



AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à une évaluation du risque zoonositaire **de la nocardiose à *Nocardia crassostreae*** **chez les coquillages marins**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le 1^{er} décembre 2010 par la Direction générale de l'Alimentation (DGA) d'une demande d'avis relatif à une évaluation du risque zoonositaire de la nocardiose à *Nocardia crassostreae* chez les coquillages marins.

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Nocardia crassostreae (*N. crassostreae*) est une bactérie susceptible d'infecter les huîtres creuses *Crassostrea gigas* (*C. gigas*) ; elle a également été détectée chez des huîtres plates *Ostrea edulis* (*O. edulis*) élevées à proximité de *C. gigas* infectées. Elle peut être à l'origine d'abcès jaune-vert dont le diamètre peut dépasser un centimètre. La présence de cette bactérie a été rapportée aux Etats-Unis, au Canada et au Japon. En Europe, elle ne l'a été qu'aux Pays-Bas depuis 2006 avec une faible prévalence. En France, elle n'a jamais été identifiée à ce jour. Par ailleurs, la nocardiose ne fait l'objet d'aucune réglementation, nationale, communautaire ou internationale.

Dans ce contexte, la profession conchylicole souhaiterait la mise en place d'une surveillance de cette maladie au niveau communautaire.

Au regard de ces éléments, l'Anses a été saisie sur les points suivants :

- (1) « *l'impact de la nocardiose sur la santé des coquillages marins, notamment en cas d'implantation de cet agent pathogène dans les bassins français, et ce au regard des conséquences directes sur la santé animale, à savoir la morbidité, la létalité et les pertes de production, ainsi que sur d'éventuelles recommandations en matière d'interdiction de transfert de coquillages marins pour l'élevage, entre zones de statuts zoonositaires différents ;*
- (2) *le risque d'introduction et de diffusion de cette maladie en France à partir de territoires ayant signalé la présence de N. crassostreae dans leurs produits d'élevage. »*

3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence (Gecu) « Nocardiose » réuni les 4 avril et 20 mai 2011. La coordination scientifique du Gecu « Nocardiose » a élaboré un projet de rapport qui a été validé par voie télématique les 30 et 31 mai 2011.

L'expertise s'est appuyée sur :

- le document de travail préparé par l'un des experts et discuté en réunion ;
- la bibliographie citée en fin d'avis ;
- les discussions entre les membres du Gecu.

4. ANALYSE ET CONCLUSION DU GECU

« 1. Impact de la nocardiose sur la santé des coquillages marins

La nocardiose est une infection bactérienne due à N. crassostreae (cf. annexe 1 relative aux caractères bactériologiques). Les infections à N. crassostreae, naturelles et expérimentales, ont été observées chez l'huître creuse C. gigas, associées à des phénomènes de mortalité, plus particulièrement chez les animaux adultes. Les infections décrites ci-dessous se rapportent aux huîtres creuses.

Nocardia crassostreae a également été détectée chez des huîtres plates O. edulis élevées à proximité d'huîtres creuses infectées, par exemple en Colombie britannique (Bower et al., 2005). La bactérie est pathogène chez O. edulis et peut induire une mortalité.

A ce jour, N. crassostreae n'a pas été rapportée chez d'autres espèces de coquillages marins.

1.1. Infections naturelles : données épidémiocliniques

Nocardia crassostreae est responsable d'une infection appelée nocardiose ou Pacific Oyster Nocardiosis (PON) (d'autres dénominations sont également utilisées : « fatal inflammatory bacteraemia » (FIB), « focal necrosis », « multiple abscesses » ou « summer mortality »).

