

Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006

Convention N°2001-RPC-A-212

"Pathologie"

Programme 4 : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la pathologie

Etude des Agents Pathogènes et épidémiologie

**T. Renault, F. Le Roux, F. Berthe, M. Robert,
B. Chollet, et A. Gérard**



**IFREMER La Tremblade
Laboratoire de Génétique et Pathologie**

Rapport d'Avancement pour l'année 2001

Programme : Santé des populations d'élevage **Sous programme : Agents pathogènes et épidémiologie**

Le programme 4 portant sur la pathologie des coquillages dans le cadre d'une gestion durable des productions ostréicoles, comporte 2 actions principales réparties en une étude d'épidémiologie analytique et descriptive des agents pathogènes (Action 1), et l'étude des relations hôtes/agents pathogènes (Action 2).

Les résultats 2001 présentés ici sont relatifs à ces 2 actions, avec notamment des informations sur les infections à virus de type herpès, et de recherche de bactéries pathogènes chez *Crassostrea gigas* lors des épisodes de mortalités estivales.

Par ailleurs, l'émergence d'un programme national, intitulé **MOREST** (pour **M**ortalités **E**stivales) sur l'huître creuse *C. gigas* va permettre de rappeler le contexte scientifique des relations hôtes/pathogènes.

PROGRAMME NATIONAL MOREST

Initiation du programme en 2001 :

Le programme MOREST (mortalités estivales de l'huître *C.gigas*) coordonné par Ifremer a été lancé début 2001 pour 4 ans. Il associe des équipes d'une quinzaine de laboratoires de 8 organismes différents, ainsi que des structures de développement départementales ou régionales, et des structures professionnelles. Son objectif est de rassembler des compétences complémentaires indispensables pour l'étude d'un phénomène multifactoriel conduisant aux mortalités observées.

Ce phénomène est observé au niveau international depuis les années 40, mais prend parfois une ampleur incompatible avec l'économie du secteur ostréicole (30 à 60% de mortalités répartie en taches sur du naissain de 5 à 18 mois et parfois sur des adultes de 2 ans ou plus, dans certains secteurs ou parcs, selon les années).

Les travaux préliminaires entrepris depuis 1995 par les équipes de pathologie de l'Ifremer, associées à des structures régionales n'ont mis en évidence aucune pathologie au sens strict. Parfois un virus Herpes ou certains vibrios pouvaient être associés à une petite fraction des huîtres moribondes, mais en aucun cas l'ensemble des mortalités n'a pu être expliqué par un même pathogène. C'est pourquoi, le problème a été reconsidéré en proposant l'hypothèse selon laquelle des interactions entre certaines conditions d'environnement, certains stades de l'huître et des pathogènes opportunistes favoriseraient des conditions d'infection.

Il a donc été nécessaire de rassembler dès 2001 des spécialistes en génétique, en physiologie, en immunologie, en pathologie, en écologie côtière. Un premier projet a été rédigé comportant 6 domaines d'études : 1/ La validation d'outils existant ou leur mise au point pour ce problème dans toutes les disciplines concernées. 2/ La caractérisation du phénomène sur 3 sites ateliers, à Marennes, en Bretagne sud et Normandie en Baie des Veys avec l'intervention des laboratoires côtiers Ifremer. 3/ Des études expérimentales de découplage de facteurs. 4/ Des études expérimentales de sortie de crise. 5/ Des actions synergiques entre le réseau REPAMO et le projet MOREST. 6/ Des outils de gestion de données et de communication entre les partenaires et vers l'extérieur. Compte tenu de la rapidité de mise en place du projet, une extension de ces actions à des l'intervention des équipes de la DEL et TMSI a été prévue pour 2002. Le dossier a été déposé auprès de 5 régions pour cofinancement.

MOREST Actions réalisées en 2001:

45 familles ont été produites à l'écloserie IFREMER de La Tremblade et déposées sur trois sites ateliers (Ronce Les bains, Baie des Veys, Rivière d'Auray) avec du naissain naturel en témoin.

