



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 22 avril 2010

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la surmortalité d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*)

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 9 mars 2010 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) d'une demande d'avis relatif à la surmortalité d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*).

CONTEXTE

Des épisodes de surmortalité d'huîtres creuses (*C. gigas*) sont survenus sur les littoraux français, irlandais et des îles anglo-normandes en 2008 et 2009, principalement dans les naissains et chez les juvéniles. Plusieurs facteurs étiologiques, environnementaux et biologiques, ont été impliqués dans ces phénomènes, dont la présence de l'herpèsvirus OsHV-1, notamment d'un génotype nouvellement décrit, OsHV-1 μ var.

Dans ce contexte, l'Afssa est interrogée par la DGAI sur plusieurs questions concernant l'étiologie, l'épidémiologie et les mesures de contrôle relatives à ce phénomène de surmortalité. Il a donc été créé, en concertation avec les présidents des comités d'experts spécialisés « Santé animale » et « Eaux », un Groupe d'expertise collective d'urgence (Gecu) dénommé « Surmortalité d'huîtres creuses - 2010 », chargé de répondre aux questions suivantes :

- 1) « Quel est le niveau respectif de responsabilité d'OsHV-1 et d'OsHV-1 μ var dans la cause des surmortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* observées en 2008 et 2009 sur le littoral français ?
- 2) Existe-t-il un réservoir biologique (sauvage et/ou domestique) et/ou environnemental d'OsHV-1 et d'OsHV-1 μ var, avec, s'il existe plusieurs réservoirs, leur importance relative ?
- 3) En cas de réponse positive à la question 2) : Peut-on considérer la situation comme enzootique, durablement implantée et appelée à se renouveler d'année en année si les seules mesures prises sont les restrictions de transferts d'huîtres originaires de zones où les surmortalités seraient de nouveau observées vers des zones où ce phénomène ne l'est pas ? Dans ce cas, le maintien de ces mesures est-il pertinent ?
- 4) Quels sont les dispositifs de traitement de l'eau de mer approvisionnant un établissement conchylicole qui inactivent les virus à enveloppe ou réduit le risque de contamination des eaux naturelles par des maladies à un niveau acceptable ?
- 5) Quel est le risque d'observer un nouveau phénomène de surmortalité d'un niveau au moins comparable à celui de 2009 ? La réponse sera, le cas échéant, modulée en fonction des facteurs et des situations suivants :
 - de la période de l'année ;
 - du stade de développement des huîtres nouvellement immergées dans le milieu naturel ;
 - du fait que le lot à immerger a été détecté positif au test officiel de recherche d'OsHV-1 ou OsHV-1 μ var ;

27-31, avenue
du Général Leclerc
94701

Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 26 13
www.afssa.fr

REPUBLIQUE
FRANÇAISE

- du fait que le lot à immerger a été détecté négatif au test officiel de recherche d'OsHV-1 et d'OsHV-1 μ var alors que ce lot était positif à un précédent test de dépistage OsHV-1 ou OsHV-1 μ var ;
 - de tout autre facteur que vous auriez estimé à risque.
- 6) En cas de réponse positive à tout ou partie de la question 5, quelles sont les mesures que vous recommanderiez de prendre en fonction des facteurs ou situations que vous auriez estimés à risque ? »

METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence (Gecu) « Surmortalité d'huîtres creuses - 2010 » réuni le 26 mars et le 2 avril 2010. La coordination scientifique du Gecu « Surmortalité huîtres creuses - 2010 » a élaboré un projet d'avis qui a été validé par voie télématique le 19 avril 2010.

L'expertise s'est appuyée sur les documents suivants :

- l'avis de l'Afssa 2009-SA-0145 du 5 juin 2009 relatif à une mortalité anormale d'huîtres ;
- l'avis de l'Afssa 2009-SA-0273 du 2 novembre 2009 relatif à l'évaluation d'un projet communautaire de mesures de gestion et de surveillance en cas de hausse de mortalité d'huîtres creuses en lien avec la détection de l'herpèsvirus OsHV-1 μ var ;
- le Règlement (UE) n°175/2010 de la Commission du 2 mars 2010 portant application de la directive 2006/88/CE du Conseil en ce qui concerne des mesures de lutte contre la surmortalité des huîtres de l'espèce *C. gigas* associée à la détection du variant génotypique OsHV-1 μ var ;
- la note de service DGAL/SDPPST/N2010-8069 du 11 mars 2010 ;
- la bibliographie citée en fin d'avis.

ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Afssa est fondé sur l'avis du Groupe d'expertise collective d'urgence (Gecu) « Surmortalité d'huîtres creuses - 2010 » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

« 1) Question n°1 : « Quel est le niveau respectif de responsabilité d'OsHV-1 et d'OsHV-1 μ var dans la cause des surmortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* observées en 2008 et 2009 sur le littoral français ? »

➤ Contexte

*Depuis une vingtaine d'années, une surmortalité d'huîtres creuses *C. gigas* est observée durant l'été, sous forme de foyers localisés répartis sur le littoral français. Une origine plurifactorielle de ce phénomène a été suspectée, associant des agents pathogènes transmissibles, viraux (herpèsvirus) et/ou bactériens (*Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*) ainsi que des facteurs environnementaux (température, pH, salinité, par exemple) et des facteurs intrinsèques (âge, état physiologique, facteurs génétiques).*

*En 1991, un virus apparenté à la famille des Herpesviridae a été décrit chez des larves d'huître creuse *C. gigas* en France (Nicolas et al., 1992). Depuis cette date, des épisodes de surmortalité de larves de *C. gigas* sont régulièrement observés dans des éclosiers en France (Renault et al., 1994a et 1994b). Une surmortalité importante a également été observée à partir de 1993 dans des lots de naissain d'huître creuse dans différents sites en France.*

La purification en 1995 du virus infectant des larves d'huître creuse et l'extraction de l'ADN viral à partir des particules purifiées ont permis d'analyser la structure du virus (Davison et al., 2005) et de réaliser le séquençage complet du génome (Genbank AY509253). Les caractéristiques morphologiques des virions, les sites de réplication du virus, la nature de l'acide nucléique viral

(ADN double brin de grande taille), l'organisation du génome, la présence de certains gènes (terminase) et la structure fine des capsides sont autant d'éléments qui ont permis de conclure qu'il s'agissait bien d'un herpesvirus (Le Deuff et Renault, 1999 ; Davison et al., 2005). Le virus décrit chez l'huître creuse, *C. gigas*, a été nommé ostreid herpes virus 1 (OsHV-1). Il est largement répandu dans les bassins conchylicoles français et sa présence est régulièrement détectée lors d'épisodes de surmortalité depuis 1994. En 2008 et 2009, un variant génotypique, appelé OsHV-1 μ var a été mis en évidence à partir d'isolats collectés lors d'épisodes de surmortalité. Le génotype OsHV-1 μ var se caractérise notamment par une délétion de 12 paires de bases dans l'ORF 4 par rapport au génome viral de référence (Davison et al., 2005). Actuellement, le génome de ce variant n'est pas connu dans son intégralité.

En 2008 et 2009, les caractéristiques des épisodes de surmortalité, observés en France, mais également en Irlande et dans les îles anglo-normandes, ont évolué (Cochennec-Laureau et al., 2009). Les taux de mortalité observés ont été très élevés, compris entre 60 et 100%, selon les sites et les lots d'animaux.

En 2008, la surmortalité a été observée simultanément dans l'ensemble des élevages du littoral français. Les naissains et les juvéniles ont été les plus touchés, sans différence entre naissains de captage et naissains d'écloserie (diploïdes et triploïdes). Trois pics de surmortalité ont été observés : fin mai-début juin, fin juin-mi juillet et fin juillet-début août 2008.

En 2009, les épisodes de surmortalité ont été différents de ceux de 2008. Ils ont commencé plus précocement, fin avril, et ont connu une progression du sud vers le nord des côtes françaises.

➤ Résultats d'analyses

Plusieurs lots d'huîtres présentant de la surmortalité ont fait l'objet de recherches de virus OsHV-1 et OsHV-1 μ var par PCR et séquençage de gènes viraux.