- *L'infection touche principalement les huîtres matures de deux ans et plus, mais des animaux plus jeunes peuvent être atteints.*
- *D'un point de vue géographique, l'infection à N. crassostreae a été rapportée chez des huîtres adultes lors d'épisodes de mortalité estivale :*
 - ✓ *au Japon, dans les baies de Matsushima et d'Hiroshima, associée à de sévères taux de mortalité estivale de C. gigas adultes dans les années 50. La bactérie Nocardia avait été identifiée (Fujita et al., 1953 et 1955 ; Takeuchi et al., 1955 ; Numachi et al., 1965), mais les chercheurs japonais avaient attribué ces phénomènes de mortalité à des désordres physiologiques liés aux conditions environnementales et non à des agents infectieux (Tamate et al., 1965 ; Imai et al., 1965 et 1968) ;*
 - ✓ *en Amérique du Nord, au Canada et aux Etats-Unis, sur la côte ouest, de la Colombie britannique à la Californie. La bactérie, bien qu'identifiée lors d'épisodes sévères de mortalité estivale d'huîtres creuses dans l'Etat de Washington et en Californie dans les années 60, n'avait pas été retenue comme agent causal (Lindsay, 1969 ; Sindermann et Rosenfield, 1967 ; Glude, 1975). Aux Etats-Unis, dans les années 90, Friedman et al. ont rapporté dans différentes publications le pouvoir pathogène expérimental de la bactérie en l'absence d'autres agents pathogènes ;*
 - ✓ *aux Pays-Bas : N. crassostreae a été rapportée pour la première fois en Europe en 2006, lors d'un épisode de mortalité estivale d'huîtres creuses C. gigas observé dans le lac Grevelingen au sud-ouest des Pays Bas. L'élevage s'y fait sur un sol vaseux ou sableux. Un échantillon d'huîtres prélevé pour la recherche d'agents infectieux a*

permis de mettre en évidence des lésions jaune-verdâtre chez plusieurs animaux lors d'une inspection visuelle. Les analyses histologiques ont montré la présence de lésions laissant suspecter une infection à bactérie de type *Nocardia* chez quatre individus sur 36. De plus, *N. crassostreae* a été détectée dans des échantillons d'hémolymphe, par PCR et par séquençage, la séquence (ARNr 16s) obtenue étant identique à celle des isolats de *N. crassostreae* provenant de la côte ouest de l'Amérique du Nord.

Pour cet épisode de mortalité, la détresse physiologique liée aux conditions d'environnement, notamment des températures élevées sur une longue période et de faibles niveaux en oxygène, a été identifiée comme cause primaire ; *N. crassostreae* a été présentée comme agent infectieux impliqué secondairement dans l'épisode de mortalité observé. Par ailleurs, sur ce même site (lac Grevelingen), l'infection par *N. crassostreae* a également été identifiée chez des huîtres plates *O. edulis*.

Après 2006, *N. crassostreae* a été retrouvée à plusieurs reprises chez les deux espèces dans le cadre d'une surveillance automnale. En 2010, deux *C. gigas* ont été trouvées infectées sur 25 animaux testés et huit *O. edulis* sur 150 animaux testés (Central Veterinary Institute, Epidemiological report 2010). Il faut noter que, dans le cadre de cette surveillance, des bactéries *Nocardia*-like ont été détectées dans quelques échantillons d'animaux asymptomatiques depuis 2003, dans le lac de Grevelingen et dans l'estuaire de l'Escaut oriental (Engelsma, communication personnelle).

N. crassostreae n'a pas été rapportée à ce jour dans d'autres pays que ceux cités ci-dessus.

La distribution géographique de *N. crassostreae* pourrait être plus large du fait des transferts d'huîtres creuses à partir de la zone Pacifique ; elle pourrait ainsi se trouver dans d'autres sites où l'espèce *C. gigas* est présente (Elston, 1993 ; Bower et al., 2005).

- L'habitat de *N. crassostreae* dans l'environnement est inconnu à l'heure actuelle. Certains auteurs ont suggéré qu'à l'instar de nombreuses espèces de *Nocardia*, *N. crassostreae* pourrait être une bactérie saprophyte du sol, en particulier des sols vaseux, et opportuniste chez des huîtres affaiblies par différents facteurs, notamment lors de développement gonadique important et lorsque l'eau, de température élevée (18 à 23 °C), est riche en nutriments et pauvre en oxygène (Friedman et Hedrick, 1991). Selon une autre hypothèse, *N. crassostreae* pourrait infecter les huîtres de façon inapparente et devenir pathogène chez des animaux soumis à un stress (Bower et al., 2005).
- La voie de contamination est inconnue, mais l'hypothèse d'une transmission via l'appareil digestif et le tractus génital a été évoquée (Elston et al., 1987 ; Bower et al., 2005).
- Cliniquement, la nocardiose se traduit par le développement de pustules, de couleur jaune-vert, dont le diamètre peut dépasser un centimètre et correspondant à des abcès localisés. Des ulcères sont possibles. Ces lésions sont observées sur le manteau, les branchies, le cœur et le muscle adducteur. Elles sont caractéristiques de la nocardiose, mais non pathognomoniques (Elston, 1993). Le manteau peut présenter des zones de coloration brune anormale (Friedman et al., 1998). Des lésions étendues du muscle adducteur peuvent altérer la capacité de fermeture des valves de l'huître, d'où une exposition aux prédateurs et à la déshydratation hors de l'eau (Bower et al., 2005).

