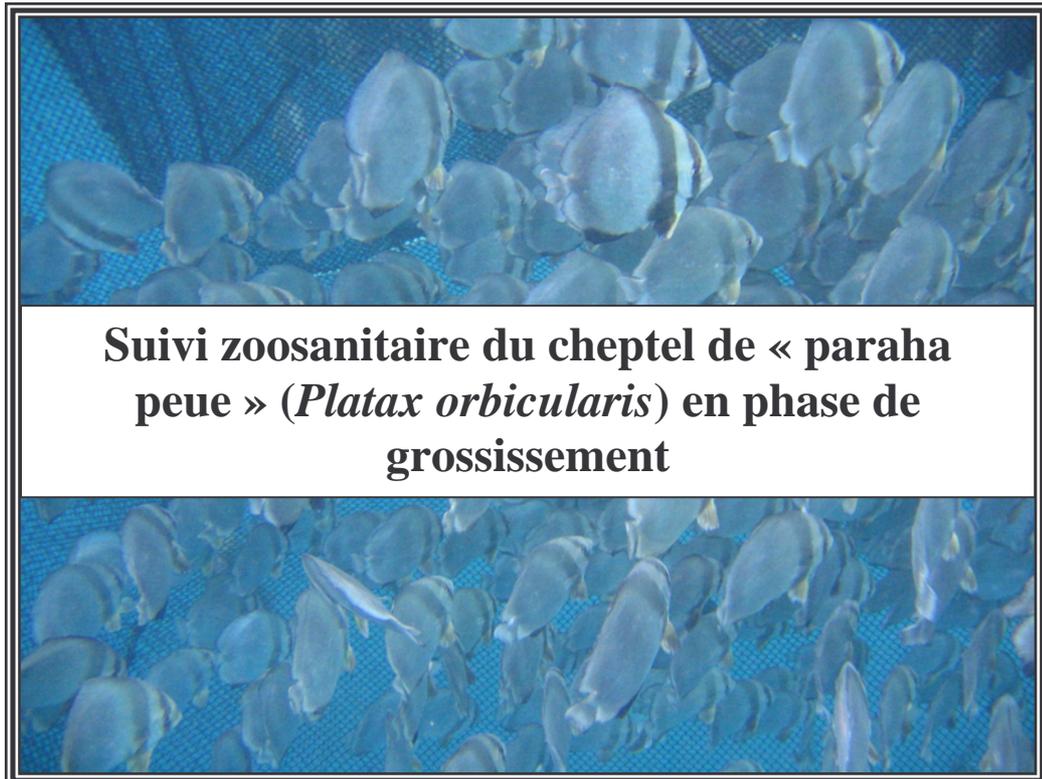


Rapport de soutenance de stage
2^{ème} année de Master BGAE
Spécialité EFDD



Parcours : Bioressources Aquatiques en Environnement
Méditerranéen et Tropical



Ambre VAN CAM

Maîtres de stage et organismes d'accueil :

Georges REMOISSENET
LAUREAU
Service de la Pêche de Polynésie française
Pacifique
BP 20 Fare Ute
98 713 Papeete
Tahiti, Polynésie française

Nathalie COCHENNEC-
Ifremer-Centre Océanologique du
BP 7004
98 719 Taravao
Tahiti, Polynésie française



Service de la Pêche
PIHA RAVA'AI



Août 2008

Table des matières

<u>INTRODUCTION</u>	p. 1
<u>I. DESCRIPTIF DES ORGANISMES D'ACCUEIL</u>	p. 3
<u>II. MATERIELS ET METHODES</u>	p. 4
<u>II. 1. Matériel biologique</u>	p. 4
<u>II. 2. Matériel thérapeutique</u>	p. 4
▪ <u>Les produits utilisés</u>	p. 4
▪ <u>Voies d'administration et posologies</u>	p. 5
<u>II. 3. Transfert et répartition des lots</u>	p. 5
<u>II. 4. Suivi des poissons dans leur nouvel environnement</u>	p. 6
▪ <u>Les différents types de suivi</u>	p. 6
▪ <u>Fréquence des suivis</u>	p. 7
<u>II. 5. Eléments d'appréciation statistique</u>	p. 7
<u>II. 6. Evaluation de la toxicité du peroxyde d'hydrogène</u>	p. 8
<u>III. RESULTATS, INTERPRETATIONS ET ACQUISITIONS</u>	p. 8
<u>III. 1. Suivi zoosanitaire</u>	p. 8
▪ <u>Taux de mortalité</u>	p. 8
▪ <u>Développement du parasite monogène</u>	p. 9
▪ <u>Autres organismes identifiés</u>	p. 11
○ <i>Bactérie responsable d'épithéliocystis</i>	p. 11
○ <i>Trichodine</i>	p. 12
<u>III. 2. Suivi journalier</u>	p. 12
<u>III. 3. Evaluation de l'efficacité des traitements préventifs</u>	p. 13
▪ <u>Présentation de la matrice de résultats</u>	p. 13
▪ <u>Etude des corrélations entre symptômes et traitement</u>	p.20
▪ <u>Etude de similarité des échantillons</u>	p. 25
▪ <u>Interprétation</u>	p. 26
<u>III. 4. Evaluation du traitement curatif</u>	p. 26
▪ <u>Evaluation de la toxicité</u>	p. 26
▪ <u>Evaluation de l'efficacité</u>	p. 27

III. 5. <u>Bilan de la situation</u>	p. 28
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	p. 31
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	p. 32
<i>ANNEXES</i>	p. 33

INTRODUCTION

En Polynésie française, la pisciculture a débuté dans les années 80 avec des essais réalisés sur plusieurs espèces introduites pour leur fort potentiel aquacole : le loup tropical ou barramundi (*Lates calcarifer*), le loup tempéré (*Dicentrarchus labrax*), la daurade (*Sparus aurata*), puis au niveau privé, le tilapia doré (*Oreochromis aureus*). Bien plus tard (2001), un programme de développement de la pisciculture nommé « Programme pisciculture d'espèces lagunaires » a sélectionné deux espèces dont le poisson chauve-souris ou « paraha peu » (*Platax orbicularis*), un poisson à haute valeur ajoutée. Il s'agit d'un programme dirigé par le Service de la Pêche (SPE) et mené en collaboration depuis 2003 avec l'Ifremer-Centre Océanologique du Pacifique (COP). L'objectif est la maîtrise technique de la production de poissons lagunaires destinés au marché local de la consommation (1).

En 2004, dans le cadre de l'élevage, des épisodes de mortalités anormales en phase larvaire de *Platax orbicularis* ont été observés. Elles étaient dues à un agent infectieux viral déjà présent sur le loup tropical: le nodavirus. Depuis la mise en place de mesures prophylactiques, l'écloserie est aujourd'hui indemne de cette maladie. Par contre, la phase de grossissement en cages (milieu ouvert) présente beaucoup plus de difficulté pour la maîtrise des pathologies. Les principaux agents pathogènes identifiés sont des bactéries et des parasites, notamment un ectoparasite monogène de la famille des Capsalidés initialement identifié comme *Neobenedenia sp.*. Par ailleurs, tout facteur de stress (densités élevées, dégradation des conditions environnementales, manipulations zootechniques...) contribue à l'affaiblissement de l'état physiologique et du système immunitaire des poissons et favorise donc l'émergence des maladies (2). Celles-ci engendrent de nombreuses pertes, essentiellement lors des premières semaines de grossissement en cages. C'est pourquoi l'un des points prioritaires du programme de pisciculture est de développer le suivi et la prévention zoosanitaires des cheptels afin de surmonter les points de blocage.

En 2005, le cycle de production n'a pu être mené à terme du fait de l'apparition systématique de pathologies bactériennes et parasitaires, tout comme le deuxième cycle de 2006 (3). En 2007, on a remarqué que les épisodes de mortalité survenaient peu de temps après le transfert des juvéniles de l'écloserie vers les cages en mer. Par exemple, les résultats du premier cycle de cette même année ont montré l'émergence d'une maladie en quelques semaines chez des juvéniles transférés à un poids moyen de 8,5 g. Les poissons atteints présentaient divers symptômes comme la perte d'appétit, une opacification de la cornée, des exophtalmies et des plaies. Deux mois après leur mise en cage, le taux de mortalité s'élevait à 29 %. Toutefois, la piste d'un agent pathogène n'était pas la seule prise en compte pour expliquer les mortalités. L'équipe zootechnique s'est également penchée sur une cause environnementale et climatique aggravante (intempéries, eaux boueuses). Mais les résultats du troisième cycle de 2007 ont une fois de plus mis en avant un problème pathologique : en effet, les premiers symptômes ont été remarqués la troisième semaine après l'introduction des juvéniles dans leur nouvel environnement à un poids moyen de 50 g. A nouveau, il s'agissait des mêmes signes cliniques. Par ailleurs, un échantillonnage réalisé 28 jours post-transfert a permis d'examiner les poissons et de mettre en évidence un ectoparasite : a priori le *Neobenedenia sp.*. A ce moment, une forte suspicion s'est portée sur ce pathogène, soupçonné alors d'être la cause initiale des mortalités.

Il s'agit d'un vers plat, parasite de la peau et des branchies des poissons, dont la famille est connue pour être à l'origine d'épisodes de mortalités en pisciculture. De par sa rapidité de prolifération (parasite monoxène à courte durée de cycle de reproduction), il a un impact économique important sur les élevages en cage. On peut citer quelques exemples dans la région Asie-Pacifique où il pose problème: l'élevage de la sérieole en Australie et au Japon, du bar en Malaisie, du mérrou au Vietnam ou encore du cobia à Taïwan (4). Les mesures de

contrôle de cette maladie, comme pour toutes les maladies parasitaires, consistent à respecter de bonnes pratiques d'élevage et à appliquer régulièrement un traitement préventif afin de rompre le cycle de développement parasitaire. En cas de maladie déclarée, le cheptel reçoit un traitement curatif (exemple : bain au formol) (5). Concernant les poissons malades en grossissement, les agents du SPE les ont traités par bain d'eau douce et ont pu constater une régression des symptômes. Cependant, les conditions d'élevage en cage, le manque de main d'œuvre et la lourdeur de mise en place font que cette technique est difficile à mettre en œuvre. De plus, face à l'augmentation des interdictions régulières d'utilisation de substances thérapeutiques en aquaculture dont les produits sont destinés à la consommation, les éleveurs voient leur arsenal se réduire. Aucune alternative ne leur a cependant été présentée. Dans ce contexte, différentes molécules ont été mises sur le marché, mais bien souvent sans explication d'utilisation (dosage, toxicité, paramètres d'élevage...) avec pour conséquence des échecs thérapeutiques.

C'est dans ce cadre que j'ai réalisé mon stage : l'objectif de ma mission était d'apporter un soutien au développement des connaissances et des techniques dans le domaine du suivi et de la prévention zoonosaires du cheptel en phase de grossissement. Ce travail consiste à diagnostiquer les maladies (reconnaissance des symptômes et identification des agents pathogènes) et mettre en place des méthodes de lutte adaptées. Plus particulièrement, j'étais chargée d'apporter une meilleure connaissance des agents pathogènes et de l'évolution des affections suite à la mise en cage, et de trouver si possible des traitements appropriés. Pour cela, j'ai réalisé des expérimentations visant à suivre le développement des maladies et à évaluer l'efficacité de traitements préventif et curatif.

Par rapport à ce stage, mes objectifs personnels étaient les suivants :

- 1) rallier ma formation vétérinaire au domaine de l'aquaculture,
- 2) et me familiariser aux pratiques d'élevage.

Afin de les atteindre, j'ai commencé par effectuer une recherche bibliographique sur les pathologies décrites en pisciculture marine dans la région Asie-Pacifique. Cette étape préliminaire m'a permis de prendre connaissance des principaux agents pathogènes existants et des symptômes associés, de m'informer sur les techniques diagnostiques appropriées à chaque maladie et de rechercher les différentes méthodes de lutte employées par des pays où l'aquaculture est bien développée.

Ensuite, j'ai participé aux tâches de routine dans le but d'acquérir les bases de la zootechnie en pisciculture. Dans un même temps, je me suis investie dans le suivi zoonosaire afin d'être petit à petit formée à quelques techniques de prélèvements et de diagnostic que sont : l'état frais, l'histopathologie, la bactériologie.

Toutes ces étapes m'ont apporté une partie des compétences nécessaires au bon déroulement des expériences.

I. DESCRIPTIF DES ORGANISMES D'ACCUEIL

J'ai été accueillie par deux organismes, à savoir le SPE de Polynésie française et l'Ifremer-Centre Océanologique du Pacifique. Mon travail a été supervisé par mes deux maîtres de stage : M. Remoissenet G., « Responsable Développement Aquaculture » au sein du SPE et Mme Cochenec-Laureau N., « Chef du Laboratoire de Biotechnologies et de la Qualité de la Perle (LBQP) » au COP.

Le SPE est un organisme public placé sous l'autorité du Ministère de la mer, de la pêche et de l'aquaculture. Ses principales missions sont : la conception et la mise en œuvre des programmes de développement, la gestion des concessions maritimes, la gestion de la profession (ex : assistances technique et scientifique à la pêche) et les aides à l'investissement au bénéfice des pêcheurs côtiers et lagunaires. Le budget de fonctionnement hors salaire se situe aux alentours de 2,4 millions d'euros par an. Cinquante personnes travaillent sous la direction du chef de Service. Le recrutement passe par une demande d'ouverture de poste : pour un contrat à durée déterminée, le SPE lance un simple appel à candidature. Pour un contrat à durée indéterminée, la sélection passe par un concours, prioritairement ouvert en voie interne. L'organisation du Service se décline suivant un échelon central et un échelon déconcentré (annexe 1a). Ce dernier est composé de deux subdivisions : la subdivision déconcentrée de l'archipel des Iles-du-Vent organisée en trois cellules, et celle des autres archipels. Parmi les trois cellules, celle nommée « Développement » est chargée d'assurer le développement économique des secteurs des pêches hauturière et côtière, des ressources lagunaires et de l'aquaculture.

J'ai intégré l'équipe chargée du développement de la pisciculture basée sur le COP (annexe 1b), plus particulièrement l'unité « Pathologie aquacole » dont les missions sont le diagnostic des maladies, la mise en place de mesures prophylactiques et de fiches techniques, et la participation à la mise au point de méthodes et d'outils de diagnostic. Les activités de cette équipe découlent du « Programme Pisciculture Lagunaire » dont le but est la maîtrise technique de la production de poissons lagunaires. Le COP participe à ce programme en mettant à disposition du pays ses installations et son expertise scientifique. Par le biais d'une convention « recherche-développement », il apporte son soutien technique au Territoire. Implantation de l'Ifremer en Polynésie française, le COP a pour vocation la recherche appliquée au développement de l'aquaculture tropicale. Il s'investit essentiellement dans la filière perlicole, mais aussi en crevetticulture et en pisciculture. En 2007, le budget de fonctionnement était d'environ 930 000 euros dont 30% consacrés aux programmes de recherche. Le nombre total d'agents permanents est de 46. Il accueille également des équipes de Services extérieurs à l'Ifremer: le Service de la Perliculture et le SPE (annexe 2). Réparties sur un site de 7 ha, le COP comprend 6200 m² d'infrastructures, dont le LBQP (histologie, bactériologie, biologie moléculaire), le Laboratoire de Domestication de l'Huître Perlière ou LDHP (biométrie, biochimie), et de nombreux équipements aquacoles dont trois écloséries expérimentales : huîtres perlières, crevettes et poissons. L'écloserie de poissons est composée de 10 salles (annexe 3a). Chaque stade (incubation, larvaire, sevrage-nurserie, maturation) est isolé des autres par une séparation physique. L'eau de mer alimentant l'écloserie est pompée à une profondeur de 5 mètres et subit un traitement mécanique (système de filtration) et physique (stérilisation aux UV). Les nouveaux poissons subissent une quarantaine dans une salle prévue à cet effet. La phase de grossissement est réalisée en milieu lagunaire dans 3 modules (annexe 3b). Un module peut accueillir 2 cages de 30 m³ ou 4 cages de 15 m³ (2,3 x 2,3 x 3,8 m). Il est équipé d'un filet de protection contre les attaques de prédateurs (6 x 6 x 4 m), de distributeurs automatiques à tapis et d'une ombrière. Les équipements destinés au grossissement appartiennent au SPE.

II. MATERIELS ET METHODES

II. 1. Matériel biologique

Dans le cadre de mon stage, deux expérimentations ont été conduites :

- la première concerne les juvéniles issus du cycle de sevrage-nurserie 2008-01 réalisé en éclosion. Lorsque les animaux pèsent entre 7g et 8g à l'âge de 56 jours, ils sont transférés vers les cages situées dans le lagon. L'objectif de cette expérimentation est double : (i) premièrement, avoir une idée du développement d'agents pathogènes suite à la mise en cage, notamment *Neobenedenia sp.* (ii) Deuxièmement, tenter de diminuer le stress lié au transfert et à l'adaptation à un nouvel environnement, et par conséquent diminuer les problèmes pathologiques et par là même, le taux de mortalité. Pour cela, deux traitements préventifs du stress sont testés dans un même temps: le Tex-OE et un mélange constitué de vitamine C, Garmin B et Nor-Grape 80. Au démarrage, nous disposons de 3600 juvéniles.

- La deuxième utilise un traitement curatif, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Celui-ci est expérimenté sur les poissons du cycle 2007-03 âgés de 174 jours. En phase de grossissement dans les cages en mer, il s'agit de poissons dont la plupart sont moribonds, présentant une opacité des yeux et un état général diminué. Cette expérience a pour but de vérifier la non toxicité du peroxyde d'hydrogène sur *Platax orbicularis* et d'évaluer l'efficacité du produit contre le symptôme d'opacité des yeux, témoin d'une infestation parasitaire.

II. 2. Matériel thérapeutique

▪ Les produits utilisés

Quatre produits sont évalués pour leur effet préventif :

- 1) Le Garmin B est composé de poudre d'ail et de vitamine B1. Il s'agit d'un facteur de croissance et anti-parasitaire (annexe 4).
- 2) Le Nor-Grape 80 est un extrait naturel de raisin en poudre qui a des propriétés anti-oxydantes (annexe 5).
- 3) La vitamine C : associée au Nor-Grape 80, elle lui confère en plus une propriété immunostimulante.
- 4) Le Tex-OE est un produit extrait du cactus et composé de « heat shock protein » permettant d'accélérer la réparation des cellules détériorées par un stress (annexe 6).

Trois produits sont utilisés pour le traitement curatif :

Le peroxyde d'hydrogène concentré à 30% est le produit testé. Il s'agit d'un puissant oxydant à large spectre : anti-parasitaire, anti-bactérien et anti-fongique dont l'efficacité contre les parasites monogènes est reconnue dans la littérature.

Le formol est un produit anti-parasitaire, efficace notamment contre les ectoparasites.

L'eau douce est utilisée en bain flash pour son action contre les ectoparasites.

▪ Voies d'administration et posologies

Les produits Garmin B, Nor-Grape 80 et vitamine C sont mélangés et composent un traitement qui est administré par voie orale (enrobage de l'aliment). Les doses utilisées sont celles préconisées par le fabricant soit 1g/kg d'aliment pour le Garmin B, 15 mg/kg d'aliment pour le Nor-Grape 80. Quant à la vitamine C, la dose nécessaire est de 30 mg/kg de poids vif.

Le traitement débute lorsque les poissons sont âgés de 50 jours (J50), soit 6 jours avant la mise en cage. Il est donné tous les jours pendant 22 jours.

Le Tex-OE est utilisé une première fois à J55 en immersion, à raison de 1ml/250l pendant une heure. A ce stade, les juvéniles sont encore en bassin, en éclosérie.

Une fois le transfert en cage effectué, c'est-à-dire 48h plus tard, il est distribué en mélange avec l'aliment (Tex-OE sous forme d'huile) tous les 3 jours pendant 2 semaines.

Le peroxyde d'hydrogène et le formol sont tous deux administrés de la même façon : ils sont utilisés à la dose de 200 ppm (partie par million) en bain statique, 1 heure par jour, pendant 12 jours. Une fois les produits répartis dans les bassins, le bullage est augmenté et l'arrivée d'eau coupée.

Le traitement à l'eau douce consiste à sortir les poissons de leur bassin et les plonger dans un bain durant 5 minutes. Cette opération, appelée bain flash, est réalisée une première fois en début d'expérience puis une deuxième fois à 7 jours d'intervalle.

II. 3. Transfert et répartition des lots

Les juvéniles du cycle 2008-01 sont transférés à l'âge de 56 jours. En mer, ils sont répartis par lot dans un des compartiments des modules A, B et C, chaque compartiment comprenant 3 cages de 400 juvéniles chacune (voir figures 1 ci-dessous).

