

**Rarahu David
Ambre Van Cam
Marie-Estelle Soupé
Nathalie Cochenec-Laureau**

Service de la Pêche, Laboratoire de Biotechnologie et de Qualité de la Perle du centre Ifremer en Polynésie

Décembre 2008

Rapport final de la Convention N° 7.0022 du 23 mai 2007

Relative à la collaboration du Service de la Pêche de Polynésie française et de l'Ifremer dans le cadre de l'opération :

Prophylaxie des poissons lagunaires en élevage



1. Introduction	2
2. Techniques de diagnostic utilisées	4
2.1. État frais	4
2.2. Techniques histologiques	4
2.3. Techniques bactériologiques	4
2.4. Techniques de biologie moléculaire	5
3. Expertises réalisées sur les élevages piscicoles au COP	8
3.1. Rappels	8
3.2. Virus	9
3.3. Bactéries	15
3.4. Éctoparasites	18
4. Prophylaxie	29
4.1. Intrants	29
4.2. Salle de quarantaine	35
4.3. Salle de maturation	38
4.4. Salle d'élevage larvaire	40
4.5. Salle de sevrage – nurserie	40
4.6. Zone de grossissement en cage flottante	41
5. Collaborations	43
5.1. Visite d'un expert japonais	43
5.2. Visite d'experts australiens	43
5.3. Participation au colloque de Nantes	43
5.4. Participation au « 7th symposium on diseases in asian aquaculture » (DAAVII)	44
6. Expertise sur les élevages de crevettes (<i>Litopenaeus stylirostris</i>) de Polynésie française	45
7. Discussion - Conclusion	46
8. Annexes	49
9. Bibliographie	58

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 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 suite à divers problèmes et n'est plus assurée que par une ferme et une écloserie (Aquapac). La Polynésie française a souhaité reconverter sa filière piscicole en la basant sur l'élevage de nouvelles espèces endémiques lagunaires à haute valeur ajoutée. Les deux espèces choisies sont le « moi », *Polydactylus sexfilis* ou tarpon des sables, et le « paraha peue », *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.

A l'horizon 2010, un centre technique aquacole de Vairao verra le jour. Il sera constitué d'une écloserie de crevette et d'une écloserie de Paraha peue. Ces écloséries permettront la mise en place d'une filière aquacole en Polynésie française. Dans l'objectif de pérenniser cette filière il est nécessaire de développer les connaissances et les savoir-faire au niveau diagnostique, prophylactique pour les aquaculteurs. Leur sensibilisation au bien être des animaux est essentiel pour mener à bien les élevages.

Ce rapport de convention comporte cinq 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 au COP. 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 rencontrés lors des expertises durant cette convention. 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 thérapeutique que préventif.

La troisième partie, une description des techniques d'écloserie et d'élevage réalisées au COP est présentée avec un point particulier sur les mesures prophylactiques développées et améliorées. Ces éléments constituent un soutien technique pour la filière aquacole polynésienne.

Une partie est consacrée aux différentes collaborations mise en place dans le domaine de la santé aquacole. Elles ont pour objectif l'acquisition de connaissances au niveau du diagnostic, du traitement et de la prévention des pathologies rencontrées en milieu aquacole. La mise en place de ce réseau international d'experts sera un soutien pour un diagnostic précis et rapide des nouvelles pathologies survenant dans les élevages aquacoles polynésiens.

La dernière partie de ce rapport retrace l'expertise effectuée par le laboratoire de référence de l'OIE sur les élevages de crevettes (*Litopenaeus stylirostris*). Cette analyse permet d'évaluer l'état sanitaire actuel des élevages locaux. Il déterminera les mesures de bioscurisation à mettre en œuvre pour protéger la filière crevetticole.

2. Techniques de diagnostic utilisées

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

2.1. État frais

L'état frais permet rapidement d'observer sous microscope ou loupe binoculaire, sans coloration, un raclage 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.

2.2. 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 mortalité. 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'hématoxyline/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.

2.3. 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 sont ensemencés 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 sur bouillon « 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. §2.4.1).

2.4. Techniques de biologie moléculaire

2.4.1. 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.

2.4.2. 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.3.2.1). 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 porteurs ou non de 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 production 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 phénol-chloroforme (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 transformés 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 se forme. L'élongation s'effectue à 72°C.

Ce cycle est répété 30 fois et est suivi par une dernière étape d'élongation 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 54g ; Acide borique 27,5g ; EDTA (0,5M) 20ml ; Eau distillée qsq 1000 ml) auquel on ajoute du bromure d'éthidium (BET : 0,5µg/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 chargement sur gel, un tampon de dépôt est rajouté aux produits amplifiés (2µl de tampon de dépôt pour 8µl de produits amplifiés). Ce mélange est ensuite déposé sur gel et soumis à un champ électrique sous voltage constant. Le seuil de détection est de quelques 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.

- PCR quantitative en temps réel (qRT-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 présent dans l'échantillon.

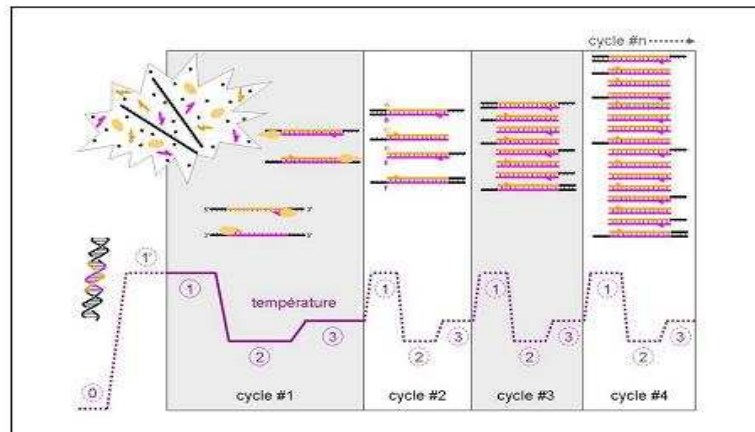


Figure 1 : Principe de l'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction). La courbe mauve représente la variation de la température en fonction des cycles de PCR.

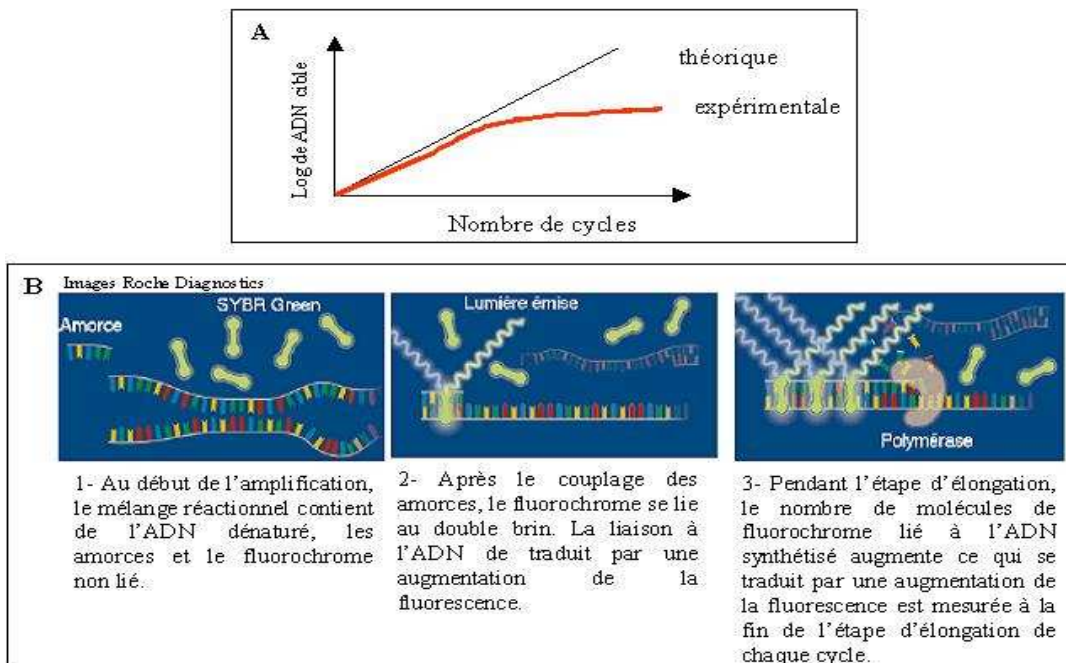


Figure 2 : Principe de la PCR en temps réel. A : Courbes expérimentale et théorique du logarithme d'ADN cible en fonction du nombre de cycle de PCR. B : Schéma d'insertion du fluorochrome aspécifique SYBR Green lors d'un cycle de PCR.