Bien que l'infection à *N. crassostreae* ne soit pas systématiquement létale, elle a été associée à des phénomènes de mortalité en fin d'été et au début de l'automne. L'infection apparaît généralement lorsque la nourriture est abondante et la température de l'eau élevée, et elle peut être observée jusqu'en novembre. Les plus forts taux d'infection sont rapportés en septembre. Les épisodes de mortalité observés évoluent sur un mode sporadique, enzootique.

- La prévalence de l'infection est variable et peut atteindre des taux élevés, notamment lors d'épisodes de mortalité. Elston et al. (1987) ont rapporté la nocardiose chez environ 30% des huîtres dans le Puget Sound, Washington, durant des épisodes de mortalité en 1984 et

1985. Friedman et al. (1991) ont recherché la bactérie par examen histologique de 30 huîtres âgées de 2 à 3 ans sur 13 sites de la côte ouest d'Amérique du Nord, avec et sans historique de PON ou de mortalité estivale. Six sites se sont avérés infectés, les pourcentages d'animaux infectés s'échelonnant entre 5 et 50%. L'un des sites a été suivi du 7 juillet au 5 novembre 1986 : jusqu'au milieu de l'été, pas ou peu de mortalité a été observée, avec un taux d'infection de 16 à 22%. La mortalité a augmenté fin août, associée à un taux d'infection de 37%, suivie d'un pic de mortalité en septembre, accompagné d'un taux d'infection de 58%. Celui-ci a ensuite baissé. En Colombie britannique (Canada), des prévalences comprises entre 3 et 30% ont été observées entre 1986 et 2002, associées dans environ 1/3 des cas, à des lésions ou des épisodes de mortalité (Bower et al., 2005). La bactérie peut être détectée toute l'année chez des huîtres situées dans des zones contaminées.

L'infection et la mortalité semblent être plus importantes parmi les huîtres creuses directement élevées sur le sol, en particulier sur sol vaseux. A l'inverse, l'élevage surélevé paraît limiter l'impact de l'infection (Bower et al., 2005). Les huîtres issues de ce mode d'élevage seraient moins infectées par *N. crassostreae* (Elston, 1993). Cette observation conforterait l'hypothèse de la persistance de la bactérie dans le sédiment comme c'est le cas pour de nombreuses espèces de *Nocardia* ; en revanche, la bactérie ne circulerait pas dans l'eau. Ces hypothèses restent toutefois à confirmer, notamment en analysant de façon répétée le sédiment, l'eau et les huîtres dans des sites appartenant à des zones où la nocardiose est enzootique (Bower et al., 2005).

1.2. Infections expérimentales

La nocardiose a pu être reproduite expérimentalement par injection intracardiaque de la bactérie *Nocardia crassostreae* chez l'huître creuse *C. gigas*. Ainsi, Friedman et Hedrick (1991) ont réalisé deux essais : dans le premier, cinq des dix huîtres creuses infectées expérimentalement sont mortes (aucune des dix huîtres du lot témoin n'est morte) ; toutes ont présenté des modifications pathologiques associées à l'infection. Dans le deuxième essai, réalisé sur 51 huîtres infectées expérimentalement, comparées à un lot témoin de même taille, la mortalité cumulée à la fin des 34 jours de l'étude a été de 47% (versus 8% dans le lot témoin). L'infection à *Nocardia* a été mise en évidence par histologie chez 20 des 23 huîtres mortes examinées et chez deux huîtres parmi dix survivantes.

