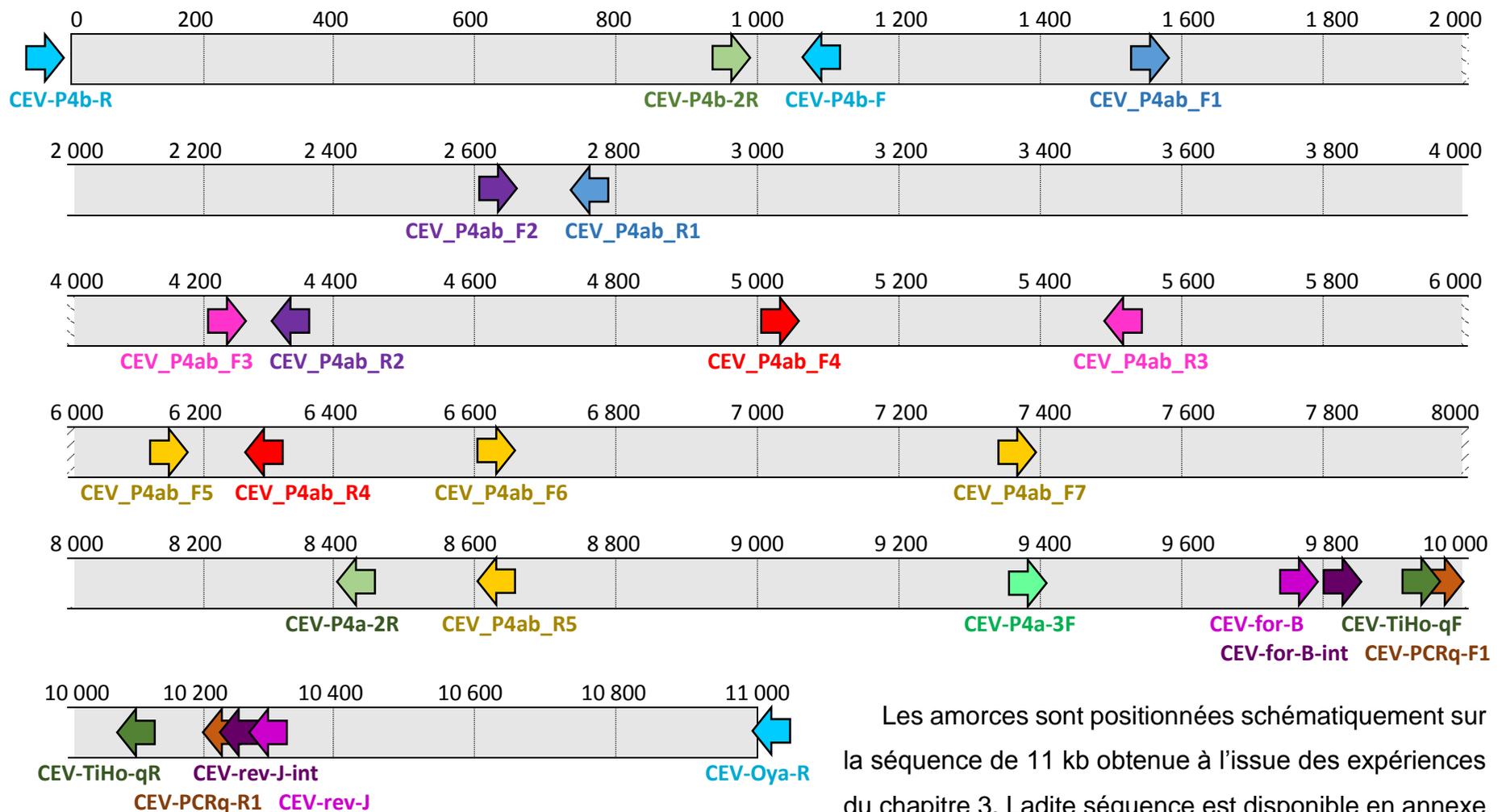
+ : par rapport à la séquence de 10 951 pb située entre P4b (partiellement inclus) et P4a (inclus) disponible en annexe C. *[italique]* : l'amorce se situe à l'extérieur de la séquence de 10 951 pb obtenue dans cette étude