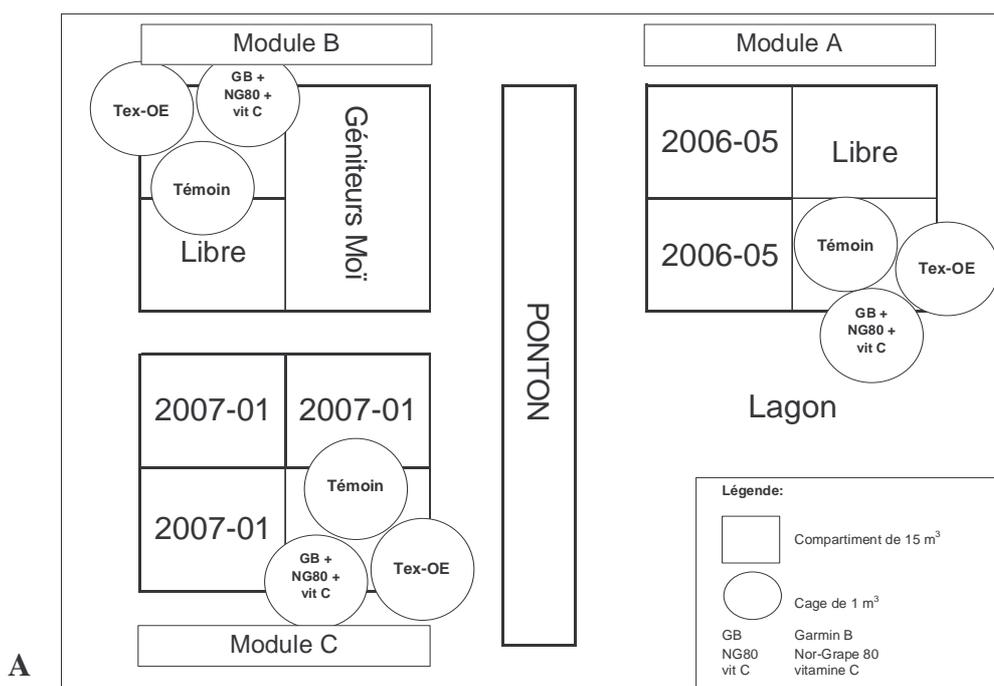




Fig. 1 : Elevage du cycle 2008-01 en cage ; **A**: schéma de répartition des poissons dans les cages ; **B**: illustrations des cages de 1 m³

Les poissons du cycle 2007-03 sont transférés dans 6 bassins de traitement à terre d'une contenance de 400 L chacun, à raison de 25 poissons par bassin. La répartition se fait au hasard et l'on considère qu'au départ les lots sont homogènes. Les bacs 1 et 2 contiennent les lots traités au formol, les 3 et 4, ceux traités au peroxyde d'hydrogène, le 5, celui traité à l'eau douce et le bac 6 contient le lot témoin.

II. 4. Suivi des poissons dans leur nouvel environnement

▪ Les différents types de suivi

Les poissons du cycle 2008-01 font l'objet de trois types de suivi :

- 1) un suivi journalier qui consiste à observer leur comportement, noter les mortalités et relever les paramètres environnementaux,
- 2) un suivi de la croissance pondérale par mesure du poids individuel,
- 3) un suivi zoosanitaire dont le but est de relever les symptômes, les lésions et agents pathogènes que l'on identifie si possible. Pour cela, on effectue un examen externe et des analyses plus approfondies utilisant différentes techniques d'identification d'organismes pathogènes ou non :
 - Etat frais : un frottis est systématiquement réalisé sur les branchies. La peau, les nageoires et les yeux ne sont prélevés qu'en cas de lésions. Ces prélèvements sont analysés à la loupe binoculaire ainsi qu'au microscope photonique.
 - Histologie : la tête et les organes affectés sont fixés dans une solution de Davidson (acide acétique, formaldéhyde, alcool à 95° et eau de mer). Les lames histologiques colorées à l'hématoxyline éosine sont analysées au microscope photonique.
 - Bactériologie : les prélèvements de peau saine et de peau avec lésions sont mis en culture sur deux types de milieux gélosés : Marine Agar qui est un milieu non sélectif, spécifique du milieu marin, et TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose) qui est sélectif des bactéries du genre *Vibrio*. L'identification se fait au moyen d'un système standardisé de tests biochimiques (galerie API-E20).

Ces techniques sont complémentaires pour établir un diagnostic. Les échantillons sont systématiquement analysés à l'état frais. L'histologie et la bactériologie ne sont utilisées qu'en cas d'anomalie particulière à l'état frais ou cas de mortalités anormales observées dans les lots.

Les organismes et symptômes recherchés sont les suivants : le parasite monogène et autres parasites, opacité des yeux, exophtalmie, tâches, plaies, pustules.

Les poissons du cycle 2007-03 sont également suivis quotidiennement. De plus, nous établissons leur état sanitaire individuel. Celui-ci consiste en un examen externe au cours duquel nous relèvons le poids, les lésions et la présence éventuelle de parasites.

▪ Fréquence des suivis

Le suivi de la croissance et le suivi zoosanitaire concernant le cycle 2008-01 répondent à un schéma bien défini : ils font l'objet de prélèvements hebdomadaires (échantillonnages) durant quatre semaines, puis ces prélèvements s'effectuent toutes les deux semaines sur quatre semaines. On réalise donc six prélèvements pour une expérience de huit semaines.

La méthodologie d'échantillonnage est la suivante : nous prélevons par cage un échantillon de 20 poissons pêchés au hasard, soit 180 individus prélevés par semaine ou encore 1080 au total. Ceux-ci sont pesés et soumis à un examen externe puis sacrifiés pour les analyses complémentaires.

Pour le cycle 2007-03, on établit un état sanitaire initial (avant de commencer les traitements) et un état sanitaire final (à la fin de toute la durée de traitement).

II. 5. Elements d'appréciation statistique

Pour l'analyse statistique visant à évaluer l'efficacité des traitements préventifs (juvéniles du cycle 2008-01), les données relevées sont :

- la gravité de l'opacité des yeux graduée selon une échelle de 0 à 4

0 : absence d'opacité

1 : œil voilé

2 : point blanc

3 : opacité partielle

4 : opacité totale de l'œil

- la présence (notée 1) ou l'absence (notée 0) d'opacité des yeux, de tâches, plaies, pustules et parasites

- le nombre de parasites par poissons

- le poids moyen des poissons par cage

- la mortalité cumulée.

Pour déterminer l'effet des traitements, une analyse de variance paramétrique ou non paramétrique est réalisée en fonction de la normalité ou non de la distribution des données obtenues.

Pour l'analyse statistique visant à évaluer l'efficacité du traitement curatif (poissons du cycle 2007-03), une seule donnée est utilisée :

- la présence (1) ou l'absence (0) d'opacité des yeux

Pour déterminer l'effet du peroxyde d'hydrogène, on réalise un test du khi deux.

Le logiciel d'analyse utilisé est la version 7.1 de Statistica.

II. 6. Evaluation de la toxicité du peroxyde d'hydrogène

La toxicité est évaluée par rapport au taux de survie après traitement. Le taux de survie des lots traités au peroxyde d'hydrogène est comparé à celui des lots témoins positifs (formol et eau douce) et témoin négatif (aucun traitement). En effet, le formol et l'eau douce sont des traitements reconnus non toxiques sur *Platax orbicularis*.

A propos du taux de survie, la limite inférieure acceptée est fixée à 70%, en se basant sur un exemple de la littérature (13).

III. RESULTATS, INTERPRETATIONS ET ACQUISITIONS

L'étude menée sur le cycle 2008-01 a permis l'observation du développement parasitaire au cours du temps et l'expérimentation de traitements préventifs. L'expérience réalisée avec le cycle 2007-03 nous a permis d'évaluer la toxicité et l'efficacité d'un traitement curatif, le peroxyde d'hydrogène. Les résultats sont présentés ci-dessous.

III. 1. Suivi zoosanitaire

▪ Taux de mortalité

Sur les 8 premières semaines de grossissement en cage du cycle 2008-01, nous avons observé un taux de mortalité global (tous modules confondus) de 43,18 %. L'évolution au cours du temps est représentée sur la figure 2.

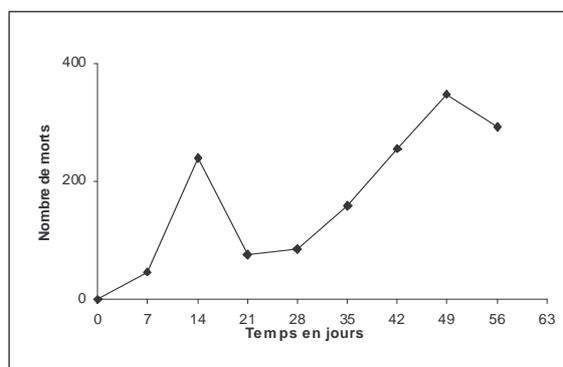


Fig. 2 : Evolution de la mortalité globale en cage au cours du temps

Trois phénomènes sont soulignés par ce graphique :

tout d'abord, le taux élevé de mortalité du cycle 2008-01, supérieur à celui des cycles précédents, est incompatible avec un objectif de production.

Par ailleurs, l'évolution au cours du temps suit une tendance similaire à celle observée en 2006 et 2007. En effet, un pic de mortalité a également été constaté après la mise en cage des juvéniles, mais avec un délai différent : concernant les cycles 2006-05 et 2007-01, le pic est survenu environ 1 mois post transfert.

Le dernier élément mis en évidence est la recrudescence des mortalités au début de la 5^{ème} semaine.

- Développement du parasite monogène

Comme dans les cycles précédents, les juvéniles 2008-01 ont présenté une opacité des yeux très rapidement après la mise en cage. Ce symptôme a été observé dès la 2^{ème} semaine (figure 3). Ceci témoigne d'un développement parasitaire précoce.



Fig. 3 : Photo d'un poisson présentant une opacité des yeux

Au cours du 2^{ème} échantillonnage, nous avons mis en évidence le parasite monogène (aucun lors du 1^{er} échantillonnage). La figure 4 présente l'évolution de l'infestation parasitaire globale au cours du temps, observée lors des échantillonnages.

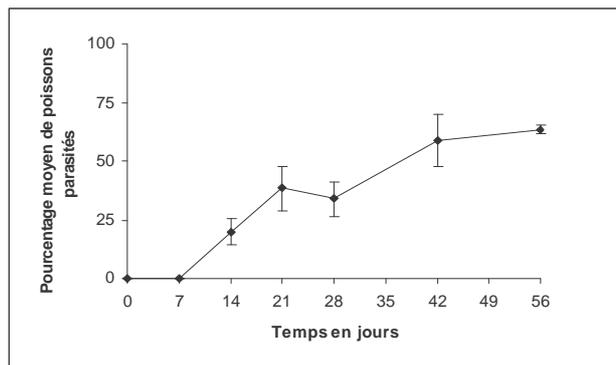


Fig. 4 : Evolution de l'infestation parasitaire globale au cours du temps

Après un bain flash de quelques secondes, nous avons vu à l'examen externe des poissons le parasite accroché principalement sur les yeux (figure 5).



Fig. 5 : Observation à la loupe binoculaire de parasites monogènes accrochés sur l'œil d'un poisson (x 2.5)

Il s'agit d'un vers plat (Phylum : Plathelminthes) appartenant à la classe des Monogènes qui sont des ectoparasites très répandus chez les poissons. Le système

d'accrochage à l'hôte comprend une paire de ventouses en région antérieure. En région postérieure, un organe simple de la forme d'une « capsule » appelé opisthopteur permet de classer le parasite dans la famille des Capsalidés. De par la présence d'œufs caractéristiques de forme triangulaire et de couleur marron-jaune, l'espèce en cause a pu être identifiée au microscope photonique : il s'agit de *Benedenia seriolae* (6) (figures 6).



Fig. 6: Identification du parasite monogène *B. seriolae*; **A:** adulte mature vu à la loupe binoculaire (grossissement x 4); **B:** œuf caractéristique de *B. seriolae* vu au microscope photonique (grossissement x 200)

L'opisthopteur est armé de 3 paires de crochets qui sont à l'origine de l'irritation causée aux poissons (figure 7).



Fig. 7 : Observation au microscope photonique de l'opisthopteur armé de 3 paires de crochets (grossissement x 100)

B. seriolae est un parasite monoxène (c'est à dire à cycle direct) et hermaphrodite. Ovipare, il relâche ses œufs dans l'eau qui peuvent se fixer sur un substrat ou s'accrocher les uns aux autres en formant une chaînette et rester sur l'hôte (7). En fonction de la température, ils éclosent et libèrent une larve ciliée et mobile appelée oncomiracidium. Celle-ci se met activement à la recherche d'un hôte sur lequel elle se fixe puis se transforme en un jeune immature. La durée du cycle de reproduction et l'atteinte de la maturité sexuelle sont également influencées par la température de l'eau (6).

Cet ectoparasite se nourrit de mucus et de cellules épithéliales. Il est fixé sur différents sites de l'hôte incluant la peau, les yeux et moins souvent les branchies. L'action mécanique exercée par les crochets gêne les poissons. Ceux-ci se frottent alors contre les structures d'élevage, ce qui entraîne une perte d'écaillés puis l'apparition de plaies. Les symptômes généraux sont un état d'abattement et une perte d'appétit. Les lésions sont une opacité des yeux, des plaies sur lesquelles peuvent se développer des infections bactériennes secondaires et une hypersécrétion de mucus et (8).

Par rapport aux suspicions de départ, nous avons confirmé l'étiologie parasitaire, mais l'espèce identifiée est différente de celle suspectée (*Neobenedenia* sp.).

- Autres organismes identifiés

D'autres organismes ont été mis en évidence à partir du 4^{ème} prélèvement (c'est-à-dire 28 jours après la mise en cage). En général peu ou non pathogènes, on les retrouve surtout lorsque les conditions du milieu se dégradent ou lorsque les poissons présentent un état général bien diminué.

- Bactérie responsable d'épithéliocystis

L'épithéliocystis est une infection intracellulaire des épithéliums de surface (épithéliums tégumentaire et branchial) causée par une bactérie « chlamydia-like » à gram négatif. Cet organisme a été identifié à partir de prélèvements de branchies observés en histologie. En effet, il est impossible d'utiliser les techniques microbiologiques de routine (étalement sur boîte de Pétri et identification par galerie API) car cette bactérie ne peut être mise en culture. Le diagnostic de confirmation est uniquement apporté par l'histologie ou par la biologie moléculaire (9). On y observe un élargissement des cellules épithéliales contenant une grosse inclusion de granules basophiles repoussant le cytoplasme en périphérie (figure 8).

Les branchies prélevées lors de chaque échantillonnage n'ayant pas été systématiquement analysées via cette technique diagnostique, il n'est pas possible d'avoir le taux de prévalence, ni une idée de l'évolution du développement de l'épithéliocystis. Cependant, on peut signaler que les premières observations ont eu lieu au cours du 4^{ème} échantillonnage et que la bactérie était présente sur chaque lame histologique et de manière abondante (de l'ordre de 6 à 15 observations par lame). Concernant les échantillonnages suivants, les mêmes lésions étaient présentes dans les branchies et en nombre supérieur.

D'après la littérature, il n'est pas prouvé que l'épithéliocystis soit une cause directe de mortalité. Cela reste le plus souvent une affection bénigne et la bactérie peut très bien être rencontrée de manière fortuite chez des poissons sains. Néanmoins, cette affection a souvent été associée à des épisodes de mortalités, en particulier chez les juvéniles qui sont physiologiquement plus sensibles que les adultes. Le taux de mortalité peut varier de 4 à 100% (10) : cela reste un agent potentiellement pathogène et donc non négligeable.

Des bains d'oxytétracycline se sont révélés efficaces pour traiter l'achigan à grande bouche, un poisson d'eau douce (*Micropterus salmoides*). Malheureusement, il n'existe encore aucun traitement contre l'épithéliocystis en pisciculture marine (10). Dans ce cas, Goodwin *et al.* (2005) proposent de tester un aliment enrobé avec ce même antibiotique.



Fig. 8 : Observation au microscope photonique d'une coupe histologique de branchies présentant une lésion d'épithéliocystis (grossissement x 200)

○ *Trichodine*

Cet organisme a été révélé dans des branchies observées en état frais (figure 9). Présent dans un seul prélèvement du 4^{ème} échantillonnage, sa prévalence, bien que toujours faible, était en augmentation lors du 6^{ème} : on a mis en évidence plusieurs ciliés dans 13 prélèvements branchiaux. Bien que ce chiffre semble négligeable, il est toutefois à souligner que cet ectoparasite n'a jamais été remarqué au cours des précédents échantillonnages.

Les trichodines sont des protozoaires ciliés principalement commensaux qui utilisent leur hôte comme un simple substrat sur lequel ils glissent et s'attachent temporairement. Ils se nourrissent de particules et bactéries transportées par l'eau ou provenant de la peau ou des branchies de leur hôte. Chez des poissons débilisés, la barrière de défense de la peau est altérée et les trichodines prolifèrent. En ces circonstances, ils se comportent comme des parasites (11). La trichodinose se traite facilement : en général, la guérison est spontanée par amélioration des conditions du milieu ou il suffit d'une application unique d'un traitement approprié (formol, bain flash) (12).

L'intérêt de mentionner ce cilié réside dans le fait qu'il est le témoin d'une dégradation de l'état général des poissons. De nombreux autres organismes (autres ciliés, flagellés), non identifiés, ont été observés à partir du 4^{ème} échantillonnage, avec une prévalence suivant la même dynamique que celle des trichodines. Leur présence appuie l'hypothèse d'un affaiblissement des poissons en début de la 5^{ème} semaine post-mise en cage.

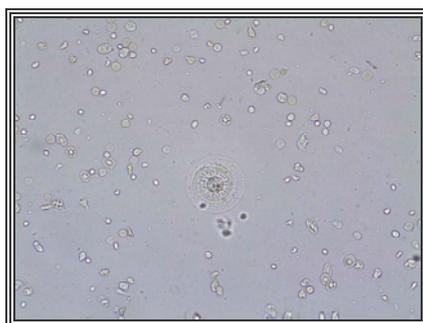


Fig. 9 : Observation au microscope photonique d'un trichodine à partir d'un prélèvement branchial (grossissement x 400)

II. 2. Suivi journalier

Globalement, l'ensemble des lots du cycle 2008-01 s'alimentait activement durant les 4 premières semaines. A partir de la 5^{ème} semaine, on a constaté une diminution générale et de l'appétit qualifié alors de moyen à mauvais. Les conditions environnementales, bonnes jusqu'à la 5^{ème} semaine, se sont ensuite légèrement dégradées de par l'apparition de courant dans le lagon puis de pluie la dernière semaine.

Les poissons du cycle 2007-03 subissant le test au peroxyde d'hydrogène n'ont jamais manifesté de signe de détresse physiologique durant le traitement. Ils présentaient un bon appétit et les symptômes d'opacité des yeux se sont progressivement estompés. Malgré un taux de survie de 100 %, on a observé dans le lot témoin une aggravation générale et très nette du symptôme d'opacité de l'œil ainsi que l'apparition de nombreuses plaies.

III. 3. Evaluation de l'efficacité des traitements préventifs

- Présentation de la matrice de résultats

Les dimensions de la matrice de résultats sont de 54 lignes, une ligne étant un échantillonnage pour une cage donnée, par 17 colonnes, dont 13 pour les variables mesurées sur les échantillons (tableaux I et II). les valeurs de chaque mesure sont représentées dans les graphiques 10 à 22. La matrice réelle est présentée en annexe 7.

