

Département des Ressources Vivantes – Ressources aquacoles
Laboratoire IFREMER – COP - Tahiti

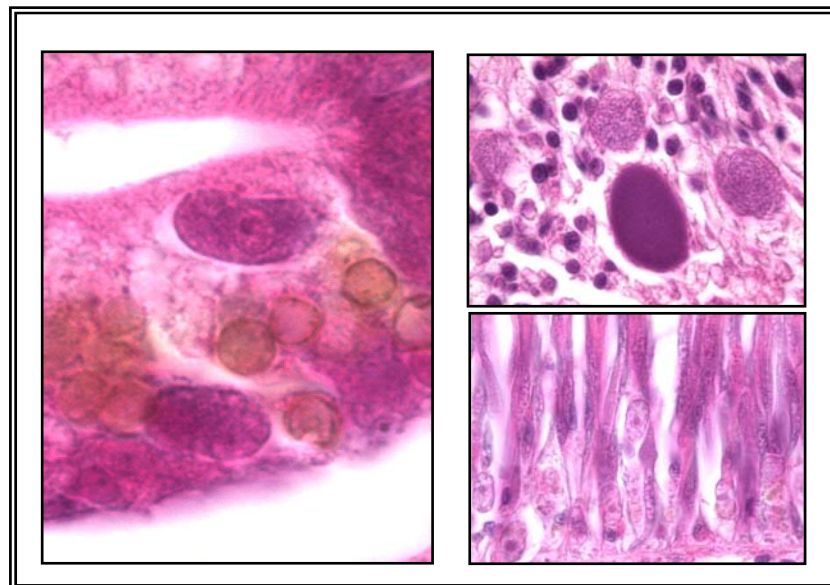
Nathalie Cochenec-Laureau
Peva Levy
Denis Saulnier
Angélique Fougerouse

Décembre 2003

Rapport final de la Convention n°3.0232 du 23 avril 2003
entre le Service de la Perliculture et l'IFREMER - COP

ifremer

Mise en place d'un Réseau de Veille Zoosanitaire des huîtres perlières *Pinctada margaritifera* en Polynésie Française



Rapport final

Convention n°3.0232 du 23 avril 2003
Relative à la collaboration de l'IFREMER à la
mise en place d'un Réseau de Veille Zoosanitaire
des huîtres perlières *Pinctada margaritifera*
en Polynésie Française (REPANUI)

Nathalie Cochennec-Laureau*, Peva Levy*, Denis Saulnier*
et Angélique Fougerousse**

- * Ifremer - COP, Taravao, Polynésie Française
- ** Service de la Perliculture (PRL) Papeete

Résumé

L'importance socio-économique de l'activité perlière justifie que le Service de la Perliculture mette en place un réseau de surveillance pathologique de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* en Polynésie française. Les objectifs de ce réseau sont de prévenir l'introduction ou l'apparition d'agents infectieux, de prévenir leur propagation à l'intérieur d'une zone d'élevage, d'étudier les moyens de limiter leur impact, de surveiller leur évolution et enfin de garantir les échanges entre les zones d'élevage.

Cette première année a permis d'élaborer le schéma de fonctionnement du réseau et de vérifier sa faisabilité. Cinq zones de prélèvements ont été définies en fonction de critères d'accessibilité à la zone et de facilité d'acheminement des échantillons, de l'importance du collectage, de la densité des élevages et de la géomorphologie. Il s'agit de Makemo, Fakarava, Tahaa, Takaroa et Rikitea. Par zones, deux à trois sites sont suivis. Ainsi, pour 2003, 406 huîtres, *P. margaritifera*, 21 *P. maculata* (pipi), 11 *S. cucullata* (kapi kapi) et 1 *Chama* sp. ont été analysés. Les analyses histologiques effectuées ne font apparaître aucun agent pathogène à déclaration obligatoire à l'Office International des Epizooties. Les huîtres d'élevage examinées présentent un degré plus ou moins important d'atteinte parasitaire par des sporozoaires de type **grégarine** et des parasites de type ***Rickettsia*-like**. De même, l'espèce *P. maculata* (pipi) est affectée par des grégarines. Des **zones d'enkystement de métazoaires** ont été également observées chez *P. margaritifera* et *Saccostrea cucullata*.