Dans ces deux essais, l'infection expérimentale a reproduit les mêmes signes cliniques et lésions que ceux observés dans les conditions naturelles. De plus, la même bactérie a été ré-isolée en culture pure, chez les animaux infectés expérimentalement (mais pas chez les témoins), ce qui confirme le rôle étiologique de *Nocardia crassostreae*.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence une transmission de la bactérie via l'eau, au cours d'une expérience de cohabitation d'huîtres saines avec des huîtres issues de deux sites infectés pendant plusieurs mois, ni via les sédiments lors d'une expérience utilisant du sédiment issu de zones contaminées et d'une expérience dans laquelle le sédiment a été contaminé (Friedman et al., 1991).

En résumé :

- *N. crassostreae* a été décrite chez *C. gigas* et *O. edulis* ; elle touche principalement les huîtres adultes ;
- l'infection à *Nocardia* a été décrite au Japon, sur la côte ouest de l'Amérique du Nord et aux Pays-Bas, avec des prévalences d'infection variables, pouvant aller jusqu'à près de 60% ;
- le pouvoir pathogène de *N. crassostreae*, au vu des données obtenues en conditions naturelles et expérimentales, apparaît modéré ;
- la nocardiose se traduit par des abcès (voire des ulcères) de plus d'un centimètre, jaune - vert, et a été associée à des épisodes de mortalité en milieu – fin d'été. Ces épisodes semblent évoluer sur un mode sporadique, dans des conditions défavorables aux huîtres, laissant supposer un caractère pathogène opportuniste de *N. crassostreae* ;

- la seule expérience de cohabitation entre huîtres saines et huîtres infectées rapportée à ce jour n'a pas permis de démontrer la possibilité de transmission via l'eau ou les sédiments.

2. Risque d'introduction et de diffusion de cette maladie en France à partir de territoires ayant signalé la présence de *N. crassostreae*

2.1. Situation actuelle en France au regard de l'infection à *N. crassostreae*

En France, l'infection à *N. crassostreae* n'a pas été identifiée à ce jour. Aucune surveillance ciblée (active) de l'infection bactérienne, intégrant en particulier une recherche fondée sur des outils de diagnostic moléculaire, n'y a été réalisée à ce jour chez l'huître creuse. Cependant, très peu d'épisodes de mortalité ont touché des lots d'adultes, tranche d'âge la plus touchée par la nocardiose. De plus, des analyses histologiques sont réalisées de manière systématique depuis le début des années 90 lors de phénomènes de mortalité anormale d'huîtres creuses et d'autres espèces de bivalves, dont l'huître plate dans le cadre du Réseau Pathologie des Mollusques (Repamo). Les résultats de ces examens histologiques n'ont jamais été évocateurs d'infections à *N. crassostreae*.

2.2. Risque d'introduction de *N. crassostreae* en France à partir de territoires ayant signalé sa présence

Au vu des données disponibles présentées ci-dessus, le risque d'introduction de *N. crassostreae* en France serait lié à l'importation d'huîtres en provenance de pays et de zones où elle a été rapportée (cf. paragraphe 1.2. Distribution géographique) ou de zones où la bactérie serait présente mais n'aurait pas encore été identifiée.

D'un point de vue réglementaire, l'infection à *N. crassostreae* n'est pas à déclaration obligatoire, que ce soit au niveau national, européen ou international. Elle ne figure pas sur la liste OIE des maladies des mollusques marins, ni dans la directive 2006/88/CE du Conseil du 24 octobre 2006. Elle ne fait donc pas l'objet d'un dépistage avant transfert ni de mesures de restriction de transfert.

Le Règlement (CE) n° 1251/2008 de la Commission du 12 décembre 2008 interdit l'importation d'huîtres destinées à l'élevage en provenance du Japon et du Canada. Il autorisait l'importation de mollusques marins en provenance de certains sites des Etats-Unis, mais cette autorisation a été suspendue.

Au sein de l'Union européenne, les échanges d'huîtres creuses et plates sont possibles dans le cadre de la directive 2006/88/CE.