Nom de l'amorce	Séquence	Tm (°C)*	Position de l'amorce +	Cible Type PCR	Référence
CEV_P4ab_F1	CTT TCT TAT CTG AAG CAT CTC CAC	63	1 566 – 1 589	PCR conventionnelle pour séquençage SANGER de la première portion entre les gènes P4a et P4b (1200 pb)	Original
CEV_P4ab_R1	ACC AAC TAT TGC ATA CTC TCT AGC	63	2 794 – 2 770		
CEV_P4ab_F2	CTT TGT CTG AAG AAG AAG AGG AAG	63	2 607 – 2 630	PCR conventionnelle pour séquençage SANGER de la deuxième portion entre les gènes P4a et P4b (1716 pb)	Original
CEV_P4ab_R2	TGT CAA AGT AGT CTC TAC TAA CCC	63	4 333 – 4310		
CEV_P4ab_F3	ACA AAG TTT ATC TAC GTC ACC TCC	63	4 204 – 4 227	PCR conventionnelle pour séquençage SANGER de la troisième portion entre les gènes P4a et P4b (1312 pb)	Original
CEV_P4ab_R3	CTA ATC CCT TCC TAA GTT GGA AAC	63	5 527 – 5 504		
CEV_P4ab_F4	CAG AAG ACA ATC CAG TAA TGA CAG	63	5 003 – 5 026	PCR conventionnelle pour séquençage SANGER de la quatrième portion entre les gènes P4a et P4b (1304 pb)	Original
CEV_P4ab_R4	CTT TGA TCC TTA CTC AGT AGA CAG	63	6 312 – 6 289		
CEV_P4ab_F5	CCA ATT GAC TAT TCC TAC TTG TCC	63	6 156 – 6 179	PCR conventionnelle pour séquençage SANGER de la cinquième portion entre les gènes P4a et P4b (2445 pb)	Original
CEV_P4ab_R5	GGA TCT GCA AAT AAA CAT GGT CTC	63	8 631 – 8 608		
CEV_P4ab_F6	TTC TGA GTT CGA AGA TTC CAT TCC	63	6 624 – 6 647	Séquençage SANGER interne de l'amplicon CEV_P4ab_F5 – CEV_P4ab_R5	Original
CEV_P4ab_F7	GGG ATT AGT GTA TTT ATG GAC GAG	63	7 375 – 7 398		

* calculé à l'aide de la formule : $T_m = 2 * (nA + nT) + 4 * (nC + cG) - 5$

+ : par rapport à la séquence de 10 951 pb située entre P4b (partiellement inclus) et P4a (inclus) disponible en annexe C

Annexe B : Positionnement des amorces utilisées sur la séquence de la zone inter-génique P4b – P4a



Les amorces sont positionnées schématiquement sur la séquence de 11 kb obtenue à l'issue des expériences du chapitre 3. Ladite séquence est disponible en annexe C, page 132

