

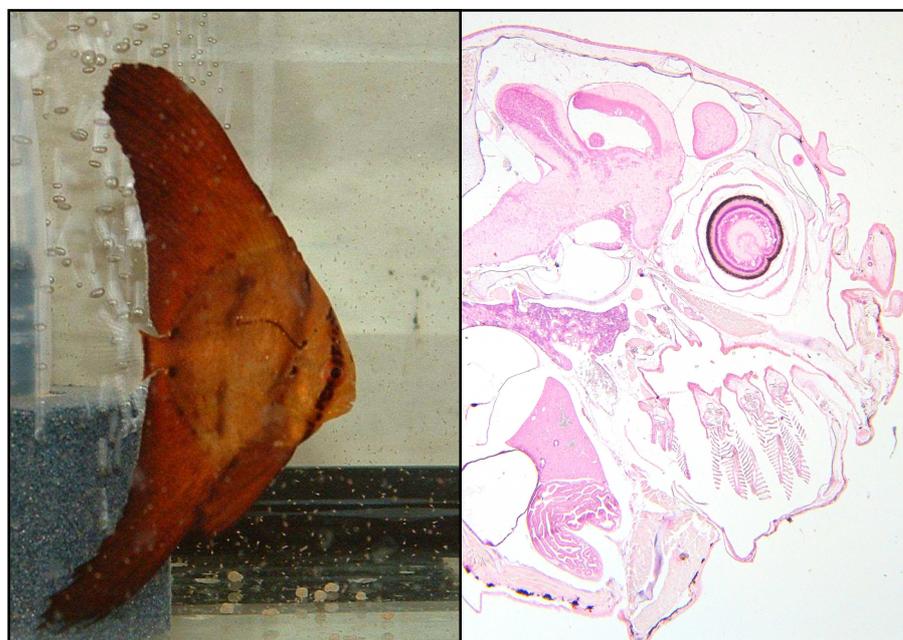
Service de la Pêche, cellule Développement, unité Aquaculture
Laboratoire de Biotechnologie et de Qualité de la Perle,
Ifremer-COP-Tahiti

Rarahu David
Cathy Treguier
Nathalie Cochenec-Laureau

Janvier 2007

**Rapport final de la Convention N° 6.0034 du 16 janvier
2006 entre le Service de la Pêche et l’Ifremer**

Prophylaxie des poissons lagunaires en élevage



SOMMAIRE

RESUME	2
1. INTRODUCTION	3
2. RAPPELS	5
3. FORMATION AUX TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC	6
3.1. État frais	6
3.2. Techniques histologiques	6
3.3. Techniques bactériologiques	6
3.4. Techniques de biologie moléculaire	7
4. FORMATION AU DIAGNOSTIC DES PRINCIPAUX ORGANISMES DETECTES CHEZ LES POISSONS LAGONAIRES	11
4.1. Virus	11
4.2. Bactéries	16
4.3. Ectoparasites	19
5. PROPHYLAXIE	29
5.1. Intrants	30
5.2. Salle de quarantaine	36
5.3. Salle de maturation	40
5.4. Salle d'élevage larvaire	43
5.5. Salle de sevrage – nurserie	45
5.6. Zone de grossissement en cage flottante	46
6. DISCUSSION – CONCLUSION	48
7. BIBLIOGRAPHIE	51
8. ANNEXES	54
9. LISTE DES FIGURES	57

Résumé

Dans la perspective du développement de l'aquaculture en Polynésie française, un programme visant à développer l'élevage de deux nouvelles espèces de poissons lagunaires a été initié depuis 2001. Ces deux espèces sont le « Mo'i », *Polydactylus sexfilis* et le « Paraha peue », *Platax orbicularis*. L'objectif de ce programme est de maîtriser le cycle complet de production afin de transférer la technique à des aquaculteurs. Toutefois, les élevages en cage et en bassin, de ces deux nouvelles espèces, ont été rapidement confrontés à l'apparition de mortalités d'origine infectieuse (bactéries, ectoparasites, virus). Les moyens disponibles pour protéger efficacement ces animaux élevés en milieu ouvert ou semi-ouvert sont limités. Pour réduire les mortalités, on peut s'appuyer, en fonction des hypothèses infectieuses émises, sur la mise en place de traitements préventifs ou curatifs spécifiques (antibiothérapie ou balnéation médicamenteuse...). Toutefois, en raison de leur difficulté d'application en milieu ouvert, ce type d'approche est réservé aux élevages en milieu contrôlé (notamment bassin de quarantaine). Pour réduire à leur plus bas niveau les risques d'infection et de propagation des agents infectieux, l'accent doit être mis sur la prévention par un renforcement de la prophylaxie zootechnique et zoonitaire. La prophylaxie zootechnique doit permettre d'améliorer les techniques d'élevage afin d'obtenir des poissons en meilleures conditions, plus aptes à résister aux infections. La prophylaxie zoonitaire repose sur la rapidité et la fiabilité de l'identification et du diagnostic des organismes infectieux à chaque étape de la chaîne de production.

La présente convention avait pour objectif de définir les modalités de collaboration entre le Service de la Pêche et l'Ifremer dans le cadre de l'accueil d'un CVD pour mettre en place une étude sur la prophylaxie des poissons lagunaires d'élevage. Cet agent s'est formé dans un premier temps aux techniques d'analyse histologique, bactériologique et de biologie moléculaire maîtrisées à l'Ifremer en accédant à la plate forme technique du laboratoire. D'autre part, cette formation technique a été complétée par une formation théorique de détection et d'identification des principaux organismes pathogènes et/ou opportunistes affectant les élevages menés par le SPE. De plus, afin de lui permettre d'appréhender plus facilement les problèmes techniques d'élevage et les améliorations prophylactiques à apporter, une formation zootechnique lui a été dispensée. La combinaison de ces connaissances devrait permettre rapidement à l'agent du SPE d'acquérir l'autonomie suffisante pour effectuer une surveillance et une veille sanitaire efficace des poissons en élevage.

1. Introduction

La Polynésie française développe depuis près de 20 ans l'aquaculture de diverses espèces : crevettes, chevrettes, poissons... Dans les années 80, afin de développer la pisciculture, une étude a été réalisée pour comparer les performances de production de différentes espèces de poissons endémiques et exotiques (Fuchs *et al.*, 1989). Cette étude a été menée au Centre Océanographique du Pacifique (COP) Ifremer de Tahiti (Vairao) et a porté sur (i) 4 espèces endémiques : *Caranx ignobilis*, *Siganus argenteus*, *Epinephelus microdon*, *Coryphaena sp.* et (ii) 3 espèces importées : *Lates calcarifer*, *Oreochromis sp.* et *Dicentrarchus labrax*. L'espèce sélectionnée fût le loup tropical *L. calcarifer*. En 2002, la production polynésienne de cette espèce était d'environ 18 tonnes. Aujourd'hui, elle a chuté à 5 tonnes et n'est plus assurée que par une ferme et une éclosion privée (Aquapac). La Polynésie française a souhaité reconvertir sa filière piscicole en la basant sur l'élevage de nouvelles espèces endémiques lagunaires à haute valeur ajoutée. Les deux espèces choisies sont le « Mo'i », *Polydactylus sexfilis* ou Tarpon des sables, et le « Paraha peu », *Platax orbicularis* ou Poisson lune (Le Maréchal & Remoissenet, 2001 ; Le Maréchal, 2002).

Depuis 2001, le Service de la Pêche (SPE) a initié un projet de recherche sur la domestication de ces deux espèces lagunaires en collaboration avec l'Ifremer. La collaboration a pour objectif essentiel de maîtriser le cycle de reproduction complet et la zootechnie des deux espèces. Toutefois, ces élevages ont été rapidement confrontés à des épisodes de mortalités. Pour répondre à ces problèmes récurrents, l'expertise diagnostique et les traitements préventifs et/ou curatifs adaptés ont été confiés au Laboratoire de Biotechnologie et de la Qualité de la Perle (LBQP) de l'Ifremer de Tahiti (Nédélec, 2003 ; Remoissenet *et al.*, 2006). Depuis fin 2005, un agent du SPE en contrat « Corps des Volontaires au Développement » (CVD) est accueilli au LBQP pour suivre une formation aux techniques de prélèvements, d'identification, de diagnostics et de traitements des pathologies rencontrées chez les deux espèces élevées (Convention SPE-Ifremer n°6.0034). Ce dispositif permet de compléter la formation initiale (universitaire) du CVD et renforce l'effort de surveillance pathologique des poissons élevés en Polynésie. Cet agent a d'ailleurs été recruté en Contrat à Durée Indéterminée (CDI) depuis fin 2006.

Ce rapport de convention comporte trois parties. La première partie décrit les différentes techniques d'analyse mises en œuvre pour détecter les principaux organismes pathogènes rencontrés chez les poissons en élevage. Selon les hypothèses infectieuses émises lors des épisodes de mortalités, différentes techniques sont utilisées : état frais, histologie, bactériologie et biologie moléculaire.

Dans la deuxième partie, nous détaillons les principaux agents pathogènes déjà rencontrés chez les deux espèces lagunaires. Une description précise de chaque bioagresseur

est établie, accompagnée des différentes méthodes d'identification et de diagnostic. Des traitements spécifiques sont proposés aussi bien au niveau préventif que thérapeutique.

En dernière partie, une description des techniques d'écloserie et d'élevage réalisées au COP est présentée avec un point particulier sur les mesures prophylactiques adoptées. Ce descriptif est complété par des propositions d'amélioration pour l'optimisation de la prophylaxie des élevages. Ces éléments constituent un soutien technique pour la filière aquacole polynésienne.

2. Rappels

Lorsqu'un poisson est malade, cet état se traduit par la présence de :

- symptômes : anomalies du comportement, diminution de l'appétence, modification de la coloration (livrée)...
- lésions : anomalies de l'intégrité corporelle, présence de plaies et/ou de pustules, perte d'écailles...

Ces anomalies diminuent les performances biologiques des poissons jusqu'à entraîner leur mort. L'origine de ces manifestations peut être d'ordre physique, chimique et/ou biologique. Ces phénomènes agissent seuls ou en synergie pour perturber les fonctions physiologiques du poisson (Kinkelin *et al.*, 1985).

1) Les causes d'ordre physique sont principalement liées aux propriétés physiques de l'eau : température, concentration en matière en suspension (MES), rayonnement. La température, par exemple, peut être, en fonction des espèces de poissons, un des facteurs importants pour leur santé. En effet, elle agit sur la physiologie du poisson, la concentration en éléments essentiels de l'eau (pour une même salinité, plus l'eau est froide et plus elle est riche en oxygène) ou la virulence des organismes pathogènes (Kinkelin *et al.*, 1985).

2) Les causes d'ordre chimique sont liées aux propriétés et à la composition de l'eau : pH, gaz dissous, toxines ou polluant. Par exemple, la présence plus ou moins importante d'ammoniac dans l'eau peut être toxique. Cette toxicité varie en fonction du pH, de la température, de la salinité, de la concentration de l'oxygène, de l'espèce et de l'état physiologique du poisson. A noter, que les qualités chimiques de l'eau peuvent aussi être altérées par l'alimentation des poissons. De plus, la description des composants de l'eau, comme l'oxygène, est un élément majeur pour expliquer l'apparition d'une maladie et donc pour tenter de déterminer la cause de la pathologie.

3) Les causes biologiques de la maladie sont essentiellement dues au développement massif et non contrôlé de bioagresseurs. Ce terme regroupe les êtres vivants susceptibles d'entraîner une pathologie. Les principaux groupes sont, du plus petit au plus grand, les virus, les bactéries, les champignons microscopiques et les parasites (ectoparasite ou endoparasite).

3. Formation aux techniques de diagnostic

Selon les hypothèses infectieuses émises en fonction des symptômes et des lésions observées chez les poissons, différentes techniques d'analyses sont mises en oeuvre au LBQP.

3.1. État frais

L'état frais permet d'observer rapidement sous microscope photonique ou loupe binoculaire, sans coloration, un frottis ou un prélèvement de tissus lésés sans avoir besoin de sacrifier l'animal. Les tissus sont alors prélevés et déposés sur une lame histologique avec une goutte d'eau de mer stérile, puis sont recouverts d'une lamelle.

3.2. Techniques histologiques

L'histologie permet d'analyser tous les types de tissus ou d'organes présentant des lésions. C'est la technique de référence d'analyse. Elle est combinée systématiquement aux autres techniques lors de mortalités. Elle permet d'observer les modifications tissulaires et cellulaires des organes internes ou externes et, le cas échéant, de détecter et d'identifier les organismes étrangers. Les morceaux de tissus ou d'organes lésés sont prélevés et fixés dans une solution de Davidson (Eau de mer : 1200 ml, Alcool à 95% : 1200 ml, Formaldéhyde 38% : 300 ml, Glycérol : 400 ml, Acide acétique glacial 10% : 310 ml) pendant 48 heures. Les prélèvements sont ensuite traités selon les techniques classiques de l'histologie : déshydratation des tissus dans des bains d'éthanol de concentration croissante, imprégnation et enrobage des tissus dans de la paraffine, réalisation de coupes de 3 µm d'épaisseur déposées sur lame de verre, séchage des coupes, déparaffinage et réhydratation des tissus, coloration panoptique à l'hémalum/éosine, montage des coupes entre lame et lamelle à l'aide d'une résine (Eukitt). L'observation des lames colorées se fait au microscope photonique. Des photographies peuvent être prises et conservées dans une base de données.

3.3. Techniques bactériologiques

Les techniques de bactériologie permettent de dénombrer et d'isoler les colonies bactériennes présentes au sein des tissus. Un prélèvement de tissu lésé externe ou interne (peau, sang, organes...) est homogénéisé dans de l'eau de mer stérile. Des dilutions décimales sont ensuite réalisées à partir de cet échantillon. 10 µl de chaque dilution sontensemencés par étalement sur deux milieux de culture : un milieu pour la flore hétérotrophe marine totale (Marine agar 2216, Difco) et un milieu spécifique des bactéries de la famille des *Vibrionaceae* (TCBS agar, Difco : Thiosulfate Citrate Bile Sucrose). Le comptage des colonies est effectué après 24 h d'incubation à 28°C.

À partir des boîtes de milieu TCBS, une colonie de chaque type morphologique, identifiée en fonction de sa couleur sur la gélose, sa taille, sa forme et son aspect, est repiquée dans un bouillon de culture liquide « Marine Broth » (Difco) en vue de son identification phénotypique (biochimique) et/ou génotypique (génétique). Ces identifications peuvent être réalisées en fonction du niveau de diagnostic souhaité (genre, espèce).

L'identification phénotypique se fait par des tests biochimiques, d'une part, avec des milieux préparés au laboratoire (milieux composés de différentes concentrations de NaCl) et, d'autre part, par une méthode miniaturisée (Galeries API 20 E Biomérieux). La sensibilité à différents antibiotiques peut être également recherchée à l'aide d'antibiogrammes.

L'identification génotypique se fait au moyen des techniques de biologie moléculaire (cf. §3.4.1).

3.4. Techniques de biologie moléculaire

3.4.1. Identification génotypique des souches bactériennes

Une extraction d'ADN est réalisée à partir d'une culture bactérienne pure. Une portion de gène, codant pour les ARN ribosomiaux, « 16 S », est amplifiée par amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction) (Figure 1). Le résultat de cette amplification est visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose. Le produit amplifié de PCR peut être séquencé si nécessaire (Génome Express). La comparaison des séquences ainsi obtenues avec celles d'espèces bactériennes, déjà référencées au LBQP, permet leur rattachement à un groupe, à une espèce et donc leur identification génotypique.

3.4.2. Détection du *Nodavirus*

La technique d'amplification génique (PCR) est aussi mise en oeuvre pour détecter de manière spécifique le virus de l'Encéphalopathie et Rétinopathie Virale (ERV, cf.4.1.1). Cette technique peut être réalisée à partir de prélèvements ou de biopsies de divers organes : cerveau, muscle et gamètes. Elle est utilisée pour le diagnostic de la nodaviriose (mortalité de larves par exemple) mais également pour la sélection de géniteurs non porteurs du virus. Contrairement à la technique histologique, qui ne permet que de poser un diagnostic de suspicion, la technique de PCR permet d'apporter un diagnostic de certitude par l'amplification direct de l'ADN viral.

- Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc par RT-PCR

Les ARN totaux sont extraits d'organes de poissons (nageoires, cerveau), de larves entières, de prélèvements de gamètes ou d'œufs. Les tissus sont lysés par l'action chimique du TRIzol® reagent (Invitrogen) et par écrasement mécanique (avec des pistons). Une centrifugation permet d'éliminer les débris tissulaires. Le surnageant est repris dans du choroforme (Invitrogen) qui permet de séparer la phase inférieure organique et la phase supérieure aqueuse contenant l'ARN. Cet ARN est ensuite précipité par de l'isopropanol, puis quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une fois les ARN extraits, ils sont reverse-transcrits en ADN complémentaire (ADNc). Cette synthèse est catalysée par une enzyme transcriptase inverse (Reverse Transcriptase, iScript™ Biorad), enzyme ADN polymérase ARN dépendante, capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADNc.

- Amplification génique ou PCR en point final

Un cycle de PCR est constitué de trois étapes différentes (Figure 1) :

La dénaturation : L'ADNc double brin obtenu après la transcription inverse est utilisé comme matrice. La dénaturation est effectuée à 94°C pendant une minute, afin de rompre les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN : ceci donne deux simples brins d'ADN qui serviront de matrice pour l'amplification ultérieure.

L'hybridation : Les amorces spécifiques s'hybrident à la séquence cible d'ADNc. Dans nos expériences, pour la première série d'amplification génique nous avons utilisé des amorces sens dessinées dans la partie 5' et des amorces anti-sens dessinées dans la partie 3' du gène RNA2. La température d'hybridation choisie dépend de la séquence des amorces testées. Les amorces sont ajoutées en grande quantité dans le milieu réactionnel afin d'augmenter la probabilité d'hybridation sur la séquence cible. Notons que c'est grâce à leur petite taille (environ 20 paires de bases) que ces amorces peuvent s'hybrider plus vite que les brins de matrice entre eux.

L'élongation : À partir des amorces hybridées, le brin d'ADN de séquence complémentaire à l'ADN cible est synthétisé. L'élongation s'effectue à 72°C à l'aide d'une ADN polymérase (Taq DNA polymérase).

Ce cycle est répété 30 fois et est suivi par une dernière étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

- Amplification du produit de PCR par une PCR interne

Les produits de PCR obtenus lors de la première amplification sont ré-amplifiés. Le protocole utilisé est semblable à celui de la première amplification, cependant les amorces utilisées pour cette deuxième amplification doivent être internes à la séquence du premier produit amplifié obtenu. Cette seconde amplification permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la première PCR.

- Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits amplifiés sont analysés sur gel d'agarose (2 %) en tampon TBE (Tris Base 54 g ; Acide borique 27,5 g ; EDTA (0,5 M) 20 ml ; Eau distillée qsq 1000 ml) auquel on ajoute du bromure d'éthidium (BET : 0,5 µg/ml) qui s'intercale entre les paires de base de l'ADN : il émet alors une fluorescence lorsqu'il est éclairé par des UV (200-300 nm). Avant le dépôt sur gel, un tampon de charge est rajouté aux produits amplifiés (1 X final). L'ADN, chargé négativement, va migrer au sein d'un champ électrique du pôle négatif vers le pôle positif et les fragments seront ainsi séparés en fonction de leur charge et de leur taille (longueur). Le seuil de détection est d'environ 50 nanogrammes. La comparaison visuelle de la fluorescence d'un échantillon avec celle d'un ADN connu (le marqueur de taille) permet de déterminer la taille d'un fragment amplifié.

