

Thème Surveillance et Exploitation des Ressources Aquacoles  
Département Aquaculture en Polynésie  
Laboratoire Biotechnologie et Qualité de la Perle

Ifremer

Cécile Saugeon  
Angélique Fougerouse  
Antoine Pellan  
Peva Levy  
Nathalie Cochenec-Laureau

Mars 2007

Rapport final de la Convention n°7.0029 du 2 mai 2007 entre  
le Service de la Perliculture et l'Ifremer - Tahiti

## Bilan final 2004-2007 du Réseau de Veille Zoosanitaire REPANUI des huîtres perlières *Pinctada margaritifera* en Polynésie Française



<b>RESUME</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>2. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES PATHOLOGIES DES HUITRES PERLIERES</b>	<b>6</b>
<b>3. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION DE <i>PINCTADA MARGARITIFERA</i> EN POLYNESIE FRANÇAISE</b>	<b>8</b>
<b>4. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>9</b>
<b>4.1. Objectifs de la surveillance</b>	<b>9</b>
<b>4.2. Objet de la surveillance</b>	<b>9</b>
4.2.1. Agents pathogènes présents en Polynésie française	9
4.2.2. Agents pathogènes réglementés en Polynésie française	9
4.2.3. Agents pathogènes réglementés par l'OIE	10
4.2.4. Agents pathogènes présents dans la zone Asie-Pacifique	10
<b>4.3. Population cible</b>	<b>10</b>
<b>4.4. Protocole de l'épidémiologie-surveillance</b>	<b>11</b>
4.4.1. Stratégie d'échantillonnage	11
4.4.2. Zone de surveillance	11
4.4.3. Sites de prélèvements intra-zone	14
4.4.4. Echantillonnage	14
4.4.5. Périodes et fréquence des prélèvements	16
<b>4.5. Prélèvements</b>	<b>16</b>
4.5.1. Réalisation des prélèvements	16
<b>4.6. Démarche d'analyses de laboratoire</b>	<b>16</b>
<b>4.7. Protocole de l'épidémiologie-vigilance</b>	<b>19</b>
<b>4.8. Données utilisées</b>	<b>19</b>
<b>4.9. Traitement des données</b>	<b>19</b>
<b>5. RESULTATS</b>	<b>21</b>
<b>5.1. Situation sanitaire des huîtres perlières en Polynésie française</b>	<b>21</b>
5.1.1. Bilan global	21
5.1.2. Grégarines	22
5.1.3. Rickettsie-like	24
5.1.4. Kystes de métazoaire	25
<b>5.2. Evolution de la situation sanitaire des huîtres perlières en Polynésie française</b>	<b>27</b>

5.2.1. Bilans annuels	27
5.2.2. Evolution annuelle	28
<b>6.DISCUSSION</b>	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>31</b>
<b>8. BIBLIOGRAPHIE CITEE</b>	<b>32</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>37</b>

## Résumé

De nombreuses pathologies affectent les mollusques, dont les huîtres perlières. Celles-ci peuvent être sensibles à des maladies, ce qui peut entraîner parfois de fortes mortalités au sein d'une population. La présence de certains agents pathogènes dans la région Asie-Pacifique ainsi que les fortes mortalités dans les années 1985 sur le cheptel de *Pinctada margaritifera* en Polynésie française, permet de se rendre compte de la vulnérabilité de la filière perlicole.

De part l'importance socio-économique de la perliculture en Polynésie française, le Service de la Perliculture, en collaboration avec l'Ifremer de Tahiti, a mis en place en 2003 un réseau de surveillance épidémiologique des pathologies de l'huître perlière *P. margaritifera* (REPANUI). **Après cinq années de fonctionnement, le réseau a permis de déterminer les organismes présents sur le territoire.** Un bilan des résultats obtenus par le REPANUI est proposé afin d'évaluer la situation épidémiologique actuelle. **Une validation du fonctionnement du réseau est également proposé** (CES d'épidémiologie de l'Ecole Vétérinaire de Maison Alfort) **avant le transfert de l'animation et de la gestion opérationnelle de REPANUI le 26 mai 2008.**

Le réseau a permis d'effectuer 2797 analyses d'huître perlières et 493 analyses d'autres mollusques sauvages. Les analyses histologiques effectuées dans le cadre du REPANUI ont permis de déterminer les agents pathogènes présents sur le Territoire de Polynésie française : grégarines, rickettsie-like, kyste de *Tylocephalum*. Des tendances ont été dégagées parmi les agents pathogènes présents :

- les parasites de type grégarines sont présents avec une fréquence de détection élevée de l'ordre de 70 à 90 %;
- les rickettsie-likes présentent une fréquence de détection de l'ordre de 5 à 10 % ;
- les kystes de *Tylocephalum* correspondent à une fréquence de détection de l'ordre de 5 à 10 %.

**Depuis la mise en place de ce réseau, aucun agent infectieux à déclaration obligatoire de la liste de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) n'a pus être mis en évidence.** Ceci confirme le statut indemne de la Polynésie française par rapport aux pathologies des huîtres perlières. *Seule une déclaration de mortalité, démentie ensuite, a été enregistrée au Service de la Perliculture en 2008.* Ces résultats seront à confirmer dans les années à venir.

## Liste des abréviations

IFREMER : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

PRL : Service de la Perliculture

REPAMO : Réseau de surveillance des pathologies des mollusques

REPANUI : Réseau de surveillance des pathologies des huîtres perlières

SDR : Service du Développement Rural

SPE : Service de la Pêche

## 1. Introduction

La Polynésie française est située au cœur de l'Océan Pacifique. Elle regroupe 118 îles réparties sur une surface équivalente à celle de l'Europe, 2 500 000 km<sup>2</sup>, mais ne représente que 4 200 km<sup>2</sup> de terres immergées (moins de 1% de la superficie métropolitaine). Cela souligne bien l'étendue et le morcellement de la Polynésie française. La Zone Economique Exclusive de la Polynésie couvre plus de 4 800 000 km<sup>2</sup> (D'Aboville, 2007).

La technique de greffe connue au Japon a été mise en place en Polynésie française sur *Pinctada margaritifera* dans les années 1960 par M. Domard. En 1962, la première greffe, sur plus de 5000 huîtres, a permis de récolter trois ans plus tard plus de 1000 perles. Ce succès a permis la création de fermes perlicoles sur les îles de Manihi, Marutea et Mangareva (Perles.TV, 2007). Depuis, la perliculture a connu un développement exponentiel, surtout dans la dernière décennie : la production exportée représentait environ 30 kg de perles au début des années 1980. Elle a atteint 7,695 tonnes en 2006 (D'Aboville, 2007). Aujourd'hui, elle se concentre dans les atolls des Tuamotu, dans l'archipel des Gambier et aux Iles Sous-le-Vent (D'Aboville, 2007). La perliculture est un secteur d'activité important pour la Polynésie qui est le premier fournisseur de perles de culture brute (D'Aboville, 2007). Près de 8 tonnes de perles brutes ont été produites à l'exportation en 2006 permettant d'atteindre un chiffre d'affaire de près de 11 milliards de Francs CFP, soit près de 93 millions d'Euros (ISPF, 2007). Avec près de 60% des exportations totales, plaçant la perle au premier rang des exportations de la Polynésie française (ISPF, 2006). Cette activité concerne 548 fermes d'élevage, dont 428 fermes perlicoles et a un impact social important avec plus de 7 000 personnes employées dans toute la Polynésie française, soit 12 à 13% des actifs (D'Aboville, 2007).

Le développement rapide de la perliculture s'est accompagné d'une augmentation des densités d'huîtres en élevage et d'une intensification des transferts d'huîtres entre atolls. Cette évolution est un facteur favorable à l'émergence ou la réémergence d'agents infectieux et à la propagation de maladies. De plus, l'élevage de l'huître perlière, *P. margaritifera* (Linnaeus, 1758), a connu dans les années 1985, des épisodes de mortalité massive (de 30 à 80%) touchant plusieurs atolls et soulevant la question de la vulnérabilité de la filière perlicole (Grizel, 1986 ; Comps *et al.*, 1996 ; Comps *et al.*, 1998). La présence du virus de l'huître *Akoya*, a causé des mortalités élevées et des pertes importantes sur le cheptel d'huîtres japonaises (Miyazaki *et al.*, 1999 ; Kobayashi *et al.*, 1999). Plus récemment, la description d'un autre virus-like au Japon, peut aussi représenter un danger non négligeable pour le cheptel d'huîtres, d'autant que les échanges en matériels et la mobilité des greffeurs entre l'Asie et la Polynésie française se sont intensifiés (Maeno *et al.*, 2006 ; Prokop Vanluyd, 2007). Enfin, l'apparition en octobre 2006 de mortalités dans les élevages de *P. maxima* en Australie Occidentale nommée « maladie de l'œdème de l'huître » dont l'origine étiologique n'a pas encore été déterminée est un véritable exemple d'émergence de phénomènes pathologiques (OIE, 2007).

Il devenait prioritaire de connaître précisément l'état de santé des huîtres et les microorganismes existants. Ce contexte a conduit le Service de la Perliculture en collaboration avec l'IFREMER (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer) de Tahiti, à mettre en œuvre une surveillance épidémiologique de l'huître perlière. Un réseau de surveillance épidémiologique des pathologies de l'huître perlière, *P. margaritifera*, en Polynésie française, REPANUI, a ainsi été créé en 2003 (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003). La surveillance épidémiologique est essentielle à la protection des populations d'huîtres contre les maladies infectieuses et transmissibles, ainsi qu'à la mise en place de mesures de lutte efficaces, le cas échéant. Cette surveillance s'est appuyée sur l'étude préliminaire de faisabilité réalisée par l'Ifremer de La Tremblade (Thébault, 1999).

La première phase 2003-2004 a permis de mettre en place le dispositif de surveillance et d'élaborer les protocoles et les procédures. Cela a permis de déterminer le

choix des sites de prélèvements, l'échantillonnage, la définition des acteurs. La surveillance épidémiologique a été entreprise de manière spécifique en veillant à développer des activités propres à la surveillance de la filière perlicole. Elle s'est mise en place à partir de protocoles dédiés à des objectifs précis, en formant les acteurs de la surveillance des pathologies des mollusques et en instaurant une organisation propre au réseau, grâce à la collaboration de l'Ifremer de Tahiti et du Service de la Perliculture.

Lors de la deuxième phase 2005-2007, le réseau est rentré dans son fonctionnement et a permis d'établir la situation sanitaire des huîtres perlières en Polynésie française. Ceci permet de confirmer la faisabilité d'un tel réseau en Polynésie française, malgré les contraintes spécifiques à ce territoire. La présence de l'Ifremer sur Tahiti a permis un appui technique et scientifique important pour le fonctionnement du REPANUI.

La dernière phase 2008 verra le transfert, de l'Ifremer vers le Service de la Perliculture, de l'animation et de l'organisation opérationnelle du Réseau REPANUI.

Après bientôt cinq ans de fonctionnement, le réseau REPANUI a permis d'établir un référent de la prévalence des agents pathogènes et des organismes présents en permanence en Polynésie française. Cette étude a donc comme objectif de réaliser un bilan des résultats obtenus sur les cinq années. Le bilan se compose de bilans annuels des agents présents ou absents du territoire de Polynésie française et d'un bilan global présentant l'évolution temporelle de la situation épidémiologique.

La présente étude se base sur les résultats de la surveillance épidémiologique réalisée dans le cadre du Réseau de surveillance épidémiologique des pathologies de l'huître perlière *P. margaritifera* en Polynésie française. Ainsi, les principes de la surveillance épidémiologique de ce réseau sont détaillés dans la chapitre matériel et méthodes, car ils font partie intégrante du protocole de surveillance.

Ce rapport est accompagné d'un second rapport qui concerne la validation du fonctionnement du REPANUI. Il a été réalisé avant le transfert du réseau, dans le cadre d'un Certificat d'Etude Spécialisée (CES) en Epidémiologie de l'école Vétérinaire de Maison Alfort (C. Saugeon, 2007). Une thèse vétérinaire sera également soutenue courant juin 2008 sur le même sujet et la thèse sera fournie au Service de la Perliculture.

## 2. Rappels bibliographiques sur les pathologies des huîtres perlières

Les élevages d'huîtres perlières, *P. margaritifera*, ont connu en Polynésie française dans les années 1985, des épisodes de mortalité importante. Plusieurs atolls ont été touchés, soulevant la question de la vulnérabilité de la perliculture. Différentes hypothèses environnementales et pathologiques ont été émises (Grizel, 1986 ; Comps *et al.*, 1998, 1999, 2001). Un parasite de type grégarine a été décrit chez des huîtres perlières moribondes (Chagot *et al.*, 1993). Aucune association significative avec les mortalités n'a pu être clairement établie. En dépit des investigations, les causes exactes de ces mortalités appelées « syndrome 85 » restent encore aujourd'hui indéterminée et semblent être multifactorielles.

*P. margaritifera* est également cultivée avec succès en mer rouge, au Soudan, depuis les années 1904. Des mortalités récurrentes sont décrites depuis les années 1969, en association avec un parasite « sphérique » non clairement déterminé (Nasr, 1982 ; Suliman, 1995), qui seraient en fait des formes constitutives des cellules digestives (Pass et Perkins, 1985).

Une première enquête épidémiologique descriptive a été développée, en Polynésie française, entre 1996 et 1997 (contrat d'étude Ifremer - EVAAM n°85/1210177). Cette étude a permis de mettre en évidence des rickettsies (procaryotes) au niveau de l'épithélium digestif, des cestodes (sporozoaires du genre *Tylocephalum*) et grégarines (nématodes) au niveau du tractus digestif, et des particules « d'allure virale » d'environ 40 nm, au sein de vésicules membranaires, associées à des zones de nécrose du muscle adducteur (Comps *et al.*, 2001). Les organismes de type grégarine avaient été déjà précédemment décrits (Chagot *et al.*, 1993). Bien que cette situation sanitaire ne mette en évidence aucun pathogène majeur (répertorié par l'Organisation mondiale de la santé animale, OIE), certaines observations, notamment celles de particules « d'allure virale » doivent être considérées comme préoccupantes. En effet, au Japon, depuis les années 1994, de fortes mortalités affectent l'espèce *P. fucata martensii*. Ces mortalités sont associées, au niveau macroscopique, à la description d'abcès localisés au niveau du muscle adducteur. Au niveau histologique, ces lésions sont caractérisées par la présence de tissus nécrosés en association à une forte infiltration hémocytaire. Les observations en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence de nombreuses particules virales, de taille comprise entre 25 et 33 nm. Ce virus, vraisemblablement à ARN a été nommé « akoya virus » (Miyasaki *et al.*, 1999 ; Kobayashi *et al.*, 1999). Excepté la taille, il présente de nombreuses homologues avec celui décrit par Comps *et al.* (2001), sans qu'il ait été possible de confirmer cette appartenance (Comps *et al.*, 1999).

L'implication de « l'akoya virus » dans les mortalités de *P. fucata* est toutefois aujourd'hui assez controversée. D'autres origines infectieuses (Kurokawa *et al.*, 1999) et environnementales (Muroga *et al.*, 1999 ; Tomaru *et al.*, 2001 ; Morizane *et al.*, 2001) ont été également retenues pour expliquer ces mortalités. Dans le même temps, un virus de type birnavirus (MABV) a été isolé à partir d'huîtres *P. fucata* asymptomatiques (Suzuki *et al.*, 1998). Ces virus ubiquitaires ont été décrits chez plusieurs espèces de bivalves, *Meretrix lusoria* et *Sinonovacula consticta* (Chou *et al.*, 1994, 1998 ; Suzuki *et al.*, 1997). La sensibilité des clams *M. lusoria* à ce virus est augmentée lors de conditions stressantes de température et de pollution (Chou *et al.*, 1994, 1998). De même, le stress de la ponte augmente significativement les mortalités de *S. consticta* (Suzuki *et al.*, 1997b). Des études ont montré des différences de détection de ce virus dans les huîtres perlières *P. fucata* en fonction de la profondeur d'élevage et des stress de manipulations (Kitamura *et al.*, 2002).

D'autres organismes ont été décrits chez l'espèce *P. fucata martensii*. Récemment, en Corée, sans mortalité apparente associée, un parasite de type *Perkinsus* sp. a été observé par Park *et al.* (2001). Notons également la description d'organismes de type



rickettsien associés à de fortes mortalités en Chine chez les deux espèces d'huîtres perlières, *P. fucata* et *P. maxima* (Wu et Pan, 1998, 1999).

Les élevages de l'huître perlière *P. maxima*, en Australie, ont également subi d'importantes mortalités dans les années 1974. Des suivis pathologiques et microbiologiques réalisés entre 1981 et 1982 révèlent la présence de foyers bactériens au niveau de lésions du tissu conjonctif de la glande digestive et du manteau. Les analyses bactériologiques permettent alors d'isoler une bactérie du type *Vibrio harveyi* (Pass *et al.*, 1987). Des mortalités ont été également obtenues expérimentalement confirmant le pouvoir pathogène de ces bactéries. En outre, il semble que la virulence soit dépendante de la température et des conditions de stockage des animaux (Pass *et al.*, 1987) en Europe, des *Vibrio* sp. ont été impliqués dans la maladie des coquilles de *Ruditapes philippinarum*. Des observations similaires d'anomalies de dépôt de conchioline ont été rapportées chez *P. maxima* par Perkins en 1996, sans mettre en évidence d'agent étiologique. En Polynésie française différents épisodes d'anomalies de la couche nacrée de la coquille de *P. margaritifera* ont été également rapportés (Cuif et Dauphin, 1996 ; Mao *et al.*, 1996 ; Comps *et al.*, 2000 ; Saulnier, 2001).