Annexe C : Séquence de la zone inter-génique P4b – P4a

Séquence nucléotidique du CEV située entre les gènes P4b (partiellement inclus) et P4a (inclus). Résultat de l'assemblage des séquences obtenues par séquençage SANGER d'amplicons de l'extrait ADN de l'écouvillon de branchies 2019-OT3-EB13.4n°4.

```
>CEV_P4aP4b_assemblage_SANGER
1  TGTTGGCTCG AAGTTAATCT GAACTGGGAA TGGATTGCTA TTCTTAATGA AGCAAGTATC TGAGAAATTA TGTTGATGAT GTTTTTGTCT CTGAATGAAG
101 AAGATTAGAG AACCATCTAC GACAATATTG TTGTTTCATGA AAGGATATGA AATTGGTGCA TATGCTGGAG TCTCAGAATA TCTTGTATCA TAGAATGGAT
201 TTCTTGGATT TTGGAATCCG ATTCCAGTAT GATCTTGTG CATCTGTCCG TAATTCTTGA TTATGTGCTG AGTTACTGGT TGTAGTCTA GCCTATTGTA
301 GAAGCTATCG AAGGTAGTAT GGTAATGTA ATCGTTGTTG ATTACAATTG GCTCAGCCAT ATCAGCAACC ATGTTACTAA TATTTACTGT AATGTAAGAA
401 GAAGTCTTCA TTACTGAACT TCCTTCCTTG ATTGCTTGC TTGAGATTCC TCTAATTCCA AGAATGTGAA GAACCATGTA TAGAATATGT TCTTCATTAG
501 ACATGAATTC TGGACTATTC TTGGCAATGA GTTTCATGAT GTAGTTGATC AATTTAGAAT TACCAGTTAC TTTGAAGTTT CCAATTCTAA GATTCTGAAC
601 AATATTTCTG ATTGCCATAT GAATTATAGA TTTCTCCATT TCTACACTAA CCAAACTCTT GGAATCTCTT GAGTAGATTT CATCATCTTC ACTAACTTTG
701 GTCATAACTA GATTTCCAAA CTCAGAAGGA ATCTTTTCTT TTGAGACAAT TTTCTTAAAG AGATAATAGC TGTCTCCAAC AATTGCATTA TCTTCAATTC
801 CTGCAAGCTT CTTAGCAAAA AGAGCTACTA GAATTGGATG TACCATATTT TGAATTCCAT TTCCATATTC GAAGTATTTG TCATTAACAT CACTAATGTC
901 AATAAATCCT TCACTCTGTT TCTTTGAAAG ATTGTAGATA TTGTAATAAT TAATTTCTC AGCGAAGCTA TCGAGACTAT GAAGATTTTC CTTGATCATT
1 001 TTACTATTAT CGAACTTAGC TCTAATTAGA GCAAGAGGAT GATTCCAAGT TGTTTGTTTA ATTTGCTTAG ACATTACAGC TCTTACGTAC ATTACAACCTC
1 101 CATTGAATGT ACTTGCACTA AACTGAAGAC CAAGTTGGTT TGAAATTGTT ATGATATCTG AGAGTTTGAA ATCTCCTTTC TTGTTCTTTA GTACTGCAGC
1 201 AATCTTATCT CCATAAGTCT TGATCATTGA ACATTCAGCT GTATCACTGA TTTCTAACTC CTCTCCTTTT CTTGCAGCTT GGAGTCCCAT TCTTGCAGGC
1 301 TTCTTTTGTC CAACAATCTT TCTCTTTTTT ACTGGTGCTC CACCAACAAC ATCACTTACA TACATATGAT GATTGAGTCT AAGTAGAGAA CAACAAGAAC
1 401 ATGTAGTTGG TCCAGAGTTA CTATGAACGT GATTAGGCTC AACTTCAAGA GTATTTTTCT TGAATTCAAC TTCTCTAGAA TCTAGAAGAG ATTCAGAATA
1 501 ATCTTCTCT TCTACAGCGT GTACGAAATC TTCTTGTCTT TGAGTTAGTT CTCTCCTTC TACATCTTTC TTATCTGAAG CATCTCCACC ATAAATTTCA
1 601 CTTTTTTCGA AATAATCACT TTTAGACACT ATACGAAAAT TGCAAGTTGG AATTCGAAA GAATTCAAAA CTGTTGGATG TCCTAATCT AGATCGCAAA
1 701 TACAACGTTT AGGATTGCTC ATTTATTAGG TGTAATATTA TGAAAAGTTT TAATGTCAAT TAAATACAAA AAAAAATTATA AAATCCCCAT AAACCAAGTT
1 801 TTTATCTAGA TTCATTTTTC GTTTTTTAAT TCCTTGATTA GGTAAAACCA GAGGATTAAT AAATCTTTGT CCTTGACTAT ATTCTACTTC ATGATATTTT
1 901 TTATTAGGCA ATTTGATGAT TTTTTTAAAT CCAACGAAAT AATCATTATG TGAAAATATT GTATAATATA CAACGTTACC TTTTTCAGCA TCTATGGCAT
2 001 ATTCAGATTC TTCTAATTTA AAATTAAC TAATTAGAAG TCTATTAAGT TTTACAAAAT TAGAATTTAA TGGAGTTTTA TTATTGACTA CAAAATTAGT
2 101 TTTTATTTTT TTATCTATGA ATCCTGAATC GTCACAAGTA CATTATCTC TAATCATAAA AAAAGATTTA CTTTCAAATT TATGTAAGTA ACTACATCTG
2 201 TCACAAATAT CTCTGTATGA TACCGTTATT GGATATGAAG TTCCTTCTC ATTATAGAAA TCATTTATTG AAACTTAAT GTAATGTATA ATAATATTAA
```