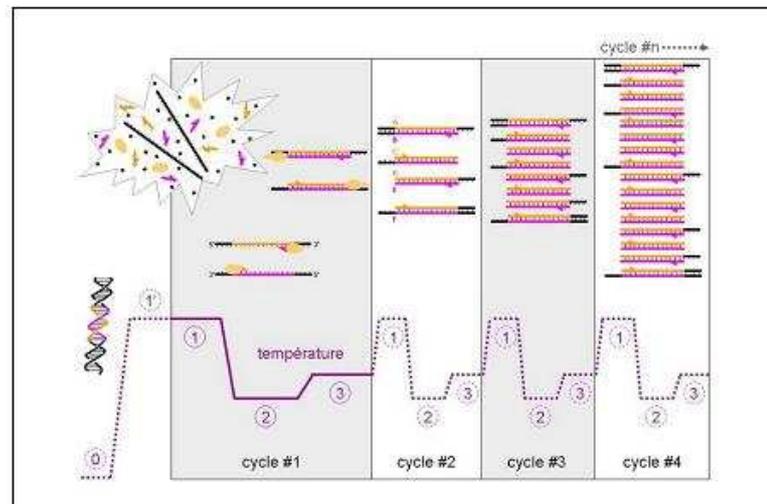


Figure 1: Principe de l'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction). La courbe mauve représente la variation de la température en fonction des cycles de PCR.

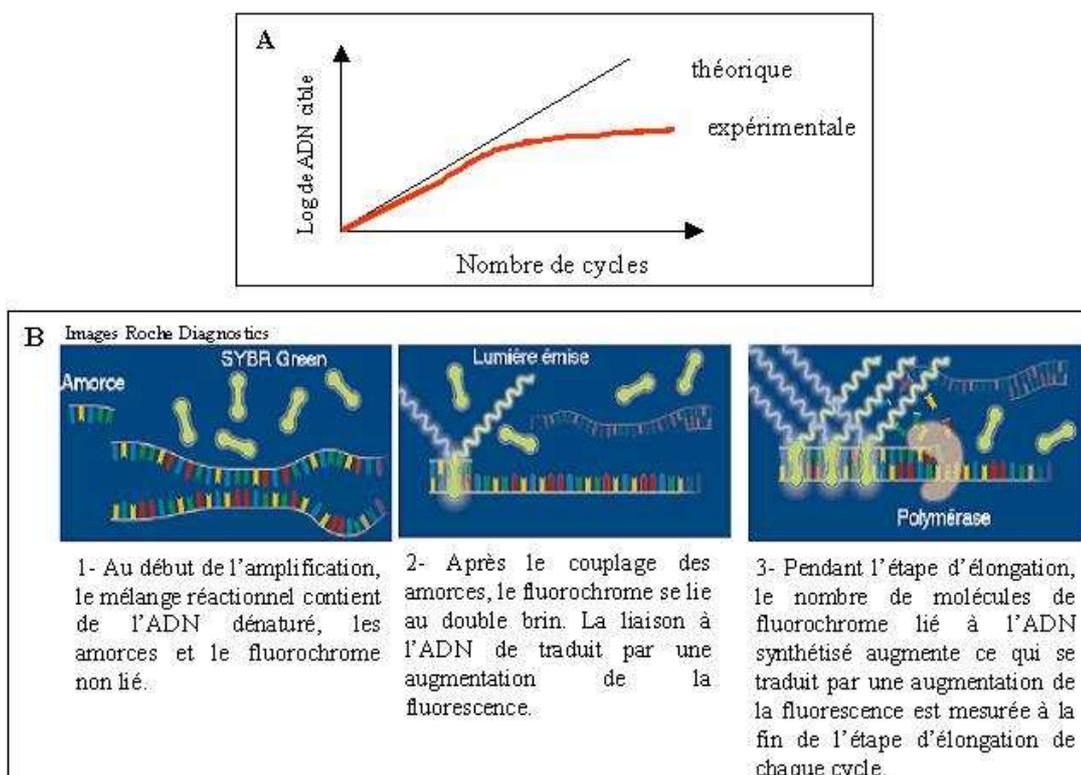


Figure 2 : Principe de la PCR en temps réel. A : Courbes expérimentale et théorique du logarithme d'ADN cible en fonction du nombre de cycle de PCR. B : Schéma d'insertion du fluorochrome spécifique SYBR Green lors d'un cycle de PCR.

- PCR quantitative en temps réel (q-PCR)

La PCR en temps réel est composée des trois mêmes étapes que la PCR en point final (dénaturation, hybridation et élongation) (Figure 2). Mais comme son nom l'indique, cette technique permet la mesure en continue de la quantité de produits amplifiés. A chaque cycle de PCR, la quantité d'ADN total est mesuré grâce à un marqueur fluorescent. Ainsi, l'intégralité de la cinétique est mesurable. Les données peuvent être exprimées en logarithme afin d'identifier la phase exponentielle et la linéariser. Cette partie est appelée « segment quantifiable » et permet de calculer la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon.

4. Formation au diagnostic des principaux organismes détectés chez les poissons lagunaires

Les maladies des poissons d'élevage sont dépendantes des interactions complexes qui existent entre l'hôte (poisson), son environnement et l'agent pathogène. L'évolution d'une maladie varie en fonction (Kinkelin *et al.*, 1985) :

- de la qualité de l'environnement,
- de la « pression » de l'organisme pathogène (responsable de la maladie). Cette pression peut être diminuée par des moyens simples, par exemple en désinfectant les bassins d'élevage, le matériel d'élevage etc....et en utilisant des traitements préventifs et/ou curatifs.
- de l'amélioration de la réaction du poisson vis-à-vis de l'agent pathogène. Cette amélioration peut être obtenue en **réduisant le stress des poissons** (amélioration des conditions d'élevage, réduction des manipulations...), et en **stimulant la réponse immunitaire spécifique** par l'utilisation, lorsqu'elle existe, de vaccination.

Dans le but d'identifier l'origine et la cause d'une maladie, il est nécessaire de connaître aussi précisément que possible l'historique de l'élevage. Pour faciliter cette enquête, des fiches d'intervention ont été établies afin de retracer au mieux les modifications du milieu d'élevage et/ou de l'état du poisson (Annexe 1). Une base de données devrait être développée rapidement.

Depuis le début des conventions entre le Service de la Pêche et l'Ifremer, plusieurs organismes (virus, bactéries, parasites) ont déjà été identifiés (Nédélec, 2003 ; Remoissenet *et al.*, 2006). Une description précise est établie ci-dessous, accompagnée des méthodes d'identification et de diagnostic. Lorsque cela est possible, la liste des traitements préventifs et/ou curatifs est proposée.

4.1. Virus

4.1.1. Encéphalopathie et Rétinopathie Virale

4.1.1.1. Etiologie

L'Encéphalopathie et Rétinopathie Virale (ERV) est une maladie provoquée par un virus de la famille des *Nodaviridae* et du groupe des *Bétanodavirus*. Les mortalités engendrées varient entre 60 et 100 % selon les espèces infectées.

Le *Nodavirus* est un virus non enveloppé de petite taille, entre 25 et 30 nm, de forme icosaédrique, avec un génome composé de deux simples brins d'ARN orientés dans le sens positif (5'-3'). Le premier brin d'ARN, RNA 1 de 3,1 kb code une enzyme RNA-dépendante RNA polymérase (Chi *et al.*, 2001 ; Nagai & Nishizawa, 1999 ; Tan *et al.*, 2001). Le second brin, RNA 2 de 1,4 kb code la protéine de structure de la capsid (Delsert *et al.*, 1997 ; Nishizawa *et al.*, 1994).

4.1.1.2. Epidémiologie

L'agent viral responsable de l'ERV a été décrit pour la première fois en Polynésie française en 1991 suite à d'importantes mortalités des larves de *L. calcarifer* (Renault *et al.*, 1991). Cet agent viral est connu pour infecter une quarantaine d'espèces de poissons marins dont certaines sont présentes en Polynésie : *Epinephelus sp.*, *Poecilia reticulata*, *Oreochromis spp.* (Thiéry *et al.*, 2004). L'ERV est décrite aussi bien chez les espèces en élevage qu'en milieu sauvage. En 2004, deux nouvelles espèces de poissons sauvage de Polynésie ont été diagnostiquées positives : *Acanthurus triostegus*, *Apogon exostigma* (Mopert, 2001). Actuellement à l'Ifremer, les deux espèces élevées, *P. orbicularis* et *P. sexfilis* ont été trouvées infectées par le *Nodavirus* et ont présenté de fortes mortalités (Nédélec, 2003 ; Remoissenet *et al.*, 2006). Chez ces espèces, les signes cliniques et les mortalités associés à cette virose se déclarent essentiellement au stade larvaire. Chez d'autres espèces, tous les stades peuvent être touchés (FFA&UNPSA, 2004). C'est le cas du Bar (*Dicentrarchus labrax*) où tous les stades d'élevage sont sensibles (larves, juvéniles et adultes). Chez l'Ombrine (*Sciaenops ocellatus*), en revanche, seuls les stades larvaires et juvéniles sont sensibles.

Différents facteurs semblent influencer l'expression et/ou la virulence de cette virose. Notamment, les fortes densités d'élevage semblent favoriser l'expression de l'ERV. Ceci a d'ailleurs été observé pour les élevages de *P. orbicularis* menés au COP en 2004. En effet, à partir d'un lot commun d'œufs élevés à différentes densités, seuls les bassins d'élevage présentant la plus forte densité ont déclaré l'ERV (Nédélec, 2003 ; Remoissenet *et al.*, 2006).

Cette maladie peut se transmettre par voie verticale (des géniteurs aux progénitures) et par voie horizontale (par contact direct entre individus sains et individus atteints, matériel d'élevage et/ou eau contaminée). En 2002, Breuil *et al.* ont démontré la transmission verticale chez le Bar, *D. labrax*, par l'intermédiaire des produits génitaux (Breuil *et al.*, 2002 in Nerland *et al.*, 2007). La transmission horizontale a été établie par des expérimentations de balnéation de poissons sains dans de l'eau contenant des particules virales. L'étude de Nerland *et al.* (2007) a révélé qu'une forte concentration en virus était retrouvée dans les eaux des bassins contenant des larves atteintes, environ 104 TCID₅₀/50.ml⁻¹ (équivalent à la dose nécessaire pour infecter 50 % des tissus en culture). Notons que 1 unité de TCID₅₀ correspond approximativement à 1 200 copies d'ARN viral. C'est cette voie de transmission qui a été suspectée pour expliquer la contamination simultanée des *P. orbicularis* et *P. sexfilis* élevés dans les installations du COP en 2004 (Nédélec, 2003 ; Remoissenet *et al.*, 2006).

L'alimentation, par l'apport de proies vivantes, a aussi été suspectée comme voie de transmission de l'ERV par différents auteurs. Il a été démontré, toutefois, que les rotifères et les artémi ne semblent pas être sensibles au *Nodavirus* (Skiris & Richards, 1998 in Nerland *et al.*, 2007).

Les risques d'expression de la maladie par les voies de transmission horizontales et verticales sont importants. C'est pourquoi il est primordial de développer de bonnes pratiques d'élevage et de biosécuriser les élevages, notamment par la sélection de géniteurs non porteurs du virus.

4.1.1.3. Diagnostic

Signes cliniques et lésionnels

Les larves déclarant l'ERV, présentent des symptômes comportementaux. Elles sont hyperactives et présentent des troubles de la nage (nage en vrille, rotation). Une hyperinflation de la vessie natatoire est souvent notée. Les juvéniles et les adultes présentent des troubles du comportement : les poissons heurtent les parois ou les filets. Il en résulte une érosion de la mâchoire par action mécanique. En dernier lieu, les poissons morts présentent fréquemment un corps incurvé.

Diagnostic

Ces signes cliniques permettent d'orienter le diagnostic. Celui-ci peut se faire par sérologie, culture cellulaire, histologie et biologie moléculaire (hybridation *in situ* et/ou RT-PCR). Seules les techniques d'histologie et de biologie moléculaire sont développées à l'Ifremer de Tahiti (LBQP).

La sérologie n'est pas envisageable au LBQP car nous ne disposons pas d'anticorps dirigés contre les immunoglobulines spécifiques des espèces de poissons élevées en Polynésie (*P. orbicularis* et *P. sexfilis*). Cette technique est, en effet, basée sur la détection d'anticorps anti-*Nodavirus* produits par le poisson lorsqu'il est infecté (Breuil *et al.*, 2002 in Nerland *et al.*, 2007). Le développement de ces outils sera proposé dans le cadre d'un appel d'offre de projet de recherche du Ministère de l'Outre Mer, « Trident ». Cette technique, bien que moins sensible que la biologie moléculaire, présente l'avantage d'être moins coûteuse.

La culture cellulaire est une technique assez lourde à utiliser car elle nécessite, pour un laboratoire, d'entretenir des cultures cellulaires. De plus, le diagnostic n'est posé qu'après une dizaine de jours, temps nécessaire à l'observation d'effets cyto-pathogènes des extraits viraux sur les cellules en culture (lyse cellulaire, présence de vacuoles...). D'autre part, une confirmation de ce type de diagnostic est souvent nécessaire (Manuel aquatique, 2006).

En histologie, l'analyse de coupes d'organes lésés permet d'observer la présence d'un nombre plus ou moins important de vacuoles (Figure 3 A, B) au sein des tissus du système nerveux et des yeux. Cette technique ne permet d'apposer qu'un diagnostic de suspicion. En effet, seules les lésions associées à la présence du virus sont visibles. A ce niveau de résolution, il est impossible de voir les particules virales (< 1 µm). De plus, le diagnostic reste difficile à effectuer lorsque l'infection virale est de faible intensité.

Pour confirmer le résultat, il est nécessaire de compléter l'histologie par des techniques de biologie moléculaire, d'hybridation *in situ* (hybridation ARN-Sonde spécifique du *Nodavirus* sur coupes histologiques (Figure 3C, D) et/ou RT-PCR (cf.3.4.2). En biologie moléculaire la PCR interne est utilisée depuis 2001 pour détecter la présence spécifique du *Nodavirus* chez les poissons. Cette technique permet de déterminer la présence ou l'absence du virus, mais ne renseigne pas sur le niveau d'infection des animaux. Depuis 2006, une démarche de mise au point de la q-PCR spécifique à la détection du *Nodavirus* a été entreprise au LBQP. Nous utilisons les amorces dessinées pour la PCR conventionnelle (fragment 300 pb, F3R5 ; Mopert, 2001) ainsi que des amorces pour la q-PCR (TRNODA R et TRNODA F, 200 pb ; Mazelet, 2005). La q-PCR permettra de déterminer la quantité initiale de virus (ADN viral) dans l'échantillon testé. On pourra ainsi évaluer le niveau d'infection

des poissons. Cette quantification pourra permettre d'établir le seuil minimum d'infection nécessaire pour que la maladie se déclare chez un lot de poissons.

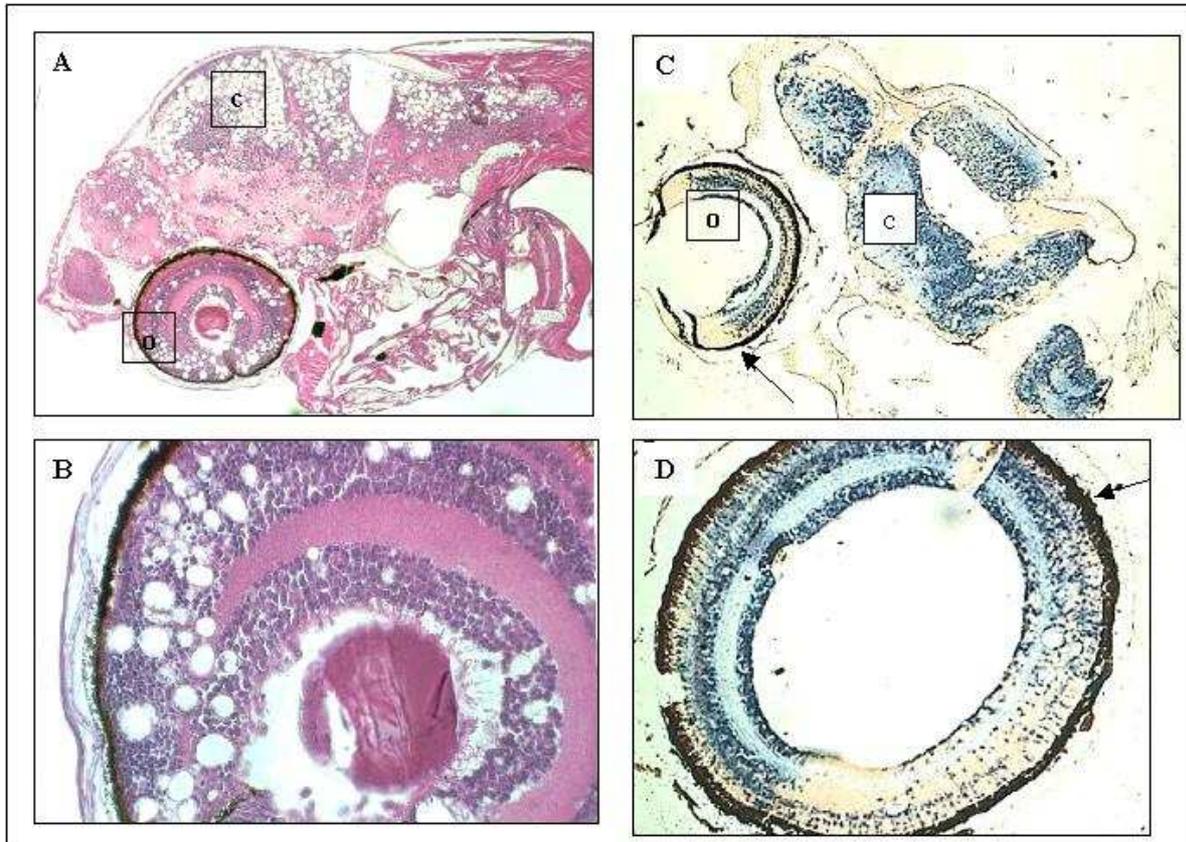


Figure 3 : Comparaison des images obtenues en microscopie optique d'une larve infectée par le *Nodavirus* après coloration à l'hémalum/éosine (A, B) et après hybridation *in situ* (C, D). A : notons la présence de nombreuses vacuoles au niveau de l'œil (o) et du cerveau (c)(x200). B : vacuolisation au niveau des tissus rétiniens (x600). C : marquage important au niveau de la présence de l'œil (o) et du cerveau (c) (x200). D : marquage important au niveau de la rétine. La mélanine est signalée par une flèche.