Jusqu'à récemment, la culture de *P. maxima* était basée sur un système d'élevage semi-intensif en filières. Depuis quelques années, une production intensive de naissains en éclosure s'est développée. Du fait des densités d'élevage importantes, ces pratiques mettent souvent en exergue des problèmes pathologiques. Au cours de programmes de surveillance zoosanitaire, des organismes de type *Haplosporidium* spp. et *Perkinsus* spp. ont été rapportés, respectivement 6 et 1 sur 4670 naissains analysés (Hine et Thorne, 1998, 2000). En dépit des taux de prévalence faibles, il est important de noter que ces organismes font partie des genres *Haplosporidium* et *Perkinsus* dont différentes espèces *H. nelsoni*, *H. costale*, *P. marinus* entraînent des mortalités importantes chez les huîtres *Crassostrea virginica* aux Etats-Unis, *P. olseni* chez *Haliotis ruber* et *H. laevigata* en Australie, et *P. atlanticus* chez les palourdes *Ruditapes decussatus* en Europe. Dès 1978, un organisme de type *Haplosporidium* avait déjà été mis en cause dans les mortalités décrites dans les années 1970 chez les huîtres perlières adultes. Toutefois, il semble que le processus de sporulation ne soit pas caractéristique de celui des genres *Haplosporidium*, *Urosporidium* et *Minchinia* (Wolf et Sprague, 1978). Norton *et al.* ont rapporté, pour la première fois sur cette espèce, au cours d'un programme de surveillance zoosanitaire en 1993, un virus-like (Papovirus). Cette description n'était pas associée à des mortalités. Enfin, depuis octobre 2006 des mortalités sur un nombre limité d'huîtres perlières *P. maxima*, ont été reportées dans les élevages perlicoles du nord de l'Australie Occidentale. Les huîtres atteintes montrent des signes d'œdème et de rétraction du manteau. La mort survenant trois à quatre jours après le début des symptômes (OIE, 2006). L'étiologie de la maladie de l'œdème de l'huître n'a pas encore été déterminée. Des investigations sont en cours afin de caractériser cette maladie (OIE, 2007).

### 3. Caractéristiques de la population de *Pinctada margaritifera* en Polynésie française

L'huître perlière utilisée en perliculture est l'huître perlière à lèvres noires, de son nom scientifique *Pinctada margaritifera* variété *cumingii*. Sa population en élevage atteint les 200 millions d'individus (estimation). 30 îles ou atolls sur les 118 présentent une activité perlicole.

L'élevage de l'huître est destinée à la perliculture en Polynésie française. Les huîtres sont élevées sur des filières situées entre 6 et 10 mètres de profondeur. La station de collectage permet de collecter les naissains présents dans le lagon. Les huîtres sont ensuite élevées en chapelets, système le plus utilisé dans les fermes, aussi bien pour le grossissement des nacres avant la greffe, que pour l'élevage après la greffe. 10 à 20 huîtres sont disposées par chapelet. Certaines îles ou atolls présentent peu de captage de naissains. Par conséquent, de nombreux transferts sont réalisés entre îles afin d'introduire des naissains d'huîtres dans les élevages. Des transferts d'huîtres adultes sont également réalisés entre les fermes d'élevage et les fermes de production de perles.

La greffe est une véritable opération chirurgicale. Cette étape est réalisée par des greffeurs en grande majorité de nationalité chinoise, qui sont dépêchés sur les îles perlicoles lors de la saison de greffe. La préparation des huîtres avant la greffe est très importante, elle doit favoriser la réussite de l'opération. Pour cela un nettoyage régulier des huîtres est nécessaire. Il est aussi impératif de faire une sélection rigoureuse des huîtres à greffer. La greffe est l'opération qui consiste à introduire, dans la poche perlière d'une huître perlière, un morceau de manteau, le greffon, d'une huître donneuse de la même espèce, ainsi qu'un noyau de nacre, le nucleus, support de la formation de la future perle. La perle est alors produite par sécrétion d'aragonite sur le nucleus, par l'épithélium externe du manteau, apporté dans la poche perlière par le greffon.

La sur-greffe est une opération pratiquée sur les huîtres qui ont rejeté le nucleus. Elle se fait au minimum six mois après la première opération. Les huîtres sur-greffées ont un taux de mortalité supérieure à celui des premières greffes. S'il y a de nouveau rejet du nucleus, les huîtres seront sacrifiées ou utilisées pour les mabe. De nombreux perliculteurs éliminent les huîtres qui ont rejeté leur nucleus, notamment s'ils ont un stock d'huîtres perlières important. Après la greffe, les huîtres porteuses sont remises en élevage sur des chapelets ou dans les paniers kangourou.

La récolte se fait environ 18 mois après la greffe. Les meilleures dates de récolte se situeraient en saison fraîche, car les couches nacrières sont à ce moment-là les plus fines. Le lustre et l'orient sont alors de qualité supérieure. La surgreffe est associée à la récolte. Le greffeur est sollicité pour extraire la perle et opère la surgreffe à la suite. La qualité de la perle et sa position dans la poche perlière permettent de pratiquer ou non la surgreffe. La surgreffe consiste, une fois la perle extraite, à insérer un nouveau nucleus de diamètre identique à celui de la perle récoltée afin de ne pas trop distendre le sac perlier déjà formé. La récolte suivante se fait au bout de 10 mois environ.

## 4. Matériel et Méthodes

### 4.1. Objectifs de la surveillance

Les objectifs de la surveillance épidémiologique sont :

- **déterminer la présence ou l'absence d'agents pathogènes** chez l'huître perlière *P. margaritifera* en Polynésie française ;
- **permettre d'établir une hiérarchie dans l'importance, économique ou sanitaire, entre les différents microorganismes pathogènes présents**, afin de déterminer les priorités d'action ;
- **suivre l'évolution de la situation afin de choisir d'entreprendre ou non des mesures prophylactiques appropriées** ou de modifier les modalités de ces mesures (épidémiosurveillance) ;
- **détecter l'apparition d'une maladie exotique ou nouvelle** dans la population d'huîtres perlières élevées en Polynésie française afin d'entreprendre une lutte précoce (épidémiovigilance) ;
- **s'assurer du statut indemne de maladies à déclaration obligatoire de l'OIE** sur le cheptel d'huîtres perlières de Polynésie française.

### 4.2. Objet de la surveillance

Les microorganismes pathogènes et les phénomènes pathologiques surveillés dans le cadre du REPANUI sont présentés ci-dessous.

#### 4.2.1. Agents pathogènes présents en Polynésie française

Les agents présents en Polynésie française ou sur les huîtres perlières et n'ayant pas un impact connu sont suivis :

- sporozoaire rattaché aux grégarines (Chagot, 1993) ;
- organismes de type rickettsie (Cochennec-Laureau, 2003 ; Comps, 1996) ;
- métazoaire : genre *Tylocephalum* spp. (Seurat, 1906), (Comps, 1999) ;
- mycose : *Ostracoclabe implexa* (PRL, 2004) ;
- nécrose du muscle adducteur (Comps, 1996).

#### 4.2.2. Agents pathogènes réglementés en Polynésie française

En plus des agents notifiables à l'OIE, un certain nombre d'agents pathogènes font partie des maladies à déclaration obligatoire en Polynésie française (Arrêté n°760 CM du 4 juin 2007, JOPF) (Annexe 1) :

- infection à *Haplosporidium nelsoni* ;
- infection à *Marteilia sydneyi*\*\* ;
- infection à *Marteilioides chungmuensis*\*\* ;
- infection à *Mykrocytos mackini* ;
- maladie de l'huître Akoya\*\*.

\*\* agents pathogènes présents dans la zone Asie-Pacifique.

#### 4.2.3. Agents pathogènes réglementés par l'OIE

Les organismes pathogènes responsables de maladies réglementées par l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale, 2006) et non représentées en Polynésie française, font aussi l'objet d'une vigilance quant au risque d'émergence dans la région :

- infection à *Bonamia ostreae* ;
- infection à *Bonamia exitiosa* ;
- infection à *Marteilia refringens* ;
- infection à *Perkinsus marinus* ;
- infection à *Perkinsus olseni* ;
- infection à *Xenohalotis californiensis* ;
- mortalité virale de l'ormeau.

#### 4.2.4. Agents pathogènes présents dans la zone Asie-Pacifique

Les organismes pathogènes présents dans la zone Asie-Pacifique, mais non enregistrés dans la liste des maladies notifiables à l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale), font aussi l'objet d'une vigilance accrue :

- infection à *Marteilioides chungmuensis* (Chun, 1979 ; Matsusato et Masumura, 1981) ;
- infection à *Marteilia sydneyi* ;
- maladie de l'huître Akoya (Miyazaki, 1999 ; Kobayashi, 1999) ;
- maladie de l'œdème de l'huître (OIE, 2006).

D'autres agents ne sont pas surveillés par le REPANUI. C'est le cas notamment des prédateurs (balistes, diodons, raies, poulpes, poissons perroquets, napoléons) qui peuvent entraîner la transmission de parasites ou un affaiblissement des individus, et des épibiontes (ascidies, éponges, anémones) qui peuvent créer des anomalies de croissance des huîtres (Thébault, 1999).

Le cas correspond à l'huître (l'individu), ou groupe d'huîtres, qui présente les caractéristiques de la maladie à étudier. Les différentes définitions des cas correspondantes aux agents pathogènes étudiés en Polynésie française sont reportées en annexe 1.

### **4.3. Population cible**

Dans le cadre de l'épidémiosurveillance, la population surveillée correspond aux huîtres perlières dont la classe d'âge visée est représentée par les adultes de 2 ans prêts à la greffe. Cette population surveillée correspond alors à une sous-population de la population cible. La surveillance n'est donc pas exhaustive sur la population totale d'huîtres. Une procédure d'échantillonnage a été mise en place pour éviter un impact économique trop important sur les élevages sélectionnés. Les prélèvements sont réalisés sur les huîtres en retour de greffe, soit présentant une poche perlière trop petite, soit non aptes (fragilisées).

Dans le cadre de l'épidémiologie, la population surveillée correspond à l'ensemble des individus de *Pinctada margaritifera* élevées en Polynésie française. Dans le cas des investigations post-alertes, on se contentera d'un échantillon représentatif de la population cible. La population échantillonnée représente alors une sous-population de la population cible.

## **4.4. Protocole de l'épidémiologie-surveillance**

### **4.4.1. Stratégie d'échantillonnage**

L'unité épidémiologique de base est représentée par une huître (individu). L'échantillonnage utilisé dans REPANUI correspond à un sondage à trois degrés (figure 1).

- le premier degré correspond à un échantillon en grappes. La grappe est constituée par une île qui représente un ensemble de fermes perlicoles ;
- le second degré correspond à un échantillonnage de fermes dans chaque grappe ;
- le troisième degré correspond à un échantillonnage d'huîtres dans chaque ferme perlicole. Au sein des fermes « sentinelles », on effectue un nouvel échantillonnage pour désigner les huîtres qui seront prélevées.

### **4.4.2. Zone de surveillance**

Chaque île (île haute ou atoll) faisant l'objet d'élevage perlicole est considérée comme constituant une zone d'élevage à part entière, en raison de son isolement géographique et de la présence d'un système hydro-biologique quasiment homogène et spécifique à chaque île. Elle constitue, par conséquent, une zone de surveillance. Au vu du grand nombre d'îles hautes ou atolls producteurs d'huîtres perlières (30 sur 117 îles), et de l'étendue du territoire de la Polynésie française comparable à celle de l'Europe, la surveillance épidémiologique s'est limitée au suivi sur cinq zones : Rikitea, Makemo, Gambier, Fakarava, Tahaa, Takarua. Pour l'année 2007, six zones ont été retenues, deux îles hautes et quatre atolls: Ahe, Arutua, Fakarava, Gambier, Tahaa, Takarua (figure 2).

Différents critères et contraintes ont dicté le choix des zones de prélèvement. Sont pris en compte :

- représentativité et importance de l'activité perlicole ;
- facilité d'accès (présence d'aéroport), d'antenne du Service de la Perliculture ou de perliculteurs relais et des coûts d'acheminements des prélèvements ;
- présence ou absence de collectage naturel ;
- introduction connue d'huîtres perlières provenant d'autres zones de Polynésie ;
- géomorphologie des îles : îles hautes caractérisées par un réseau fluvial ou atolls.

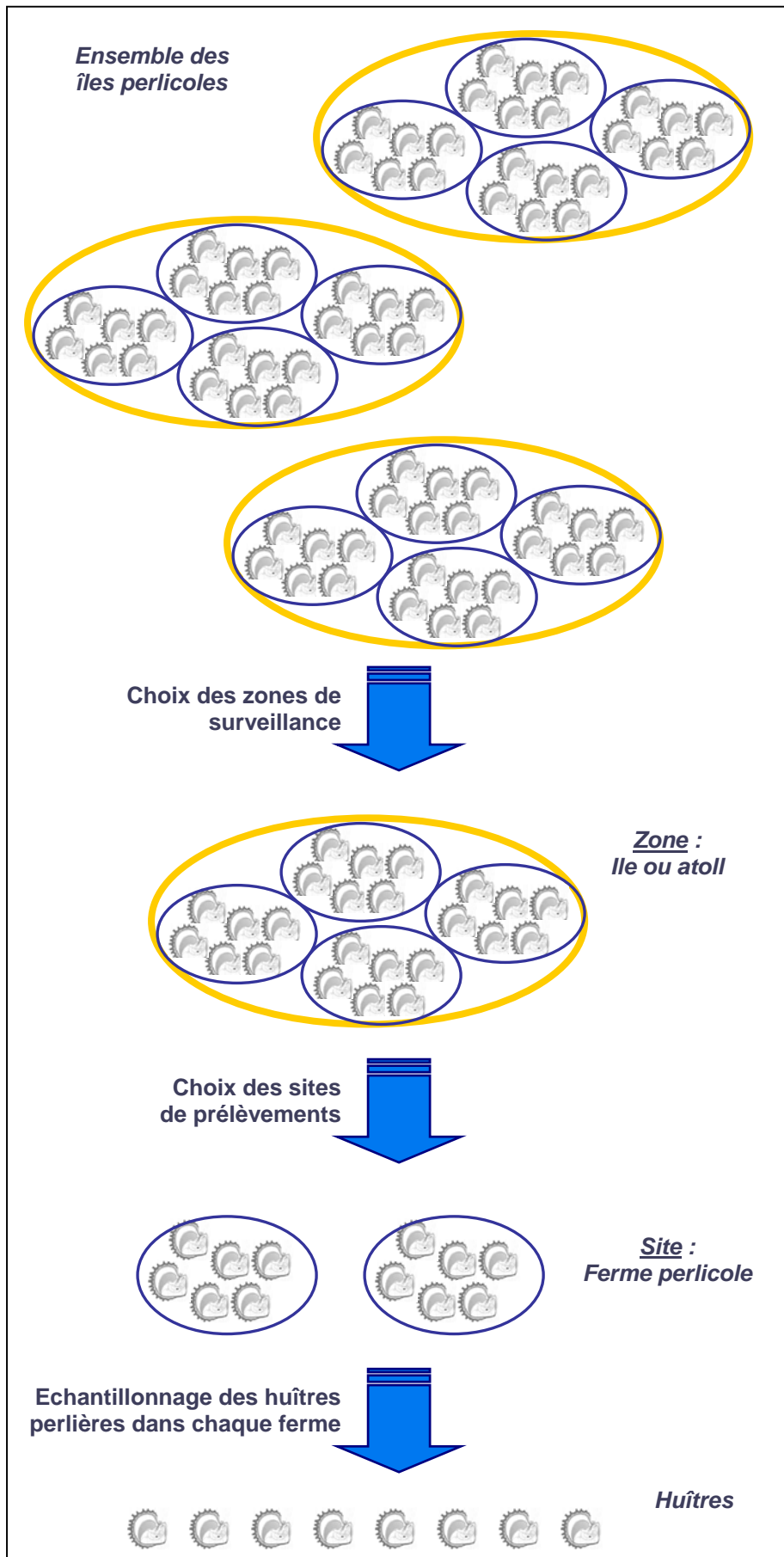
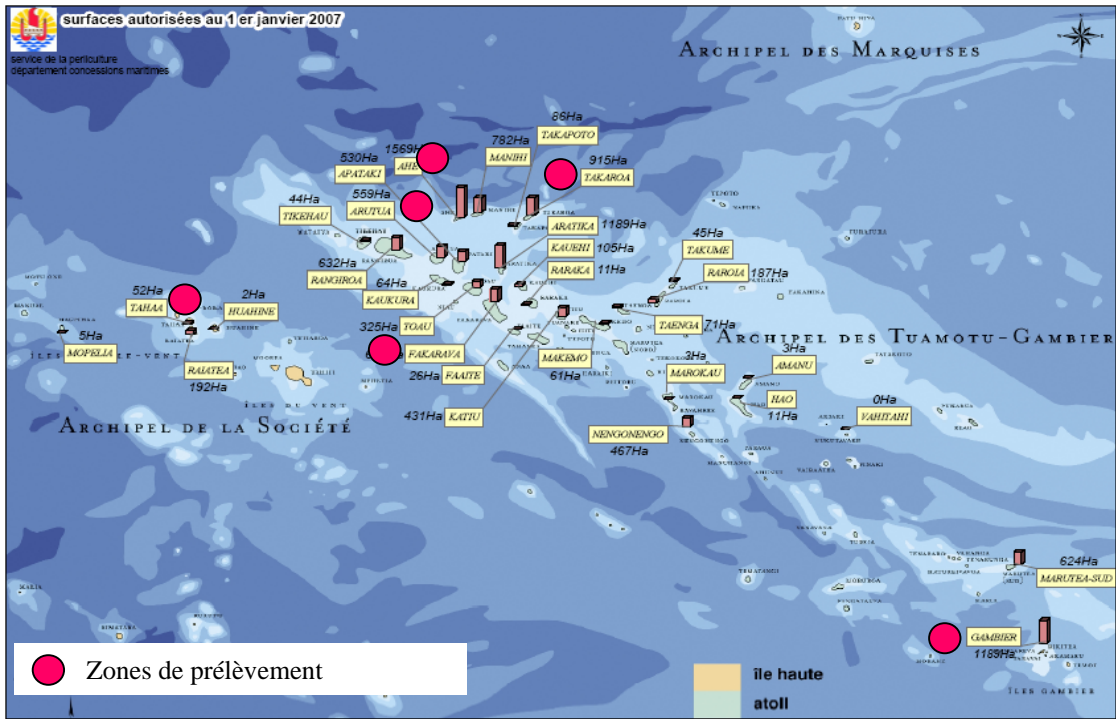


Figure 1 : Principe du sondage de l'épidémiologie



Deux sites par zone de prélèvement ont été définis et des échantillons de 30 huîtres et d'autres mollusques présents sont réalisés deux fois par an. Toutefois, à cause des contraintes de la perliculture et du coût élevé d'achat des huîtres perlières prêtes à greffer, il est basé sur les échantillons que nous fournissent les perliculteurs-relais qui correspondent souvent à des huîtres ayant rejeté un nucléus ou ne pouvant être greffées (poches perlières trop petites). Cet échantillon en grappe, répété et orienté peut présenter un biais pour les analyses. Toutefois il correspond aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la santé Animale (OIE) et permet de maximiser le diagnostic des maladies connues et listées par l'OIE. Il est représentatif de la zone suivie avec un seuil de détection à 95% pour un niveau de prévalence à 5% (OIE).

