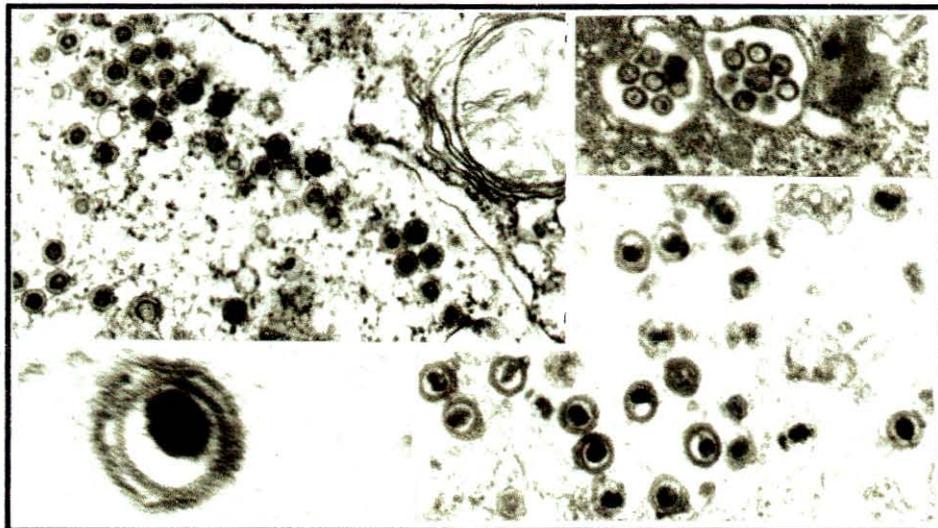


**CONTRAT DE PLAN ETAT REGION POITOU
CHARENTES 1994- 1998
CONVENTION 94 RPC R 62**

**PROGRAMME PATHOLOGIE
RAPPORT SCIENTIFIQUE ANNEE 1994**

**T. Renault, N. Cochenec, R. M. Le Deuff, B. Chollet, P. Maffart,
P. Haffner, F. Berthe et B. Thuillier**



**Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales
B. P. 133, 17390 La Tremblade**



**CONTRAT DE PLAN ETAT REGION POITOU
CHARENTES 1994- 1998
CONVENTION 94 RPC R 62**

**PROGRAMME PATHOLOGIE
RAPPORT SCIENTIFIQUE ANNEE 1994**

Responsable : T. Renault

**Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales
B. P. 133, 17390 La Tremblade**

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION

II - RECHERCHE D'AGENTS PATHOGENES CHEZ L'HUÎTRE CREUSE

III - REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE L'INFECTION A VIRUS DE TYPE HERPES SUR LARVES AXENIQUES

IV - ESSAIS DE PURIFICATION DU VIRUS DE TYPE HERPES A PARTIR DE LARVES ET DE NAISSAINS INFECTES

V - TESTS DE CONDITION D'ELEVAGE (TEMPERATURE) ET CONTROLE SUR L'EXPRESSION ET/OU LE DEVELOPPEMENT DE L'INFECTION VIRALE

VI - REFERENCES

I - INTRODUCTION

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

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

Ces travaux ont d'autant plus d'importance qu'aujourd'hui, devant les pathologies rencontrées, les professionnels restent extrêmement démunis (traitements inapplicables ou inexistantes). Dans ce cadre, la promptitude du diagnostic ainsi que l'acquisition de données épidémiologiques et biologiques concernant les agents pathogènes impliqués sont les meilleurs moyens d'éviter ce qu'il a pu advenir, dans les années 1960-1970, avec l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*.

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

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

Par ailleurs, en 1993, suite à l'observation d'anomalies au niveau des branchies chez des huîtres creuses provenant de Charente Maritime et du bassin d'Arcachon associées à de médiocres performances de croissance, il a été entrepris des analyses de divers échantillons, en histologie classique et en microscopie électronique à transmission. Ces examens ont permis de révéler la présence au niveau des branchies, chez un nombre non négligeable d'animaux, d'un microorganisme de type chlamydien (RENAULT and COCHENNEC, 1995).

L'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales a réalisé, en 1994, un ensemble de travaux correspondant essentiellement aux actions 1 et 2 du programme proposé dans le Contrat de Plan Etat Région Poitou Charentes (Action 1 : Recherche et purification d'agents pathogènes chez l'huître creuse. Essais de reproduction de pathologies expérimentales au laboratoire - Action 2 : Tests de divers facteurs de stress (variation de salinité, de température, de niveau nutritionnel et de manipulation des animaux) pour étudier leur rôle dans le déclenchement et/ou l'apparition de pathologies chez l'huître creuse).

II - RECHERCHE D'AGENTS PATHOGENES CHEZ L'HUITRE CREUSE

Au cours de l'année 1994, 2107 animaux de l'espèce *Crassostrea gigas* (huître creuse), ont fait l'objet, au laboratoire de La Tremblade, d'analyses en histologie classique afin de rechercher des agents pathogènes connus ou nouveaux. Par ailleurs, plus de 30 lots d'huître creuse (adultes, naissains et larves) ont l'objet d'un examen complémentaire en microscopie électronique à transmission.

Les analyses effectuées ont permis de mettre en évidence sur 364 individus examinés des anomalies nucléaires laissant suspecter une infection virale de type herpès. Des analyses en MET ont confirmées la présence d'un virus de type herpès chez certains animaux.

Par ailleurs, les examens, effectués en 1994, n'ont pas permis de retrouver le microorganisme de type chlamydien observé sur des huîtres creuses en 1992 et 1993.

SUIVI DES MORTALITES ANNEE 1994 Huîtres creuses - *Crassostrea gigas*

	<i>Charente Maritime - naissain d'écloserie</i>	<i>Charente Maritime - naissain captage naturel</i>	<i>Charente Maritime - Huîtres de plus d'un an</i>
<i>Total des lots et des huîtres analysés</i>	14 lots 281 individus	2 lots 57 individus	31 lots 649 individus
<i>Nombre d'huîtres présentant une suspicion d'infection virale</i>	11 lots 91 individus	2 lots 17 individus	13 lots 41 individus
<i>Détection de particules virales en microscopie électronique à transmission</i>	2 sur 3 lots analysés	1 sur 2 lots analysés	

Les résultats détaillés concernant les analyses effectuées sont rapportés dans les tableaux suivantes.