4.1.1.4. Traitement

La prophylaxie vaccinale n'est pas encore envisageable, car il n'existe pas actuellement de vaccin commercial protégeant de la Nodavirose. Les études sur l'élaboration de tels vaccins n'ont débuté que récemment et se focalisent sur la protéine de la capsid (Tanaka *et al.*, 2001 ; Yuasa *et al.*, 2002 in Aquavetplan, 2004). Les premiers résultats sont encourageants mais seraient, dans un premier temps, seulement adaptés pour les espèces chez qui la maladie se déclare tardivement comme les mérous (*Serranidae*) ou le Bar, *D. labrax*.

4.1.1.5. Prévention

La prophylaxie sanitaire permet de limiter les voies de transmission verticale et horizontale de l'ERV. Pour limiter la transmission verticale du virus, des géniteurs aux descendants, nous réalisons au COP une sélection de géniteurs « non porteurs » du virus de l'ERV. Pour ce faire, chaque géniteur est identifié par un marquage individuel (type puce : « pit-tag »). Une surveillance rigoureuse est appliquée dès la décision d'introduire un nouveau lot de géniteur en zone d'élevage. Lorsque les poissons proviennent du milieu naturel, ils sont tout d'abord isolés dans une zone de quarantaine, séparée physiquement de la zone de maturation (contenant tous les géniteurs sains). Des prélèvements de gamètes sont effectués sur chaque individu. Les animaux sont maintenus en salle de quarantaine jusqu'à l'obtention des résultats de détection du *Nodavirus* par q-PCR. Les poissons présentant un résultat négatif (pas de détection de portion de la séquence virale à partir des prélèvements) sont introduits en zone de maturation. En cas de détection (résultat positif), le poisson est sacrifié. Depuis la mise en place de cette biosécurisation des géniteurs de *P. orbicularis* (2005), les élevages larvaires n'ont pas présenté de mortalité associée à la présence de ce virus.

La détection du *Nodavirus* chez les géniteurs maintenus en salle de maturation est effectuée une fois par an afin de confirmer le bon état sanitaire des reproducteurs. De plus, lors de chaque élevage larvaire, des prélèvements d'œufs et de larves (de J 0 à J 30) sont réalisés pour valider cette méthode et ainsi confirmer l'absence de *Nodavirus*.

Pour limiter la transmission horizontale par l'eau d'élevage ou autres organismes porteurs du *Nodavirus*, les différentes zones d'élevage de l'écloserie, zone de maturation/production de proies vivantes/ élevage larvaire/ nurserie, sont physiquement séparées les unes des autres. La décontamination de l'eau de mer à l'entrée de l'écloserie est réalisée par irradiation de l'eau par des UV de longueur d'onde 254 nm avec une dose de 200 milijoule/cm²/seconde à 26 000 l/h et une transmittance de 85 % (Manuel aquatique, 2006).

4.2. Bactéries

Les bactérioses regroupent un grand nombre de pathologies chez les poissons. Les maladies les plus fréquentes sont associées à la présence de bactéries du genre *Vibrio*. Plusieurs épisodes de mortalités dans les élevages au COP de *P. orbicularis* et de *P. sexfilis* ont déjà été rapportés associées à des vibrioses.

4.2.1. Etiologie

Au COP, la principale espèce bactérienne isolée et identifiée est *Vibrio harveyi*. C'est un bacille droit, à Gram négatif, halophile et mobile grâce à une ciliature.

Systématique du genre *Vibrio*

Règne : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *Virbionale*

Famille : *Vibrionaceae*

Genre : *Vibrio*

4.2.2. Epidémiologie

Cette espèce bactérienne est retrouvée dans les eaux des mers chaudes, les sédiments marins ainsi que dans les tubes digestifs d'animaux marins. Les principales infections au *V. harveyi* ont été décrites chez les mollusques, les huîtres perlières (*Pinctada maxima*), l'ormeau européen (*Haliotis tuberculata*), l'ormeau du Japon (*Sulculus diversicolor supratexta*) et la palourde (*Ruditapes philippinarum*). Quelques épizooties de vibrioses à *V. harveyi* ont été décrites chez le brochet des mers (*Centropomus undecimalis*), l'hippocampe (*Hippocampus* sp.) et chez des poissons d'élevage : mérous à taches oranges (*Epinephelus coioides*), mérous malabres (*E. malabaricus*), chinchards du Japon (*Trachurus japonicus*), daurades (*S. auratus*) et le loup tropical (*L. calcarifer*) (Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/harveyi.html>).

V. harveyi est aussi à l'origine de pertes importantes dans les élevages de crevettes. La mortalité touche les larves et les stades post-larvaires. L'infection se traduit généralement par une anorexie, un retard de croissance et un ralentissement de la nage. Les animaux deviennent opaques, éventuellement luminescents et présentent une dégénérescence tissulaire de l'hépatopancréas. De telles infections sont décrites en Australie, Equateur, Inde, Indonésie, Philippines, Taiwan et Thaïlande chez différentes espèces de crevettes (*Penaeus japonicus*, *P. vannamei*, *P. monodon*) (Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/harveyi.html>).

4.2.3. Diagnostic

Signes cliniques et lésionnels

En fonction des espèces atteintes les signes cliniques peuvent être variables. Par exemple chez les mérous, la maladie se traduit par des gastro-entérites alors que chez les chinchards on observe des ulcères, des hémorragies externes, une exophtalmie. A l'autopsie, les poissons présentent une pâleur excessive des reins, des hémorragies du foie et la présence de tubercules sur la rate. Chez *P. sexfilis*, les poissons atteints présentaient de nombreuses plaies et des hémorragies au niveau de la tête et du corps (Figure 4). Chez *P. orbicularis*, cette vibriose a provoqué des plaies du corps. Les vibrioses sont souvent des affections secondaires qui apparaissent sur des plaies provoquées par des atteintes diverses, blessures, présence d'ectoparasites... (Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/harveyi.html>).

Diagnostic

Le diagnostic est posé grâce aux différentes techniques de bactériologie d'identification phénotypique et génotypique (cf. § 3.3 et 3.4.1) (Figure 5).

4.2.4. Traitement

Lors de l'apparition d'une vibriose, un traitement antibiotique à base d'OxyTétraCycline (OTC) en bain statique de 1h à 100 ppm est appliqué pendant 8 jours. Afin de limiter l'utilisation des antibiotiques, les traitements sont effectués dans de petits volumes en bassin contrôlé.

Des traitements *per os* peuvent également être effectués mais ne sont pas utilisés au SPE (80-150 mg OTC/kg de poissons/ jour pendant 7 à 10 jours).

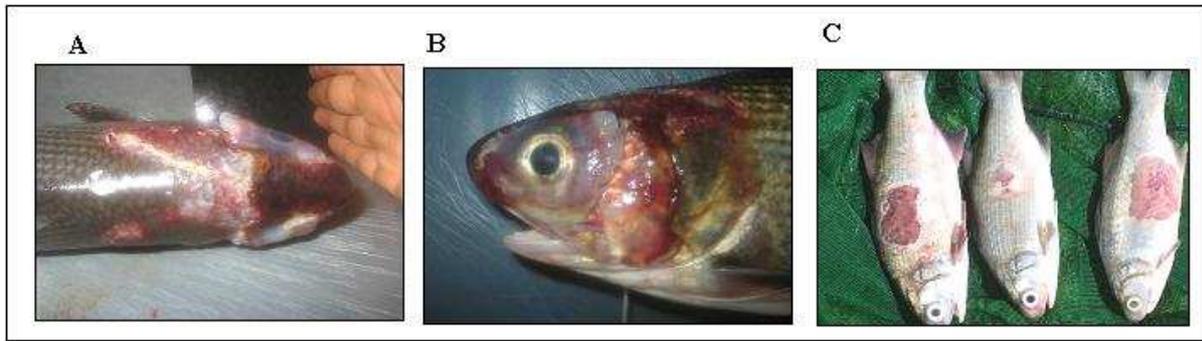


Figure 4 : *Polydactylus sexfilis* atteints de Vibriose. A, B : poissons présentant des hémorragies au niveau de la tête. C : poissons présentant des plaies importantes au niveau des flancs.

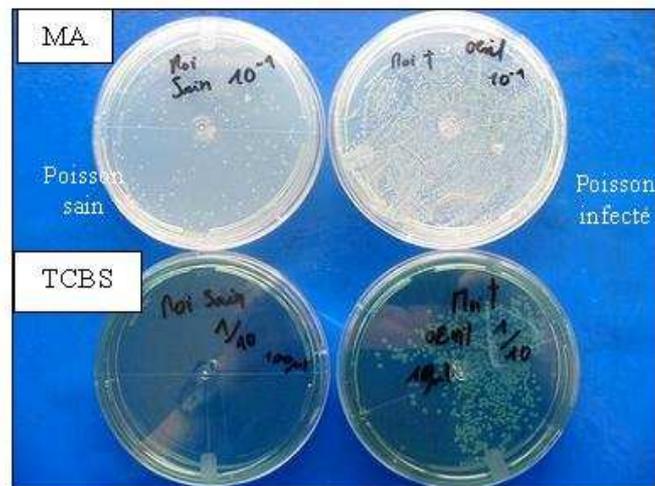


Figure 5 : Étalement sur deux milieux de cultures spécifiques au milieu marin : marine agar (MA) non sélectif et sur TCBS (TCBS) sélectif du genre *Vibrio*.

4.2.5. Prévention

Les infections bactériennes sont souvent opportunistes et apparaissent à la suite d'une infection primaire qui peut être causée par des ectoparasites ou qui fait suite à des manipulations zootechniques. L'identification et le traitement des infections primaires sont primordiaux avant tout traitement aux antibiotiques. Cela réduit d'autant l'apparition des bactérioses.

4.3. Ectoparasites

Le parasitisme est fréquent chez les poissons et est souvent observé dans les élevages. Ce type de condition est propice à la déclaration des pathologies notamment en raison des densités d'élevage qui sont fortes.

Il existe plusieurs milliers d'espèces de parasites chez les poissons. Selon le positionnement des parasites, interne ou externe, ils sont nommés respectivement endoparasites ou ectoparasites. Les endoparasites sont seulement observables lors de la dissection d'individus infestés. De ce fait, leur diagnostic n'est souvent possible qu'après la mort du poisson. Certains traitements existent, mais ils sont difficiles à appliquer et peu efficaces. En effet, les médicaments doivent être intégrés dans l'alimentation. Or, dans la majorité des cas un poisson malade ne s'alimente pas ou très peu (Kinkelin *et al.*, 1985).

Les ectoparasites, en revanche, sont visibles puisqu'ils sont présents à la surface du corps du poisson (nageoires, yeux, branchies). Leur traitement peut se faire, soit par une alimentation supplémentée en médicament, soit par balnéation.

4.3.1. Infections par des Crustacés du genre *Caligus*

4.3.1.1. Etiologie

L'ectoparasite mis en cause dans cette parasitose est le pou de mer (« sea lice ») ou *Caligus sp.* (Figure 6). Il s'agit d'un crustacé copépode. Cet organisme est commun dans les élevages de Saumon (*Salmo salar*) et est connu depuis une trentaine d'années (Costello, 2006).

Systématique du genre *Caligus*

Phylum : *Arthropodia*

Sous Phylum : *Crustacea*

Classe : *Maxillopoda*

Ordre : *Copepoda*

Famille : *Caligidae*

Genre : *Caligus*

4.3.1.2. Epidémiologie

Le genre *Caligus* possède un cycle de vie composé de 4 phases (Figure 7) : Nauplius, Copepodite, Pre-adulte, Adulte. Ce cycle est dépendant de la température et dure entre 6 et 8 semaines.

Pendant la phase adulte, les femelles portent les œufs dans leurs sacs ovigères. Le nombre d'œufs varie selon la saison, la taille et l'âge du *Caligus*, ainsi que de l'état de santé de la population de poissons. Le phase larvaire est composé de 2 stades nauplius. C'est une phase autotrophe et planctonique qui dure entre 5 et 15 jours selon la température. Après le stade nauplius 2, **les larves muent en copepodite qui est la phase infectieuse du cycle.** Lors

de cette phase, les *Caligus* sont mobiles et recherchent leur hôte dans la colonne d'eau. La reconnaissance de l'hôte est assez complexe et comporte plusieurs voies (Costello, 2006) :

- la voie visuelle : les copépodites recherchent l'ombre de l'hôte ou des reflets créés par les écailles,
- l'utilisation de mécano-récepteurs situés sur les antennes, ils détectent les vibrations engendrées par les poissons,
- l'utilisation de chémo-récepteurs pour vérifier la « compatibilité » avec l'hôte.

Une fois fixé, le copépodite mue en phase chalimus. Selon les espèces de *Caligus*, il peut exister ensuite une phase pré-adulte (2 stades). Les chalimus sont sessiles et **se nourrissent sur la peau de l'hôte.**

Le genre *Caligus* n'est pas hôte-spécifique, c'est à dire qu'une même espèce peut infecter plusieurs espèces de poissons. C'est ainsi que *C. elongatus* a été décrit sur près de 80 espèces de poissons comme les Salmonidés, les Thonidés, *L. calcarifer*, *Chanos chanos* (Revie *et al*, 2002). *P. orbicularis* est aussi sensible à cette infection.

Cette maladie peut se transmettre des populations sauvages aux poissons d'élevage en cage par le biais des phases mobiles du *Caligus* (copépodite) libres dans le milieu naturel.

4.3.1.3. Diagnostic

Signes cliniques et lésionnels

Les *Caligus* mobiles possèdent une morphologie telle que le flux d'eau les plaque contre la surface de leur hôte. Le *Caligus* s'accroche alors à son hôte grâce à une paire d'antennes et à ses maxillipèdes (partie de la bouche). Ils raclent et retirent le mucus, l'épiderme et les tissus sous-jacents des poissons. Ils peuvent se fixer sur tout le corps du poisson hôte avec une préférence pour la tête des poissons. À cause de ce broutage, on observe une abrasion de la peau jusqu'à l'ulcération dans les cas les plus graves. Il en résulte des problèmes d'osmorégulation et d'infections bactériennes secondaires. La diminution de l'appétence est le premier des symptômes (Costello, 2006).

Diagnostic

Il est basé sur l'identification, à l'état frais, des stades de vie du parasite. Les stades copépodites et adultes immatures sont observables au microscope photonique à partir d'un frottis de téguments (peau ou branchie) (Figure 6). Les femelles ovigères sont présentes sur la peau et souvent visibles à l'œil nu (Noga, 1999).



Figure 6 : État frais montrant un copépode du genre *Caligus sp.* (barre = 10µm)

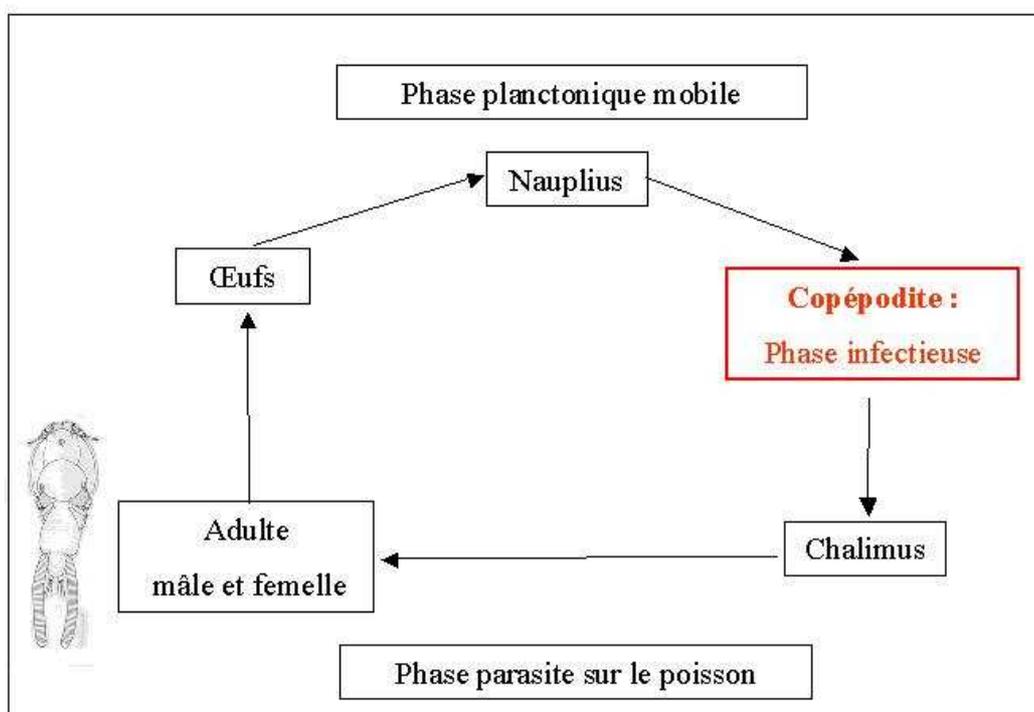


Figure 7 : Cycle de reproduction du genre *Caligus sp.*
(source : TRENDS in Parasitology)

4.3.1.4. Traitement

Cette parasitose survient majoritairement dans des élevages en cage. Il est difficile de contrôler la multiplication de ce parasite dans de telles conditions. Des bains de Trichlorphon ou de Dichlorvos ont été longtemps utilisés. Cependant ils sont potentiellement dangereux aussi bien pour l'environnement que pour le manipulateur. De plus, des résistances à ces produits ont été décrites pour certains sites géographiques (Roth *et al.*, 1993 in Noga, 1999).

Le traitement le plus efficace consiste à briser le cycle de reproduction soit en éliminant les phases fragiles du cycle par des traitements antiparasitaires, soit par une mise à

sec des structures d'élevage pendant au moins 4 à 6 semaines. Un suivi journalier des élevages permet de retirer les poissons les plus atteints.

Dans nos infrastructures au COP, en cas de forte infection, nous préconisons des bains statiques de formol à 200 ppm d'une heure par jour pendant 8 à 10 jours.

4.3.1.5. Prévention

Au niveau zootechnique, une diminution de la densité des poissons en élevage et une réduction des biosalissures par un entretien régulier des structures permettent de maximiser le flux d'eau et ainsi de limiter les possibilités d'accrochage des parasites et de contamination (Costello, 2006).

4.3.2. Infections par des Plathelminthes du genre *Neobenedenia*

4.3.2.1. Etiologie

Le genre *Neobenedenia* appartient à l'Embranchement des Plathelminthes et à la Classe des Monogéniens. Ces animaux sont des ectoparasites qui possèdent un système de fixation leur permettant de s'accrocher aux branchies et à la peau des poissons (Figure 8). C'est la description de ce système de fixation qui permet de déterminer l'espèce.

Systématique du genre *Neobenedenia*

Phylum : Platyhelminthes

Classe : *Monogenea*

Ordre : *Monopisthocotylea*

Famille : *Capsalidae*

Genre : *Neobenedenia*

4.3.2.2. Epidémiologie

Les Monogéniens sont bien connus pour parasiter les poissons en milieu naturel. **Une forte infestation indique souvent une détérioration de la qualité de l'eau et de mauvaises conditions d'élevage** (surpeuplement, manque d'oxygène, excès d'ammonium ou de nitrate, pollution organique). Ces conditions, accompagnées de températures supérieures à 15°C, favorisent le développement rapide de ces parasites (Noga, 1999).