Tableau I : Dimensions de la matrice de résultats des traitements préventifs

Date d'échantillonnage	Cage	Module	Traitement	Variables mesurées
6 dates	9 cages	3 modules	3 traitements	13 variables

Tableau II : Détail des variables mesurées sur les échantillons

Variable	Libellé	Formule	Type
Taux d'opacité des yeux	T_Opacité	Proportion d'individus atteints d'opacité de l'oeil	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Gravité de l'opacité	G_opacité	Proportion d'individus atteints d'opacité au stade 3 et 4	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Taux de Benedenia	T_Bene	Proportion d'individus contaminés par des Benedenia	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Nombre de Benedenia	S_Bene	Quantité totale de Benedenia observée sur l'échantillon	Entier positif
Taux d'exophtalmie	T_exo	Proportion d'individus atteints d'exophtalmie	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Taux de tâches	T_tâches	Proportion d'individus présentant des tâches	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Taux de plaies	T_plaies	Proportion d'individus présentant des plaies	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Taux de pustules	T_pustules	Proportion d'individus présentant des pustules	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Taux de ciliés	T_ciliés	Proportion d'individus contaminés par des ciliés	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Taux de vers	T_vers	Proportion d'individus contaminés par des vers	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Taux d'autres parasites	T_Autres	Proportion d'individus contaminés par d'autres parasites	Réel compris entre 0 et 1 inclus
Pois moyen	Pm	Poids moyen en gramme	Réel positif
Mortalité cumulée	Mortalité	Cumul du nombre d'individu mort depuis la première mesure	Entier positif