3. Expertises réalisées sur les élevages piscicoles au COP

Entre 2007 et 2008, près d'une centaine d'expertises ont été réalisées. Elles se répartissent comme suit : 29 analyses d'état frais, 30 analyses bactériologiques, 21 analyses histologiques et 21 de biologie moléculaire.

3.1. Rappels

Lorsqu'un poisson est malade, cet état se traduit par des :

- symptômes : anomalies du comportement, diminution de l'appétence, modification de la coloration...
- 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 constituées des propriétés physiques de l'eau : température, concentration en matière en suspension (MES), rayonnement. La température, par exemple, peut être, en fonction des espèces de poisson, 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.

2) Les causes d'ordre chimique sont formées des propriétés et de 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 le résultat du 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).

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. Une fiche de suivi des comportements de chaque élevage a été mise en place (Annexe 1). Différents critères sont suivis quotidiennement, ils nous permettent d'évaluer l'état sanitaire de la population en élevage. Pour faciliter cette enquête, des fiches d'intervention ont été établies afin de décrire au mieux de l'état du poisson (Annexe 2).

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.

3.2. Virus

Au niveau viral, deux types de pathologies ont été rencontrées dans les élevages piscicoles du COP : le virus de la lymphocystose et le Nodavirus responsable de l'encéphalopathie et rétinopathie virale.

3.2.1. Lymphocystose

3.2.1.1. Etiologie

La lymphocystose est une infection très contagieuse causée par un iridovirus à ADN cytoplasmique. La mortalité causée par cet agent pathogène est très limitée. Il provoque une forte morbidité des animaux atteints, et les rend impropre à la commercialisation.

3.2.1.2. Epidémiologie

Cette maladie est connue pour infecter 30 familles de poissons marins, malgré tout la lymphocystose est une maladie hôte-spécifique (Woo, 2006). Cette maladie est certainement causée par un groupe de souches virales différentes.

Cette pathologie n'est pas retrouvée que dans les eaux chaudes mais elle s'étend dans le monde entier dans les eaux marines et d'eaux douces.

La transmission est horizontale ce qui explique la propagation rapide de proche en proche dans les élevages de forte densité. Les mauvaises conditions environnementales favorisent le développement de cette pathologie. En Asie du Sud-est, l'utilisation d'aliment frais, serait une autre source de contamination.

Signes cliniques et lésionnels

Le virus provoque des tumeurs à la surface du poisson. Chez le Paraha peue, les nageoires sont les premiers organes affectés, puis le corps. Au début de l'infection, de petites granulosités sont ressenties au touché sur les zones atteintes. Dans les formes les plus graves, la tumeur prend l'aspect de petit chou fleur.

Diagnostic

Ces signes cliniques permettent d'orienter le diagnostic. La confirmation passe par des analyses histologiques et de biologie moléculaire. Seules les techniques d'histologie et de biologie moléculaire sont développées à l'Ifremer de Tahiti (LBQP).

En histologie, l'analyse de coupes d'organes lésés permet d'observer la présence de cellules anormalement volumineuses. Ce virus est un des rares virus à être identifiable par cette technique. L'observation particulière des virions icosaédral en microscopie électronique permet de confirmer le diagnostic. Pour confirmer le résultat, il est nécessaire de compléter l'histologie par des techniques de biologie moléculaire. Des amorces ont été dessinées pour développer une détection par PCR conventionnelle.

3.2.1.3. Traitement et prévention

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif ou préventif pour cette pathologie. Le retrait de poissons atteints et la diminution de la densité d'élevage sont les seules mesures connues qui peuvent réduire l'impact de cette maladie.

3.2.1.4. Episodes infectieux

Un seul épisode infectieux a été observé dans nos élevages en cage de juvéniles (Fiche d'Intervention N°07-25). Depuis cette identification, certaines formes moins graves ont été rencontrées dans les mêmes types d'élevages : seules quelques granulosités sont décelables au touché. Cette pathologie a sévi que dans les élevages en milieu non contrôlé et soumis aux diverses variations climatologiques.

3.2.2. Encéphalopathie et Rétinopathie Virale

3.2.2.1. 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 de petite taille, entre 25 et 30 nm, de forme icosaédrique, non enveloppé, avec un génome composé de deux simples brins d'ARN orientés dans le sens positif (5'-3'). Le premier segment d'ARN, RNA 1 de 3,1 kpb code pour une enzyme RNA-dépendante RNA polymérase (Chi *et al.* 2001 ; Nagai & Nishizawa, 1999 ; Tan *et al.* 2001).

Le second segment, RNA 2 de 1,4 kpb code pour la protéine de structure de la capsid (Delsert *et al.*, 1997 ; Nishizawa *et al.*, 1994).

3.2.2.2. 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 sauvages de Polynésie ont été diagnostiquées positives : *Acanthurus triostegus*, *Apogon exostigma*. 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. 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 qui 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.

Cette maladie peut se transmettre par voie verticale (des parents aux enfants) 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 baignade 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. (104 TCID /50.ml-1 = 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 des bonnes

pratiques d'élevage et de biosécuriser les élevages, notamment, par la sélection de géniteurs non porteurs de virus.

3.2.2.3. Diagnostic

Signes cliniques et lésionnels

Les larves, déclarant l'ERV, présentent des symptômes nerveux. 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 dont des signes de cécité : 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). 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 3A, 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 (< 1µm). 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) et/ou RT-PCR (cf.2.4.2) (Figure 3 C ,D). En biologie moléculaire nous utilisons depuis 2001 la PCR conventionnelle pour détecter la présence spécifique du *Nodavirus* chez les poissons. Cette technique nous permet seulement de déterminer la présence ou l'absence du virus, mais ne renseigne pas sur le niveau d'infection des animaux. En revanche, la PCR quantitative permet de déterminer la quantité initiale de virus (ADN viral) dans l'échantillon testé, on peut ainsi évaluer le niveau d'infection des

poissons. Cette quantification permet d'établir le seuil minimum nécessaire d'infection pour que la maladie se déclare chez un lot de poissons. La q-PCR affine le diagnostic en confirmant la nature des échantillons positifs. En effet, une courbe de fusion est effectuée sur les produits finaux de la q-PCR. La forme de la courbe et son maximum précise la pureté de l'ADN et sa spécificité (*Nodavirus*). 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 300pb, F3R5 ; Mopert, 2001) ainsi que des amorces dessinées pour la q PCR (TRNODA R et TRNODA F, 200pb ; Mazelet, 2005). Les températures d'hybridations de chaque couple d'amorces ont été déterminées par des gradients de températures.

