



Focus sur un laboratoire

Un laboratoire communautaire de référence pour les maladies des mollusques au cœur du Bassin Marennes-Oléron

I. Arzul, IFREMER, La Tremblade (France)

Arzul I. (2009). A European reference laboratory for mollusc diseases located at the heart of the Marennes-Oléron Bay, cahiers de la Référence, No. 2, CR2-09F01. <http://www.afssa.fr/cahiersdelareference/numero2/PN4010.htm>



Le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) Ifremer de La Tremblade est le laboratoire de référence des maladies des mollusques pour l'Europe depuis 1995. Il exerce également cette activité de référence pour la France et est désigné laboratoire OIE de référence pour la bonamiose et la martelliose. Ces différents mandats lui confèrent des missions dont l'objectif principal est l'harmonisation du diagnostic de ces maladies. Le LGP développe en parallèle des activités de recherche sur les maladies et la génétique des bivalves marins. Cette position lui permet d'être réactif en cas d'épizootie et d'adapter les stratégies de surveillance en tenant compte des résultats et développements les plus récents. Des locaux uniquement dédiés aux activités de référence et de surveillance lui ont notamment permis d'être accrédité pour les analyses en histopathologie.

La production de coquillages en Europe avoisine les 700 000 tonnes (FAO, 2006) et repose essentiellement sur les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (490 000 t) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (126 000 t). Ces chiffres globaux cachent une disparité entre pays européens en termes d'espèces, de quantités produites et d'organisation de la filière. Quel que soit le pays considéré, la production repose sur de nombreux transferts à des fins d'aquaculture ou à des fins de vente pour consommation. Or, les maladies des coquillages constituent une limite majeure à cette production et les transferts d'animaux vivants représentent le risque principal d'introduction d'organismes pathogènes. En l'absence de possibilité de vaccination des invertébrés marins, de traitement et d'éradication des organismes pathogènes en milieu ouvert, le contrôle des maladies des mollusques repose aujourd'hui essentiellement sur le contrôle des transferts d'animaux vivants, en particulier lorsque le pays importateur est reconnu comme indemne de certaines maladies.

C'est dans ce contexte que le laboratoire de génétique et pathologie (LGP), Ifremer La Tremblade a été désigné comme laboratoire communautaire de référence (LCR) pour les maladies des mollusques en 1995. Les missions du LCR visent à l'harmonisation de l'approche diagnostique pour la détection des maladies des mollusques au sein de l'Union européenne. Elles concernent avant tout les maladies à déclaration obligatoire que sont les infections à *Bonamia ostreae* et à *Martellia refringens* pour les maladies endémiques et les infections à *B. exitiosa*, *Perkinsus marinus* et *Mikrocytos mackini* pour les maladies considérées comme exotiques. Néanmoins, les activités du LCR visent également à détecter et contrôler tout cas d'émergence d'un agent pathogène pouvant affecter la conchyliculture européenne. Par exemple, l'herpès virus OsHV-1 et les souches bactériennes du genre *Vibrio* détectés récemment lors des mortalités anormales d'huîtres creuses en France pourraient être soumis à déclaration si leur distribution apparaissait restreinte à certaines zones de production et si leur dispersion pouvait être jugulée par des restrictions de transferts.

Les missions du LCR sont précisées dans la Directive 2006/088/EEC. Concrètement, elles s'articulent autour (1) du développement et de la validation d'outils diagnostiques, (2) de l'aide aux laboratoires nationaux de référence en termes de diagnostic et d'étude épidémiologique, (3) de l'animation du réseau des laboratoires de référence européens. Le LCR fournit également un appui scientifique et technique en particulier pour la Direction Générale pour la Santé du Consommateur (DG Sanco).

Le LCR se situe au sein du LGP qui développe des travaux de recherche sur la génétique et la pathologie des bivalves marins. Le LGP rassemble 12 chercheurs, 11 techniciens et 3 étudiants en thèse. Parmi ces personnes, 5 cadres et 3 techniciens travaillent plus particulièrement pour le LCR et sont également affectés aux activités de surveillance à l'échelle nationale ou à des activités de recherche. Le LCR dispose de locaux spécifiques dédiés aux activités d'analyse en histologie, cytologie, bactériologie et biologie moléculaire et est accrédité depuis 2009 sur le programme 111 (histopathologie) du COFRAC. La proximité entre recherche et surveillance et la polyvalence du personnel sont extrêmement bénéfiques tant pour l'orientation des recherches que pour les choix en terme de stratégie de surveillance.