2 301 AATCGTTAGT ATTTTGTACT GATAGAATAT TTTTATATTT TTCTAACTTG CTTTTATTAT TTAAAATTGA ATTACATTTT AGAATAAAAT CAGTATCAGC
2 401 TGTGTTAGCA TTGGAGTTT TGTCTGGGTG ATATTTTATT AGTAACTCTT TTTTAGCAGA CTCTTTTTTA AATAAATCAA AAATCGGAAC TATAGTATTT
2 501 TCCATATCTC AAAAATAATA TTTAAATTAT TTAAAATAAA TGGACGAGTT TTCCCCGAC GATTTTTTTC AATCTGATGA AGAGTTCGAT TCCGAACAAG
2 601 AGTTTTCTTT GTCTGAAGAA GAAGAGGAAG AGGAGGAAGA TTCTGAAGAA GAGAATCTTT TTGATATTTT AACTATAAGT CAGATCGAAG AGATTTCTAA
2 701 TATCGATGAA ACTAGTAATA CTAATTTAAA AAAAGTAGAA AATAGTAGAA AGAATTATAT CTTCAATAGG CTAGGAGAGT ATGCAATAGT TGGTATGATG
2 801 TCTCATAGAT ATAACCAAAT TGTA AAAAGGA TCGATTCCCT TGTGTATTAA CTCAAAGGAT TATTATGAAA AATATACTCC ATTCATCGCA ATATTAGACG
2 901 AGATAAAACA AGGAGTATTT CCTGTAGTAA TAAAAAAGG TGAATATTAT ATTAAGATTA CTGACTTTCC TTATAAAGTA GTACAACATA GATTGGAAAT
3 001 AATTTGTGAC TACTGGAAAG AGCAACGTAA AATTCCTATG GATTATTCTC CTATGTTGTT TTGGGAGAA TAAATAATCT CAACATAGAA TCATAATGAT
3 101 CAAATATGTG ATAATACATA AGTAAATTTA TTATTA AAAA AGCTAAAGAC AATTTTTGAC TTTGCATAAA CAAACTAAAT AGTATTTGGA TTAACCCAAT
3 201 AATAAAAAAT AAATTTTTAT GTCCCATTTA AAAAAGAGTA ATTTTATACT TGTAGAATTA GTCTGATCTT TTCGATCAAA CTATTATATA GTTCATCTCC
3 301 AGCTGGAATA TTAAATCTAG AACAAAAAGT ATTGATATA GATTTTACCT TAGTACTGTT ATCATTACTT TCTACAATTT CTTTTAGAAAT TGCTTCTTTA
3 401 TCTTCTCCTA GTTTACTTGA GAGTACTGAA GTAATTTTAC TAATATCTTC GAATTTAAAT TTATTATCAA GATTAATTTT TGTATGTCCA GCTACAATTT
3 501 TCTTACAAGA ATCTAGAACA TCTTTAACA TTTCTTTAAT ATCTTCTAGT CCTCCAAAT CAAATAGAAT ATTAAGGAAG ACTGCAATTT TAAATTTAAG
3 601 AGTTTTAACT TCTTCAGGAG TTTTAGTTTT ACAGAATTCT CTTAGAACAG CAGATCTAGA AAATACCTTC TTTACGATTT CTTTAAATGTT TGTTTTATTT
3 701 GTTGTGTTT TAGGATTCTC CCAAAGTAGT ACTAATCTA GGAAAGCAA CAAATCTTCT TTTTGAAGT TGAAGTTTTT ATCAATCTTC TGAAGAGTAC
3 801 TTTCAGAAAT ATCATTAGCT GGATTAATTA GTTTAATGAA TCGTACTGTG TACTTCTCTT TAGTAATGAA TCTTCTAGG ATTACAATAA TCTGGTTTAG
