

Unité Amélioration génétique, Santé animale et Environnement**Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins**

Décembre 2013

Objet	Compte rendu des journées de la surveillance de la santé des mollusques marins 2013
Auteurs	Céline Garcia, Cyrille François, Tristan Renault, Coralie Lupo
Date	12 et 13 novembre 2013
Lieu	Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, La Tremblade (Charente maritime)

1. Introduction

Les 12 et 13 novembre 2013, les journées de la surveillance de la santé des mollusques marins ont rassemblé les acteurs de la santé des mollusques marins (Ifremer, DGAI, DPMA, DDTM, CNC, CRC, laboratoires d'analyses agréés et reconnus, centres techniques).

Les objectifs de cette réunion étaient de :

- faire un bilan des activités 2013 du Laboratoire National de Référence (LNR) des maladies des mollusques marins et des réseaux de laboratoires agréés et reconnus,
- faire un bilan des activités 2013 des réseaux de surveillance (Repamo) et d'observation (RESCO et réseaux de centres techniques) de la santé des mollusques marins,
- échanger sur les évolutions de la surveillance,
- faire le point sur les connaissances actuelles concernant les organismes pathogènes des mollusques marins et leur détection,
- présenter les études réalisées et à venir pour préparer l'évolution de la surveillance.

Cinquante-sept participants étaient présents à cette réunion représentant 35 structures différentes impliquées dans la surveillance (Annexe I).

Chaque sujet abordé a fait l'objet d'un temps d'exposé, puis d'un temps d'échange entre les participants. Les principaux commentaires émis après chaque exposé sont relatés dans ce document.

L'ordre du jour de cette réunion figure en Annexe II.

2. Bilan des activités du LNR et des réseaux de laboratoires 2013

Plusieurs présentations ont été réalisées abordant les points suivants :

- Bilan des activités du LNR en 2013
- Bilan de l'EILA 2012
- Bilan des activités des réseaux de laboratoires en 2012-2013

Les activités 2013 du LNR ont pour but de répondre aux missions définies dans la réglementation nationale et européenne, à savoir :

- 1) animer les réseaux de laboratoires agréés et reconnus,
- 2) réaliser des analyses officielles et confirmer des résultats d'analyses,
- 3) répondre aux demandes d'expertises scientifiques ou techniques du ministère chargé de l'agriculture et des autres ministères intéressés,
- 4) assurer une veille scientifique et technique dans son domaine de compétence
- 5) développer, optimiser et valider des méthodes d'analyse et participer à leur normalisation,
- 6) coopérer avec le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne des maladies des mollusques

Le nombre de laboratoires agréés et reconnus n'a pas évolué en 2013. Le réseau se compose toujours de neuf laboratoires agréés et de cinq laboratoires reconnus. Le LNR a répondu aux différentes demandes des laboratoires en 2013 et concernant la fourniture de matériel, les demandes ne concernent plus uniquement les agents infectieux OsHV-1 et *Vibrio aestuarianus*, mais également différentes souches de bactéries marines et des agents réglementés tels que *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*.

En 2013, le LNR a encore assuré la réalisation des analyses officielles en histologie, en particulier lors de prélèvements pour hausse de mortalité des mollusques marins (soit environ 800 analyses). Ces analyses pourraient en grande partie être prises en charge en 2014 par un réseau de laboratoires agréés en histo-cytopathologie vis-à-vis des maladies des mollusques marins (laboratoires en cours d'agrément lors de la tenue de ces journées).

Le LNR a également été particulièrement impliqué dans les discussions sur l'évolution de la surveillance française des maladies des mollusques marins et également sur l'élaboration de protocoles épidémiologiques en particulier lors de déclarations de hausse de mortalité.

Le LNR est également en attente de la catégorisation des maladies des mollusques marins qui fera suite à la hiérarchisation des maladies ; cette hiérarchisation sera achevée à la fin du premier semestre 2014 et la catégorisation sera réalisée à la suite. En fonction de cette catégorisation des maladies, différentes stratégies de surveillance pourront être mises en place. Ceci pourra impliquer également le développement et le transfert d'outils diagnostiques vers les réseaux de laboratoires agréés.

Un essai interlaboratoire d'aptitude (EILA) a également été organisé en octobre 2012 par le LNR. L'objectif était d'évaluer l'aptitude des laboratoires agréés et reconnus par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAl), à effectuer la recherche de l'herpès virus OsHV-1 et celle de la bactérie *Vibrio aestuarianus* chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par PCR en temps réel. L'ensemble des 14 laboratoires participants a présenté des résultats satisfaisants à

la fois pour la détection du virus OsHV-1 et de la bactérie *Vibrio aestuarianus*. L'analyse des résultats repose uniquement sur les données qualitatives fournies par les laboratoires participants (présence ou absence de l'agent infectieux). Un essai d'interprétation des résultats de manière quantitative a été effectué et s'est révélé non pertinent en raison d'une trop grande variabilité inter et intra-laboratoire. Le LNR suppose que ces variations sont principalement expliquées par une mauvaise homogénéisation de la répartition de l'agent infectieux dans les tissus de l'huître. Des travaux seront réalisés en 2014 pour essayer d'obtenir une répartition plus homogène de l'agent infectieux au sein des tissus broyés.

La discussion qui a suivi a essentiellement porté sur la quantification des agents infectieux. Vu les variations de quantification observées, il est préférable de travailler sur des données qualitatives ou semi-quantitatives même si toutes les analyses d'une étude sont effectuées au sein d'un même laboratoire, car des variations importantes en quantité d'agents infectieux présents sont également observées en intra-laboratoires. Des premiers travaux ont été réalisés pour améliorer la répartition des agents infectieux au sein des tissus analysés, mais ils ne sont pas concluants. Le broyage des tissus en poudre après congélation en azote liquide n'a pas encore été étudié et devrait l'être en 2014, mais dans tous les cas, ce type de broyage n'est pas envisageable pour des analyses de routine vu son coût et sa lourdeur à mettre en place. Différents types de broyage seront comparés en 2014 afin d'essayer d'en trouver un qui pourrait donner des résultats satisfaisants en terme de quantification. Il est cependant important de noter que les agents infectieux concernés (OsHV-1 et *Vibrio aestuarianus*) ne sont naturellement pas répartis de manière homogène dans les tissus des animaux qu'ils infectent.