L'Ifremer (2009) a obtenu les résultats suivants :

- En 2008, sur 49 lots analysés, 32 (65%) se sont révélés positifs pour la détection du virus OsHV-1, dont 52% présentaient le génotype OsHV-1 μ var ;
- En 2009, sur 61 lots analysés pour la recherche d'herpesvirus, 57 (93%) se sont révélés positifs pour la détection du virus OsHV-1 par PCR ; le génotype OsHV-1 μ var représentait 100% de ces 57 lots positifs ;
- Le génotype OsHV-1 μ var n'a pas été détecté de façon rétrospective sur 54 lots conservés depuis la période 1995-2007.

Le laboratoire d'analyses du Conseil général du Calvados a testé, depuis août 2008, 221 échantillons issus de différentes zones littorales françaises, 35 échantillons prélevés en périodes de surmortalité, et 186 échantillons en dehors de ces périodes : parmi 171 échantillons positifs, le variant génotypique OsHV-1 μ var a été retrouvé dans 62% des cas. Dans les autres cas, le séquençage partiel du virus a mis en évidence différents variants, autres que OsHV-1 μ var. Dans tous les cas, le génotype de référence n'a pas été retrouvé.

Ces analyses mettent en évidence :

- l'émergence rapide de variants du virus OsHV-1, dont le génotype OsHV-1 μ var, et ce indépendamment du site géographique ;
- la substitution du génotype OsHV-1 de référence par ces variants.

➤ Pouvoir pathogène expérimental

Le pouvoir pathogène du virus OsHV-1 est connu depuis plusieurs années au stade larvaire chez l'huître creuse. Compte tenu du caractère récent de l'émergence du génotype OsHV-1 μ var, les caractéristiques du pouvoir pathogène de ce variant et de sa transmission n'ont été précisées que récemment. En particulier, Schikorski et al. (2010) ont mis en évidence, de manière expérimentale, la transmission du génotype OsHV-1 μ var par cohabitation entre huîtres saines et huîtres infectées expérimentalement, âgées de moins d'un an. Après 48 heures de cohabitation des deux catégories d'huîtres, ils ont observé des phénomènes de mortalité chez les huîtres initialement saines. Le génotype OsHV-1 μ var a été détecté chez tous les animaux morts, en l'absence de bactéries pathogènes, ce qui permet d'attribuer la mortalité observée au pouvoir pathogène intrinsèque du virus.

➤ Conclusion

Comme évoqué dans les avis antérieurs de l'Afssa, la surmortalité d'huîtres creuses est associée d'une part à des agents infectieux, en particulier l'herpèsvirus et, d'autre part, à l'environnement et la réceptivité de l'hôte, qui favorisent l'expression de la mortalité. Au vu des éléments dont dispose le Gecu en mars 2010, le rôle de l'herpèsvirus OsHV-1 μ var, dans le phénomène de surmortalité sur le littoral français en 2008 et 2009 peut être considéré comme prépondérant.

Les résultats d'analyses disponibles montrent que la fréquence d'OsHV-1 de référence peut y être considérée comme faible à très faible par rapport au variant génotypique OsHV-1 μ var.

II) Question n°2 : « Existe-t-il un réservoir biologique (sauvage et/ou domestique) et/ou environnemental d'OsHV-1 et d'OsHV-1 μ var avec, s'il existe plusieurs réservoirs, leur importance relative ? »

➤ Existence d'un réservoir biologique

On considère dans cette réponse un « réservoir » comme une source prolongée d'un agent infectieux (hôte réservoir) et non pas une source occasionnelle, ponctuelle (hôte intermédiaire ou messager).

- Plusieurs études, notamment Arzul et al. (2001b, 2001c), ont mis en évidence la présence du virus OsHV-1 chez **des mollusques bivalves autres que l'huître creuse**, dont l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), la coquille Saint Jacques (*Pecten maximus*) et la palourde, commune (*Ruditapes decussatus*) et japonaise (*R. philippinarum*). Une contamination interspécifique, à l'origine de mortalité, a par ailleurs été démontrée expérimentalement par cohabitation de différentes espèces de mollusques (Arzul et al., 2001a), ce qui peut se produire en situation naturelle dans les éclosiers et dans certaines zones d'élevage.

Le rôle des mollusques sauvages en tant que réservoir du virus OsHV-1 reste mal précisé à l'heure actuelle.