L A R V E S

N° d'enregistrement	Espèce	Date	Commémoratif	Résultats microscopie électronique
94-63	<i>C. gigas</i>	28/04/94	Larves J4. 85% de mortalité.	Détection de particules virales du type herpès.
94-64	<i>C. gigas</i>	03/05/94	Larves J7. 99% de mortalité.	Détection de particules virales du type herpès.
94-107	<i>C. gigas</i>	16/05/94	Larves 200µm. 20% de mortalité. Fond de bacs.	RAS
94-108	<i>C. gigas</i>	16/05/94	Mêmes bacs. Larves nageuses.	Détection de particules virales du type herpès.
94-109	<i>C. gigas</i>	16/05/94	Autre ponte. 15-40% de mortalité.	Détection de particules virales du type herpès.
94-122	<i>C. gigas</i>	18/05/94	Ponte 29/04/94. Larves 200µm.	RAS
94-123	<i>C. gigas</i>	24/05/94	Ponte 19/05/94. Mortalité à J7, de 20 à 80% selon les bacs. Larves 60µm. Géniteurs originaires de Paimpol.	Détection de particules virales du type herpès.
94-124	<i>C. gigas</i>	21/05/94	Ponte 17/05/94. Larves 40µm. Géniteurs originaires de Vendée.	Détection de particules virales du type herpès.
94-158	<i>C. gigas</i>	08/06/94	Ponte 26/05/94. Larves J4, 40-60µm. Géniteurs originaires de Bouin.	Détection de particules virales du type herpès.
94-161	<i>C. gigas</i>	08/06/94	Ponte 26/05/94. Larves J4, 50% des animaux au fond des bacs. Géniteurs originaires de Bretagne Nord.	Détection de particules virales du type herpès.
94-164	<i>C. gigas</i>	08/06/94	Ponte 28/05/94. Larves J4, 50% des animaux au fond des bacs. Géniteurs originaires : femelles Bretagne Nord x mâles Bouin.	Détection de particules virales du type herpès.
94-166	<i>C. gigas</i>	08/06/94	Ponte 25/05/94. Larves J5, 50% des animaux au fond des bacs. Géniteurs originaires de Paimpol.	Présence de noyaux anormaux en absence de particules virales de type herpès.

94-168	<i>C. gigas</i>	08/06/94	Ponte P8/P9. Larves J7, 40µm.	Présence de noyaux anormaux en absence de particules virales de type herpès.
94-170	<i>C. gigas</i>	08/06/94	P10. Larves J5, 40µm.	Présence de noyaux anormaux en absence de particules virales de type herpès.
94-230	<i>C. gigas</i>	20/06/94	J6 - Mortalité 90%.	Présence de noyaux anormaux en absence de particules virales de type herpès.
94-231	<i>C. gigas</i>	20/06/94	Idem	RAS.
94-232	<i>C. gigas</i>	20/06/94	Idem	RAS.
94-233	<i>C. gigas</i>	20/06/94	Idem	RAS.
94-335	<i>C. gigas</i>	01/08/94	Ponte 19/07/94. Mortalité.	RAS.
94-352	<i>C. gigas</i>	22/08/94	Micronurserie. Mortalité 20%. Animaux 400-800µm.	RAS.
20 lots analysés				

MARENNES - OLERON

NAISSAINS AGES DE MOINS D'UN AN - ORIGINAIRES D'ECLOSERIES

N° d'enregistrement	Espèce	Date de fixation	Commémoratifs	Résultats histologiques	Résultats en microscopie électronique
94-7	<i>C. gigas</i>	26/01/94	<i>Marennes</i> . Animaux reçus en mai 93 et placés en nurserie. Mortalité au bout de 2-3 semaines, puis animaux mis en poche. Mortalité ensuite en juillet 1993.	3/13 animaux présentent des noyaux anormaux dans les tissus conjonctifs : <i>suspicion d'infection virale à virus de type herpès</i> .	NF.
94-234	<i>C. gigas</i>	21/06/94	<i>Ronce les Bains</i> . Mortalité 95%. Problème de renouvellement d'eau - Aération insuffisante.	2/10 animaux avec rares noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale</i> .	RAS;
94-235	<i>C. gigas</i>	21/06/94	<i>Ronce les Bains</i> . Autre lot.	10/10 animaux : RAS.	NF.
94-248	<i>C. gigas</i>	27/06/94	Poches à <i>Bourgeois</i> . Origine éclosionerie. Animaux moribonds.	14/14 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale</i> .	<i>Détection de particules virales.</i>
94-250	<i>C. gigas</i>	27/06/94	Idem. Animaux vivants.	20/3 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale</i> .	<i>Idem.</i>
94-256	<i>C. gigas</i>	30/06/94	<i>Port des Barques</i> . Origine éclosionerie. Tête de lot. Mortalité chronique.	6/25 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale</i> .	NF.
94-257	<i>C. gigas</i>	30/06/94	Idem. Milieu de lot.	5/22 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale</i> .	NF.
94-258	<i>C. gigas</i>	30/06/94	Idem. Origine éclosionerie. Pas de mortalité particulière.	3/21 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale</i> .	NF.
94-278	<i>C. gigas</i>	05/07/94	<i>Ronce les Bains</i> . Origine éclosionerie.	18/30 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale</i> .	<i>Particules virales</i>

94-309	<i>C. gigas</i>	25/07/94	Oléron. Télécaptage avril 1994. Animaux vivants.	7/24 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale.</i>	NF.
94-310	<i>C. gigas</i>	25/07/94	Idem. Animaux vivants.	9/14 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale.</i>	NF.
94-338	<i>C. gigas</i>	04/08/94	Mortalité depuis le 29 juillet 94. Animaux 3 mois.	21/21 animaux : RAS.	NF.
94-353	<i>C. gigas</i>	26/08/94	Breuillet. Télécaptage avril 1994. Premières mortalités début juillet 1994 (80%), les survivantes ont ensuite bien passé, puis 10% de mortalité depuis le 15 août.	4/27 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale.</i>	NF.
13 lots analysés, soit 254 animaux examinés.					

MARENNES - OLERON

NAISSAINS AGES DE MOINS OU DE PLUS D'UN AN - CAPTAGE NATUREL

N° d'enregistrement	Espèce	Date de fixation	Commémoratifs	Résultats histologiques	Résultats en microscopie électronique
94-255	<i>C. gigas</i>	27/06/94	Origine Bonne Anse. Transfert le 15 avril 94 à <i>Bourgeois</i> . Mortalité 80% depuis le 21 juin.	13/26 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale.</i>	Détection de noyaux condensés avec petits amas denses aux électrons, mais absence de particules virales.
94-294	<i>C. gigas</i>	13/07/94	Captage 93 Brouage. Elevage <i>Port des Barques</i> . Mortalité 50% depuis 2 ou 3 jours.	4/31 animaux présentent des noyaux anormaux : <i>suspicion d'infection virale.</i>	<i>Détection de particules virales de type herpès.</i>
<p>2 lots analysés, soit 57 animaux examinés.</p>					