Figure 2 : Carte représentant en histogrammes les surfaces autorisées pour la perliculture dans les îles et atolls en Polynésie française et les sites de prélèvements du réseau REPANUI

#### 4.4.3. Sites de prélèvements intra-zone

De nombreux facteurs biotiques (âge des individus, état de maturation, rejet de greffe) et abiotiques (climat, pratiques d'élevage, transfert...) sont supposés avoir un impact sur le développement des maladies. Trois facteurs sont privilégiés pour orienter le choix des sites :

- densités d'élevage, en particulier lorsque l'activité pericole est importante,
- proximité de zones d'habitation avec les risques de pollutions anthropiques du milieu d'élevage et d'affaiblissement des huîtres perlières,
- hydrodynamisme qui peut entraîner une augmentation du pouvoir de dissémination des agents pathogènes en cas de courants forts, à proximité d'un hoa, par exemple.

Deux sites de prélèvements sont définis par zone de suivi, dans la mesure du possible (figure 3).

#### 4.4.4. Echantillonnage

Le principe de la surveillance épidémiologie que du REPANUI est basé sur une démarche qualitative. L'objectif de la démarche qualitative est la détection éventuelle de l'infection dans la population d'huîtres étudiée. Cette démarche permet de détecter la présence ou l'absence d'agents pathogènes par rapport au seuil choisi. Dans notre cas, le seuil de détection choisi correspond à un taux de prévalence limite de 5%, avec un indice de confiance de 5%. Par conséquent, si l'on identifie dans l'échantillon au moins une huître infectée, on considère que l'infection est présente dans la population. En revanche, en l'absence de résultat positif dans l'échantillon, on considère la population comme « indemne » de cette infection. En fait, la population peut être réellement indemne, ou bien infectée mais sans que l'étude ait permis de révéler l'infection.

La taille de l'échantillon est :

- Huîtres perlières

30 huîtres *P. margaritifera* sont prélevées par site de prélèvement, ce qui représente un échantillon de 60 huîtres par zone (annexe 2). Les huîtres sont directement prélevées sur les filières par les periculteurs. En concertation avec les agents de terrain du Service de la Periculture, les professionnels choisissent, si possible, les huîtres présentant des anomalies cliniques, des retards de croissance ou ayant été « rejetées » pour la greffe. Ce sont donc principalement des huîtres, en âge d'être greffées (18 mois à 2 ans), (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003, 2006).

- Mollusques bivalves sauvages

Si possible, une dizaine d'autres mollusques bivalves sont prélevés dans le voisinage immédiat des huîtres perlières (*Pinctada maculata*, *Saccostrea cucullata*, *Arcidae*, *Chamidae*, *Tridacnidae*...). Ainsi, les genres *Chamidae*, *Tridacnae* et *Arcidae* sont plus sensibles aux infections par *Perkinsus* sp., et peuvent tolérer, sans mortalité, des taux de prévalence élevés. Ces mollusques représentent donc de bons indicateurs de la présence de *Perkinsus* sp. et peuvent ainsi faciliter son identification dans les huîtres perlières (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003, 2006). Ces échantillons ne permettent en aucun cas une estimation de la prévalence des agents pathogènes dans la population de mollusques bivalves sauvages. Ils apportent, néanmoins, une information complémentaire par rapport à la détection des agents pathogènes dans les huîtres perlières.



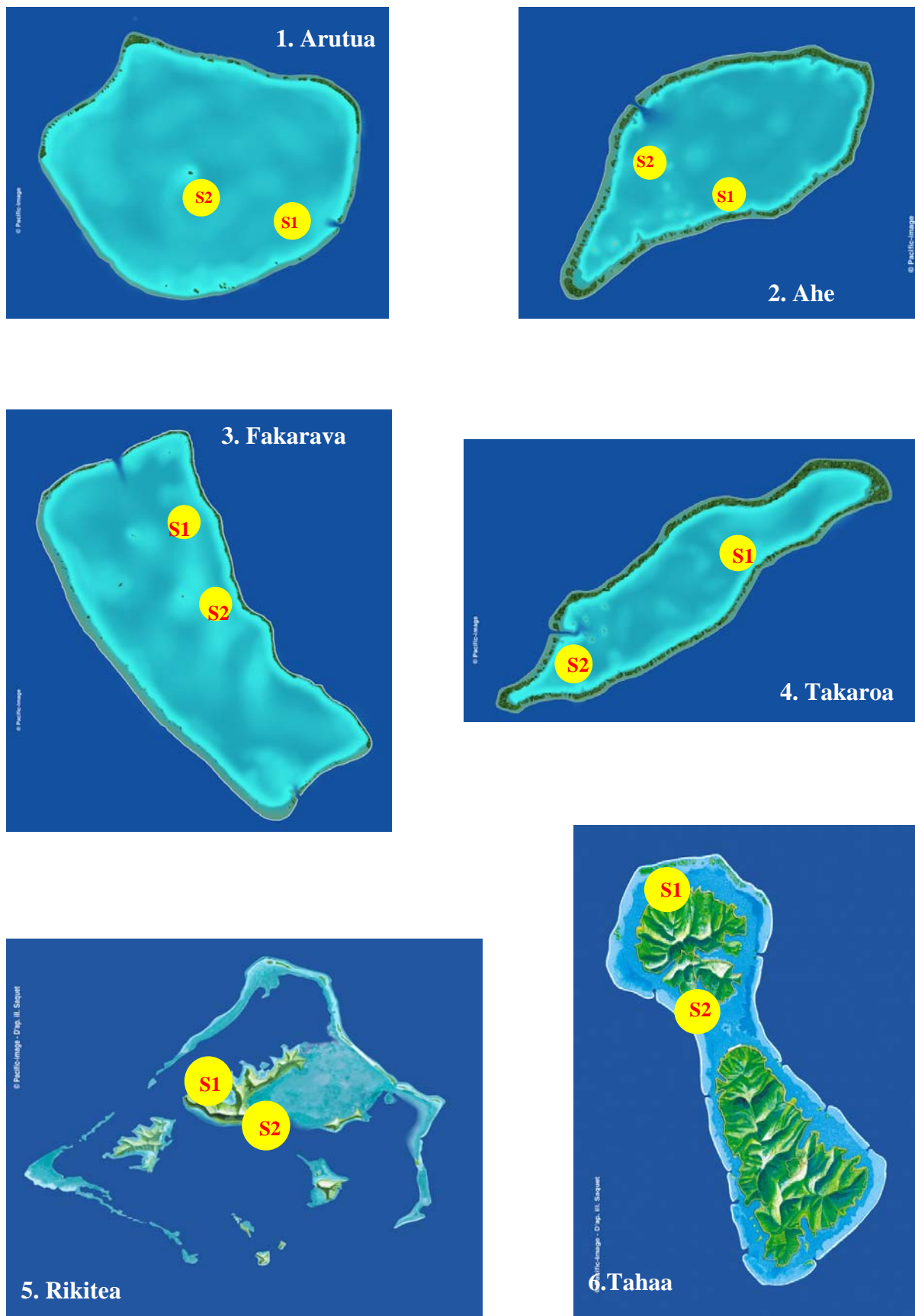


Figure 3 : Sites de prélèvement par zone de surveillance en 2007

#### **4.4.5. Périodes et fréquence des prélèvements**

Chaque site de prélèvements donne lieu à deux missions de prélèvements dans l'année : une campagne de janvier à avril et la seconde campagne de juillet à octobre (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003, 2006). Ces périodes ont été définies pour maximiser les chances de détection des parasites. En effet, le taux d'infection des agents pathogènes varie selon les saisons (froide ou chaude) avec les variations des températures de l'eau (OIE, 2006).

### **4.5. Prélèvements**

#### **4.5.1. Réalisation des prélèvements**

Après ouverture de l'huître, les tissus mous choisis sont prélevés (figures 4 et 5), puis immergés dans le liquide fixateur de Davidson (annexe 3), à raison de 10 volumes de fixateur pour un volume de tissus. Après 48 heures d'immersion, le fixateur de Davidson sera remplacé par de l'alcool à 70° jusqu'à envoi et réception des échantillons à la plate-forme technologique (SPE-PRL-IFREMER). Les étapes suivantes de préparation des échantillons, enregistrement du lot, mise en cassette des individus prélevés, déshydratation et imprégnation des tissus en paraffine, préparation des lames pour l'histologie sont réalisées au niveau de la plate-forme technique par un technicien du PRL (figure 6).

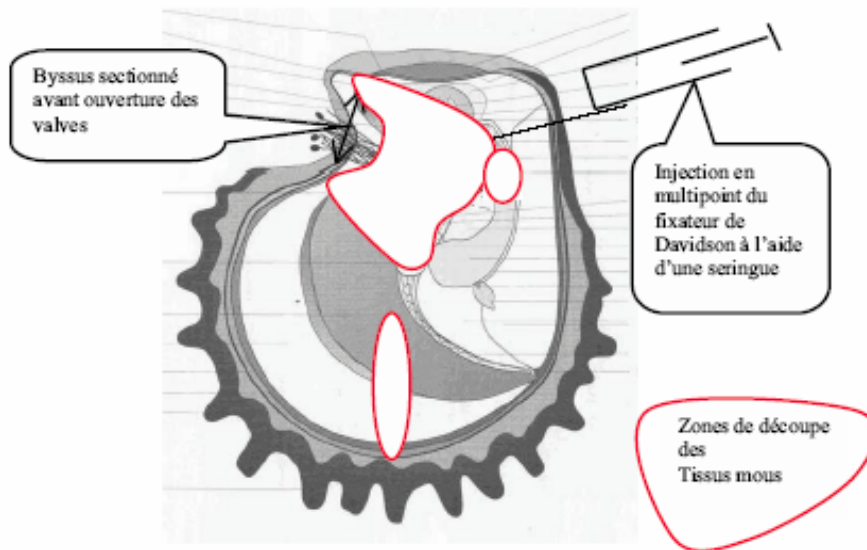


Figure 4 : Schéma des zones de découpe des tissus mous au moment de l'ouverture des huîtres perlières

### **4.6. Démarche d'analyses de laboratoire**

L'histologie est la technique de référence selon l'OIE pour la détection des agents pathogènes des mollusques. La sensibilité et la spécificité de cette technique d'analyse ne sont actuellement pas connues. Par défaut la taille de l'échantillon est déterminée selon le Manuel Aquatique de l'OIE. Une taille d'échantillon de 60 individus permet un seuil de détection d'une prévalence de 5% à un niveau de confiance de 95% (risque  $\alpha$  de 5%).

La coloration en première intention est la coloration à l'hématoxyline-éosine, qui colore les structures des organes. Elle peut être complétée lors de doute par la coloration de Feulgen et Rosenberg, qui colore les acides désoxyribonucléiques présents dans le noyau

des cellules. Ceci permet une meilleure visualisation des agents pathogènes de type rickettsie ainsi que des virus à ADN.

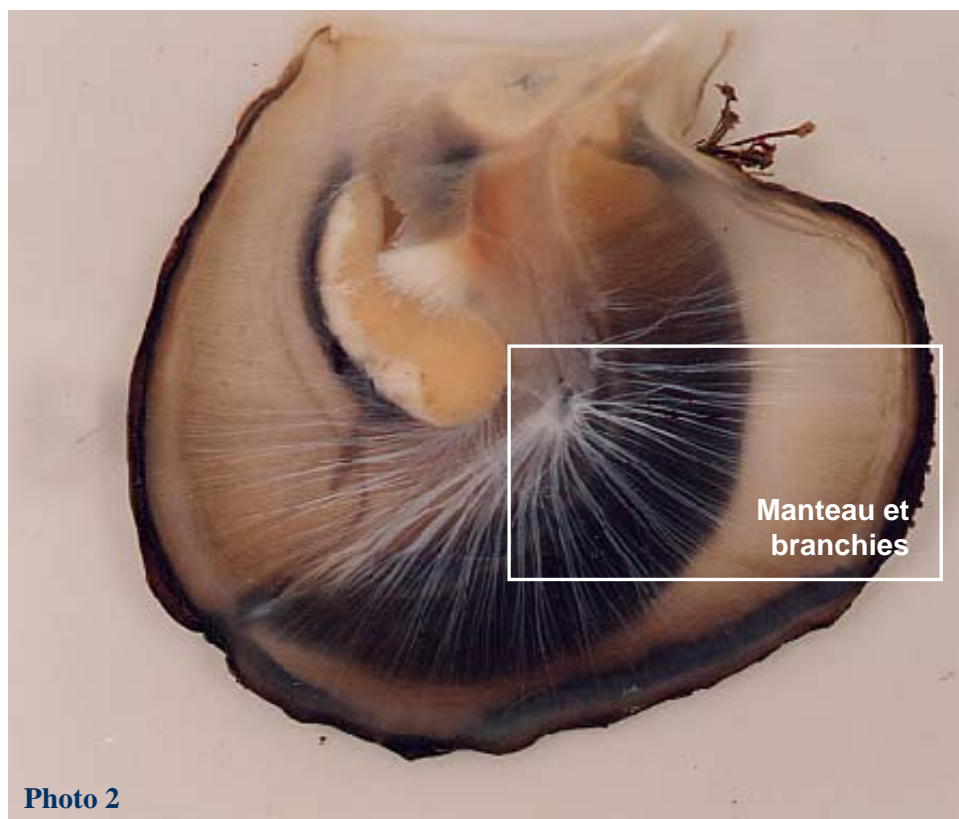
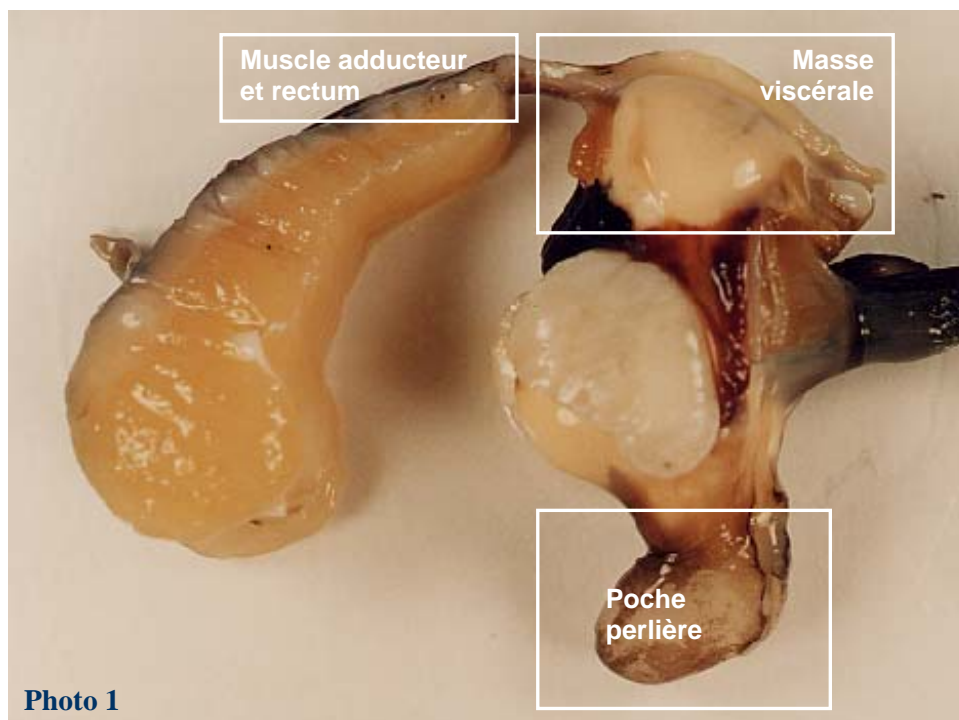


Figure 5 : Photographie montrant les organes et tissus à prélever sur une huître perlière (Photo 1 : masse viscérale ; photo 2 : manteau et branchies).