- Indépendamment du rôle possible des autres espèces de mollusques bivalves, **C. gigas** joue très certainement un rôle majeur de réservoir car c'est l'espèce la plus représentée dans les élevages conchylicoles français. Au sein de l'espèce *C. gigas*, il a été montré que des sujets adultes pouvaient être infectés de façon asymptomatique et demeurer porteurs du virus (Arzul et al. 2002 ; Sauvage et al. 2009). En 2009, des suivis de lots sur le terrain ont permis de détecter de l'ADN viral chez des animaux survivants d'épisodes de surmortalité, indiquant une persistance possible du virus chez ces animaux (Saulnier et al., communication personnelle).

Entre juillet 2008 et septembre 2009, le laboratoire départemental du Calvados a analysé 221 échantillons d'huîtres, dont neuf issus d'adultes, les autres provenant de naissains (Houssin M, communication personnelle). Parmi les échantillons, le virus OsHV-1 μ var et ses autres variants ont été détectés, par PCR TaqMan, durant quasiment toute la période, avec des charges virales faibles et très hétérogènes en dehors des périodes de mortalité, et avec une nette augmentation, en phase de mortalité, de la fréquence de PCR positives comme de la charge virale. Sur les neuf lots adultes testés, deux étaient porteurs de virus détectable par PCR.

Par ailleurs, Sauvage et al. (2009) suggèrent l'existence de familles ou groupes d'huîtres moins sensibles au virus OsHV-1, qui pourraient contribuer à l'existence d'un réservoir du virus.

La pérennité de l'infection chez des huîtres adultes pourrait favoriser une transmission verticale du virus. Celle-ci est suggérée par Barbosa-Solomieu et al. (2005) qui ont effectué un suivi sur trois générations et retrouvé de façon inconstante le virus dans les deux descendances, y compris chez des larves de deux jours.

Les porteurs asymptomatiques sont difficiles à mettre en évidence en raison des faibles quantités de virus présentes et des limites du diagnostic en termes de sensibilité. Le

diagnostic d'une infection par le virus OsHV-1 repose actuellement sur les techniques PCR, qui se sont révélées plus sensibles que les méthodes d'hybridation in situ et immuno-enzymatiques (Arzul et al., 2002). Il existe deux techniques PCR validées :

- ✓ La PCR conventionnelle (non quantitative) permettant de mettre en évidence le virus OsHV-1 de référence et son génotype μ var. Cette méthode est préconisée dans le Règlement (UE) n°175/2010 ;
- ✓ La PCR-SYBR-Green en temps réel, technique quantitative décrite par Pépin et al. (2008) et utilisée par Sauvage et al. (2009);

Un résultat négatif chez des adultes signifie soit que le virus est effectivement absent, soit que la charge virale est trop faible pour être détectée selon les techniques PCR disponibles. L'évolution de ces techniques pourra permettre d'améliorer les capacités de détection d'OsHV-1 et de préciser la prévalence du virus chez les adultes asymptomatiques. Ainsi, une technique PCR Taq-Man quantitative en temps réel décrite par Martenot et al. (soumis pour publication), semble présenter une sensibilité accrue, mais doit faire l'objet d'une validation complète dans le cadre d'essais interlaboratoires.

La détection du virus OsHV-1 chez des sujets adultes infectés de façon asymptomatique suggère l'existence d'infections persistantes, comme pour les herpèsvirus de vertébrés.

De façon générale, les herpèsvirus peuvent persister chez leur hôte sous forme d'une infection latente, qui peut être rompue par des accès de réactivation virale, accompagnés de réexcrétion virale et parfois de récurrence de la maladie. Les accès de réactivation virale se produisent sous l'action de stimuli variés : facteurs environnementaux ou intrinsèques (altération de l'état général, reproduction,...). Durant la phase de latence, le virus n'existe pas à l'état de virion ; seul le génome est présent, le plus généralement sous une forme épisomique dans le noyau de certaines cellules. Cet état explique le nombre faible de copies de génome viral présentes en phase de latence, et donc la difficulté de déceler cette infection.