Il existe donc un risque d'introduction en France de *N. crassostreae* à partir des sites européens contaminés, qu'ils aient été ou non identifiés. Ce risque est proportionnel aux quantités d'huîtres importées et à la prévalence de l'agent dans les populations d'huîtres. L'isolement de la bactérie dans des échantillons de petite taille indiquerait une prévalence relativement élevée de *N. crassostreae*. Il est à noter qu'à partir du seul pays européen où la bactérie a été identifiée à ce jour (Pays-Bas), il n'y a eu récemment aucune exportation d'huîtres plates et d'huîtres creuses vers la France (en 2009 et 2010) (source : DGAI).

2.3. Risque de diffusion de *N. crassostreae*

Il existe peu de données précisant le devenir de la bactérie, une fois introduite sur un site. *Nocardia crassostreae* pourrait être saprophyte (notamment des sédiments vaseux), son pouvoir pathogène ne s'exprimant que dans certaines conditions favorables (cf. supra). Elle pourrait s'implanter dans l'environnement et contaminer d'autres huîtres, notamment dans les élevages non surélevés. Elle serait alors susceptible d'occasionner des épisodes de mortalité dans des conditions défavorables pour les huîtres.

L'éradication de la bactérie semble non réalisable après introduction et diffusion, comme pour les autres espèces de *Nocardia*, notamment du fait de sa distribution sans doute assez large dans l'environnement.

On peut noter que l'origine la plus probable de l'introduction de *N. crassostreae* aux Pays-Bas est considérée comme étant l'importation de *C. gigas* en provenance du Japon en 1964 ainsi que de

naissain originaire des Etats-Unis et du Japon jusqu'en 1977. Le délai entre l'importation des huîtres et la détection récente de *N. crassostreae* plaide en faveur de la persistance de la bactérie dans l'environnement après son introduction et de son comportement d'agent pathogène opportuniste (Engelsma et al., 2008).

En résumé :

Il existe un risque d'introduction, puis de diffusion de l'infection à *N. crassostreae* à partir de territoires dans lesquels l'infection a été signalée, même s'il est difficile, au vu des éléments disponibles, de l'estimer précisément. L'introduction de cet agent pathogène pourrait avoir pour conséquence une implantation durable de *N. crassostreae* dans les sites de destination. Le scénario supposé de contamination des Pays-Bas pourrait se reproduire en cas d'introduction d'huîtres contaminées en France.

3. Recommandations en matière d'interdiction de transfert de coquillages marins pour l'élevage, entre zones de statuts zoosanitaires différents

- La mise en place en Europe d'une **surveillance active ciblée** de la bactérie *Nocardia crassostreae* chez les huîtres creuses et les huîtres plates apparaît comme une première approche utile pour préciser sa distribution. Cette surveillance serait à réaliser à grande échelle, sur plusieurs sites et durant toute l'année, en utilisant les outils moléculaires aux fins de diagnostic. Ces études pourraient permettre notamment de vérifier l'hypothèse d'un portage de *N. crassostreae* par des huîtres apparemment saines. Chez les huîtres asymptomatiques, il conviendrait d'associer la PCR à l'examen histologique afin d'augmenter la sensibilité du diagnostic (voir l'annexe 2 relative au diagnostic d'infection à *N. crassostreae*).

Dans le cadre d'un projet européen (Bivalife, FP7, 2011-2013), il est prévu de rechercher *N. crassostreae* dans plusieurs pays membres de l'Union Européenne (Espagne, France, Irlande, Italie et Pays-Bas). Dans le cadre de ce projet, les premiers résultats devraient être obtenus début 2012.

Toute souche de *N. crassostreae* qui serait identifiée dans une zone dans le cadre d'actions d'épidémiologie ciblées devrait être caractérisée au plan de son pouvoir pathogène sur des huîtres issues de la même zone.

La transmissibilité de la bactérie serait également à étudier, par inoculation et par cohabitation.

Enfin, le rôle des sédiments comme réservoirs de *Nocardia* serait à préciser. L'intérêt d'un mode de culture surélevé, qui serait susceptible de réduire la prévalence et la sévérité de la maladie, pourrait être modulé en fonction des résultats obtenus.

La présence de la bactérie chez d'autres espèces de coquillages marins pourrait être recherchée, compte tenu de l'absence actuelle de données sur ce point.