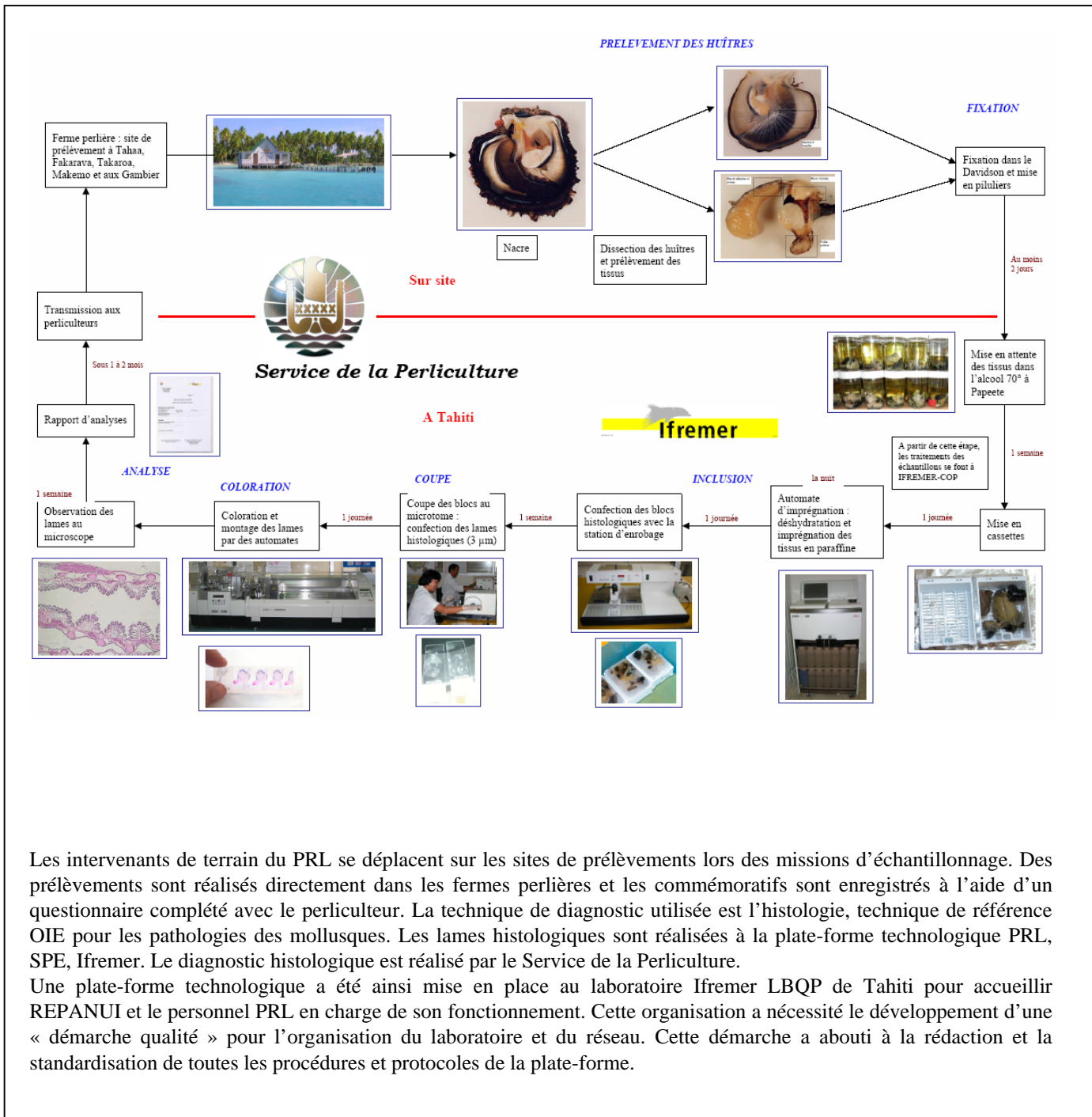


Figure 6 : Démarche diagnostique en épidémiologie du réseau REPANUI

#### **4.7. Protocole de l'épidémiologie-vigilance**

La déclaration de mortalités ou morbidités anormales (15% en 15 jours) se fait par les perliculteurs au Service de la Perliculture. Une enquête téléphonique doit est alors réalisée par le Service de la Perliculture à l'aide d'un questionnaire de mortalité, afin de déterminer l'origine du phénomène (annexe 5). Si une origine infectieuse est suspectée, une cellule de crise se réunira afin de mettre en place les mesures nécessaires. Une commission de visite du REPANUI sera dépêchée sur les zones atteintes afin de procéder aux enquêtes et aux prélèvements. Les résultats obtenus permettront à la Cellule de crise d'apprécier la situation épidémiologique. Les étapes du plan d'urgence sont récapitulées sur la figure 7.

#### **4.8. Données utilisées**

Les données utilisées dans ce bilan proviennent des résultats des analyses histologiques obtenus de 2004 à 2007. Les données obtenues en 2003 ont été exclues de cette étude. En effet, cette période correspond à la mise en place du réseau et à la formation du cadre aux diagnostics des pathologies des mollusques, ce qui risque de biaiser les résultats. Les données des années 2004 à 2007 comprennent les données obtenues lors des deux campagnes annuelles.

#### **4.9. Traitement des données**

Les résultats obtenus ont permis de déduire la présence ou l'absence d'agents pathogènes. Le seuil limite de détection étant de 5% sur chaque zone de surveillance avec un indice de confiance de 95%.

Les fréquences de détection ont été calculées sous forme de taux avec un intervalle de confiance de 95%. Les fréquences de détection sont calculées par type d'agent pathogène présent, agrégées sur l'année et sur chaque campagne afin de suivre l'évolution de la présence de ces agents pathogènes. L'évolution de la fréquence de détection des organismes parasites a été analysée par le test du Chi<sup>2</sup>. On peut aussi utiliser le test de l'écart réduit, qui donne les mêmes résultats statistiques (annexe 6).

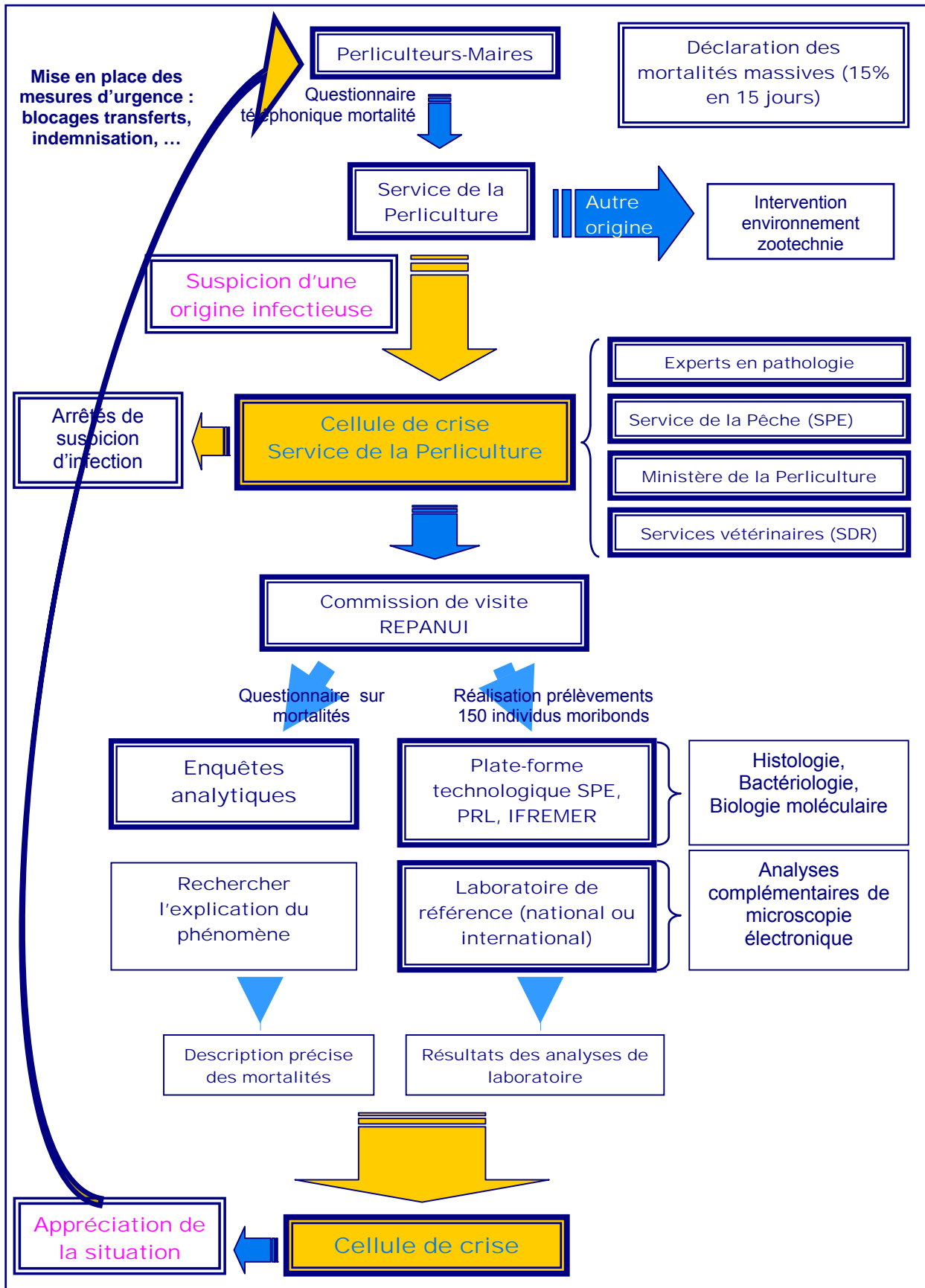


Figure 7 : plan d'urgence en épidémiologie du REPANUI

## 5. Résultats

### 5.1. Situation sanitaire des huîtres perlières en Polynésie française

#### 5.1.1. Bilan global

La surveillance épidémiologique réalisée de 2004 à 2007 a permis d'analyser 2797 huîtres perlières. La présence de trois agents pathogènes : les grégarines (sporozoaire), des parasites rickettsie-like (procaryote) et des kystes de *Tylocephalum* sp. (Métazoaire) a été rapportée. Ceci suppose que leur prévalence est donc supérieure à 5% dans la population d'huîtres perlières de chaque zone de surveillance, avec un indice de confiance de 95%.

De plus, aucune maladie réglementée par l'OIE n'a pu être mise en évidence chez les huîtres perlières *P. margaritifera* et chez les autres espèces de bivalves étudiées sur la zone de surveillance pendant la période d'étude. De part ces résultats négatifs, on peut noter que la prévalence de ces maladies est inférieure au seuil de prévalence limite défini dans le protocole, voire nulle, ce qui n'a pas permis de les détecter.

Grâce à l'épidémiologie, un phénomène de mortalité ou de morbidité anormales a été déclaré au Service de la Perliculture, puis démenti, pendant la période d'étude.

L'ensemble des analyses histologiques effectuées sur les prélèvements chez les autres bivalves d'une même zone a permis d'identifier chez ces espèces les mêmes organismes que chez les huîtres perlières, des grégarines, des organismes de type rickettsien et des zones d'enkystement de métazoaires. Ceci confirme donc les résultats obtenus à partir des échantillons d'huîtres perlières.

Sept autres espèces de mollusques ont été prélevés et analysés sur la période de 2004 à 2007. Il s'agit de *Pinctada maculata* (pipi), de *Saccostrea cucullata* (kapi kapi), de *Chamidae* (*Chama* sp.), *Isognomon* sp., palourdes de corail, *Lithophaga* sp., arca et monia. Sur 493 mollusques bivalves prélevés, 246 *P. maculata*, 93 *S. cucullata*, 50 *Chama* sp., 94 *Isognomon* sp., 2 palourdes de corail, 2 *Lithophaga* sp., 1 arca et 4 monia ont été analysés au total sur l'ensemble de la période d'étude. Les mêmes parasites ont été décelés : les grégarines, les rickettsie-like et les kystes de métazoaire. Seule exception en 2006 avec la détection de larves de trématodes sur un individu de *S. cucullata*.

Les grégarines sont situées dans l'appareil digestif au niveau de l'épithélium haut et/ou bas. Cette localisation est la même que chez les huîtres perlières. La présence de rickettsie-like est la première description chez *S. cucullata* en Polynésie. Ces parasites apparaissent comme des « masses » violettes, qui correspondent à des cistes contenant les colonies bactériennes. Ils sont généralement observés au niveau des filaments branchiaux et des épithéliums digestifs. Leur présence entraîne une déformation des cellules branchiales ou des cellules épithéliales sans qu'une réaction inflammatoire massive consécutive de l'hôte soit notée. Les taux d'infection restent bas puisque seules quelques rickettsies (< 10) sont observées par individu analysé.

Des zones d'enkystement ont été observées et correspondent aux réactions inflammatoires associées à la présence de métazoaires, vraisemblablement des cestodes du genre *Tylocephalum* sp. (aux vues des images histologiques). Les réactions inflammatoires se caractérisent par la présence de nombreux hémocytes au niveau de l'infection et par la présence de « gangues » fibreuses entourant le cestode. Une infection par des larves de vers trématodes a été observée dans les tissus gonadiques chez *S. cucullata* en 2006. Il s'agit de la première infection observée chez cette espèce. Le diagnostic se caractérise par l'observation de coupes transversales de larves de trématodes à l'intérieur de rédie (sorte de gangue). Ces larves ont une taille comprise entre 0,05 et 0,1 mm. Des larves de trématodes du genre *Buchephalus* spp. ont déjà été rapportées chez *Tridacna maxima* en Polynésie.

### 5.1.2. Grégarines

Des parasites de type grégarine se présentent sous la forme de cellules allongées d'environ 15 à 30µm (figure 8). Bien que le cycle des sporozoaires de type grégarine soit plus complexe, seule cette forme parasitaire unicellulaire a été jusqu'à présent observée dans les tissus des huîtres infectées.

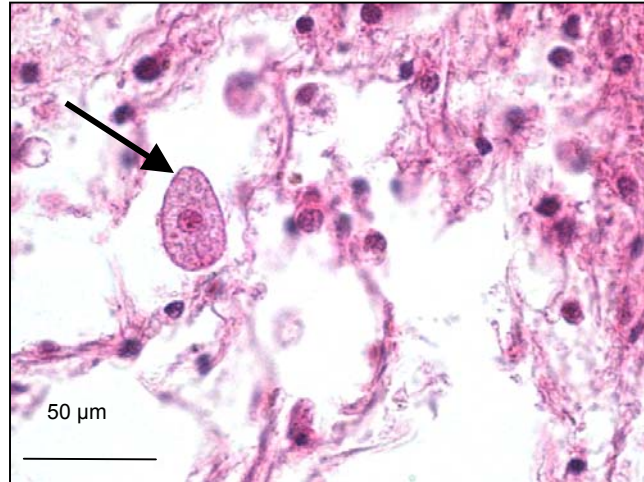


Figure 8 : Coupe histologique de grégarine libre dans le tissu conjonctif d'une huître perlière (flèche), (x1000)

Ces parasites ont été observés chaque année dans les prélèvements provenant de toutes les zones de surveillance. Les grégarines sont des parasites intracellulaires des cellules de l'épithélium cylindrique digestif (figure 9). Ces parasites ont été couramment observés et n'ont pas été associés à des réactions de défense de l'hôte. De plus, l'état physiologique et la croissance des huîtres ne sont pas modifiés par leur présence (Comps *et al.*, 2001).

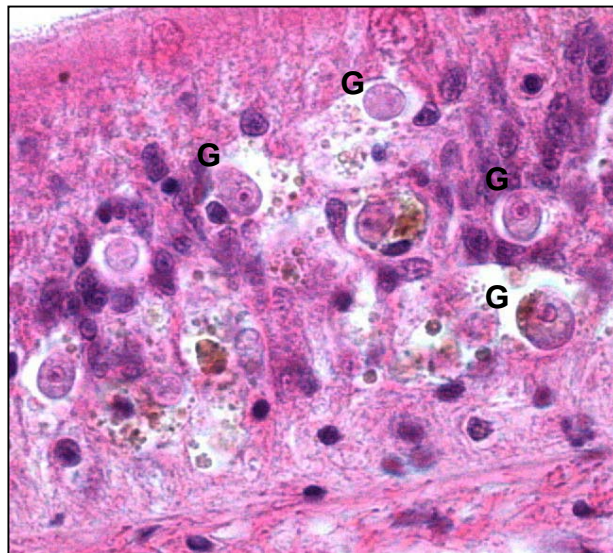


Figure 9 : Parasites de type grégarine (G) dans les huîtres perlières avec désorganisation de l'épithélium associé à la présence de nombreux parasites (x600)



Les grégarines sont retrouvés à différents niveaux de l'appareil digestif des huîtres et leur localisation peut s'étendre de l'épithélium du rectum jusqu'aux portons hautes de l'intestin et quelques parasites ont été trouvés dans les palpes labiaux (figure 10).