Chez le virus OsHV-1, à ce jour, il n'a pas été identifié de séquence homologue aux gènes de latence connus chez d'autres herpèsvirus, ce qui ne permet pas aujourd'hui d'assimiler de façon certaine l'infection persistante asymptomatique chez les huîtres adultes à une infection latente.

Un suivi à long terme, au bout d'un an, et de deux ans, de naissains et juvéniles ayant survécu à un épisode de surmortalité pourrait apporter des éléments susceptibles de préciser le rôle des adultes en tant que réservoir du virus.

➤ Réservoir environnemental

Au vu des connaissances actuelles, l'existence d'un réservoir environnemental (non associé à la présence de cellules hôtes vivantes) pour le virus OsHV-1 semble à exclure. Le virus OsHV-1 est un virus enveloppé dont les lipides d'enveloppe sont facilement dégradés par détergence ou solubilisation, ce qui mène à l'inactivation du virus dans le milieu extérieur. Vigneron et al. (2004) ont placé des virions purifiés dans différents milieux et conditions, et ont évalué par PCR leur persistance. Ils ont retrouvé de l'ADN viral dans de l'eau de mer pendant 16 jours à 4 °C, 9 jours à 11 °C et un jour à 20 °C. Toutefois, la présence d'ADN n'est pas associée de façon certaine à celle de virus infectieux.

De plus, selon les observations disponibles à ce jour, il semble que le virus OsHV-1 ne survive pas plus de quelques jours dans de l'eau de mer « propre ».

Des données de survie dans l'eau sont disponibles pour d'autres herpèsvirus aux caractéristiques physico-chimiques et structurales supposées comparables à celles du virus OsHV-1. L'herpèsvirus cyprin 3 (CyHV-3) perd son infectivité en 3 jours dans une eau à plus de 15 °C (Shimizu et al., 2006). Le virus de la maladie d'Aujeszky voit son infectivité diminuée à moins de 10 UFP (unités formant plages)/ml en 7 jours en eau de puits et en 2 jours en eau de lagune (Schoenbaum et al., 1991).

➤ Conclusion

Au vu des éléments disponibles en mars 2010, on peut considérer qu'il existe un réservoir biologique du virus OsHV-1 et de ses variants, essentiellement constitué par des mollusques bivalves (huîtres creuses et plates, palourdes, coquilles Saint-Jacques...). L'espèce *C. gigas* semble y occuper une place prépondérante car elle est la plus représentée dans les élevages conchylicoles.

Au sein de l'espèce *C. gigas*, les adultes semblent pouvoir jouer un rôle de réservoir, le virus ayant été détecté chez des adultes infectés de façon asymptomatique.

L'évolution des modalités d'élevage, avec des productions et délocalisations de naissains toute l'année, favorise par ailleurs les mélanges de générations d'huîtres, et donc les risques que les jeunes mollusques se contaminent auprès d'adultes.

Le rôle de réservoir des mollusques sauvages, bien que probable, reste à préciser.

L'existence d'un réservoir environnemental semble à ce jour peu probable ; l'eau peut jouer un rôle dans la transmission, mais non dans la conservation de virus infectieux à long terme.

III) Question n°3 : « En cas de réponse positive à la question 2 : peut-on considérer la situation comme enzootique, durablement implantée et appelée à se renouveler d'année en année si les seules mesures prises sont les restrictions de transfert d'huîtres originaires de zones où les surmortalités seraient de nouveau observées vers des zones où ce phénomène ne l'est pas ? Dans ce cas, le maintien de ces mesures est-il pertinent ? »

➤ Situation épidémiologique vis-à-vis du OsHV-1 et de ses variants

Les éléments décrits précédemment, concernant notamment les épisodes de 2008 et 2009, étendus à tout le littoral français, ainsi que l'existence de réservoirs biologiques, amènent à considérer la situation comme enzoo-épizootique, avec un risque élevé que les épisodes de surmortalité se reproduisent dans les années à venir. Le Gecu s'est déjà prononcé en ce sens dans l'avis 2009-SA-0273.