Figure 10 – Evolution du taux d'opacité

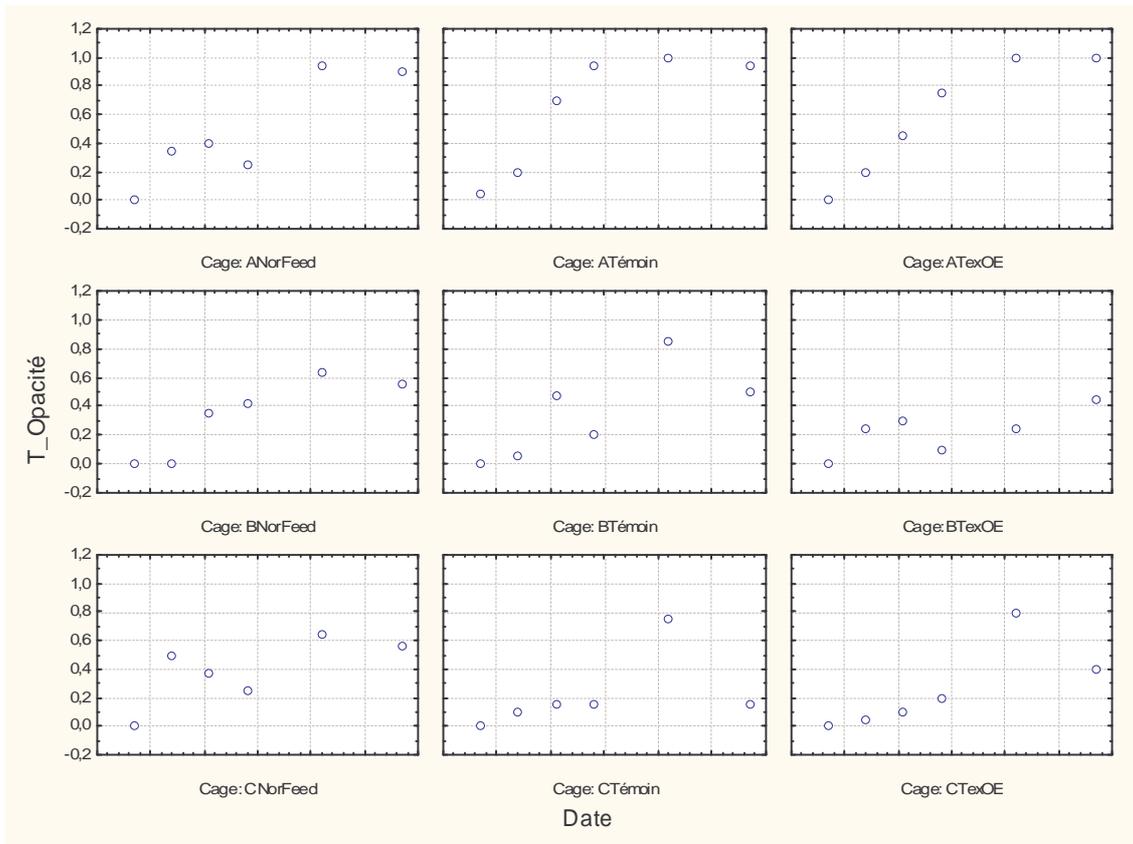


Figure 11 – Evolution de la gravité de l'opacité

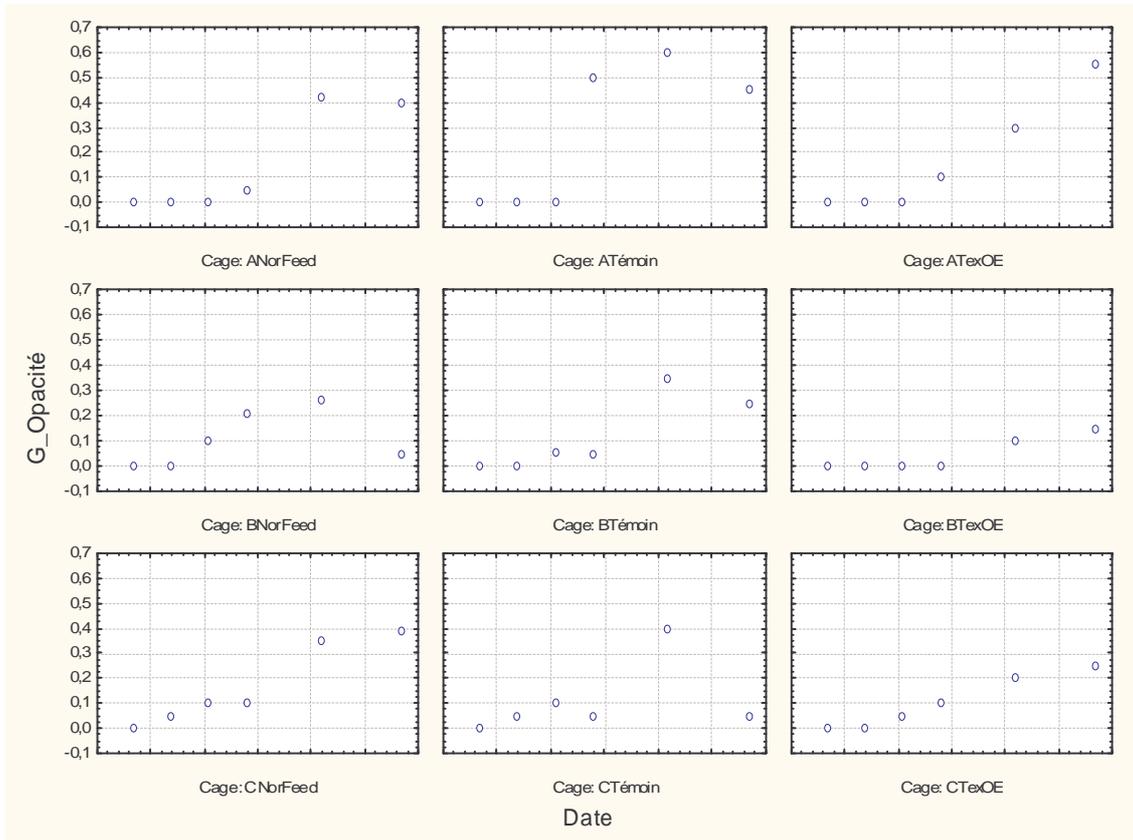


Figure 12 – Evolution du taux de contamination par les néobédénia

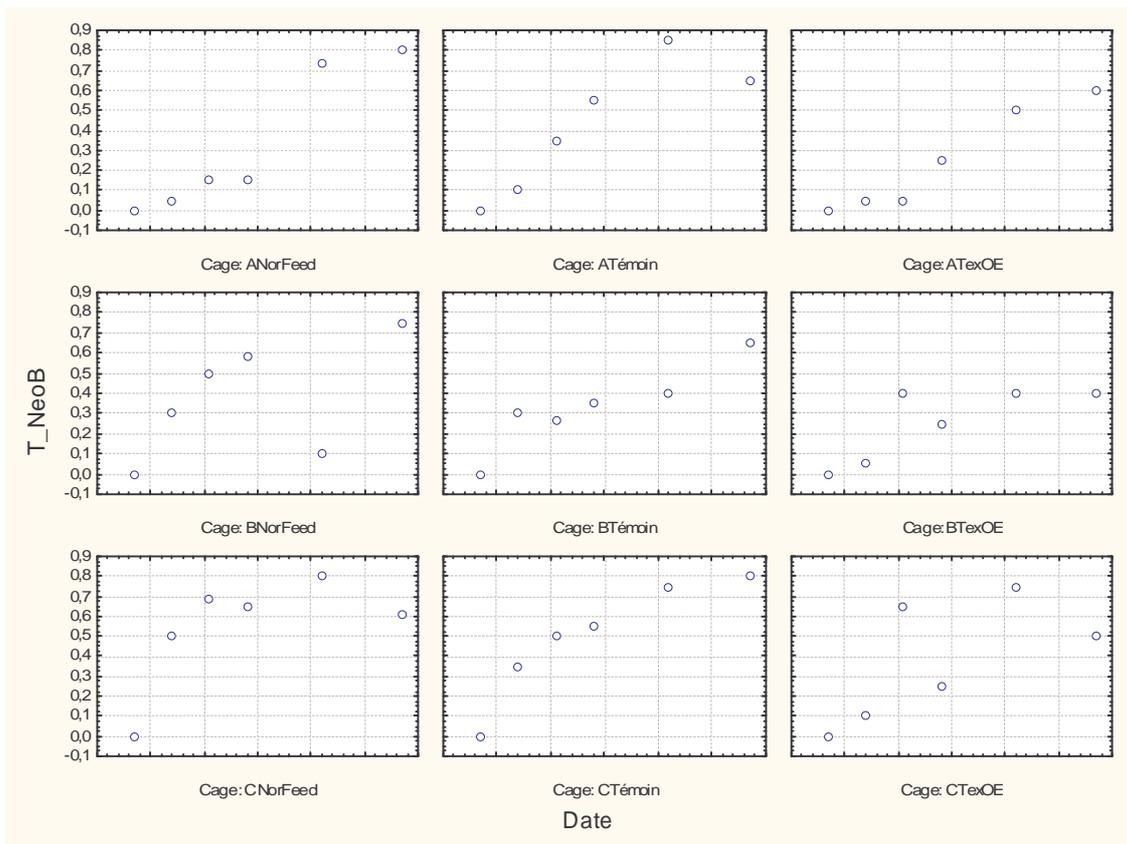


Figure 13– Evolution du nombre de néobédénia

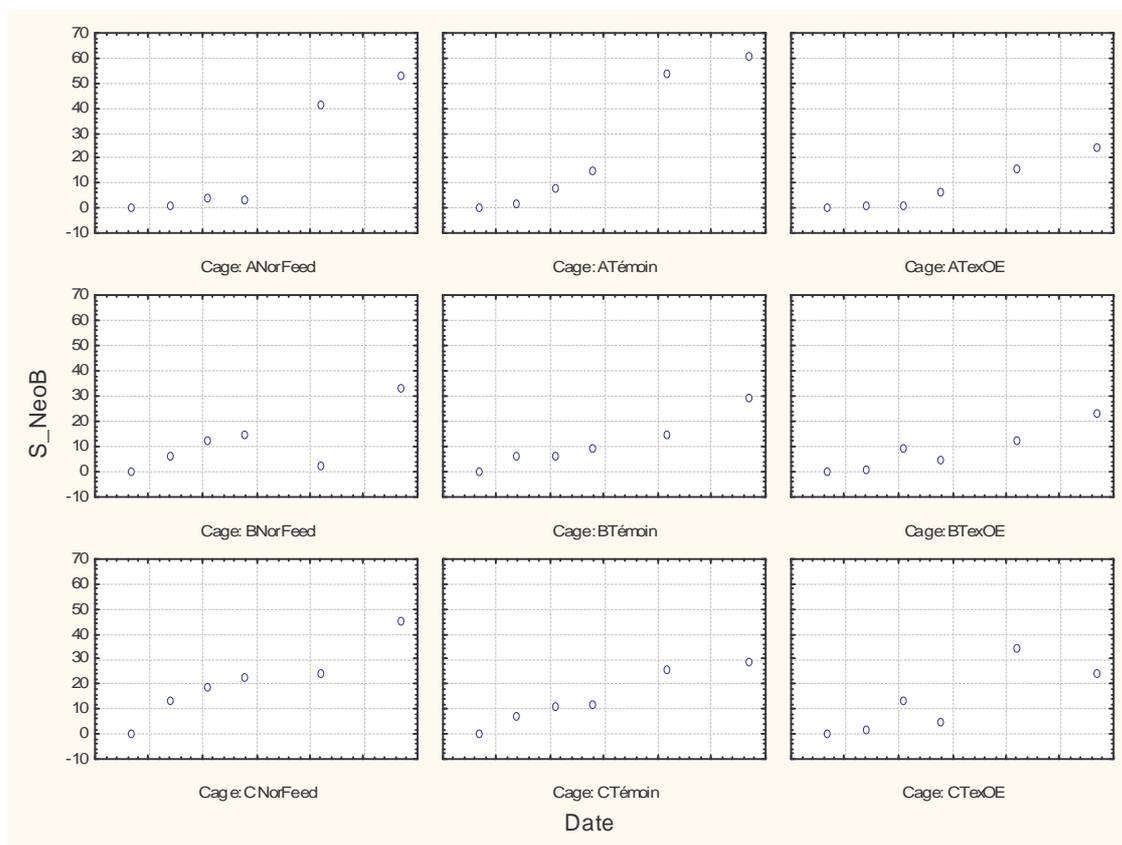


Figure 14 – Evolution du taux d'exophtalmie

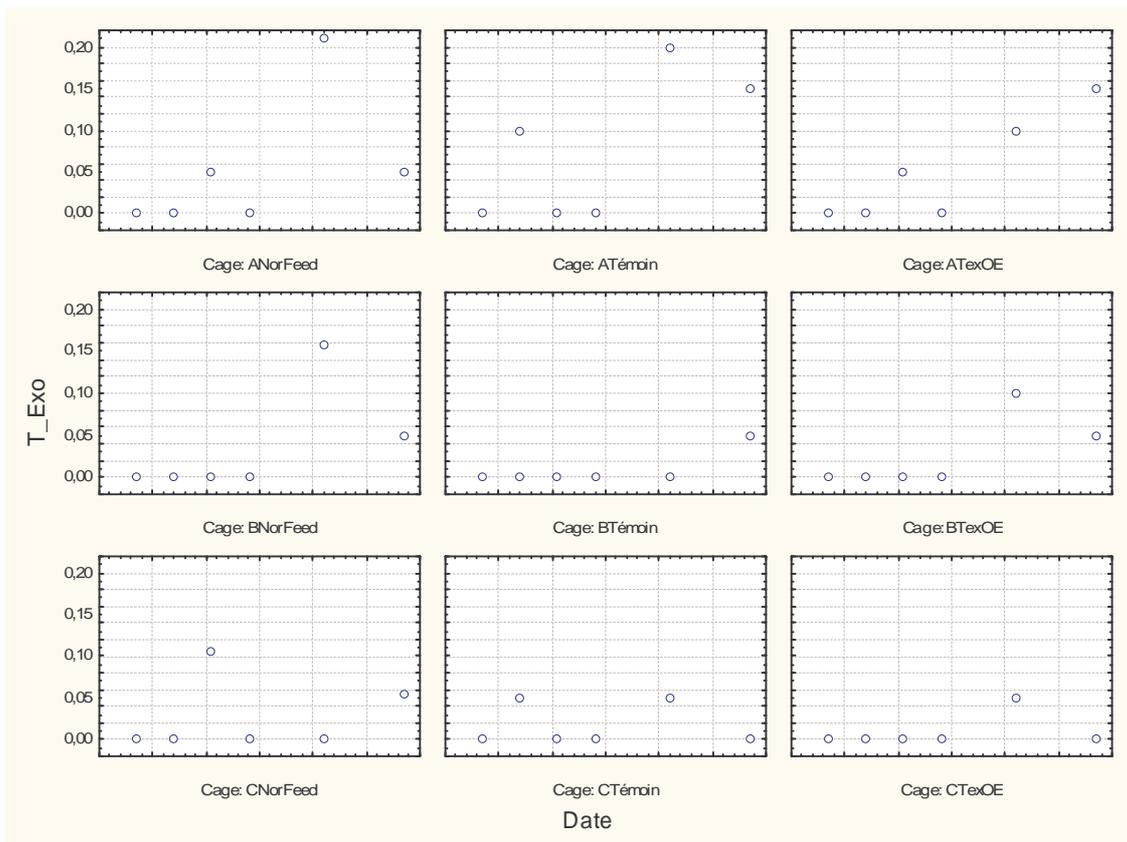


Figure 15 – Evolution du taux de présence de tâches

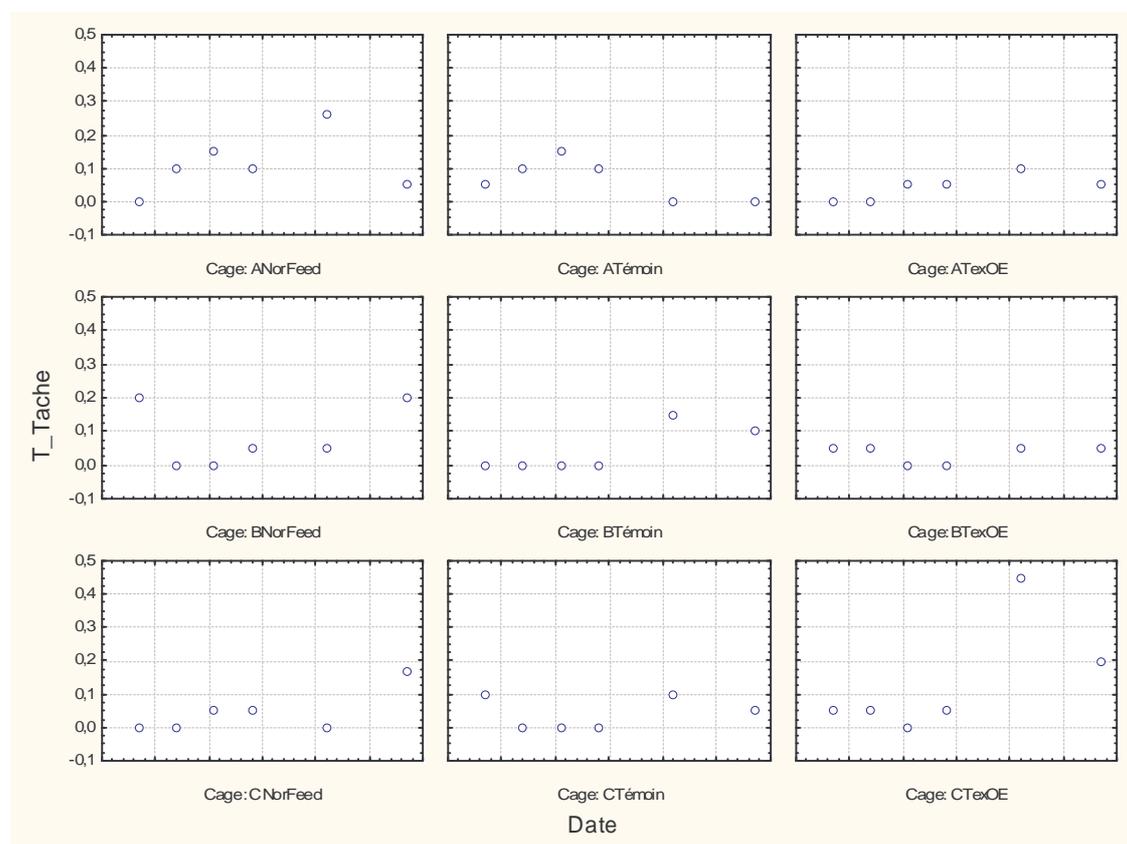


Figure 16 – Evolution du taux de présence de plaies

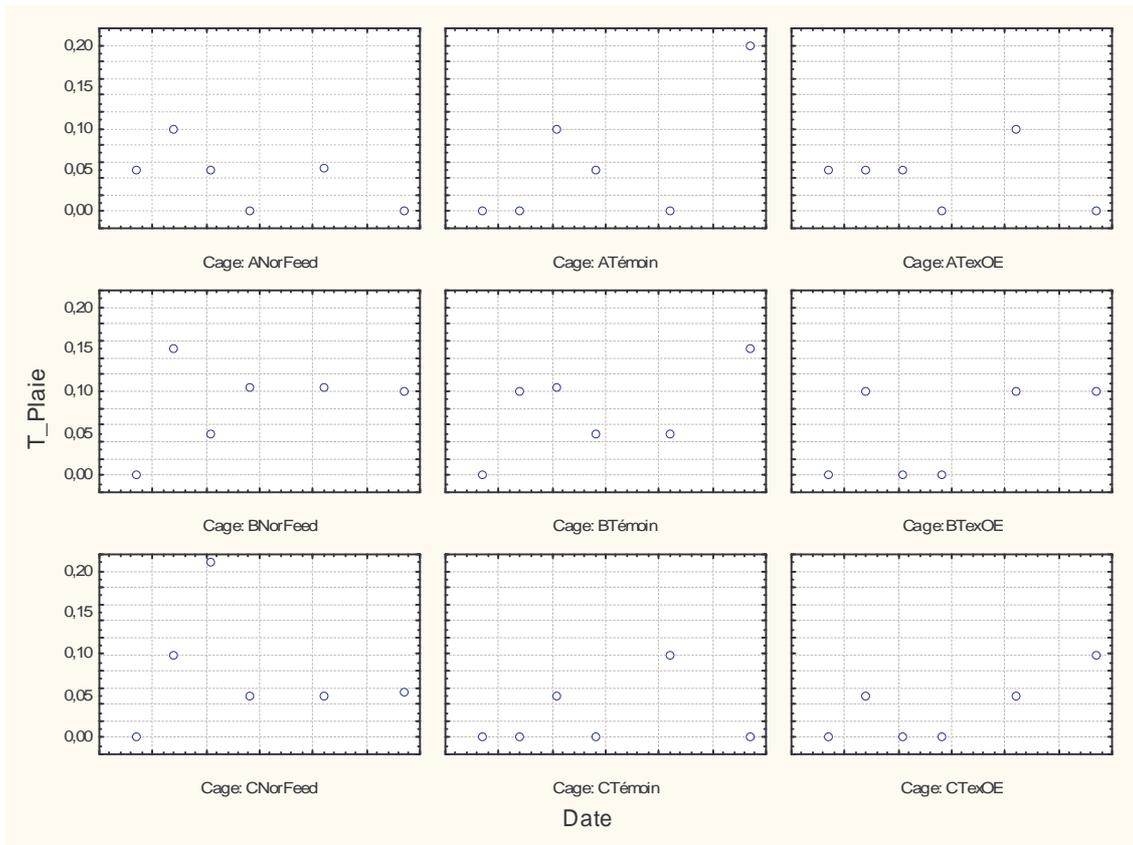


Figure 17 – Evolution du taux de présence de pustules

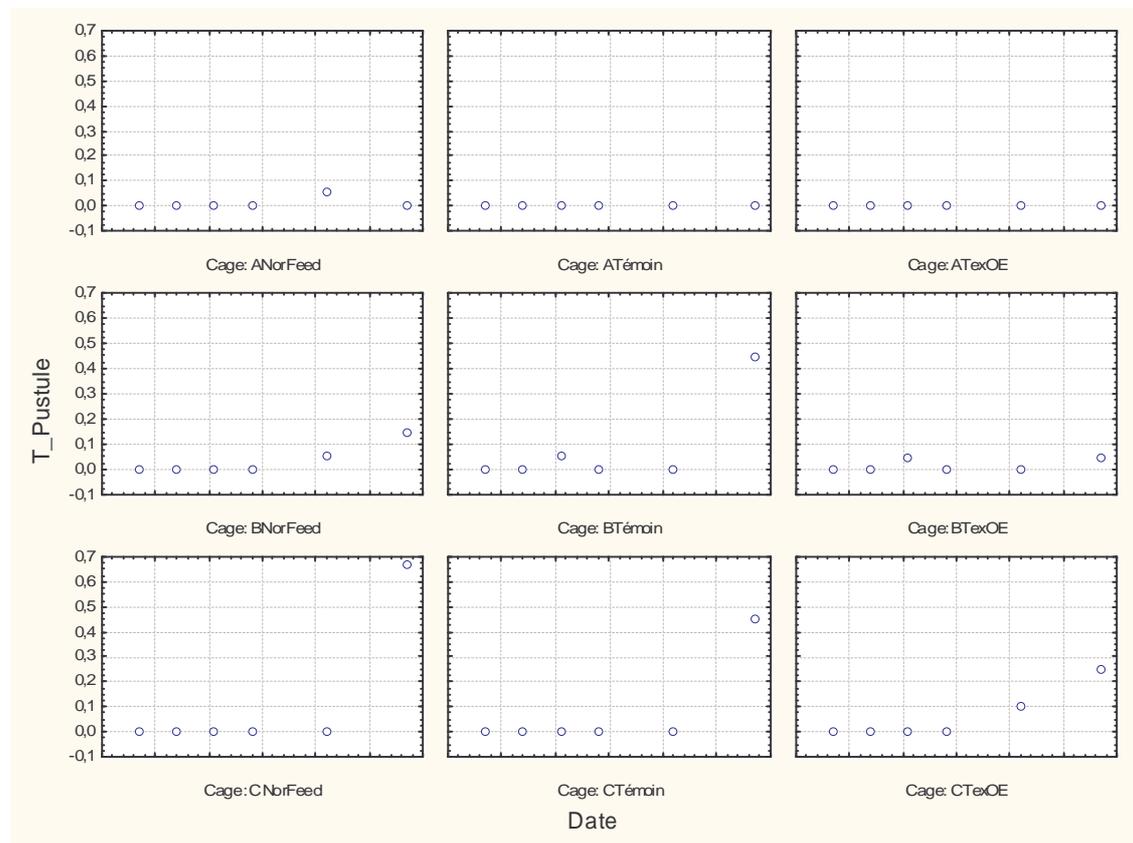


Figure 18 – Evolution du taux de contamination par les ciliés

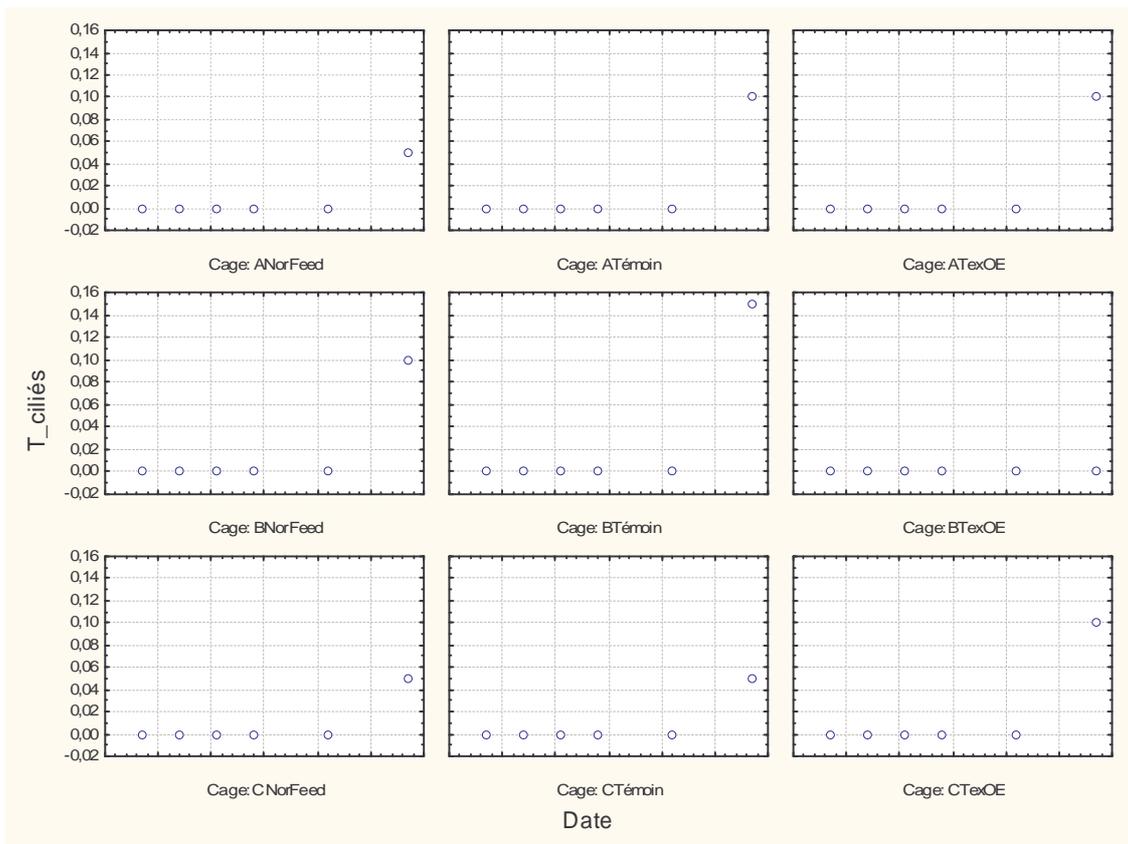


Figure 19 – Evolution du taux de contamination par les vers

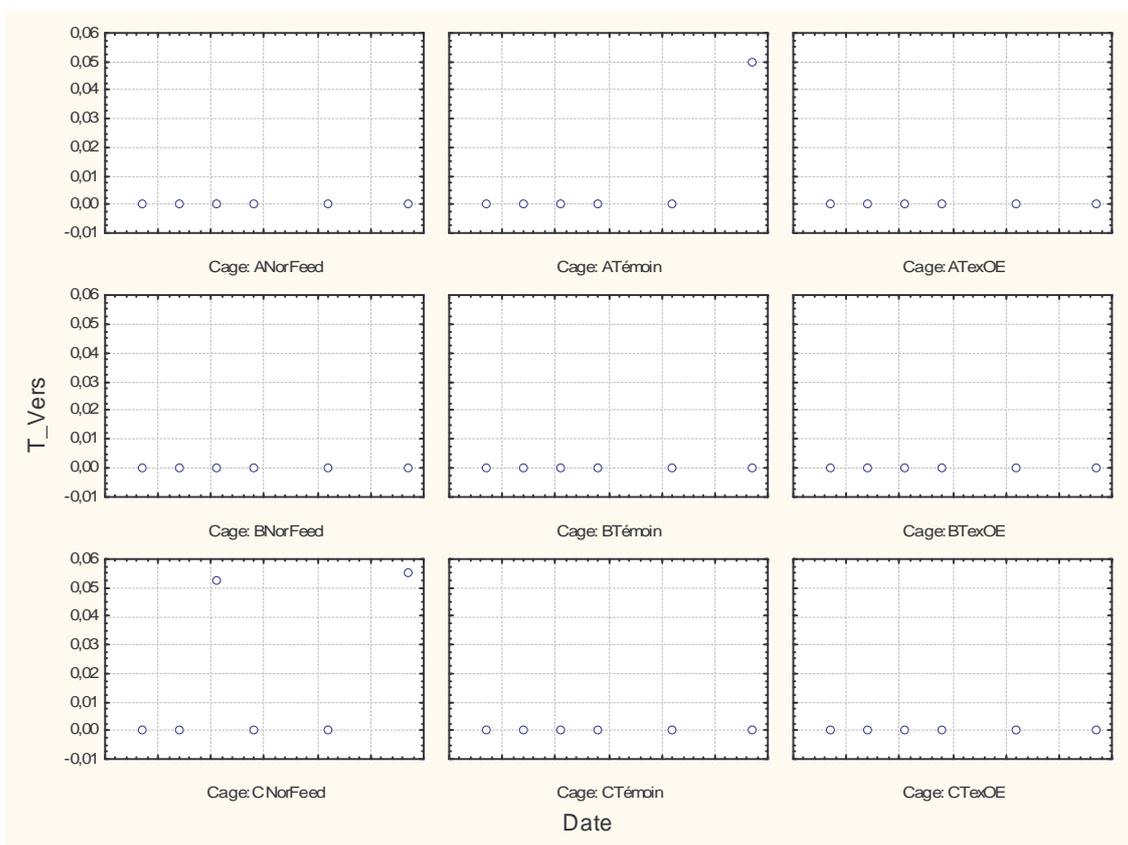


Figure 20 – Evolution du taux de contamination par d'autres parasites

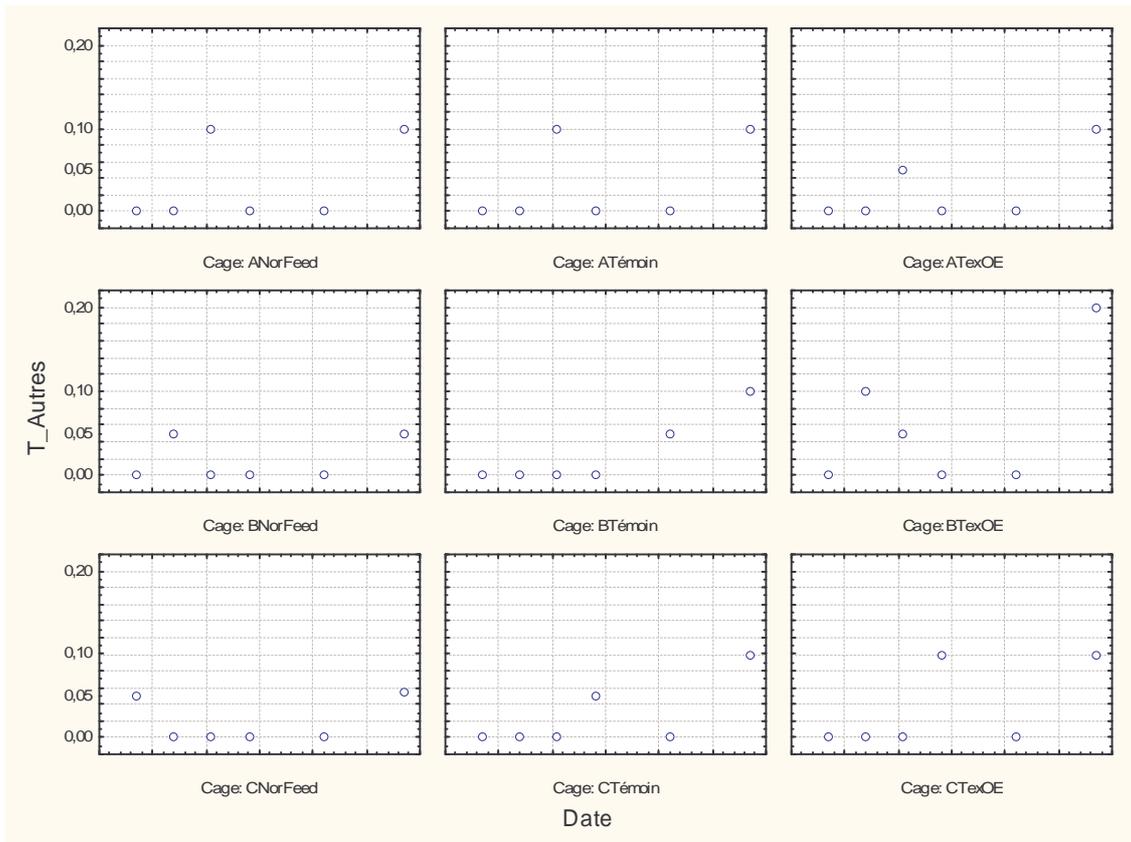


Figure 21 – Evolution du poids moyen (g)

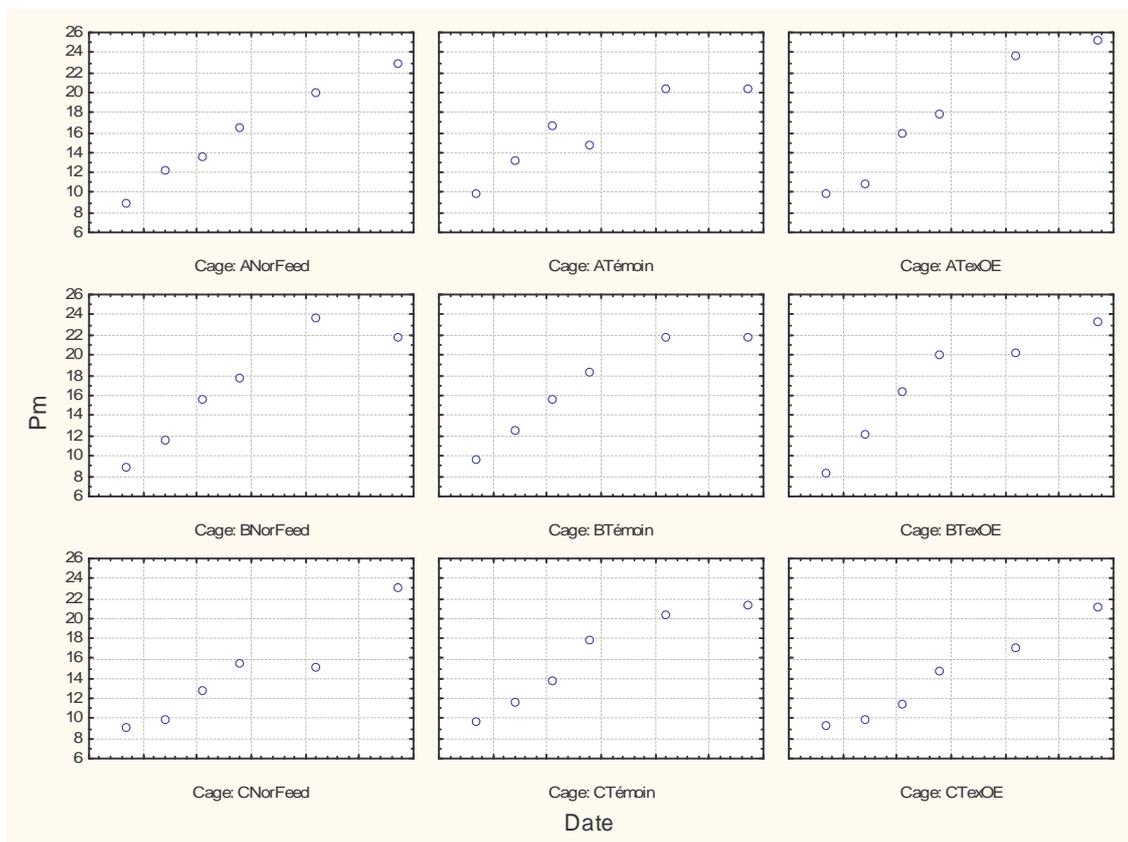
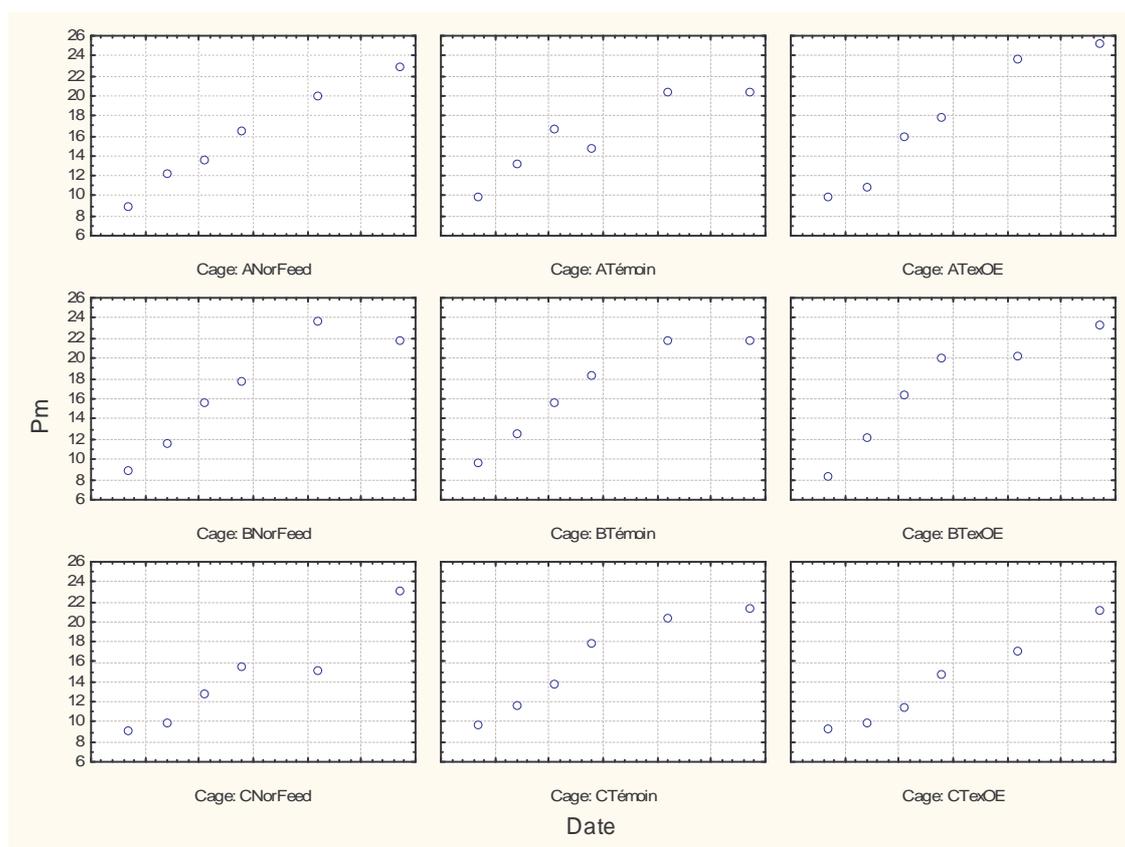


Figure 22 – Evolution de la mortalité cumulée



▪ Etude des corrélations entre symptômes et traitement

Afin d'étudier les relations entre le traitement et les symptômes observés (variables mesurées), une analyse en composantes principales (ACP) a été menée sur la matrice de résultats. Le poids moyen et la mortalité cumulée, qui par définition augmentent au cours du temps, ont été fixés comme variables supplémentaires ainsi que les variables cages et modules qui doivent être considérées à ce stade comme des paramètres contrôlés de l'environnement. Ces valeurs ne rentreront ainsi pas en compte dans le calcul de la variance observée.

La première valeur propre n'explique que 38,5 % de la variance totale si bien que le premier plan factoriel (facteur 1 et 2) ne rassemble qu'à peine plus de 50 % de la variance. Le plan factoriel composé des deuxième et troisième axes ne contient quant à lui qu'un peu moins de 25 % de l'information. Il faut considérer jusqu'à la 8^{ème} valeur propre pour obtenir 80 % de la variance expliquée. La distribution des valeurs propres suggère ainsi une **forte dilution de l'information** ce qui laisse doré et déjà présager un faible pouvoir explicatif de la variance des échantillons par les variables mesurées.

L'étude du cercle des corrélations des variables actives sur le plan factoriel principal (figure 24 et tableau III) montre que l'ensemble des symptômes sont projetés du même côté de l'axe principal tandis que seule la variable traitement est projetée à l'opposé ce qui pourrait laisser croire que les traitements ont eu une influence négative sur la prolifération des symptômes, cependant, l'étude des corrélations entre les variables et les facteurs (tableau IV) montrent que la variable traitement n'est que très faiblement corrélée au premier axe.