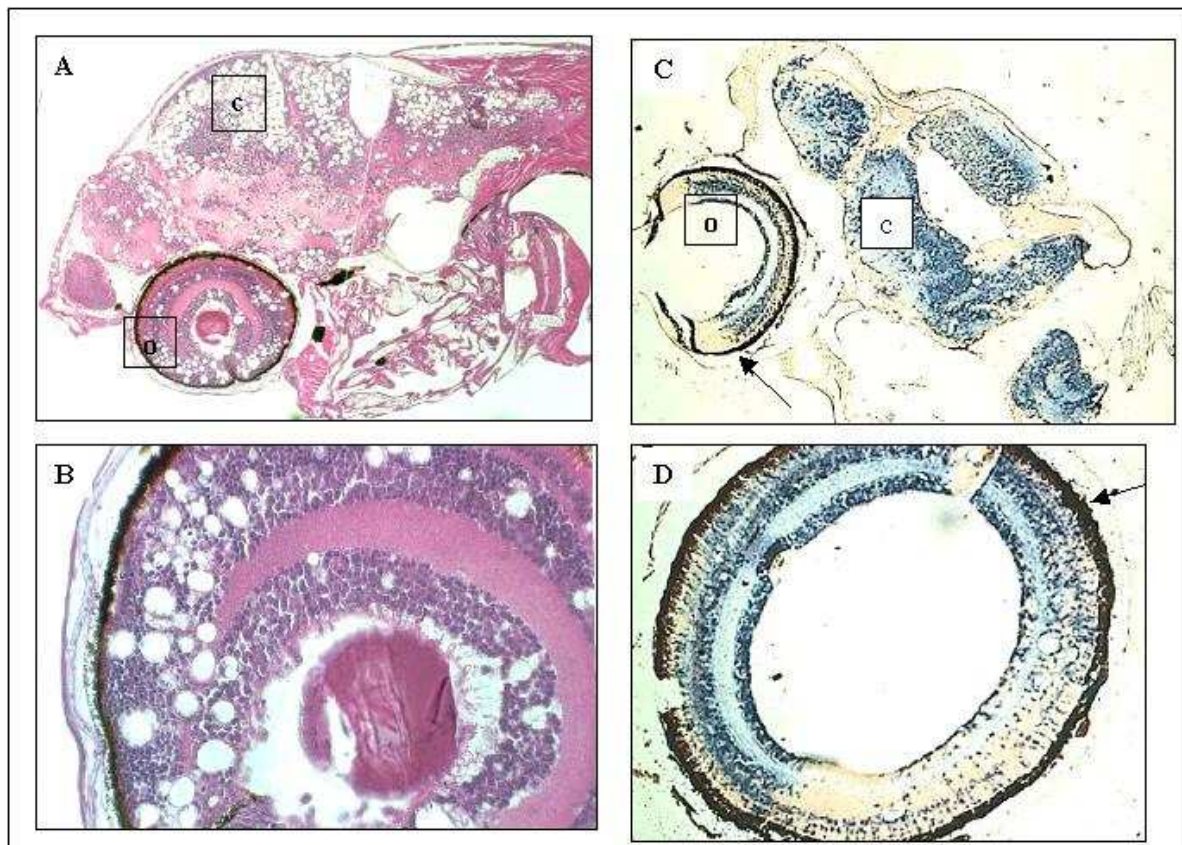


Figure 3 : Comparaison des images obtenues en microscopie optique d'une larve infectée par le *Nodavirus* après coloration à l'hémalum/éosine (A, B) et après hybridation *in situ* (C, D). A : notons la présence de nombreuses vacuoles au niveau de l'œil (o) et du cerveau (c)(x200). B : vacuolisation au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

3.2.2.4. 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'a débuté que récemment et se focalise sur la protéine de la capside

(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 mérours (*Serranidae*) ou le bar, *Dicentrarchus labrax*.

3.2.2.5. 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 qRT-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 J0 à J30) 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).

3.2.2.6. Episodes infectieux

Aucun épisode infectieux n'a été relevé dans les élevages au COP. Mais un suivi annuel est réalisé sur les géniteurs maintenus en milieu contrôlé. De plus chaque poisson est dépisté avant l'entrée en zone de maturation.

Du fait du caractère invasif des prélèvements gonadiques, un projet dénommé TRIDENT pour Triple Détection du *Nodavirus* à été mis en place entre différents centres Ifremer et leurs partenaires (Palavs-les-flots, Tahiti et Martinique). L'objectif est de mettre en place un test de détection peu coût, rapide et spécifique. L'intérêt est aussi de choisir un organe dont le prélèvement n'est pas invasif tel que les nageoires. Durant cette convention des

travaux ont été menés dans le cadre de ce projet. Par la même des améliorations ont été apportées à la technique de détection du Nodavirus par PCR en temps réel.

3.3. 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.

3.3.1. 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.

Systematique du genre *Vibrio*

Règne : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *Vibrionales*

Famille : *Vibrionaceae*

Genre : *Vibrio*

3.3.2. 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 (*Halotis 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*).

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*).

3.3.3. 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 chionchards 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...

Diagnostic

Le diagnostic est posé grâce aux différentes techniques de bactériologie d'identification phénotypique et génotypique (cf. § 2.3 et 2.4.1) (Figure 5).

3.3.4. 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).

3.3.5. 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 piscicoles. L'identification et le traitement des infections primaires sont primordiaux avant tout traitement aux antibiotiques. Cela réduit d'autant l'apparition des bactérioses.

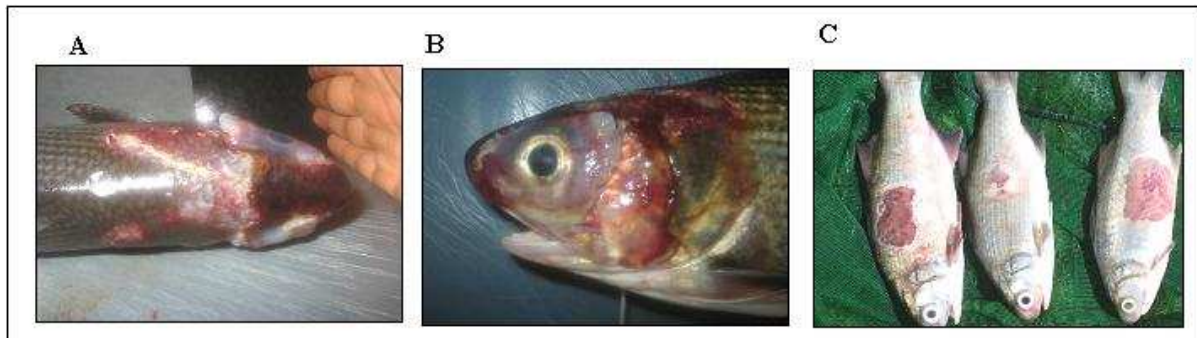


Figure 4 : *Polydactylus sexfilis* atteints de Vibriose. A, B : poissons présentant des hémorragies au niveau de la tête. C : poissons présentant des plaies importantes au niveau des flancs.

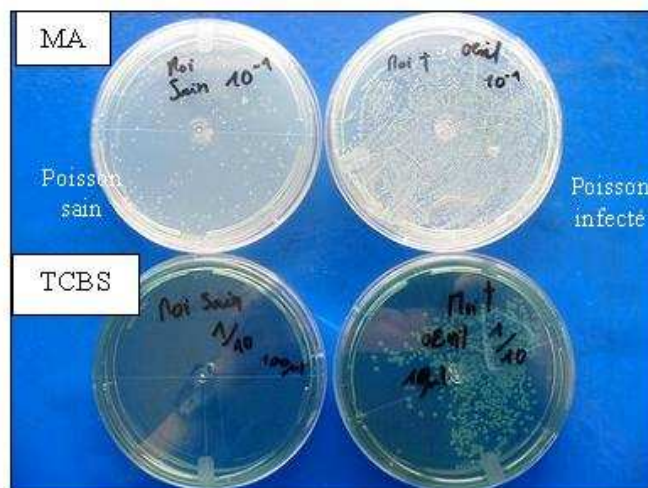


Figure 5 : Étalement sur deux milieux de cultures spécifiques au milieu marin : marine agar (MA) non sélectif et sur TCBS (TCBS) sélectif du genre *Vibrio*.

3.3.6. Episodes infectieux

Sur les 30 analyses bactériennes réalisées en deux ans : 14 ont conduit à des traitements antibiotiques chez les géniteurs (plaies causées lors des manipulations zootechniques), 12 expertises réalisées sur les élevages en cages flottantes ont révélé des infections bactériennes secondaires, et enfin 5 expertises réalisées sur des juvéniles élevés en milieu contrôlé.