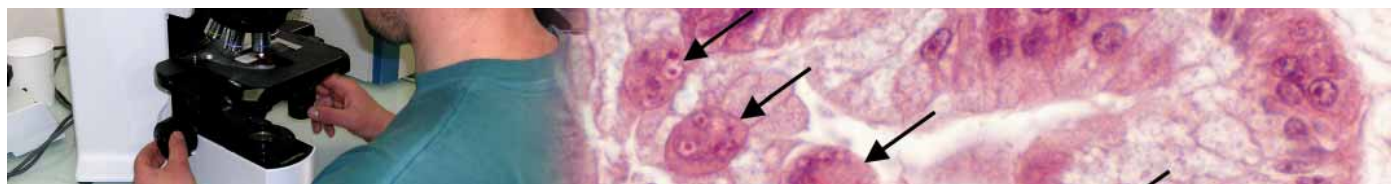
Cet article présente le LCR pour les maladies des mollusques et décrit ses activités à travers des exemples concrets tout en les positionnant dans un contexte régional et international.

Des outils diagnostiques adaptés et validés

Le diagnostic des maladies des mollusques repose surtout sur l'examen de lames histologiques et cytologiques. Cette approche permet de détecter les organismes pathogènes à déclaration obligatoire qui sont tous aujourd'hui des protozoaires. L'histologie permet également d'apprécier l'état général des tissus et la présence éventuelle de lésions. Ces outils ne sont cependant pas spécifiques, sont peu sensibles et ne sont pas adaptés à la détection des infections virales et bactériennes. Des outils de PCR (Polymerase Chain Reaction)



Focus sur un laboratoire



et PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Length Polymorphism) ont donc été développés par le laboratoire de façon à permettre la détection rapide et la caractérisation de parasites tels que *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*.

Afin de proposer ces techniques comme méthodes de référence pour le diagnostic de routine, le LCR a entrepris leur validation en les comparant aux techniques de cytologie par apposition d'organe. Par exemple, la comparaison des résultats de PCR (Cochennec *et al.*, 2000) et d'apposition de tissus cardiaques d'huîtres plates pour la détection de *Bonamia ostreae* a permis de définir les sensibilité et spécificité pour ces deux méthodes qui peuvent varier en fonction des prévalences des populations testées. Récemment, le laboratoire a caractérisé des gènes d'actine de *B. ostreae* (Lopez-Flores *et al.*, 2007), ce qui a permis le développement d'une PCR en temps réel pour la détection et la quantification du parasite (Robert *et al.*, 2009). Cette technique apparaît plus sensible et plus spécifique que la cytologie ou la PCR classique. De plus, de par sa capacité de quantification, elle ouvre des perspectives en terme d'étude du cycle du parasite au sein de son hôte mais également dans l'environnement.

L'organisation d'essais de comparaison inter-laboratoires (EIL) est une des obligations du LCR et est une activité indispensable à l'harmonisation du diagnostic à l'échelle européenne. À ce jour, le LCR a organisé six EIL visant la détection des agents pathogènes à déclaration obligatoire en histologie et/ou cytologie. En 2008, un premier test concernant la détection des parasites *Bonamia sp.* par PCR a été proposé aux LNR.

De l'aide aux laboratoires nationaux de référence

Le LCR maintient une collection de matériel de référence depuis 1997. Cette collection comporte du matériel concernant les principaux agents pathogènes des mollusques rencontrés en Europe mais également à travers le monde. Il s'agit principalement de tissus inclus en blocs de paraffine, de lames histologiques, de tissus fixés en alcool, d'extraits d'ADN et de souches bactériennes. Cette collection est régulièrement enrichie de nouveaux matériels; elle permet notamment de répondre aux demandes de matériel de référence des LNR et des laboratoires de diagnostic situés en dehors de l'Europe. Un Cd-rom incluant de nombreuses photos des collections de lames histologiques a été créé en 2002 afin de faciliter l'accès au matériel histologique et d'aider les personnes impliquées dans le diagnostic par histologie des maladies des mollusques. Ce Cd-rom est régulièrement mis à jour et complété.

Le LCR est sollicité pour des doubles lectures de lames histologiques ainsi que des analyses de confirmation. Différentes techniques sont alors mises en œuvre telles que PCR, PCR-RFLP, clonage, séquençage et hybridation *in situ*. Le LCR contribue ainsi à la caractérisation de parasites du

genre *Bonamia* (Corbeil *et al.*, 2006) ou *Marteilia* (Carrasco *et al.*, 2007) dans le cadre de collaborations européennes ou internationales. Suite à la notification de *B. exitiosa*, parasite considéré comme exotique, en Espagne en 2007, le LCR, avec le soutien de la DG Sanco, a proposé aux LNR un programme de surveillance visant à définir la carte de distribution de cet organisme pathogène. Dans ce contexte, le LCR offrirait son soutien aux LNR pour la caractérisation moléculaire du parasite qui faisait appel à des PCR-RFLP, du clonage et séquençage.