Chaque laboratoire a ensuite fait un point sur ses activités en 2012-2013 concernant le diagnostic des organismes pathogènes marins. D'une manière générale, le nombre d'analyses officielles par laboratoire est faible (quatre lots analysés par an par laboratoire) ; en revanche, certains laboratoires effectuent un nombre élevé d'analyses à des fins d'autocontrôle alors que d'autres n'en effectuent aucune. Les analyses concernant les auto-contrôles sont généralement accompagnées de peu d'informations concernant l'échantillon à analyser et sont souvent réalisées en poolant plusieurs individus. Le fait de pooler entraîne une diminution non négligeable de la sensibilité de la technique diagnostique (en particulier pour le virus OsHV-1) pouvant augmenter le nombre de faux négatifs. Cette information est importante à signaler aux clients. Certains laboratoires ont exprimé le souhait de disposer de témoins positifs non cibles pour les outils diagnostiques transférés par le LNR.

Les laboratoires ont également signalé qu'ils avaient des demandes pour rechercher le virus OsHV-1 et la bactérie *Vibrio aestuarianus* sur des mollusques autres que l'huître creuse pour de l'autocontrôle. Ces analyses sont possibles, mais le LNR a attiré l'attention des laboratoires sur le fait que le kit d'extraction Qiagen® fréquemment utilisé au sein des laboratoires n'était pas le kit le plus approprié pour réaliser des extractions chez les bivalves fouisseurs en raison de la présence de nombreux inhibiteurs des réactions de PCR chez ces bivalves.

Il a été aussi rappelé aux laboratoires que la recherche de *Vibrio splendidus* ne présentait que peu d'intérêt en raison d'un outil diagnostique insuffisamment spécifique. Des travaux sur le groupe *Vibrio splendidus* sont actuellement en cours au dans le cadre d'une collaboration CNRS-Ifremer pour étudier les espèces bactériennes particulièrement virulentes appartenant au clade *splendidus*. Cependant, actuellement, aucun outil diagnostique n'est disponible pour

caractériser en routine les souches virulentes de *Vibrio splendidus*. En l'absence d'un tel outil transférable et d'interprétation fiable, il est conseillé de ne pas réaliser ce type d'analyse en routine.

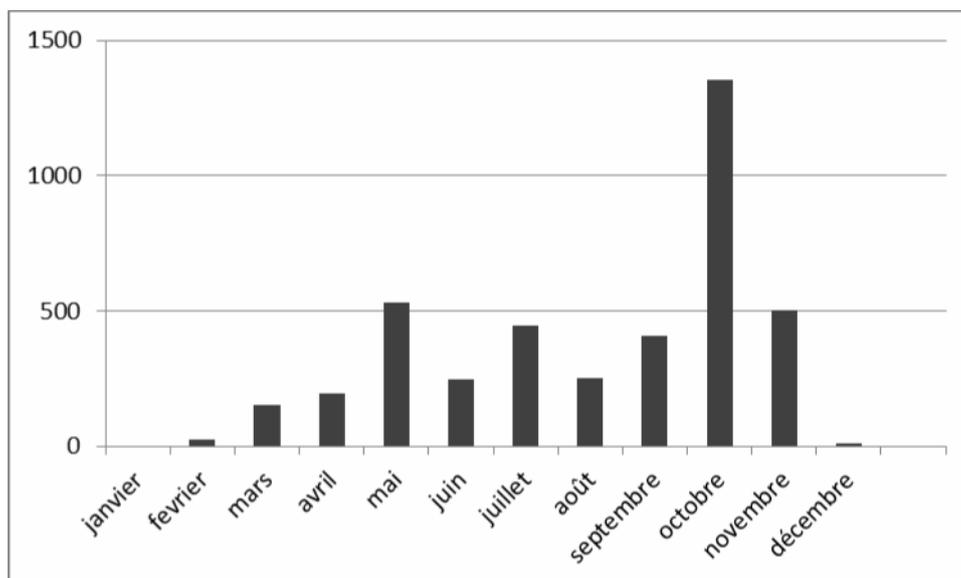
Le LNR avait demandé aux laboratoires de lister les informations accompagnant les demandes d'autocontrôles qu'ils recevaient. Le tableau 1 en fait le résumé pour neuf laboratoires.

Tableau 1. Informations accompagnant généralement les demandes d'autocontrôle reçues par 9 laboratoires

Type d'information	Nombre de laboratoires
Absence d'information	1
Localisation du prélèvement	2
Date du prélèvement	2
Numéro d'identification du lot	3
Nom du propriétaire du lot	1
Etat de santé des animaux (contexte de mortalité ou pas)	4
Classe d'âge des animaux	5
Taille des animaux	3
Ploïdie des animaux	1
Animaux issus de captage/écloserie	1

En 2013, les laboratoires du réseau ont réalisé en moyenne 657 analyses d'autocontrôles et quatre d'entre eux n'en ont réalisé aucune. Le nombre d'analyses médian était de 338, le nombre minimum de 56 et le nombre maximum de 2027 (données disponibles pour 13 laboratoires). La répartition du nombre d'analyses d'autocontrôles au cours de l'année est présentée dans la Figure 1.

Figure 1. Répartition annuelle du nombre d'analyses d'autocontrôles réalisées par le réseau de laboratoires agréés et reconnus pour la recherche d'OsHV-1 et de *Vibrio aestuarianus* pour les huîtres creuses, 2013 (N= 7 laboratoires)



Quatre laboratoires sur sept ont reçu des demandes d'analyses concernant la recherche d'autres organismes pathogènes (*Vibrio splendidus* et/ou *Vibrio harveyi*). Cinq laboratoires sur sept ont reçu des demandes d'analyses concernant d'autres espèces que l'huître creuse, dont notamment la palourde (quatre laboratoires).