CHARENTE MARITIME

ANIMAUX D'UN AN ET PLUS- ORIGINAIRES D'ECLOSERIES OU DE CAPTAGE NATUREL

N° d'enregistrement	Espèce	Date de fixation	Commémoratifs	Résultats histologiques	Résultats en microscopie électronique
94-16	<i>C. gigas</i>	14/02/94	<i>Ile de Ré.</i> Mortalité 10-15 janvier 1994.	- 1/23 animaux présentent des noyaux anormaux (branchies) : suspicion d'infection virale. - 4/23 animaux présentent des lésions branchiales et présence d'inclusions basophiles. - 6/23 animaux présentent des dépôts calciques au niveau des tissus de soutien des branchies.	NF.
94-20	<i>C. gigas</i>	16/02/94	<i>Chaillevette.</i> Captage 1993.	3/9 animaux présentent des dépôts calciques au niveau des tissus de soutien des branchies.	NF.
94-35	<i>C. gigas</i>	30/03/94	<i>Etaules - Les Grandes Roches.</i> Origine Bretagne, huîtres mises en claires à réception. Huîtres vivantes.	2/30 animaux présentent un phénomène néoplasique au niveau du tissu conjonctif de la glande digestive.	NF.
94-37	<i>C. gigas</i>	30/03/94	Huîtres moribondes.	2/22 animaux : Idem.	NF.
94-43	<i>C. gigas</i>	01/04/94	<i>Arvert - L'Eguillate.</i> Origine Bretagne - Paimpol. Animaux remis en eau le 28/03/94. Mortalité 15%.	1/24 animaux présente des noyaux anormaux dans les tissus conjonctifs : suspicion d'infection virale.	NF.
94-96	<i>C. gigas</i>	17/05/94	<i>Ile de Ré.</i> Captage 90. Mortalité 67%.	30/30 animaux : RAS, excepté 12 huîtres avec noyaux éosinophiles.	NF.

94-130	<i>C. gigas</i>	27/05/94	<i>Etaules.</i>	30/30 animaux : RAS.	NF.
94-141	<i>C. gigas</i>	31/05/94	<i>Mus de Loup.</i>	-2/30 animaux présentent des noyaux anormaux en anneau au niveau des branchies. - 1/30 animaux présente des ciliés au niveau des branchies. - 1/30 infestation à <i>Mytilicola intestanilis</i> .	NF.
94-177	<i>C. gigas</i>	07/06/94	Captage Bonne Anse.	1/20 animaux présente de rares noyaux anormaux dans les tissus conjonctifs : suspicion d'une infection virale.	NF.
94-179	<i>C. gigas</i>	07/06/94	Aytré. Origine Baie de Quiberon. Animaux transférés le 03/05/94.	20/20 animaux : RAS.	NF.
94-229	<i>C. gigas</i>	16/06/94	<i>Ronce les Bains.</i> Mortalité 15-20%.	15/27 animaux présentent des noyaux anormaux : suspicion d'infection virale.	RAS.
94-287	<i>C. gigas</i>	07/07/94	<i>Mornac.</i>	- 6/30 animaux présentent de très rares noyaux anormaux : suspicion d'infection virale. - 1/30 animaux présente des flagellés au niveau des branchies associés à un phénomène de nécrose.	1 animal présente de nombreux noyaux anormaux, mais pas de particules virales visibles.
12 lots analysés, soit 325 individus analysés.					

III - REPRODUCTION DE L'INFECTION A VIRUS DE TYPE HERPES SUR LARVES AXENIQUES

Des essais de reproduction expérimentale de mortalité ont été entrepris (LE DEUFF *et al.*, 1994), afin de déterminer si le virus (virus de type herpès) détecté en microscopie électronique à transmission sur les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, peut être considéré comme l'agent étiologique des épisodes de mortalité observés en écloséries.

Dans ce but, des larves axéniques (indemnes de contaminations bactériennes) ont été mises en élevage. Elles sont obtenues soit après ponte naturelle et décontamination des animaux par une solution contenant différents antibiotiques, soit par des prélèvements stériles des gamètes sur des géniteurs et fécondation *in vitro* en conditions stériles. Les essais de reproduction de mortalité consistent à inoculer les récipients d'élevage de larves axéniques avec des broyats de larves virosées. Les broyats sont effectués directement à partir de larves fraîches ou à partir de larves conservées au réfrigérateur. Après inoculation des broyats dans les flacons de culture, les animaux sont observés quotidiennement. L'état des larves, ainsi que les mortalités sont enregistrés.

Ainsi, dans les flacons de culture ayant reçu des broyats de larves virosées, il apparaît que dès le deuxième jour, l'ensemble des larves sédimente et présente des lésions du velum. Cependant, au deuxième jour suivant l'inoculation, tous les animaux ayant sédimenté ne sont pas morts. Les résultats sont identiques pour les larves axéniques infectées par un broyat ultrafiltré obtenu à partir de larves fraîches ou à partir d'animaux virosés conservés au congélateur à - 20°C.

Dans le même temps, pour les larves témoins négatifs, ayant reçu un inoculum d'eau de mer filtrée, les mortalités cumulées au sixième jour sont de l'ordre de 3%, alors que pour les larves axéniques inoculées avec un broyat d'animaux virosés, elles sont de 100%.

Les examens effectués en microscopie électronique à transmission sur les échantillons provenant des essais de reproduction expérimentale de mortalité n'ont pas permis de détecter de particules virales de type herpès chez les animaux témoins négatifs. Chez les larves axéniques ayant reçu un inoculum de broyat d'animaux virosés (frais ou conservés congelés), il est possible d'observer des particules virales de type herpès dans le noyau et le cytoplasme de certaines cellules conjonctives au niveau du velum (Figures 1 et 2) et des particules en position extracellulaire.

Ainsi, le virus de type herpès détecté en association à des mortalités chez les larves d'huîtres creuses élevées en éclosérie peut être considéré comme un agent infectieux possédant un pouvoir pathogène évident (possibilité de reproduire des symptômes et des mortalités en 48 heures sur larves axéniques par mise en contact avec du broyat d'animaux virosés).