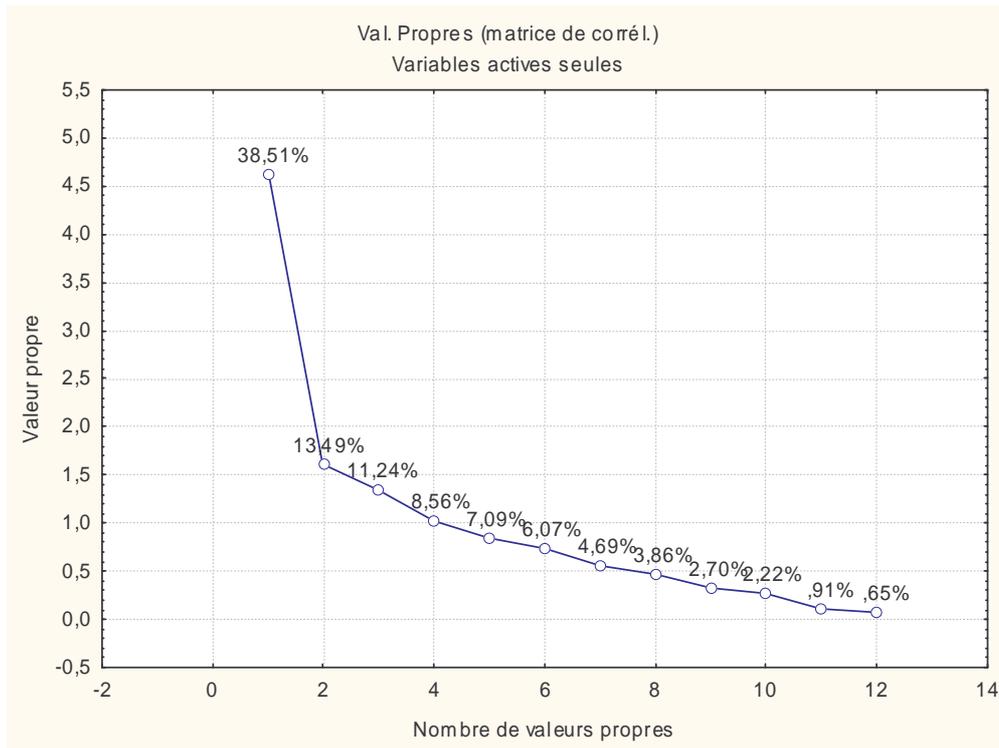


Fig. 23 : Tracé des valeurs propre de l'ACP

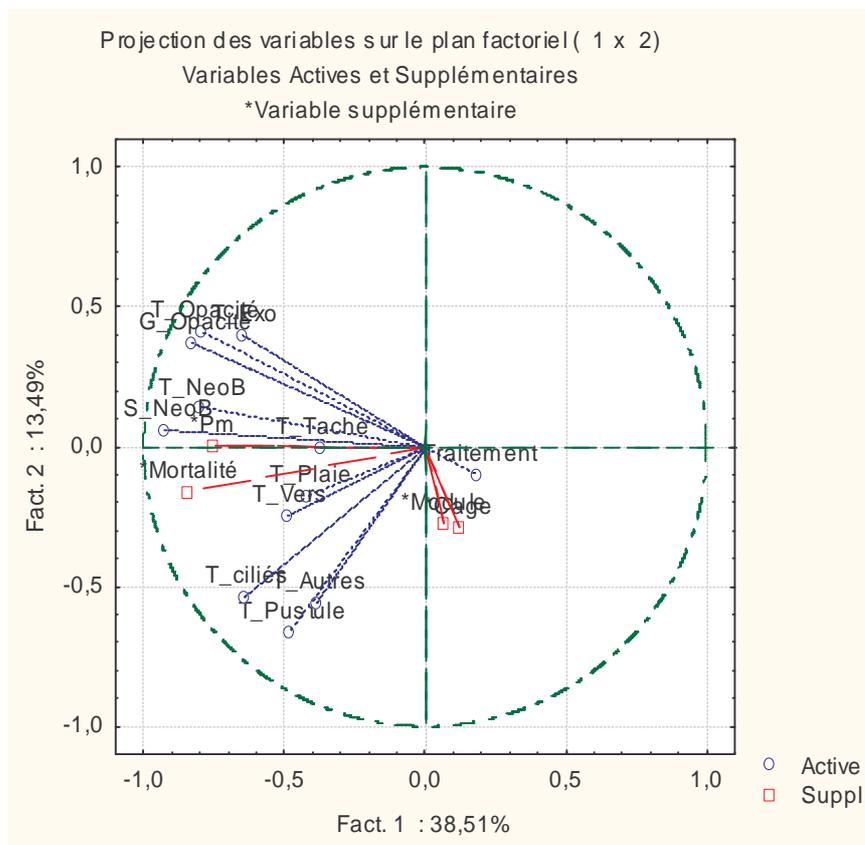


Figure 24 : Projections des variables de l'ACP dans le plan factoriel principal

Les variables les plus corrélées au premier axe sont les variables relatives à la contamination par les bédénias et à l'opacité des yeux. Les corrélations diminuent ensuite pour les autres symptômes. Cependant les contributions relatives de l'ensemble de ces variables avec l'axe sont faibles et il s'avère délicat de donner un sens à ce facteur. L'étude des axes suivants ne permet pas non plus de distinguer des variables marquantes, la contribution des variables étant diluée sur l'ensemble des axes. La projection des variables sur le deuxième plan factoriel (figure 25) ne montre ainsi aucune structure dans les données. On peut néanmoins souligner la corrélation négative entre le traitement et la présence de plaies et de vers sur le troisième axe, les contributions étant relativement faibles, il convient de rester prudent quant à la significativité de cette corrélation en particulier pour les vers dont le nombre d'observations est très faible.

Tableau III : Corrélations variables-facteurs pour les trois premiers axes de l'ACP

Variables	Fact. 1	Fact. 2	Fact. 3
Traitement	0,18	-0,10	0,67
T_Opacité	-0,79	0,41	0,18
G_Opacité	-0,83	0,37	0,14
T_Bene	-0,80	0,14	0,03
S_Bene	-0,92	0,06	0,03
T_Exo	-0,65	0,40	-0,03
T_Tache	-0,37	0,00	0,24
T_Plaie	-0,42	-0,17	-0,55
T_Pustule	-0,48	-0,66	0,03
T_ciliés	-0,64	-0,53	0,16
T_Vers	-0,49	-0,25	-0,58
T_Autres	-0,39	-0,56	0,34
*Cage	0,12	-0,29	0,11
*Module	0,07	-0,27	-0,10
*Pm	-0,76	0,01	0,27
*Mortalité	-0,84	-0,16	0,07

* Variables supplémentaires

Tableau IV : Contribution des variables aux trois premiers axes de l'ACP

Variable	Fact. 1	Fact. 2	Fact. 3
Traitement	0,007	0,006	0,332
T_Opacité	0,137	0,104	0,025
G_Opacité	0,149	0,084	0,015
T_Bene	0,138	0,012	0,001
S_Bene	0,185	0,002	0,001
T_Exo	0,092	0,098	0,001
T_Tache	0,030	0,000	0,044
T_Plaie	0,038	0,019	0,224
T_Pustule	0,050	0,268	0,001
T_ciliés	0,090	0,176	0,019
T_Vers	0,052	0,038	0,251
T_Autres	0,033	0,192	0,087

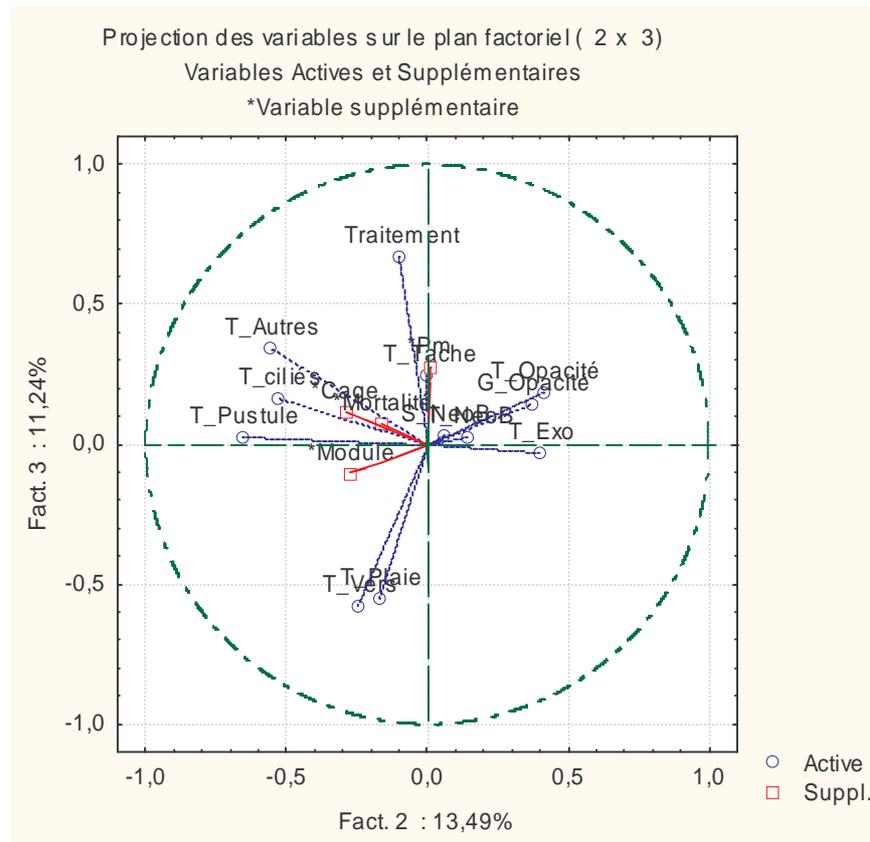


Fig. 25 : Projections des variables de l'ACP dans le deuxième plan factoriel

L'étude des variables illustratives n'apporte que peu d'information. Il peut sembler étonnant de prime abord d'observer une corrélation positive entre les symptômes et la croissance (figure 25) mais c'est probablement lié au fait que l'ampleur des symptômes, tout comme la valeur du poids moyen, ont augmenté au cours des mesures. C'est pourquoi la corrélation positive entre l'ampleur des symptômes et la mortalité, qui semble plus logique d'un point de vue biologique, n'est probablement pas significative également. Les paramètres cages et modules ne présentent pas de corrélations fortement marquées avec un axe en particulier ce qui peut suggérer qu'**il n'y aurait pas d'effet « lieu » sur les variables mesurées.**

Les corrélations entre les variables (deux à deux) sont synthétisées dans le tableau V. On peut immédiatement remarquer qu'aucun symptôme n'est significativement corrélé au traitement ce qui signifierait que **le traitement n'a pas eu d'influence sur la progression des pathogènes et maladies.** Plusieurs corrélations significatives ($p < 0,5$) peuvent être cependant observées entre les symptômes. Les corrélations les plus fortes sont observées entre l'opacité de l'œil et la contamination par les bénédénias, la corrélation la plus élevée étant entre la gravité de l'opacité (G_Opacité) et le nombre total de bénédénias (S_Bene). On peut également noter une corrélation, mais bien plus faible, entre le nombre de bénédénias et respectivement la présence d'exophtalmie et de ciliés. On peut cependant noter que la corrélation entre ces deux dernières variables n'est cependant pas significative. Enfin, on peut également noter la corrélation entre le taux de ciliés et le taux de pustules.

Tableau V : Matrice de corrélations entre variables

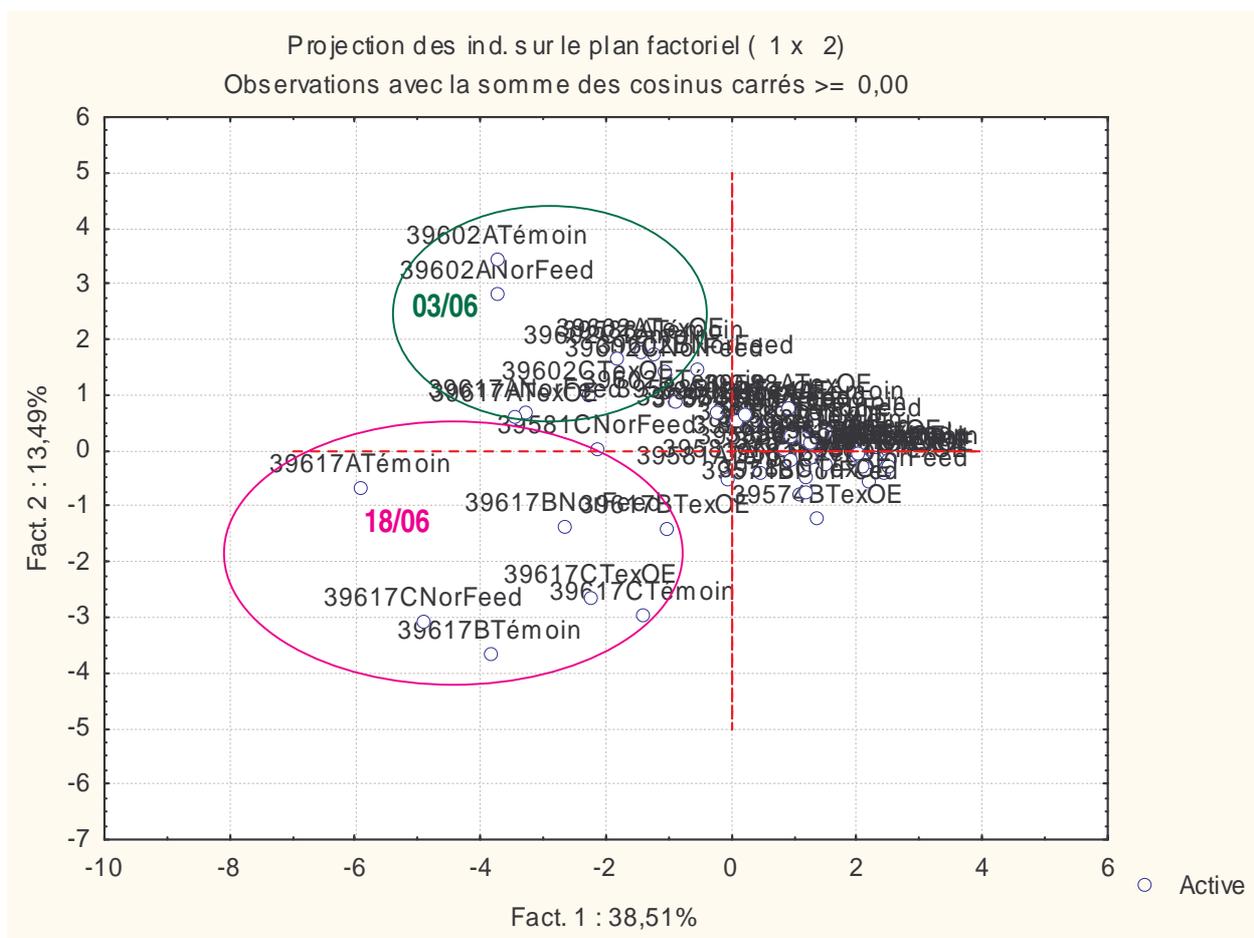
Variables	Traitement	T_Opacité	G_Opacité	T_NeoB	S_NeoB	T_Exo	T_Tache	T_Plaie	T_Pustule	T_ciliés	T_Vers	T_Autres
Traitement	1,00	-0,06	-0,09	-0,18	-0,18	-0,07	-0,05	-0,20	-0,08	0,00	-0,20	0,15
T_Opacité		1,00	0,84	0,62	0,68	0,60	0,36	0,27	0,08	0,30	0,18	0,21
G_Opacité			1,00	0,67	0,77	0,62	0,21	0,16	0,19	0,38	0,26	0,16
T_NeoB				1,00	0,84	0,38	0,21	0,25	0,33	0,40	0,24	0,18
S_NeoB					1,00	0,56	0,27	0,25	0,40	0,54	0,43	0,32
T_Exo						1,00	0,20	0,23	0,05	0,25	0,30	0,08
T_Tache							1,00	0,06	0,30	0,18	0,03	0,09
T_Plaie								1,00	0,12	0,28	0,45	0,18
T_Pustule									1,00	0,58	0,37	0,33
T_ciliés										1,00	0,26	0,51
T_Vers											1,00	0,11
T_Autres												1,00

Corrélations significatives en caractère gras

La distribution des données et les résultats précédents doivent cependant inciter à la plus grande prudence quant à l'interprétation des relations de cause à effet entre ces symptômes.

Dans l'étude des individus, compte tenu du plan expérimental, on devrait s'attendre à observer deux à trois sous populations si les traitements ont été efficaces. Or la projection des observations dans le plan factoriel principal ne permet pas de dissocier les cages selon les traitements (figure 26). On remarque cependant l'existence d'observations a priori atypiques qui correspondent non pas à une décomposition par lots (cage, traitement ou même module) mais par date avec les deux dernières mesures qui sont projetées à l'écart des autres observations et ceux pour toutes les cages. Ce phénomène suggère ainsi une forte variabilité des mesures entre les dates mais qui ne s'explique pas par les variables mesurées ou les paramètres mais plutôt par une évolution quasi aléatoire. Ces deux dernières séries de mesures ayant par ailleurs été réalisées avec un pas de temps différent des premières, il est également possible que l'écart observé par rapport aux précédentes observations n'est pas linéaire ce qui biaise l'interprétation des résultats de l'ACP, l'analyse n'intégrant pas la linéarité du temps dans la notion d'observation.

Fig. 26 : Projection du nuage d'individus sur le plan factoriel principal



▪ Etude de similarité des échantillons

Compte tenu du non respect des conditions de normalité pour la plupart des variables (annexe 8), il est nécessaire d'utiliser des tests non paramétriques pour déterminer si les traitements ont eu une influence. Une analyse de variance de Kruskal Wallis a donc été réalisée sur la matrice de résultat. Cette analyse a par ailleurs l'avantage de se baser sur les rangs et non les moyennes ce qui permet de contourner le problème du pas de temps évolutif au cours des mesures (une semaine puis quinze jours pour les deux dernières séries de mesures).

Les niveaux p associé à chaque variable sont compilés dans le tableau VI. L'analyse confirme ainsi que les échantillons ne sont pas significativement différents à partir des variables mesurées (au seuil de 5 %), c'est à dire que les traitements ont tous les deux été inefficaces sur le développement des pathogènes et maladies suivies et n'induisent pas une croissance supérieure ou une mortalité inférieure.

Afin de tester si un éventuel effet « lieu » masque les effets du traitement, l'analyse de Kruskal Wallis a été successivement reproduite en fixant comme variable de classement le module puis la cage. On peut constater une nouvelle fois qu'aucune discrimination ne peut être faite à partir des variables ce qui témoigne que les mesures ne sont pas significativement différentes entre module ou entre cage.

Tableau VI : Niveau p associé à l'analyse de Kruskal Wallis avec plusieurs variables de classement

Variables mesurées	Variable de classement		
	Traitement	Module	Cage
T_Opacité	0,869	0,055	0,408
G_Opacité	0,585	0,611	0,925
T_NeoB	0,319	0,207	0,649
S_NeoB	0,503	0,492	0,892
T_Exo	0,881	0,157	0,749
T_Tache	0,450	0,612	0,586
T_Plaie	0,240	0,159	0,366
T_Pustule	0,935	0,135	0,735
T_ciliés	0,888	0,921	0,996
T_Vers	0,340	0,340	0,122
T_Autres	0,807	0,959	0,995
Pm	0,883	0,454	0,954
Mortalité	0,146	0,338	0,581

▪ Interprétation

L'analyse de Kruskal Wallis nous amène à conclure que les traitements n'ont pas eu l'effet escompté : ils n'ont pas empêché le développement de la maladie. Tex-OE et le mélange Garmin B, Nor-Grape 80 et vitamine C ne sont que des produits préventifs du stress : dans une situation de forte pression infectieuse, ce genre de traitement ne peut limiter à lui seul le développement des pathologies. En revanche, il serait peut-être intéressant de les associer à des traitements préventifs antiparasitaires.

III. 4. Evaluation du traitement curatif

▪ Toxicité du peroxyde d'hydrogène

Les taux de survie obtenus après les traitements d'une durée de 12 jours sont présentés dans la figure ci-dessous.

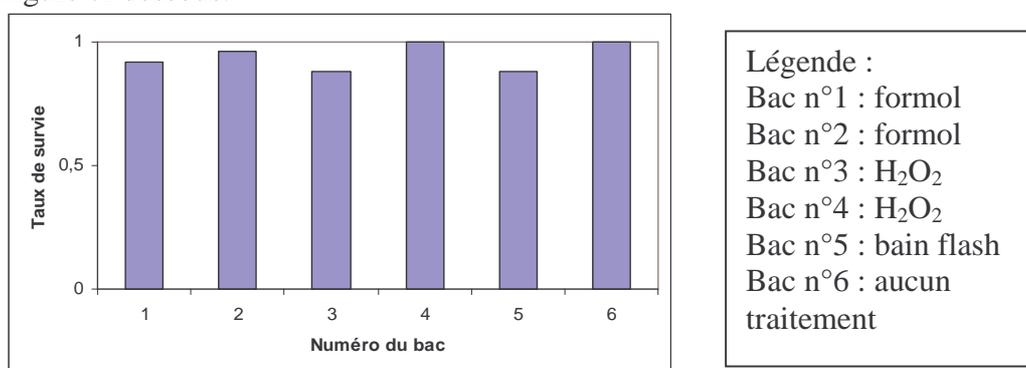


Fig. 27 : Taux de survie obtenu après traitement

Le bac n°3 présente 88 % de survie, tout comme le bac n°5. On obtient 100 % de survie dans le bac n°4, c'est à dire plus que pour le formol et le bain flash, et autant que le lot témoin.

Les bacs 3 et 4 correspondant aux lots traités au peroxyde d'hydrogène ont tous deux un taux de survie supérieur au seuil minimum des 70 %. De plus, comparé aux deux autres traitements (formol et bain flash) et au lot témoin, on peut considérer que le produit testé présente un niveau d'innocuité au moins égal à celui du bain flash.

Par conséquent, cette expérience préliminaire permet de conclure que le peroxyde d'hydrogène utilisé à la dose de 200 ppm à raison d'une heure par jour ne présente pas de toxicité pour de jeunes poissons chauve-souris d'un poids moyen de 100 grammes.

▪ Evaluation de l'efficacité

Dans un premier temps, les états sanitaires initial et final nous permettent de comparer le nombre de poissons atteints d'opacité des yeux par traitement, en début et en fin d'expérience. Les données sont présentées sur le graphique ci-dessous.