Il existe plusieurs espèces dont l'espèce *Neobenedenia melleni* qui affecte de nombreux poissons de récif, *Acanthuridae*, *Ariidae*, *Balistidae*, *Diodontidae*, *Carangidae*, *Chaetodontidae*, *Holocentridae*, *Labridae*, *Lutjanidae*, *Malacanthidae*, *Ostraciidae*, *Pomadasyidae*, *Percichthyidae*, *Pomatomidae*, *Psettidae*, *Scatophagidae*, *Sciaenidae*, *Serranidae*, *Sparidae* et *Triglidae*. Le *P. orbicularis* est aussi sensible au *Neobenedenia sp.* particulièrement à l'âge adulte lors de son élevage en cage.

4.3.2.3. Diagnostic

Signes cliniques et lésionnels

Grâce à leurs crochets, ces parasites se fixent sur la peau, les yeux et les branchies des poissons. Ces infestations cutanées entraînent des lésions de grattage, suivi de perte d'écaillés. Cette activité irritante rend la peau duveteuse ou rougeâtre du fait de la production excessive de mucus, d'une hyperplasie épithéliale (augmentation du nombre de cellules épithéliales) ou d'une hémorragie. Les parasites peuvent se fixer aussi sur les branchies des poissons. L'irritation provoquée rend alors les lamelles branchiales congestives. Les lamelles secondaires se couvrent alors de mucus, jusqu'à fusionner entre elles dans un cas extrême de la parasitose. Ces phénomènes entraînent des difficultés voire même des détresses respiratoires qui vont jusqu'à l'hyperventilation.

Lorsque la fixation se fait au niveau oculaire, la présence des parasites provoque d'importantes lésions ophtalmiques et peut entraîner une opacification de l'œil, jusqu'à quelquefois l'hémorragie (Figure 9). Ces infestations associées au développement de lésions cutanées peuvent être accompagnées d'infections secondaires bactériennes.

Diagnostic

Le diagnostic est posé après observation d'un raclage de tégument (peau, yeux) ou de branchies (lamelles branchiales) à la loupe binoculaire ou au microscope photonique (état frais). Les Monogéniens sont facilement reconnaissables à leur déplacement en chenille (le parasite s'allonge et se rétracte successivement) et à la présence des crochets et des ventouses (Figure 8).

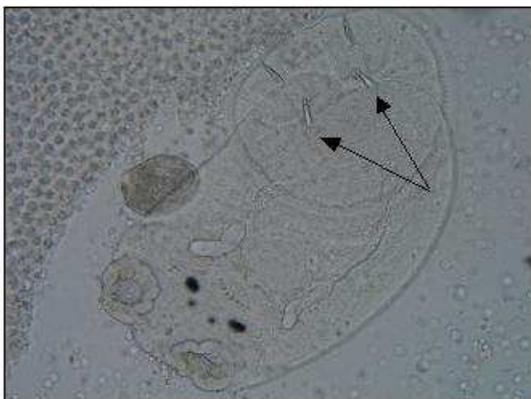


Figure 8 : État frais montrant un parasite adulte du genre *Neobenedenia* sp. (x 200). Les flèches indiquent les crochets qui permettent au parasite de se fixer sur le poisson.



Figure 9 : Photographie d'une lésion de l'œil associée à une infection au *Neobenedenia* sp. chez un *Platax orbicularis* adulte. L'œil présente une hémorragie et une opacification.

4.3.2.4. Traitement

Lorsque la parasitose est diagnostiquée, un bain rapide d'eau douce permet de détacher les adultes fixés sur la peau et les yeux des poissons. Si les branchies ne sont pas atteintes, un traitement à l'eau douce (salinité à 10 ‰) pendant 3 semaines permet d'éliminer complètement les œufs. En effet, ils mettent environ 10 à 21 jours pour éclore. Le traitement

doit donc être d'une durée supérieure au temps nécessaire à l'éclosion pour éviter une réinfection.

Si les branchies sont atteintes, un traitement au formol est nécessaire. Dans ce cas, un bain statique de formol à 200 ppm, pendant une heure, avec un fort bullage, est préconisé. Ce traitement doit durer au moins 8 jours et être suivi par une observation au microscope d'un raclage des tissus atteints pour s'assurer de l'absence de parasites

Après le premier jour de traitement, il est impératif de changer de bassin d'élevage. Le 1^{er} bassin peut alors être désinfecté au chlore et mis à sec afin d'éliminer les œufs potentiellement accrochés sur les parois (cf. 5.1.5).

4.3.2.5. Prévention

De bonnes conditions d'élevage et une bonne qualité d'eau permettent souvent de limiter cette parasitose. Avant la mise en place du traitement de l'eau aux rayons UV dans nos infrastructures, des infections ont été observées chez les géniteurs de *P. orbicularis* en élevage. C'est pourquoi, nous avons préconisé pour les individus maintenus en zone de maturation une procédure de prévention. Elle consiste en un bain court, d'eau douce, l'observation des branchies et du corps, un changement de bassin suivi d'une dessalure (10 ‰) de 5 jours. Cette procédure est effectuée de manière régulière tous les deux mois. Depuis sa mise en place, nous n'avons plus observé cette parasitose sur les poissons en salle de maturation.

4.3.3. Infections par des Ciliés du genre *Cryptocaryon*

4.3.3.1. Etiologie

Ce parasite est un Protozoaire de l'Embranchement des Ciliés. Il affecte les branchies et la peau des poissons marins. Initialement connu pour infecter les poissons d'aquariums, il s'est étendu aux poissons de pisciculture marine d'eau chaude.

Systematique du genre *Cryptocaryon*

Phylum : *Ciliophora*

Classe : *Oligohymenophorea*

Ordre : *Hymenostomatida*

Famille : *Ichthyophthiriidae*

Genre : *Cryptocaryon*

4.3.3.2. Epidémiologie

Le cycle biologique est de type monoxène direct, avec alternance d'une phase exogène libre (mobile) et d'une phase ectoparasite (un seul hôte). Quatre stades de développement sont décrits pour cette espèce (Figure 10) (Maunier, 2002) :

- Le stade trophonte correspond à la phase ectoparasitaire qui dure entre 3 et 7 jours. Le parasite pénètre dans l'épithélium du poisson, se nourrit et grossit à son dépend.

- Au stade tomonte, la cellule abandonne l'hôte et nage (12 à 18h) vers un support (végétal, paroi du bac...). Elle se fixe, s'enkyste pour se diviser de manière active. Cette période de multiplication intensive en cellules filles (tomites) dure entre 3 et 28 jours.
- Les tomites émergent du kyste par une petite ouverture. L'excystement des tomites peut s'étaler sur plusieurs semaines pour des tomontes ayant subi les mêmes conditions environnementales. Cet étalement dans le temps est favorable aux récurrences suite à des traitements trop courts. Le nombre de tomites produits par un tomonte dépend de sa taille. Plus il est gros, plus il produira de tomites. Mais en moyenne, un tomonte produit près de 200 tomites par division binaire.
- Les tomites se différencient en forme nageante avec des cils, appelée théronte. Commence alors **la phase infestante, où les thérontes doivent trouver rapidement un poisson hôte**. En effet, les thérontes ne disposent que de 12 à 36 h pour se fixer. De manière générale, les thérontes meurent dans le milieu s'ils ne trouvent pas d'hôte. Il a été prouvé que la libération des thérontes est réglée de manière circadienne. Cette libération s'opère entre 2h00 et 9h00 le matin, suivie d'une synchronisation des infestations des poissons dans la matinée. Une fois le poisson hôte trouvé, le théronte se fixe et pénètre dans l'épithélium pour se nourrir.

La transmission se fait par simple contact entre un poisson sain et un poisson atteint ou tout autre objet contaminé. Le principal réservoir est le tomonte. Il permet la réinfection en libérant les tomites.

La cryptocaryose est une maladie très contagieuse. Elle est essentiellement causée par l'espèce *Cryptocaryon irritans*. Cet ectoparasite est le plus virulent et le plus fréquent chez les poissons. Ces infections causent un retard de croissance des poissons atteints, et des impossibilités de vente voire même des mortalités. C'est pourquoi elle entraîne de graves pertes économiques pour l'aquaculture mondiale depuis les années 1980.

Le genre *Cryptocaryon* affecte spécifiquement les poissons téléostéens marins (*E. merra*, *Lutjanus johni*, *G. nigricans*...). Notons que certaines espèces sont connues pour être résistantes telles que *Lythrypnus dalli* (*Gobiidae*), *Paralichthys californicus* (*Bothidae*) et *Pleuronichthys coenosus* (*Pleuronectidae*). Nous avons observé que les poissons adultes de l'espèce *P. orbicularis* sont sensibles à cette infestation. Des individus élevés en milieu non contrôlé (élevage en cage en mer), ou provenant du milieu naturel (lors de leur entrée en zone de quarantaine) ont été trouvés infestés.

4.3.3.3. Diagnostic

Signes cliniques et lésionnels

La maladie se traduit par l'apparition d'anomalies du comportement (diminution de l'appétence, hyperactivité) et la présence de lésions sur le corps associée à une décoloration du poisson atteint. Les nageoires sont les premiers organes atteints, suivi du corps. Lorsque l'épithélium branchial est infecté, les poissons entrent en détresse respiratoire. On observe

alors une augmentation de la fréquence respiratoire. A ce niveau de la maladie, les nageoires sont rétractées contre le corps du poisson et l'appétit est diminué. Dans certains cas, les yeux peuvent être atteints. Une kératite (inflammation de la cornée) se développe et opacifie l'œil (Figure 11). La peau se recouvre de nombreuses ponctuations blanchâtres ou grisâtres visibles à l'œil nu (jusqu'à 0,5 mm de diamètre) (Figure 11). Du fait de l'irritation causée par le broutage du parasite, les poissons se frottent contre le substrat ou les bords des bassins et augmentent leur sécrétion de mucus. La peau se desquame et des tâches hémorragiques apparaissent. On peut même observer une ulcération de la peau dans les stades terminaux. Associées à ces plaies, des infections bactériennes secondaires peuvent survenir (Maunier, 2002).

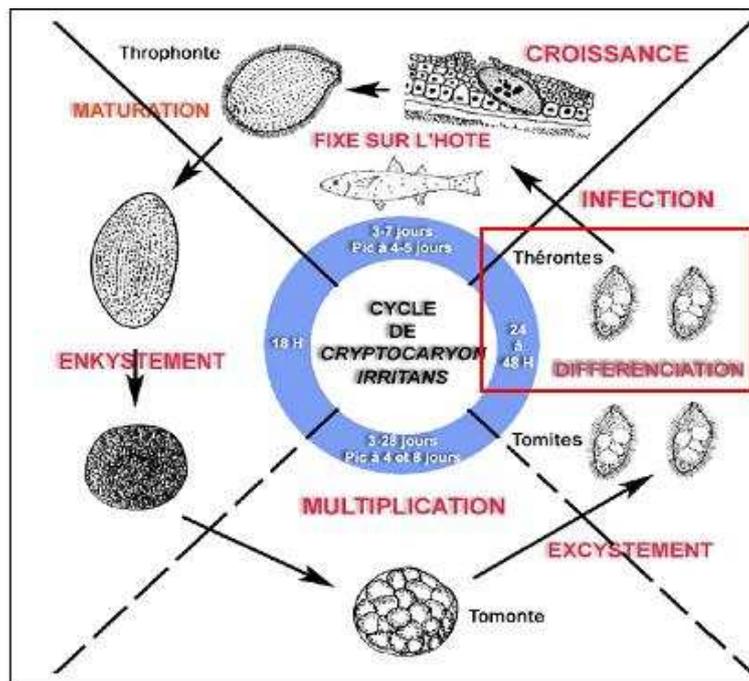


Figure 10 : Cycle de reproduction de *Cryptocaryon irritans* (Maunier, 2002)

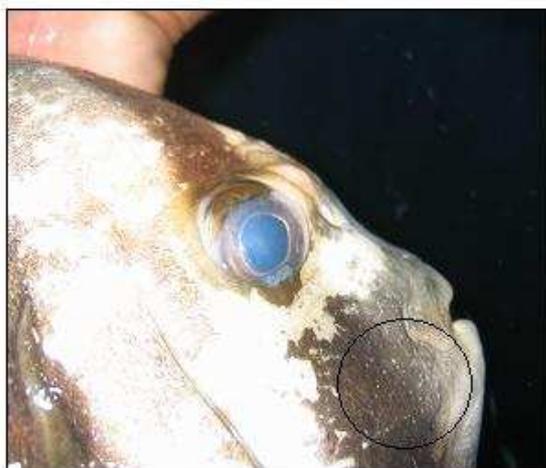


Figure 11 : Observation de points blancs au niveau de la tête d'un *Platax orbicularis* et de kératite.



Figure 12 : État frais montrant une cellule de *Cryptocaryon sp.* au stade trophonte (x 630)

Diagnostic

L'observation des symptômes cutanés permet rapidement de poser un diagnostic. En effet, la présence de petits points blancs (rugosité) sur la peau laisse suspecter la présence d'une cryptocaryose. Cette maladie est généralement aiguë et très contagieuse. La confirmation de la maladie passe par l'examen microscopique. Il se fait à partir de prélèvement de branchies et de peau. L'observation doit se faire rapidement après le prélèvement car les parasites sont vite détruits une fois séparés de leur hôte. L'observation au microscope photonique révèle la présence de particules ciliées (Figure 12). En l'absence de traitement adéquat, l'état général des poissons atteints se dégrade rapidement pour devenir mortel. La mort est souvent causée par une asphyxie, un déséquilibre osmotique ou des infections bactériennes ou fongiques secondaires (Maunier, 2002).

4.3.3.4. Traitement

Lorsque la maladie est diagnostiquée dans un élevage, les poissons sont déjà très atteints. Les méthodes de traitement contre la cryptocaryose sont de trois types : d'ordre biologique pour limiter la recontamination, d'ordre physique pour détruire le parasite et enfin d'ordre chimique pour éliminer le parasite (Maunier, 2002).

Les méthodes biologiques peuvent comprendre trois techniques : d'abord la récolte des thérontes (formes libres), le piégeage des tomontes (formes enkystées) et enfin le transfert des poissons atteints.

- La récolte des thérontes (formes nageantes) se fait en retirant une grande quantité d'eau du bassin infecté. La libération des thérontes s'effectuant entre 2h et 9h du matin, il est préférable d'effectuer cette opération le matin. Cette technique permet de limiter la contamination mais en aucun cas ne permet d'éliminer la source (les tomontes).

- Le dépôt de sable au fond du bassin peut permettre (s'il est possible) de piéger les tomontes (formes enkystées). Les tomontes se fixent au sable et peuvent ainsi être éliminés. Cette technique est plus efficace que l'élimination des thérontes puisqu'un tomonte peut renfermer des centaines de tomites.

- La dernière technique, **la plus facile à réaliser, consiste à changer de bassin d'élevage** : ainsi les trophontes mûrs détachés du poisson restent dans le premier bassin d'élevage et les tomontes fixés aux parois du bassin.

Les méthodes physiques permettent d'éliminer les parasites présents dans le bassin en jouant sur la température ou avec des irradiations aux rayons UV. Lorsqu'elle est compatible avec l'élevage, une température d'eau inférieure à 19°C permet de ralentir le cycle de reproduction des souches classiques de *Cryptocaryon*. En milieu tropical, cette solution est difficile à mettre en œuvre.

Pour la méthode chimique deux cas sont possibles, l'hyposalinité ou l'hypersalinité. Une modification temporaire de la salinité peut être envisageable dans nos infrastructures car *P. orbicularis* est un poisson euryhalin. Cette technique est, de plus, bien adaptée pour

l'élevage des poissons destinés à la consommation humaine, puisque aucun traitement médicamenteux n'est utilisé. **La diminution de la salinité est néfaste au parasite quel que soit son stade de développement.** La lyse cellulaire des tomites se produit à des salinités inférieures à 16 ‰. Le traitement consiste à diminuer la salinité de l'eau jusqu'à 10 ‰ pendant 14 jours. Ce traitement est précédé d'un bain « flash » en eau douce.

Lors d'une telle parasitose, les poissons se protègent en produisant un excès de mucus comme une « barrière biologique ». Cette barrière empêche, toutefois, l'action d'une chimiothérapie. Une augmentation de la salinité permet d'éliminer cet excès de mucus et facilite les traitements chimiques. Les traitements n'affectent pas tous les stades de développement de *Cryptocaryon*. Les trophontes situés au niveau intra-épidermique ne sont pas affectés par les traitements anti-parasitaires. Les tomites enkystés sont résistants à tous les traitements. Seuls les **thérontes** (formes libres, nageantes et infestantes) sont directement affectés par les traitements. Leur faible durée de vie accentue leur vulnérabilité. **C'est le stade critique de la cryptocaryose.** Le principe actif doit être en concentration suffisante pour tuer les thérontes avant qu'ils ne se fixent aux poissons hôtes. Le traitement doit être d'une durée minimum de 5 à 10 jours afin de tuer tous les tomites libérés par les kystes. Il est impératif de poursuivre le traitement après disparition des symptômes, pour éviter les récurrences. Dans les formes graves, plusieurs principes actifs sont utilisables contre la cryptocaryose : chlorure d'acriflavine, bleu de méthylène, formol, permanganate de potassium, sulfate de cuivre ou de zinc, diméridazole, pyriméthamine, métronidazole, sulfathiazole, 2 amino 5 nitrothiazole

Malgré une adaptation des traitements, ils sont toujours coûteux et engendrent un stress important pour les poissons. Pour une meilleure efficacité du traitement, il est préférable de traiter les animaux le matin, lors de la libération des thérontes. Une association avec un traitement préalable à l'eau douce permet une meilleure pénétration des molécules à travers la peau grâce à la force osmotique.

Au COP, nous préconisons une dessalure (10 ‰ pendant 14 jours) suivie d'un traitement au formol (37%), en bain statique de 100 à 250 ppm pendant une heure avec un fort bullage pendant 8 jours. A la suite d'un épisode de cryptocaryose, il est nécessaire de désinfecter les bassins atteints et de les mettre à sec.

Enfin, l'irradiation aux UV est maintenant utilisée. Elle permet d'éliminer les formes libres du parasite.

4.3.3.5. Prévention

Actuellement, il n'existe pas encore de vaccin mis au point contre la cryptocaryose.

Tout organisme venant du milieu extérieur peut être porteur de *Cryptocaryon*. La limitation du stress réduit les risques de prolifération des parasites. Une fois les poissons introduits dans leurs bassins d'élevage, il est recommandé d'effectuer des sédations correctes lors des transferts ou manipulations.

5. Prophylaxie

Les poissons issus de l'aquaculture sont soumis à une réglementation rigoureuse concernant les résidus médicamenteux car ils sont destinés à la consommation humaine. De ce fait, il existe très peu de traitements thérapeutiques légaux utilisables en aquaculture. De plus, ils sont souvent très lourds en temps et en manipulation sur les poissons et coûteux. Afin d'éviter ou de limiter ces traitements thérapeutiques, il convient d'effectuer des traitements préventifs. Cette prévention regroupe l'ensemble des processus ayant pour but de prévenir l'apparition ou la propagation d'une maladie, elle est dénommée prophylaxie.

En aquaculture, trois types de prophylaxie prédominent : médicale, sanitaire et zootechnique.

La prophylaxie médicale regroupe les médications prévenant l'apparition ou le développement de maladies telle que la vaccination. Il existe, toutefois, très peu de vaccins commerciaux. Beaucoup de vaccins sont encore au stade de la recherche.