3 901 TTTAGACATT ACAATTTGTT CGAATTGATC TGGAGATTGT TTGAATTCAG ATGCAATTTT AGTAATATCA TGAAGATCAG ATCTATCTC TCTATTATCC
4 001 TTAATAGTTT GTTGGACAT CTCTGTTAGT TTTCTTACAC TAATAACTTC ATGTAGTACA TTAACGAAGT TAGATAGGAA TTTAGATTTA TTAGAAGAAG
4 101 CATTGTAAAC AGATTTGACA TTTCTACTA GACAAATCTG GATGAAGCTA AGATTTTTTAA GTTCAACTTT CTTAATGAAC TTTAGAAGAT CAGCTTCACT
4 201 AGTACAAAGT TTATCTACGT CACCTCCATG TTTTGGTAA ATATCGACAA TGGTTTTTAG GAAATCATAA TCTTGCTTTA CATTAAAAGT ATCTTTAACT
4 301 TTGTTATCAG GGTTAGTAGA GACTACTTTG ACAATTTTCAAT CTTTAAGCTC AACGTAAGAT TGGAATTTT TACTATCTTC CATTATTTAA AAAATGATTT
4 401 AAAAGTTAAA AAAATGAAT AAAATTTTCA GAAGTACTCT TGTA AAAATTC TTTTGGTCTT TTCTATTTTCG TCAATACTGT TTTTCAAAT AAAAAGTAGA
4 501 AAGATATTGA TGATGAATGC TTTAATGAAA CTTTCAGGTT GACTACATTC TATATTTTTG AAATACTCGG TGA AAATATTT TTTAACTACT CTGACGTTAG
4 601 TTTGCTTTTC ATCTACGTTA ATATTTTTTA TAGAAATAGT ATAATCTGTA GATAACCTAG TTTCAAATAA TTCTCCATCA ACATAGAATC CTCCAAACTT
4 701 AAGTTCTAGT CCATCTTTTT TAGTTATAGT TTTATCGTCA GGAACGAAGT GATTTAGTTC ATAGATCATT TTCCGTTTCT CTAAGTTTAC AGATTTTTTG
4 801 ATCATATCTG TCTTGTATC TTTTTTGATC TCAATAAGAT TATGTACCAT TTCTTTTATC AAAACTTTAT AGTCATAGAA TTCCTTGGT TTAACATAGA
4 901 ACTCTCTAGG ATATAAAATA TTATCATTCT GTATCAAGAT GATTTTTGAT CCATTAACAT AATTTAGAAT ATCTTGTTCT TTAGCAAGTC TAATACTTTT
5 001 ATCAGAAGAC AATCCAGTAA TGACAGTAAA ATTATTTACT TTAATTATTC TCCTATTTTC TTCTTCTAGA ATTAATTCGA CTCCTTTAT CAAAAAGTTA
5 101 TTGATACTAT CTTTTAAGAA TGAGATCTTG TTTTCCAAAA TAATCTTACC ATATTTTAGA ATATATAGAT CAACCTCCTT TTGTTTCATAT TCTTTTTTCT
5 201 CTATACATTT TTTATATAAT TGAGTTTTTG TCTGATCTTG GATAAAGCAA CAAGGTAAAC AAGTATTAT TAAATTTATG AAAATCTTAA GAAATCTAG
5 301 ATATACATAT TGTCCATTAT CTTCAGAACA TTTATGAACA TTGTTAGATT CGTCAATATA TAAATCTATG TTCTTTCTC TAAAGAAAT TGGTCCAATT