Ces parasites ne sont pas associés à des maladies. Toutefois leur présence entraîne des désordres tissulaires plus ou moins importants qui peuvent rendre l'huître plus sensible au stress de la greffe. Dans ces conditions il paraît utile d'effectuer un nombre plus élevé d'analyse afin de mieux décrire ce phénomène et d'approfondir les investigations dans les îles les plus sensibles.

Un schéma d'organisation à mettre en place en cas d'épisodes de mortalité ou de morbidité déclarées est proposé. Il est en effet important de définir dès aujourd'hui la procédure afin de mobiliser les compétences et les informations le plus rapidement possible. Les informations recueillies lors de ces situations de crise apporteront les éléments nécessaires à la prise de décision en matière de réglementation et/ou d'informations auprès des services compétents du territoire et des professionnels.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	4
2. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES AGENTS INFECTIEUX DECRITS CHEZ LES HUITRES PERLIÈRES.....	6
3. MISE AU POINT DU DISPOSITIF DE LA VEILLE ZOOSANITAIRE.....	8
3.1. Définition d'une zone de surveillance	8
3.2 . Zones de prélèvements	8
3.2.1. Critères de sélection	8
3.2.2. Sites de prélèvements intra-zone.....	8
3.2.3. Dates et fréquence des prélèvements.....	9
3.3 . Réalisation des prélèvements	9
4. PROCEDURES D'URGENCE A METTRE EN PLACE EN CAS DE MORTALITE ANORMALE	10
4.1. Au moment des mortalités – Confirmation et évaluation des mortalités	10
4.2. La commission de visite – action concertée PRL - IFREMER	11
4.3. Synthèses des données et avis	14
5. RESULTATS DES ANALYSES HISTOLOGIQUES EFFECTUEES EN 2003	15
5.1. Les sporozoaires de type Grégarine	16
5.1.1. Analyse des huîtres perlières, <i>Pinctada margaritifera</i>	16
5.1.2. Analyse des espèces <i>P. maculata</i> , <i>Saccostrea cucullata</i> et <i>Chama</i> sp.....	19
5.2. Les parasites de type Rickettsia-like	21
5.2.1. Analyse des huîtres perlières, <i>Pinctada margaritifera</i>	21
5.2.2. Analyse des espèces <i>P. maculata</i> , <i>Saccostrea cucullata</i> et <i>Chama</i> sp.....	23
5.3. Les zones d'enkystement	23
5.3.1. Analyse des huîtres perlières, <i>Pinctada margaritifera</i>	23
5.3.2. Analyse des espèces <i>P. maculata</i> , <i>Saccostrea cucullata</i> et <i>Chama</i> sp.....	25
5.4. Analyse des résultats par classe d'âge	25
6. CONCLUSIONS	27
7. BIBLIOGRAPHIE CITEE.....	29
8. ANNEXES	35

1. Introduction

Le développement rapide de la perliculture, accompagné ces dix dernières années d'une augmentation des densités d'huîtres en élevage et d'une intensification des transferts d'huîtres entre atolls, est un facteur favorable à l'émergence ou la ré-émergence d'agents infectieux et à la propagation de maladies. L'élevage de l'huître perlière, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758), a connu dans les années 85, des épisodes de mortalité massive (30 à 80%) touchant plusieurs atolls et soulevant la question de la vulnérabilité de la filière perlicole. Différentes hypothèses environnementales et pathologiques ont été émises (Grizel, 1986, Comps *et al.*, 1998, Comps *et al.*, 1999, Comps *et al.*, 2001).