La prophylaxie sanitaire est basée sur la prévention sanitaire et le diagnostic rapide et précoce des infections bactériennes, virales et/ou parasitaires. La prophylaxie sanitaire n'est pas infaillible mais permet de limiter les risques d'épidémie.

D'autre part la prophylaxie zootechnique correspond à l'ensemble des actions et mesures non médicales et non sanitaires : mise en place de mesures d'hygiène (pédiluves, décontamination du matériel, des mains, filtration/stérilisation de l'eau), et de mesures d'éradication des foyers potentiels d'infections (nettoyage régulier des structures d'élevage, mise à sec des bassins). **Ces bonnes pratiques d'élevage ne sont efficaces que si elles sont appliquées, au quotidien et par toutes les personnes qui accèdent aux installations soumises à ces mesures.**

Nous proposons dans ce chapitre de décrire les installations des différentes zones d'élevage en précisant les mesures prophylactiques appliquées à chacune d'entre elles.

La zone d'élevage est composée des 10 salles suivantes (Figure 13) : filtration (1), quarantaine (2), maturation de *P. orbicularis* (3), aliments (4) et préparation (5), élevage larvaire de *P. orbicularis* (6), production de rotifères (et d'incubation des œufs) (7), production d'artémia (8), sevrage /nursérie (9) et laboratoire (10).

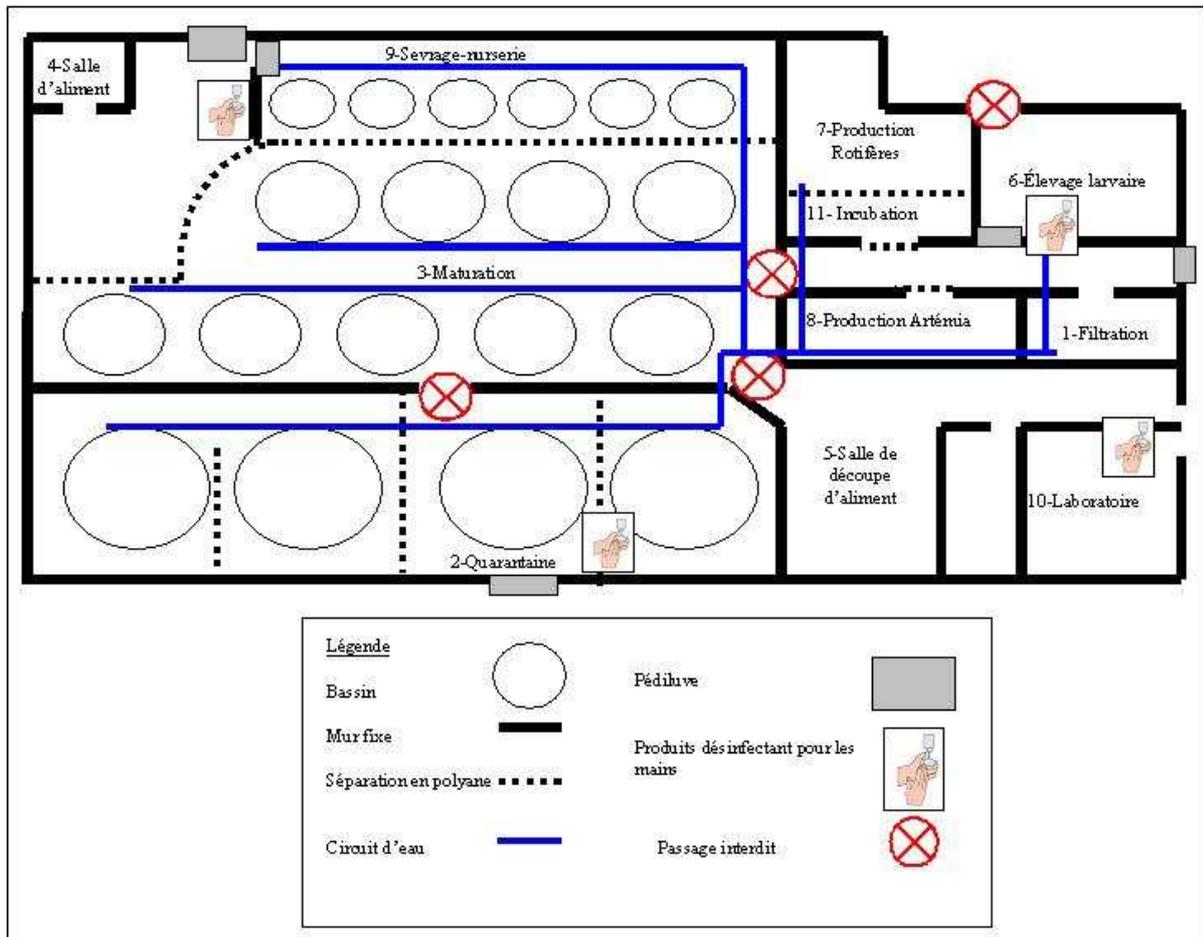


Figure 13 : Plan de la zone d'élevage

5.1. Intrants

Les intrants sont constitués par tous les éléments qui entrent en contact avec les poissons en élevage c'est-à-dire : l'eau de mer, l'eau douce, l'air, les aliments, le matériel et le personnel.

5.1.1. Eau de mer

L'eau de mer du lagon, pompée à 5m de profondeur, arrive dans la salle de filtration. Elle subit deux types de traitement : un traitement mécanique puis un traitement physique. Ces traitements complémentaires permettent l'élimination des matières en suspension (MES) et des organismes vivants présents.

Le système de filtration mécanique comprend un piège à coquillages qui permet d'arrêter les particules de taille inférieure à 2 cm, suivi de deux filtres à sable puis d'une série de 8 cartouches filtrantes (4 avec un tamis de 25 μm et 4 avec un tamis de 10 μm). Une filtration physique effectuée par stérilisation de l'eau aux UV complète le dispositif de filtration de l'eau de mer. Le réacteur d'UV désinfecte l'eau par irradiation d'UV-C de longueur d'onde 254nm. Le réacteur fournit une dose de 200 milijoule/cm²/seconde à 26 000 l/h qui est la dose conseillée par l'OIE (Office International des Epizooties ; Manuel

aquatique, 2006) pour éliminer les particules virales (*Nodavirus*) avec une transmittance de 85%.

5.1.1.1. Procédures d'entretien

Le système de filtration est nettoyé régulièrement : le piège à coquillage est nettoyé tous les deux ou trois mois ; les filtres à sable sont nettoyés quotidiennement, de préférence le matin et le système de filtration à cartouches est nettoyé tous les deux jours.

Les filtres à sable sont nettoyés l'un après l'autre. Chaque filtre est équipé d'une vanne. Une fois fermée, il est possible de sélectionner le mode de fonctionnement du filtre : filtration, « back wash », rinçage. Quand le mode est choisi, la vanne est réouverte pour le traitement voulu. Pour le nettoyage, on passe en mode « back wash » pendant 5 à 10 min, ainsi l'eau traverse le filtre en sens inverse, vers une sortie lagon. Cette manipulation permet d'évacuer les particules retenues par le filtre, d'observer la qualité de l'eau rejetée et d'évaluer l'état du filtre. Si l'eau rejetée est colorée par les MES (marron) suite à de fortes pluies, ce traitement est prolongé jusqu'à obtenir une eau de rejet limpide. L'arrivée d'eau est ensuite coupée, pour passer en mode « rinçage ». L'arrivée d'eau réouverte, le système est rincé pendant 5 à 10 min.. Dans cette configuration l'eau passe dans le même sens qu'en mode « filtration » mais l'eau est rejetée. Après vérification de la propreté de l'eau de rejet, le filtre repasse en mode « filtration ». Une fois l'eau remise en circulation normale, il est important de vérifier la pression. Elle doit être comprise entre 0,5 et 1 bar. On peut alors faire de même pour le second filtre à sable.

Les poches des filtres à cartouche sont nettoyées deux par deux. Une fois l'arrivée d'eau coupée, on ouvre le couvercle de chaque unité. Les 2 cartouches sont extraites de l'unité et déposées sur leur support respectif. Chaque cartouche est rincée à l'aide d'un jet d'eau douce, afin d'éliminer les MES retenues dans les mailles du cartouche. Une fois les poches rincées, elles sont replacées dans leur unité respective. Le couvercle est refermé jusqu'à la butée, et réouverte d'un quart de tour. Quand les 4 cartouches sont nettoyées et replacées dans leurs unités, la vanne d'eau est réouverte. La purge de chaque unité est faite pour éliminer l'air résiduel qui est remplacé par de l'eau. En cas de fortes pluies, ce nettoyage est effectué tous les jours, voire même plusieurs fois par jour si les cartouches sont très imprégnées de MES. Lorsque les cartouches ne peuvent plus être nettoyées par simple jet d'eau, elles sont remplacées par des neuves.

Quand le nettoyage du système de filtration à sable et à cartouche est terminé, on effectue un rinçage à l'eau douce de l'extérieur des deux systèmes afin de limiter la corrosion des pièces métalliques par l'eau de mer.

Une fiche de suivi de ce nettoyage est placée dans cette zone et remplie dès que le nettoyage est effectué. De plus, cette fiche permet de signaler les observations de la qualité de l'eau filtrée ou toutes autres remarques.

L'eau de mer ainsi traitée est redistribuée dans toutes les salles de la zone d'élevage : maturation, quarantaine, larvaire, sevrage-nurserie, rotifères et artémia.

5.1.2. Eau douce

L'eau douce provient d'un captage Ifremer. Lorsque l'eau douce vient à manquer, on bascule sur le réseau de la commune de Vairao. L'eau douce n'est pas traitée avant d'être distribuée dans la zone d'élevage.

Suite à plusieurs épisodes de mortalité inexplicée lors de dessalures, il est préférable de munir les installations de colonnes de dégazage. Ce dispositif permet d'éviter la sursaturation de l'eau en gaz dissous. En salle larvaire l'eau d'élevage est traité dans une colonne commune à la salle. Une fois traité l'eau est distribuée aux différents bacs de cette salle. Par contre dans les autres salles (maturation, quarantaine, sevrage-nurserie) chaque bac est équipé d'une colonne de dégazage qui traite l'eau douce et l'eau de mer avant de distribuer l'eau au bac.

5.1.3. Aération

L'air utilisé pour l'aération des bassins n'est soumis à aucun traitement.

5.1.4. Alimentation

5.1.4.1. Poissons adultes

Les poissons sont nourris soit avec des aliments naturel (moules et calamars congelés) soit avec des aliments déshydratés (granulés, Legouessant). L'aliment frais est réservé aux poissons sauvages qui viennent d'être introduits en salle de quarantaine. Cette alimentation est utilisée pour leur permettre de mieux s'acclimater au milieu confiné. Nous utilisons des moules et des calamars congelés comme aliment frais. Une fois décongelés, ils sont découpés dans la salle de découpe puis répartis en petites doses et stockés dans le congélateur de la salle d'aliments. Les doses sont placées à 4°C (réfrigérateur) pour permettre leur décongélation la veille de leur utilisation. Celle-ci doit être toutefois limitée à cause des risques de contamination par d'éventuels organismes pathogènes. Il faut noter qu'il est important de bien maintenir la chaîne du froid. Les aliments déshydratés sont introduits progressivement dans la nourriture des poissons sauvages. L'aliment déshydraté industriel présente plusieurs avantages. Il est stérile et de composition chimique connue et constante. Tous les aliments utilisés sont stockés en chambre de congélation (-20°C). Une fois ouvert, le sac d'aliment déshydraté est stocké à 4°C, à l'abri de l'humidité et de la lumière, dans la salle d'aliments.

5.1.4.2. Élevage larvaire et sevrage-nurserie

Lors des premières étapes de l'élevage larvaire, les poissons sont autotrophes. L'ouverture de leur bouche s'opère quelques jours après l'éclosion. Du fait de la taille réduite de leur bouche, ils sont nourris avec de petites proies vivantes comme les rotifères et les artémi.

La souche de rotifères (*Brachionus plicatilis*, 180 µm) est produite dans une salle isolée. La conservation des souches se fait en erlenmeyers (500 ml à 5l) à température ambiante. Leur production est réalisée en bacs cylindro-coniques noirs de 200 l. Ces bacs sont alimentés en eau de mer filtrée. Les rotifères sont alimentés par une pâte d'algues stériles qui

est un concentré de microalgues, *Nannochloropsis oculata*, mortes et congelées (64 milliards de cellules/ml). Une fois un sac décongelé, il doit être utilisé dans le mois qui suit son ouverture et conservé à 4°C. Ils sont enrichis en acide gras à hauteur de 0,3g de Easy DHA Selco® par million de rotifères. La veille de la récolte le bac de culture de rotifères reçoit une dose d'enrichissement de 0,05 g de Easy DHA Selco® par million. Ces solutions d'acide gras (Easy DHA Selco®) sont conservées à 4°C (Gasset *et al.*, 2007).

Les nauplii d'artémi (INVE®, type AF, 430 µm) sont produites à partir de cystes commerciaux conservés à 4°C. Leur production est faite dans une salle spéciale et isolée physiquement des autres salles, dans des bacs cylindro-coniques noirs de 200l. Ces bacs sont alimentés en eau de mer filtrée. L'incubation des cystes est de 24 heures en bassin de 200 litres fortement aéré. Après une purge et une décantation d'une ½ heure, ils sont récoltés sur une maille de 100 µm par la vanne de purge du bac (Gasset *et al.*, 2007).

Les artémi de un jour (A1) (Salt Creeck®, Premium Great Salt Lake) sont produits dans un bac cylindro-coniques noir de 200l. Les bacs sont alimentés en eau de mer filtrée. Ils sont enrichis en acides gras (Super Selco®) à hauteur de 1g/million d'artémi. Ces solutions d'acide gras (Super Selco®) sont conservées à 4°C (Gasset *et al.*, 2007).

Des essais de sevrage précoce sont effectués grâce à une gamme d'aliment « starter » : Gemma micro (Nutreco). Les larves sont nourris avec des micro-particules permettant de favoriser le passage d'une alimentation sur proies vivantes à une alimentation sur granulés (aliment inerte). Au fur et à mesure de la croissance des poissons, la taille du granulé augmente. Les sacs de granulés sont stockés à -20°C, une fois les sacs ouverts ils sont conservés à 4°C (Gasset *et al.*, 2007).

5.1.5. Matériel

Chaque salle d'élevage possède son propre matériel, thermomètre, lampe torche, bacs de 200 l (Gillac), pour limiter les éventuelles contaminations entre les salles. Un certain nombre de petit matériel, épuisette, balai, seau, sont propres à chaque bassin d'élevage. Pour les identifier, le numéro du bassin doit être inscrit sur le matériel. Ces mesures permettent de limiter la contamination par des organismes pathogènes d'un bassin à un autre par l'utilisation d'un matériel « contaminé ».

Avant l'utilisation du matériel, il convient de le rincer à l'eau douce. Après chaque utilisation, il doit être nettoyé à l'eau douce puis égoutté. Une fois par semaine, le matériel doit être chloré dans une solution à 5 %, rincé à l'eau douce puis égoutté. Ces précautions évitent la propagation des agents pathogènes.

Le matériel en contact avec les aliments (moule, calmar ou granulés) comme les pots d'aliments sont nettoyés au savon vaisselle, rincés à l'eau douce et séchés avant d'être réutilisés. Les distributeurs automatiques d'aliments (tapis) sont nettoyés tous les matins, avant le premier remplissage. Le restant d'aliments sur le tapis est retiré à l'aide d'un pinceau. On s'assurera que ce restant d'aliments ne tombe pas dans le bac ou au sol, afin d'éviter le développement de microorganismes indésirables. Si le nettoyage au pinceau ne suffit pas, l'utilisation d'une éponge humide ou du papier essuie-tout est préconisée afin de retirer les amas de granulés qui ont séché sur le tapis.

Lorsqu'un bassin d'élevage est vidé, un premier rinçage à l'eau douce est effectué. Une solution désinfectante (eau de javel à 5mL/L) est pulvérisée sur l'ensemble du bac et de son filet de protection (pour les bacs en maturation et quarantaine). Après au moins 20-30 secondes d'action, le bac est brossé puis rincé à l'eau douce et mis à sec. A la fin d'un élevage dans une salle (larvaire, sevrage-nurserie), une procédure de mis à sec des conduits doit être imposée. Cette mise à sec permet d'éviter le développement de microorganismes indésirables dans les conduits entre deux élevages.

5.1.6. Personnel

Dans une situation idéale, il faudrait un responsable par salle d'élevage. Nous ne sommes pas dans ce cas, et de plus, lors des astreintes, cette situation n'est pas réalisable. D'une manière générale, il y a un responsable pour la zone de maturation, un pour la zone de quarantaine et un autre pour le grossissement en cage flottante. Ce dispositif devrait permettre de limiter les passages et les échanges de matériel entre zones. Lors des astreintes, une « marche en avant » a été définie : il faut s'occuper en premier des poissons maintenus en salle de maturation, puis des poissons en zone de quarantaine : la règle étant de manipuler les poissons les moins exposés aux pathogènes (maturation) vers ceux les plus exposés (milieu naturel).

5.1.6.1. Désinfection des chaussures

Le nettoyage et la désinfection des chaussures est une mesure d'hygiène obligatoire dans les zones d'élevage pour limiter les contaminations croisées. Cette pratique est applicable à toutes les personnes qui entrent dans la zone d'élevage.

Matériel

Les pédiluves doivent être d'au moins 10cm de profondeur, de dimension 50 x 50 cm pour la désinfection des deux chaussures. Les pédiluves peuvent être muni d'un tapis brosse au fond pour un meilleur nettoyage des chaussures. La désinfection se fait par une solution désinfectante comme l'eau de javel (hypochlorite de sodium) à raison de 5ml/l pendant 20 à 30 secondes d'action.

Positionnement

Les pédiluves sont positionnés de façon permanente à l'entrée de chaque zone d'élevage (maturation, larvaire, sevrage-nurserie et proies vivantes). Lors d'opérations occasionnelles (tri, comptage...) pouvant entraîner des risques sanitaires supplémentaires, il est conseillé de rajouter des pédiluves à proximité des lieux de manipulation. Un double pédiluve est nécessaire à tout endroit où les chaussures sont fortement souillées par de la matière organique (boue, terre...). Ce système de double pédiluve, permet le nettoyage des chaussures puis une désinfection efficace (FFA&UNPSA, 2004).

Mode opératoire

Après nettoyage des chaussures à l'eau douce avec un tapis brosse dans un premier pédiluve, la désinfection est réalisée par trempage d'environ 20 à 30 secondes dans un deuxième pédiluve contenant un produit désinfectant (eau de javel).

La désinfection doit se faire à chaque fois qu'on entre dans la zone d'élevage en venant de l'extérieur, lors de passage entre zones physiquement séparées, après toute manipulation de produits à risque sanitaire (poisson mort) ou après le passage dans une zone potentiellement contaminée (quarantaine, laboratoire, filtration).

Précaution

Avant utilisation du produits désinfectant, il faut s'assurer qu'il a été stocké dans des conditions n'entraînant pas sa dégradation (exposition des stocks d'eau de javel à la lumière).

En cas de double pédiluve, il faut s'assurer que le premier pédiluve demeure propre.

Il est important de vérifier régulièrement que les solutions désinfectantes des pédiluves ne sont pas inactivées. L'eau de javel est inactivée par dilution, présence de matière organique excessives ou par des rayons UV (exposition excessive à la lumière du jour). Il est préférable de renouveler régulièrement cette solution.