5 401 TCCTTAATGT TATTTTCCTG GAAATAAGAC TTATCTGGAA TAAACAAAGT AGGTTTACGA TTTTGTAT TTGCATTTTG ACAGATTCTA CTCCAATAAT
5 501 ACGGTTTCCA ACTTAGGAAG GGATTAGAAA GATAATTAGG ACTATGAATA TAATTGTAAG AGATGACCAT TAGAACCAAG TATTTTCTA AACCTTTGTA
5 601 ATAATTTCTC ATTTTAATTG TAATCCGATT TCTTGCAATA AGAATACTAT TCTTTTATC TGGAGTTAGG ATGATATTAT TGGTTGCTGT TTCCACAAAA
5 701 AGGAAGTTAA TATTAAGATC AATTTTCAAA GCAGAATTAA TACTGTTTTT CAATCTATC TTATGAGTAA TATCAGACTT AATCTTTGG AAATCATGCT
5 801 CTATCATAAT AGGATAAATF TCATTAGTTA GATTTTTGTC TCTAATTATA ATATTGGAAT TTGTAATGAC AATTCCAATT TGGTTAAACT CGTTAACTAA
5 901 GAGTAGAGTA TCTGGATTTT TATAATAAGT CAAATGTTT CCTGTCATGT AAATATTGTT ATTATCTGTA GTGTAGTAAT TAAGAGTAAT TTTGTAGTTG
6 001 GTAGATTTTG AATATTCTAA CAAAGTTTTA ATAATCTTCT TCATCTCAGT TTCAGAGATT TCAGTTCTAA AATTATTATT AGTATGACTA GTAATTTTAA
6 101 AATCGATATT TACTTTTTTG ATGGCATTAA AAATCTTCTC TTCATATCCG ATATTCCAAT TGAATATTCC TACTTGCCG ATCTCTGGAT AATTAGAATA
6 201 CTTAGATTCC ATACACCAGA TAATTAGATT GTCAAAACAA TCTGGGTATA GTTTATATAA AACCATATCA TTCTTATGTA GAGAAATTCT GTCTACTGAG
6 301 TAAGGATCAA AGATTTGTTT ATCAACATAA CTATAATCTA TATTATGTTG GTAACATATAT AAAATAATTG GAGTATCTAA TTCTAAAAGA TTTGCAATGT
6 401 ATCCTCTAAT CTGGTTATTG TTCAAAGTTA AAAAAATATG ATTTTTTTTA TGTCTAGAG GAGGTATAAT ATTTGAACTT TTAGTTAACA AAGAATAAAA
6 501 TCTATAAGCG TTTGATCTAT AGTCAATTTT GTCTGCGTGA GATAAATACA GACATCTATC TATTTTTTTA TCTTCTTTAG TTAAGATAAT AAGCTGAGGT
6 601 TTAATGATTT CTGTAATGA CTTTTCTGAG TTCGAAGATT CCATTCCAGT ATTTATAACA GATAATGTTG ATATAACAAA TGAGTATTAT AATGTCGAAA
6 701 AAATATTAG TATTAATGAA AGTAGAGAAC AGTATAAAAG ATCGAATAAT AAAAGAATC CAAGATTCTA TTCGTCAATA ACCAAAGAAG ATGAGAGAAC
6 801 TTGTTCAATTA GGTATTTTA ATTACAGAAA TCCTTTTATT ACAGAATTGG AAAACTCAGA ATTAATAATTA ATTATCAAAG AAATGTCAGA AAAATTTCAAT
6 901 GTCAAAAAAA ATAATATAAT CAATAGTTTA TATATTTATA TTTTGAAAAC TCTTAGTGAA GGAATAACTT TTTTCAAGAG TTTTCAATAAT TACTATATTC
7 001 CTGAACTTAA TGTAGAACT GGTAAAAAGA ATTCTTTCAA AAATCAGATA AAAATTTCAAT ATGAAAATCT TAGAGATGAC GATCAGTTTA AAAAGTTTTT
7 101 TAAACCCATT AATAAAGATA GTGTAGATTA TTATGATAAA AATCAAATTA GTAATATTGT AAAAGGTCAT GTAATTTTCT TAAGAAATGT AATTTTATTT
7 201 GACAAGGAAT TTAATGCTAA TTATTTGGAA TTTTAAATGT CTGGAGATAT TAGTTTAAATC GATACTATTT TTAAGTTTAC TGATGCTGAT TTACATTTTT
7 301 GTACTACTGA TCTTAAGTCA GAAGTAAAAC TAGATGTTGG AGAAGAAGAT GAAACTAGTA AAGATTTCTGG TTATGGGATT AGTGTATTTA TGGACGAGTT
7 401 TGACGAAGAG TTTTACAACG AAGATTATGA TATTGATTCA GAAGTATTTA CTGAAGAAGA AGTTTTAGAA GAAACTGAGT TCAAAAAAT CGAACATATG
7 501 TTGCTGAAGT TTTTTAAAAA AATATATATA TTTAATTTCC AAAATAAAAT CATTAGTCAG AGTCTTAAAA AAACCATAAT TGTCGACAAA TTAATGTGGG
7 601 TAGTTTATAA CCTATTTCTT GACTTCTATA ACAAGCTTGA AATTCTTAAA GGTTTTTTAC CTAATCTAAC TAACCAAGAA ATCATAAGTT ATTCTAATAG
7 701 ACTTTTAAAA ATTGGAGTTT ATGATTATAA TAAACCTGAA AGAGTACCAA GCAATAGATT TAAAATTTCA AAAGATTTAT TCGAATCTAT TTTAAGTTCT
7 801 AGTCAAGAAT ATTACGAAAC CAAATCTATC AAAAGTTATA AAAAAGTTAC AGGGTTTTTG GATACTAACA AACTCAATTT TTACAATAAA TATTATTTAC
7 901 CAACACTAAA CCAATTTGAC ATACCTTCTA CTAACAAAAA AGAAATGTCA GAATTTATAA AACTTAGCGA TTTCATTTTC AAGTATATAT TTATTTTCGA
8 001 GAATGATCTA AGTTTAGTAT TATTAGAAAA ACCAGAATTA GCAAACTGT TTTATCTAAT GACAGAAAAA CTCAATCCAT ATAGAATCGA ATCATTTTTT
8 101 GGAATCAAAA AAAAGATCAA TCAAATGTTA AACATCTTTT TTGTCTGAAA TGACAGCACG TAATGCTGTA GACTTTGACA TTATTTTTTT TAGTAATAAT
8 201 AAAAAATATA TTACAAAAAT TCCAAAGACT AAGATCGTGA CTAAACTTTC TATATAAAAT AAATATTTAG TATTAAGTTT TTTTTTAGTT AAGAATTCAG
8 301 TCAACACCTT TTTAATAATF CCAGATATTG AACTTGCTAT ATTAAAAAAA GAAGAAGACA ATAATACTCT TGTCACAGCT TCCATAACTT CCAACGACTG
8 401 TAACATAGCA CCTTCATACA TTTAAATTGT TTAATAAAGT TCCTCATTAG CAGCTTCTAG TTCCTCACTC TGTAATCTTA GTTCTCCAGA AACCTTCTCA