➤ Pertinence du maintien des mesures de restriction de transfert d'huîtres originaires de zones où les surmortalités seraient de nouveau observées, vers des zones où ce phénomène ne l'est pas

En cas de déplacements d'huîtres depuis des zones connaissant ou ayant connu des épisodes de surmortalité vers des zones qui seraient encore indemnes, il existe un risque non négligeable d'introduire des animaux porteurs du virus, et donc de contaminer la zone d'accueil encore indemne. Il faut toutefois préciser que des mesures de restriction de transferts ne suffiraient probablement pas à assurer le maintien du statut indemne d'une zone, en raison des facteurs naturels pouvant permettre une diffusion du virus, comme les courants marins, ou du fait de facteurs humains (non respect de la réglementation, déplacements incontrôlés, par exemple).

➤ Conclusion

Le Gecu est favorable au maintien des mesures de restriction de transfert d'huîtres originaires de zones où les surmortalités seraient de nouveau observées vers des zones de destination où ce phénomène ne l'est pas.

IV) Question n° 4 : « Quels sont les dispositifs de traitement de l'eau de mer approvisionnant un établissement conchylicole qui inactivent les virus à enveloppe ou réduit le risque de contamination des eaux naturelles par des maladies à un niveau acceptable ? »

Cette question sera traitée dans un second avis, car elle nécessite l'acquisition de données (d'observation en particulier) dont ne disposent pas les experts aux jours de réunion.

V) **Question n° 5 : « Quel est le risque d'observer un nouveau phénomène de surmortalité d'un niveau au moins comparable à celui de 2009 ? La réponse sera, le cas échéant, modulée en fonction des facteurs et des situations suivants :**

- **de la période de l'année ;**
- **du stade de développement des huîtres nouvellement immergées dans le milieu naturel ;**
- **du fait que le lot à immerger a été détecté positif au test officiel de recherche d'OsHV-1 et OsHV-1 μ var ;**
- **du fait que le lot à immerger a été détecté négatif au test officiel de recherche d'OsHV-1 et d'OsHV-1 μ var alors que ce lot était positif à un précédent test de dépistage OsHV-1 ou OsHV-1 μ var ;**
- **de tout autre facteur que vous auriez estimé à risque. »**

Les données épidémiologiques relatives à la surmortalité recueillies durant ces dernières années, et en particulier au cours de 2008 et 2009, mettent en avant :

- le rôle important du virus OsHV-1 dans l'étiologie de la surmortalité et l'émergence de variants de ce virus dont le génotype OsHV-1 μ var,
- la large répartition de la surmortalité sur le littoral français,
- l'atteinte de sujets jeunes, des naissains principalement,
- l'existence d'un réservoir biologique de virus, notamment les huîtres adultes, mais également d'autres espèces de mollusques bivalves.

Ces éléments permettent de considérer que le risque d'observer une nouvelle surmortalité d'un niveau au moins comparable à celui de 2009 est élevé à très élevé.

De plus, le Gecu estime que :

➤ comme les années précédentes, la période de survenue de ces épisodes devrait s'étendre d'avril à août 2010, en raison notamment de l'augmentation de la température de l'eau et du franchissement d'un seuil thermique (des travaux sont en cours à l'Ifremer afin de déterminer la plage thermique propice à la multiplication virale) ;

➤ les animaux les plus touchés seront probablement de nouveau les naissains et juvéniles, qui représentent les populations nouvellement exposées au virus. De plus, la multiplication cellulaire active chez ces jeunes huîtres pourrait favoriser la réplication virale ;

➤ lorsqu'un lot à immerger a été détecté positif au test officiel de recherche d'OsHV-1 et OsHV-1 μ var, il est considéré comme infecté. Par conséquent, le risque que ce lot connaisse un épisode de surmortalité et, qu'en outre, il contamine la zone dans laquelle il serait immergé, est très élevé ;

➤ lorsqu'un lot à immerger a été détecté négatif au test officiel de recherche d'OsHV-1 et d'OsHV-1 μ var alors que ce lot était positif à un précédent test de dépistage OsHV-1 ou OsHV-1 μ var, cette « négativation » peut être a priori attribuée à deux causes possibles :

- soit le second test a été réalisé en utilisant une technique moins sensible que la première. On peut noter que les « tests officiels » seront réalisés par des laboratoires agréés utilisant tous les mêmes techniques précisées dans la note de service DGAL/SDPPST/N2010-8069 du 11 mars 2010, à savoir la PCR en temps réel SYBR-Green décrite par Pépin et al. (2008) pour la détection de le virus OsHV-1 (génotype de référence et génotype μ var) et la PCR conventionnelle préconisée par le Règlement (UE) n°175/2010 pour la détection ciblée du génotype OsHV-1 μ var ;
- soit la quantité d'ADN viral est devenue inférieure au seuil de détection, du fait d'un passage à un stade de portage asymptomatique, assimilable à la latence virale des herpèsvirus et décrit dans la réponse à la question n°2.