Les résultats de la première année de travail sont les suivants :

- Il existe une composante génétique forte permettant de caractériser des familles biparentales sensibles parfois avec des mortalités jusqu'à 70% (S) ou résistantes (R) quelque soit l'écosystème testé. Le naissain sauvage étant affecté en moyenne de 20 à 30%.
- Cependant l'environnement module l'intensité de mortalités observées chez les familles sensibles soulignant ainsi l'importance de ce facteur.
- La phase de la reproduction précédant juste la ponte est une phase critique, même pour des naissains d'une dizaine de mm (ce dernier point n'était pas démontré jusqu'ici).
- La température associée aux mortalités est supérieure ou égale à 19°C
- Enfin, la diversité des pathogènes isolés et identifiés renforce leur caractère opportuniste et écarte fortement l'hypothèse d'une épidémie.
- De nombreux critères pathologiques, immunologiques et physiologiques ont été développés et testés au cours de cette année (notamment sur le site atelier du REseau de PATHologie des Mollusques). Ces résultats ont été discutés au cours de journées bilan fin novembre 2001.

Ces résultats permettent de sérier nos hypothèses autour d'un premier ensemble de facteurs de risques : un facteur génétique, l'intensité et la durée de la phase reproductrice pré-ponte, dépendante elle même du niveau trophique riche, une température supérieure à 19°C. Le tout affecterait le système immunitaire. Un stress quelconque pourrait amplifier le phénomène : la matière organique dissoute, induisant des poussées de vibrios, pourrait augmenter la probabilité de pathogènes opportunistes, des manipulations zootechniques, des stress environnementaux, la présence de micropolluants sont probablement des facteurs de risques à étudier.

MOREST Actions prévues en 2002 :

Les travaux prévus pour 2002 sont les suivants :

- En génétique : vérification de la survie des bonnes familles en seconde année et de la transmission des caractères en générations divergentes G2.
- Poursuivre la caractérisation du phénomène « in situ » avec l'ensemble des disciplines : suivre avec les outils mis au point en première année, une population reconstituée G1 sur 2 sites ateliers (Marennes et Baie des Veys), afin de comparer les dynamiques de reproduction qui y sont différentes, et d'en déterminer les conséquences sur l'immunologie et les processus d'infection. Ces observations sont encadrées de mesures de paramètres environnementaux. Comparer dans les mêmes conditions le comportement des familles sensibles S et résistantes R sur un site. Caractériser les effets délétères du sédiment. Tester la conséquence de l'environnement hivernal (périodes de grande pluviosité) sur la qualité des réserves (eventuelle accumulation de polluants et la survie des géniteurs et de leur progéniture au printemps suivant.
- Engager des expérimentations permettant de découpler les facteurs à l'origine des mortalités (Expérimentation phase 1) avec intervention de toutes les disciplines. En 2002, on étudiera l'effet de la quantité de nourriture sur l'effort de reproduction et la conséquence sur les capacités de défense et la susceptibilité aux infections. D'autres expérimentations concernent aussi l'effet de la température, de l'hypoxie de la salinité, des micropolluants. Plusieurs expériences visant à reproduire la maladie avec différentes souches de vibrios opportunistes sont prévues, ainsi que l'étude des conditions de l'expression de leur facteurs de virulence.
- Engager des expérimentations pour sortir de la crise (Expérimentation phase 2) : Testage de souches R avec les professionnels des écloséries, testage de triploïdes issus de tétraploïdes. En Baie des Veys : transferts en eau moins riche en phytoplancton et MO avant la période critique pour diminuer l'intensité de vitellogenèse et éviter les poussées de vibrios, déclenchement de la ponte qui n'est que partielle, ce qui augmente le risque.
- Continuer les synergies) REPAMO-MOREST et engager une approche épidémiologique.
- Développer les études environnementales avec la DEL dont l'hydrobiologie l'écotoxicologie, l'origine (bassins versants) et la dispersion des micropolluants, Organiser le traitement de séries temporelles des réseaux afin d'observer d'éventuelles dérives à long terme de l'écosystème, les fluctuations interannuelles en relation avec les épisodes de mortalité, développer les modèles prédictifs afin de simuler différents

scénarios climatiques ou de rejets des rivières et développer une approche épidémiologique.