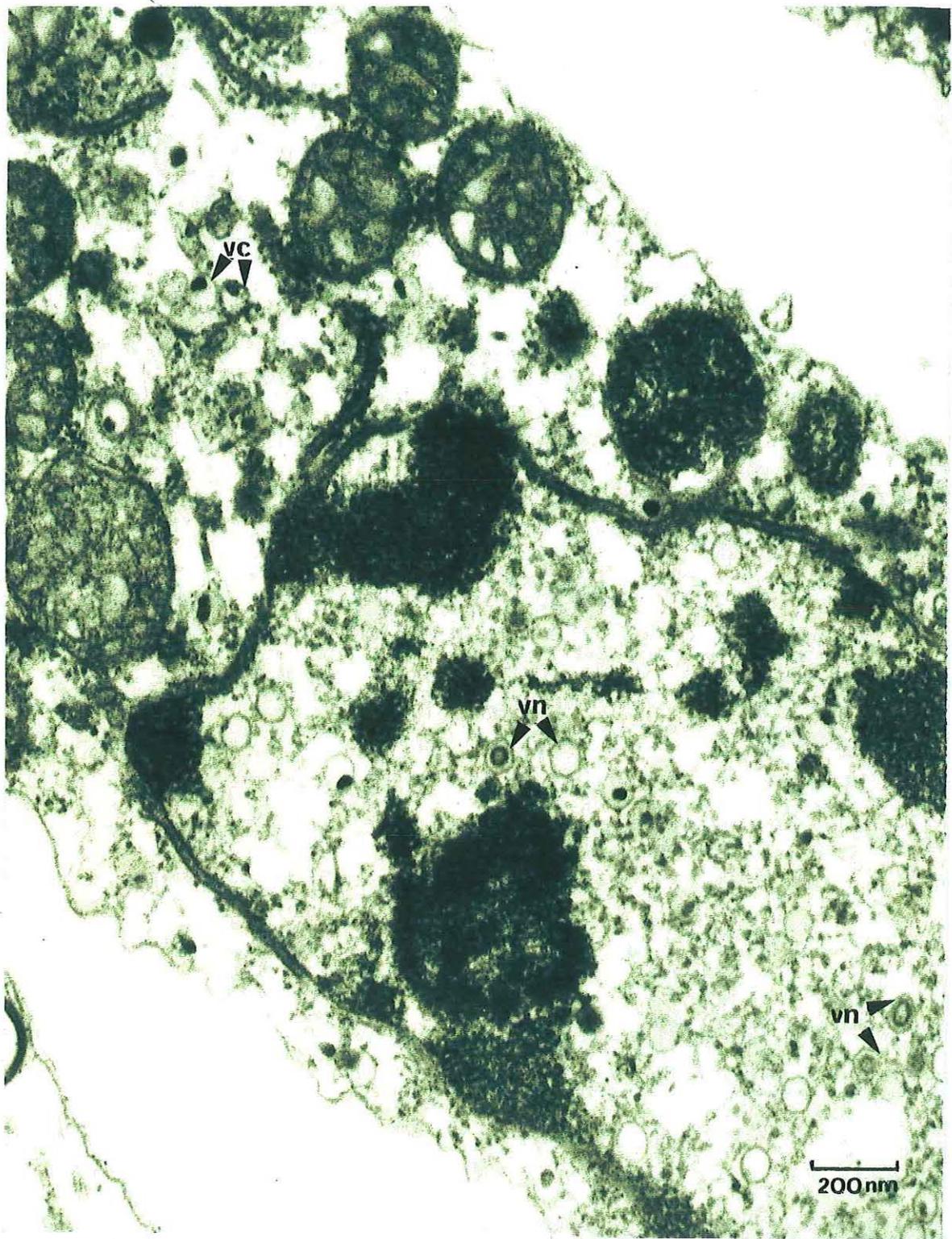


Figure 1 Cliché en microscopie électronique à transmission d'une cellule de larve axénique d'huître creuse, *C. gigas*, infectée par broyat ultrafiltré d'animaux virosés frais : présence de particules virales intranucléaires (vn) et intracytoplasmiques (vc).

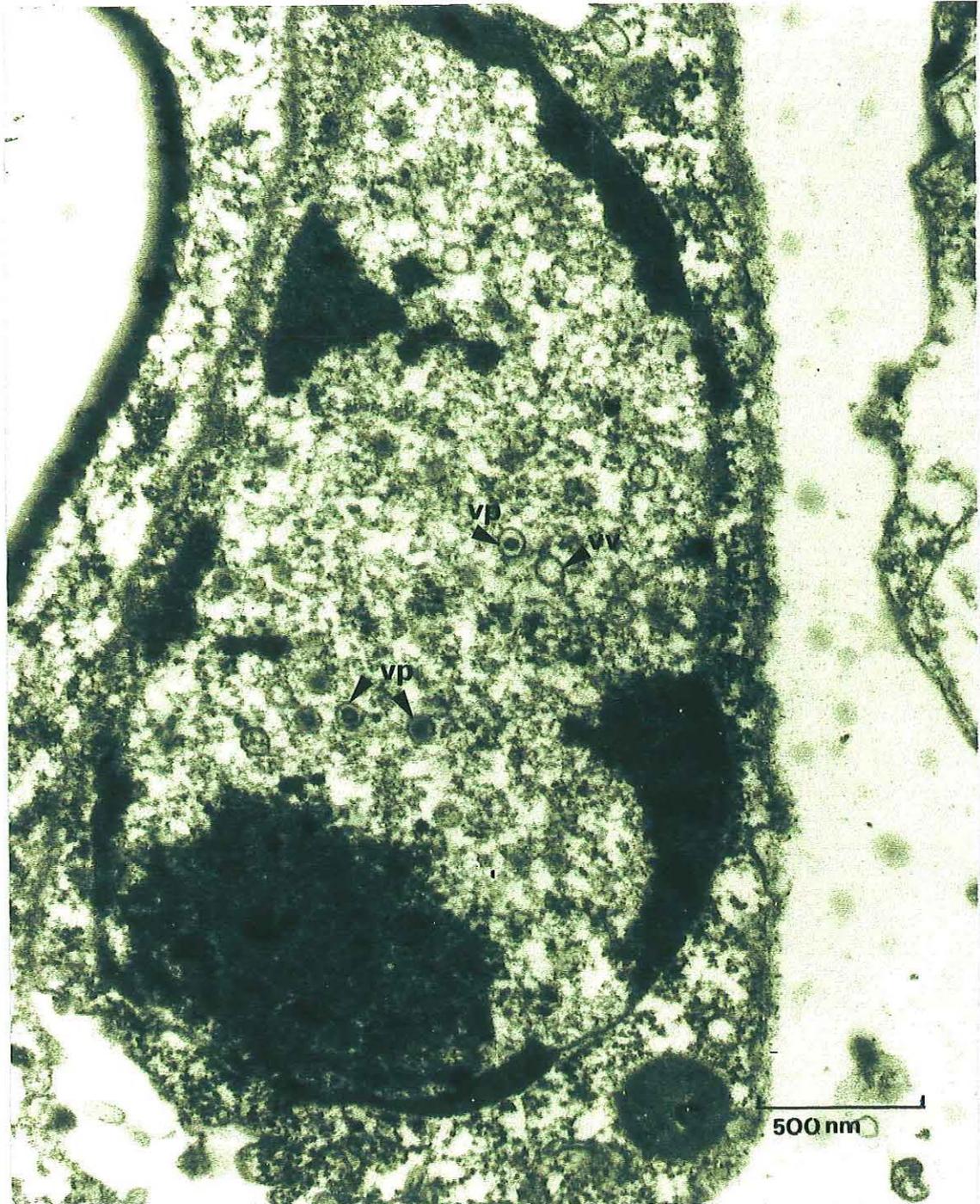


Figure 2 Cliché en microscopie électronique à transmission d'une cellule de larve axénique d'huître creuse, *C. gigas*, infectée par broyat ultrafiltré d'animaux virosés conservés congelés à -20°C : présence dans le noyau de capsides vides (vv) et de capsides pleines (vp).