3.4. Éctoparasites

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.

Depuis 2007, 29 analyses d'état frais et 21 analyses histologiques ont permis de diagnostiquer les infections ectoparasitaires. La constitution de la lamothèque de références a commencé. Cette référence nous permet d'étudier les tissus sains, et de le comparer avec des tissus lésés.

3.4.1. Infections par le genre *Caligus*

3.4.1.1. Etiologie

L'ectoparasite mis en cause dans cette parasitose est le pou de mer (« sea lice » en anglais) 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.

Systematique du genre *Caligus*

Phylum : *Arthropodia*

Sous Phylum : *Crustacea*

Classe : *Maxillopoda*

Ordre : *Copepoda*

Famille : *Caligidae*

Genre : *Caligus*

3.4.1.2. 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 stade 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 copépodite 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 méchano-recepteurs 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*. *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.

3.4.1.3. Diagnostic

Signes cliniques et lésionnels

Les *Caligus* mobiles sont formés de telle manière 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 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).

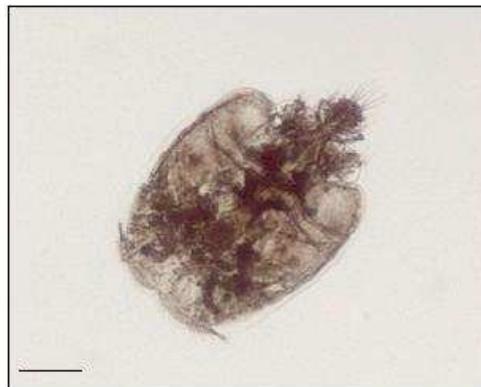


Figure 6 : État frais montrant un copéode du genre *Caligus* sp. (barre = 10µm)

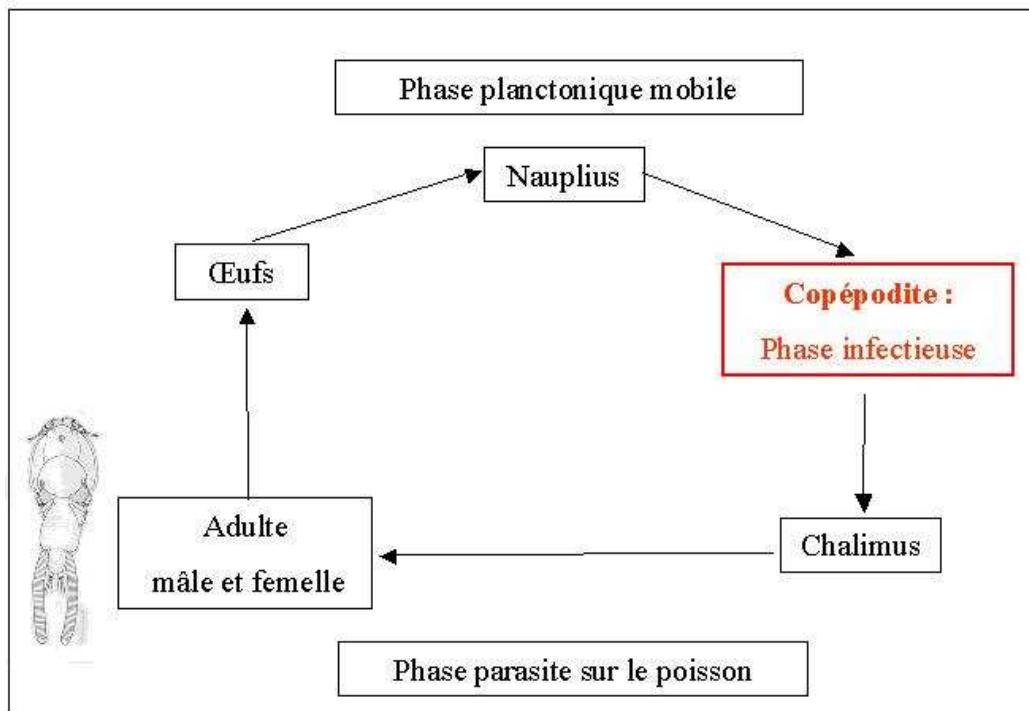


Figure 7 : Cycle de reproduction du genre *Caligus* sp.
(source : TRENDS in Parasitology)

3.4.1.4. 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 du 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.

3.4.1.5. 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).

3.4.1.6. Episodes infectieux

Ces infections parasitaires sont retrouvées chez de futurs géniteurs non domestiqués, sauvages. Un seul épisode infectieux est survenu durant cette période (FI 09#12-18). Les poissons atteints provenaient d'une ferme de pisciculture de Bora Bora.

3.4.2. Infections aux Monogènes

3.4.2.1. Etiologie

Le genre *Neobenedenia* appartient à l'Embranchement des Plathelminthes et à la Classe des Monogènes. Ces animaux sont des ectoparasites qui possèdent un système de fixation lui 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*

3.4.2.2. 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.

3.4.2.3. 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.

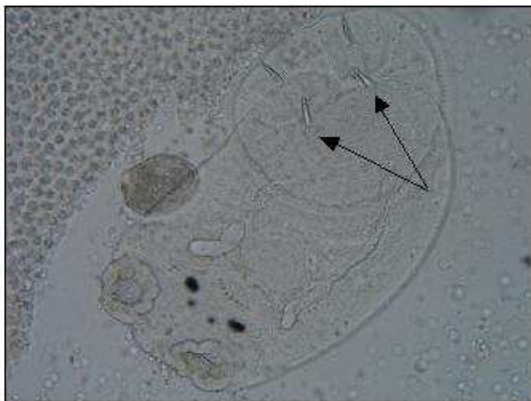


Figure 8 : État frais montrant un parasite adulte du genre *Neobenedenia* sp. (x 200). Les flèches indiquent les crochets qui permettent au parasite de se fixer sur le poisson.



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.

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 (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).

3.4.2.4. 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 1er bassin peut alors être désinfecté au chlore et mis à sec afin d'éliminer les œufs potentiellement accrochés sur les parois.

3.4.2.5. 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.

3.4.2.6. Episodes infectieux

Lors de chaque mise en cage, des épisodes de mortalités ont été observés sur les juvéniles. Les mortalités n'étaient pas importantes mais les performances biologiques (croissance) des cheptels étaient très réduites (FI 07-08, 07-09, 07-439, 07-43).

Les travaux réalisés par Van Cam en 2008, ont permis une meilleure compréhension du problème de mortalité rencontré systématiquement suite à la mise en cage des juvéniles. Le suivi sanitaire réalisé lors de ce stage de Mastère 2, a rendu possible l'identification de l'agent pathogène, *Benedenia sp.*, et le cycle de développement parasitaire. De ces travaux ont découlé des propositions de traitement préventif. Le détail des résultats est consigné dans un rapport (Van Cam, 2008). Afin de développer une pisciculture durable, il est important de limiter les traitements curatifs et de privilégier les traitements préventifs.

Dupieux *et al.* (2008) ont expérimenté le traitement préventif proposé contre le *Benedenia sp.* lors des élevages en cage des Paraha peue (cycle 2008-02). En cas d'infection sévères, des bains statiques d'eau oxygénée d'une heure sont administrés à l'aide de tarpauline. Du fait du cycle court de cette espèce (infestation en 12 jours) le traitement est réalisé à J0, J3, J5 puis tous les 10 jours. Les œufs du parasite se fixent sur les structures d'élevage et notamment sur le filet d'élevage, il est donc impératif d'englober le filet de protection dans la tarpauline pour le traiter. Ce traitement lourd en main d'œuvre, et onéreux a montré d'excellent résultat. Il devra cependant être amélioré, en tentant de diminuer : la dose efficace en peroxyde d'hydrogène, le temps d'administration afin de rendre ce traitement moins lourd et moins stressant pour les animaux.