- A l'issue de cette surveillance active, en fonction des premiers résultats obtenus, certains pays pourraient être amenés à déterminer leur statut zoosanitaire au regard de *N. crassostreae*. Les pays se déclarant indemnes de nocardiose pourraient être autorisés à mettre en place des mesures réglementaires visant à restreindre les échanges à partir de zones à statut infecté ou inconnu.
- Des membres du Gecu considèrent que, dans l'attente de ces résultats, la France devrait éviter d'importer pour l'élevage des huîtres à partir des zones et pays identifiés comme infectés par cette bactérie.

Conclusion du Gecu « Nocardiose »

La nocardiose est une infection due à la bactérie *N. crassostreae*. Depuis la fin des années 40, elle a été décrite chez l'huître creuse *C. gigas* et l'huître plate *O. edulis* adultes au Japon, puis sur la Côte ouest de l'Amérique du Nord, aux Etats-Unis et au Canada, ainsi qu'aux Pays-Bas. Elle n'a pas été rapportée à ce jour dans d'autres pays, dont la France.

Plusieurs incertitudes demeurent, notamment quant à la distribution géographique de l'infection, au(x) réservoir(s) de l'agent pathogène, à son mode de transmission et à l'expression de son pouvoir pathogène chez les huîtres, observé sporadiquement dans les conditions naturelles et mis en évidence expérimentalement. Bien que les taux de mortalité liée à la nocardiose n'aient pas été mesurés de manière précise, la sévérité de l'infection chez certains animaux et la forte prévalence dans certaines populations d'huîtres suggèrent que cette infection bactérienne pourrait être dans certaines conditions un facteur de mortalité important.

Par conséquent, il est recommandé :

- de mettre en place une surveillance active ciblée de *Nocardia crassostreae* afin de préciser la distribution géographique de la bactérie ;
- en cas d'identification de *N. crassostreae*, d'étudier :
 - (1) l'expression de son pouvoir pathogène sur des huîtres issues du même secteur ;
 - (2) sa transmissibilité par inoculation et cohabitation ;
 - (3) le rôle des sédiments comme réservoir éventuel de la bactérie ;
 - (4) l'éventuelle sensibilité d'autres espèces de coquillages marins à la bactérie.

En fonction des résultats obtenus, certains pays pourraient déterminer leur statut zoosanitaire au regard de la bactérie. Les transferts d'huîtres destinées à l'élevage entre secteurs de statuts zoosanitaires différents pourraient alors faire l'objet de restrictions. Des membres du Gecu considèrent que, dès à présent, et dans l'attente de ces résultats, la France devrait éviter d'importer pour l'élevage des huîtres à partir des zones et pays identifiés comme infectés par *N. crassostreae*. »

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses souscrit aux recommandations du Gecu concernant la surveillance active *N. crassostreae* et l'étude des souches bactériennes qui seraient isolées en France. Elle propose de réaliser cette surveillance notamment dans les zones constituant un écosystème favorable à la bactérie (zones vaseuses du littoral, bassins et « lacs » intérieurs). L'exposition des huîtres à l'infection, voire l'expression clinique de l'infection, pourraient être favorisée dans certaines conditions d'élevage qui placent les huîtres dans de tels écosystèmes.

L'Anses considère également, comme certains membres du Gecu, qu'il est préférable, dans l'attente des résultats de la surveillance active, d'éviter les importations en France à partir de zones infectées, d'huîtres qui seraient destinées à l'élevage. En effet, malgré les incertitudes relatives à sa transmissibilité dans les conditions naturelles et à l'expression de son pouvoir pathogène chez les huîtres, *N. crassostreae* a été impliquée dans des épisodes de mortalité des huîtres adultes et son pouvoir pathogène intrinsèque a été mis en évidence expérimentalement.

Cette recommandation se justifie d'autant plus en France, que la surveillance passive effectuée par le réseau Repamo depuis les années 90 (lors de tout épisode de mortalité anormale d'huîtres creuses et autres bivalves) n'a jamais été à l'origine de suspicions de nocardiose. Cette surveillance passive étant considérée comme efficace, il est probable, sans qu'on puisse l'affirmer avec certitude, que la France soit actuellement indemne de *N. crassostreae*.