- Gérer l'acquisition des données et la diffusion de l'information avec l'aide des spécialistes de TMSI.

Projet Pathologie du programme MOREST

Contexte scientifique

La pathologie est la science qui a pour but l'étude et la connaissance des maladies et des effets qu'elles provoquent (lésions, troubles).

Les maladies constituent un risque majeur pour l'ostréiculture. Une maladie peut être définie par un déséquilibre physiologique non compensé par l'animal. Ce déséquilibre peut avoir des conséquences sur la qualité du produit, sur les performances zootechniques et dans les cas extrêmes une maladie peut conduire à la mort de l'animal.

Les facteurs abiotiques et biotiques peuvent être la cause de maladies. Les paramètres environnementaux (température, salinité, oxygène...) ou physiologique (maturation, stress) peuvent induire une fragilisation de l'animal. Parmi les facteurs biotiques, un retour sur l'histoire de l'ostréiculture française met en évidence la fragilité de cette production face aux maladies dues à des agents pathogènes : chute de 90 % de la production d'huîtres plates suite à l'apparition de deux parasitoses successives à *Marteilia refringens* (Grizel et al., 1974) et *Bonamia ostrea* (Comps et al., 1980); disparition de *Crassostrea angulata* des côtes françaises due à une épizootie à iridovirus (Comps et Bonami, 1977).

Chez *Crassostrea gigas*, plusieurs types d'agents infectieux ont été mis en évidence :

1) De nombreux **parasites** ont été décrits chez les huîtres ceruses, mais la nature commensale ou pathogène de ces agents est rarement établie. Certains protozoaires cependant sont considérés comme pathogènes de *C.gigas* : *Mikrocytos mackini* (Farley et al, 1988), *Perkinsus marinus* et *Haplosporidium nelsoni* (Barber et al, 1994). Les maladies qu'ils provoquent sont listées par l'office internationale des épizooties (OIE) comme maladie à déclaration obligatoire et n'ont pour le moment jamais été observées sur les côtes françaises.

2) Des **virus** apparentés aux *Iridoviridae* (Elston, 1993 ; Comps et Bonami, 1977) et aux *Herpesviridae* (Nicolas et al ,1992 ; Renault et al, 1994, 2000a, 2000b) ont été décrits chez les huîtres, en association avec des mortalités plus ou moins importantes à caractère

épidémique ou endémique. Ces virus sont considérés comme des agents potentiellement dangereux pour les cheptels d'huîtres.

3) La flore **bactérienne** hétérotrophe associée aux mollusques bivalves est extrêmement variée et essentiellement constituée de germes Gram négatif (Laukner, 1983). Elle contient en effet des bactéries de l'environnement que les bivalves captent par filtration. Ainsi, la plupart des bactéries isolées appartiennent à la flore commensale des coquillages, certaines sont même bénéfiques et jouent un rôle dans la nutrition des mollusques.

L'effet des antibiotiques dans les élevages de bivalves a cependant montré que certaines d'entre elles sont pathogènes (Davis et Chanley, 1956 ; Walne, 1956, 1958 ; Guillard, 1959).

Le tableau ci dessous nous présente les principaux genres bactériens décrits comme pathogène des huîtres creuses.

Genre	Stade	Références
<i>Vibrio</i>	Larve	Jeffries, 1982 Garland <i>et al.</i> , 1983 Sugumar <i>et al.</i> , 1998 Takahashi <i>et al.</i> , 2000
	Adulte	Grischkovsky et Liston, 1974
<i>Cytophaga</i>	Naissain	Dungan et Elston, 1988 Dungan <i>et al.</i> , 1989
<i>Nocardia</i>	Adulte	Imai <i>et al.</i> , 1968 Elston <i>et al.</i> , 1987 Friedman <i>et al.</i> , 1988 Friedman <i>et al.</i> , 1991 Friedman et Hedrick, 1991
<i>Chlamydia</i>	Adulte	Renault et Cochenne, 1995
<i>Rickettsia</i>	Adulte	Comps, 1983 Renault et Cochenne, 1994

La pathologie dans le programme Morest

Depuis 1991, en période estivale, de forts taux de mortalité de naissain d'huîtres creuses (60 à 100%) sont observés régulièrement en milieu naturel et en écloséries. Ces épisodes récurrents inquiètent les professionnels qui craignent qu'à l'instar de l'huître portugaise, *C. angulata*, *C. gigas* puisse disparaître à son tour, suite à une épizootie.