3.4.3. Infections par le genre *Cryptocaryon*

3.4.3.1. 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*

3.4.3.2. 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 de trophonte correspond à la phase ectoparasite qui dure entre 3 et 7 jours. Le parasite a pénétré 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 tous autres objets contaminés. Le principal réservoir est le tomonte. Il permet la réinfection en libérant les tomites.

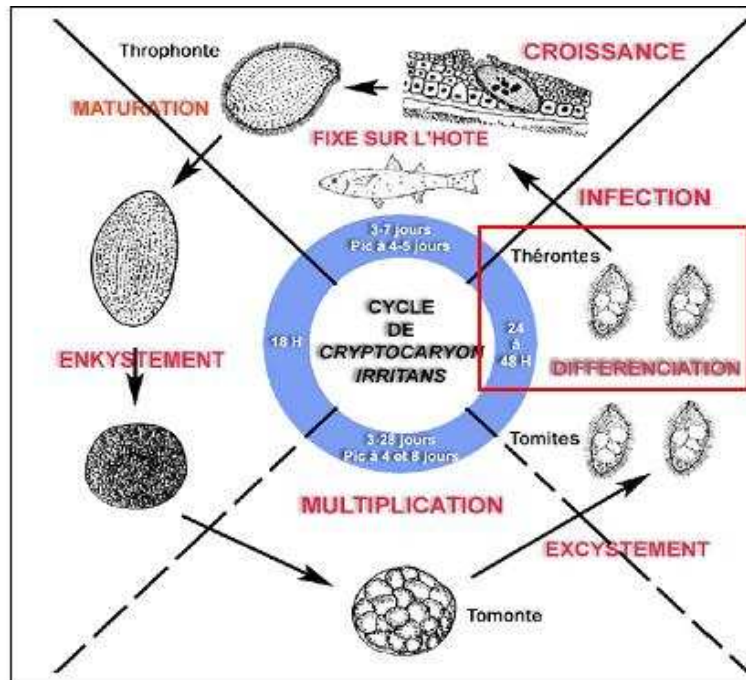


Figure 10 : Cycle de reproduction de *Cryptocaryon irritans* (Maunier, 2002)



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)

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.

3.4.3.3. 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 brouillage 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).

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 adéquate, 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).

3.4.3.4. 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 ainsi que les tomontes fixés aux parois du bac.

Les méthodes physiques permettent d'éliminer les parasites présents dans le bassin en jouant sur la température, la salinité 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. En revanche, 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.

Pour la méthode chimique deux cas sont possibles, l'hyposalinité ou l'hypersalinité. **La diminution de la salinité est néfaste au parasite quel que soit son stade de développement.** La lyse cellulaire des tomontes 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 tomontes enkystés sont résistants à tous les traitements. Seuls les **thérontes** (formes libres, nageantes et infestantes) sont directement affectées 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.

3.4.3.5. 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*. Un passage en zone de quarantaine est préconisé avant toute nouvelle introduction de poissons en salle de maturation. Pendant cette période, les poissons subissent des traitements curatifs et/ou préventifs contre les ectoparasites (dessalure et formol). 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.

3.4.3.6. Episodes infectieux

Un épisode infectieux a été rencontré lors de l'année 2008 (FI08#09-29). Il est survenu sur un lot de Paraha peu élevé dans un bassin en scobalite en milieu non contrôlé.

4. 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 : 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-nurserie (9) et laboratoire (10).

4.1. 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.

4.1.1. 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 (4 de 25 µm et 4 de 10µm). 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%.

4.1.1.1. 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.

4.1.2. 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 inexpiquée lors de dessalure, 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 distribué 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 distribué l'eau au bac.

4.1.3. Aération

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

4.1.4. Alimentation

Selon les stades d'élevages, mes animaux sont nourris avec aliments différents et adaptés à leur anatomie, physiologie et leur comportement alimentaire.

4.1.4.1. Poissons adultes

Les poissons sont nourris soit avec des aliments frais (moules et calamars) 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 négative (-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.

4.1.4.2. 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 (500ml à 5l) à température

ambiante. Leur production est réalisée en bacs cylindro-coniques noirs de 200l. 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 nourries 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).

4.1.5. 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 tombent 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 séchés 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.

4.1.6. 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).

4.1.6.1. 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 entre dans la zone d'élevage.

Matériel

Les pédiluves doivent d'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 30s 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 zone physiquement séparée, 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 produit 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.

4.1.6.2. 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.

4.1.7. Les propositions d'améliorations

4.1.7.1. 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.

4.1.7.2. 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).

4.1.7.3. 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.

4.1.7.4. 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 négative 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.

4.2. 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*.

4.2.1. 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. 4.1.6). La salle est isolée physiquement des autres salles par des murs.

Elle est composée de 4 bassins cylindriques de 2m³ de couleur noire,. 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

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

4.2.2. 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.

4.2.2.1. 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. Le bulleur et le filet de protection sont installés.

A l'arrivée, l'état sanitaire des poissons est vérifié. Ils sont placés dans un bac de réveil (eau de mer uniquement).

Si le poisson présente un bon état sanitaire, il est réanesthésié pour subir la pesée, le marquage et le prélèvement gonadique pour la détection du *Nodavirus*. Une vérification des branchies est réalisée pour vérifier l'absence de parasites.

chaque poisson est placé dans une bac 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 13). 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 10‰. Cette dessalure est maintenue pendant **15 jours**. Elle a pour objectif de débarrasser les animaux de tous les ectoparasites (Monogène, *Cryptocaryon*, *Caligus*). 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 (copépode, cilié, monogène), une dessalure suivie d'un traitement par le formol peut être appliquée (Figure 13). 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.

En cas de plaies importantes occasionnées lors de la pêche ou du transport, les poissons blessés subissent un traitement antibiotique à l'oxytétracycline (OTC) sur une durée de 7 jours (bain statique 1h à 100 ppm). Ce traitement est combinée avec la dessalure. De la Fucidine® en pommade 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.

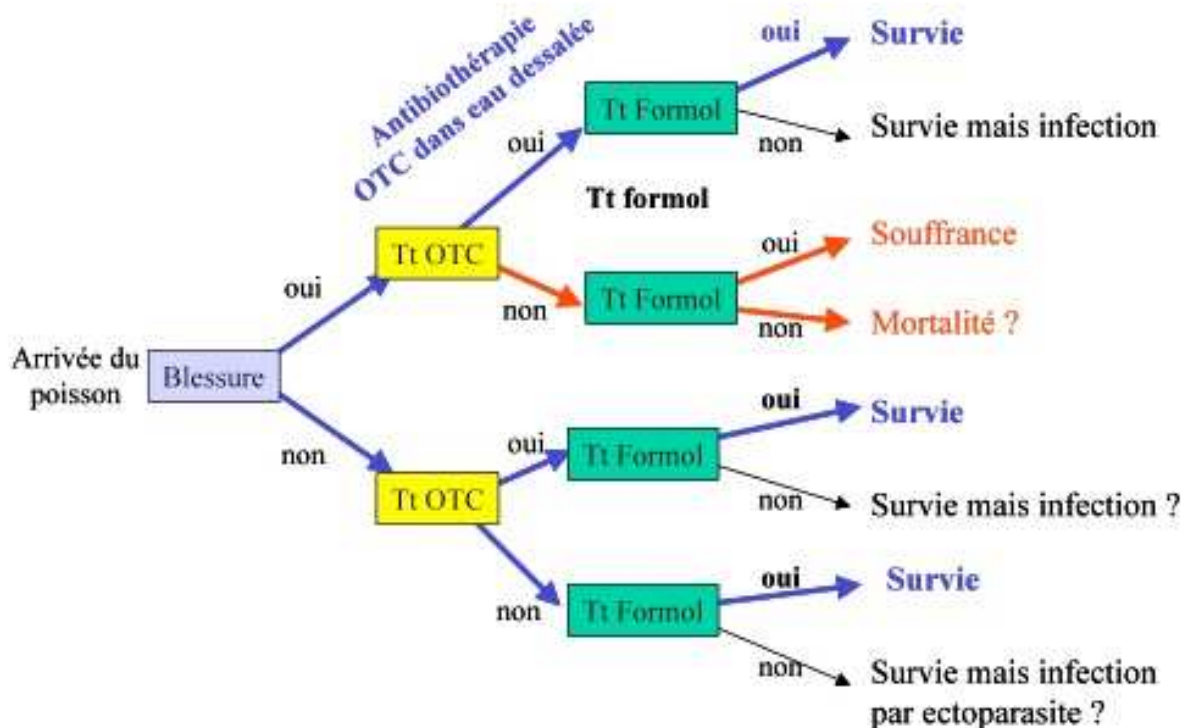


Figure 13 : Schéma décisionnel de la stratégie de traitement des poissons à adapter selon leur état sanitaire à leur entrée en zone de quarantaine

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.