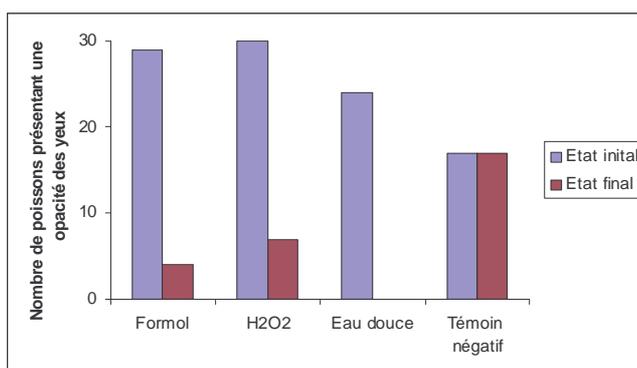


Fig. 28 : Comparaison du nombre de poissons atteints d'opacité des yeux par traitement, en début et en fin d'expérience

Le symptôme d'opacité des yeux a nettement régressé dans les lots de poissons ayant reçu un traitement alors que dans le lot témoin négatif il n'y a eu aucune amélioration.

Dans un deuxième temps, les fréquences observées des poissons présentant une opacité des yeux en fin de traitement ont été rentrées dans une tableau de contingence (tableau ci-dessous). Un test du khi deux a été réalisé pour comparer les échantillons. Afin de remplir les conditions d'utilisation, nous avons dû appliquer la correction de Yates.

Tableau VII : Fréquences observées des poissons présentant une opacité des yeux par traitement en fin d'expérience

Opacité des yeux	Formol	H ₂ O ₂	Eau douce	Témoin négatif	Total
Présence	4	7	0	17	28
Absence	43	40	22	8	113
Total	43	47	22	25	141

Tout d'abord, nous avons comparé l'ensemble des échantillons (annexe 9) : la valeur du khi deux observée (41,293) étant largement supérieure à celle du khi deux critique (7,81),

on peut conclure avec un risque d'erreur α de 5 % qu'il y a une différence hautement significative entre les échantillons.

Ensuite, pour savoir d'où provenait cette différence, nous avons recommencé l'analyse en excluant le lot témoin négatif (annexe 10) : cette fois-ci, la valeur du khi deux observée (2,368) étant inférieure à celle du khi deux critique (5,991), on peut conclure avec un risque d'erreur α de 5 % qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois traitements.

Ainsi, la comparaison des états sanitaires initial et final et le test du khi deux nous permettent de conclure que le peroxyde d'hydrogène, le formol et l'eau douce ont tous trois permis la régression du symptôme d'opacité des yeux. Celui-ci étant le témoin de l'infestation parasitaire, on peut penser que le peroxyde d'hydrogène est efficace pour traiter des poissons parasités.

III. 5. Bilan de la situation

Après deux mois de grossissement en cage, on peut qualifier les mortalités observées dans le cycle 2008-01 de massives. En effet, avec un taux de 43,18 %, nous sommes loin des 80 % de survie qui devraient être idéalement obtenus après une phase de grossissement de 11 mois (14). Comparé aux cycles précédents, nous retrouvons toujours un premier pic de mortalité peu de temps après la mise en cage, mais bien plus précocement qu'avant : à 2 semaines contre 1 mois pour les cycles 2006-05 et 2007-01. Outre le fait évident que les poissons passent par une phase de stress et d'adaptation à leur nouvel environnement, ce facteur ne peut expliquer à lui seul l'ampleur du phénomène : un agent pathogène en est à l'origine. En effet, cette étude nous a permis d'incriminer un parasite dans les mortalités observées : les premiers symptômes d'opacité des yeux ont été relevés en début de 2^{ème} semaine, et lors du 2^{ème} échantillonnage, nous avons mis en évidence et identifié l'agent étiologique majeur: *Benedenia seriola*. Par rapport aux suspicions de départ, nous ne pensions pas que le développement parasitaire serait aussi rapide. Les parasites adultes trouvés lors du 2^{ème} échantillonnage mais absent lors du premier laissent penser que le cycle de reproduction a une durée comprise entre 7 et 14 jours à une température variant entre 26,5°C et 28,6°C. Mais ce phénomène et le pic de mortalité précoce peuvent probablement être expliqués de la manière suivante : le site où ont évolué les juvéniles a accueilli depuis fin 2006 quatre lots de poissons en grossissement. Durant toute cette période, les seuls éléments nettoyés pour éviter l'accumulation des bio-salissures ont été les filets d'élevage. Toutes les autres structures (armatures, filets de protection, ponton) sont restées en place. Or, les œufs de parasites s'accrochent à ces structures qui représentent en plus un substrat idéal de par la proximité avec leur hôte. Par ailleurs, les modules contiennent en permanence des lots de poissons adultes (*Platax orbicularis* et *Polydactylus sexfilis*). Par conséquent, tout ceci contribue à la formation d'un véritable réservoir d'agents pathogènes. La pression infectieuse s'est accrue au fil du temps et il est donc normal qu'à l'introduction de sujets sains les maladies se soient développées plus rapidement.

Après une légère accalmie, on constate une nouvelle augmentation des mortalités à partir de la 5^{ème} semaine. Dans un même temps, on remarque une diminution de l'appétit des poissons, l'apparition de courant dans les cages ainsi que la présence de nouveaux agents : bactérie chlamydia-like, trichodine et autres ciliés et flagellés. Certes peu pathogènes en temps normal, l'émergence simultanée de tant de nouveaux organismes témoigne d'un affaiblissement important de l'état physiologique des juvéniles. L'ensemble de ces facteurs les sensibilise d'autant plus au parasitisme. Par ailleurs, il n'est pas impossible que dans de telles circonstances l'épithéliocystis soit réellement devenu pathogène. Ainsi, l'effet conjugué

des conditions environnementales et de stress physiologique sur le métabolisme des juvéniles explique la recrudescence des mortalités.

Pour surmonter le point de blocage rencontré au début de la phase de grossissement, il faut avoir recours à des méthodes de lutte appropriées, sachant que les mesures prophylactiques sont à privilégier aux mesures curatives. La prévention est la règle prioritaire en aquaculture. Concernant les maladies parasitaires dans les élevages en cages, on ne peut prétendre à l'élimination totale des agents pathogènes puisqu'ils font parti de l'écosystème naturel. La présence de quelques parasites n'a habituellement aucun impact sur la santé des poissons. La maladie se déclare seulement lorsque l'équilibre hôte-parasite est rompu. Pour maintenir cet équilibre, la répétition régulière des traitements est un moyen de contrôler la pression parasitaire afin d'éviter qu'elle ne dépasse le seuil infestant. De plus, il est primordial de connaître le cycle de reproduction de ces agents pathogènes pour appliquer un traitement adéquate et efficace (15). Dans notre cas, nous avons vu que *B. seriolae* se développe en moins de deux semaines. Par ailleurs, les œufs de capsalidés peuvent se fixer sur les structures d'élevage : il est donc impératif d'inclure leur nettoyage dans notre plan de prévention. Celui-ci inclut deux volets.

La prophylaxie médicale en est le premier. Elle consiste en l'application de traitements préventifs anti-parasitaires. Dans les piscicultures de la région Asie-Pacifique confrontées au même problème, les bains au formol, au peroxyde d'hydrogène ou d'eau douce sont les trois traitements les plus couramment utilisés mais aussi les plus efficaces (16). Pour l'élevage de « paraha peue », il est recommandé de traiter les poissons tous les 10 jours, compte tenu de la durée du cycle de développement de *B. seriolae*. La prophylaxie médicale doit s'étendre sur toute la période sensible qui reste à déterminer. En Asie, les traitements préventifs sont préconisés sur une durée de 3 à 4 mois (16). Dans un environnement où la charge en agents pathogènes est importante, les traitements visant à diminuer le stress ne peuvent en aucun cas limiter à eux seuls la contamination. C'est pourquoi le Tex-OE et le mélange testés n'ont pas eu l'effet escompté. En revanche, ils pourraient être utilisés en complément des bains.

Le deuxième volet du plan de prévention est la prophylaxie sanitaire. Elle passe par de bonnes pratiques d'élevage que sont la recherche et le maintien de la qualité de l'eau, l'espace vital accordé aux animaux, le choix et la disponibilité de l'alimentation, afin d'éviter tout stress majeur. La désinfection du matériel rentre également dans ce cadre. Cependant, il s'agit d'un point délicat compte tenu du risque à retirer les filets de protection et de la difficulté à nettoyer les structures rigides (ponton, armatures des cages). A l'heure actuelle, l'équipe zootechnique tente de trouver une solution à ce problème. Tant que ce point reste en suspens, l'accent doit être mis sur la limitation du stress et la prophylaxie médicale.

Enfin, les traitements curatifs doivent être de dernier recours. Ce sont les mêmes que ceux utilisés pour la prévention. D'après la littérature, le peroxyde d'hydrogène est un traitement curatif efficace contre les parasites monogènes (16). Le plus important est de s'être assuré de la non toxicité du produit à la dose de 200 ppm sur *Platax orbicularis* grâce à nos essais préliminaires. Il présente donc une alternative intéressante au formol et à l'eau douce pour trois raisons : tout d'abord, le formol est un produit rémanent et donc peu écologique. Son utilisation en milieu ouvert va à l'encontre d'une aquaculture durable. En outre, il enlève chimiquement de l'oxygène de l'environnement à raison de 1 mg/L pour chaque 5 mg/L de produit utilisé (17). Il est donc nécessaire de compléter l'eau en oxygène lors du traitement. Ensuite, le bain flash a l'avantage de ne présenter aucun danger pour le milieu. Malheureusement, il s'agit d'une technique contraignante et stressante: il est peu pratique de transporter de grandes quantités d'eau douce d'une part, et ce traitement nécessite la sortie des poissons des cages d'autre part. Enfin, le peroxyde d'hydrogène est totalement écologique et

non polluant. Il se décompose en eau et en oxygène et ne présente ainsi aucun risque de pollution pour l'environnement (17).

Il serait judicieux que le traitement comprenne deux applications à quelques jours d'intervalle : la première tuerait les parasites adultes mais pas les œufs restés accrochés à l'hôte. Après éclosion et transformation des larves, la deuxième application éliminerait les immatures et éviterait ainsi une nouvelle contamination. Dans les cas d'infestation importante, trois applications sont conseillées à 2 jours d'intervalle (J0, J3, J5) (16).

Toutefois, traiter des poissons en cage par bain requiert de la main d'œuvre et du temps, dépend des conditions météorologiques et stresse les poissons. Il existe un anthelminthique bien plus pratique d'utilisation car administrable par voie orale : le praziquantel. Commercialisé sous le nom de Hadaclean® (Bayer), il se mélange à l'aliment. Malgré une diminution de l'appétence du granulé, il s'est révélé efficace à la dose de 150mg/kg/j pour traiter des sérioles infestées de parasites monogènes au Japon (18). Le problème majeur réside dans la légalité de son utilisation car il ne figure pas sur la liste européenne des médicaments autorisés en aquaculture dont les produits sont destinés au marché de la consommation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette expérience au sein du SPE et du COP a enrichi mes compétences et m'a permis de rallier ma formation vétérinaire à l'aquaculture. Outre la familiarisation avec le milieu, j'ai reçu une réelle formation en pathologie piscicole. Après avoir travaillé sur le terrain et en laboratoire, j'ai acquis un savoir faire essentiel relatif au diagnostic des maladies. En effet, j'ai appris à reconnaître des poissons en mauvais état de santé de par leur comportement et les éventuels symptômes et lésions qu'ils peuvent présenter. Puis j'ai été formée aux techniques de prélèvements, à certaines techniques d'analyse (état frais, bactériologie et histologie), et à l'identification de certains agents pathogènes. Pour savoir comment réagir face à l'émergence de maladies en élevage, j'ai pris connaissance des méthodes de lutte et de la législation relative à la pharmacie vétérinaire en aquaculture.

Enfin, ce stage m'a également permis de me faire une opinion sur le travail de recherche et développement, de m'informer sur la place économique du secteur de l'aquaculture en Polynésie française et de me renseigner sur des formations plus poussées en pathologie aquacole.

Mon travail a contribué à une meilleure compréhension du problème de mortalités rencontré systématiquement après la mise en cage des juvéniles. La cause pathologique identifiée et le cycle de développement parasitaire déterminé, il en a découlé la proposition de mesures adaptées, en tenant compte des moyens disponibles. Il convient de souligner l'importance d'agir en prévention et non une fois la maladie déclarée. L'efficacité de ces mesures pourra être évaluée lors de la prochaine sortie en mer de juvéniles.

De plus, les résultats du suivi zoosanitaire du cycle 2008-01 pourront être utilisés lors du projet « Essais d'élevage en cages du paraha peu chez des privés » (prévu pour janvier 2009). En particulier, il serait intéressant de comparer le taux de mortalité suite à la mise en cage et d'observer le développement d'éventuels parasites sur un autre site que celui du COP.

A l'heure où l'aquaculture polynésienne est en voie de développement, les difficultés rencontrées à l'échelle expérimentale permettent de développer des mesures alternatives et préparer au mieux le transfert du savoir-faire à l'échelle de la production. Un des points concerné par cette phase de préparation est la nécessité de contrôler les maladies au sein de l'élevage. Néanmoins, il faut aussi penser aux risques de contamination pouvant provenir du milieu extérieur à la ferme. Par exemple, les produits importés de pays dont les cheptels sont touchés par des maladies potentiellement dangereuses pour nos espèces locales doivent d'autant plus être surveillés. Ainsi, la maîtrise sanitaire des élevages permettra d'assurer en partie la viabilité économique de cette activité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) La pisciculture lagonaire, *Service de la Pêche* http://www.peche.pf/rubrique.php3?id_rubrique=211, février 2008
- (2) Rottmann R. W., Francis-Floyd R., Durborow R., The Role of Stress in Fish Disease, *Southern Regional Aquaculture Center*, no. 174, 3p., 1992
- (3) Gasset E., Remoissenet G., Covès D., Maamaatuaiahutapu M., Tamata T., Joufoques V., Teissier A., Nedelec G., David R., Cochenec-Laureau N., Maîtrise technique de la production de poissons lagunaires, *Convention n° 6.0175*, Polynésie française, SPE-Ifremer, 33 p., 2006
- (4) Bondad-Rantaso M. G., Subasinghe R. P., Arthur J. R., Ogawa K., Chinabut S., Adlard R., Tan Z., Shariff M., Disease and health management in Asian aquaculture, *Veterinary parasitology*, vol. 132, pp. 249-272, 2005
- (5) Leong Tak Seng, Zilong Tan, Enright W. J., Important parasitic diseases in cultured marine fish in the Asia Pacific region, *AQUA Culture Asia Pacific Magazine*, vol. 2, no. 1, pp. 14-16, 2006
- (6) Buchman K., Brescian J., Monogenea (Phylum Plathyelminthes), *Fish Diseases and Disorders*, Woo P. T. K., CAB International, London, vol. 1, 2nd edition, pp. 297-346, 2006
- (7) Stephen F., communication personnelle, mai 2008
- (8) Whittington I. D., The Capasaliidae (Monogenea: Monopisthocotylea): a review of diversity, classification and phylogeny with a note about species complex, *Folia Parasitologica*, vol. 51, pp. 109-122, 2004
- (9) Nowak B. F., La Patra S. E., Epitheliocystis in fish, *Journal of Fish Diseases*, vol. 29, pp. 573-588, 2006
- (10) Goodwin A. F., Park E., Nowak B. F., Successful treatment of largemouth bass *Micropterus salmoides* (L.) with epitheliocystis hyperinfection, *Journal of Fish Diseases*, vol. 28, pp. 623-625, 2005
- (11) Basson L., Van As J., Trichodiniae and Other Ciliophorans (Phylum Ciliophora), *Fish Diseases and Disorders*, Woo P. T. K., CAB International, London, vol. 1, 2nd edition, pp. 154-182, 2006
- (12) Noga E. J., Trichodinosis, *Fish Disease Diagnosis and Treatment*, Noga E. J., Blackwell, Iowa, pp. 99-101, 2000
- (13) Montgomery-Brock D., Sylvester J. Y., Tamaru C. S., Brock J., Hydrogen peroxide treatment for *Amyloodinium* sp on mullet (*Mugil cephalus*) fry, *Regional notes*, vol. 11, no. 4, pp. 4-6, 2000
- (14) Maamaataiahutapu M., communication personnelle, juillet 2008
- (15) Wendover N., Komar C., Step by step to a marine prevention plan, *Intervet Aquatic Animal Health*, vol. 15, pp. 5-9, 2007
- (16) Leong Tak Seng, Zilong Tan, Enright W. J., Important parasitic diseases in cultured marine fish in the Asia Pacific region, *AQUA Culture Asia Pacific Magazine*, vol. 2, no. 2, pp. 25-27, 2006
- (17) Morin R., Les produits de traitement utilisés en aquaculture, à quoi servent-ils ?, *L'AQUICOLE*, vol. 12, no. 1, 16 p., 2006
- (18) Williams R. E., Ernst I., Chambers C. B., Whittington I. D., Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriolae* and *Benedenia seriolae* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*, *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 77, pp. 199-205, 2007

ANNEXES

Annexe 1a: Organigramme du Service de la Pêche

Organigramme cible du Service de la pêche au 31 décembre 2007
Ministère de tutelle : Ministère de la mer, de la Pêche et de l'Aquaculture

Direction = 4

Direction	
Chef de service	1
Stephen Yen Kai Sun	
Secrétariat de direction	4
Vacant A	
Louise Degage	
Caroline Pastare	
Ruben Orzas	
	5

Echelon de conception = 7

Bureau Administration / Finances		Bureau Communication	
Chef de bureau	1	Chef de bureau	1
Alain Santoni		Tiare Perilla y Perilla	
Marchés-Conventions	1		1
Esther Lemoine			
Ressources humaines	1		
Stella Cowan			
Comptabilité	2		
Andréa Roomasaroa			
Vaea Gugimaker			
Affaires juridiques	1		
Siab Ghabi			
Logistique			
	6		

Echelon de mise en oeuvre 47

Subdivision des Iles Sous Le Vent

Subdivision des Iles Du Vent (SIDV)

Secteur ISLV		Cellule Développement		Cellule Réglementation/Contrôle		Cellule statistiques		Secteurs IDV	
Coordination		Assistante du DEV	1	Juridique	1	Chef de cellule	1	Coordination	
Stephen YEN KAI SUN		Corinne Rohr (2ème CDD)		Frédérique Damos (CDD)		Cédric Ponsonnet		Stephen Yen Kai Sun	
Secteur Raikaa	4	Pêche	5	Secteur houtier	3	Base de données	1	Ecolerie de Tararoo	
Philippe Choume		Georges Fèvre		Heraani Poroi		Sylvestre Sanchez (SIT)		William Tapu	
Enoha Terou		Caroline Rolliau		Leopold Tauru		Stéphane LI (SIT)		Maui Tauhiro	
Lady's Marahiti		Christophe Misseis		Tearu Mercier		Christophe Ora (1er CDD)		Fatino Tamu	
Eric Millaud		Benoit Le Maréchal (1er CDD)		Secteur lagonaire	4	Saisie statistiques	4	Lora Teva	
Secteur Tahaa	1	Frederic Leproux		Moetua Ayou		Vincent Teumere		Daniel Sanford	
Georges Kong Fou		Pêche lagonaire	2	Rose Mulliez		Lofita Raihau		Gérard Parker	
Secteur Huahine	2	Christian Monier		Mélanie Perolini		Bernadette Teai		Secteur Moorea	
Meari Mataha		Arsène Stein		Nicolas Ebb		Edmond Teumere		Maire Bustamante	
Alain Ah Min		Aquaculture - Papeete	2	Contrôle	2	Secteur Papeete	2		
	7	Georges Bernissenet		Faana Frédéric		Tahina Tehei			
		Xavier Ceran-Jerusaleny		Faaturai Auguste		Alexandre Tamaehu			
		Aquaculture - Vaïao	6		9		8		
		Moana Maamaatiahurapu							
		Rarahu David							
		Vaiana Joufoques							
		Thierry Tamata							

Annexe 1b : Organigramme de la cellule Développement Aquaculture basée au COP

PISCICULTURE

	Administratif Logistique Organisation des travaux	Maturation	Pré- Géniteurs	Proies vivantes et filtration	Larvaire	Sevrage- Nurserie	Cages	Transport (alevins et géniteurs)
Responsable	Moana	Vaiana	Vaiana	Moana	Moana	Moana	Thierry	Thierry
Adjoint	Vaiana	Moana	Moana	Alex	Alex	Alex	Sylvain	Alex
Suppléant	Thierry	Alex	Alex	Thierry	Thierry	Thierry	Alex	Sylvain
Tâches quotid.	Moana	Vaiana	Alex	Alex	Moana	Alex	Thierry	

Responsable du programme

Georges basé à Fare Ute

**Chargé du programme
Responsable scientifique**

Moana
Eric*

* Ifremer Pisciculture au sein de l'équipe "Assistance technique Crevettes-Poissons"

** Formation aux prélèvements à réaliser

Contact Patho

Rarahu

Communications :
(minimum)

	Destinataires prioritaires	Copie
Administratif	Moana, Georges	DIRECTION et ou BAF SPE, Jeannot
Technique	Eric + Resp d'unité SPE	Moana, Jeannot, Georges
Patho	Rarahu	Nathalie (puis son remplaçant), Marie-Estelle, Eric, Moana, Georges, Jeannot
Logistique	Marcel, Resp d'unité SPE,	Eric, Georges, Jeannot
Écloserie	Georges, Eric, Moana	Marcel, Jeannot