5.1.6.2. Désinfection des mains

Le nettoyage et la désinfection des mains est une mesure d'hygiène obligatoire dans les zones d'élevage pour limiter les contaminations croisées. Cette pratique est applicable à toutes les personnes qui traverse la zone d'élevage.

Matériel

Les zones à risques sanitaires doivent être équipées (toilettes, laboratoire) d'un évier avec un savon liquide, d'un produit bactéricide, une brosse à main, un système d'essuyage à main unique et d'une poubelle.

L'entrée des différentes zones d'élevage physiquement séparées doit être équipée d'un désinfectant liquide dans un distributeur mural (FFA&UNPSA, 2004).

Mode opératoire

En début de journée et après toutes opérations souillantes (manipulation de poissons morts, matière organique..), un nettoyage correct des mains doit être réalisé, suivi d'un rinçage et de la désinfection avec le produit prévu à cet effet (MED +).

Au cours de la journée, cette désinfection a lieu lors du passage d'une zone physiquement séparée à une autre à l'aide d'un désinfectant liquide dans un distributeur.

Précautions

Avant utilisation du désinfectant, il est nécessaire de vérifier que le produit a été stocké dans des conditions n'entraînant pas sa dégradation. Il convient aussi de vérifier la date d'utilisation du produit, pour assurer l'activité biologique de ce dernier.

Le responsable de chaque salle doit s'assurer que les distributeurs muraux ne sont pas vides.

5.1.7. Les propositions d'améliorations

5.1.7.1. L'eau de mer

Tout d'abord concernant le piège à coquillages : la fréquence de nettoyage de ce dernier devrait être augmentée à une fois par mois.

Depuis l'instauration du système de filtration de l'eau de mer, la qualité de l'eau d'élevage est bien meilleure, en effet les bassins présente moins de MES. Un suivi de la contamination bactérienne permettrait d'évaluer l'efficacité du système de filtration et de la qualité de l'eau d'élevage. Cette évaluation devrait être complétée par un suivi de la contamination en *Nodavirus* dans l'eau grâce à la nouvelle technique de PCR en temps réel.

5.1.7.2. L'eau douce

Afin de limiter la pollution de l'eau par les MES, il est nécessaire d'installer un système de filtration (filtre à sable ou à cartouche).

5.1.7.3. L'aération

Un traitement de l'air devrait être envisagé, afin de compléter la protection des animaux en élevage. Un passage de l'air sur charbon actif permet d'éliminer les agents pathogènes potentiels.

5.1.7.4. Les rejets

L'eau d'élevage

Un gros effort est porté sur le traitement des intrants. En revanche, l'eau évacuée des zones d'élevage est dirigée vers le lagon sans aucun traitement. L'eau rejetée des zones d'élevage devrait passer dans un bassin de décantation ou dans une cuve spéciale afin de traiter les eaux de rejets notamment suite à des traitements (OTC ou formol).

Les poissons morts

Lorsqu'un poisson est sacrifié ou retrouvé mort, il est congelé et stocké en chambre de congélation à -20°C. Par la suite il est rejeté dans le lagon. Par précaution, il conviendrait d'autoclaver les individus morts afin de ne pas propager les potentiels agents pathogènes qui ont conduit à sa mort. Il est préférable de jeter les poissons à la poubelle après autoclavage.

5.2. Salle de quarantaine

La salle de quarantaine est la salle qui accueille les poissons issus de zones non protégées : poissons sauvages et poissons élevés en cage dans le lagon. Les poissons y subissent des traitements préventifs et/ou curatifs ainsi qu'un dépistage du *Nodavirus*.

5.2.1. Plan de la salle

L'entrée de cette salle est équipée d'un pédiluve et d'un distributeur de produit désinfectant pour les mains (MED +) (cf. 5.1.6). La salle est isolée physiquement des autres salles par des murs.

Elle est composée de 4 bassins cylindriques de 12m³ de couleur noire, chacun séparé par une bâche en polystyrène noire, opaque. Chaque bassin est équipé d'une colonne de dégazage de l'eau de mer et de l'eau douce, avant qu'elles soient distribuées au bassin, ainsi que d'un système d'aération. L'évacuation de l'eau se fait par une surverse latérale et par une vidange centrale (Figure 14).

Chaque bassin possède son matériel spécifique : épuisette, balais, seau (10 l).

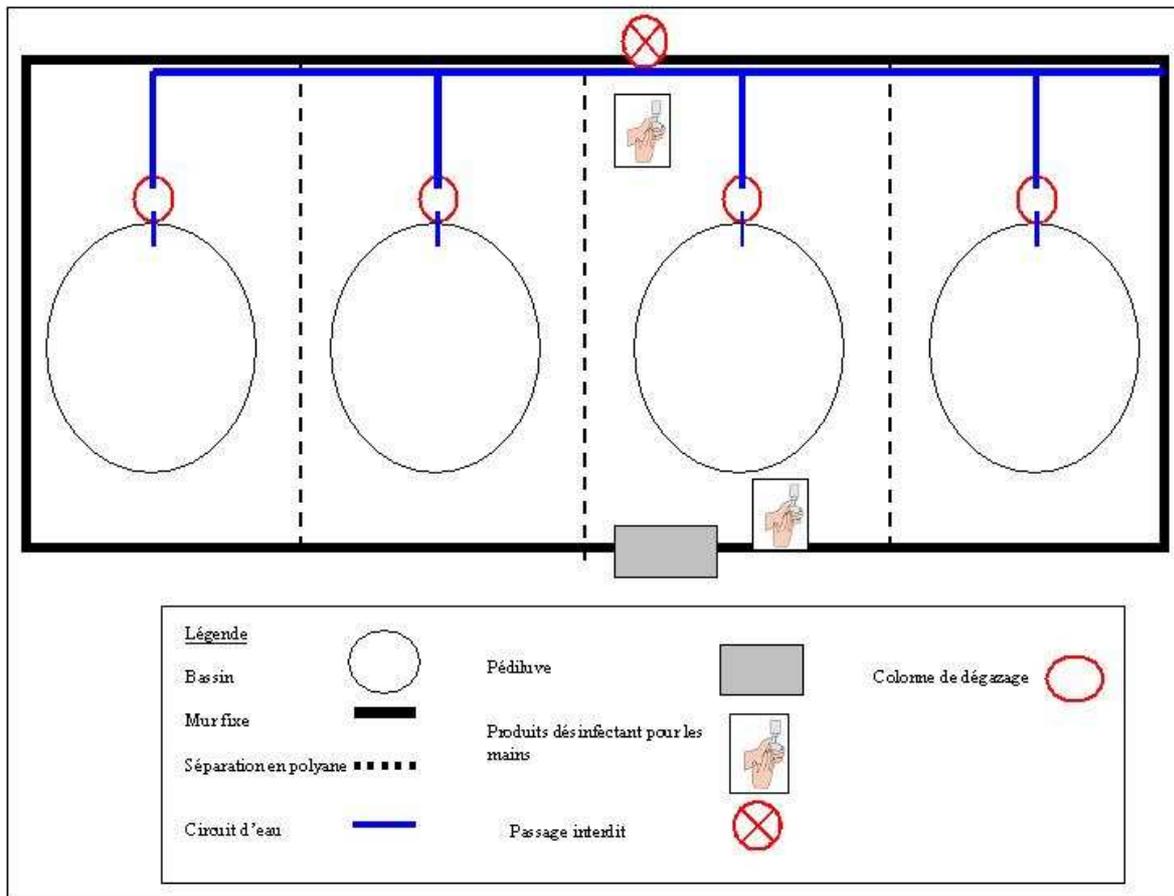


Figure 14 : Plan de la salle de quarantaine

5.2.2. prophylaxie

A l'arrivée des géniteurs en quarantaine, ils suivent une procédure prophylactique permettant d'éliminer tous les parasites qu'ils portent. Un dépistage du *Nodavirus* est effectué sur prélèvements de gamètes.

5.2.2.1. Prophylaxie d'entrée d'un géniteur en quarantaine

Une chronologie des opérations d'introduction des animaux sauvages a été définie.

La veille de l'arrivée des animaux, un bassin de quarantaine est préparé : une solution d'eau de javel à 5 % est pulvérisée dans le bassin et sur le filet de protection. On laisse cette solution agir quelques minutes puis un rinçage à l'eau douce est réalisé. Le bassin est rempli avec de l'eau de mer à 15 ‰. Le bulleur et le filet de protection sont installés.

A l'arrivée, chaque poisson est placé dans une poubelle de 80 litres d'eau douce (bain flash) pendant 5 minutes (traitement des Monogènes présents). A l'issue de ce premier traitement, qui permet également la manipulation plus facile du poisson (effet calmant de l'eau douce), il est sorti de l'eau et posé délicatement sur une table sur un linge humide. Un point complet de l'état sanitaire externe des animaux est effectué. Cette opération permet de détecter éventuellement des ectoparasites et la mise en place d'un traitement adapté (Figure 15). Un marquage par un « pit-tag », une pesée et un prélèvement de gamètes (si l'état de maturité le permet) pour le dépistage du *Nodavirus* sont réalisés. Ce dernier prélèvement est obtenu par simple pression abdominale chez le mâle et par canulation dans la gonade chez la femelle.

Les animaux sont ensuite placés dans le(s) bac(s) de quarantaine avec un renouvellement d'eau total réglé (8 litres en 15 secondes) en dessalure à 15‰. Cette dessalure est maintenue pendant **15 jours**. Elle a pour objectif de débarrasser les animaux de tous les ectoparasites (Copépodes, Ciliés, Monogènes). La durée du traitement a été calculée pour permettre de « briser » le cycle de multiplication de ces parasites.

Traitements à réaliser en fonction de l'état des animaux :

Pour optimiser l'élimination de tous les types d'ectoparasites (Copépodes, Ciliés, Monogènes), une dessalure suivie d'un traitement par le formol peut être appliquée (Figure 15). Lors de chaque traitement, une fiche de traitement est établie (Annexe 2). Cette fiche indique le lot de poisson à traiter et explique le traitement (produits médicamenteux, dose, durée du traitement et la méthode de traitement : balnéation...). Un suivi journalier détaillé (comportement évolution des plaies...) des animaux traités est réalisé pour observer l'efficacité des traitements.

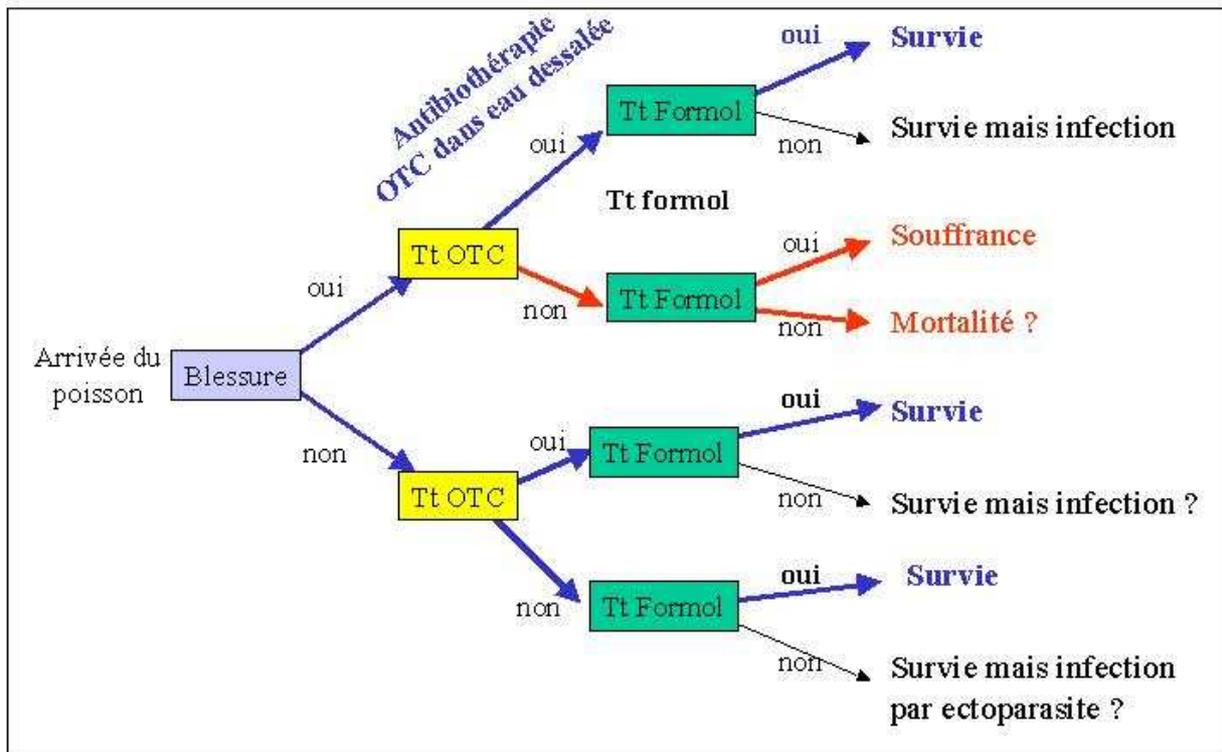


Figure 15 : Schéma décisionnel de la stratégie de traitement des poissons à adapter selon leur état sanitaire à leur entrée en zone de quarantaine

En cas de plaies importantes occasionnées lors de la pêche ou du transport, les poissons blessés subissent un traitement antibiotique à l'OTC sur une durée de 7 jours (bain statique 1h à 100 ppm). Ce traitement est combinée avec la dessalure. De la Bétadine® en gel est également appliquée sur les plaies à chaque manipulation. Lorsque les plaies sont cicatrisées, les poissons sont traités au formol (bains statiques de 1h à 200 ppm) pendant 5 jours.

L'efficacité de ces traitements successifs est vérifiée par l'observation des animaux à l'issue de la période de traitement. Le traitement par le formol pourra être prolongé de 3 jours, si des parasites sont toujours observés sur le corps, les yeux ou les branchies. La concentration peut être augmentée jusqu'à 250 ppm.

Lorsque le faible nombre d'animaux le permet, ces traitements par bains statiques (OTC, Formol) devront être réalisés dans des bacs de volume réduit (200 l). Dans ce cas, les animaux seront pêchés à l'épuisette après vidange du bassin de maturation et transférés le temps du traitement dans un bac de 200 litres. Dans le cas des traitements au formol, le bassin de maturation sera complètement vidé, nettoyé. Dans la mesure du possible (disponibilité des bassins), les animaux seront passés dans un bac propre tous les jours après le traitement.

Gestion de la salle de quarantaine

Les arrivées successives et, souvent, par petit nombre de poissons sauvages, impliquent de regrouper les poissons car le nombre de bacs est rapidement insuffisant. Ce

regroupement d'individus de différents lots n'est toutefois possible que lorsque tous les traitements préventifs et/ou curatifs sont réalisés. Le regroupement pourra alors se faire en deux bassins, un pour les poissons dont le prélèvement des gamètes pour le dépistage du *Nodavirus* est possible et le deuxième pour les animaux en attente de prélèvement (animaux non matures).

Transfert des poissons vers la zone maturation

A l'issue des résultats du dépistage du *Nodavirus*, les poissons diagnostiqués négatifs pourront intégrer un bassin de la salle de maturation et participer à la constitution ou reconstitution des lots de géniteurs expérimentaux. Les animaux diagnostiqués positifs seront sacrifiés.

La durée de maintien des animaux en zone de quarantaine est dépendante de la durée des traitements curatifs et/ou préventifs mais également liée à la possibilité de prélever ou non les gamètes.

5.2.2.2. Prophylaxie quotidienne

Après désinfection des mains et des chaussures, le responsable de chaque salle réalisent le(s) traitement(s). Ces traitement sont réalisés avant le nourrissage des poissons. C'est l'occasion d'observer leur comportement et évaluer leur état sanitaire (évolution des blessures...). Les paramètres environnementaux (température et débit d'eau) sont mesurés pour chaque bassin à leur sortie. Il s'ensuit la purge des bassins. Toutes ces données sont retranscrites sur des fiches de suivi.

5.2.3. Les propositions d'améliorations

Suite à des mortalités consécutives à un transport (7 à 8h de voyage), il serait nécessaire de permettre aux poissons de se réoxygéner dans un bac (200 l) d'eau de mer bullée avec de l'oxygène. Cette phase permettra d'évaluer l'état sanitaire des poissons ainsi arrivés et de décider des traitements les plus adéquats pour leur rétablissement.

5.3. Salle de maturation

Cette salle regroupe les lots de géniteurs (reproducteurs) qui constituent la base du programme de recherche sur les espèces lagunaires. En effet, c'est à partir de leurs œufs que les élevages larvaires sont lancés. Il est donc primordial de leur accorder une attention toute particulière.

5.3.1. Le plan de la salle

L'entrée de cette salle est équipée d'un pédiluve et d'un distributeur de produit désinfectant pour les mains (MED +) (cf.5.1.6). La salle est isolée physiquement des autres salles par des murs et des bâches en polystyrène noir, opaque (Figure 16).

Cette salle est composée de 8 bassins cylindriques de 7m³ de couleur noire et 4 bacs récolteurs d'œufs (180 l).

Chaque bassin est équipé d'une colonne de dégazage qui traite l'eau (de mer et douce) avant distribution et d'un système d'aération. L'évacuation de l'eau se fait par « surverse »

latérale et une vidange centrale. Les systèmes de purge sont sécurisés pour éviter la vidange totale du bassin du bassin.

Chaque bassin possède du matériel spécifique : une épaisseur, un balais, un seau (10 l).