Les mortalités affectant les élevages de *P. fucata* au Japon suscitent également des craintes sur l'introduction potentielle de maladies. En effet, depuis 1997, les élevages sont décimés par le virus « Akoya ». Dans la mesure où de nombreux greffeurs de Polynésie sont originaires du Japon, l'inquiétude d'introduire accidentellement le virus est forte, malgré les mesures obligatoires de désinfection des outils de greffe avant leur introduction sur le territoire (Arrêté du 21 janvier 2000, J.O. de la Polynésie du 3 février 2000).

De plus, l'inventaire des organismes potentiellement dangereux pour la perliculture est loin d'être complet. Bon nombre d'agents considérés comme « non infectieux » pour les espèces de coquillage élevées à des fins alimentaires (*C. gigas*, *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis*...) pourraient se révéler préjudiciables pour la perliculture en fragilisant les huîtres pour la greffe et en entraînant des rejets. Leur présence, de ce fait, peut être considérée comme préoccupante.

L'importance socio-économique de l'activité perlière justifie que le Service de la Perliculture mette en place un réseau de surveillance pathologique de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* en Polynésie française. Deux axes de travail sont envisagés :

- l'épidémio-vigilance qui visera à détecter le plus rapidement possible l'apparition de maladies émergentes ou exotiques afin de limiter leur dissémination,
- l'épidémio-surveillance qui visera à suivre l'évolution spatio-temporelle d'agents infectieux connus et/ou suspectés d'avoir un impact potentiel sur la perliculture.

Les objectifs de cette veille sont donc de :

- prévenir l'introduction ou l'apparition d'agents infectieux
- prévenir la propagation à l'intérieur d'une zone d'élevage
- d'étudier les moyens de limiter l'impact des agents infectieux et de surveiller leur évolution
- de garantir les échanges entre zones d'élevage.

Il est important de rappeler que certaines caractéristiques des mollusques marins réduisent considérablement les moyens de lutte contre les maladies. En effet, peu de solutions sont disponibles pour protéger ces animaux élevés en milieu ouvert. Les recherches réalisées en matière de traitement n'ont pas pour l'instant débouché sur des applications pratiques, soit en raison de leur inefficacité, soit en raison de leur difficulté d'application (Grizel, 1985). Ce type d'approche ne semble pas une voie à privilégier, et est limité aux élevages en milieu contrôlé. En raison de l'absence de réponses spécifiques de types anticorps la vaccination des

mollusques est impossible. Pour préserver les élevages et limiter les risques d'introduction et de propagation d'agents infectieux, les moyens de lutte sont essentiellement basés sur :

- la prophylaxie zootechnique qui vise à améliorer les techniques d'élevage dans le but d'obtenir des animaux en meilleures conditions, plus aptes à résister aux infections,
- l'amélioration génétique qui vise à accroître le niveau de résistance d'une espèce vis-à-vis d'un agent pathogène par sélection ou transgénèse,
- et surtout la **prophylaxie zoosanitaire** qui repose la mise en place d'un réseau de surveillance.

Ce rapport présente le plan stratégique d'échantillonnage du réseau de surveillance en pathologie, un rappel bibliographique des maladies et agents infectieux décrits chez les huîtres perlières, les résultats des analyses effectuées cette année et les procédures d'urgence à mettre en place en cas d'épisodes de mortalité anormale.

2. Rappels bibliographiques sur les agents infectieux décrits chez les huîtres perlières

La perliculture, en Polynésie française, a connu un essor considérable depuis les années 1980. En effet, pour illustrer cette progression, notons que les exportations de perles sont passées de 86 kg dans ces mêmes années à environ 11 tonnes aujourd'hui. Ces chiffres soulignent l'importance de cette activité tant au niveau économique (1.2 milliard FF de chiffre d'affaires) que social (34 atolls producteurs, 1000 fermes, 5000 emplois). Le développement rapide de la perliculture, accompagné ces dix dernières années d'une augmentation des densités d'élevage et d'une intensification des transferts des huîtres, est un facteur favorable à l'émergence de maladies et à leur propagation. Les élevages d'huître perlière, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758), ont connu dans les années 85, 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, Comps *et al.*, 1999, Comps *et al.*, 2001). Un parasite de type grégarine a été décrit chez des huîtres perlières moribondes (Chagot *et al.*, 1993). Cependant, aucune association significative avec les mortalités n'a pu être clairement établie. En dépit des nombreuses investigations, les causes exactes de ces mortalités appelées « syndrome 85 » restent encore aujourd'hui indéterminée et semblent être pluri-factorielles.