IV- ESSAIS DE PURIFICATION DU VIRUS DE TYPE HERPES A PARTIR DE LARVES ET DE NAISSAINS INFECTES

Pour les premiers essais réalisés, un protocole de purification du virus a été élaboré à partir de protocoles déjà existants (SEAL and St JEOR, 1988). Une étape préliminaire de décalcification par l'EDTA disodique 5% pendant quatre heures a permis le broyage efficace des larves qui étaient ensuite filtrées sur toiles (250 à 20 μm) avant clarification. Deux gradients de densité successifs étaient ensuite réalisés : sucrose puis chlorure de césium, afin de séparer le virus des composants cellulaires (Figure 3). Un contrôle de chaque étape a été effectué en microscopie électronique à transmission.

Seuls des échantillons faiblement virosés étaient disponibles pour ces premiers essais de purification. En effet, le contrôle en microscopie électronique à transmission effectué sur le broyat initial de larves montre la présence de rares particules virales (Figure 4). Ce qui explique en partie les difficultés d'établir un protocole reproductible de purification. En effet, il a été possible d'obtenir une seule fois sur l'ensemble des essais réalisés, des capsides vides en fin de purification (Figure 5).

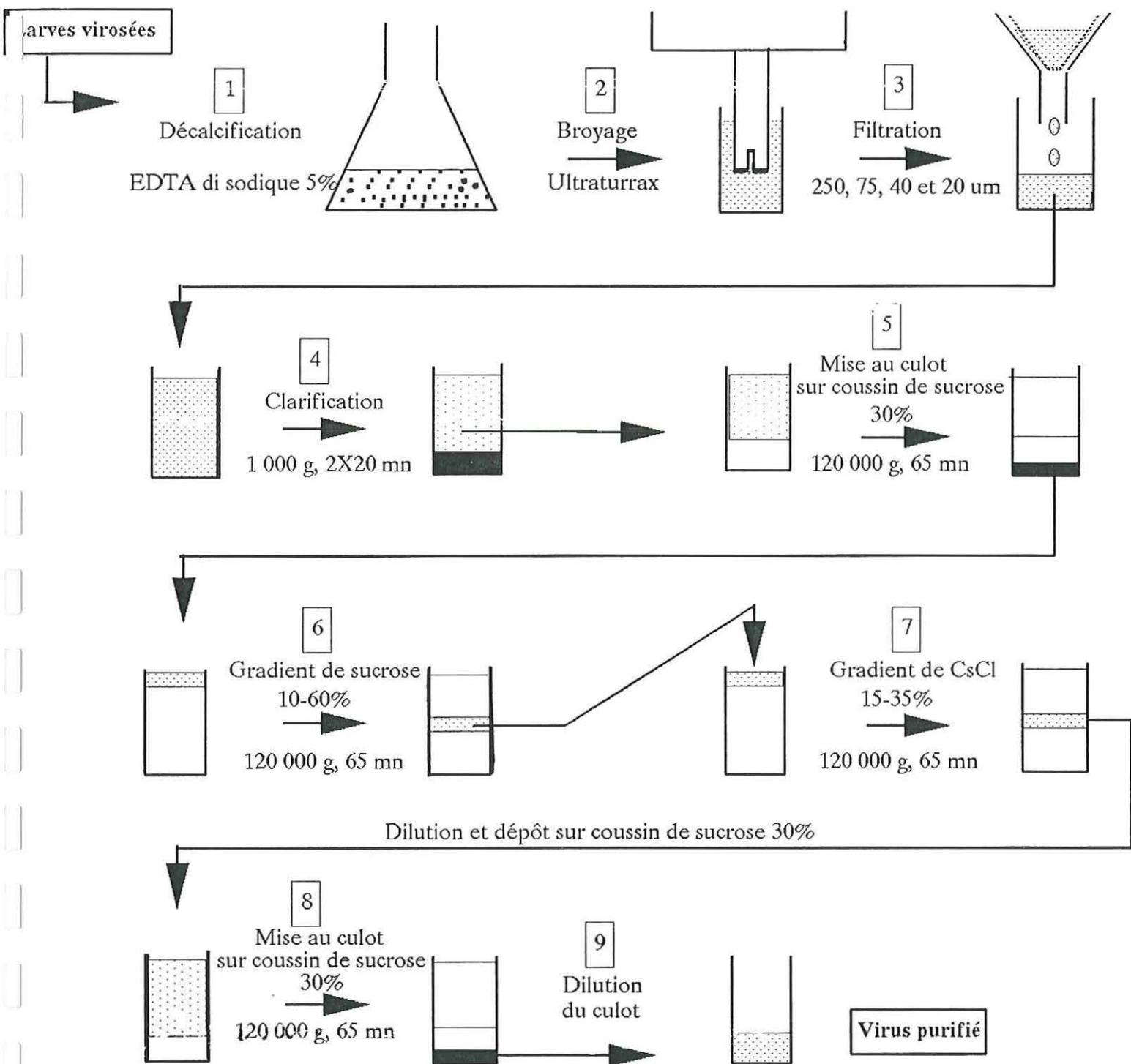
D'autre part, il est possible que l'étape de décalcification préalable par l'EDTA nuise à l'intégrité des capsides. En effet, l'EDTA est un agent chélateur des ions divalents et de ce fait, peut être responsable de la dissociation, même partielle, des capsides. Des essais ont été réalisés sans décalcification préalable par l'EDTA, mais en utilisant du sable de Fontainebleau. Ce sable, très fin, permet un broyage plus efficace des larves car leurs coquilles sont elles même broyées efficacement.

Lors de ces essais, seuls des gradients de sucrose ont été réalisés. En effet, les gradients de chlorure de césium semblent être responsables de la perte des capsides non enveloppées lors de la purification de virus (communication personnelle R.P. HEDRICK et S. CHILMONCZIK). Or, dans les échantillons de larves virosées, selon le stade de l'infection, une grande partie des capsides peut se présenter sous une forme non enveloppée, ce qui peut également expliquer les résultats négatifs des premiers essais de purification.

Malgré ces modifications de protocole, le virus herpes-like de *Crassostrea gigas* n'a pas encore pu être purifié, mais les échantillons initiaux utilisés au cours de ces essais étaient également petits et peu virosés. Les essais de purification du virus à partir de naissain n'ont pas été plus fructueux car, si ces échantillons de départ étaient beaucoup plus importants (100 grammes), ils étaient très peu virosés.

La production de larves virosées en grande quantité devrait permettre d'améliorer ces résultats. A cette fin, une amélioration du protocole d'infection expérimentale des larves est en cours de réalisation. Au vu de la difficulté de reproduire la virose dans des conditions axéniques en grands volumes, des essais sont réalisés afin de contaminer des larves conventionnelles avec des larves axéniques préalablement infectées expérimentalement.