Dans les deux cas, on ne peut considérer ce lot comme indemne d'infection par le virus OsHV-1 ou OsHV-1 μ var. Par conséquent, le risque qu'il connaisse un épisode de surmortalité et, qu'en outre, il contamine le milieu dans lequel il serait immergé, est très élevé ;

- d'autres facteurs sont susceptibles de moduler le risque d'apparition de la surmortalité :
 - Une augmentation de température assez rapide, de l'ordre de 2 à 3 °C sur un laps de temps court (quelques jours) devrait favoriser le déclenchement des épisodes de surmortalité, notamment en accélérant la multiplication virale ;
 - Lorsque la surmortalité survient, un grand nombre d'huîtres mortes et moribondes sont laissées sur place sur l'estran. Ces animaux constituent une source importante de particules virales infectieuses, et donc de contamination, même si la survie du virus dans l'eau n'est pas très longue ;
 - Des facteurs génétiques sont incriminés dans l'expression de la surmortalité des huîtres. Ainsi, Dégremont et al. (2007) ont réalisé des croisements à partir d'huîtres sauvages, et ont observé une mortalité différente en fonction des géniteurs mâles ayant contribué aux fécondations. De plus, Sauvage et al. (2009) ont observé que trois familles élevées dans le même bassin (donc exposées au même risque infectieux) présentaient des comportements différents : deux familles subissaient une mortalité importante, associée à la détection d'une quantité importante d'ADN viral, alors que la troisième ne présentait qu'un très faible taux de mortalité, associé à un meilleur contrôle de la charge virale. Les résultats de cette étude suggèrent l'existence, chez certaines familles d'huîtres d'une résistance à l'expression de la surmortalité et/ou d'une capacité à limiter la multiplication virale.

VI) Question n°6 : « En cas de réponse positive à tout ou partie de la question 5, quelles sont les mesures que vous recommanderiez de prendre en fonction des facteurs ou situations que vous auriez estimés à risque ? »

Des recommandations ne peuvent pas porter sur les facteurs de risque qu'il n'est pas possible de modifier, comme l'augmentation de température de l'eau, les facteurs climatiques généraux, l'âge auquel les huîtres sont sensibles à l'OsHV-1...

Pour d'autres facteurs de risque, des recommandations peuvent être émises :

- En présence d'un grand nombre d'huîtres moribondes et mortes lors d'un épisode de surmortalité, il est souhaitable d'éliminer rapidement ces animaux, dans la mesure du possible (notamment en fonction de l'accès aux parcs conchylicoles) et de les détruire de la manière la plus opportune au regard de chaque situation (équarrissage ou enfouissement et chaulage) ;
- La sélection de lignées exprimant moins de surmortalité pourrait contribuer à en réduire l'importance, sous réserve que les résultats d'expérimentations en cours à l'Ifremer viennent conforter les éléments disponibles actuellement. Toutefois, il faut considérer que des animaux « résistants » qui seraient capables de s'infecter sans développer de symptômes pourraient constituer de nouveaux réservoirs du virus OsHV-1 ;
- L'évolution actuelle des modes d'élevage, notamment l'augmentation de la densité d'animaux et le rythme soutenu d'introduction des jeunes huîtres, influent probablement sur la surmortalité. Un espacement de l'introduction des huîtres dans les bassins, permettant une distinction plus marquée entre générations, pourrait limiter les risques de contamination des naissains auprès des adultes.
Il serait également souhaitable de ne pas immerger des jeunes huîtres en période d'augmentation de température rapide (environ 2 à 3 °C sur quelques jours), période propice à la multiplication virale ;
- Le développement de compartiments totalement indépendants et étanches les uns par rapport aux autres, sous réserve de sa faisabilité, pourrait diminuer les risques de contamination ; ces compartiments nécessiteraient un approvisionnement en eau « propre » et indemne de virus.