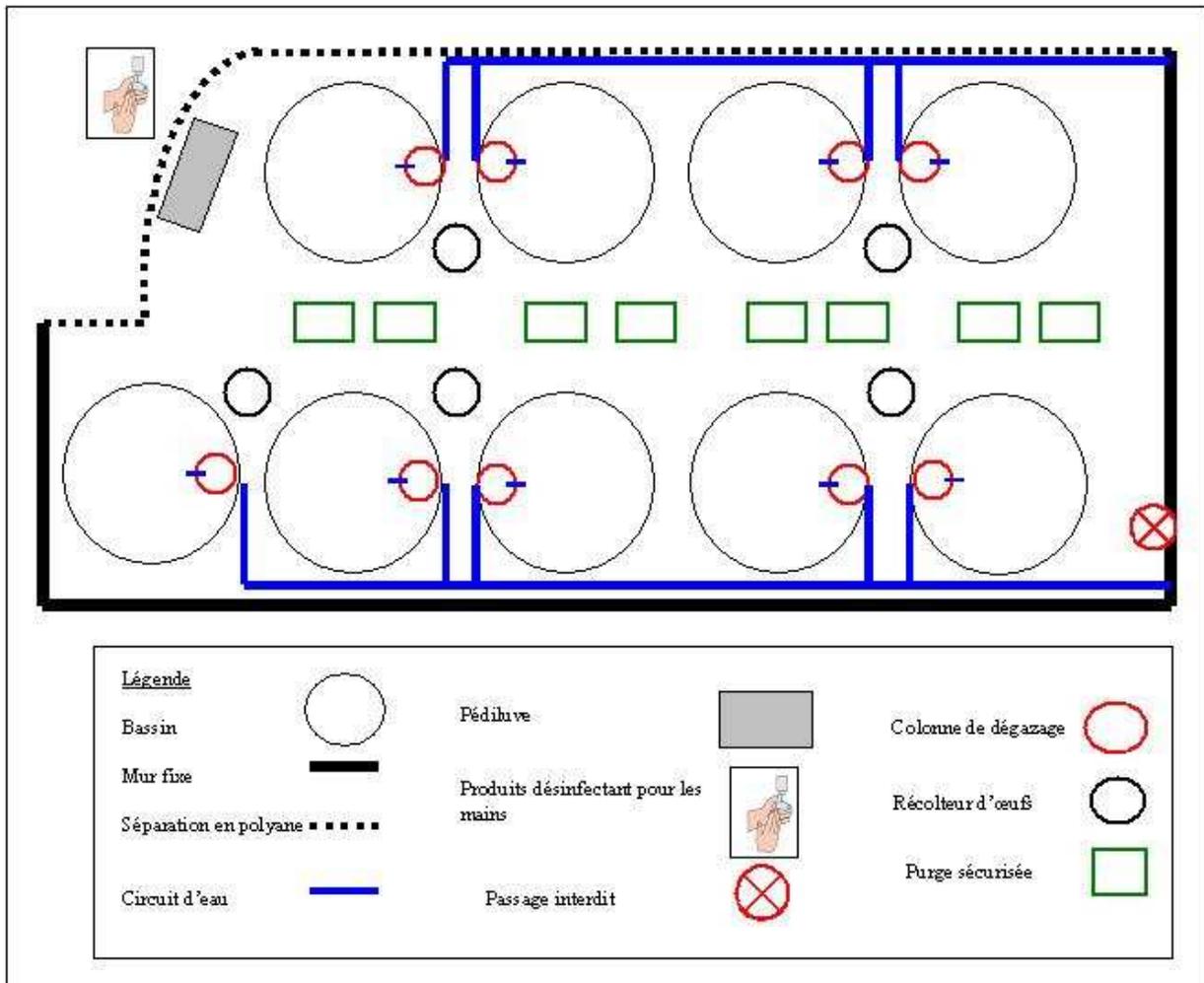


Figure 16 : Plan la salle de maturation

5.3.2. La prophylaxie actuelle

➤ Au quotidien :

Après désinfection des mains et des chaussures, le responsable observe le comportement et l'état sanitaire de chaque poisson. Différents paramètres essentiels sont mesurés : la température dans le bac collecteur d'œufs, le débit d'eau au niveau du trop plein d'eau et la salinité.

Au début de la journée, une purge d'au moins 40 cm de hauteur d'eau est effectuée. Cette action permet de laisser le temps aux poissons pour manger le granulé flottant.

Après le nourrissage, une autre purge est réalisée pour éliminer les granulés non consommés restant au fond du bassin. En effet, une présence trop importante d'aliments résiduels dans le bac peut entraîner la dégradation de la qualité de l'eau et favoriser la propagation bactérienne.

Le bac récolteur d'œuf et le panier sont nettoyés à l'eau douce.

➤ De manière hebdomadaire

Tous les lundis, un nettoyage au balai est effectué dans chaque bassin en eau afin d'évacuer l'accumulation des MES. Tous les jeudis, les paniers et les récolteurs d'œufs sont chlorés.

➤ De manière bi-mensuelle

Un traitement préventif contre les ectoparasites est réalisé par dessalure sur les lots de géniteurs. Les poissons sont pêchés, un par un, et subissent un premier bain d'eau douce pure dans une poubelle de 80 litres. Le poisson reste 5 min dans le bain statique d'eau douce avant d'être replacé dans un nouveau bac rempli d'eau de mer. Ce traitement permet d'éliminer en particulier les *Neobenedenia* adultes présents sur le corps du poisson (yeux, tête). Cette étape permet aussi de calmer le poisson et d'en profiter pour rechercher la présence de blessures éventuelles sur le corps, de parasites sur les yeux ou sur les lames branchiales. En cas de blessure, de la bétadine est appliquée sur les plaies. Une fois que tous les géniteurs ont été inspectés, la salinité de l'eau est diminuée progressivement de 35 ‰ à 15 ‰ en 4-5 jours. Un contrôle quotidien de la salinité est effectué avec un réfractomètre.

En phase de dessalure, l'appétence des poissons est diminuée. La ration quotidienne est alors ajustée.

Au 4^{ème} jour de dessalure, le nouveau bassin est préparé. Une solution d'eau de javel à 5 % est pulvérisée dans le bassin et sur le filet de protection. Cette solution agit quelques minutes avant le rinçage à l'eau douce. Le bassin est rempli avec de l'eau de mer et le bulleur et le filet de protection sont installés.

Une fois les 5 jours de dessalure effectués les poissons sont placés dans le nouveau bassin propre rempli. L'ancien bassin est vidé et nettoyé comme le nouveau bassin.

➤ De manière annuelle

Une fois par an, le dépistage du *Nodavirus* est effectué sur tous les géniteurs de la zone de maturation afin de confirmer l'absence du virus. Cette mesure est une vérification en plus du traitement de l'eau de mer aux rayons UV.

5.3.3. Les propositions d'améliorations

Il est important que l'agent responsable de la salle observe le comportement des poissons au quotidien. Ainsi en observant les poissons en dehors de problèmes pathologiques on peut déterminer un « état normal ». Il est alors plus facile de détecter un changement d'état lié à différents problèmes (maladie). Actuellement, cet « état normal » n'a pas été défini par des critères quantifiables comme l'agitation dans le bac, coloration des poissons

Actuellement, seuls la température et le débit d'eau du bassin sont mesurés comme paramètres environnementaux. Le pourcentage de saturation en oxygène devrait être rajouté.

Un suivi plus régulier des autres paramètres environnementaux essentiels devrait être mis en place tels que les taux de nitrates, les nitrites, l'ammoniac.

5.4. Salle d'élevage larvaire

La structure d'élevage a été réorganisée fin 2006 afin d'optimiser les résultats de survie et d'inflation de la vessie natatoire chez le *P. orbicularis*.

5.4.1. Le plan de la salle

L'entrée de cette salle est équipée d'un pédiluve et d'un distributeur de produit désinfectant pour les mains (MED +) (cf.5.1.6.1 et 5.1.6.2) . La salle est isolée physiquement des autres salles par des murs. Elle est équipée de 8 bassins d'un volume utile de 250 l, cylindro-coniques, de couleur noire avec une évacuation latérale équipée d'une crépine (Figure 17).

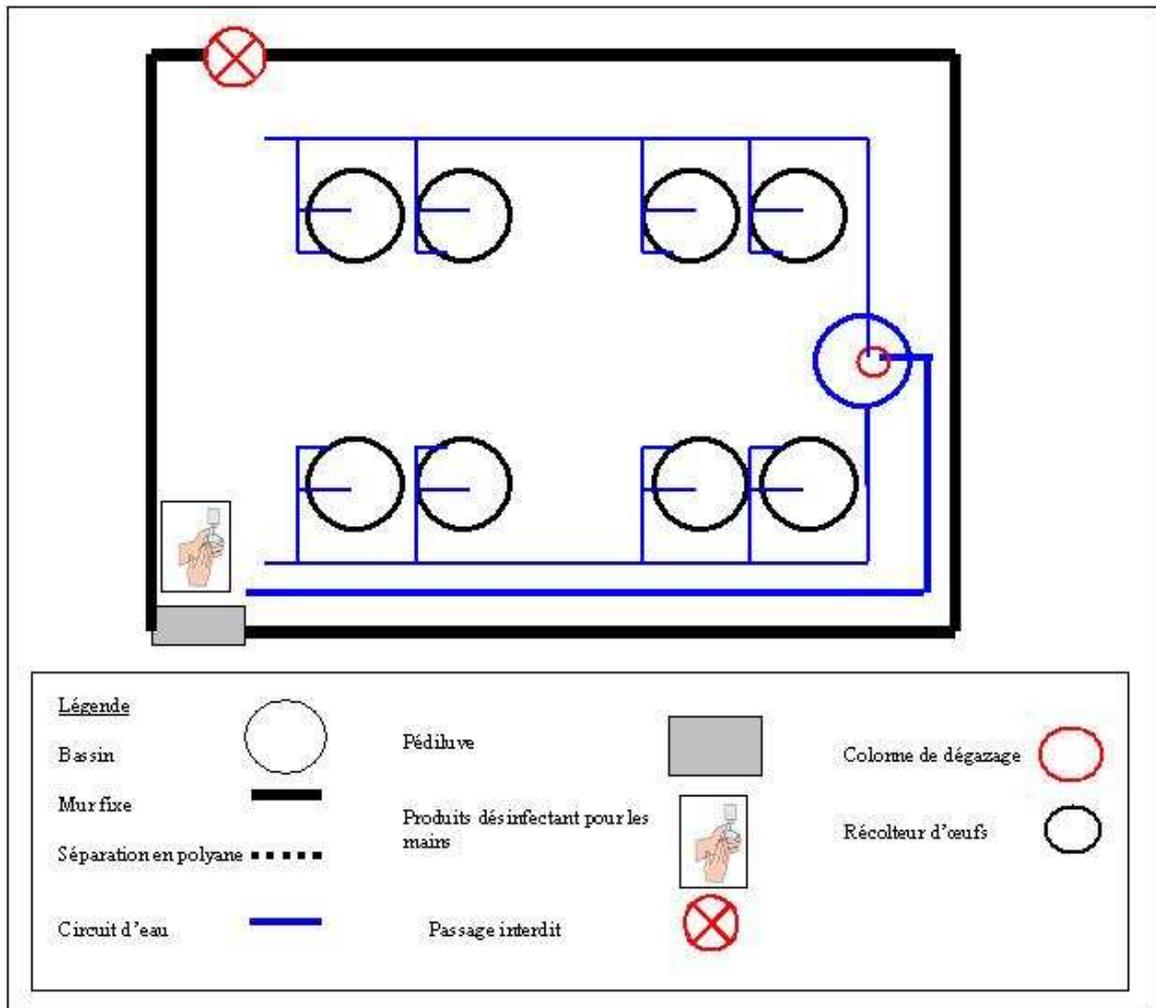


Figure 17 : Plan de la salle larvaire

5.4.2. La prophylaxie actuelle

L'air utilisé est filtré sur une cartouche de 1 µm.

Du fait des particularités de cette étape de l'élevage, les tâches de nettoyage quotidiennes sont adaptées. A cause de l'utilisation de proies vivantes, la surface de l'eau de chaque bassin est nettoyée en continu par un « écrémeur » qui collecte le film gras. L'écrémeur est utilisé dès le 2^{ème} jour d'élevage et ce jusqu'à la fin de cette phase (J 0 à J 20). Le nettoyage de ce dispositif (crépines) est réalisé tous les jours et jusqu'à 4 fois, par jour, pendant la phase d'inflation de la vessie natatoire. Le siphonnage des bassins est une étape délicate à cause de la petite taille des larves dans les premiers jours. Entre J 4 et J 11, il est fait tous les deux jours.

Au niveau sanitaire, un suivi de la présence du *Nodavirus* est effectué de la ponte jusqu'au 30^{ème} jour après la ponte. Des larves sont prélevées le jour de la ponte, à J 3, J 8, J 15, J 21 et J 30. Ces dates de prélèvements peuvent varier pour coïncider avec les autres types de prélèvements (mesures biométriques par exemple).

5.5. Salle de sevrage – nurserie

Lors de cette phase, les larves seront sevrées, en passant d'une alimentation basée sur des proies vivantes à de l'aliment inerté.

5.5.1. Le plan de la salle

L'entrée de cette salle est équipée d'un pédiluve et d'un distributeur de produit désinfectant pour les mains (MED +) (cf.5.1.6.1 et 5.1.6.2). La salle est isolée physiquement des autres salles par des murs et des bâches en polystyrène noir, opaque. Elle est composée de 6 bassins d'un volume utile de 400 l, cylindro-coniques, de couleur noire avec une évacuation centrale équipée d'une crépine. Chaque bassin est équipé d'une colonne de dégazage qui traite l'eau (de mer et douce) avant qu'elle soit distribuée au bassin et d'un système d'aération. L'évacuation de l'eau se fait par une surverse et une vidange centrale. Les systèmes de purge ont été sécurisés afin d'empêcher la vidange totale du bassin (Figure 18).

Chaque bassin possède du matériel spécifique : une épuisette, un balais, un seau (10 l).

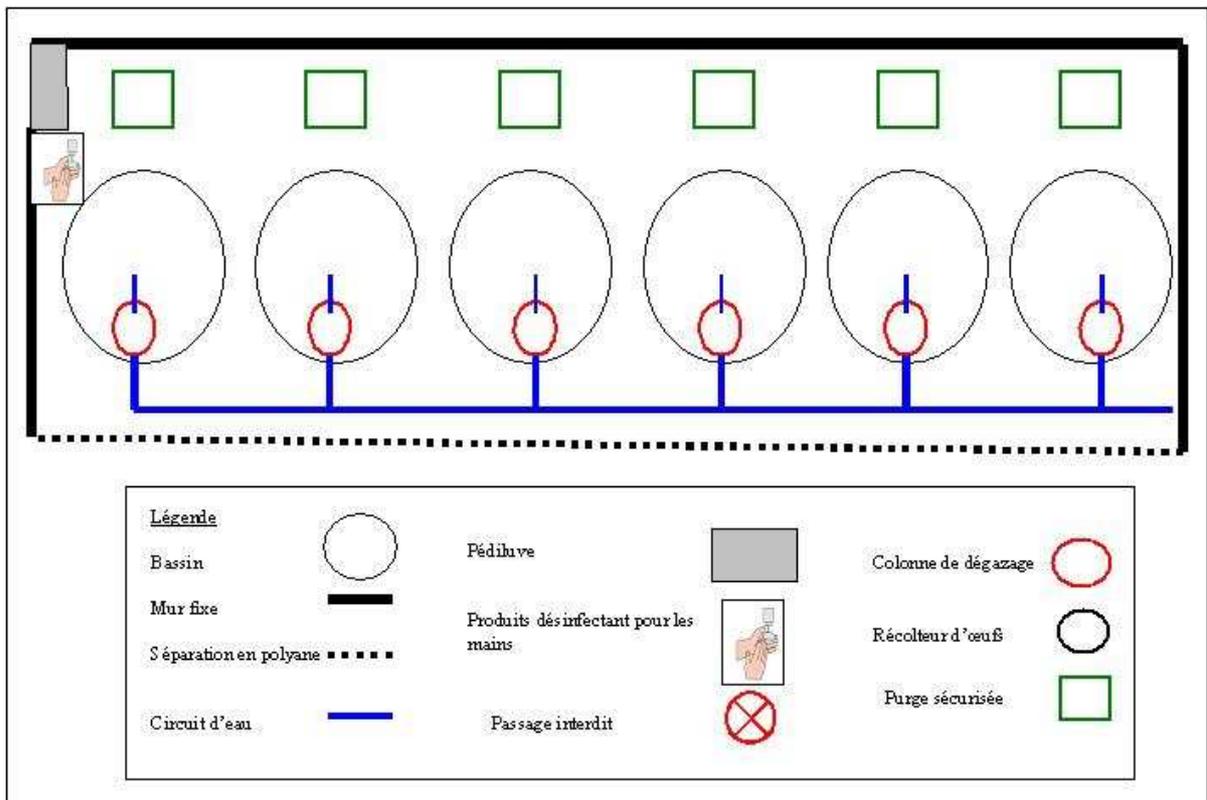


Figure 18 : plan de la salle de sevrage nurserie

5.5.2. La prophylaxie actuelle

Lors de cette phase les poissons seront sevrés par un passage progressif d'une alimentation vivante à une alimentation inerté. Un film gras est toujours présent, donc l'écumeur est toujours de rigueur, son nettoyage est quotidien. La fréquence de nettoyage est fonction de l'état de salissure du bassin, la plus part du temps deux fois par jour. Une purge

quotidienne est effectuée pour éliminer les déchets (aliments non-consommés ou fèces). Les parois du bassin et la crépine centrale (intérieure) sont nettoyées par la même occasion avec une éponge (pour retirer le film gras qui s'y est déposé).

Avant de déposer la dose d'aliments sur le tapis du distributeur automatique, ce dernier est nettoyé au pinceau pour éliminer les résidus d'aliments.

En début et en fin de journée, les paramètres physiques essentiels sont mesurés : la saturation en oxygène et la température. Ces mesures permettent de réajuster le débit de l'eau afin d'éviter que les animaux ne souffrent d'un manque d'oxygène.

5.6. Zone de grossissement en cage flottante

La phase de grossissement est réalisée en milieu lagunaire. Elle consiste en l'engraissement des poissons après leur sevrage.

5.6.1. Plan des installations

Cette phase d'élevage est réalisée en milieu non protégé dans le lagon. Trois modules sont actuellement disponibles. Chaque module peut accueillir 2 cages de 30 m³ ou 4 cages de 15m³. Il est équipé d'un filet de protection qui prévient de l'attaque des prédateurs marins. Des ombrières sont également installées pour protéger les élevages du soleil.

5.6.2. La prophylaxie actuelle

Au quotidien

A l'arrivée sur les cages, le responsable observe l'état général des animaux et réalise un premier nourrissage manuel. Il effectue Des mesures des paramètres environnementaux comme la température et la saturation en oxygène.

Le nourrissage est automatisé par l'utilisation de distributeurs automatiques (tapis). Une fois le distributeur nettoyé, la dose d'aliment est répartie le long du tapis et le distributeur est enclenché (la distribution dure environ 4h).

Tous les jours les poissons morts et/ou moribonds sont retirés de la cage à l'aide d'une épuisette. Les individus morts sont comptabilisés.

Toutes les observations sont notées sur les fiches d'élevage.

De manière périodique

Rapidement après l'installation des cages et des filets en mer, les algues et les coraux (biosalissures) colonisent les mailles du filet immergées. Cette colonisation réduit le passage du flux d'eau dans la cage. Lorsque les biosalissures obstruent les mailles du filet, ce dernier est remplacé par un filet propre. Cette opération est délicate et stressante pour les poissons.

Une fois le filet chargé en biosalissures il est sorti de la zone d'élevage et suspendu par les quatre coins pour être nettoyé à l'eau douce par jet à haute pression. Une fois les biosalissures éliminées, il est séché à l'air libre. Il est ensuite plié et rangé dans un fût à l'abri de la lumière, de l'humidité et des animaux nuisibles.

Lors des échantillonnages, le volume de la cage est réduit (remontant une partie du filet) pour concentrer les poissons et pouvoir effectuer un prélèvement homogène. Les poissons sont alors placés dans des poubelles de 80 litres contenant de l'eau de mer et oxygénée (par bullage d'oxygène pur). Pendant le transport les poubelles sont fermées. Une fois à terre, les poissons sont anesthésiés avec du MS 222 à 50 ppm. Après les mesures de poids et taille, les poissons sont réveillés dans une poubelle contenant de l'eau de mer oxygénée (oxygène pur). Une fois que tous les poissons sont rétablis et nagent correctement, ils sont ramenés dans leur structure d'élevage d'origine.