Figure 3 - Protocole testé pour tenter de purifier le virus de type herpès observé chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*



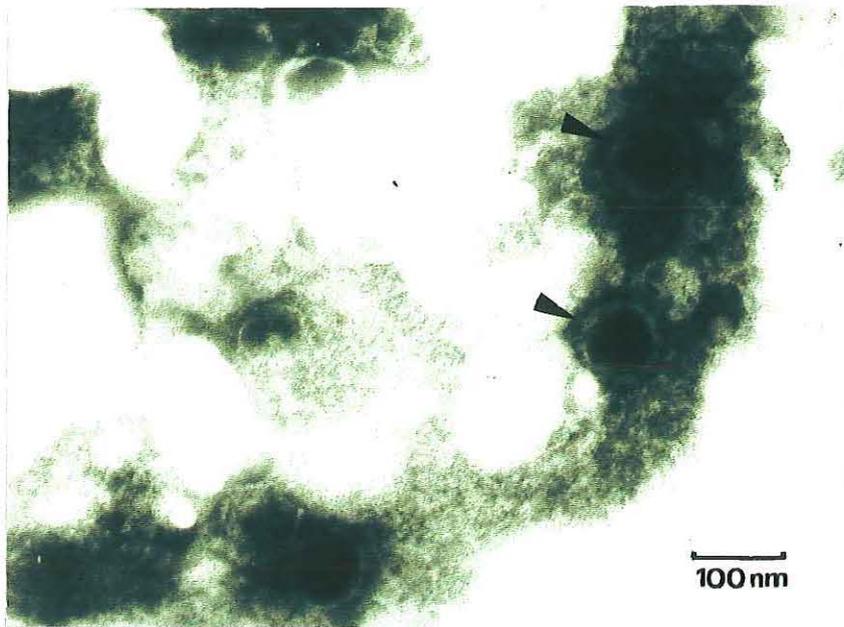


Figure 4 - Essai de purification d'un hepes virus-like de larves d'huître creuse, *C. gigas*. Broyat initial de larves virosées : présence de rares particules virales en microscopie électronique à transmission, coloration négative.

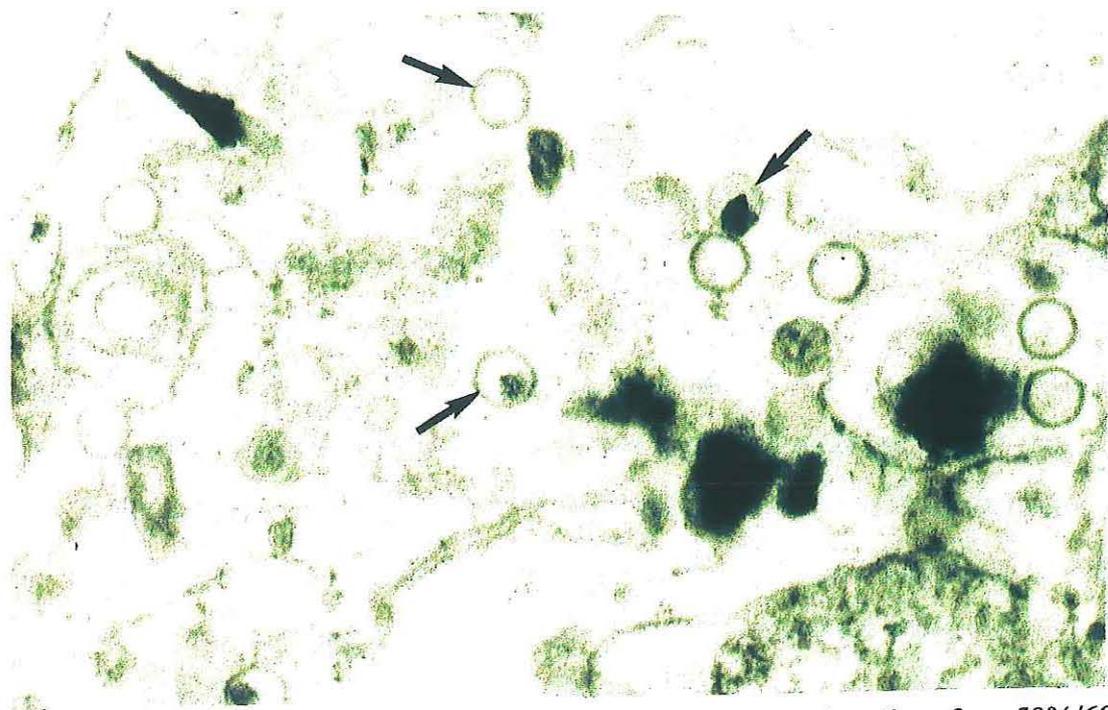


Figure 5 - Fraction enrichie en particules virales après purification (interface 50%/60% du gradient de sucrose).

V - TESTS DE CONDITIONS D'ELEVAGE (TEMPERATURE), ET CONTROLE SUR L'EXPRESSION ET/OU LE DEVELOPPEMENT DE L'INFECTION VIRALE

Différentes descriptions de mortalités, en association avec la présence de virus apparentés à la famille des *Herpesviridae*, ont été réalisées chez différentes espèces d'huîtres : *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* et *Crassostrea virginica*. Ces différents cas de viroses chez les ostréidés ont en commun de s'être produites soit lors de périodes chaudes de l'année (NICOLAS et al, 1992 ; HINE *et al.*, 1992 ; COMPS et COCHENNEC, 1993 ; RENAULT *et al.*, 1994), soit lorsque les animaux étaient élevés en eau chauffée (FARLEY, 1972 ; 1978). C'est pourquoi, il est apparu important de compléter ces observations par quelques expériences permettant de mieux comprendre la transmission de ce virus et les phénomènes de latence qui lui sont associés.

En effet, il est possible de formuler l'hypothèse que la température soit un facteur important dans le développement de l'infection virale du point de vue de la durée du cycle productif, mais aussi, la température peut intervenir dans l'activation d'un virus présent chez les animaux sous une forme latente non exprimée.

D'autre part, l'apparition très précoce des mortalités associées à la détection de l'herpèsvirus-like chez les larves d'écloserie, laisse suspecter une transmission verticale de cet agent par les parents.

Les huîtres utilisées comme géniteurs dans ces expériences étaient originaires de différentes régions de France : Bretagne (rade de Brest), Gironde (Arcachon), Charente-Maritime (Marennes) et des animaux provenant d'Arcachon, élevés à La Tremblade (Charente-Maritime) depuis plusieurs mois. Après prélèvement des gamètes par stripping de la gonade, la fécondation a été réalisée entre mâles et femelles de même provenance.