4.2.2.2. Prophylaxie quotidienne

Après désinfection des mains et des chaussures, le responsable de chaque salle réalise le(s) traitement(s). Ces traitements 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.

4.3. 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.

4.3.1. 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.4.1.6). La salle est isolée physiquement des autres salles par des murs et des bâches en polystyrène noir, opaque .

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 époussette, un balais, un seau (10 l).

4.3.2. 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 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 Fucidine® en pommade est appliquée sur les plaies. Une fois que tous les géniteurs sont dans le nouveau bac, la dessalure décroît de 35 ‰ à 10 ‰ 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.

La veille de cette manipulation, 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.

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.

4.3.3. Les propositions d'améliorations

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 nitrates, les nitrites, l'ammoniac.

4.4. 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*.

4.4.1. 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.4.1.6.1 et 4.1.6.2) . 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.

4.4.2. 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 (J0 à J20). 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 J4 et J11, 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 J3, J8, J15, J21 et J30. Ces dates de prélèvements peuvent varier pour coïncider avec les autres types de prélèvements (mesures biométriques par exemple).

4.5. 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 inerte.

4.5.1. 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.4.1.6.1 et 4.1.6.2). 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 .

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

4.5.2. La prophylaxie actuelle

Lors de cette phase les poissons seront sevrés par un passage progressif d'une alimentation vivante à une alimentation inerte. 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.

4.6. 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.

4.6.1. 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.

4.6.2. 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 obstrues 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 à l'eugénol à 30 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.

5. Collaborations

Durant cette convention, la formation a été complétée par la mise en place d'un réseau de connaissance d'experts en pathologie et santé aquacole.

5.1. Visite d'un expert japonais

En début d'année 2008, le laboratoire a accueilli le Dr Koh-Ichiro Mori, spécialiste japonais du *Nodavirus*. Sa visite nous a permis de mettre en place une collaboration au niveau de la pathologie aquacole. Lors de sa mission, il nous a renseigné vis-à-vis des agents pathogènes rencontrés dans les élevages japonais au travers d'un atlas des pathologies.

Une discussion a débuté pour la réalisation d'une mission d'information et de formation d'un agent SPE au Japon. La formation porterait sur l'identification des agents pathogènes tropicaux rencontrés au Japon. Les différents systèmes et techniques de traitement, prévention des ectoparasitoses serait étudiés aussi.

5.2. Visite d'experts australiens

Au travers d'une mission demandé par le Service de la Perliculture, nous avons bénéficié de la visite de deux pathologistes australiens : Dr Brian Jones et Fran Stephens. Ils ont apporté leur connaissance au niveau du diagnostic notamment dans les techniques d'histologie. Leur aide nous a été précieuse pour l'identification de certains parasites rencontrés dans nos élevages.

Une demande de financement au Partenariats Hubert Curien (www.egide.asso.fr) a été déposée pour perpétuer cette collaboration par une mission d'un agent SPE dans leur laboratoire le « Fish health unit » dans le « Department of Fisheries of Western Australia ». L'agent sera formé aux techniques de diagnostic, mais pourra aussi découvrir les élevages en cages flottantes. Les solutions développées contre les infections ectoparasitaires seront abordées lors de visites des installations.

5.3. Participation au colloque de Nantes

Le colloque de Nantes avait pour titre : « Impact des organismes pathogènes et des micropolluants sur l'état de santé des poissons, mollusques et crustacés des milieux naturels : de l'individu au peuplement » (<http://aquafilia.fr/asps2008/>). Il réunissait les spécialistes de la santé aquacole métropolitaine et européenne. L'agent du SPE ayant participé a pu entrer en contact avec des vétérinaires spécialisés dans les élevages aquacoles. Patrick Girard, vétérinaire fondateur de l'Association Santé Poissons Sauvages (association organisatrice du

colloque), nous a éclairé sur la réglementation européenne relative aux produits médicamenteux utilisables dans l'aquaculture pour la consommation humaine.

Nous avons pu prendre connaissance des services du SAVU. Cet organisme propose des expertises sur les élevages aquacoles métropolitains mais aussi d'outre-mer. L'adhésion du Service de la Pêche à ces services est en cours de réflexion.

5.4. Participation au « 7th symposium on diseases in asian aquaculture » (DAAVII)

Le DAAVII est un colloque international qui réunit les spécialistes en santé aquacole de la région Asie-Pacifique. L'agent du service de la Pêche a pu participer à cet événement grâce aux financements du Secrétariat général de la Communauté du Pacifique (CPS, www.spc.int/Fr/) de Nouméa. Lors de ce colloque, l'accent a été porté sur les besoins croissants en protéines animales d'origine de marine. En effet, les stocks naturels de poissons tendent à diminuer, pour compenser l'augmentation exponentielle de la population mondiale l'aquaculture est le secteur mondial produisant le plus rapide. En 2005, la production d'animaux aquatique mondiale était estimée à 48 million de tonnes. En considérant les projections de croissance de la population mondial, on estime à 37 million de tonnes d'aliment d'origine aquatique supplémentaire nécessaire dans les prochaines décennies. Afin de relever ce challenge, l'aquaculture doit suivre des méthodes respectueuses de l'environnement et du bien être des animaux pour aboutir à une aquaculture durable.

Durant ces dernières années, plusieurs épisodes de maladies émergentes sont survenues dans les régions de fortes activités aquacoles. Ces syndromes ont soulevé les lacunes des pays en matière de santé animale, mais aussi en terme de diagnostic, de déclaration, de gestion et de control sanitaire.

Lors de ce colloque, des collaborations se sont établies avec des organismes tel que le NACA (Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, <http://www.enaca.org>). Cet organisme propose des formations au niveau du diagnostic en histopathologie des poissons de la zone Asie-Pacifique.

L'agent du SPE a pu aussi rencontré Dr. Ingo Ernst, spécialiste des Monogènes en Australie membre de « office of the Chief Veterinary » du « Department of agriculture, fisheries and forestry ». Des échanges ont été développé pour répondre aux problèmes rencontrés dans les élevages en cages flottantes.

6. Expertise sur les élevages de crevettes (*Litopenaeus stylirostris*) de Polynésie française

Les élevages de crevette de Polynésie française n'ont pas présentées de mortalités massives dues à un agent pathogènes.

Afin d'évaluer l'état sanitaire de nos élevages, une recherche des maladies inscrites sur la liste de l'OIE a été effectuée. Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire de référence de l'OIE : le laboratoire « Aquaculture Pathology » de l'Université d'Arizona dirigé par le Pr. Donald Lightner.

Les quatre site de production de crevettes ont été analysés, à savoir : Ifremer (Vairao), Opunohu (Moorea), Aquapac (Teahupoo) et Sopomer (Tautira). Pour chaque site d'élevage (grossissement), un prélèvement de 30 individus est réalisé et conservé en éthanol 95°. Les crevettes sont envoyées entières au laboratoire d'analyse.

De précédentes analyses ont révélées la présence du virus de l'IHHN (Nécrose Hypodermique et Hématopoïétique Infectieuse) en Polynésie française (Lightner *and al.*, 1983, Lightner *and al.*, 1990).