8 501 ATTATTTTAT TAATTGTTGT CTGGTATGCA TTTAGGTTAC TTGTTAGACT AGGTTTAATA TGATTGTAAA TTACATTTAG AGTTTCAGAA TCAATGTCTG
8 601 TCTCATCGAG ACCATGTTTA TTTGCAGATC CACCTCTTCC AATAAATTCT AGAAGTCCTC TTGTGAAGTC AACTACAACA CAAGTCTTAT ATAGAGAATA
8 701 AAGATTCTTG ATTATTGCGT TTCCTTGTTT TGCAATTACT TCTTTTACAT CTGAGTTAAT TTCTACTCCA TGAGTTTTCT CTAGAGCTTT CATATTTGAT
8 801 ACCATTGAGT TCATTATGTA TCCAACATCT TCTCCAGTCT TTAGCATTGC TCTATGTCTT AGTGCATACT CGGGAATTCT CTTAAGGAAA TGTCCAGGTC
8 901 TTGTTGTCAT TCTTTGAATC TGTCTAGAAG AAACCAATTG TTTTGAAGT TCATCTACAA TGTAATTTGA CTCAAGTTCA GTAGTTTCAG ATTCTAGTTG
9 001 TTCAAAGATA TCTTTAATTC CATATCCAGC AGCAACATCT TCACTTTTAC TTCTGAATAT ATTATTGAAA TCATGTTGAA CTGACTTCTC TACAATATCT
9 101 ACAATATTAT CAGAGTTGAT TATTGAACCA TCTACTGAAC CACTTACAGC AAGATTCCAT CTTAGATGTT CGGGATATGA AGATTTGATA CTGTCAGCAA
9 201 ATTCAAGAAT ATCATCTTTC ATTGGAGCTT CATAAACTGC CTTCTTGAAA TTATCGATAC AATTCTTGAA TGGTCTGCAA TTCTTTAGTT CTTCTCCAGA
9 301 CTCTGTAAGT AGTAGTTCTT GGATATTGAT ATTATGATAA AATGGAATTG GATCATTTTC AACTGACAAT GTATCTCCAC CTGAAGTATC TTCTTTTGT
9 401 CCTTTTCCAG CTCCAGCAAT ATCAGCACAA GCTTTTGTG CACTAGGATA TGAAAGGAAA TTGTAGATAA AAAGAATTAG AGGTTCCAG TTGTTAATTA
9 501 GAGTATCAGC AGCTTCAACA TTATTTCCAT CTTTCTTAG AGCTGCAATA ACTTTAGATC TTAGAGATTG TTTTGTGAAT GAAGGAAATA CCTTAAACT
9 601 AATTTTATCA GTTTTAGTAT TTGTTGTTGA TCTAATAACA TATCCCAATT TTGTTAGAAG AATCCAAATC AAATTTAGTA CTGCCTTATT AGAAGGAATT
9 701 TTGTATAGTA CTTTATTTGC TGCAGGATCT GTATCCTTGT ATCTGCAAGT ACAATAGAAA GCAAGAAGTT TGTATGGAGT ATCCAAAGTA CTTAGATTAA
9 801 TGTTATCAAT GAAATTTGTG TATTGTGTTT TTGTTAGTCC AAGAGTTTTT TCTCATCGT TTGTTACTTT TTGTAGTTGC TTAATATTTG TGATAAGATT
9 901 TCCATTGGCA TAAAATCCTT CCCAGATTTG TGTTGAAACA TGTTTTAGTG TTTTGTAGAT TGTAGCATTT CCTAGTTTGT ATGGCAAGAA ACAAACCTCTC
10 001 TTTACTGAAA CTCCTTGAGG AATTTGATCT AGAATTCAC AGAATGTAAT CTCAAATTTG TTTGTGGAGT TTTTGAAGTA TACAGTTTCA TCATACAATC
10 101 CTAGAACTAG AGCAAGATTA GAAGTCATTG TCTTATCGAA GACAGACATC TTATTCCAAT CATCAATCTG AATTCCTTTC CAGAACATAA CATTTGCAAT
10 201 TTTAACTTGC TCTGGAATTG TATCAACGTA TCCAATATCT TTCTTTACTA CGTAATTTGG ATGAGGTAGT ACTTTGCTAA CAAAGTCACA ATAATGAAGA
10 301 GTTGTCAATT TAATTTGTTG TAGTCCAATT TCTGCAAATT GGTGTATATC AGGAATATCA AATTTAACCA TATTTGCAAA TGGATTTGCT GCTGGTGCTG
10 401 CCATTACGTA ACTAGAATCA CGAAGCTCAG GATCTCTTGC CGCTGCTGTT GCAACCATTG GAGAATGAAC TGAATCAACA AGTTGATATG CCTTTGCGAT
10 501 TGCATCAAAA GTAATAAGTT GACGAGGGAA TGATTGAGAT AAAGTAGAAC TTCTTGATA ATGTATATCT TGAGAAGCAG CTGCTCCACC TGCTACAATT
10 601 CCAAGAGCAT AATGATATTC AAGATCTAGT CTAATTTGAT CTGGAGAATA AGTGTATGCC TTAATTCAT ACAGTTTAAAT GAAATGCTCA TAATTACCTT
10 701 GTCCAAACAA AGTTAGGTAA AATAGTTTTA GGATTGAAGC AAGAGCTGCT GCACTTTTAG GAGGACAAGT AAAGTTACCA CCAGCTCCCT ACAAGGAAAG
10 801 CAATTGATTT TATACTTGAA GAACATTCOA GAAGATTAGA GAAATCTCA AGAATTAGAA TTGCAACTTC TAGTCTCTCT AGTTTTTCTA GATTTAGATT
10 901 TAGGTTGGCA TCGAAATAAC TTGCATAATC TAGAAGTTCA TCAACATCAA A