Il a également été demandé aux représentants des organisations professionnelles quels étaient leurs objectifs lorsqu'ils demandaient des analyses dans le cadre d'autocontrôles. Leur objectif principal est d'estimer la qualité de leur semis et ainsi de pouvoir négocier les prix. La notion de bassin indemne vis-à-vis d'OsHV-1 ou *Vibrio aestuarianus* a également été abordée et comparée à ce qui existe en pisciculture. Actuellement, l'existence de zone indemne vis à vis de ces agents infectieux est inconnue car aucun plan de surveillance concernant ces agents n'a été mis en place ; la DGAI souligne le fait qu'il est difficile de comparer la conchyliculture à la pisciculture du fait des nombreux mouvements d'animaux existant en conchyliculture et qu'en pisciculture la notion de bassin versant est importante avec des statuts pouvant être différents en amont et aval d'un cours d'eau. Cependant, une étude visant à déterminer les statuts des différentes zones de production pourrait être envisagée, mais elle serait coûteuse et probablement contraignante pour la profession conchylicole (restriction des transferts de coquillages).

Des questions ont également concerné l'intérêt de la quantification des agents infectieux. En effet, actuellement, la demande de la DGAI est de déterminer la présence ou l'absence d'un agent infectieux chez les mollusques marins. Ce type de demande est souvent appliqué pour la majorité des productions animales et il est rare qu'un seuil de quantification soit déterminé pour la recherche d'un agent infectieux dans les autres productions animales. Actuellement, la DGAI n'a besoin uniquement que de réponses qualitatives mais si le LNR montre un intérêt à prendre en compte les résultats quantitatifs, cette position pourra évoluer.

La quantification semble cependant être intéressante, car elle peut permettre :

- d'apprécier de manière relative si l'infection est avérée ou s'il s'agit plutôt d'un portage,
- de déterminer une fenêtre à risque pour les mortalités d'huîtres creuses,
- de mettre éventuellement en place des mesures de gestion.

En 2013, les résultats obtenus n'ont pas été exploités pour la mise en place de mesure de gestion comme cela avait été en partie le cas en 2012 suite à la demande de la profession. La question de l'intérêt des analyses quantitatives se pose réellement, surtout si aucune mesure de gestion n'est mise en place. De plus, dans le cas d'analyses quantitatives, des travaux complémentaires devraient être réalisés pour la définition de seuils de quantification d'intérêt.

Il peut cependant être plus intéressant d'avoir un outil diagnostique très sensible plutôt que d'avoir une quantification de l'agent infectieux afin de réaliser une détection précoce et prendre des mesures adéquates. La détection pourrait être également accompagnée de méthodes complémentaires telles qu'une épreuve thermique développée par l'Ifremer ayant pour objectif de favoriser la détection d'OsHV-1 chez des animaux asymptomatiques.

Cependant, l'outil diagnostique seul ne suffit pas même s'il est très sensible. Il est également important de prendre en compte le nombre d'individus à analyser, nombre qui dépend de l'objectif fixé (ex : dépistage, confirmation d'une suspicion...).

Au vu des discussions, de nombreuses questions restent à résoudre sur la quantification des agents infectieux (détermination d'une méthode efficace d'homogénéisation, seuil de quantification..). Considérant que la quantification de l'agent infectieux n'est pas une demande de la DGAI, il est recommandé pour 2014 de ne pas la réaliser dans le cadre des analyses officielles et de ne pas la mentionner dans les rapports d'essai.

3. Bilan des activités 2013 des réseaux de surveillance et d'observation de la santé des mollusques marins

Plusieurs présentations ont été réalisées abordant les points suivants :

- Bilan des activités 2013 du réseau Repamo
- Bilan des activités 2013 du réseau RESCO
- Bilan des activités 2013 des réseaux sentinelles des centres techniques

La surveillance mise en œuvre par le réseau Repamo et ses partenaires a pour finalité première de détecter un signal, déclencheur d'une action publique réalisée par la DGAI et les DDTM avec l'adoption de mesures de lutte appropriées.

En 2013, 52 interventions Repamo ont été menées dans la majorité des bassins conchylicoles, principalement de mai à septembre, avec la réalisation de prélèvements d'échantillons pour analyses. Aucun agent infectieux réglementé n'a été détecté dans les échantillons prélevés et analysés excepté dans un lot de palourdes où le parasite *Perkinsus olseni* (enzootique en France) a été détecté. Des agents enzootiques non réglementés, OsHV-1 et *Vibrio aestuarianus*, ont été fréquemment détectés chez les huîtres creuses et il est à noter que cette année, comme observé en 2012, des mortalités d'huîtres creuses adultes ont été associées à la détection de la bactérie *Vibrio aestuarianus*. La majorité des analyses en biologie moléculaire est réalisée par le réseau de laboratoires agréés. Le coordonnateur du réseau Repamo s'attache à solliciter l'ensemble des laboratoires agréés pour la réalisation d'analyses officielles sur les échantillons prélevés dans le cadre de l'exercice de Repamo. Le coordonnateur diffuse également régulièrement des bulletins d'information concernant les prélèvements réalisés et les résultats d'analyses associés.

Le réseau d'observations conchylicoles RESCO assure, depuis 2009, le suivi de lots sentinelles d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, sur des sites ateliers disposés sur l'ensemble du littoral français. Leur suivi permet d'acquérir des données nationales de croissance et de mortalité, de traduire la dynamique spatio-temporelle des performances d'élevage et ainsi de participer à la compréhension des phénomènes observés. En parallèle des suivis de croissance et de mortalité, des données associées à la présence d'agents infectieux dans ces huîtres, ainsi que des variables environnementales sont acquises. En 2013, les taux de mortalité observés sont de l'ordre de 11% pour les huîtres de 18 mois et de 72% pour le naissain. Cependant, des variations inter-lots et inter-sites sont observées. Le réseau RESCO va également évoluer dans les années à venir et s'orienter en particulier vers une caractérisation des écosystèmes conchylicoles avec notamment la volonté de développer des marqueurs moléculaires « clefs » pour suivre l'évolution du statut physiologique de l'huître en lien avec l'environnement.