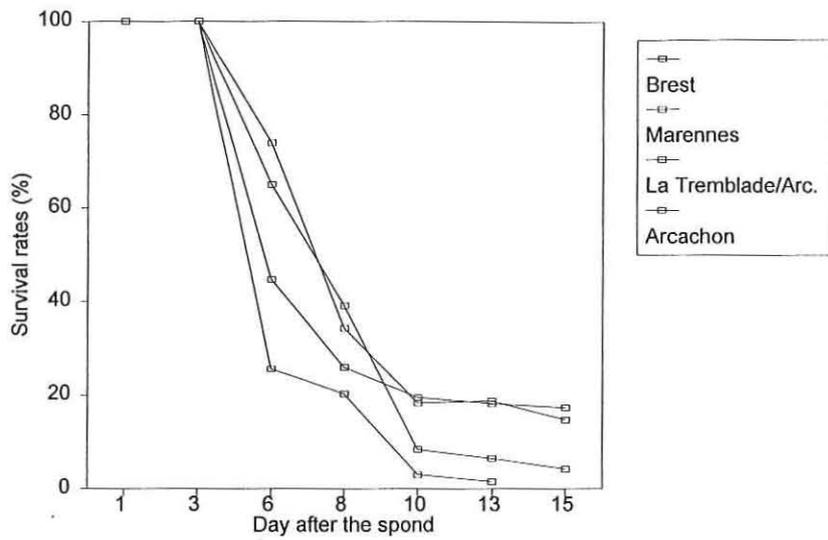
Ces pontes ont ensuite été chacune divisées en deux lots et les élevages larvaires ont été réalisés à deux gammes de température : 22-23°C ou 25-26°C. Les taux de survie ont été relevés régulièrement (Figure 6), et des échantillons de larves ont été fixés tout au long de ces élevages, pour être analysés en microscopie électronique à transmission (MET).

Les analyses effectuées en MET montrent qu'il n'est possible de retrouver des particules virales de type herpès-like que chez les larves élevées à haute température (25-26°C) (Figure 6). Cependant, les larves issues de géniteurs originaires de Bretagne (rade de Brest) ont montré d'excellents taux de survie et il n'a pas été possible, quelles que soient les températures d'élevage (22-23°C ou 25-26°C), de détecter la présence de particules virales de type herpès.

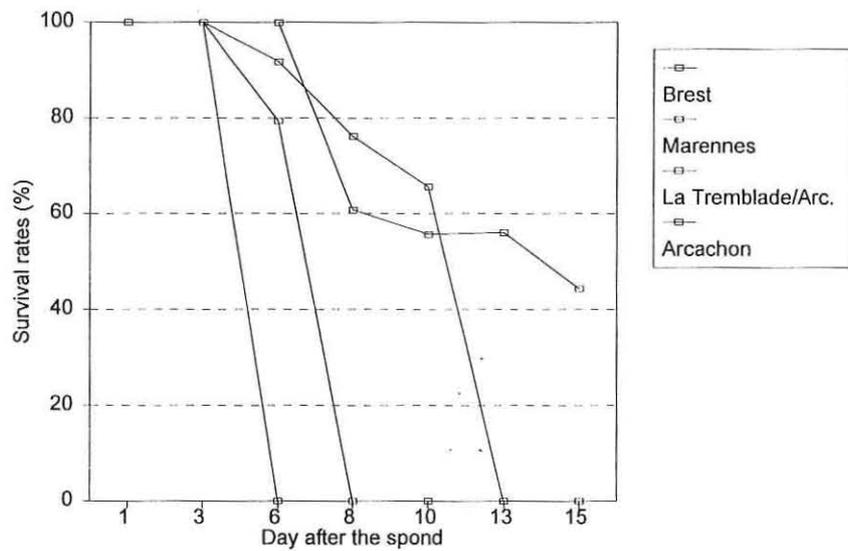
Il est par ailleurs à noter que, quelle que soit l'origine des géniteurs, il a été impossible de déceler la présence de particules virales herpès-like, chez les animaux élevés à de plus faibles températures (22-23°C). Cependant, certains animaux présentaient des anomalies nucléaires comparables à celles observées chez les larves virosées, élevées à 25-26°C. Ces anomalies correspondent à une condensation des noyaux qui apparaissent alors très dense aux électrons, avec des zones arrondies plus claires.

Ces résultats comparatifs de pontes placées à 22-23°C ou à 25-26°C confirment que le virus herpès-like se développe plus facilement à plus haute température (25-26°C), puisque des particules virales n'ont pu être observées que dans ces lots. Une caractéristique similaire a été décrite par FARLEY (1972) lors de mortalités importantes (80%) de *C. virginica* adultes,

Survival rates for 22-23°C breedings



Survival rates for 25-26°C breedings



Origine	Température d'élevage larvaire	Observations en microscopie électronique à transmission :	
		Particules virales	Anomalies nucléaires
Brest	22-23°C	-	-
	25-26°C	-	-
Marennes	22-23°C	-	OUI
	25-26°C	OUI	OUI
Arcachon	22-23°C	-	OUI
	25-26°C	OUI	OUI
La Tremblade/ Arcachon	22-23°C	-	OUI
	25-26°C	OUI	OUI

Figure 6 - Suivi des mortalités en élevage larvaire en fonction des températures et de l'origine des géniteurs - Détection de particules virales de type herpes.

associées à la présence d'un herpès-like virus ont été observées sur des lots placés à 28-30°C, alors que les lots témoins élevés à 12-18°C ont présenté des mortalités de 18%.

Cependant, des anomalies nucléaires ont pu être observées sur les larves élevées à 22-23°C, sans que la présence de particules virales ne soit détectée. Ces anomalies peuvent être interprétées comme le reflet d'une infection virale peu productive et non détectée, ou bien d'une infection virale non productive, c'est à dire pour laquelle il n'y a pas production de particules virales (capsides, nucléocapsides et particules enveloppées). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Ces anomalies peuvent être le résultat de l'expression de protéines virales associées à un véritable stade latent du virus (GARCIA-BLANCO, 1991; MILLER, 1985). Elles peuvent également résulter de l'expression de protéines fonctionnelles ou de structure, en association ou non à la réplication du matériel génétique viral, et qui correspondrait à un cycle abortif dans lequel seulement certaines phases de la réplication virale se déroulent sans que cela n'aboutisse à l'assemblage de particules virales filles (GIRARD et HIRTH, 1989). Ces phénomènes de latence ou de cycle abortif pourraient se traduire par une modification de l'aspect structural du noyau des cellules infectées.

De ce fait, les animaux élevés à plus faible température (22-23°C), bien que négatifs pour la recherche de particules virales en MET, peuvent être infectés par l'herpès-like virus. On peut donc les considérer comme d'éventuels porteurs du virus constituant un réservoir de cet agent, en le transmettant ultérieurement à leur descendance. Il y a donc un réel danger d'effectuer des élevages à basse température (22-23°C). En effet, tout en permettant d'éviter une expression « explosive » de la maladie (limitation des mortalités), il se pourrait que des animaux porteurs asymptomatiques soient produits de cette façon et disséminés.