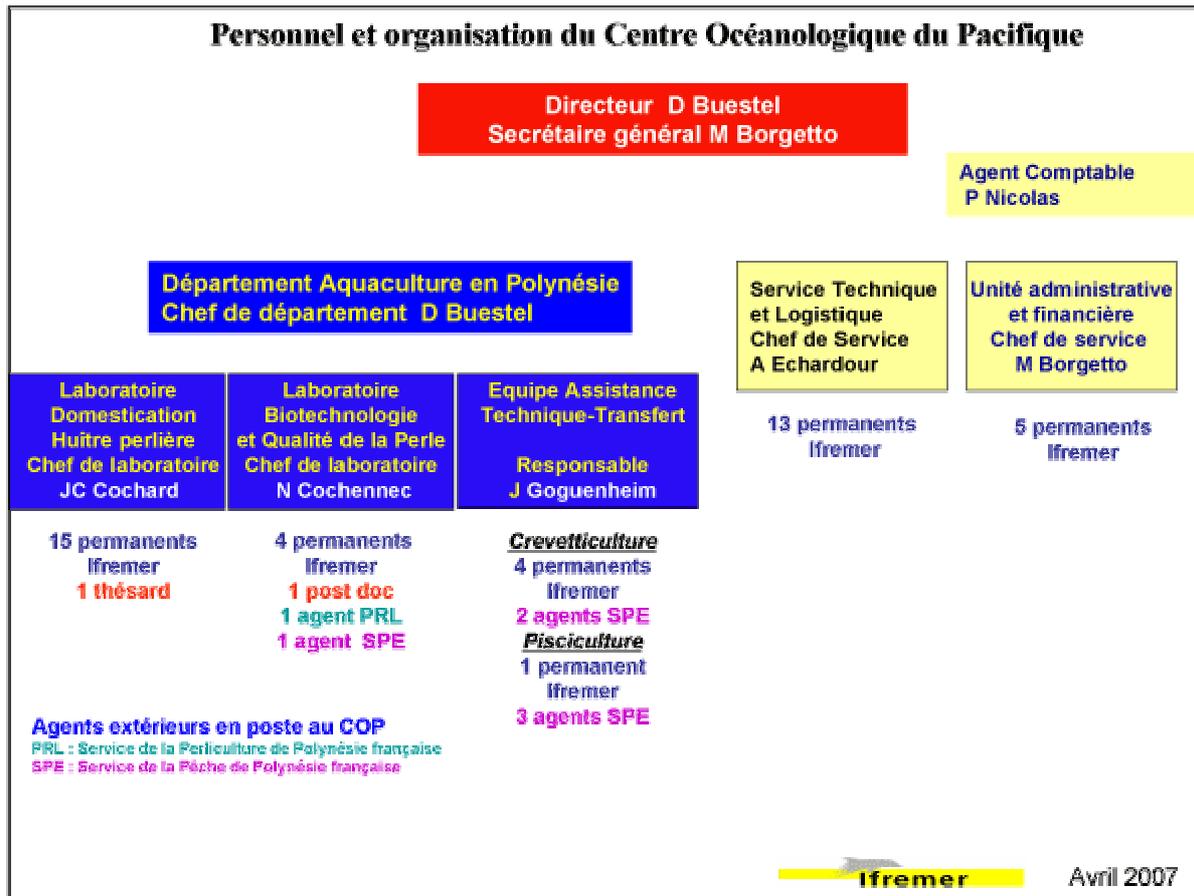
CREVETICULTURE et ASSISTANCE TECHNIQUE Crevettes-Poissons (missions)

Responsable technique et scientifique	Jeannot	Responsable SPE Fare Ute = Georges
Suivi administratif des agents SPE	Moana	Responsable SPE Fare Ute = Georges
Souches géniteurs	Stanley, Romain et Alain	Appui René (IFREMER)
Crevettes en cages	Romain et Alain	Appui René (IFREMER)
Tests éclosion	Stanley, Romain et Alain	Appui René (IFREMER)
Assistance technique crevettes	Thierry et Stanley (présent pêche nurserie EPT)	2h x 3 j (sur 6 cycles) = 30 h. Planning à fournir à Thierry
Assistance technique poissons	Thierry, Alex, Sylvain	

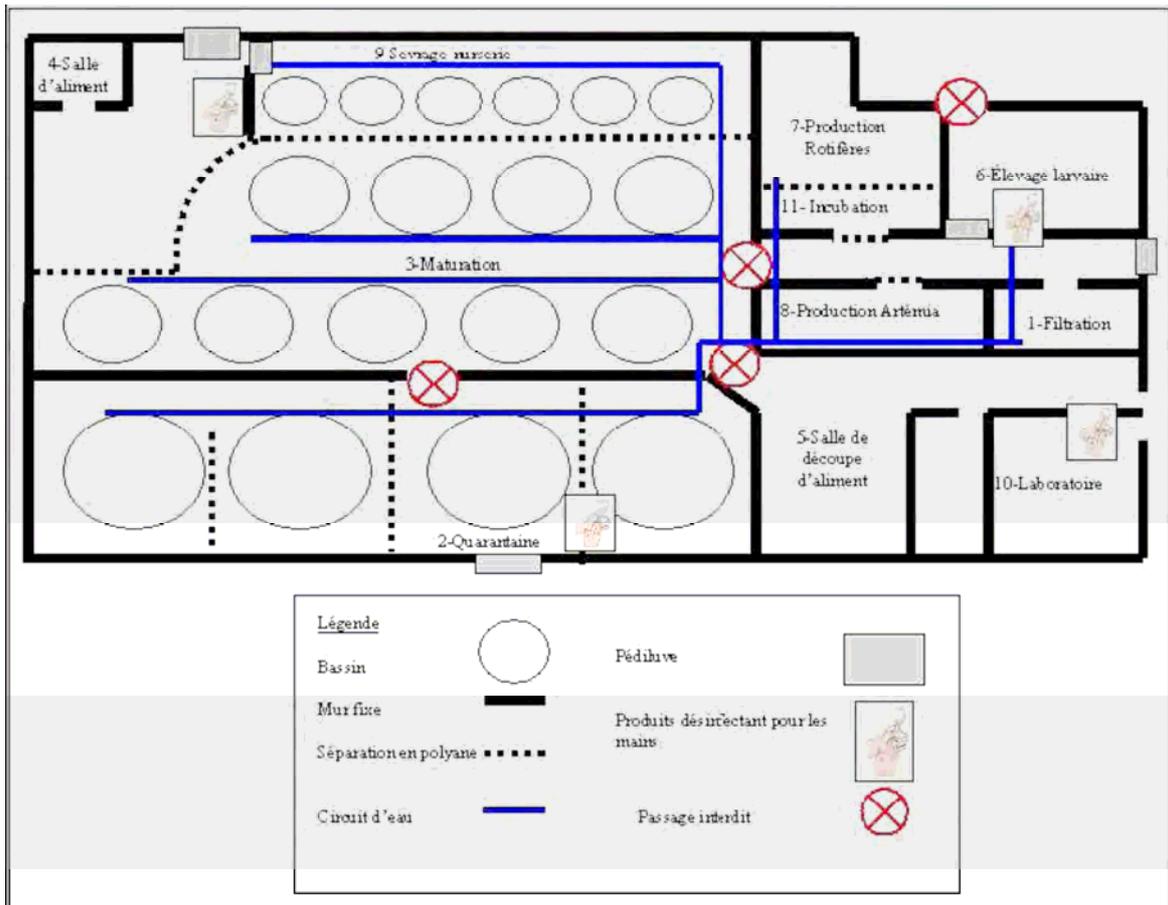
PATHOLOGIE AQUACOLE

Responsable technique et scientifique	Nathalie (puis son remplaçant)	Responsable SPE Fare Ute = Georges
Chargé du programme	Rarahu	Suivi SPE par Georges
Suivi administratif des agents SPE	Moana	responsable SPE Fare Ute = Georges

Annexe 2 : Organigramme du Centre Océanologique du Pacifique



Annexe 3a : Plan de l'écloserie de poissons



Annexe 3b : Module de grossissement



Annexe 4 : Fiche technique du Garmin B

SUPPLIER OF NATURAL ADDITIVES TO THE ANIMAL FEED INDUSTRY

NOR-FEED SUD Sarl
1 rue Alexandre FLEMING
49066 ANGERS cedex 01
FRANCE
Tel: +33 2419 374 56
Fax: +33 2414 895 17
Email: pierre.chicoteau@nor-feedsud.fr

NATURAL PARASITE REPELLENT

Garmin B Powder

- Cold blooded animals -

Description

Garmin B Powder is a natural insect- and parasite-repellent, effective against embarrassing/biting insects. It is, for instance, effective in repelling for lice from fish and crustaceans grown under intensive conditions in aqua- and mariculture.

It is a blend of selected pure garlic powders and Vitamin B₁.

The product contains all the active elements of garlic. Especially the high content of specific sulphur compounds is of importance to this specific use. Additionally, the product gives off a strong smell originating from Vitamin B₁ which in combination with the traditional smell of garlic gives the product its insect- and parasite-repelling smell.

Specifications

Ingredients:	Powders of two or three species of Garlic, and Vitamin B ₁
Appearance:	Beige to light-brown powder
Smell:	Like strong garlic
Storage:	In a dry and cool place. Avoid leaving the bag open for a longer period.
Packing:	5 kg plastic pails, 25 kg paper-bags with inner polyethylene bags

Suggested dosage

Fish:	1000-2000 ppm in pelleted or extruded feeds
Crustaceans:	500-2000 ppm in pelleted or extruded feeds

August 2006

® **Garmin B** est une marque déposée de Dumas Aps, société sœur de NOR-FEED.

ET 0250407

Annexe 5 : Fiche technique du Nor-Grape 80

THE ONLY NATURAL ADDITIVES TO THE ANIMAL FEED INDUSTRY

NOR-FEED SUD

NOR-FEED SUD Sarl
1 rue Alexandre FLEMING
49066 ANGERS cedex 01
FRANCE
Tel: +33 2419 374 56
Fax: +33 2414 895 17
Email: pierre.chicoteau@nor-feedsud.fr

Fiche Technique



Organisme Certificateur

Nor-Grape[®] 80 Powder

Description

Nor-Grape 80 Powder est un extrait naturel de raisins destinés à l'alimentation animale. Ce produit est obtenu par extraction et purification de pépins et de pellicules de raisin *Vitis vinifera*. Les procédés d'extraction mis en œuvre ne font pas appel à des solvants organiques. Après extraction le produit est atomisé.

Nor-Grape 80 Powder est un extrait de raisin riche en polyphénols qui lui confèrent une activité antioxydante largement décrite (Kristiina Pelli, Marika Lyly, 2003). Cette activité est renforcée par son association avec d'autres antioxydants comme la vitamine E, par exemple.

Le produit est fabriqué en France pour Nor-Feed Sud.

Spécifications

Composition:	Extraits secs de pépins et de pellicules de raisin (<i>Vitis vinifera</i>)
Analyse typique:	Polyphénols totaux > 80 % Procyanidols > 60 % Anthocyanes > 0.75 % Cendres brutes < 6 % Humidité < 10 % pH 3-5
Solubilité dans l'eau (50 g/l):	> 85 %
Aspect:	poudre fine marron pourpre (en fonction du process de fabrication, la couleur peut varier d'un lot à l'autre)
Toxicité:	non toxique
Stabilité:	24 mois minimum à température ambiante
Emballage:	fût de 20 kg et seaux de 5 kg

Mode d'emploi

Si l'objectif recherché est l'amélioration de la qualité de la viande, il est recommandé d'associer Nor-Grape avec de la vitamine E. Dans ce cas, la dose suivante est recommandée :

Pores charcutiers:	10 g/t de Nor-Grape 80
Veaux de boucherie:	
Volailles, chair :	

Si l'objectif recherché est la pleine compétence des défenses des animaux, il est recommandé d'associer Nor-Grape avec d'autres anti-oxydants : Vit.E, C, Sélénium, pigments... Dans ce cas, les doses suivantes de Nor-Grape 80 sont recommandées, la deuxième dose correspondant aux situations difficiles :

Porcelets :	6 à 15 g / tonne d'aliment
Pores charcutiers :	3 à 10 g / tonne d'aliment
Truies, agneaux, veaux :	5 à 15 g / tonne d'aliment
Aviculture (jeunes et reproduction) :	5 à 15 g / tonne d'aliment
Poules pondeuses, poulets, dindes :	4 à 10 g / tonne d'aliment
Aquaculture :	15 à 30 g / tonne d'aliment
Chevaux :	60 à 300 mg / 100 kg de poids vif
Chiens et chats :	10 à 20 g / tonne d'aliment

Annexe 6 : Fiche technique du Tex-OE



Institute of Cellular Pharmacology.

Unit F24, Mosta Technopark, Mosta MST 3000, Malta. Tel (356) 21438458

Fax (356) 21419778 VAT No. MT 1481 1120 Co. Reg. No. C21455

TEX-OE®

TEX-OE® is a natural extract of a cactus that is consumed by Millions of people worldwide.

TEX-OE® is not Toxic or Hazardous.

TEX-OE® may be used to induce the rapid synthesis of HSP following physical and or physiological stress, thus it may be used to help protect fish from the harmful effects associated with these conditions.

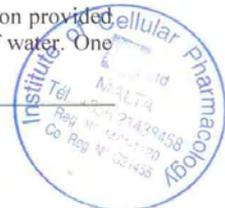
TEX-OE® may be applied to fish to counteract the effect of physical / physiological stress such as transportation or grading.

Method of application.

The most appropriate method of application to obtain maximal affect is to immerse the fish in the TEX-OE® solution prior the start of Stress.

- Starve the fish prior the treatment for a period of 2 hours (if this is possible).
- Add the TEX-OE® solution to the holding tank where the fish will be exposed to stress, such as the transport vessel or the holding tank stocking the fish prior transport, grading or post capture. The TEX-OE® is prepared at a high concentration in pure ethanol. 1 ml of TEX-OE solution should be used with a volume of water of 250 Lt. (52 gallons) at a fish stocking density up to 50 Kg of fish per 1000 Lt. TEX-OE® is made up in ethanol so that it will dissolve and disperse easily in the water. To aid the dispersion the TEX-OE® should be mixed with a volume of water (10 Lt.) and then added to the holding tank.
- It is possible to use the same quantity of TEX-OE® per volume of water if the fish density is lower than 50 Kg per 1000 Lt. TEX-OE® has been proven not to be toxic at concentrations several orders of magnitude higher than the recommended application dose.
- For small volumes (such as transport tanks of approximately 10 Lt. or two gallons) the TEX-OE® solution should be diluted accordingly. A 1/10 dilution is recommended prior use. Measure 0.5 ml of the TEX-OE® stock solution provided using a pipette and add to a measuring cylinder containing 4.5 ml of water. One

Directors: C.M.Saliba (Managing), G.Gutierrez, C.Briatta





Institute of Cellular Pharmacology.

Unit F24, Mosta Technopark, Mosta MST 3000, Malta. Tel (356) 21438458
Fax (356) 21419778 VAT No. MT 1481 1120 Co. Reg. No. C21455

ml of this solution (the 1/10 dilution) of TEX-OE should be added to a tank holding 10 Lt. of water and thoroughly mixed.

- After addition and thorough mixing of the diluted TEX-OE[®] solution, the fish should be introduced into this tank.
- Allow the fish to be immersed in the water containing the TEX-OE[®] solution for a period of 2 hours without feeding to ensure appropriate dosing of the fish. If it is possible to leave the fish in contact with the TEX-OE[®] solution for a period of time longer than 2 hours this is preferable
- TEX-OE[®] will provide fish with the necessary protection if the fish are exposed to the stress within 24 hours from TEX-OE[®] treatment. After the initial stress, TEX-OE[®] will exert its protective effect for a period of 72 hours.

The method of application described is the most appropriate method. It is not the only method that can be used. If this method is not suitable for your particular application, may we suggest that you contact us and we can discuss with you alternate methods of application for your specific needs.

Directors: C.M.Saliba (Managing), G.Gutierrez, C.Briatta

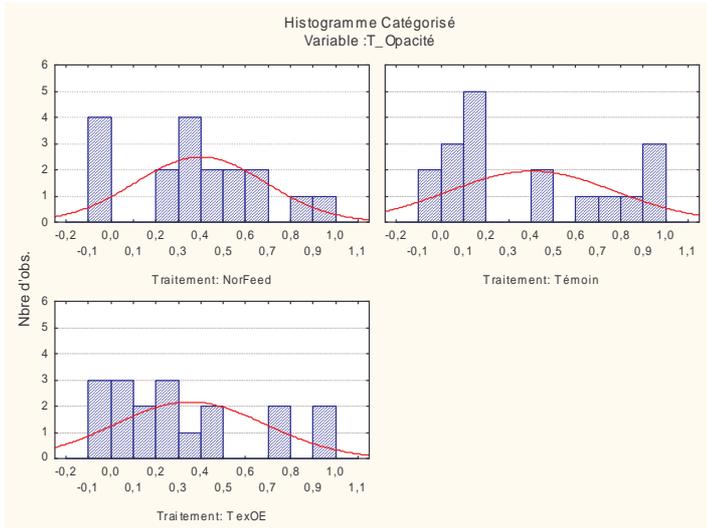


Annexe 7 : Matrice de résultats (traitements préventifs)

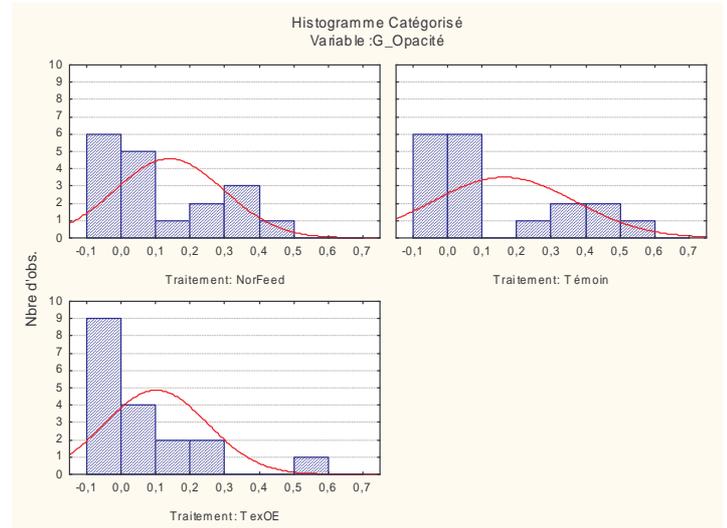
	Date	Cage	Module	Traitement	T_opacité	G_opacité	T_Bene	S_Bene	T_Exo	T_Tache	T_Plaie	T_Pustule	T_Ciliés
39567ANorFeed	29/04/08	ANorFeed	A	NorFeed	0	0	0	0	0	0	0,05	0	0
39567ATémoin	29/04/08	ATémoin	A	Témoin	0,05	0	0	0	0	0,05	0	0	0
39567ATexOE	29/04/08	ATexOE	A	TexOE	0	0	0	0	0	0	0,05	0	0
39567BNorFeed	29/04/08	BNorFeed	B	NorFeed	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0
39567BTémoin	29/04/08	BTémoin	B	Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39567BTexOE	29/04/08	BTexOE	B	TexOE	0	0	0	0	0	0,05	0	0	0
39567CNorFeed	29/04/08	CNorFeed	C	NorFeed	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39567CTémoin	29/04/08	CTémoin	C	Témoin	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0
39567CTexOE	29/04/08	CTexOE	C	TexOE	0	0	0	0	0	0,05	0	0	0
39574ANorFeed	06/05/08	ANorFeed	A	NorFeed	0,35	0	0,05	1	0	0,1	0,1	0	0
39574ATémoin	06/05/08	ATémoin	A	Témoin	0,2	0	0,1	2	0,1	0,1	0	0	0
39574ATexOE	06/05/08	ATexOE	A	TexOE	0,2	0	0,05	1	0	0	0,05	0	0
39574BNorFeed	06/05/08	BNorFeed	B	NorFeed	0	0	0,3	6	0	0	0,15	0	0
39574BTémoin	06/05/08	BTémoin	B	Témoin	0,05	0	0,3	6	0	0	0,1	0	0
39574BTexOE	06/05/08	BTexOE	B	TexOE	0,25	0	0,05	1	0	0,05	0,1	0	0
39574CNorFeed	06/05/08	CNorFeed	C	NorFeed	0,5	0,05	0,5	13	0	0	0,1	0	0
39574CTémoin	06/05/08	CTémoin	C	Témoin	0,1	0,05	0,35	7	0,05	0	0	0	0
39574CTexOE	06/05/08	CTexOE	C	TexOE	0,05	0	0,1	2	0	0,05	0,05	0	0
39581ANorFeed	13/05/08	ANorFeed	A	NorFeed	0,4	0	0,15	4	0,05	0,15	0,05	0	0
39581ATémoin	13/05/08	ATémoin	A	Témoin	0,7	0	0,35	8	0	0,15	0,1	0	0
39581ATexOE	13/05/08	ATexOE	A	TexOE	0,45	0	0,05	1	0,05	0,05	0,05	0	0
39581BNorFeed	13/05/08	BNorFeed	B	NorFeed	0,35	0,1	0,5	12	0	0	0,05	0	0
39581BTémoin	13/05/08	BTémoin	B	Témoin	0,47368421	0,05263158	0,26315789	6	0	0	0,10526316	0,05263158	0
39581BTexOE	13/05/08	BTexOE	B	TexOE	0,3	0	0,4	9	0	0	0	0,05	0
39581CNorFeed	13/05/08	CNorFeed	C	NorFeed	0,36842105	0,10526316	0,68421053	19	0,10526316	0,05263158	0,21052632	0	0
39581CTémoin	13/05/08	CTémoin	C	Témoin	0,15	0,1	0,5	11	0	0	0,05	0	0
39581CTexOE	13/05/08	CTexOE	C	TexOE	0,1	0,05	0,65	13	0	0	0	0	0
39588ANorFeed	20/05/08	ANorFeed	A	NorFeed	0,25	0,05	0,15	3	0	0,1	0	0	0
39588ATémoin	20/05/08	ATémoin	A	Témoin	0,95	0,5	0,55	15	0	0,1	0,05	0	0
39588ATexOE	20/05/08	ATexOE	A	TexOE	0,75	0,1	0,25	6	0	0,05	0	0	0
39588BNorFeed	20/05/08	BNorFeed	B	NorFeed	0,42105263	0,21052632	0,57894737	15	0	0,05263158	0,10526316	0	0
39588BTémoin	20/05/08	BTémoin	B	Témoin	0,2	0,05	0,35	9	0	0	0,05	0	0
39588BTexOE	20/05/08	BTexOE	B	TexOE	0,1	0	0,25	5	0	0	0	0	0
39588CNorFeed	20/05/08	CNorFeed	C	NorFeed	0,25	0,1	0,65	23	0	0,05	0,05	0	0
39588CTémoin	20/05/08	CTémoin	C	Témoin	0,15	0,05	0,55	12	0	0	0	0	0
39588CTexOE	20/05/08	CTexOE	C	TexOE	0,2	0,1	0,25	5	0	0,05	0	0	0
39602ANorFeed	03/06/08	ANorFeed	A	NorFeed	0,94736842	0,42105263	0,73684211	41	0,21052632	0,26315789	0,05263158	0,05263158	0
39602ATémoin	03/06/08	ATémoin	A	Témoin	1	0,6	0,85	54	0,2	0	0	0	0
39602ATexOE	03/06/08	ATexOE	A	TexOE	1	0,3	0,5	16	0,1	0,1	0,1	0	0
39602BNorFeed	03/06/08	BNorFeed	B	NorFeed	0,63157895	0,26315789	0,10526316	2	0,15789474	0,05263158	0,10526316	0,05263158	0
39602BTémoin	03/06/08	BTémoin	B	Témoin	0,85	0,35	0,4	15	0	0,15	0,05	0	0
39602BTexOE	03/06/08	BTexOE	B	TexOE	0,25	0,1	0,4	12	0,1	0,05	0,1	0	0
39602CNorFeed	03/06/08	CNorFeed	C	NorFeed	0,65	0,35	0,8	24	0	0	0,05	0	0
39602CTémoin	03/06/08	CTémoin	C	Témoin	0,75	0,4	0,75	26	0,05	0,1	0,1	0	0
39602CTexOE	03/06/08	CTexOE	C	TexOE	0,8	0,2	0,75	34	0,05	0,45	0,05	0,1	0
39617ANorFeed	18/06/08	ANorFeed	A	NorFeed	0,9	0,4	0,8	53	0,05	0,05	0	0	0,05
39617ATémoin	18/06/08	ATémoin	A	Témoin	0,95	0,45	0,65	61	0,15	0	0,2	0	0,1
39617ATexOE	18/06/08	ATexOE	A	TexOE	1	0,55	0,6	24	0,15	0,05	0	0	0,1
39617BNorFeed	18/06/08	BNorFeed	B	NorFeed	0,55	0,05	0,75	33	0,05	0,2	0,1	0,15	0,1
39617BTémoin	18/06/08	BTémoin	B	Témoin	0,5	0,25	0,65	29	0,05	0,1	0,15	0,45	0,15
39617BTexOE	18/06/08	BTexOE	B	TexOE	0,45	0,15	0,4	23	0,05	0,05	0,1	0,05	0
39617CNorFeed	18/06/08	CNorFeed	C	NorFeed	0,55555556	0,38888889	0,61111111	45	0,05555556	0,16666667	0,05555556	0,66666667	0,05
39617CTémoin	18/06/08	CTémoin	C	Témoin	0,15	0,05	0,8	29	0	0,05	0	0,45	0,05
39617CTexOE	18/06/08	CTexOE	C	TexOE	0,4	0,25	0,5	24	0	0,2	0,1	0,25	0,1