Les circonstances particulières à la France, où la filière ostréicole est déjà très affectée par l'épizootie due au virus OsHV-1, justifient la plus grande prudence en matière d'importations, d'autant que des huîtres adultes porteuses latentes de l'herpèsvirus pourraient être plus sensibles à l'infection par un pathogène potentiellement opportuniste tel que *N. crassostreae*.

Cette recommandation de prudence s'appliquerait également à toute autre zone indemne ou présumée indemne de nocardiose, dans l'attente d'être en mesure de définir le statut zoosanitaire de zones et pays au regard de *N. crassostreae*.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Mots clés : nocardiose, *Nocardia crassostreae*, huîtres, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*

BIBLIOGRAPHIE

Bower SM, Goh B, Meyer GR, Carnegie RB, Gee A (2005) Epizootiology and detection of nocardiosis in oysters. Diseases in Asian Aquaculture V. Proceedings of the Fifth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 249-262.

Directive 2006/88/CE du Conseil du 24 octobre 2006 relative aux conditions de police sanitaire applicables aux animaux et aux produits d'aquaculture, et relative à la prévention de certaines maladies chez les animaux aquatiques et aux mesures de lutte contre ces maladies.

Elston RA, Beattie JH, Friedman C, Hedrick R, Kent ML (1987) Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J Fish Dis 10, 121-132.

Elston RA (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Annual Review of Fish Diseases, 259-276.

Engelsma MY, Roozenburg I, Joly JP (2008) First isolation of *Nocardia crassostreae* from Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Europe. Dis Aquat Organ 80, 229-34.

Friedman CS, Hedrick RP (1991) Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. J Invertebr Pathol 57, 109-120.

Friedman CS, Beattie JH, Elston RA, Hedrick RP (1991) Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. Aquaculture 94, 1.

Friedman CS, Beaman BL, Chun J, Goodfellow M, Gee A, Hedrick RP (1998). *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. Int J Syst Bacteriol. 48 Pt 1, 237-46.

- Fujita T, Matsubara T, Hirokawa H, Araki F (1953) On the inflammatorious changes of the *Ostrea gigas* in Hiroshima Bay. Bull Japan Soc Fish Sci 19, 766-770 (en japonais, avec résumé en anglais).
- Fujita T, Matsubara T, Hirokawa H, Araki, F (1955) On the inflammatorious changes of the *Ostrea gigas* in Hiroshima Bay-II. Bull Japan Soc Fish Sci 20, 1063-1065 (en japonais, avec résumé en anglais).
- Gee A, Elston RA (1997) PCR detection of the bacterial pathogen in oyster nocardiosis. J Shellfish Res 16, 264 (résumé).
- Glude JB (1975) A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972. In Proceedings of the Third U.S. Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Japan October 15-16, 1974. Special Publication of Fishery Agency, Japanese Government and Japan Sea Regional Fisheries Research Laboratory, 1-27.
- Imai T, Numachi K, Oizumi J, Sato S (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplanted experiment. Bulletin of the Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory 25, 27-38 (en japonais, avec résumé en anglais).
- Imai T, Mori K, Sugawara Y, Tamate H, Oizumi J, Itakawa O (1968) Studies on the mass mortality of oysters in Matsushima Bay VII. Pathogenic investigation. Tohoku Journal of Agricultural Research 25, 27-38.
- Lindsay CE (1969) Summary of progress of Pacific oyster mass mortality investigations, 1967-68. 21st Annual Report of the Pacific Marine Fisheries Commission for the Year 1968, 36-38.
- Numachi KI, Oizumi J, Sato S, Imai T (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay III. The pathological changes of the oyster caused by Gram-positive bacteria and their frequency of their infection. Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute 25, 39-48.
- Règlement (CE) n° 1251/2008 de la Commission du 12 décembre 2008 portant application de la directive 2006/88/CE du Conseil en ce qui concerne les conditions et les exigences de certification applicables à la mise sur le marché et à l'importation dans la Communauté d'animaux d'aquaculture et de produits issus de ces animaux et établissant une liste des espèces vectrices.
- Sindermann CJ, Rosenfield A (1967) Principal diseases of commercially important marine bivalve Mollusca and Crustacea. Fisheries Bulletin 66, 335-385.
- Takeuchi T, Matsubara T, Hirokawa H, Tsukiyama A (1955) Bacteriological studies on the unusually high mortality of *Ostrea gigas* in Hiroshima Bay-I. Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 20, 1066-1070 (en japonais, avec résumé en anglais).
- Tamate H, Numachi K, Mori K, Itikawa O, Imai T (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. VI. Pathological studies. Bulletin of the Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory 25, 89-104 (en japonais, avec résumé en anglais).