D'autre part, les animaux issus de tels élevages peuvent développer la maladie plus tard. Ceci est montré par d'autres observations (résultats non montrés) de larves élevées à l'écloserie de La Tremblade à 22-23°C qui ont présenté des mortalités progressives aboutissant 20 jours après la ponte à des taux de survie entre 2,7 et 27,3% selon les lots (il s'agissait d'une même ponte divisée en six lots pour des essais de polyploïdisation réalisés par l'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie). Ces mortalités très progressives n'ont pas attiré l'attention à ce moment et aucun échantillon de larves n'a été fixé. Cependant, un mois et demi après la ponte, des mortalités massives (environ 80% des survivants) ont affecté les jeunes naissains issus de ces lots, élevés à 22-23°C. L'analyse en MET de ces animaux a révélé la présence de particules virales de type herpès.

Ces observations montrent donc le réel danger de réaliser des élevages larvaires à basse température (22-23°C), car si ces température ne permettent pas l'expression massive des particules virales chez les larves et évitent que des mortalités importantes des larves ne se produisent, il n'est pas exclu que les animaux subissent des mortalités plus importantes au stade naissain, comme cela a été le cas pour cet élevage. Et d'autre part, si les naissains survivent, ils seront d'éventuels facteurs de dissémination et de transmission de la maladie.

Comme première conclusion, il semble bien que les deux facteurs, température d'élevage et origine des géniteurs, interviennent sur l'expression de l'herpesvirus-like chez les larves de *C. gigas*. En effet, les températures élevées semblent favoriser l'apparition précoce de particules virales associées à des mortalités importantes, soit en activant le virus qui se trouve en phase de latence à basse température, soit (et) en réduisant la durée du cycle productif, ce qui aboutit à une dissémination très rapide à l'ensemble de l'élevage, et explique les mortalités massives subites.

Par ailleurs, des géniteurs de certaines origines, en particulier ceux provenant de la rade de Brest, donnent des larves qui présentent de bons taux de survie quelle que soit la température d'élevage, et pour lesquels il est impossible de détecter l'herpès-like virus. De ce fait, il semble bien que l'origine des géniteurs joue un rôle non négligeable dans l'apparition des phénomènes de mortalités massives associées à la détection du virus. Ceci laisse suspecter une très probable transmission verticale du virus des géniteurs aux larves soit sous la forme d'un virus latent, soit sous la forme d'un virus en phase très peu productive, ne donnant pas lieu à des mortalités remarquables.

Ces dernières hypothèses, concernant l'état du virus éventuellement transmis à la descendance, semblent être appuyées par d'autres observations. En effet, on peut également rapporter le cas d'autres lots de géniteurs (origine : La Tremblade), mis à maturer à l'écloserie de La Tremblade, dont les larves élevées à 25-26°C ont présenté des mortalités massives en association avec la présence d'herpes-like virus (résultats non montrés). Ces géniteurs eux-même, ont présenté quelques mortalités, de façon non massive mais suspecte. L'analyse en histologie et en MET de ces géniteurs n'a permis de détecter aucune anomalie nucléaire ni la présence de particules virales, même sur les animaux morts ou moribonds, ce qui est en accord avec les hypothèses précédentes.

Il serait intéressant d'approfondir l'effet des conditions de maturation des géniteurs sur le développement éventuel de cette virose chez les larves et le naissain. Il est en effet possible de formuler l'hypothèse que le virus existant sous une forme latente chez les adultes soit activé par un stress (GARCIA-BLANCO, 1991). En effet, les animaux sont généralement placés à plus haute température (22°C) que celle de leur milieu naturel d'origine afin d'accélérer les processus de maturation. Ce changement brutal des conditions d'élevage pourrait être considéré comme un facteur de stress induisant l'activation du virus latent, qui rentre alors en phase de multiplication productive, puis est transmis sous cette forme à la descendance. Ceci se traduirait, chez les larves issues de ces animaux et élevées à haute température (25-26°C) par une multiplication rapide du virus aboutissant à des mortalités massives. Alors que chez les larves élevées à basse température (22-23°C) la réplication virale décline et aboutit à une faible production de virus (non détectable) ou à un cycle viral abortif puis le virus retourne à une phase de latence (GIRARD et HIRTH, 1989). Cependant, d'autres facteurs de stress peuvent être pris en considération, comme par exemple, une densité d'élevage importante, une manipulation des animaux, telle que leur transport, ou une modification de leur alimentation.

Ces hypothèses feront l'objet de travaux ultérieurs qui, en plus d'approfondir la connaissances des mécanismes de transmission du virus et du déclenchement de la maladie, pourraient permettre d'établir un protocole d'élevage évitant la production d'animaux porteurs asymptomatiques de virus et susceptibles soit de présenter plus tard des mortalités importante au stade naissain, soit de transmettre le virus à leur descendance.

Le travail décrit ci-dessus a fait l'objet d'un article soumis à publication à "Diseases of Aquatic Organisms" : R.M. Le Deuff, T. Renault, and A. Gérard , « Thermal effects on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval oyster, *Crassostrea gigas* ».

VI - REFERENCES

- COMPS, M. and COCHENNEC, N., 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. J. Inv. Pathol, 62.
- FARLEY C.A., BANFIELD W.G., KOSNIC JR.G. and FOSTER W.S., 1972 Oyster herpes-type virus. Science, Wash.D.C. 178 : 759-760.
- FARLEY C.A., 1978. Viruses and virus-like lesions in marine molluscs. Mar. Fish. Rev. 40 : 18-20.
- GARCIA-BLANCO M.A. and B.R. CULLEN, 1991. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. Science, 254 : 815-820.
- GIRARD M. and HIRTH, 1989. Différents types d'interactions virus-cellule. In : Virologie moléculaire, chap. 5.1 : 199-207.
- HINE P.M., WESNEY B. and HAY B.E., 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Org. 12(2) : 135-142.
- LE DEUFF R. M., NICOLAS J. L., RENAULT T. AND COCHENNEC N., 1994. Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Fish Pathol., 14 (2), 69-72.
- MILLER G., 1985. Epstein-Barr virus. In : Virology, Eds B.N. Fields, Raven Press, New-York : 563-589.
- NICOLAS J.L., COMPS M. and COCHENNEC N., 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12(1) : 11-13.
- RENAULT T. AND COCHENNEC N., 1995. Chlamydia-like organisms in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, from the French atlantic coast Dis. aqua. Org. In press.
- RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R.-M. and CHOLLET B., 1994. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14(2), 64-66..
- SEAL B.S. and St JEOR S.C., 1988. Purification and characterization of bovine herpesvirus-1 isolates and virus DNA utilizing bovine embryonic lung cells. J. Tiss. Cult. Meth., 11(2) : 57-63.