Les résultats des analyses effectuées sont présentés en Annexe 4.

Ces résultats révèlent l'absence de virus responsable des maladies inscrites sur la liste de l'OIE pour les Crustacés. Cet état sanitaire est particulièrement rare et recherché dans le monde de la crevetticulture. Il est aussi un atout majeur pour la filière locale. En effet, des épidémie ravage les élevages du monde entier. Nous devons profiter de cet avantage et le conserver. Cette préservation doit passer par un suivi sur plusieurs année de l'état sanitaire en renouvelant ces analyses. Mais aussi par la protection de nos frontières et le contrôle sanitaire des importations. L'importation de crevette crues congelées pour l'alimentation humaine est le principale vecteur d'organismes pathogènes.

7. Discussion - Conclusion

Cette convention a permis à l'agent du SPE de se compléter sa formation aux techniques d'analyse d'histologie, de bactériologie et de biologie moléculaire en accédant à la plate forme technologique du centre Ifremer de Vairao et en bénéficiant de l'expertise technique du Laboratoire Biotechnologie et Qualité de la Perle. 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 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 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 pour rechercher la présence éventuelle de parasites. L'identification des parasites se fait par comparaison morphologique. En même temps, 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 (réalisée par des techniques biochimiques) ou génotypiques (réalisée par des techniques de biologie moléculaire).

En cas de mortalité, les états frais et les techniques de bactériologie sont complétés 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 diagnostics chez ces deux espèces.

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

Des fiches de prélèvements ont été définies pour conserver les données relatives aux épisodes de mortalité (pourcentage de mortalité, présence ou non de lésions, diagnostic,

traitements...). Des fiches mensuelles ont été mises en places. Elles retracent les différents épisodes infectieux avec le diagnostic posé et les traitements préconisés.

Divers organismes ont été diagnostiqués en 2008, 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 2008, de mortalités dues au *Nodavirus* dans des 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). Cette recherche n'est possible que si les individus sont matures. Cette méthode innovante est la seule basée sur cette technique. Les prégéniteurs 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 et de la qualité des poissons prélevés. Il en résulte un nombre important de prise de poissons jeunes « non matures » et qui sont trop stressés pour mûrir rapidement.

Près de 66 % des poissons étaient immatures à leur arrivée au COP. 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 (en Martinique, à La Réunion, à Tahiti, et à Palavas-les-flots) sur une même thématique.

Les problèmes pathologiques majeurs ont été rencontrés dans les élevages en cage flottantes (Van Cam, 2008 ; Tamata *et al.*, 2008). Des mortalités récurrentes étaient observées lors de la mise en cages flottantes. Lors du suivi soutenu (prélèvement hebdomadaire), d'un cycle d'élevage en cages flottantes, nous avons pu déterminer l'agent pathogène responsable de ces mortalités : *Benedenia sp.* Des travaux complémentaires portant sur l'efficacité du peroxyde d'hydrogène sur cet ectoparasite, nous ont permis de proposer un traitement préventif efficace pour les élevages en cages flottantes : traitement par l'intermédiaire de tarpauline au peroxyde d'hydrogène pendant une heure. Ces techniques seront transmises aux pisciculteurs lors des essais préliminaires de grossissement.

Afin de développer une filière aquacole durable, il est primordial de mettre en place un réseau de surveillance des pathologies en milieu aquacole. Pour pérenniser l'aquaculture locale, il faut préserver la situation sanitaire actuelle. Nous possédons le privilège d'être exempt des grandes pathologies qui disséminent les élevages aquacoles du monde. Ce réseau aura différents objectifs à remplir

- prévention des risques sanitaires dans les élevages
- suivi sanitaire des élevages aquacoles
- biosécurisation des frontières : pour limiter les risques d'introduction des agents pathogènes sur notre territoire.

La situation sanitaire polynésienne en milieu aquacole, est à l'heure actuelle très satisfaisant voire même exceptionnelle dans le cas de la crevette *Litopenaeus stylirostris* (aucun virus à déclaration obligatoire à l'OIE n'a été détecté). Afin de développer une filière aquacole durable et rentable il est indispensable de conserver cet état sanitaire en protégeant nos élevages des pestes qui ravagent le reste du monde. Cette étape passe par l'instauration d'un réseau de surveillance des maladies dans les différents sites d'élevage, mais aussi la mise en place de mesures règlementaire strictes à l'entrée de nos frontières. Ces mesures protégeront aussi bien notre économie aquacole tout comme la biodiversité de notre environnement.

8. Annexes

Annexe 1 : Fiche de suivi des critères comportementaux des poissons en élevage

Critères d'observations des poissons en cage												
Cage d'élevage : RAC 6			Cycle : 2007-03			Espèce : PLATAX						
DATE	Comportement natatoire (hors alimentation)			Appétit			Lésions (plaies, pustules, œil opaque etc...)			Couleur de la livrée		
	Bon	Mauvais	Observations	Bon	Mauvais	Observations	Présence	Absence	Observations	Clair	Sombre	Observations
Mardi												
Mercredi												
Jeudi												
Vendredi												
Samedi												
Dimanche												
Lundi												
Mardi												
Mercredi												
Jeudi												
Vendredi												
Samedi												
Dimanche												
Lundi												
Mardi												
Mercredi												
Jeudi												
Vendredi												
Samedi												
Dimanche												
Lundi												
Mardi												
Mercredi												
Jeudi												
Vendredi												
Samedi												
Dimanche												
Lundi												
Mardi												
Mercredi												
Jeudi												
Vendredi												
Samedi												
Dimanche												
Lundi												
Mardi												

C : Calme	G : Groupe	Pl : Plaies	Pu : Pustules
F : Effrayé	I : Isolé	B : Borgne	Op : Œil opaque

Annexe 2 : Fiche d'intervention

N° de prélèvement : 09- #

FICHE PRELEVEMENT SPE-IFREMER

Questionnaire rempli par :

Prélèvement réalisé par :

Objet de l'intervention :

N° lot année :

Espèce:

Classe d'âge : élevage larvaire
(Nb jours)

juvéniles
(Nb mois)

géniteurs
(nb années)

Condition d'élevage : milieu contrôlé

milieu naturel

CARACTERISTIQUE DU PRELEVEMENT

Date du prélèvement :

Nom du Demandeur (SPE) :

Nombre d'individus prélevés :

Choix du prélèvement : au hasard :

parmi les moribonds :

Mortalité : oui

non

Signes macroscopiques observés :

DESCRIPTION DE LA MORTALITE

Mortalité estimée ou comptage :

Y a t il d'autres lots touchés :

OUI

NON

Ce lot est il présent sur d'autres sites :

Si oui préciser

Faits marquants

- Excitabilité

- Coloration de la livrée

- Appétence

- Nage désorientée

- Problèmes respiratoires

Autres observations

FICHE PRELEVEMENT SPE-IFREMER

TYPE D'ANALYSES EFFECTUEES

Fiche de dissection :

Prélèvements : Etat frais histologique bactériologique Biologie Moléculaire

RESULTATS

Date	Code Technique	Numeros poissons	Tissu prélevé	Effectif	Observation

FICHE PRELEVEMENT SPE-IFREMER

PROPHYLAXIE ET/OU TRAITEMENT ENVISAGE

Annexe 3 : Fiche de traitement pathologique et de suivi quotidien

Fiche de traitement Pathologique

Fiche pathologique

objectif traitement contre ectoparasite
lot de poissons Bora bora quarantaine

traitement	Formol
dose	200 ppm
durée	1h
méthode	pendant une heure par jour
	bullage au maximum

volume bassin	400 L
qté formol	80 ml

début du traitement le mardi 9 janvier 2007

dernier jour de traitement le samedi 13 janvier 2007

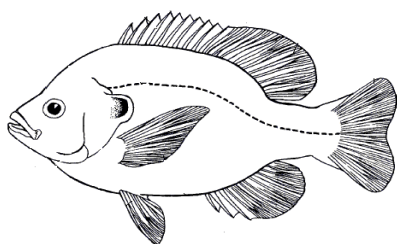
condition d'élevage

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

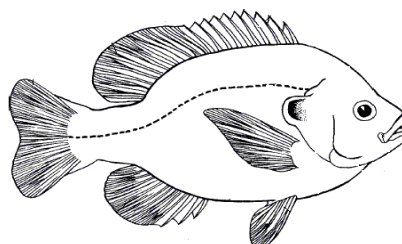
suivi hebdomadaire

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 clair)
 état des blessures zone : flan, tête, nageoire
 couleur : perte écaille, rouge, orange, rose clair
 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