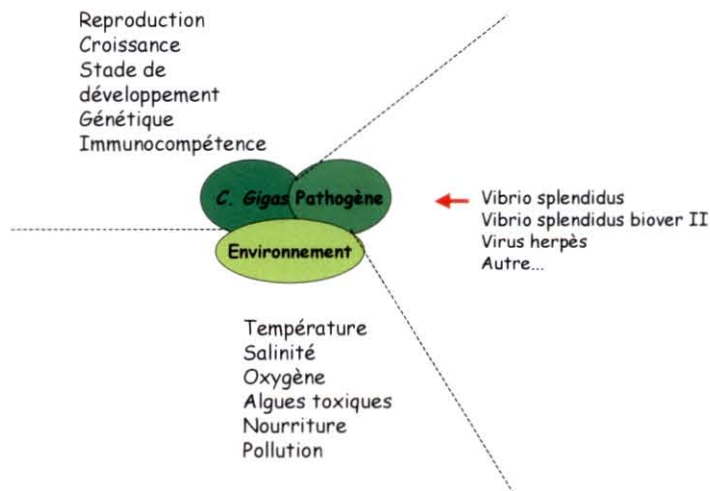
Des études menées dans le but d'identifier une origine infectieuse de ce phénomène ont permis d'identifier un virus de type herpes dans des larves et du naissain de *C. gigas*. La pathogénicité de cet agent a pu être démontrée chez les larves en éclosérie, tandis que son effet sur les naissains et les juvéniles est encore à l'étude (Le Deuff et al., 1994, 1996).

Des études de bactériologie menées par deux groupes de recherche français (CNRS de Roscoff et l'Ifremer de La Tremblade) ont permis d'isoler deux souches de *Vibrio*, dont le caractère pathogène a été reproduit par transmission expérimentale sur naissains d'huîtres creuses. Une caractérisation par phénotypage, puis par séquençage du gène codant pour la petite sous unité ribosomique, a montré que ces deux souches appartiennent au groupe des *Vibrio splendidus* (Lacoste et al., 2001 ; Waechter, 2001).

Nous avons tenter de détecter dans d'autres épisodes de mortalité des bactéries proches de notre souche pathogène. Cette étude a montré que les *Vibrio splendidus* sont très répandus dans le milieu marin. Par contre peu de souches proches de notre bactérie pathogène ont été mises en évidence, posant donc la question d'un épiphénomène ou d'un biais d'échantillonnage (Waechter et al., 2002 ; Le Roux et al., 2002).

Dans l'état actuel des connaissances, les caractéristiques des mortalités estivales ne peuvent s'expliquer par l'unique intervention d'un agent infectieux (épizootie). La piste d'une étiologie multifactorielle reste à privilégier. Le rôle possible d'un pathogène nous amène à réfléchir sur la notion de maladie infectieuse, résultat d'un déséquilibre entre la virulence de l'agent infectieux et les défenses immunitaires de l'hôte. Dans le cas d'épizooties la virulence de l'agent est telle que sa pathogénicité ne dépend pas de l'hôte. Dans le cas opposé d'une action bactérienne opportuniste, la fragilité physiologique de l'hôte est telle que la pathogénicité ne dépend pas uniquement de la virulence de l'agent infectieux. Enfin, les travaux antérieurs concernant les mortalités estivales s'accordent sur le fait que si agent infectieux il y a, celui ci présente une virulence modulée par l'état de l'hôte (liaison stress/capacité immunitaire) et par des conditions environnementales (période estivale).