6. Discussion – Conclusion

Cette convention a permis à l'agent du SPE de se former dans un premier temps aux techniques d'analyse d'histologie, de bactériologie et de biologie moléculaire en accédant à la plate forme technologique du centre Ifremer de Tahiti et en bénéficiant de l'expertise technique du Laboratoire Biotechnologie et Qualité de la Perle (Convention SPE-Ifremer n°6.0034). Le choix de la technique d'analyse est important car il détermine l'efficacité et la justesse du diagnostic porté. D'autre part, pour orienter le diagnostic, il est primordial d'observer les symptômes et/ou les lésions présentes sur les poissons. Cela présuppose une connaissance des comportements et des conditions d'élevage des poissons. C'est pourquoi cette formation technique a été complétée non seulement par une formation théorique de détection et d'identification des principaux organismes pathogènes et/ou opportunistes mais aussi par une formation zootechnique. Seule la combinaison de ces connaissances permettra à l'agent du SPE d'acquérir l'autonomie suffisante pour effectuer une surveillance sanitaire efficace.

Selon l'hypothèse infectieuse émise, les techniques de détection ne seront pas identiques. Chaque technique possède des spécificités quant aux méthodes de prélèvements et aux méthodes d'analyses. Enfin chacune de ces techniques permet l'identification d'une catégorie différente d'agents pathogènes : elles sont complémentaires les unes des autres.

Sans mortalité, l'état frais est la première technique utilisée. Un frottis de l'épithélium et/ou de l'organe lésé est effectué et observé directement au microscope photonique pour rechercher la présence éventuelle de parasites. L'identification des parasites se fait par comparaison morphologique. Parallèlement, des prélèvements de l'épithélium et des plaies peuvent être effectués pour un étalement sur milieu de culture en bactériologie. Deux milieux sont utilisés actuellement, l'un non sélectif (Marine Agar) et l'autre sélectif (TCBS) pour les bactéries du genre *Vibrio*. L'identification des souches bactériennes peut être phénotypique et est réalisée par des techniques biochimiques ou génotypique et est réalisée par des techniques de biologie moléculaire.

En cas de mortalité, les états frais et les techniques de bactériologie sont complétées par l'histologie. Après dissection et observation des caractéristiques de chaque organe, des prélèvements de tissus sont réalisés. L'analyse des tissus permet de détecter les anomalies présentes (parasites, kystes...). Une lamothèque des tissus sains et parasités des deux espèces de poissons lagunaires a été créée. Elle constitue, pour la première fois, un référentiel pour l'ensemble des anomalies tissulaires observées chez ces deux espèces.

Les diagnostics effectués au cours de cette formation ont porté essentiellement sur les épisodes de mortalités qui survenaient au cours des élevages de *P. orbicularis* et *P. sexfilis* du SPE au COP. La mise à disposition par le SPE d'un agent affecté au programme de recherche sur la prophylaxie des poissons lagunaires a permis d'augmenter considérablement l'effort analytique. Ainsi une quarantaine d'expertises ont été réalisées durant cette convention. Elles ont permis d'observer, comme les années précédentes, des bactérioses, des parasitoses et une virose.

Divers organismes ont été diagnostiqués en 2006, principalement des ectoparasites et des infections bactériennes secondaires. Ces infestations sont souvent présentes au sein des élevages piscicoles. Elles sont généralement associées à des mauvaises qualités d'eau et des conditions d'élevage « stressantes » (manipulations à répétition, densité élevée, qualité et quantité des aliments...). Ces problèmes récurrents peuvent être limités par de bonnes pratiques zootechniques. La limitation du stress, par exemple, réduit considérablement les risques de prolifération des parasites. Un effort particulier a été réalisé pour développer la prévention. Ainsi, l'hygiène des élevages a été considérablement améliorée en affectant à chaque salle un personnel responsable, en mettant en place un système de séparation physique des installations, en installant dans les salles d'élevage des pédiluves, en mettant à disposition du personnel des produits désinfectants... Il est important de rappeler que ces mesures ne sont efficaces que si elles sont réalisées au quotidien en prenant conscience de leur rôle et nécessité. Elles ont été complétées par un dispositif de filtration et de stérilisation de l'eau de mer aux UV. Ces traitements permettent d'éviter ou de limiter la contamination des élevages par les organismes présents dans l'eau de mer. Il faut noter l'absence, en 2006, de mortalités dues au *Nodavirus* dans les élevages larvaires de *P. orbicularis*. Cette absence d'infection virale peut être directement associée aux efforts réalisés depuis 2005 pour biosécuriser les élevages. Ces résultats encourageants devront toutefois être validés sur plusieurs prélèvements et années.

La biosécurisation des élevages est basée sur la recherche d'une séquence spécifique de l'ADN viral dans les produits génitaux des géniteurs (mâles et femelles) par PCR quantitative. Cette recherche n'est toutefois possible que si les individus sont matures. Les produits génitaux sont prélevés par pression simple abdominale ou par cannulation. Les géniteurs sont essentiellement des poissons sauvages issus du milieu naturel. Cette source d'approvisionnement n'est pas satisfaisante pour plusieurs raisons : délais d'adaptation plus long des poissons sauvages aux conditions d'élevage en milieu confiné et hétérogénéité de l'âge, de la qualité et de l'état sanitaire des poissons prélevés. Il en résulte un nombre important de prise de poissons jeunes « non matures ». Près de 30 % des poissons étaient immatures à leur arrivée au COP. La détection du *Nodavirus* est alors impossible et doit souvent être différée.

Nous souhaiterions optimiser la technique de biosécurisation en choisissant d'autres tissus cibles pour rechercher la présence du *Nodavirus* (nageoires, sang...). Ce projet est

inscrit dans une demande de financement au Ministère de l'Outre-Mer. Il s'agit d'un projet transversal fédérant différents laboratoires (Martinique, Réunion, Tahiti, et Palavas-les-flots). L'objectif est de développer un test de dépistage des différents génotypes de *Nodavirus* affectant les espèces élevées (Ombrine, Bar, Paraha peue et Mo'i). De plus, pour limiter l'approvisionnement en géniteurs sauvages une nouvelle stratégie a été choisie. Un pool de poissons issus des élevages larvaires sera élevé en milieu protégé (zone biosécurisée) jusqu'à leur maturité sexuelle. Ce pool sera la source principale de géniteurs. Cette démarche enclenchera le processus de domestication du Paraha peue par la mise en place d'une sélection raisonnée.

Enfin des fiches de prélèvements ont été définies pour conserver les données relatives aux épisodes de mortalités (pourcentage de mortalité, présence ou non de lésions, diagnostics, traitements...). Une base de données qui regroupe les informations d'élevage ainsi que ces données sanitaires devrait être mise en place par l'équipe zootechnique SPE-Ifremer. Elle permettra d'améliorer la traçabilité des élevages et de conserver un bon historique des pathologies.

Un relevé mensuel des expertises (diagnostic, traitements éventuels, épisodes de mortalités) est réalisé et présenté à l'ensemble de l'équipe zootechnique SPE-Ifremer. Cette démarche permet de coordonner les différentes interventions pour tenter de résoudre efficacement les problèmes rencontrés.

7. Bibliographie

Boxaspen K (2006) A review of the biology and genetics of sea lice. *ICES Journal of Marine Science* 63: 1304-1316

Breuil G., Pepin J.F.P., Boscher S. and Thiery R. (2002) Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* 25 : 697-702.

Chi S.C, Lo B.J and Lin S.C (2001) Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases* 24 : 3-13.

Cochennec-Laureau N., Saulnier D., Nedelec G., Belliard C., Levy P., Vonau V., Moppert X., Espiau B. & Remoissenet G. (2005) Contribution à l'étude épidémiologique de l'agent pathogène responsable de l'encéphalopathie et rétinopathie virale des poissons : Mise au point d'outils moléculaires de détection et définition du statut d'infection des géniteurs de *Platax orbicularis* et *Polydactilus sexfilis* en élevage. Rapport final de l'appel à Projet du Ministère de l'Outre Mer n°02T 11/1 (26 mars 2003 – 26 mars 2005).

Costello M.J (2006) Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *TRENDS in Parasitology* 22. 10: 475-483

Delsert C., Morin N. and Comps M. (1997) A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Arch. Virology* 142 : 2359-2371.

Diggles B. K, Lester R.J.G (1996) Infections of *Cryptocaryon irritans* on wild fish from southeast Queensland, Australia. *Diseases of aquatic organisms*, 25: 159-167.

Fédération française d'aquaculture (FFA) & Union nationale de prévention sanitaire aquacole (UNPSA), (2004) Guide des bonnes pratiques sanitaires en élevage piscicole.

Fuchs J., Nedelec G., Gasset E. and AQUACOP (1989) Selection of finfish species as candidates for aquaculture in French Polynesia. *Advances in Tropical Aquaculture*. Tahiti, Feb. 20 – March 4. 461-484.

Gasset E., Tamata T., Teissier A., Maamaatuaiahutapu M., David R., Joufoques V., Nedelec G. (2007) Protocole d'élevage larvaire du platax orbicularis cycle 2007-01.

Kinkelin P., Michel C., Ghittino P. (1985) Précis de pathologie des poissons. OIE & INRA. 348 pp.

OIE (2006) Manual of diagnostic tests for aquatic animals, fifth edition

Le Marechal B. & Remoissenet G. (2001) Sélection de nouvelles espèces pour l'aquaculture en Polynésie française, Bilan des recherches bibliographiques. Rapport interne au SPE : 28 pp.

Le Marechal B. (2002) Bilan de la première année du programme de pisciculture de poissons lagunaires. Rapport final de la convention N°020505 entre le Territoire-SPE et B. Le Marechal : 47 pp + 15 annexes.

Mazelet L. (2005) Etude de la transmission horizontale et verticale du Betanodavirus chez le Bar *Dicentrarchus labrax*. 21 pp + 5 annexes.

Meunier E. (2002) Etude de la Cryptocaryose (*Cryptocaryon irritans*) chez les poissons marins- Essais de vaccination hétérologue avec *Tetrahymena pyriformis*. Thèse doctorale vétérinaire. 81 pp.

Mopert X. (2001) Développement d'un test de diagnostic moléculaire du nodavirus, virus responsable de mortalités en élevage larvaire de loup tropical *Lates calcarifer*. 19 pp.

Noga E (1999) Fish disease Diagnosis and treatment. *Iowa State Press*. 367 pp.

Nagai T. & Nishizawa T. (1999) Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of Virology* 80 : 3019-3022.

Nédélec G. (2003) Maîtrise technique de la production des poissons lagunaires. Rapport final de la convention n°3.0040 entre SPE et l'Ifremer : 56 pp

Nerland A., Skaar C., Eriksen T., Bleie H. (2007) Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hipoglossus hipoglossus* larvae. *Disease of aquatic organisms* 73:201-205.

Nishizawa T., Mori K.I., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms* 18 : 103-107.

Convention n°6.0034 du 16 janvier 2006. Convention relative à la collaboration entre le Service de la Pêche et l'Ifremer pour l'étude de la prophylaxie des poissons lagunaires en élevage.

Remoissenet G., Tchepidjian B., Tamata T., Joufoques V., Cochenec-Laureau N., Nédélec G (2004) Maîtrise technique de la production de poissons lagoanires. Rapport final de la convention n°4.0021 entre SPE et l'Ifremer : 57 pp + 55 annexes.

Renault T., Haffner P., Baudin Laurencin F., Breuil G., and Bonami J.R. (1991) Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Association of Fish Pathology* 11 : 68-73.

Tan C., Huang B., Chang S.F., Ngho G.H., Munday B.L., Chen S.C., Kwang J. (2001) Determination of the complete nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *Journal of General Virology* 82:647-653.

Tanaka S., Mori K.I., Arimoto M., Iwamoto T. & Nakai T. (2001) Protective immunity of seveband grouper, *Epinephelus septempfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of Fish Diseases* 24 : 15-22.

Thiéry R., Cozien J., De Boisseson C., Kerbart-Boscher S., Névarez L. (2004) Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of General Virology* 85:3079-3087.

Revie C., Gettinby G., Treasurer J. & Rae G. (2002) The epidemiology of the sea lice, *Caligus elongatus* Nordmann, in marine aquaculture of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Journal of Fish Disease* 25, 391-399

Roth M., Richards R.H., Sommerville C. (1993) Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infections in aquaculture : a review. *Journal of Fish Disease* 16: 1-26. in Noga E (1999) Fish disease Diagnosis and treatment. *Iowa State Press*. 367 pp.

Skiris G. & Richards R. (1998) Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infection. *Aquaculture* 169:133-141 in Nerland *et al.*, 2007

Yuasa K., Koesharyani I., Roza D., Mori K., Katata M., Nakai T. (2002) Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of betanodavirus. *Journal of Fish Disease* 25:53-56 in Aquavetplan (2004) Disease strategy Viral encephalopathy and retinopathy version 1.0

Annexe 1 : Fiche d'intervention

Fiche d'intervention

N° fiche :
date :
personne :

Espèce :
lot :
élevage :
classe d'âge :

objet intervention :

manip :

Fait marquant :

comportement :
signes macroscopiques :
condition élevage :
date dernière manip :
mortalité :
 estimation
 autre lot atteint
 autre site atteint

alimentation :

Prélèvement :

Résultat :

Etat frais nb individus prélevés
 peau saine
 blessure
 branchie
 autres :

Bactériologie peau saine
 blessure
 branchie
 autres :

Histologie organes :

Biologie moléculaire
 gonade
 nageoire
 sang
 autres :

Conclusion

sacrifice
traitement
prophylaxie

Observations

Annexe 2 : Fiche de traitement pathologique et de suivi quotidien

Fiche de traitement Pathologique

Fiche pathologique objectif

traitement	
dose	
durée	
méthode	

volume bassin	
qté	

début du traitement le v
dernier jour du traitement

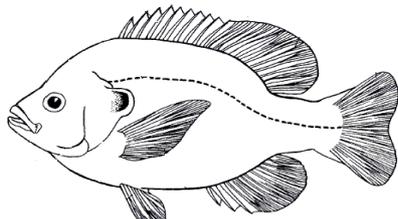
condition d'élevage

débit d'eau mer 10 L/ 15s
débit d'eau douce 0 L/s
débit oxygene L/s
alimentation (moule)
purge quotidienne au moins 40 cm

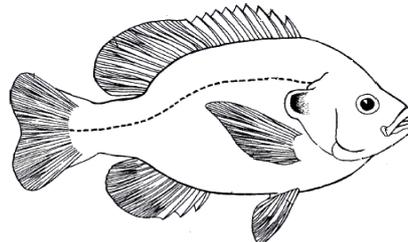
suivi hebdomadaire

pendant et après le traitement

appétance mange pas, peu, pas du tout, recrache, mange tout
comportement nage calmement, nage vite quand on arrive, caché dans le bullage
couleur de la livrée foncée (noire), claire (gris claire)
état des blessures zone : flan, tête, nageoire
couleur : perte écaille, rouge, orange, rose claire
ampleur : entourer sur le poisson
aspect : lisse, apparition d'une croûte, pustules ou sanguinolante



Côté Gauche



Côté Droit

Bilan à la fin du traitement

efficacité

Suivi après le traitement

Fiche de suivi quotidien

suivi quotidien

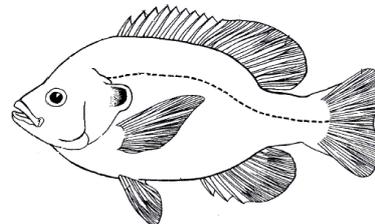
pendant et après le traitement

appétance mange pas, peu, pas du tout, recrache, mange tout
comportement nage calmement, nage vite quand on arrive, caché dans le bullage
couleur de la livrée foncée (noire), claire (gris claire)
état des blessures zone : flan, tête, nageoire
 couleur : perte écaille, rouge, orange, rose claire
 ampleur : réduction ou augmentation
 aspect : lisse, apparition d'une croûte, pustules ou sanguinolante

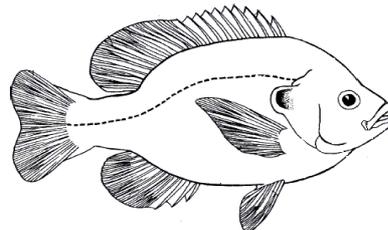
lot de poissons
date
jour
heure traitement

appétance
comportement
couleur de la livrée
état des blessures
couleur :
ampleur :
aspect :

autres observations complémentaires



Côté Gauche



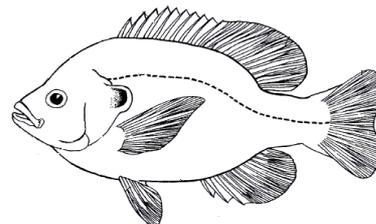
Côté Droit

suivi quotidien

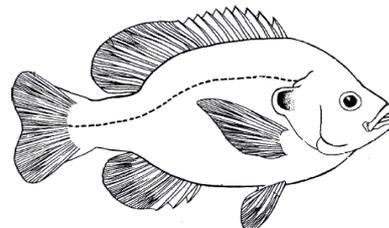
lot de poissons
date
jour
heure traitement

appétance
comportement
couleur de la livrée
état des blessures
couleur :
ampleur :
aspect :

autres observations complémentaires



Côté Gauche



Côté Droit

Liste des figures

Figure 1 : Principe de l'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction). La courbe mauve représente la variation de la température en fonction des cycles de PCR.

Figure 2 : Principe de la PCR en temps réel. A : Courbes expérimentale et théorique du logarithme d'ADN cible en fonction du nombre de cycle de PCR. B : Schéma d'insertion du fluorochrome aspécifique SYBR Green lors d'un cycle de PCR.

Figure 3 : Images obtenues en microscopie optique d'une larve infectée par le *Nodavirus* après coloration à l'hémalum/éosine (A, B). A : notons la présence de nombreuses vacuoles au niveau de l'œil (o) et du cerveau (c)(x200). B : vacuolisation au niveau des tissus rétiniens (x600). C : marquage important au niveau de la présence de l'œil (o) et du cerveau (c) (x200). D : marquage important au niveau de la rétine. La mélanine est signalée par une flèche.

Figure 4 : *Polydactylus sexfilis* atteints de Vibriose. A, B : poissons présentant des hémorragies au niveau de la tête. C : poissons présentant des plaies importantes au niveau des flancs.

Figure 5 : Étalement sur deux milieux de cultures spécifiques au milieu marin : marine agar (MA) non sélectif et sur TCBS (TCBS) sélectif du genre *Vibrio*.

Figure 6 : État frais montrant un copépode du genre *Caligus* (barre = 10 µm)

Figure 7 : Cycle de reproduction du genre *Caligus* sp. (source : TRENDS in Parasitology)

Figure 8 : État frais montrant un parasite adulte du genre *Neobenedenia* sp. (x 200). Les flèches indiquent les crochets qui permettent au parasite de se fixer sur le poisson.

Figure 9 : Photographie d'une lésion de l'œil associée à une infection au *Neobenedenia* sp. chez un *Platax orbicularis* adulte. L'œil présente une hémorragie et une opacification.

Figure 10 : Cycle de reproduction de *Cryptocaryon irritans* (Maunier, 2002)

Figure 11: Observation de points blancs au niveau de la tête d'un *Platax orbicularis* et de kératite

Figure 12: État frais montrant une cellule de *Cryptocaryon sp.* au stade trophonte (x 630)

Figure 13 : Plan de la zone d'élevage

Figure 14 : Plan de la salle de quarantaine

Figure 15 : Schéma décisionnel de la stratégie de traitement

Figure 16 : Plan de la salle de maturation

Figure 17 : Plan de salle larvaire

Figure 18 : Plan de la salle de sevrage-nurserie