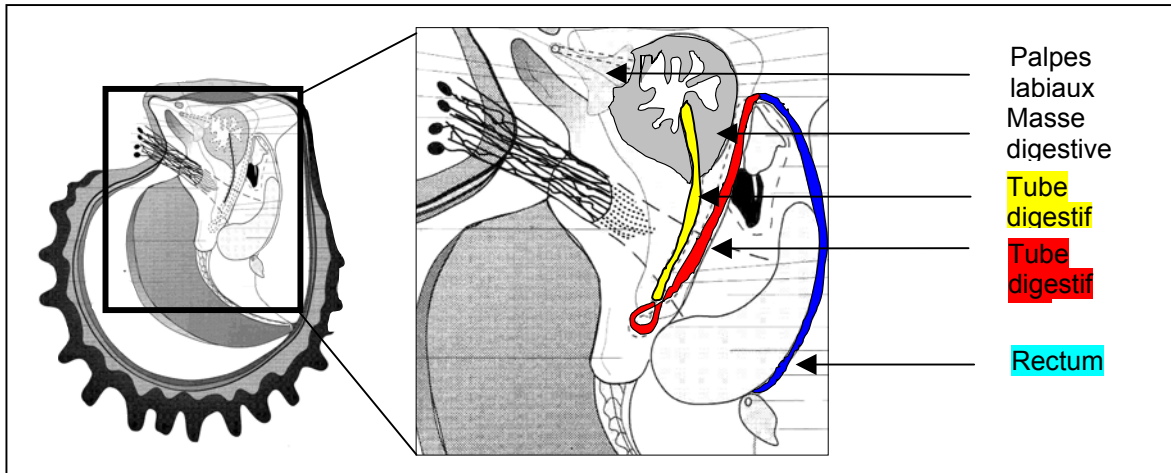


Figure 10 : Schéma détaillant l'appareil digestif de *P. margaritifera*

Pour quelques individus, des parasites sont retrouvés libres dans le tissu conjonctif de la masse digestive, de la gonade ou dans l'épithélium des diverticules digestifs. Les huîtres infestées ne présentent que peu ou pas de réaction inflammatoire en réponse à leur présence. Dans quelques cas d'infection plus importante, une désorganisation partielle des cellules épithéliales digestives, parfois accompagnée d'une lyse de l'épithélium peut être observée (figure 11).

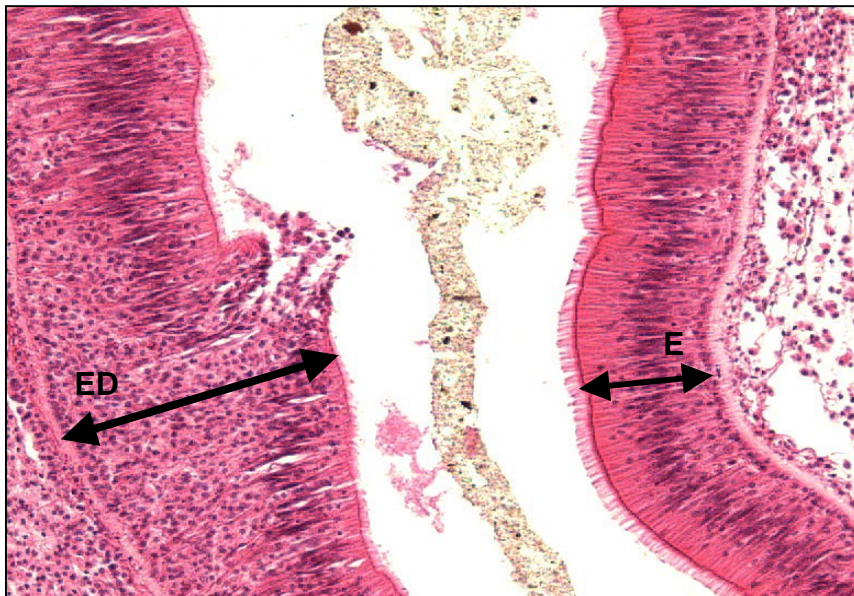
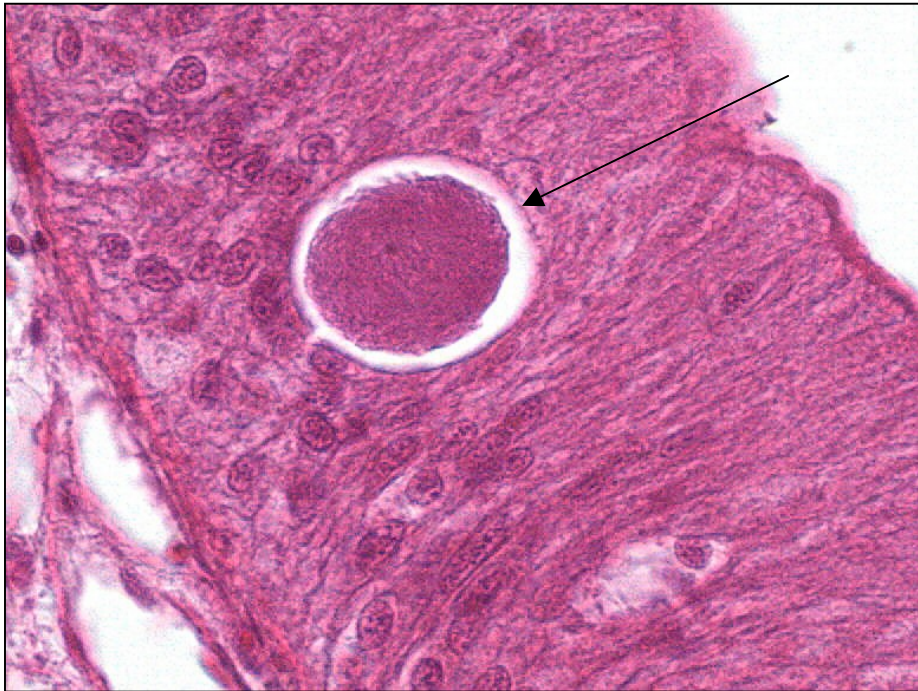


Figure 11 : Réactions consécutives à une infestation importante par des grégarines dans l'épithélium digestif : épithélium désorganisé (flèches) (ED) présentant un épaissement important par rapport à un épithélium normal (E) suite à la présence de nombreux parasites (x100)

Chez certains individus, l'infection est plus importante, et les grégarines sont observées dans certains tubules digestifs et dans le tissu conjonctif. Ces localisations sont peu fréquentes et souvent associées soit à une désorganisation de l'épithélium, soit à une infiltration hémocytaire.

### **5.1.3. Rickettsie-like**

Des organismes apparentés à des rickettsie-like se présentent sous la forme d'une enveloppe contenant des micro-colonies bactériennes (figure 12). Ce sont des bactéries Gram (-) à développement intracellulaire obligatoire.



*Figure 12 : Organismes de type rickettsien (flèches) au niveau de l'épithélium d'un conduit digestif (x600)*

Ces parasites ont été également diagnostiqués chaque années dans les huîtres provenant de toutes les zones de surveillance. Ces parasites sont présents dans les épithéliums du tube digestif et des tubules digestifs (figure 13). Aucune réaction inflammatoire de défense de l'hôte n'est notée associée à leur présence. Une coloration spécifique de Feulgen et Rosenberg a permis de confirmer la présence de ces microcolonies dans les épithéliums.

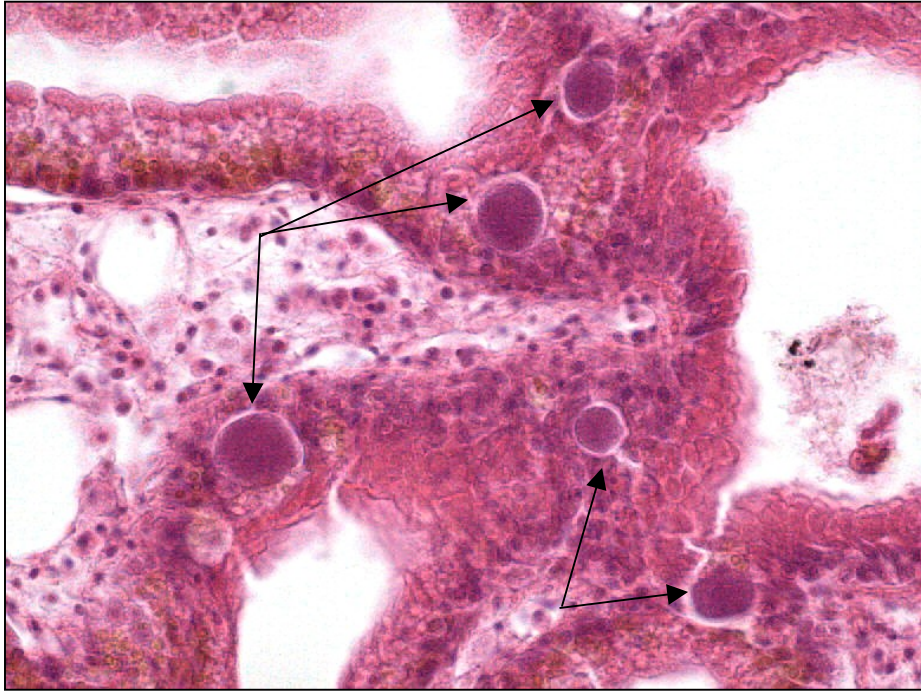


Figure 13 : Organismes de type rickettsien (flèches) au niveau de l'épithélium des tubules digestifs (x200)

#### **5.1.4. Kystes de métazoaire**

Les différentes analyses effectuées montrent des zones d'enkystement de métazoaires associées à des réponses inflammatoires importantes. Les métazoaires n'ont pu être déterminés par les techniques histologiques utilisées. Ces zones présentent différents aspects. Elles sont souvent observées au niveau du tissu conjonctif de la masse digestive (figure 14). Des kystes ont été observés dans les ganglions nerveux et au niveau des filaments branchiaux (figure 15). Il s'agit de localisations plus rares.

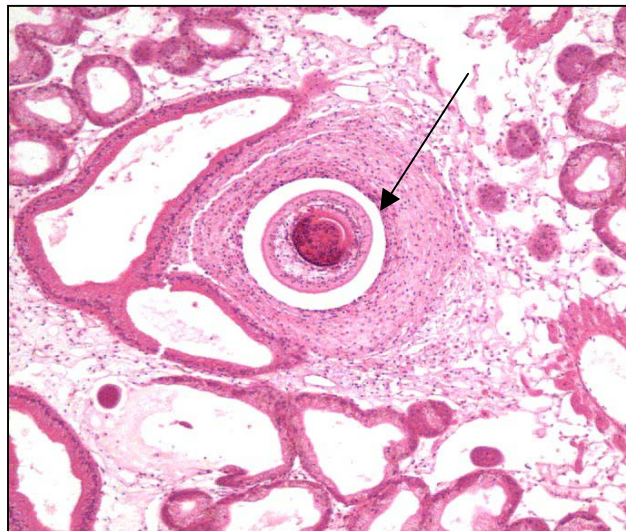


Figure 14 : Différentes formes d'enkystement (flèches) dans le tissu conjonctif de la masse digestive (x400)



Figure 15 : Différentes formes d'enkystement (flèches) dans les filaments branchiaux (x250)

Ces enkystements correspondent aux mécanismes développés par l'huître en réponse à la présence dans ses tissus de métazoaires. Ces organismes sont trop gros pour être phagocytés. L'huître s'y oppose par la mise en place d'une réaction inflammatoire plus ou moins importante complétée par un développement de tissu fibreux cicatriciel autour du métazoaire. Ces zones d'enkystement et d'inflammation sont probablement dues à la présence dans les tissus de cestodes du genre *Tylocephalum* sp. (Figure 16). Ces organismes ne représentent pas un risque majeur de maladie.

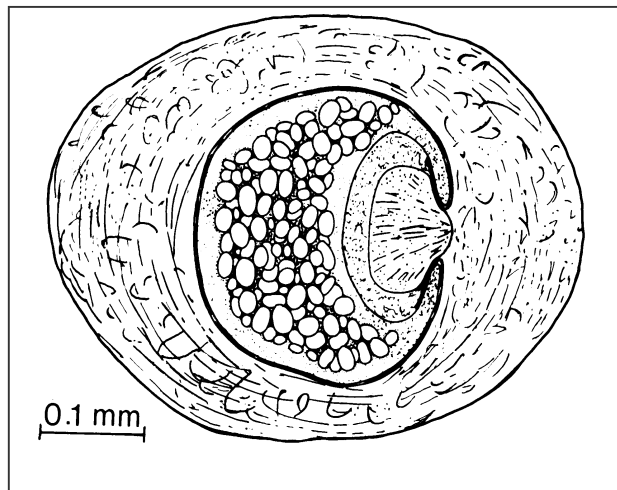
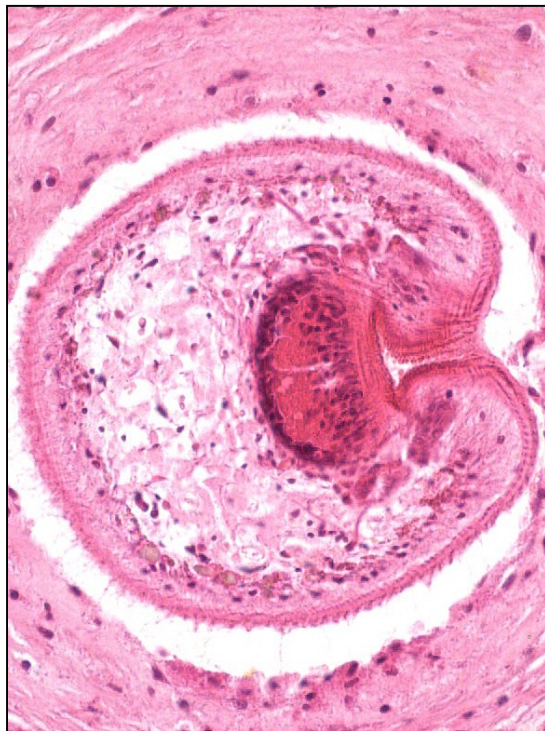


Figure 16 : Coupe (x600) et schéma du cestode *Tylocephalum* sp

## **5.2. Evolution de la situation sanitaire des huîtres perlières en Polynésie française**

### **5.2.1. Bilans annuels**

#### *- Fréquences de détection en 2004*

Neuf missions de prélèvements ont eu lieu en 2004 : une mission (correspondant à la première campagne) à Rikitea, deux missions à Fakarava, deux missions à Tahaa, deux missions à Takaroa et deux missions à Makemo. Cela correspond donc à environ 120 prélèvements pour chaque zone, sauf pour Rikitea qui s'élève à 60 prélèvements.

Sur un total de 537 huîtres échantillonnées en 2004, les fréquences de détection estimées avec un indice de confiance de 95% pour chaque catégorie d'agents pathogènes présents sont les suivants :

- Les grégarines représentent 78,0% [74,5 – 81,5 %]
- Les parasites de type rickettsien représentent 5,4% [3,5 – 7,3 %]
- Les kystes de *Tylocephalum* sp. représentent 4,7% [2,9 – 6,5%]

#### *- Fréquences de détection en 2005*

Dix missions de prélèvements ont eu lieu en 2005 : deux missions à Rikitea, deux missions à Fakarava, deux missions à Tahaa (dont la deuxième mission ne comprend qu'un seul site de prélèvement), deux missions à Takaroa et deux missions à Makemo. Cela correspond donc à environ 120 prélèvements pour chaque zone, sauf pour Tahaa qui s'élève à 86 prélèvements.

Sur un total de 563 huîtres échantillonnées en 2005, les fréquences de détection estimées avec un indice de confiance de 95% pour chaque catégorie d'agents pathogènes présents sont les suivants :

- Les grégarines représentent 71,2% [67,5 – 75,0 %]
- Les parasites de type rickettsien représentent 11,5% [8,9 – 14,1 %]
- Les kystes de *Tylocephalum* sp. représentent 13,9% [11,0 – 16,8 %]

#### *- Fréquences de détection en 2006*

Dix missions de prélèvements ont eu lieu en 2006 : deux missions à Rikitea, deux missions à Fakarava, deux missions à Tahaa (dont chaque mission ne comprend qu'un seul site de prélèvement), deux missions à Takaroa et deux missions à Ahe. Cela correspond donc à environ 120 prélèvements pour chaque zone, sauf pour Tahaa qui s'élève à 62 prélèvements.

Sur un total de 553 huîtres échantillonnées en 2006, les fréquences de détection estimées avec un indice de confiance de 95% pour chaque catégorie d'agents pathogènes présents sont les suivants :

- Les grégarines représentent 77,6% [74,1 – 81,1 %]
- Les parasites de type rickettsien représentent 6,7% [4,6 – 8,8 %]
- Les kystes de *Tylocephalum* sp. représentent 9,0% [6,7 – 11,4 %]

#### *- Fréquences de détection en 2007*

Quinze missions ont été effectuées en 2007. Douze missions de prélèvements dans le cadre du réseau : deux à Rikitea, deux à Fakarava, deux à Tahaa, deux à Takaroa, deux à Ahe et deux à Arutua. De plus trois missions ont été effectuées dans le cadre de

prélèvements pour d'autres missions. Nous en avons profité pour faire un point sur des stocks sauvages : une aux Scilly, une à Bellinghausen et une à Mopelia. Cela correspond donc à environ 60 prélèvements pour chaque zone (soit 120 prélèvements par an), sauf pour Tahaa où l'échantillon s'élève à 60 prélèvements pour l'année.