L'espèce *P. margaritifera* est également cultivée avec succès en mer rouge, au Soudan, depuis les années 1904. Toutefois, des mortalités récurrentes sont décrites depuis les années 1969, en association avec à un parasite « sphérique » non clairement déterminé (Nasr, 1982, Suliman, 1995). L'hypothèse qui prévaut aujourd'hui est que les formes sphériques observées seraient en fait des formes constitutives des cellules digestives (Pass and Perkin, 1985).

Un premier programme de surveillance zoosanitaire a été développé, en Polynésie Française, entre 1996 et 1997 (Contrat d'Etude IFREMER-EVAAM n° 85/1210177). Cette étude a permis de mettre en évidence des rickettsies (prokaryotes) 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 zoosanitaire ne mette en évidence aucun agent pathogène majeur (répertorié par l'Office International des Epizooties), certaines observations, notamment celles de particules « d'allures virales » doivent être considérées comme préoccupantes. En effet, au Japon, depuis les années 94, 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). Exceptée la taille, il présente de nombreuses homologies avec celui décrit par Comps *et al.* (2001). Toutefois, il n'a pas 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.*, 1998a). Ces virus ubiquitaires ont été décrits chez plusieurs espèces de bivalves, *Meretrix lusoria* et *Sinonovacula costicta* (Chou *et al.*, 1994, 1998, Suzuki *et al.*, 1997b). 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. costicta* (Suzuki *et al.*, 1997b). De récents résultats concernant des différences de détection de ce virus dans les huîtres perlières *P. fucata* élevées à différentes profondeurs et ayant subi différents stress de manipulations suggèrent le caractère opportuniste de ce virus (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 and Pan, 1998, 1999a, b,c).

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 qu'aucun agent étiologique n'ait jamais été mis en évidence. En Polynésie différents épisodes d'anomalies de la couche nacrée de la coquille de *P. margaritifera* ont été également rapportés (Cuif and Dauphin, 1996, Mao *et al.*, 1996, Comps *et al.*, 2000, Saulnier, 2001, communication personnelle).

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 écloserie 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 and 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 and Sprague, 1978). Enfin, 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 (papovavirus). Cette description n'était pas associée à des mortalités, cependant elle a été effectuée chez 2 individus sur 50 qui présentaient des lésions au niveau des palpes labiaux.

3. Mise au point du dispositif de la veille zoosanitaire

La première étape de cette convention a été de définir, en collaboration avec le Service de la Perliculture, les modalités du plan de surveillance zoosanitaire et plus particulièrement la stratégie des échantillonnages.

3.1. Définition d'une zone de surveillance

Chaque île faisant l'objet d'un suivi (île haute ou atoll) sera considérée, en première approximation, comme constituant une zone d'élevage à part entière, en raison de son isolement géographique et de la présence d'un système hydrobiologique homogène.

Au vu du grand nombre d'îles hautes ou d'atolls, producteurs d'huîtres perlières, et de l'étendue de la Polynésie française (environ l'Europe), le suivi zoosanitaire se limitera, dans sa phase de démarrage tout au moins, au suivi sur quelques îles.

3.2. Zones de prélèvements

3.2.1. Critères de sélection

Différents critères et contraintes ont dicté le choix des zones de prélèvement pour la mise en place du réseau de surveillance.