Avec l'apparition des mortalités estivales touchant le naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, les acteurs locaux que sont les centres techniques ont mis en place dans leurs régions respectives des actions visant à étudier des solutions de sortie de crise. Dans ce cadre, des

suivis des agents pathogènes incriminés (OsHV-1, *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*) ont été mis en place. Les centres techniques ont identifié qu'il y avait un intérêt à mutualiser leurs informations et de mettre en place une collaboration visant à mener en inter régional des suivis d'animaux déployés sur des sites spécifiques (i.e. sentinelles). Ces suivis pendant et hors période de mortalités permettent de décrire et d'aider à comprendre l'écologie des agents infectieux, la variabilité de leur distribution dans le temps et l'espace, d'aider à comprendre la relation entre agents infectieux et la mortalité et visent à apporter à la profession un outil de compréhension du phénomène par des éléments d'évaluation pertinents.

Les réseaux sentinelles des centres techniques et le réseau RESCO reposent sur les mêmes objectifs et une approche commune : suivre des animaux sentinelles pour caractériser des sites géographiques selon des critères environnementaux et de niveau d'infection par des agents infectieux d'intérêt actuellement présents en France. Une mutualisation de leur effort pourrait être intéressante afin d'avoir une meilleure représentativité ou une meilleure couverture par secteur. Cependant, les centres techniques sont des acteurs locaux et leurs réseaux ont été mis en place pour répondre à une demande locale de la profession afin de disposer d'un niveau de référence local. Les centres techniques n'ont pas vocation à faire perdurer des réseaux notamment en raison des coûts qu'engendre leur fonctionnement.

Leurs objectifs pour les années à venir pourraient être d'améliorer la connaissance de l'écologie des agents infectieux et plus particulièrement des vibrions et d'aider à la détection de l'émergence de nouveaux agents. Cette veille reposerait sur le suivi d'agents infectieux, mais il pourrait être également intéressant de réaliser un suivi incluant les pratiques d'élevage en demandant à des professionnels de suivre des lots sentinelles qui auraient le même parcours zootechnique que les lots professionnels. Un tel suivi, pour l'instant, semble difficile à envisager en raison de la grande disparité des pratiques d'élevage qui sont difficilement comparables, ce qui nécessiterait un grand nombre de lots sentinelles à suivre, et de l'effort à réaliser pour suivre un même lot du captage jusqu'à sa commercialisation.

Des questions concernant la détection de *Vibrio aestuarianus* sur des lots de naissain ont été évoquées, car ses détections n'ont pas été associées à des mortalités de naissain. Ces observations concordent avec les observations expérimentales : le naissain d'huître creuse semble moins sensible à *Vibrio aestuarianus* en conditions expérimentales que les huîtres creuses adultes. Ces détections sur du naissain d'huîtres creuses peuvent être une indication de la circulation de cette bactérie dans le milieu.

4. Evolution de la surveillance

Plusieurs présentations ont été réalisées abordant les points suivants :

- Organisation de la nouvelle gouvernance du sanitaire
- Réflexions sur les perspectives d'évolution de la surveillance épidémiologique en santé des mollusques marins
- Evolution du réseau de laboratoires

Les trois grands principes de la nouvelle gouvernance sanitaire dégagés à la suite des états généraux du sanitaire ont été présentés. Le premier est de qualifier et prioriser les dangers (dangers de catégorie 1 : intérêt général, dangers de catégorie 2 : intérêt collectif, dangers de

catégorie 3 : intérêt privé). Cette catégorisation aura lieu durant le second semestre 2014 à la suite de la hiérarchisation des maladies de mollusques marins réalisées par l'Anses.

Le second est de renforcer la concertation au niveau national via le CNOPSAV (comité national d'orientation de la politique sanitaire animale et végétale) et au niveau régional via les CROPSAV (comités régionaux d'orientation de la politique sanitaire animale et végétale). Le dernier est de mutualiser les compétences et la reconnaissance de structures opérationnelles au service de l'état et des filières professionnelles (OVS : organismes à vocation sanitaire, OVVT : organisations vétérinaires à vocation technique, ASR : association sanitaire régionale).

La discussion a porté sur la mise en place des OSV en santé animale. Un appel à candidature a été réalisé, mais la soumission des dossiers n'est pas achevée car certaines régions n'ont pas encore répondu à cet appel d'offre. Pour de nombreuses régions, les groupements de défense sanitaire (GDS) sont souvent pressentis, mais ce n'est pas le cas partout.

L'évolution de la surveillance des maladies des mollusques marins a été présentée. L'objectif de cette surveillance est la détection précoce des maladies exotiques (introduction) ou nouvelles (émergence). La mise en place de cet objectif reposera sur une surveillance événementielle basée sur la recherche d'anomalies spatio-temporelles de la répartition des déclarations de hausse de mortalité et sur une surveillance planifiée ciblant des zones où le risque d'introduction de maladie est élevé afin de maximiser les chances de détection.

Les représentants professionnels s'interrogent sur l'origine de ces émergences (OsHV-1 μ Var, *Vibrio aestuarianus*...) et en particulier sur la raison de l'expression de ces agents actuellement. Ils sont notamment plus intéressés par la surveillance de l'évolution de l'environnement que par la surveillance des maladies des mollusques. Cependant, les deux sont intéressants à surveiller, car ils sont dépendants l'un de l'autre. Des travaux au sein de l'Ifremer sont en cours pour comprendre les phénomènes de mortalités et notamment le rôle de l'environnement sur ces phénomènes. Il a été rappelé également qu'il est important de prévenir l'introduction ou l'émergence d'une maladie, car une fois que la maladie est installée, peu de moyens de lutte ou de maîtrise sont disponibles. Une maîtrise du risque zoonositaire ne pourra être effective que si elle est réalisée de façon complémentaire au niveau de l'animal et de l'environnement.