Le schéma, ci-dessous, résume cette conjoncture de facteurs déclenchant, ou à risques. L'implication des pathologistes dans le projet Morest doit tenir compte des interactions hôte-pathogène et des facteurs environnementaux modulant ces interactions.



Le programme Pathologie/Morest a donc pour objectifs :

- 1- de décrire la maladie : lésion, anomalie anatomique, transmissibilité ; par des analyses systématiques d'histologie, bactériologie et virologie et cohabitation avec des huîtres saines au laboratoire.
- 2- d'identifier de façon précise les agents infectieux potentiellement pathogènes
- 3- de mettre au point des outils de détection spécifiques et sensibles de ces agents.
- 4- de contrôler la virulence de ces pathogènes et la fragilisation de l'hôte par une meilleure compréhension des trois compartiments modulateurs : le pathogène, l'hôte et l'environnement.

D'ores et déjà des résultats significatifs ont pu être obtenus au niveau national :

Bactériologie

Plusieurs observations nous ont conduit à poser l'hypothèse selon laquelle les bactéries infectantes se trouvent dans l'hémolymphhe :

- la reproduction expérimentale de la maladie s'effectue par cette voie (injection)
- il n'y a pas de lésions localisées (nécroses) sur les huîtres moribondes
- l'hémolymphhe circule dans la cavité extra et intra –palléale sur des animaux exondés et peut entraîner des bactéries collées sur le manteau.

Au cours de l'année 2001 des analyses bactériologiques ont été effectuées sur des huîtres moribondes provenant de lots professionnels ou de lots Morest après des épisodes de mortalité.

Au même moment des animaux encore vivants des même lots ont été placés en aquarium avec du naissain provenant de l'écloserie de l'IFREMER (sain) pour des expériences de cohabitation visant à mettre en évidence une transmission de l'effet conduisant aux mortalités soit donc un éventuel agent infectieux. Dans le cas où une transmission a été observée un isolement de la flore vibrionaceae a été effectué.

Observations :

- Les microflore bactériennes de l'environnement marin sont complexes, leur phénotype versatile et leur taxonomie franchement controversée.
- La charge bactérienne de l'hémolymphhe est parfois forte mais non corrélées aux taux de mortalité. Bien qu'il y ait une certaine spécificité de la microflore associée (*V. splendidus* I et II ; *V. aesturianus* (3 types), *V. anguillarum*, *V. natriegens*) rares sont les animaux qui sont infectés par une souche bactérienne. Des infections par une seule souche sont à souligner chez certaines huîtres moribondes mais les espèces peuvent être différentes d'une huître à l'autre.
- Les expériences de cohabitations ont montré qu'il pouvait y avoir transmission de l'effet conduisant à la mortalité. Le virus herpès n'a pas été détecté. Les souches isolées de l'hémolymphhe appartiennent à diverses espèces et présentent un phénotype versatile. Les analyses génotypiques sont en cours.

- Le groupe *V. splendidus* fait l'objet d'études phylogénétiques à partir des gènes codant pour l'ARNr 16S et *GyrB*, complétées des hybridations ADN/ADN. Nous montrons que *V. splendidus* forme un groupe complexe qui contient au moins 3 espèces: *V. splendidus* « biovar1 », *V. splendidus* « biovar 2 » à renommer, *V. lentus*. Ces groupes contiennent un grand nombre de sous espèces de virulence très variable.

- REseau de PAtologie des MOllusques (REPAMO) : En histologie, bien que tous les échantillons de l'an dernier n'aient pas été encore analysés des infiltrations hémocytaires fréquentes caractérisent les huîtres en « souffrance ». Un certain nombre de parasites peuvent être présents mais leur prévalence est en général faible.