Sur un total de 660 huîtres échantillonnées en 2007, dans le cadre du réseau, les fréquences de détection estimées avec un indice de confiance de 95% pour chaque catégorie d'agents pathogènes présents sont les suivants :

- Les grégarines représentent 87,6% [83,4 – 91,7 %]
- Les parasites de type rickettsien représentent 5,0% [2,2 – 7,7%]
- Les kystes de *Tylocephalum* sp. représentent 8,7% [5,2 – 12,3 %]

Pour les huîtres analysées en dehors du réseau, les résultats histologiques montrent 68.75% (22/32), 81.25% (26/32) et **0% (0/21) de présence de grégarine** respectivement pour les huîtres de Mopélia, Scilly et **Bellinghausen**. **Aucun organisme de type rickettsien n'a été observé sur les trois origines de prélèvements. Les huîtres présentaient par contre, des taux d'infection par des cestodes** de 6.25% (2/22), 28.2% (9/32) et **60%** (12/20) respectivement pour Mopélia, Scilly et **Bellinghausen**.

### 5.2.2. Evolution annuelle

Des parasites de type grégarines, rickettsie-like et kystes de métazoaire ont été observés chaque année dans les prélèvements provenant de toutes les zones sauf pour les huîtres sauvages de Bellinghausen qui ne présentaient pas de Grégarine. La figure 17 montre l'évolution temporelle des taux de prévalence depuis 2004.

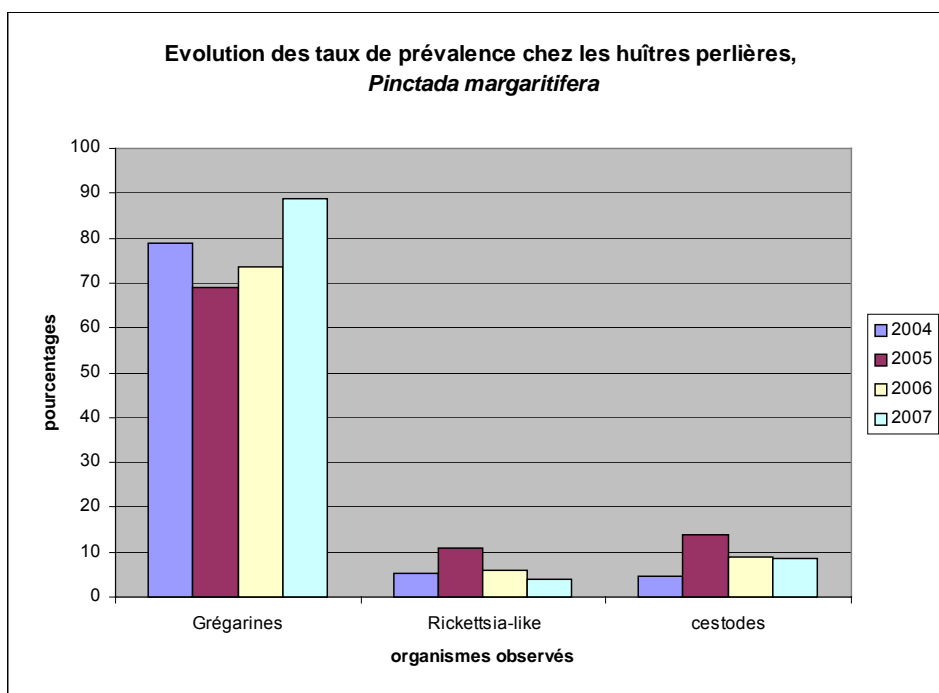


Figure 17 : Evolution des agents pathogènes chez l'huître perlière en Polynésie française de 2004 à 2007

Pour les grégarines, on observe une tendance à l'augmentation (significatif avec  $p = 0,0017$ ). Des variations annuelles sont observables.

Pour les rickettsie-like, on observe une tendance stable (non significatif avec  $p = 0,8079$ ). Des variations annuelles sont observables, mais l'évolution générale reste stable au cours des années.

Pour les kystes de métazoaire, on observe une tendance à l'augmentation en 2005 (significatif avec  $p = 0,0265$ ) qui se réduit à nouveau par la suite. Les taux de prévalence restent bas. Des variations annuelles sont observables.

## 6. Discussion

Les résultats obtenus à partir de la surveillance épidémiologique réalisée dans le cadre du REPANUI ont permis d'évaluer la présence des agents pathogènes présents en Polynésie française et d'en estimer leurs taux de prévalence. Cependant, il faut garder à l'esprit que le protocole de surveillance contient des biais d'échantillonnage. Notamment, une absence de tirage au sort lors de l'échantillonnage à chaque degré, c'est-à-dire lors de l'échantillonnage des zones de surveillance, des sites de prélèvements et des huîtres perlières prélevées dans les fermes. L'échantillonnage est, en effet, orienté puisqu'il est déterminé par le perliculteur en fonction des contraintes de l'élevage en cours ; ce dernier fournissant majoritairement des huîtres ayant été rejetée pour la greffe. Cet échantillonnage permet une détection plus ciblée des organismes parasites des huîtres perlières et donc permet une optimisation du diagnostic d'agents pathogènes potentiels. Malgré tout, et aux vues des contraintes importantes en Polynésie française, de part le transport et l'accessibilité des îles, il n'en reste pas moins que cette surveillance et ces résultats représentent une bonne détection de la présence ou non d'organismes pathogènes.

Des biais d'observation peuvent être notés au niveau du terrain. Tout d'abord, des biais du aux intervenants sur la qualité des prélèvements : par exemple, certains tissus peuvent être absents des prélèvements, ou d'autres sont endommagés par la technique de prélèvement (utilisation de ciseaux au lieu du scalpel). Ensuite, on constate un biais dans l'échantillon par le non respect de la taille d'échantillon recommandée et prédéfinie. Ceci peut poser des problèmes par la suite, quant à leur interprétation. Ils ne sont toutefois pas fréquents.

Il est également important de rappeler que la surveillance épidémiologique du REPANUI suit une approche qualitative qui permet de déterminer la présence ou l'absence d'agent pathogène par rapport à un seuil de prévalence limite. La taille d'échantillon correspondant à cette démarche ne nous permet pas de calculer les taux de prévalence, notamment du fait de l'échantillonnage orienté. Les estimations de la fréquence de détection ont été calculées à partir des données agrégées sur une année pour arriver à une précision des estimations. Les estimations des fréquences de détection peuvent présenter une surévaluation des prévalences réelles. Ceci permet, néanmoins, de connaître le niveau de la présence des organismes pathogènes chez les huîtres perlières de Polynésie française.



## 7. Conclusions et perspectives

Cette dernière année d'évaluation et de validation du réseau de surveillance épidémiologique des pathologies de l'huître perlière *P. margaritifera* en Polynésie française a permis de faire un bilan des résultats obtenus depuis le début du fonctionnement du REPANUI. **Ceci a permis de confirmer la pertinence d'un tel réseau en Polynésie française.**

Concernant la situation épidémiologique sur la population d'huître perlière de Polynésie française, **on peut affirmer, avec un indice de confiance de 95%, que le Territoire est indemne des maladies répertoriées à l'OIE et réglementées en Polynésie française.** Il faut toutefois rester vigilants sur les déclarations de mortalité ou morbidité anormale. Ceci est satisfaisant du point de vue de l'élevage perlicole sur le Territoire. La présence de quelques parasites, non pathogènes majeurs, ne représente pas un danger important. Cependant, ces parasites augmentent le risque de sensibilité de l'huître perlière lors de l'étape de greffe, qui demande une bonne cicatrisation.

Au sujet de la surveillance épidémiologique réalisée dans le cadre du REPANUI, il convient de noter la pertinence des objectifs, bien que la réalisation sur le terrain soit gênée par les multiples contraintes inhérentes à la géographie du Territoire et à la technique de perliculture. **Le renforcement de l'épidémiologie par la mise en place du nouveau plan d'urgence en cas de mortalités anormales permettra d'améliorer la détection des agents pathogènes et la réactivité lors de fortes mortalités, ce qui n'a pas été le cas lors du « syndrome 85 ».**

Au niveau des résultats, les années à venir vont permettre de confirmer ou d'infirmer les tendances actuelles. Il serait d'ailleurs intéressant de pouvoir multiplier le nombre d'analyses sur les sites sauvages. Ces huîtres représentent en effet un excellent indicateur sentinelle de santé de populations d'huîtres n'ayant jamais bougés.

Le statut indemne actuel de la Polynésie française par rapport aux maladies réglementées par l'OIE, pourrait permettre d'envisager des mesures défensives face à l'introduction potentielle d'agent infectieux exotique. Les décisions concernant ces mesures doivent être prises par le Ministère de la Perliculture, afin de protéger la filière perlicole. Ceci permettrait de renforcer les recommandations déjà existantes, comme par exemple la désinfection du matériel de greffe en provenance de Chine, où des maladies existent, ou encore le contrôle sanitaire des mollusques importés sur le territoire.

## 8. Bibliographie citée

- ARZUL, I., GARCIA, C., MIOSSEC, L., JOLY, J.P., CHOLLET, B., ROBERT, M. (2004). Bilan 2003 du réseau REPAMO, Réseau national de surveillance zoosanitaire des mollusques marins. IFREMER, mars 2004. 45 p.
- CHAGOT, D., FOUGEROUSE, A., WEPPE, M., MARQUES, A., BOUIX, B. (1993) Présence d'une grégarine (Protozoa Sporozoa) parasite de l'huître perlière à lèvres noires *Pinctada margaritifera* (L., 1758) (Mollusca Bivalvia) en Polynésie française. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1993, **33**, 213-219.
- CHOI, K.S., WILSON, E.A., LEWIS, D.H. , POWELL, E.N., RAY, S.M. (1989).The energetic cost of Perkinsus marinus parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *J. Shellfish Res.*, 1989, 8, 125-131.
- CHOU, Y.H., LI, H.J., LO, C.F. (1994). Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish pathology*, 1994, 29, 87-89.
- CHOU, Y.H., CHANG, S.J., LEE, H.Y., CHIOU, Y.C. (1998). Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathology*, 1998, 33, 213-219.
- CHUN, S.K. (1979) Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). *Bull. Korean Fish. Soc.*, 1979, 12, 281-285.
- COCHENNEC-LAUREAU, N., LEVY, P., SAULNIER, D., FOUGEROUSE, A. (2003). Mise en place d'un Réseau de Veille Zoosanitaire des huîtres perlières *Pinctada margaritifera* en Polynésie française. Rapport final de la Convention n°3.0232 du 23 avril 2003 entre le Service de la Perliculture et l'IFREMER – COP. IFREMER, 2003. 44 p.
- COCHENNEC-LAUREAU, N., FOUGEROUSE, A., LEVY, P., (2005). Mise en place d'un Réseau de Veille Zoosanitaire des huîtres perlières *Pinctada margaritifera* en Polynésie française. Rapport final de la Convention n°4.0393 du 5 mai 2004 entre le Service de la Perliculture et l'IFREMER – Tahiti. IFREMER, 2005. 47 p.
- COCHENNEC-LAUREAU, N., FOUGEROUSE, A., PELLAN, A., LEVY, P.(2006). Bilan 2005-2006 du Réseau de Veille Zoosanitaire des huîtres perlières, *Pinctada margaritifera* en Polynésie française. Rapport final de la Convention n°6.0084 du 8 mars 2006 entre le Service de la Perliculture et l'Ifremer - Tahiti. IFREMER, 2006. 37 p.
- COMPS, M., HERBAUT, Ch., FOUGEROUSE, A. (1996) Etude zoosanitaire de la nacre *Pinctada margaritifera*. EVAAM, 1996. 25 p.
- COMPS, M., HERBAUT, Ch., FOUGEROUSE, A. (1998). Situation zoosanitaire de la nacre *Pinctada margaritifera* en Polynésie française. IFREMER, 1998. 89 p.
- COMPS, M., FOUGEROUSE, A., BUESTEL, D. (1998). A procaryote infecting the black-liped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, **72**, 87-89.
- COMPS, M., HERBAUT, Ch., FOUGEROUSE, A. (1999). Virus-like particles in pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 1999, **19**, 85-88.

COMPS, M., HERBAUT, Ch., FOUGEROUSE, A. (2000). Abnormal periostracum secretion during the mineralization process of the pearl in the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquatic Living Resources*, 2000, **13**, 49-55.

COMPS, M., HERBAUT, Ch., FOUGEROUSE, A., LAPORTE, F. (2001). Progress in pathological characterization of syndrome 85 in the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquatic Living Resources*, 2001, **14**, 195-202.

CUIF, J.P., DAUPHIN, Y. (1996). Occurrence of mineralization disturbances in nacreous layers of cultivated pearls produced by *Pinctada margaritifera* var. *cumingi* from French Polynesia. Comparison with reported shell alterations. *Aquatic Living Resources*, 1996, **9**, 187-193.

D'ABOVILLE, G. (2007). La pêche et l'aquaculture en Outre-mer. Avis et rapports du Conseil Economique et Social. République Française. Paris : les éditions des Journaux officiels, 2007. N°14, 158 p.

DOHOO, I., MARTIN, W., STRYHN, H. (2003). Veterinary epidemiologic research. Carlottetown - Canada: AVC Inc., 2003. 706 p.

DUFOUR, B., HENDRIKX, P. (2007). Surveillance épidémiologique en santé animale. 2ème édition. Versailles : AEEMA et Editions Quae, 2007. 287 p.

FOUGEROUSSE-TSING, A., HERBAUT, Ch. (1994). Atlas anatomique de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. Programme Général de Recherche sur le Nacre. IFREMER, 1994. 68p.

FAO (1999). Food and agriculture organization of the United Nations (1999). Manuel on livestock disease. Surveillance and information system. Rome : FAO EMPRES, 1999. vol. n°8, 71 p.

GARCIA, C., ARZUL, I., CHOLLET, B., FRANCOIS, C., GOUBET, A., JOLY, J.P., MIOSSEC, L., ROBERT, M. et al. (2004). Bilan 2004 du réseau REPAMO. Ifremer, 2004. 69 p.[disponible en ligne] Adresse URL : [http://www.ifremer.fr/lerpc/pdf/rapport\\_repamo2004.pdf](http://www.ifremer.fr/lerpc/pdf/rapport_repamo2004.pdf)

GRIZEL, H. (1996). Etude des mortalités de l'huître perlière, *Pinctada margaritifera*, dans l'archipel des Tuamotu (Polynésie française). Contrat d'étude EVAAM-IFREMER n°85/1210177. Brest : IFREMER, 1986. 22 p.

GRIZEL, H. (2003). Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins. Plouzané : IFREMER, 2003.

HARSHBARGER, J. C., CHANG, S. C., OTTO, S. V. (1977). Chlamydiae (with Phages), mycoplasmes, and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves. *Science*, 1977, **196**, 666-668.

HINE, P.M., THORNE, T. (1998). *Haplosporidium* sp. (Haplosporidia) in hatchery-reared pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson, 1901), in north Western Australia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, **71**, 48-52.

HINE, P.M., THORNE, T. (2000). A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusk in northern Western Australia. *Disease of Aquatic Organisms*, 2000, **40**, 1, 67-78.

Institut de la statistique de la Polynésie française ISPF. (Page consultée le 27 avril 2007). Site de l'ISPF, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.ispf.pf>

Institut de la statistique de la Polynésie française ISPF. La Polynésie française en bref, French Polynesia at a glance, édition 2006 [en ligne]. Disponible à partir du site Web : <http://www.ispf.pf>

KITAMURA, S.I., TOMARU, Y., KAWABATA, Z., SUZUKI, S. (2002). Detection of marine birnavirus in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata* and seawater from different depths. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 50, 211-217.

KOBAYASHI, T., NOZAWA, N., MIYAZAKI, T. (1999). Studies on akoya-virus disease associated with mass mortalities of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. Philippines: Diseases in Asian Aquaculture (DAA IV), 22-26 novembre 1999.

KUROKAWA, T., SUZUKI, T., OKAUCHI, M., MIWA, S., NAGAI, K., NAKAMURA, K., HONJO, T., NAKAJIMA, K., ASHIDA, K., FUNAKOSHI, S. (1999). Experimental infections of a disease causing mass mortalities of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* by tissue transplantation and cohabitation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1999, 65, 241-251.

MAENO, Y., YURIMOTO, T., NASU, H., ITO, S., AISHIMA, N., MATSUYAMA, T., KAMAISHI, T., OSEKO, N., WATANABE, Y. (2006). Virus-like particles associated with mass mortalities of the pen shell *Atrina pectinata* in Japan. *Dis Aquat Org*, July 2006, Vol. 71: 169-173.

MAO CHE, L., LE CAMPION-ALSUMARD, T., BOURY-ESNAULT, N., PAYRI, C., GOLUBIC, S., BEZAC, C. (1996). Biodegradation of shells of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*, by microborers and sponges of French Polynesia. *Marine Biology*, 1996, 126, 509-519.

MATSUSATO, T., MASUMURA, K. (1981). Abnormal enlargement of the ovary of oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by an unidentified parasite. *Fish Pathology*, 1981, 15, 207-212.

MIYAZAKI, T., GOTO, K., KOBAYASHI, T., MIYATA, M. (1999). Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, 37, 1-12.

MORIZANE, T., TAKIMOTO, S., NISHIKAWA, S., MATSUYAMA, N., TYOHNO, K., UEMURA, S., FUJITA, Y., YAMASHITA, H., KAWAKAMI, H., KOIZUMI, Y., USHIMURA, Y., ICHIKAWA, M. (2001). Mass mortalities of Japanese pearl oyster in Awa sea, Ehime in 1997-1999. *Fish Pathology*, 2001, 36, 207-216.

MUROGA, K., INUI, Y., MATSUSATO, T. (1999). Workshop "Emerging diseases of cultured marine mollusks in Japan". *Fish Pathology*, 1999, 34, 4, 219-220.