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de MONTACQ Laetitia intitulée « Etude du virus responsable de la maladie du sommeil de la carpe : analyses épidémiologiques et moléculaires » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

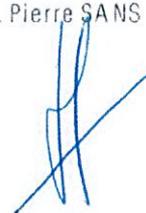
Fait à Toulouse, le 18/11/2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Stéphane BERTAGNOLI



Vu :
Le Président du jury
Professeur Christophe PASQUIER



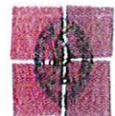
Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO



Mme MONTACQ Laetitia
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le: 24/09/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Etude du virus responsable de la maladie du sommeil de la carpe : analyses épidémiologiques et moléculaires

Résumé :

Le Carp edema virus (CEV) est responsable de la maladie du sommeil de la carpe (Koi sleepy disease, KSD). Cette maladie, découverte au Japon dans les années 1970, touche exclusivement les carpes *Cyprinus carpio* et entraîne des mortalités massives à travers le monde.

Nous avons collecté nos échantillons à la Pisciculture d'Estalens (Gers – France) entre 2017 et 2020.

Lors de l'importation de carpes Koï du Japon de 2019, le CEV a été détecté dans 76 % des poches de transport. La durée d'excrétion post-importation était variable mais pouvait atteindre deux semaines dans des lots asymptomatiques et un mois dans des lots symptomatiques.

Les essais de répllication sur culture primaire de cellules embryonnaires et sur embryons de carpe ont été sans succès.

Nous avons séquencé pour la première fois la zone intergénique P4a P4b.

Les analyses phylogénétiques positionnent nos échantillons dans le génogroupe II et le CEV parmi les *Chordopoxvirinae*, à proximité du Salmon gill poxvirus.

Mots-clés :

Carp edema virus, maladie du sommeil de la carpe Koï, Koi sleepy disease, *Poxviridae*, carpe commune, carpe Koï, *Cyprinus carpio*, épidémiologie moléculaire, cinétique d'excrétion, isolement viral, phylogénie

Study on Carp edema virus: epidemiological and molecular analyses

Abstract:

Koi sleepy disease (KSD), caused by Carp edema virus (CEV) was originally described in Japan in the 1970's. It now causes worldwide mass mortality exclusively among carps (*Cyprinus carpio*).

We collected samples in a fish farm (Pisciculture d'Estalens, Gers – France) between 2017 and 2020.

In 2019 carp Koi importation from Japan, CEV was detected in 76 % of shipping bags. The duration of viral shedding was inconstant. It could last up to two weeks for asymptomatic batches and up to one month for symptomatic batches.

Viral isolation in primary culture of embryonic cells and carp embryos was unsuccessful.

Genome region between P4a and P4b genes was sequenced for the first time in this study.

Phylogenetic analyses showed that our samples belong to CEV genogroup II and that CEV is on the same branch as Salmon gill poxvirus, among *Chordopoxvirinae*.

Keywords:

Carp edema virus, Koi sleepy disease, *Poxviridae*, common carp, Koi carp, *Cyprinus carpio*, molecular epidemiology, viral shedding timeline, viral isolation, phylogeny