- Virologie Des analyses de lots de géniteurs *Crassostrea gigas* ont permis de détecter le virus de type herpès chez un grand nombre d'animaux. La détection d'ADN et de protéines virales n'était pas associée à l'observation de mortalité chez les huîtres analysées. Ces résultats indiquent que le virus de type herpès semble présent chez les huîtres adultes sans être associé à des phénomènes de mortalité anormale. Ces résultats laissent suspecter fortement la possibilité d'une transmission parentale. D'autres résultats obtenus en 1996, 1997 et 1998 ont montré l'importance des géniteurs dans la détection par PCR de virus de type herpès dans la descendance au stade naissain. Même si le nombre de lots analysés restait limité, il apparaissait nettement que certains géniteurs donnaient du naissain chez lequel le virus était plus fréquemment retrouvé. Concernant les analyses portant sur le naissain de *Crassostrea gigas*, la mise au point d'un outil de PCR permet aujourd'hui de traiter un grand nombre d'échantillons. En 1996 et dans les années qui ont suivies le nombre de déclarations de mortalités anormales de naissain ont été faibles. Cependant, les résultats observés sur le site de Fouras en 2000 et 2001 montrent une fenêtre de détection de l'ADN viral par PCR qui coïncide avec le démarrage des mortalités.

CPER Poitou – Charentes
Action 2 : Etude des relations hôtes/agents pathogènes

Résultats 2001

Volet 1. Recherche de bactéries pathogènes chez *Crassostrea gigas* lors des épisodes de mortalités estivales.

Les principaux résultats 2001 sont les suivants :

Mise en évidence de la transmissibilité

Des échantillons de naissain, subissant des mortalités estivales, d'origine des sites MOREST, sont arrivés au laboratoire de La Tremblade en été 2001. Une partie des animaux a été congelée pour la détection de l'ADN du virus herpès, une autre partie a été fixée pour analyse histologique : analyse d'altération tissulaire, présence de parasites. Enfin 15 animaux encore vivants ont été placés en aquarium avec du naissain provenant de l'écloserie de l'IFREMER (sain) pour des expériences de cohabitation visant à mettre en évidence une transmission de l'effet conduisant aux mortalités soit donc un éventuel agent infectieux.

Analyse microbiologique

Dans le cas où une transmission a été observée un isolement de la flore vibronaceae a été effectué à partir de pool d'hémolymphe d'animaux moribonds. Dans la plupart des cas, le naissain était négatif en herpès. 125 souches de vibrio ont ainsi été isolées pour cette année 2001. Ces souches ont été caractérisées phénotypiquement au moyen de 35 tests biochimiques.

Criblage fonctionnel

La virulence ou le caractère opportunistes des isolats a été analysée par injection des souches à des palourdes adultes ou à du naissain de *C. Gigas*. Les souches virulentes sélectionnées ont été injectées aux différentes familles produites.

Les souches virulentes sont sélectionnées pour des expériences de balnéation, et pour la description de la pathogénèse (virulence in vivo, réponse de l'hôte...).

D'un point de vue recherche amont, les souches pathogènes sont utilisées pour la caractérisation cellulaire et moléculaire des supports de la virulence.

Taxonomie moléculaire

Les souches virulentes sont analysées d'un point de vue taxonomique (séquençage de gènes d'intérêt phylogénétique).

Actions 2002

Synergie REPAMO/morest

Dans les cas de mortalités supérieures à 20% les échantillons de naissain seront analysés par la cellule de veille REPAMO. Comme en 2001, une partie des animaux seront analysés directement en bactériologie, congelés pour la détection de l'ADN du virus herpes, une autre partie seront fixés pour analyse histologique, enfin une partie des animaux encore vivants seront placés en aquarium avec du naissain provenant de l'écloserie de l'IFREMER (sain) pour des expériences de cohabitation. Un suivi anatomo-pathologique des familles sensibles et résistantes placées dans le milieu naturel sera effectué.

Bactériologie

a) Ecologie microbienne: La mise en évidence d'une charge bactérienne forte dans l'hémolymphe pose la question de la spécificité de cette microflore: nous allons comparer la flore isolée de différents compartiments de l'hôte (hémolymphe, cavité palléale et tube digestif) et environnement proche des animaux moribonds. Cette approche d'écologie

bactérienne nécessite des outils relativement discriminants comme la DGGE (gène 16S ou gyrase).

b) Pathologie expérimentale : Les souches isolées en 2001 seront inoculées par bain (larves et naissain) ou injectées à des juvéniles de *C. gigas* pour la sélection de bactéries virulentes.