Un autre point a été soulevé concernant la gestion des informations collectées. Différents systèmes existent actuellement pour la déclaration des mortalités (SMS, fiche allégée de déclaration via internet...), mais il serait intéressant d'avoir une centralisation de ces informations afin de pouvoir les analyser et de mettre en place des mesures adéquates. Actuellement, rien n'est mis en place au niveau national.

La dernière présentation de cette session consistait à présenter le futur réseau de laboratoires agréés en histo-cytopathologie. Actuellement toutes les analyses en histo-cytopathologie sont réalisées par le LNR. Avec la mise en place de ce réseau, le LNR diminuera son implication dans les analyses de première intention. Un appel d'offre a été diffusé en août 2013 et a été clôturé fin septembre. Trois laboratoires ont répondu à cet appel, mais seuls deux ont été retenus. Avant d'être agréés, ces laboratoires devront suivre une formation organisée par le LNR et réussir un EILA. La mise en place de ce réseau devrait avoir lieu au cours du premier semestre 2014.

5. Connaissance actuelle sur les organismes pathogènes et leur détection

Plusieurs présentations ont été réalisées abordant les points suivants :

- Etude de la diversité du virus OsHV-1 au travers de l'analyse d'échantillons collectés dans différentes régions du monde
- *Vibrio aestuarianus* et les huîtres creuses : émergence ou ré-émergence ?
- *Vibrio aestuarianus* et les coques
- Mortalité de fousseurs en France et en Europe
- Comparaison des analyses individuelles versus analyses en pool pour la détection d'OsHV-1 et *Vibrio aestuarianus* par PCR en temps réel lors de hausse de mortalité
- Comparaison de kits d'extraction d'ADN chez les bivalves fousseurs

Différents échantillons d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, collectés entre 1993 et 2013 principalement en France mais également, dans différents pays européens et dans des pays tiers (Brésil, Chine, Corée, Japon, Mexique, USA et Nouvelle Zélande) ont fait l'objet d'analyses moléculaires afin de mieux définir la diversité génétique du virus OsHV-1. Des premiers résultats montrent l'existence de deux groupes majoritaires. Le premier groupe est composé d'échantillons français prélevés de 1993 à 2008 comme des échantillons des USA. Le second groupe contient certains échantillons collectés en France en 2008 et l'ensemble des échantillons français de 2009 et 2013 (échantillons identifiés comme étant le variant μ Var). Des travaux récents montrent également que les spécimens collectés en Nouvelle Zélande sont proches du variant μ Var, mais ne sont cependant pas identiques à ce variant. La discussion a porté sur ces analyses et notamment si les méthodes de caractérisation utilisées étaient réalisées systématiquement sur tous les échantillons reçus par le LNR et si elles pouvaient être réalisées en routine. Il est intéressant de réaliser cette approche sur un grand nombre d'échantillons afin de mieux caractériser l'espèce virale et cette approche peut permettre de déceler des génotypes émergents comme ce fut le cas avec le génotype μ Var. Cette approche n'est cependant pas facilement réalisable en routine mais une autre technique, le génotypage, en cours de développement, pourrait être transférable. Le génotypage est un outil très utilisé en génétique et est notamment employé dans des programmes de sélection. Son coût est raisonnable et c'est un outil qui semblerait très sensible. Un travail de validation de cet outil doit être cependant réalisé avant un éventuel transfert, mais il permettrait une caractérisation rapide et simple de la diversité du virus OsHV-1 en comparaison à la PCR en temps réel.

Des questions ont concerné la dispersion du virus OsHV-1 et notamment si sa dispersion était liée à la dispersion de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Il n'est pas possible de répondre à cette question bien que ce virus ait une longue histoire avec les coquillages. L'huître creuse n'est pas le seul hôte de ce virus, il a été détecté chez d'autres mollusques bivalves mais l'hôte originel est inconnu. Nous ne disposons pas actuellement de suffisamment d'informations pour permettre une analyse complète vis-à-vis de l'origine de ce virus. Des travaux sont en cours sur des données moléculaires.

Vibrio aestuarianus est une bactérie marine qui a été isolée en Amérique du Nord, en Europe et en Asie où elle provoque des mortalités dans des élevages de poissons. Les souches isolées d'huîtres creuses ou de leur environnement pendant les mortalités estivales montrent peu de diversité génétique. Cependant, l'espèce *Vibrio aestuarianus* comprend des souches avec des degrés de virulence variables. Les observations en 2012 de mortalités d'huîtres creuses

adultes associées à la détection de cette bactérie ont soulevé un certain nombre de questions dont une concernant l'émergence d'une nouvelle souche ou la réémergence d'une souche déjà connue. Des essais réalisés par injections expérimentales ne semblent pas indiquer une virulence accrue des isolats 2012 comparés aux années précédentes. D'un point de vue moléculaire, deux groupes peuvent être distingués au sein de cette espèce bactérienne, mais chacun de ces groupes contient des isolats de différentes années.

Les discussions ont porté sur la distinction de ces deux groupes. La PCR en temps réel développée pour détecter cette bactérie permet de détecter les espèces bactériennes quel que soit leur groupe d'appartenance. Ces deux groupes se distinguent d'un point de vue moléculaire uniquement sur quelques gènes et ces groupes peuvent être retrouvés dans un même lot d'animaux, mais on ignore s'ils peuvent être retrouvés au sein d'un même animal. Pour l'instant, les différences de virulence entre ces groupes ne sont pas connues, mais elles vont être étudiées prochainement. L'étude de cette virulence ne sera pas basée sur la présence ou non de la métalloprotéase ; en effet, la métalloprotéase est l'un des facteurs de virulence connus à ce jour, mais son absence ne signifie pas que la souche n'est pas virulente. La comparaison des souches des différents groupes se fera préférentiellement par des infections expérimentales.

Les mortalités d'adultes observées ne semblent pas liées à l'émergence d'une nouvelle souche de *Vibrio aestuarianus* ; d'autres hypothèses ont été avancées telle qu'une sensibilité plus importante des huîtres creuses ; ces autres hypothèses sont en cours d'étude.