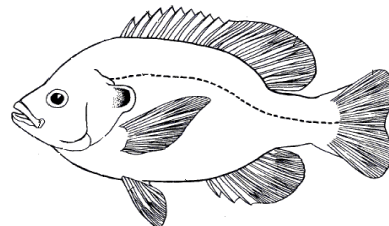
pendant et après le traitement

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 livré 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

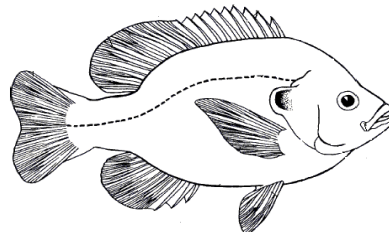
lot de poissons
date
jour
heure traitement

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

autres observations complémentaires



Côté Gauche

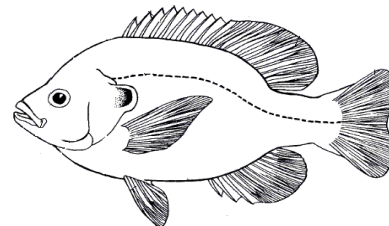


Côté Droit

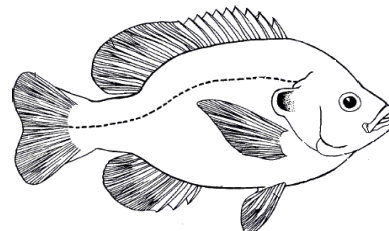
lot de poissons
date
jour
heure traitement

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

autres observations complémentaires



Côté Gauche



Côté Droit

Annexe 4 : Résultats de la recherche de virus responsable de maladies inscrites sur la liste de l'OIE

AQUACULTURE PATHOLOGY
OFFICE PHONE 1-520-621-8414
LAB PHONE 1-520-621-4438
FAX 1-520-621-4899

January 26, 2009

Mademoiselle Rarahu David
Service de la Pêche
Programmes Aquaculture Cellule Développement
BP 20
Papeete, Tahiti 97813
POLYNESIE FRANCAISE

Case: 08-258

E-mailed: Rarahu.David@ifremer.fr

Dear Ms. Rarahu David:

The tests you requested for the detection of WSSV, TSV, YHV, IMNV, MBV, BP and IHNV by PCR have been completed. The 120 whole *Litopenaeus stylirostris* arrived on January 21st, 2009 in good condition. The shrimp were pooled into 24 groups of 5 shrimp per group. Representative samples from each of the shrimp (Approximately 16 to 50 mg per pooled samples) were collected for DNA and RNA extractions. WSSV, TSV, YHV, IMNV, MBV, BP and IHNV were not detected in any of the samples tested. A summary of the tests and results is provided on the following page.

We hope that this information will be helpful to you. A hard copy of this report will be mailed to you. The fee for these tests of \$3,888.00 (72 sets of tests for WSSV/IHNV, TSV/YHV and MBV/BP @ \$47.00 each, and 24 sets of tests for IMNV @ \$21.00 each) has been prepaid. If there are any questions regarding this case please feel free to contact us.

UAZ Policy on certification: This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for examination, health status evaluation, disease diagnosis, or pathogen detection. It is our policy and intent to perform the most appropriate assay(s) for the determination of the health/pathogen status of all specimens submitted to our laboratory. However, this report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

PCR: disclaimer: This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for pathogen detection. The PCR assay used by this laboratory for the detection of shrimp pathogens is a research tool. The results should be considered as experimental and tentative. Whenever possible, PCR results should be confirmed by alternative assay. This report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

Sincerely yours,

Ms. Solangel Navarro
Research Specialist

Kathy F.J. Tang-Nelson
Associate Research Professor

Page 1 of 3

Case: 08-258

<u>Test(s) Requested:</u>	<u>Sample Type:</u>	<u>Species:</u>
YHV	120 whole shrimp in 95% ethanol	<i>L. stylirostris</i>
TSV	120 whole shrimp in 95% ethanol	<i>L. stylirostris</i>
WSSV	120 whole shrimp in 95% ethanol	<i>L. stylirostris</i>
IHHNV	120 whole shrimp in 95% ethanol	<i>L. stylirostris</i>
MBV	120 whole shrimp in 95% ethanol	<i>L. stylirostris</i>
BP	120 whole shrimp in 95% ethanol	<i>L. stylirostris</i>
IMNV	120 whole shrimp in 95% ethanol	<i>L. stylirostris</i>

Protocols:

YHV: RT-PCR described by Tang and Lightner (DAO, 1999, 35:165-173)
 TSV: RT-PCR described by Nunan, et al. (DAO, 1998, 34:87-91)
 WSSV: Two-step nested PCR modified method from Lo, et al (DAO, 1996, 25:133-141)
 IHHNV: PCR described by Nunan, et al. (Marine Biotechnology, 2000, 2: 319-328)
 BP: PCR protocol developed in this laboratory
 MBV: PCR protocol described by Surachetpong et al (Aquaculture, 2005, 249:69-75)
 IMNV: RT-PCR nested protocol described by Poulos and Lightner (DAO,2006,73:69-72)

Table:

UAZ #	Sample Ref	WSSV	IHHNV	MBV	BP	TSV	YHV	IMNV
08-258/ A1	30 whole <i>L. stylirostris</i> from IFREMER	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ A2		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ A3		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ A4		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ A5		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ A6		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected

Page 2 of 3

UAZ #	Sample Ref	WSSV	IHHNV	MBV	BP	TSV	YHV	IMNV
08-258/ B1	30 whole <i>L. stylirostris</i> from OPUNOHU	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ B2		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ B3		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ B4		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ B5		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ B6		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ C1	30 whole <i>L. stylirostris</i> from AQUAPAC	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ C2		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ C3		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ C4		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ C5		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ C6		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ D1	30 whole <i>L. stylirostris</i> from SOPOMER	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ D2		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ D3		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ D4		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ D5		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
08-258/ D6		Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected

Conclusion: WSSV, TSV, YHV, IMNV, MBV, BP and IHHNV were Not Detected in any of the samples tested.

9. 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.

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdicto/vv/harveyi.html>

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 et 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.

Lightner, D. V., Redman, R. M. & Bell, T. A. (1983). Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society* 14, 212-225.

Lightner, D. V., Bell, T. A. & Redman, R. M. (1990). A review of the known hosts, geographic range and current diagnostic procedures for virus diseases of cultured penaeid shrimp. In *Advances in Tropical Mariculture : Pathology of Molluscs, Crustaceans and Finfish*. Edited by M. Weppe. Tahiti: IFREMER.

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.

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

Tamata T., Dupieux S., David R.(2008) Bilan du traitement curatif contre les ectoparasitoses de Paraha peu de d'élevage en cages flottantes.

Tan C., Huang B., Chang S.F., Ngoh 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 seaband 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.

Van Cam A. (2008) Suivi zoosanitaire du cheptel de "paraha peu" (*Platax orbicularis*) en phase de grossissement. Rapport de stage de mastère 2 Bioressources aquatiques en environnement méditerranéen et tropical. 33pp.

Woo P. (2006) Fish diseases and disorders. Volume 1 Protozoan and Metazoan infections. 2nd edition. *Cabi*. 791 pp.

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

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 : 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

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 (T) 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 : Schéma décisionnel de la stratégie de traitement