Des familles (F1) bonnes et mauvaises (résultats de terrain 2001) subiront une épreuve par injection avec des mélanges de bactéries de concentration identique (un mélange de souches virulentes, vir+ et un autre de souches non virulentes, vir-), 60 individus par famille seront nécessaires : les familles retenues : "bonnes" : F5-20; F6-21; F10-39; F10-40; F13-50; F18-72 "mauvaises" : F2-6; F3-9; F8-29; F8-32; F13-51; F16-61. Cette expérience sera répétée à l'automne, sur la F2 si les caractères de résistances sont transmissibles.

L'effet état de maturation et de la nutrition sur la sensibilité de l'hôte sera vérifié en injectant un mélange de souches soit vir+ soit vir- à des huîtres matures et non matures maintenues à 19°C.

c) Taxonomie

Les microflore bactériennes de l'environnement marin sont complexes, leur phénotype versatile, la taxonomie franchement controversée. Les souches isolées dans le cadre du projet Morest et démontrées pathogènes seront caractérisées d'un point de vue phénotypique par des tests biochimiques classiques mais aussi une analyse des protéines membranaires, du LPS voir des protéines de type métalloprotéases excrétées. Ces souches seront aussi caractérisée au niveau moléculaire : séquence des gènes 16S, *gyrB* et éventuellement *rpoD* et construction d'arbre phylogénétique. De nouveaux taxons seront éventuellement décrits (GC%, hybridation ADN/ADN, description phénotypique plus précise). Enfin ces souches vont nous permettre de compléter le soucier microbiologique du laboratoire européen de référence de pathologies des mollusques.

a. **Perspectives 2003, 2004**

Gène support de la virulence

Des souches appartenant à la même espèce (hybridation ADN/ADN >70%), virulentes ou non (pathologie expérimentale) seront utilisées pour la recherche de gène supports de la virulence par deux approches

- 1- **du phénotype au génotype** : recherche d'exotoxine ou d'endotoxine (effet *in vivo* de surnageant de culture ou de bactéries mortes) ; interaction *in vitro* entre cellule de l'hôte et bactérie et analyse en cytométrie en flux (hémocyte, cellule musculaire). A partir des mécanismes de virulence mis en évidence, recherche des gènes supports par PCR avec des oligonucléotides dégénérés (hémolysine, protéase, pilin...)
- 2- **du génotype au phénotype** : soustraction génomique et analyse des séquences différentielles.

Modulation de la virulence

L'effet de facteurs biotiques ou abiotiques sur la virulence des pathogènes sera analysé *in vivo*.

Mise au point d'outil de diagnostic

Des outils diagnostics de ces souches seront mis au point sur la base de données taxonomiques et sur leur potentialité de virulence.

Epidémiologie

Ces outils diagnostics seront utilisés pour analyser l'impact réel de ces pathogènes dans les épisodes de mortalités en 2002, 2003, 2004.

Volet 2. Etude des infections à virus de type herpès chez *Crassostrea gigas*

Rappels des objectifs

Des infections à virus de type herpès sont observées chez les coquillages depuis 1991 en France. Les objectifs en 2001 concernant ces infections étaient :

- de rechercher les virus chez des animaux adultes asymptomatiques ;
- d'étudier la diversité de ces virus au moyen d'outils moléculaires ;
- de tester en immunohistochimie des anticorps spécifiques produits dans le cadre d'un programme européen (VINO, FAIR CT98-4334) ;

- d'étudier les mécanismes de défense mis en jeu par les huîtres creuses, *Crassostrea gigas* ;
- et de rechercher de l'ADN de virus de type herpès dans des échantillons d'eau de mer.

Résultats 2001

Les analyses réalisées chez des huîtres adultes démontrent la présence d'herpès virus avec une forte prévalence dans différentes populations d'animaux asymptomatiques en France. Les herpès virus semblent donc capables de persister chez leurs hôtes à l'instar des autres membres de la famille des *Herpes viridae*. La détection de virus chez les adultes et plus particulièrement au niveau des gonades laisse penser que les géniteurs jouent un rôle de porteurs et de réservoirs de virus, favorisant la transmission de l'infection à la descendance.