NASR, D.H. (1982) Observation of the mortality of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in Dongonab Bay, Red Sea. *Aquaculture*, 1982, 28, 271-281.

NORTON, J.H., SHEPHERD, M.A., PRIOR, H.C. (1993). Papovirus-like infections of the golden-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, 62, 2, 198-200.

NORTON, J.H., SHEPHERD, M.A., LONG, H.M., PRIOR, H.C. (1993). Parasites of the giant clams (*Tridacnidae*). *Biology and Mariculture of Giant Clams*. W.K. edition Camberra, A.C.T. -Australian Center for International Agriculture Research. 1993, 47, 18-23.

OIE Aquatic Animal Health Standards Commission. (2006). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Cinquième édition. Paris: OIE, 2006. 469 p.

Organisation mondiale de la santé animale (OIE). (2006) Code sanitaire pour les animaux aquatiques. Neuvième édition. Paris : OIE, 2006. 220 p.

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Quarterly aquatic animal disease report, July – September 2006, Asian and Pacific Region. Tokyo: OIE regional representation for Asia and the Pacific, 2006. vol. 3, 39 p.

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Quarterly aquatic animal disease report, October – December 2006, Asian and Pacific Region. Tokyo: OIE regional representation for Asia and the Pacific, 2007. vol. 4, 23 p.

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Quarterly aquatic animal disease report, January – March 2007, Asian and Pacific Region. Tokyo: OIE regional representation for Asia and the Pacific, 2007. vol. 1, 33 p.

PARK, K.I., CHOI, K.S., JEONG, W.G. (2001). An examination for the protozoan parasite, *Perkinsus* sp. In the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* (Dunker) from the southern coast of Korea. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 2001, 21, 1, 30-32.

PARK, K.I., NGO, T. T.T., CHOI, S.D., CHO, M., CHOI, K. S. (2006). Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jadoensis* in Korean waters. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2006, 93, 81-87.

PASS, D.A., PERKINS, F.O. (1985). « Protistan parasites » or residual bodies in *Pinctada maxima*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1985, 46, 208-212.

PASS, D.A., DYBDAHL, R., MANNION, M.M. (1987). Investigations into the causes of mortality of pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture*, 1987, 65, 149-169.

PERKINS, F.O. (1996). Shell disease in the gold lip pearl oyster, *Pinctada maxima* and the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquatic Living Resources*, 1996, 9, 159-168.

Perles.TV. (Page consultée le 7 août 2007). Site des Perles.TV, Tout l'univers des Vraies perles de culture, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.perles.tv/perles-tahiti.html>

PROKOP VANLUYD, I. (2007). La mortalité massive des huîtres perlières japonaises. In : Service de la perliculture. Te Reko Parau n°19. Motu Uta : Service de la perliculture, janvier 2007. p. 34-35.

PROKOP VANLUYD, I.(2007). Des leçons possibles de l'expérience japonaise. In : Service de la perliculture. Te Reko Parau n°19. Motu Uta : Service de la perliculture, janvier 2007. p. 36-37.

RENAULT, T., COCHENNEC, N. (1994). *Rickettsia-like* organism in the cytoplasm of gill epithelial cells of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Inv. Pathol.*, 1994, 64, 160-162.

Service de la Perliculture (PRL). Formation des pétitionnaires désirants obtenir la carte de producteur de perles de culture de Tahiti. Papeete : afometh, 2004. 103 p.

SULIMAN, A. (1995). Pathological studies on the pearl oyster *Pinctada margaritifera* cultivated in Dongonab Bay (Red Sea) with special reference to the recent mass mortality. Pan African Fisheries Congress on Sustainable Development of Fisheries in Africa. 1995.

SUZUKI, S., NAKATA, T., KAMAKURA, M., YOSHIMOTO, M., FURUKAWA, Y., YAMASHITA, Y., KUSUDA, R. (1997). Isolation of birnavirus from Agemaki (Jack knife clam) *Sinonovacula constica* and survey of the virus using PCR techniques. *Fish Sciences* (Tokyo), 1997, 63, 563-566.

SUZUKI, S., KAMAKURA, M., KUSUDA, R. (1998). Isolation of birnavirus from Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Sciences* (Tokyo), 1998, 64, 342-343.

THEBAULT, A. (1999). Sur la faisabilité d'un réseau de surveillance en pathologie de la nacre *Pinctada margaritifera* en Polynésie française, rapport de mission d'octobre 1999. IFREMER, 1999. 34 p.

THEBAULT, A., ROBERT, M., CHOLLET, B., DUMAIS, M., JOLY, J.P., GARCIA, C., COMTET, T., LE COGUIC, M.J., MARTIN, A.G., PICHOT, Y. (2001). Bilan 2000 du réseau REPAMO, Réseau national de surveillance zoonositaire des mollusques marins. IFREMER, novembre 2001. 79 p.

THRUSFIELD, M. (1995) Veterinary epidemiology. Second edition. Blackwell science Ltd, 1995. 483 p.

TOMA, B., DUFOUR, B., SANAA, M., BENET, J.J., SHAW, A., MOUTOU, F., LOUZA, A. (2001). Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 2ème édition. Paris : AEEMA, 2001. 696 p.

TOMARU, Y., KAWABATA, Z., NAKANO, S. (2001). Mass mortality of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* in relation to water temperature, chlorophyll *a* and phytoplankton composition. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 44, 61-68.

WOLF, P.H., SPRAGUE, V. (1978). An unidentified protistan parasite of the pearl oyster *Pinctada maxima*, in tropical Australia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1978, 31, 2, 262-263.

WU, X., PAN, J. (1999). Studies on rickettsia-like organisms disease of the tropical marine pearl oyster I: the fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* pathogen rickettsia-like organism. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 73, 162-172.

WU, X., PAN, J. (1999). Studies on rickettsia-like organisms disease of the tropical marine pearl oyster II: the morphology, morphogenesis and ultrastructure of RLO inclusions, an agent for *Pinctada maxima*. *Oceanologia et Limnologia sinica*, 1999, 30, 1 Jan, 74-80.

WU, X., PAN, J. (1999). Studies on rickettsia-like organisms disease of the tropical marine pearl oyster, *Pinctada maxima* and *P. fucata* : IV. On histo-cytopathology of RLO disease. *Oceanologia et Limnologia sinica*, 1999, 21, 2, 93-98.

WU, X., PAN, J. (1999). Studies on rickettsia-like organisms disease of the tropical marine pearl oyster V. Ultrastructural pathology and pathogenesis of rickettsia-like organism disease. *Acta Oceanologia sinica*, 1999, 21, 3 May, 114-121.

XM LITRE. (Page consultée le 8 juin 2007). Site du XM Littré, [en ligne]. Adresse URL : <http://francois.gannaz.free.fr/Littre/accueil.php>

## **Annexes**

**ANNEXE 1** : Définitions des cas correspondantes aux agents pathogènes étudiés en Polynésie française

**ANNEXE 2** : Procédure d'échantillonnage d'après le Code Aquatique de l'OIE

**ANNEXE 3** : Liquides fixateurs en histologie

**ANNEXE 4** : Questionnaire sur le terrain et fiche de renseignements au laboratoire du REPANUI

**ANNEXE 5** : Questionnaire servant lors de l'enquête téléphonique en cas de mortalités anormales

**ANNEXE 6** : Formules statistiques du test du Chi<sup>2</sup> et du test de l'écart réduit

## **ANNEXE 1 : Définitions des cas correspondants aux agents pathogènes étudiés en Polynésie française**

Le cas correspond à l'huître (l'individu), ou groupe d'huîtres, présentant les caractéristiques du phénomène étudié.

### **Cas probable**

Le cas probable dans le cas des pathologies des huîtres perlières correspond à un groupe d'huître dont le taux de mortalité dépasse le seuil de 15% en 15 jours. Cela ne permet pas d'exclure les maladies surveillées et une enquête épidémiologique est réalisée à partir de cette alerte pour préciser et confirmer les cas suspects. L'alerte précoce constitue un facteur essentiel de l'efficacité du système de vigilance.

### **Cas confirmé**

Le cas confirmé correspond à un individu chez qui l'agent recherché a été retrouvé et peut être associé aux signes observés.

#### **Grégarines**

##### ▪ Définition du cas confirmé

Le cas confirmé est celui dont la présence de grégarines dans les tissus de l'huître perlière a été détectée par observation au microscope photonique sur coupe histologique. Un classement a été proposé pour préciser le degré de l'infection. Quatre classes sont représentées :

- (0) absence de parasites ;
- (+) de 1 à 10 grégarines observées dans tous les tissus de l'huître ;
- (++) plus de 10 grégarines observées dans un même organe ;
- (+++) plus de 10 grégarines réparties dans les différents organes (tube digestif haut et bas, tissu conjonctif) associées à une désorganisation des tissus infestés et quelque fois à une inflammation.

#### **Autres agents pathogènes : rickettsies, métazoaire, ...**

##### ▪ Définition du cas confirmé

Le cas confirmé relatif aux autres pathogènes (rickettsies, métazoaire) est défini par rapport à la présence de ces pathogènes ou de leurs effets cytopathologiques dans les tissus de l'huître perlière par observation au microscope photonique sur coupe histologique. Aucune classe n'a été envisagée pour ces agents pathogènes.

#### **Maladies notifiables à l'OIE**

Les définitions des cas des maladies listées à l'OIE sont extraites du Manuel Aquatique de l'OIE (OIE, 2006). Il convient de se reporter au Manuel Aquatique de l'OIE pour toutes précisions concernant les méthodes de détection et d'identification des agents pathogènes cités ci-dessous.



## Infection à *Bonamia ostreae*

- Espèces hôtes sensibles

Hôte naturel : huîtres plates européennes *Ostrea edulis*

Espèces d'huîtres infectées lors de mouvement dans une zone endémique : *Ostrea puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, *T. lutaria*).

*Ostrea conchaphila* (= *O. lurida*), *Crassostrea angulata* et *C. ariakensis* (= *C. rivularis*) ont été supposés d'être infectées avec *B. ostreae*.

- Distribution géographique

*B. ostreae* est reporté en Europe (France, Irlande, Italie, Hollande, Espagne et Royaume-Uni en excluant l'Écosse), au Canada (Colombie britannique) et aux USA (Californie, États du Maine et de Washington).

- Définition du cas suspect

Chez une espèce sensible connue à l'intérieur d'une zone géographique de *B. ostreae*, un cas suspect d'infection à *B. ostreae* est un résultat positif par une des méthodes suivantes : histopathologie, frottis de tissus, ou PCR.

Chez d'autres espèces hôtes ou en dehors d'une zone connue de *B. ostreae*, un cas suspect est un résultat positif par histopathologie, frottis tissulaire, PCR ou HIS.

- Définition du cas confirmé

Un cas confirmé de *B. ostreae* est un résultat positif par frottis tissulaire, histologie ou HIS combiné avec un résultat positif en PCR-RFLP.

## Infection à *Bonamia exitiosa*

- Espèces hôtes sensibles

Hôte naturel : huîtres draguées de Nouvelle Zélande *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, = *T. lutaria*) et l'huître de boue australienne, *O. angasi*.

- Distribution géographique

Chez *O. chilensis*, *B. exitiosa* est reporté à Foveaux et autres localisations autour des Îles Sud, en Nouvelle Zélande, et chez *O. angasi*, en Australie.

- Définition du cas suspect

Chez une espèce sensible connue à l'intérieur d'une zone géographique de *B. exitiosa*, un cas suspect d'infection à *B. exitiosa* est un résultat positif par une des méthodes suivantes : histopathologie, frottis tissulaire, PCR ou HIS.

Chez d'autres espèces hôtes ou en dehors de zones connues de *B. exitiosa*, un cas suspect est un résultat positif par histopathologie, frottis de tissus, PCR ou HIS.

- Définition du cas confirmé

Un cas confirmé de *B. exitiosa* est un résultat positif par frottis tissulaire, histologie ou HIS combiné avec un résultat positif en PCR-RFLP.

## **Infection à *Marteilia refringens***

### ▪ Espèces hôtes sensibles

Espèce du Genre *Ostrea* incluant *O. edulis*, *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi* ;

Espèces du Genre *Mytilus* incluant *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

### ▪ Distribution géographique

*M. refringens* a été rapporté en Croatie, France, Grèce, Italie, Maroc, Portugal et Espagne.

### ▪ Définition du cas suspect

Chez une espèce sensible à l'intérieur d'une zone géographique connue de *M. refringens*, un cas suspect d'infection à *M. refringens* est un résultat positif par une des méthodes suivantes : écrasement, frottis tissulaire ou PCR.

Chez d'autres espèces hôtes ou en dehors de zones géographiques connues de *M. refringens*, un cas suspect d'infection à *M. refringens* est un résultat positif par histologie ou PCR.

### ▪ Définition du cas confirmé

Chez une espèce sensible à l'intérieur d'une zone géographique connue de *M. refringens*, un cas confirmé d'infection à *M. refringens* est :

- un résultat positif par histologie ou HIS ;
- ou un cas suspect avec la PCR seule combinée avec une histologie ou une HIS positive ;
- ou un cas suspect avec squash ou frottis seul combiné avec une PCR positive.

Chez d'autres espèces hôtes ou en dehors de zones géographiques connues de *M. refringens*, un cas confirmé d'infection à *M. refringens* est :

- un cas suspect par PCR combiné avec un résultat positif par histologie et HIS ;
- ou un cas suspect par histologie combiné avec un résultat positif par PCR et HIS.

Tous ces cas peuvent être référés immédiatement au laboratoire de référence de l'OIE pour *M. refringens* si aucun signe clinique n'est associé au cas.

## **Infection à *Perkinsus marinus***

### ▪ Espèces hôtes sensibles

Huîtres : *Crassostrea virginica*, *C. gigas*, *C. ariakensis*, *C. rhizophorae*.

### ▪ Distribution géographique

*P. marinus* est reporté sur la côte est de l'Amérique du Nord à partir du Maine aux USA, jusqu'à Tabasco au Mexique.

### ▪ Définition du cas suspect

Chez les espèces sensibles connues à l'intérieur d'une zone géographique connue de *P. marinus*, un cas suspect d'infection à *P. marinus* est un résultat positif par une des méthodes suivantes : frottis d'hémolymphe, histologie, culture liquide thioglycollate ou PCR.

Chez d'autres espèces hôtes ou en dehors de zones géographiques connues de *P. marinus*, un cas suspect d'infection à *P. marinus* est un résultat positif par PCR.

- Définition du cas confirmé

Un cas confirmé de *P. marinus* est un résultat positif par frottis d'hémolymphe, histologie ou culture liquide thioglycollate combiné à un résultat positif par PCR. Le séquençage de la région ITS est recommandé comme étape finale du diagnostic de confirmation.

### **Infection à *Perkinsus olseni***

- Espèces hôtes sensibles

Palourdes : *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Tapes decussatus*, *Tapes philippinarum*, *Pitar rostrata* ;

Huîtres : *Crassostrea gigas*, *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea sikemea* ;

Huîtres perlières : *Pinctada margaritifera*, *Pinctada martensii* ;

Ormeaux : *Haliotis rubra*, *Haliotis laevis*, *Haliotis scalaris*, *Haliotis cyclobates*.

**Les autres bivalves et les espèces de gastéropodes pourraient être sensible à ce parasite spécialement dans la zone géographique connue. Les membres des Arcidae, Malleidae, Isognomonidae, Chamidae et Veneridae sont particulièrement sensible, et leur échantillon sélectif peut révéler la présence de *P. olseni*, seulement quand les infections légères apparaissent dans les autres familles dans le même habitat.**

- Distribution géographique

*P. olseni* est répandu d'un bout à l'autre de l'Océan Pacifique tropical : Australie, l'île Nord de la Nouvelle Zélande, Corée, Japon, Chine, mais aussi Portugal, Espagne, France, Italie, et Uruguay. Pas connu en Amérique du Nord. Les espèces *Perkinsus* reportés à partir de palourde de ressac ondulé *Paphia undulata* est aussi certainement *P. olseni* en se basant sur une séquence d'ADN similaire de locus ITS-1 et ITS-2.

- Définition du cas suspect

Chez les espèces sensibles connues à l'intérieur d'une zone géographique connue de *P. olseni*, un cas suspect d'infection à *P. olseni* est un résultat positif par une des méthodes suivantes : frottis d'hémolymphe, histologie, culture liquide thioglycollate ou PCR.

Chez les autres espèces hôtes ou en dehors de zones géographiques connues de *Perkinsus olseni*, un cas suspect d'infection à *P. olseni* est un résultat positif par PCR.

- Définition du cas confirmé

Un cas confirmé de *P. olseni* est un résultat positif par histologie ou culture liquide thioglycollate combiné à un résultat positif par PCR. Le séquençage de la région ITS est recommandé comme étape finale du diagnostic de confirmation.

## **Infection à *Xenohaliotis californiensis***

En accord avec le Code Aquatique de l'OIE, tous les cas dans les espèces non répertoriées comme sensibles à l'infection à *X. californiensis* doivent être référés immédiatement au laboratoire de référence de l'OIE approprié pour confirmation, que les signes cliniques soient ou non associés aux cas.

- Espèces hôtes sensibles

*X. californiensis* infecte les membres du genre *Haliotis* incluant les ormeaux noirs (*H. cracherodii*), les ormeaux blanc (*H. sorenseni*), les ormeaux rouges (*H. rufescens*), les ormeaux roses (*H. corrugata*), les ormeaux verts (*H. fulgens*) dans la nature ou commodités en culture aussi bien que plat (*H. wallalensis*) et les ormeaux japonais (*H. discus-hannai*) dans les défis/stimulation laboratoire.