Annexe 8 : Distribution des 13 variables

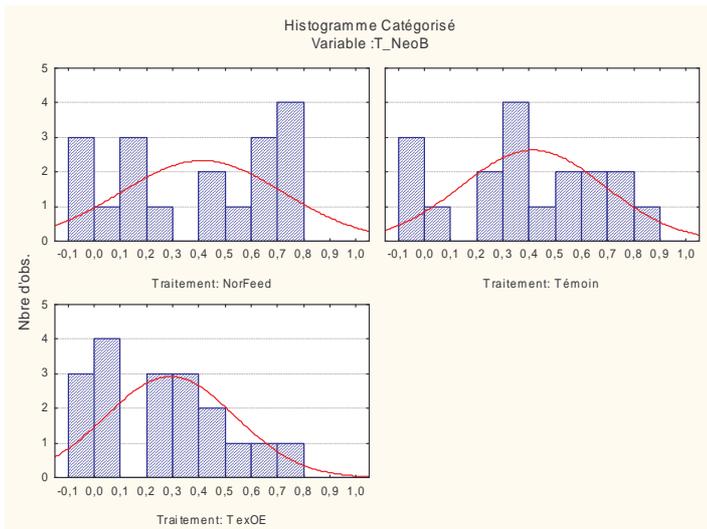
Taux d'opacité



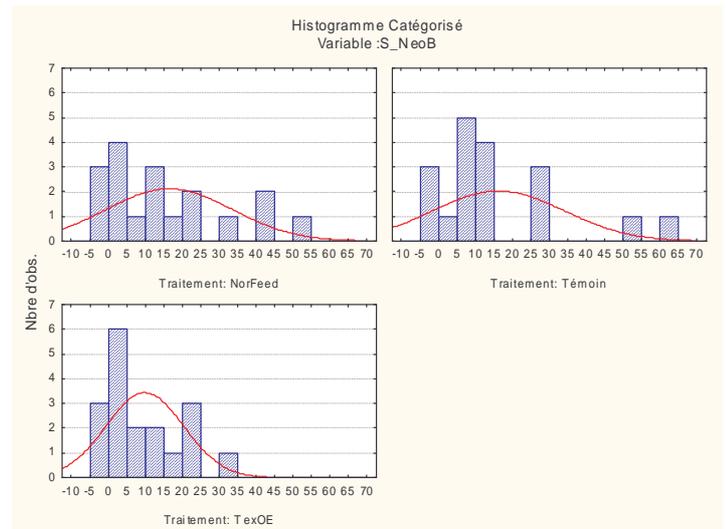
Gravité de l'opacité



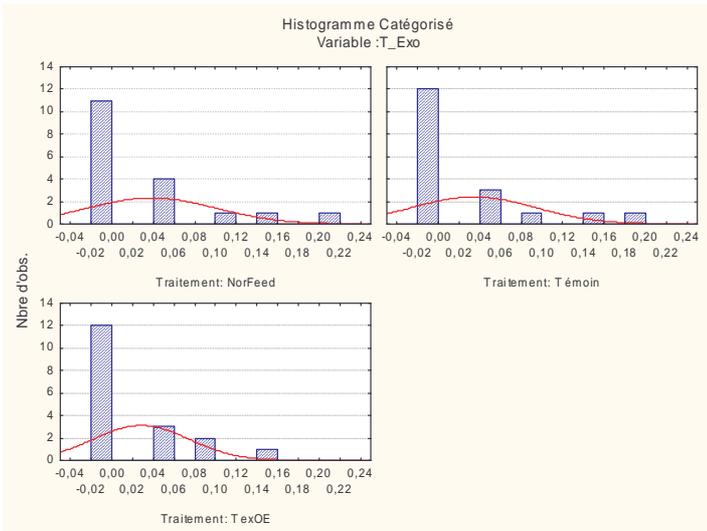
Taux de contamination par les Benedenia



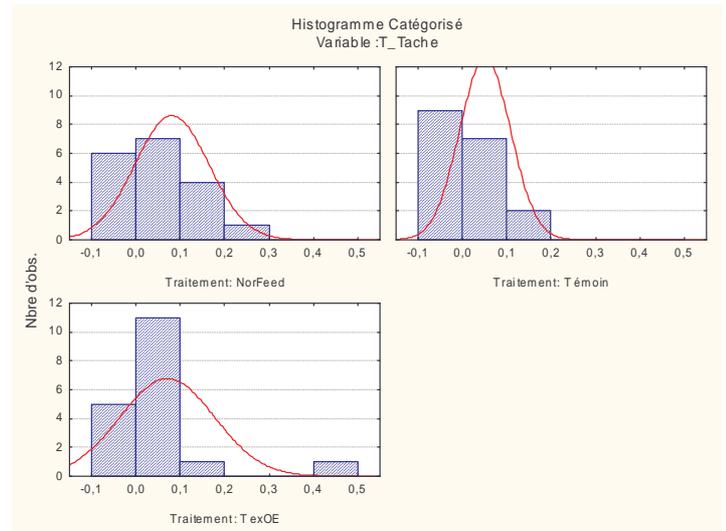
Nombre de Benedenia



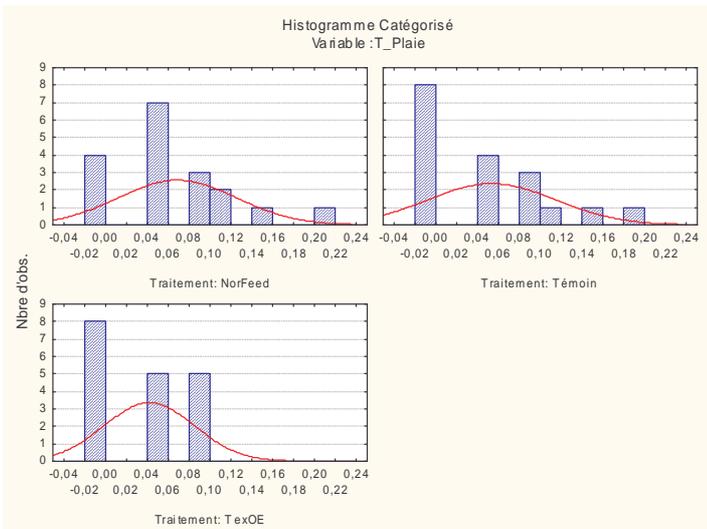
Taux d'exophtalmie



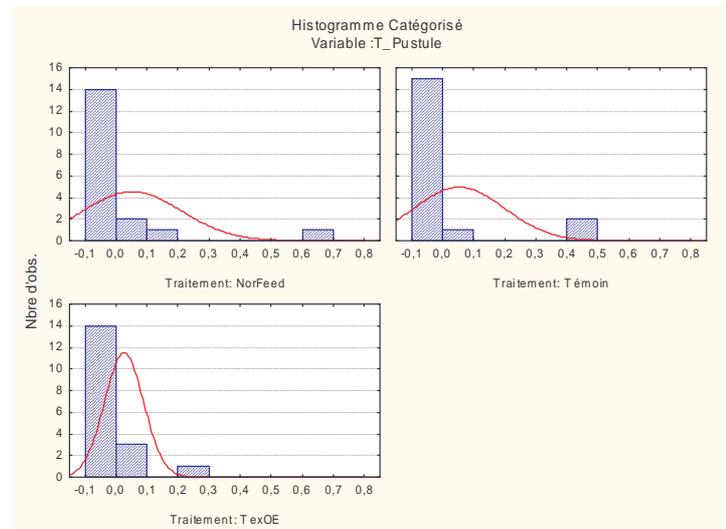
Taux de tâches



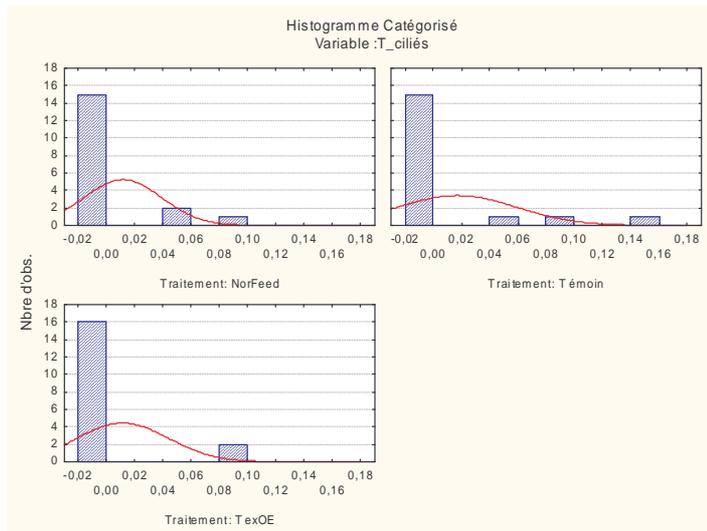
Taux de plaies



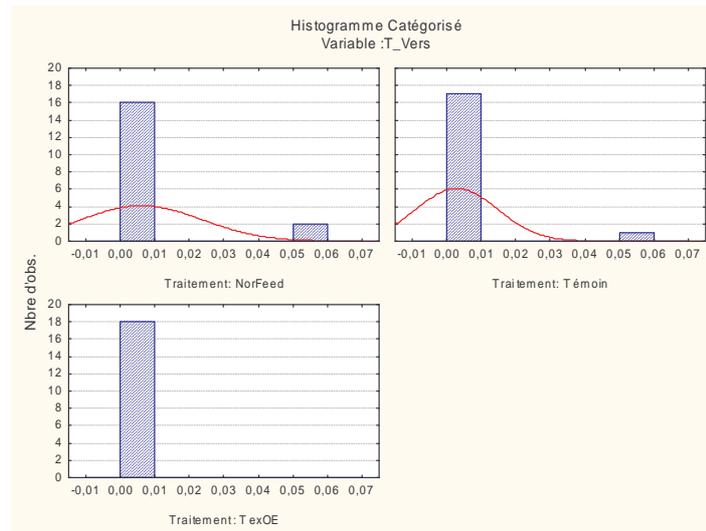
Taux de pustules



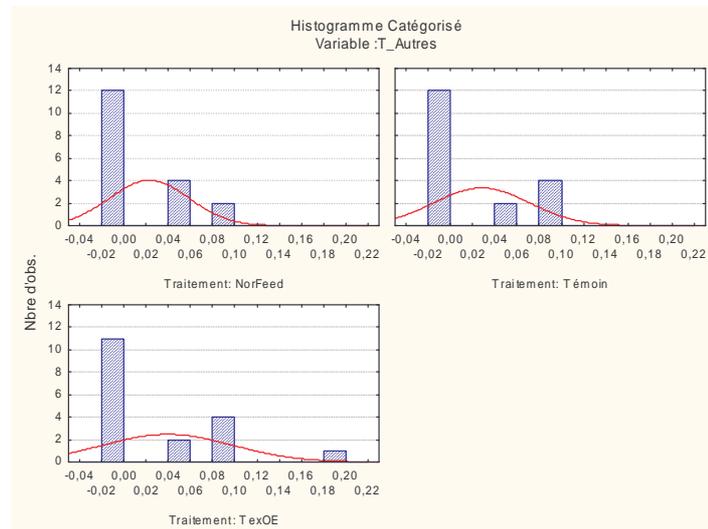
Taux de ciliés



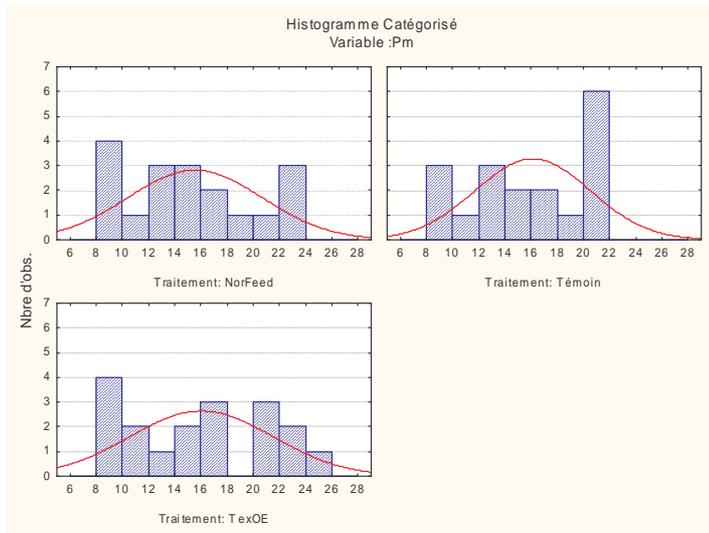
Taux de vers



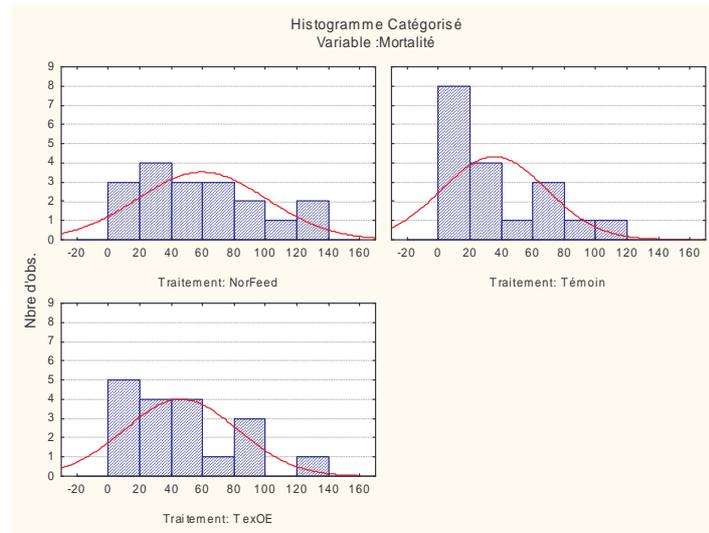
Taux autres parasites



Poids moyen



Mortalité



Annexe 9: Test du khi deux comparant tous les échantillons

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Khi²) :

Khi ² (Valeur observée)	46,389
Khi ² (Valeur critique)	7,815
DDL	3
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

Correction de Yates

Khi ² (Valeur obs)	41,293
Khi ² (Valeur crit)	7,815
DDL	3
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

Interprétation du test :

H₀ : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes.

H_a : Il existe un lien entre les lignes et les colonnes du tableau.

Etant donné que la p-value calculée est inférieure au niveau de signification alpha=0,05,

on doit rejeter l'hypothèse nulle H₀ et retenir l'hypothèse alternative H_a.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H₀ alors qu'elle est vraie est inférieur à 0,01%.

Tableau de contingence :

	Formol	H2O2	Eau douce	Témoin négatif
Présent	4	7	0	17
Absent	43	40	22	8

Khi² par case :

	Formol	H2O2	Eau douce	témoin -	Total
Présent	3,048	0,583	4,369	29,177	37,177
Absent	0,755	0,145	1,083	7,230	9,212
Total	3,803	0,728	5,451	36,407	46,389

Significativité par case :

	Formol	H2O2	Eau douce	témoin -
Présent	<	<	<	>
Absent	>	>	>	<

Effectifs observés :

	Formol	H2O2	Eau douce	témoin -	Total
Présent	4	7	0	17	28
Absent	43	40	22	8	113
Total	47	47	22	25	141

Effectifs théoriques :

	Formol	H2O2	Eau douce	témoin -	Total
Présent	9,333	9,333	4,369	4,965	28
Absent	37,667	37,667	17,631	20,035	113
Total	47	47	22	25	141

Khi² par case avec correction de YATES

	Formol	H2O2	Eau douce	témoin -	Total
Présent	2,503	0,360	3,426	26,803	33,093
Absent	0,620	0,089	0,849	6,642	8,200
Total	3,123	0,449	4,275	33,445	41,293

Annexe 10 : Test du khi deux comparant formol, H₂O₂ et eau douce (témoin négatif exclut)

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Khi²) :

Khi ² (Valeur observée)	3,960
Khi ² (Valeur critique)	5,991
DDL	2
p-value	0,138
alpha	0,05

Correction de Yates

Khi ² (Valeur observée)	2,368
Khi ² (Valeur critique)	5,991
DDL	2
p-value	0,138
alpha	0,05

Interprétation du test :

H₀ : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes.

H_a : Il existe un lien entre les lignes et les colonnes du tableau.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil alpha=0,05, on peut valider l'hypothèse nulle H₀.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H₀ alors qu'elle est vraie est de 13,81%.

Tableau de contingence :

	Formol	H2O2	Eau douce
Présent	4	7	0
Absent	43	40	22

Khi² par case :

	Formol	H2O2	Eau douce	Total
Présent	0,047	1,451	2,086	3,584
Absent	0,005	0,152	0,219	0,375
Total	0,052	1,603	2,305	3,960

Significativité par case :

	Formol	H2O2	Eau douce
Présent	<	>	<
Absent	>	<	>

Effectifs observés :

	Formol	H2O2	Eau douce	Total
Présent	4	7	0	11
Absent	43	40	22	105
Total	47	47	22	116

Effectifs théoriques :

	Formol	H2O2	Eau douce	Total
Présent	4,457	4,457	2,086	11
Absent	42,543	42,543	19,914	105
Total	47	47	22	116

Khi² par case avec correction de correction de YATES:

	Formol	H2O2	Eau douce	Total
Présent	0,000	0,937	1,206	2,143
Absent	0,000	0,098	0,126	0,225
Total	0,000	1,035	1,332	2,368