En 2012, des mortalités importantes de coques, *Cerastoderma edule*, ont été signalées en baie de Somme. Des bactéries appartenant à l'espèce *Vibrio aestuarianus* ont été isolées de coques moribondes. Il s'agit d'une première détection de cette bactérie chez des coques en France. Ces souches présentent des différences phénotypiques importantes par rapport à celles isolées chez les huîtres creuses. Des infections expérimentales ont été réalisées avec ces souches chez les huîtres creuses et chez les coques. Elles n'induisent aucune mortalité chez les huîtres creuses, mais en revanche, elles induisent des mortalités chez les coques ; les souches isolées semblent donc spécifiques d'espèce. Des études complémentaires seront réalisées afin d'identifier les différences entre les souches isolées chez les coques et chez les huîtres et également afin de mieux comprendre la spécificité des différents couples *Vibrio aestuarianus* / mollusques.

Ces dernières années, des épisodes de mortalités massives de bivalves fouisseurs ont été rapportés en Europe et en France associées à la détection de différents agents infectieux tels qu'un parasite du genre *Mikrocytos* chez les flions tronqués et les palourdes ou *Marteilia conchilla* chez des coques. La propagation de ces agents infectieux peut sembler limitée du fait que ces bivalves sont peu transférés à des fins d'aquaculture ; en revanche, ils le sont beaucoup plus pour la consommation humaine. Ces bivalves sont des espèces importantes dans l'écosystème et peuvent offrir une alternative ou un complément intéressant pour les ostréiculteurs.

Les discussions ont porté sur la surveillance mise en place vis-à-vis de ces mollusques bivalves. Il n'existe pas une surveillance « type » au niveau européen, mais chaque pays européen met en place la surveillance la plus adaptée à ses besoins. En France, la surveillance de ces espèces de coquillages suit les mêmes principes que celles des huîtres creuses ou des

moules. Lors d'observation de hausse de mortalité chez ces bivalves, la même procédure s'applique, à savoir une déclaration de ces mortalités auprès des DDTM concernées.

Une étude a été mise en place pour comparer en terme de sensibilité des analyses réalisées en PCR en temps réel sur des individus et sur des pools d'individus vis-à-vis de la détection du virus OsHV-1 et de la bactérie *Vibrio aestuarianus* dans le cadre de prélèvement pour hausse de mortalité. L'objectif est de pouvoir réduire la quantité d'analyses à effectuer en gardant une sensibilité diagnostique satisfaisante. Les lots étudiés sont des lots prélevés pour hausse de mortalité au cours de l'année 2012. Les premiers résultats indiquent une sensibilité relativement équivalente des analyses par pool de 3 individus à celle des analyses en individuel pour la détection de *Vibrio aestuarianus* mais une diminution importante de cette sensibilité diagnostique lorsque des analyses par pool de trois individus sont réalisées pour rechercher OsHV-1.

Ainsi, les analyses par pool semblent appropriées lorsqu'un diagnostic veut être posé suite à une suspicion de la présence d'un de ces agents infectieux (lors de hausse de mortalité en particulier). En revanche, lors de dépistage, elles ne sont pas recommandées car l'effet de dilution peut produire des résultats faux négatifs. Au vu des premiers résultats obtenus, il est préférable dans ce cas de réaliser des analyses en individuel.

Les analyses en biologie moléculaire pour rechercher des agents infectieux chez les bivalves fouisseurs posent de nombreuses questions en raison notamment de la présence d'inhibiteurs de PCR chez ces bivalves. Une étude a été réalisée avec pour objectif de rechercher un kit ou une méthode d'extraction permettant de s'affranchir au maximum des inhibiteurs de PCR et que cette méthode soit transférable à des laboratoires. Il en ressort que selon l'espèce de bivalve et l'organe ciblé, certains kits sont à privilégier par rapport à d'autres. Avant d'émettre des recommandations, la reproductibilité des résultats obtenus devra être testée et il serait également intéressant de développer un témoin positif non cible pour lors de la réalisation d'analyses en biologie moléculaire chez ces bivalves.

6. Etudes pour préparer l'évolution de la surveillance

Un point a été fait sur des études réalisées ou à venir permettant de préparer la mise en place de la nouvelle surveillance envisagée.

Une première étude a été menée en Charente-Maritime afin d'évaluer les pratiques et les comportements de déclaration des ostréiculteurs lors de hausse de mortalité et d'identifier les facteurs influençant le processus de déclaration. L'objectif de cette étude est d'améliorer la détection précoce des épisodes de mortalité d'huîtres creuses. Les procédures de notification sont assez bien connues par les ostréiculteurs et le système de notification est globalement bien accepté. Néanmoins, un manque de prise de conscience des objectifs du système déclaratif a été révélé, contribuant ainsi à des déclarations tardives par rapport aux observations des mortalités. Il sera important d'informer et de collaborer avec les professionnels afin de changer certaines attitudes pour améliorer la détection précoce des épizooties et maladies émergentes ou exotiques des mollusques.

En 2014, la nouvelle surveillance des maladies des mollusques marins va progressivement se mettre en place. 2014 sera une année de transition avec notamment un recentrage des activités de surveillance animées par le réseau Repamo autour de la détection précoce et une

intégration progressivement d'autres acteurs dans la surveillance de la santé des mollusques marins. Concernant la surveillance événementielle (hausse de mortalité), la procédure reste identique aux années précédentes. Cependant, une étude de faisabilité sur un ou deux sites atelier (Charente-Maritime et éventuellement Normandie) va être réalisée sur les mortalités d'huîtres creuses afin de comparer deux approches : l'approche classique de déclaration des mortalités et celle avec une intervention ciblée sur les anomalies spatio-temporelles détectées. En parallèle, un travail sera effectué sur la méthodologie d'enquête épidémiologique à mettre en œuvre lors d'une suspicion ou confirmation d'une maladie exotique ou enzootique affectant des coquillages marins. L'objectif est de rechercher les coquillages éventuellement commercialisés dans d'autres exploitations et de déterminer l'origine probable de l'infection. Concernant la surveillance planifiée, une première étude visant le développement d'une méthodologie d'évaluation spatiale et temporelle des risques d'introduction et d'installation d'un agent infectieux exotique sera réalisée. Elle portera sur l'agent réglementé *Mikrocytos mackini* et sera appliquée à un site atelier (Charente-Maritime).