- Distribution géographique

*X. californiensis* apparaît le long de la côte sud-ouest de l'Amérique du Nord en Californie aux USA et en Basse Californie au Mexique. Cependant, comme les ormeaux infectés ont été transportés au Chili, Japon, Israël, Islande, et probablement d'autres pays, l'étendue géographique de l'agent étiologique est suspectée d'être en général là où les ormeaux rouges de Californie, *Haliotis rufescens*, sont cultivés.

- Définition du cas suspect

Un cas suspect d'infection à *X. californiensis* et associé à la maladie clinique (Syndrome du dépérissement) peut inclure l'observation de signes cliniques grossiers (faiblesse, léthargie, anorexie, atrophie pédieuse, glande digestive tachetée) et la mortalité en association avec des conditions d'eaux chaudes, particulièrement à l'intérieur de l'étendue géographique connue de cette maladie. Chez les ormeaux d'élevage, l'anorexie peut être un premier signe de maladie. Ces signes cliniques en combinaison avec l'observation microscopique d'un muscle pédieux atrophié, de corps d'inclusion dans l'épithélium gastro-intestinal ou une preuve PCR représente également un cas suspect.

- Définition du cas confirmé

La confirmation de l'infection à *X. californiensis* se fie sur l'observation de l'agent en utilisant l'histologie et/ou l'HIS. Les signes grossiers et les frottis tissulaires seuls ne peuvent pas être utilisés pour le diagnostic de confirmation et doivent être complétés par l'histologie, l'HIS ou les tests PCR.

La confirmation du Syndrome du dépérissement se fie sur la présence simultanée de l'agent et des signes microscopiques de cette maladie. Au minimum, la métaplasie de la glande digestive ou la dégénération doivent accompagner l'infection à *X. californiensis* pour diagnostiquer un Syndrome du dépérissement clinique.

## **Mortalité virale de l'ormeau**

Aucune indication n'est donné pour ce phénomène pathologique du fait du l'absence de connaissance sur l'agent pathogène en cause.

## ANNEXE 2 : Procédure d'échantillonnage d'après le Manuel Aquatique de l'OIE

Il y a au mieux trois raisons pour lesquelles les stocks des mollusques peuvent être échantillonnés : la surveillance, l'épidémie ou la suspicion, et le diagnostic de confirmation. Le nombre et le type d'échantillon définis pour ces analyses varient grandement selon les objectifs choisis.

### 1. Collection des spécimens

Une approche générale de surveillance et d'échantillonnage est donnée au chapitre 1.1.4. du Manuel Aquatique de l'OIE (OIE, 2006). L'échantillonnage doit être conçu pour une détection active, à un niveau de confiance de 95%, des animaux infectés. Ce paragraphe donne des informations concernant l'échantillonnage de mollusques. Pour les tests diagnostiques où la sensibilité et la spécificité ont été établies, la taille d'échantillon peut être déterminée en utilisant les méthodes telle que FreeCalc ([www.ausvet.com.au](http://www.ausvet.com.au)) ou les programmes similaires respectant les conditions pour la surveillance de la reconnaissance internationale du statut indemne d'infection. Cependant, pour les tests diagnostiques dont la sensibilité et la spécificité n'ont pas été établies, la taille de l'échantillon par défaut devrait être déterminée à partir du tableau 1.

Tableau 1 : Taille d'échantillon pris au hasard basé sur la prévalence présumée dans la population et en supposant une sensibilité et une spécificité de 100% de la technique.

Taille de la population	A 2% de prévalence Taille de l'échantillon	A 5% de prévalence Taille de l'échantillon	A 10% de prévalence Taille de l'échantillon
50	50	35	20
100	75	45	23
250	110	50	25
500	130	55	26
1000	140	55	27
1500	140	55	27
2000	145	60	27
4000	145	60	27
10 000	145	60	27
100 000 et plus	150	60	30

D'après Ossiander et Wedemeyer, 1973.

### 2. Recommandations spécifiques pour l'échantillonnage de mollusques

La période et la fréquence d'échantillonnage peuvent être déterminé selon la période pré-patente et le cycle d'infection par les agents pathogènes. Une période adéquate devrait être prévue dans l'échantillonnage pour des maladies comportant des variations saisonnières, par exemple l'infection par *Marteilia refringens* ou *Haplosporidium nelsoni*, pour assurer une détection optimale. Comme les agents pathogènes peuvent augmenter l'intensité d'infection associée avec une altération différente selon les conditions de vie de l'hôte, l'échantillonnage est aussi recommandé à ce niveau. Les périodes d'échantillonnage

pourraient aussi tenir en compte le transfert des juvéniles et naissain dans les aires hors-croissance, et le transfert des adultes pour un futur engraissement ou de relais.

Les échantillons pourraient aussi couvrir un classement de taille de groupes, ou cibler la classe d'âge le plus prédisposé quand il est connu. Pendant l'échantillonnage, n'importe quel mollusque présentant des anomalies (croissance anormale, valves béante/ouvertes, taux de mortalité élevée ou fort) doivent être sélectionnées. Les maladies ont des stades subcliniques de développement qui peuvent échapper à la détection en utilisant la méthodologie de détection de routine. Cependant, la probabilité de détection de l'infection peut être augmentée par détention des bivalves en quarantaine pour une longue période et en les soumettant au stress (densité, manipulations, température et changements de salinité, ...). Pour détecter l'infection, les espèces de mollusques qui sont plus prédisposé d'être infectés doivent être examinées en histologie. Par exemple, les membres des *Arcidae* (*Acra*, *Barbatia*), *Malleidae* (*Malleus*), *Isognomonidae* (*Isognomon*), *Chamidae* (*Chama*), *Tridacnidae* (*Tridacna*) et *Veneridae* tolèrent des prévalence élevées des infection de *Perkinsus olseni* et sont de bons indicateurs de la présence de *P. olseni*.

La prévalence d'infection est un facteur important affectant la chance de détection. Quand les mollusques sont transportés à partir du site naturel dans une ferme ou entre des sites naturels dans différentes zones, un grand nombre de bivalves peuvent être requis pour détecter une faible prévalence d'infection. Par exemple, dans l'Ouest australien, *Marteilia sydneyi* et *Perkinsus* sp. Sont présents à une prévalence de 0,1% dans les sites isolés et non manipulés par l'homme. Ce niveau d'échantillonnage peut être proportionnel au niveau de risque de l'eau reçue et les ressources aquatiques qu'elles supportent.

Pour chaque zone, un nombre de sites d'échantillonnage peut être sélectionné par le chemin le plus pratique pour maximiser les chances de détecter des agents pathogènes. Le nombre de site pourrait être augmenté pour de grandes zones qui contiennent plusieurs aires distinctes de culture et d'espèce prédisposée. La valeur peut être prise des paramètres qui ont un effet sur le développement des agents de maladies, tels que la densité de stockage, le courant/flux d'eau, et le cycle de développement des mollusques.

C'est une condition importante que les techniques de détection utilisées pour être les méthodes optimales disponible/valable pour la détection des agents de maladies en question, et que quand l'infection est présente, elle puisse être détectée. Pour les méthodes de détection, la sensibilité et la spécificité doivent avoir été évaluées. Cette information a une influence forte sur la taille de l'échantillon.

### **ANNEXE 3 : Liquides fixateurs en Histologie**

Le rôle de la fixation est de maintenir la morphologie des tissus en figeant la morphologie du vivant autant que possible et de prévenir la nécrose post-échantillonnage. Les fixateurs recommander utilisés pour l'étude de mollusques marins sont la solution de Davidson et la solution de Carson pour de grands spécimens. Pour les petits spécimens, les fixateurs au glutaraldéhyde peuvent être utilisés et sont compatibles pour l'utilisation au microscope électronique. La ration de fixateurs par rapport au volume de tissus devrait être au moins de 10 pour 1 pour s'assurer une bonne fixation.

#### Solution de Davidson :

- Eau de mer : 1 200 ml
- Alcool à 95% : 1 200 ml
- Formaldéhyde à 35-40% : 800 ml
- Glycérol : 400 ml
- Acide acétique glacial : 10% (ajouter extemporanément)

#### Solution de Carson :

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O : 23,8 g
- NaOH : 5,2 g
- Eau distillée : 900 ml
- Formaldéhyde à 40% : 100 ml
- Ajuster le pH à 7,2-7,4

Ce ne sont pas des fixateurs universels et le choix devrait prendre en compte les dernières utilisations de matériel de fixation aussi bien que les aspects pratiques de l'utilisation du fixateur (prix, disponibilité des composés, ...). La solution de Davidson est un choix excellent pour préserver la structure des tissus. De plus, les coupes de tissus fixées à la solution de Davidson peuvent être colorées après par différentes méthodes histochimiques, aussi bien que l'hybridation in situ avec des sondes d'ADN. Dans cet objectif, une surfixation (plus de 24-48h) devrait être évitée. La solution de Carson ne peut pas être aussi bonne que la solution de Davidson pour les analyses histologiques. Cependant, elle permet une bonne conservation des ultrastructures et peut être utilisée pour conserver les échantillons pour des études ultérieures par microscopie électronique. A cause de la microscopie électronique peut être un ajout de valeur dans le diagnostic ou la confirmation d'infection chez les mollusques, fixation de quelques échantillons (en particulier pour les petits échantillons) en utilisant glutaraldéhyde peut être considéré. D'un autre côté, le matériel fixé dans la solution de Carson, et présenté pour contenir des niveaux adéquats des agents pathogènes cibles ou anomalies, peut être re fixé dans glutaraldéhyde. C'est recommandé que la partie de mollusques soit fixée dans la solution de Davidson alors que l'autre partie est fixée dans la solution de Carson pour des investigations supplémentaires. Ce devrait être fait pour s'assurer la fixation de tous les tissus ou organes dans les deux fixateurs. Si aucun n'est disponible, 10% de formol tamponné avec de l'eau de mer filtrée est adéquate.

## ANNEXE 4 : Questionnaire sur le terrain et fiche de renseignements au laboratoire du REPANUI

### - Questionnaire sur le terrain –

Numéro de lot : 07- .....  
 Ile : ..... Site : .....  
 Nom du perliculteur : .....  
 Nom de l'agent du PRL : .....  
 Date de prélèvement : .....

#### PRATIQUES ZOOTECHNIQUES APPLIQUEES AUX NACRES PRELEVEES

- Origine : .....
- Date du transfert : .....
- Tailles à l'arrivée : .....
- Support de collectage : .....
- Densité sur support de collectage : .....
- Date du détrocage : .....
- Support d'élevage : .....
- Traitements avant le transfert : .....
- Traitements à l'arrivée : .....
- Nacres sauvages  ou en élevage

#### IDENTIFICATION DES PRELEVEMENTS (LOT)

- Age estimé : .....
- Taille moyenne : .....
- Motifs du prélèvement :
  - o Suivi de croissance .....
  - o Nacres prêtes à la greffe .....
  - o Surgreffe .....
  - o Retour .....
  - o Rejet de greffe .....
  - o Rejet de récolte .....
  - o Malformation .....
  - o Mort .....
- Site de la ferme : .....
- Position GPS de la filière d'élevage : .....
- Profondeur : .....

#### PHYSICO-CHIMIE DU MILIEU

- Turbidité (Secchi) : ..... mètres
- Température : ..... ° C
- Salinité : ..... ‰
- Oxygène dissous : .....
- Chlorophylle : .....
- Plancton : .....
- Salissures % de couverture totale : .....
- Sens du courant : .....

.../...



## Fiche de renseignements au laboratoire –

### IDENTIFICATION DU PRELEVEMENT

- situation de la ferme : .....
- espèce : *P. margaritifera*.....
- élevage :
- sauvage :
- taille moyenne : .....
- âge estimé : .....
- nombre total de prélèvements d'huîtres perlières : .....
  - nombre total de prélèvements de pipis : .....
  - nombre total de prélèvements de kapi-kapi : .....
  - nombre total de prélèvements *Arca* : .....
  - nombre total de prélèvements *Chama* : .....
  - nombre total de prélèvements *Isognomon* : .....
  - nombre total de prélèvements Autres : .....

### FIXATION

- date fixation au Davidson : .....
- injection du fixateur : .....
- date passage à l'alcool : .....
- temps de fixation : .....

### ANALYSES DE LABORATOIRE

- date d'arrivée des échantillons à Papeete : .....
- date d'arrivée des échantillons au laboratoire : .....
- date de traitement au laboratoire (automate à inclusion) : .....
- coloration : .....

## ANNEXE 5 : Questionnaire servant lors de l'enquête téléphonique en cas de mortalités anormales

**FICHE DE MORTALITE** (remplir une fiche par lot et par espèce)

- Questionnaire rempli par :
- Prélèvement réalisé par :
- N° du lot : Année  N° ordre
- Espèce (nom latin)  huître greffée
- Classe d'âge:  $\leq 1$  an   $> 1$  an et  $\leq 2$  ans   $> 2$  ans   
Mélange

**5. CARACTERISTIQUES DU CONSTAT OU DU PRELEVEMENT**

- Date du prélèvement ou du constat:  Demandeur :
- Informations confidentielles

Nom du perliculteur

N° de concession :

Adresse :

Numéro de téléphone :

- Localisation : 

Ile :

Lieu-dit ou Etablissement

Latitude (GPS)  Longitude (GPS)

● **Historique : quels sont les transferts connus du lot ?**

	Date	He	Lieu ou localisation GPS	Age ou taille au moment du transfert
Captage				
Transfert 1				
Transfert 2				
Transfert 3				

● **Caractéristiques propres au prélèvement réalisé :**

Nombre d'individus prélevés  Mode prélèvement : Extrait direct  Plongée

Profondeur sous surface (m) :

Choix échant : au hasard  parmi les moribonds  autre, préciser :

**6. DESCRIPTION DE LA MORTALITE SUR LE LOT**

● **Informations concernant le lot à mortalité :**

Croissance avant mortalité : non observée  normale  plus faible  plus forte   
(que normale)

présence barbe de croissance : oui  /non

Maturité : début gamétogenèse  maturité  ponte récente

**Signes macroscopiques associés à la mortalité:**

Non observés  Observés mais aucun signe  maigreux  taches   
perforations

Autres, préciser :

● **Mortalité estimée en %**  **détail comptages :** 
 unité de comptage :  
 nombre d'unités :  
 résultats/comptage :
   
**ou/et mortalité calculée par comptage en %**

● **Taille(s) concernée(s) [ pour les huîtres ] :** petite  moyenne  grosse

● **Y a t'il d'autres lots touchés sur la concession :** Oui  Non   
 Si oui, combien :

**Préciser la ou les espèces de coquillage si elle(s) est(sont) différente(s) de celle du lot :**

● **Ce lot est-il présent sur d'autres sites ou îles :** Oui  Non   
 Si oui, lesquels :

**et comment cela se passe-t-il ? :** 
 pas de mortalité  mortalité identique   
 plus faible  plus forte  variable

● **Mortalités les années antérieures à la même période :**  
 (sur la même concession, sur les mêmes filières...)

pas de mortalité  mortalité identique   
 plus faible  plus forte  variable

● **Autres observations**

**Caractéristique de la mortalité :** en taches  touchant une filière   
 d'emblée uniforme et générale

**Déroulement de la mortalité :** brutale  progressive  par à coups

Y a t il d'autres espèces de coquillage présentes à proximité du lot à mortalité et ne présentant pas de mortalité ? Oui  Non

Si oui, préciser ces espèces :

## 7. CARACTERISTIQUES DE LA ZOOTECHNIE

● conditions du dernier transfert :

mode transport

durée (h)

T°(°C)

● charge

nombre de filières :

n<sup>bre</sup> d'individus par filière

● dernière manipulation avant mortalité : date

type

● changement zootechnique cette année

et/ou par rapport aux autres concessions

lequel ?

## 8. PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX

**Changement environnemental précédent la mortalité :**

Rien à signaler

Macroalgues

Prédateurs

Anémones

Coloration des eaux

Bloom phytoplanktonique

Anoxie

Dessalure

Autres, préciser :

**Présence d'une sonde, d'un point d'analyse ou d'étude particulière à proximité des mortalités :**

Sonde T° / S‰  Lieu :

Réseau de veille zoosanitaire à proximité  Lieu :

Etude particulière  Laquelle ? :

Lieu :

## 9. COMMENTAIRES FINAUX



## ANNEXE 6 : Formules statistiques du test du Chi<sup>2</sup> et du test de l'écart réduit

Le test du Chi<sup>2</sup> est utilisé pour comparer un pourcentage observé à un pourcentage théorique, ou deux ou plusieurs pourcentages observés.

L'indice utilisé pour le Chi<sup>2</sup> correspond à la somme des quotients : carrés des différences divisés par les effectifs calculés, soit :

$$X^2 = \sum \frac{(O - C)^2}{C}$$

Avec :

*O* : effectif observé

*C* : effectif calculé

Le test de l'écart réduit permet de déterminer si la différence observée des proportions d'individus infectés dans deux populations est due aux fluctuations d'échantillonnage.

On peut calculer l'écart réduit de la différence :

$$\varepsilon = \frac{|p_1 - p_2|}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}}}$$

Avec :

*n*<sub>1</sub> : taille d'échantillon dans la population 1

*n*<sub>2</sub> : taille d'échantillon dans la population 2

*p*<sub>1</sub> : proportion de malades dans la population 1

*p*<sub>2</sub> : proportion de malades dans la population 2

$p = \frac{n_1 p_1 + n_2 p_2}{n_1 + n_2}$  et  $q = 1 - p$