ANNEXES

ANNEXE 1

CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES DE *N. CRASSOSTREAE*

Le genre *Nocardia* a été mis en évidence à partir de 1945 chez *C. gigas*. L'espèce *N. crassostreae* a été identifiée comme agent de la nocardiose par Friedman *et al.* (1998). Il s'agit d'une bactérie Gram positif appartenant à l'ordre des Actinomycétales, aérobie stricte, immobile, acido-alcool-résistante, se présentant sous forme de mycélium avec des prolongements de formes variables.

D'un point de vue taxonomique, *N. crassostreae* est proche des espèces *N. otitidiscaviarum* et *N. seriolae*.

L'analyse phylogénétique de la séquence des ARNr 16S permet de distinguer trois groupes de *Nocardia* :

- le groupe de *Nocardia asteroides* ;
- le groupe de *Nocardia otitidiscaviarum*, dont *N. crassostreae* ;
- le groupe de *Nocardia salmonicida*.

La croissance de la bactérie est obtenue à des températures comprises entre 22 et 30°C. Des températures supérieures à 30°C semblent l'arrêter.

ANNEXE 2

DIAGNOSTIC DE L'INFECTION DE L'HUÎTRE
A *N. CRASSOSTREAE*

(1) Histologique

- Sur empreinte de tissus (en particulier à partir de manteau ou de muscle adducteur présentant des lésions), l'infection bactérienne se manifeste par la présence de bactéries filamenteuses Gram positif.
- A l'examen histologique, l'infection se traduit par la présence de foyers denses de bactéries Gram positif entourés d'un grand nombre d'hémocytes dans les tissus conjonctifs de différents organes. La plupart des organes peuvent être touchés, suggérant une faible spécificité tissulaire et un caractère systémique de l'infection, comme chez de nombreuses autres espèces de *Nocardia*. Friedman *et al.* (1991) ont observé des lésions principalement dans les gonades et le tissu conjonctif vésiculaire entourant l'intestin et, dans une moindre mesure, le manteau, le tissu conjonctif entourant les diverticules digestifs, les branchies, le cœur et le muscle adducteur. Bien que la coloration hémalum-éosine ne permette pas de colorer systématiquement la bactérie, les colonies peuvent être facilement identifiées.

(2) Bactériologique

La bactérie peut être cultivée sur milieu BHI (Brain Heart Infusion). Après 3 à 5 jours de culture, la bactérie apparaît sous forme de colonies d'aspect cireux. L'isolement en culture de *N. crassostreae* est nécessaire pour l'extraction de l'ADN bactérien.

(3) Par PCR

- Le séquençage du gène codant pour ARNr 16S à partir d'ADN extrait de bactéries en culture (Brain Heart Infusion, BHI) permet également un diagnostic de confirmation par comparaison avec les séquences disponibles dans GenBank/EMBL (U92799 et U92800).
- Deux couples d'amorces et une sonde ont été développés par Gee et Elston (1997). Un premier couple d'amorces amplifie un fragment du gène codant pour l'ARNr 16S et ciblant plusieurs espèces bactériennes produisant de l'acide mycolique, dont les *Nocardia*. Le second couple d'amorces permet d'amplifier spécifiquement les bactéries appartenant au genre *Nocardia* à partir des produits de PCR obtenus avec le premier couple d'amorces (PCR nichée). Cette première technique de PCR a été améliorée par traitement au lysozyme après digestion par la protéinase K afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction de l'ADN bactérien (Bower *et al.*, 2005). Cette technique de PCR apparaît plus sensible que l'histologie, en particulier dans le cas d'infections précoces ou à très faibles niveaux.