Un point sur le programme de travail 2014 du LNR a également été réalisé. Il s'en dégage plusieurs axes de travail :

- l'organisation des prochains EILA en 2014 avec la mise en place entre autre d'un nouveau réseau de laboratoires agréés en histo-cytopathologie,
- la poursuite des essais de développement de témoins positifs non cible,
- la comparaison de différentes techniques de broyage pour obtenir une meilleure répartition des agents infectieux au sein des tissus lors d'analyses réalisées en biologie moléculaires,
- la contribution à la détermination du spectre d'hôtes de *Vibrio aestuarianus* par infection expérimentale chez différents bivalves.

Les études envisagées ont été appréciées, mais ont soulevé la question de la collecte et de la bancarisation des données relatives à la santé des mollusques marins, a minima celles concernant les hausses de mortalités. Actuellement, il n'existe pas de base nationale et les procédés de collecte des données entre les régions sont différents. Il est important d'harmoniser les procédés de collecte d'information et d'avoir une centralisation de ces informations afin de pouvoir traiter correctement ces données et mettre en place des mesures adéquates.

La réorganisation de la surveillance se fera progressivement mais intégrera forcément une harmonisation des données collectées par des moyens simples et rapides (SMS, fiche google doc...). Ceci nécessitera la formation des différents acteurs de la surveillance.

Le travail des acteurs locaux ne va pas s'accroître avec la mise en place de cette surveillance mais sera organisé de manière différente. Dans tous les cas, des discussions auront lieu localement afin que chaque acteur du système trouve sa place et s'approprie ce système pour qu'il devienne opérationnel.

Les journées de la santé des mollusques marins seront reconduites l'année prochaine et prendront en compte les différents avis émis dans les questionnaires de satisfaction (cf. Annexe 3).

Annexe I : Liste des participants

Nom des participants	Nom des organismes
ARZUL Isabelle	Ifremer LGPMM
BAILLON Laury	Ifremer LGPMM
BAUD Jean-Pierre	Ifremer RBE
BEDIER Edouard	Ifremer LERMPL
BETTO Véronique	Ifremer LGPMM
BEUGUEL Jacques	DGAI/DDPP29
BLIN Jean-Louis	SMEL
BOUQUET Anne-Lise	CREAA
BOURHIS-MADEC Florence	CRC Bretagne Nord
BREST Goulven	CRC Bretagne Nord
CHABIRAND Jean-Michel	Ifremer LERPC
CHAMPEAU Laurent	CRC Poitou Charentes
CHOLLET Bruno	Ifremer LGPMM
DAGUIER Nadège	LDA 50
DESLOUS-PAOLI Jean-Marc	Cepralmar
DUBREUIL Christine	Ifremer LGPMM
ETRILLARD Michel	DDTM 56
FAURY Nicole	Ifremer LGPMM
FIMBEAU Sébastien	LDA 33
FLEURY Elodie	Ifremer LERMPL
FRANÇOIS Cyrille	Ifremer LGPMM
GARCIA Céline	Ifremer LGPMM
GLIZE Philippe	SMIDAP
GRIZON James	Ifremer LERPC
HAFFNER Philippe	Ifremer LGPMM
KECK Nicolas	LDV 34
KERNINON Sandrine	IDHESA
LAFITTE Jean-Luc	DDTM 33
LANGLADE Aimé	Ifremer LERMPL

LAPEGUE Sylvie	Ifremer LGPMM
LE BERRIGAUD Yann	DDTM 17
LE GAL Dominique	Ifremer LERBO
LE GALL Patrick	Ifremer LERLR
LE GALL Ghislaine	IDHESA
LEBRUN Luc	Ifremer LERBO
LUCAS Denis	DGAI
LUPO Coralie	Ifremer LGPMM
MARCE Clara	DGAI
MARTENOT Claire	Laboratoire Franck Duncombe
MAUVIOT Jean-Charles	CRC Aquitaine
MOALIC Pierre-Yves	Labofarm
NINIO Camille	LDA 56
PALVADEAU Hubert	Ifremer LSPC
PELE Marie-Agnès	LEAV 85
PERRIERE-RUMEBE Myriam	Ifremer LERAR
RENAULT Tristan	Ifremer SG2M LGPMM
ROBERT Stéphane	Ifremer LERPC
RONSIN Philippe	DPMA
SCHIKORSKI David	Genindexe
SERPIN Delphine	Ifremer LGPMM
SEUGNET Jean-Luc	Ifremer LERPC
SIMONNET Bastien	DDTM 33
TOURBIEZ Delphine	Ifremer LGPMM
TRAVERS Agnès	Ifremer LGPMM
VERIN Françoise	Ifremer LERBL
VERON Gérard	Ifremer LBH
VIAUD Gérald	CNC

Annexe II : Ordre du jour des journées de la surveillance de la santé des mollusques marins 2013

Mardi 12 novembre

13H30-14H00 Accueil et présentation générale

Activités du Laboratoire National de Référence

14H00-14H20 Bilan des activités du LNR en 2013 (C. Garcia)
14H20-14H40 Résultats de l'EILA 2012 et évolutions envisagées (C. Garcia)
14H40-15H45 Tour de table des laboratoires agréés et reconnus et discussion

Activités des réseaux de surveillance et d'observation de la santé des mollusques marins

16H00-16H30 Bilan du réseau Repamo 2013 (C. François)
16H30-17H00 Réseau national d'observations conchyliques RESCO : bilans des suivis d'agents infectieux 2013 (E. Fleury)
17H00-18H00 Synthèse des suivis des centres techniques 2013 (Centres techniques)