Conclusion du Gecu

Telles sont les réponses que le Gecu peut apporter aux questions posées par la DGAI, au vu des connaissances disponibles. »

CONCLUSION

Tels sont les éléments d'analyse que l'Afssa est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la DGAI concernant un avis relatif à la surmortalité d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*).

En outre, en raison du rôle prépondérant des agents infectieux, en particulier du virus OsHV-1 et de ses variants, dans la surmortalité de *C. gigas*, les seules mesures de restriction de transfert d'huîtres issues de zones à nouveau atteintes de surmortalité ne pourront prévenir l'extension de ce phénomène vers des zones indemnes. En effet, ces mesures reposent uniquement sur l'expression clinique de l'infection, sans tenir compte du portage asymptomatique possible du virus.

Afin de prévenir la contamination de zones ou pays qualifiés indemnes de virus OsHV-1 et de ses variants, l'Afssa recommande :

- de définir et de mettre en place une procédure européenne de certification sanitaire adaptée aux zones d'origine et de destination des huîtres ; cette certification serait appliquée lors des transferts de géniteurs, de juvéniles (issues d'écloseries ou de captages naturels) et d'adultes entre des bassins de production de statuts sanitaires différents ;
- de définir, en conséquence, le statut sanitaire des différents bassins de production, notamment au regard du virus OsHV-1 et de ses variants.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Huître creuse, *Crassostrea gigas*, surmortalité, OsHV-1, OsHV-1 μ var

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arzul I, Renault T, Lipart C (2001a) Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves : demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* 46, 1-6.
- Arzul I, Nicolas JL, Davison AJ, Renault T (2001b) French scallops: a new host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology* 290, 2, 342-349.
- Arzul I, Renault T, Lipart C, Davison AJ (2001c) Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* 82, 865-870.
- Arzul I, Renault T, Thébault A, Gérard A (2002) Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* 84, 151-160.
- Barbosa-Solomieu V, Dégremont L, Vazquez-Juarez R, Ascensio-Valle F, Boudry P, Renault T (2005) Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Research* 107, 47-56.
- Cochennec-Laureau N, Baud J-P, Bedier E, Boudry P, Huvet A, Nicolas J-L, Pepin J-F, Petton B (2009) Synthèse des “Journées mortalité de l’huître creuse, *Crassostrea gigas*” 15p.
- Davison AJ, Benes LT, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le deuff, R-M, Renault T (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 86, 41-53.
- Dégremont L, Ernande B, Bédier E, Boudry P (2007) Summer mortality of hatchery-produced pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262, 41-53.
- Houssin M, Berthaux M, Martenot C, Oden E, Travaillé E (communication personnelle) Détection de l’Ostreid Herpesvirus de type 1 chez les naissains d’huîtres, 16 p
- Le Deuff, RM, Renault T (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology*, 80, 1317-1322
- Martenot C, Oden E, Travaillé E, Malas JP, Houssin M. Comparison of two real-time PCR methods for detection of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) (soumis pour publication)
- Nicolas JL, Comps M, Cochennec N (1992) Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2, 11-13
- Pépin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 149, 2, 269-276.
- Renault T, Cochennec N, Le Deuff RM, Chollet B (1994a) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 14, 64-66
- Renault T, Le Deuff RM, Cochennec N, Maffart P (1994b) Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-comparative study. *Revue Médicale Vétérinaire* 145, 735-742

Sauvage C, Pepin J-F, Lapègue S, Boudry P, Renault T (2009) Ostreid herpesvirus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Research* 142, 181-187.

Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault (2010) Experimental Ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. Ifremer Annual Meeting Nantes.

Schoenbaum M.A., Freund J.D., Beran G.W (1991) Survival of pseudorabies virus in the presence of selected diluents and fomites. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 198, 1393-1397.

Shimizu T, Yoshida N, Kasai H, Yoshimizu M (2006) Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathology*, 41, 153-157.

Vignerot V, Sollic G, Montanié H, Renault T (2004) Detection of Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, 35-44.