Afin d'aider les LNR en terme de management de la qualité, le LCR a rédigé des procédures standardisées pour les principales étapes du diagnostic des maladies des mollusques. Ces procédures sont validées après circulation au sein du réseau des LNR et accessibles depuis le site internet <http://www.ifremer.fr/crlmollusc/>. Aujourd'hui, 9 procédures sont disponibles dont 2 concernant la détection et caractérisation de *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* par PCR-RFLP.

De l'animation de réseau

Le LCR a une mission d'animation du réseau qui compte aujourd'hui 21 LNR pour les maladies des mollusques. Ceux-ci sont invités à participer aux réunions annuelles qui sont parfois organisées conjointement à des ateliers pratiques. Au cours de ces réunions annuelles, le LCR propose des sessions de présentation de la situation épidémiologique des différents pays au regard des maladies des mollusques mais aussi des sessions concernant de nouveaux outils diagnostiques ou des travaux de recherche récents. Les ateliers pratiques portent sur le diagnostic des maladies des mollusques et peuvent ainsi consister à l'observation de lames histologiques/cytologiques ou à la réalisation de test en PCR-RFLP depuis l'extraction d'ADN jusqu'à l'interprétation des résultats. Par ailleurs, la position de référence européenne et OIE du LGP l'amène à accueillir de nombreux scientifiques pour quelques jours ou quelques semaines afin de les former au diagnostic et à la surveillance des maladies des mollusques.

Le LCR a créé une liste de diffusion par courrier électronique qui lui permet de communiquer aux LNR des informations importantes comme par exemple la notification de *Bonamia exitiosa* en Espagne en 2007 ou l'apparition de surmortalités anormales d'huîtres creuses en France en 2008. Cette liste permet également d'annoncer les réunions annuelles/ateliers pratiques ainsi que les EIL. Le site internet du LCR constitue un outil riche en termes de communication et d'animation du réseau. Il comporte de nombreuses informations pratiques pour l'activité des laboratoires du réseau.

De par les études développées ainsi que ses compétences en épidémiologie, surveillance et diagnostic des maladies des mollusques, le LCR est invité à participer à des projets européens sur les maladies des animaux aquatiques et à des programmes de coopérations internationales. Les conclusions



Focus sur un laboratoire

et recommandations élaborées sont présentées et discutées lors des réunions annuelles et diffusées aux LNR. Le LCR a également initié un groupe de travail sur les « microcells », nom générique pour désigner des protozoaires de petite taille, parasites des mollusques, qui comptent aujourd'hui les espèces des genres *Bonamia* et *Mikrocytos*. La dernière réunion de ce groupe de travail a été organisée à La Tremblade en 2008. Les résultats les plus récents sur ces agents pathogènes y ont été présentés.

Conclusion

Le contrôle des maladies aquatiques et plus particulièrement celles affectant les mollusques présente des spécificités en raison de l'absence d'anticorps et de la difficulté d'utiliser des traitements ou d'éradiquer un agent pathogène dans le milieu ouvert. Ces spécificités requièrent des connaissances et compétences dont dispose le LCR et qu'il partage à travers le réseau des LNR qu'il anime. L'implication du personnel du LCR sur des missions de surveillance et de recherche se traduit par une forte réactivité du laboratoire, notamment en cas d'apparition d'agents pathogènes exotiques en Europe tels que *B. exitiosa* ou des surmortalités anormales observées en 2008 et 2009 en France.

Références

- Carrasco N, López-Flores I, Alcaraz M, Furones MD, Berthe FCJ, Arzul I. 2007. First record of a *Marteilia* parasite (Paramyxea) in zooplankton populations from a natural estuarine environment. *Aquaculture*, 269: 63-70.
- Cochennec N, Le Roux F, Berthe F, Gerard A. 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, 76: 26-32.
- Corbeil S, Arzul I, Robert M, Berthe FC, Besnard-Cochennec N, Crane MSJ. 2006. Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis Aquat Organ*, 71(1): 81-5.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006, FishStat, <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>
- Lopez-Flores I, Suarez-Santiago VN, Longet D, Saulnier D, Chollet B, Arzul I. 2007. Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. *Parasitology*, 134: 1941-1948.
- Robert M, Garcia C, Chollet B, Lopez-Flores I, Ferrand S, François C, Joly J-P, Arzul I. 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular and Cellular probes*, 23(6): 264-271