Mercredi 13 novembre

Evolution de la surveillance

9H00-9H30 Organisation de la nouvelle gouvernance du sanitaire (C. Marcé)
9H30-10H00 Réflexions sur les perspectives d'évolution de la surveillance épidémiologique en santé des mollusques marins (T. Renault)
10H00-10H15 Evolution du réseau de laboratoires (DGAL/Ifremer)

Connaissance actuelle sur les organismes pathogènes et leur détection

10H30-11H00 Etude de la diversité du virus OsHV-1 au travers de l'analyse d'échantillons collectés dans différentes régions du monde (T. Renault)
11H00-11H30 *Vibrio aestuarianus* et les huîtres creuses : émergence ou ré-émergence ? (M.A. Travers)
11H30-12H00 *Vibrio aestuarianus* et les coques (D. Tourbiez)
12H00-12H30 Mortalité de fousseurs en France et en Europe (I. Arzul)
14H00-14H20 Comparaison des analyses individuelles versus analyses en pool pour la détection d'OsHV-1 et *Vibrio aestuarianus* par PCR en temps réel lors de hausse de mortalité (C. Dubreuil)
14H20-14H40 Comparaison de kits d'extraction d'ADN chez les bivalves fousseurs (D. Serpin)

Etudes pour préparer l'évolution de la surveillance

14H40-15H05 Etude des freins et des leviers à la déclaration obligatoire des mortalités d'huîtres creuses dans les pertuis charentais (C. Lupo)
15H05-15H30 Programme de travail 2014 et Conclusion générale
15H30-16H30 Visite de la station Ifremer de La Tremblade

Fin des journées

Annexe III : Analyse des questionnaires de satisfaction reçus

L'évaluation de la satisfaction des Journées de la surveillance de la santé des mollusques marins 2013 a été effectuée par la distribution d'un questionnaire auprès des 57 participants présents dans la salle de La Tremblade sur les deux jours. Vingt-six personnes ont répondu, appartenant à différentes catégories professionnelles :

Activité professionnelle	Nombre de répondants
Administration	4
Centres techniques	1
Laboratoires	9
Organismes professionnels	0
Recherche	12

Les répondants avaient la possibilité d'exprimer un degré de satisfaction par une note comprise entre 1 et 5 (1 = « pas satisfait du tout » et 5 = « très satisfait »). Les résultats apparaissent dans le tableau 1. Dans ce tableau, pour chaque item, le nombre correspondant à l'appréciation modale est indiqué en gras. On y constate que, sauf exception, la réponse modale est « Satisfait ».

Tableau 1 : Nombre de personnes ayant choisi le chiffre de 1 à 5 pour indiquer leur degré de satisfaction relatif à chaque item

1 = Pas satisfait ; 2 = Peu satisfait ; 3 = Pas d'avis ; 4 = Satisfait ; 5 = Très satisfait

Item	1	2	3	4	5
Densité du programme			2	17	5
Regroupement des journées du LNR et de l'épidémiologie		1	3	9	11
Session Bilan des activités du LNR		2	2	16	4
Session Bilan des réseaux de surveillance / observation de la santé		2	3	17	2
Session Réglementation et évolution de l'épidémiologie		1	5	13	5
Session Organismes pathogènes et leur détection			1	17	6
Session Préparation de l'évolution de l'épidémiologie		2	7	12	1
Visite du laboratoire et des installations expérimentales			1	2	2
Satisfaction globale			1	19	4

Globalement, l'édition 2013 de ces Journées a été bien appréciée ainsi qu'en témoigne la valeur modale « Satisfait » donnée par 19/26 répondants. Plusieurs commentaires viennent souligner cette impression positive :

- « organisation : RAS » (5 personnes)
- « présentations intéressantes et de qualité »
- « sujets très variés et complémentaires »
- « très bonne organisation : rythme, thématiques, questions, repas »
- « respect des horaires »

Le regroupement des journées du LNR et de l'épidémiologie a globalement été satisfaisant ou très satisfaisant. L'un des répondants a indiqué qu'à son avis, ce regroupement permettait d'« enrichir la vision de la surveillance ».

Il était également demandé aux participants d'exprimer leurs **regrets et/ou leurs souhaits quant à l'édition 2013** de ces Journées. Les réponses suivantes ont été obtenues :

- *tour de table des laboratoires trop long* (2 personnes)
- *manque de clarté et mélange des messages et des objectifs de réseaux d'observation vs. de surveillance* (2 personnes)
- *pas assez de détails dans la session « Préparation de l'évolution de l'épidémiologie » et les perspectives pour 2014* (2 personnes)



- *présentations de la session « Bilan des réseaux de surveillance / observation de la santé » trop lourdes*
- *questionnement sur l'intérêt de l'affichage de posters*
- *pas assez de questions*
- *la tenue de la visite des installations expérimentales le deuxième jour n'a pas permis aux personnes ayant un long trajet de retour d'y participer*

Un répondant s'est plaint de la localisation des Journées à La Tremblade et un autre répondant a considéré que « *l'organisation à La Tremblade est pratique* ».

Enfin, les participants étaient invités à faire des **suggestions pour l'édition 2014** des Journées de la surveillance. Les réponses suivantes ont été obtenues :

- *bilan plus synthétique du tour de table des laboratoires (4 personnes)*
- *sessions thématiques parallèles (dont une technique pour les laboratoires) pour faciliter les échanges (3 personnes)*
- *animateurs de sessions (2 personnes)*
- *inviter des représentants professionnels à réaliser des interventions (2 personnes)*
- *regrouper les questions communes aux laboratoires sur une seule journée (2 personnes)*
- *séparer les sessions « épidémiosurveillance » et « observation de la santé »*
- *fournir un support papier des power points*
- *café pour l'accueil de la seconde journée*
- *lieu plus accessible ou prévoir des covoiturages ou des navettes*

Un dernier commentaire positif, en supplément de ceux déjà cités mérite également d'être signalé pour conclure cette évaluation :

« *A renouveler !* ».