Les infections à herpès virus chez les bivalves marins semblent être dues à un seul et même virus, OsHV-1 (Oyster Herpes Virus type 1). En effet, les études réalisées sur deux gènes, un gène codant pour un inhibiteur d'apoptose (IAP) et un gène codant pour une glycoprotéine putative, n'ont pas mis en évidence des variations importantes au niveau des séquences analysées. En revanche, un variant (OsHV-1 var) a été détecté dans des échantillons de différentes espèces de bivalve présentant des origines géographiques variées. Cependant, OsHV-1 var est proche de OsHV-1. Ils diffèrent principalement par un important événement d'insertion/délétion (perte de 4129 pb et 905 pb insérées pour le variant) dans la zone de jonction entre U_L et IR_L. Les données disponibles indiquent que le variant possède une séquence codante supplémentaire à l'extrémité droite de U_L ainsi que des régions TR_L et IR_L plus courtes que celles de OsHV-1.

Deux protéines recombinantes obtenues par la société Eurogentec (Belgique), dans le cadre du programme européen VINO, ont été utilisées pour immuniser des souris. Des anticorps monoclonaux ont ainsi été produits et leur spécificité vis à vis de OsHV-1 a été testée en immunohistochimie au Laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade. Ainsi, 27 surnageants d'hybridome ont été testés sur coupes histologiques d'huîtres infectées par OsHV-1. Cinq hybridomes ont été obtenus à partir de splénocytes de souris immunisées avec une protéine recombinante correspondant à une glycoprotéine putative et 22 avec une protéine recombinante correspondant à une IAP virale. Trois surnageants d'hybridome présentent une réactivité marquée et trois autres une réactivité

réduite. Les trois surnageants possédant une réactivité marquée ont été produits à partir de souris immunisées avec la glycoprotéine putative. Les marquages sont observés dans le cytoplasme de cellules du conjonctif de différents organes chez les animaux contrôlés comme infectés. Ce type de marquage correspond au marquage attendu. Les trois surnageants présentant une réactivité réduite ont été obtenus par fusion lymphocytaire avec des splénocytes de souris immunisées avec une IAP virale recombinante. Dans ce cas, les marquages observés restent très ténus. Les anticorps monoclonaux spécifiques de OsHV-1 ainsi identifiés représentent des outils de choix pour le diagnostic et la recherche.

Différents protocoles de cytométrie en flux ont été développés en 2001 afin d'étudier les hémocytes et leurs fonctions chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Par ailleurs, les effets de différents métaux lourds et de l'atrazine ont été étudiés sur les hémocytes d'huître maintenus *in vitro*. Si l'atrazine semble n'avoir aucun effet particulier sur ces cellules, le mercure quant à lui est capable de tuer les hémocytes et de modifier un certain nombre de leurs fonctions enzymatiques.

La transmission des virus de type herpès chez les coquillages se fait de manière horizontale entre individus malades et individus sains. Elle semble également survenir de manière verticale entre les géniteurs et leur descendance. Cependant, il est aussi intéressant de s'interroger quant à la persistance du virus dans le milieu extérieur. Un programme de recherche commun entre le LGP et le Laboratoire de Biologie et Environnement Marins de l'Université de La Rochelle a été initié dans le but d'apporter des réponses à certaines questions soulevées. Notamment, le virus est-il présent dans le milieu extérieur, et si tel est le cas peut-il être détecté ? Cette persistance dans le milieu extérieur peut-elle constituer un moyen de contamination d'animaux sains ? Dans ce cadre, des échantillons d'eau de claires ostréicoles et d'eau de mer ont été analysés au moyen d'outils moléculaires. Des produits de PCR de taille attendue ont été ainsi obtenus. Des travaux de séquençage sont en cours dans le but de confirmer ces premiers résultats concernant la détection d'ADN viral dans l'eau de mer.