- Pour des raisons de facilité d'accès, de présence d'antenne du Service de la Perliculture ou de perliculteurs « relais » et d'économie en coûts des prélèvements, seules quelques unes des îles faisant déjà l'objet d'un suivi « croissance », dans le cadre du réseau mis en place par le Service de la Perliculture, seront considérées.
- La présence ou l'absence de collectage naturel (CN) sera prise en compte.
- L'introduction connue (IC) d'huîtres perlières provenant d'autres zones sera également examinée.
- Enfin, la géomorphologie des îles sera retenue : îles hautes caractérisées par un réseau fluvial ou atolls.

Basées sur ces contraintes et ces critères, **5 zones de prélèvements** ont été retenues pour cette année de mise en place du réseau (Annexe 1).

3.2.2. Sites de prélèvements intra-zone

Différents critères de sélection seront pris en compte pour « maximiser » la détection des agents pathogènes. Parmi ces critères, notons la période de prélèvements, le nombre des zones de suivi, la taille des échantillons, la fréquence de suivi, et les espèces échantillonnées.

- De nombreux facteurs biotiques (âge des individus, état de maturation, rejet de greffe...) et abiotiques (climat, pratiques culturales, transfert...) sont supposés avoir un impact sur le développement des maladies. Trois facteurs seront privilégiés pour orienter le choix des sites :
 - Les densités d'élevage, en particulier lorsque l'activité perlicole est importante,
 - la proximité de zones d'habitation avec les risques de pollutions anthropiques du milieu d'élevage et d'affaiblissement des huîtres perlières,
 - l'hydrodynamisme qui peut entraîner une augmentation du pouvoir de dissémination des agents pathogènes.
- 3 sites de prélèvement seront définis par zone de suivi, dans la mesure du possible.
- La taille de l'échantillon sera le suivant :

- **30 huîtres perlières / sites**

Les huîtres seront prélevées sur les filières des professionnels par le personnel du Service de la Perliculture, en choisissant en priorité, les huîtres présentant des anomalies cliniques, des retard de croissance ou ayant été rejeté pour la greffe.

- **5 mollusques sauvages**

Dans un premier temps, 5 autres mollusques seront prélevés dans le voisinage immédiat du lieu de prélèvement des huîtres perlières (*Pinctada maculata*, *Saccostrea cucullata*, *Arcidae*, *Chamidae*, *Tridacnidae*.....). En effet, les taux de prévalence ou d'infestation d'un agent pathogène peuvent se révéler différents chez d'autres espèces de mollusques ce qui faciliterait leur mise en évidence. Ainsi, les mollusques *Chamidae*, *Tridacnae* et *Arcidae* sont plus sensibles aux infections par *Perkinsus* sp. et peuvent tolérer sans mortalité des taux de prévalence élevés (OIE, International Aquatic Animal Health, 2000). Ces mollusques représentent donc de bons indicateurs de la présence de *Perkinsus* sp.

Le nombre d'individus prélevés devra toutefois être réévalué si l'on diagnostique un agent pathogène ou si l'on souhaite réaliser un suivi zoosanitaire de base sur ces espèces.

3.2.3. Dates et fréquence des prélèvements

Chaque site suivi donnera lieu à 2 prélèvements dans l'année (1^{er} et 2^{ème} semestre). Si le fonctionnement du réseau le permet, ce nombre pourra être augmenté par la suite (chaque trimestre).

3.3. Réalisation des prélèvements

Après ouverture de l'huître et prélèvement des tissus sur site (figure 1), ces derniers sont immergés dans le liquide fixateur de Davidson, à raison de 10 volumes de fixateur pour un volume de tissus (Annexe 2). Après 24 heures d'immersion, le fixateur de Davidson sera

remplacé par de l'alcool à 70° jusqu'à envoi et réception des échantillons au laboratoire IFREMER. Les étapes supplémentaires de préparation des échantillons, enregistrement du lot, mise en cassette des individus prélevés, déshydratation et imprégnation des tissus en paraffine, préparation des lames pour la coloration sont décrites en annexe 3.

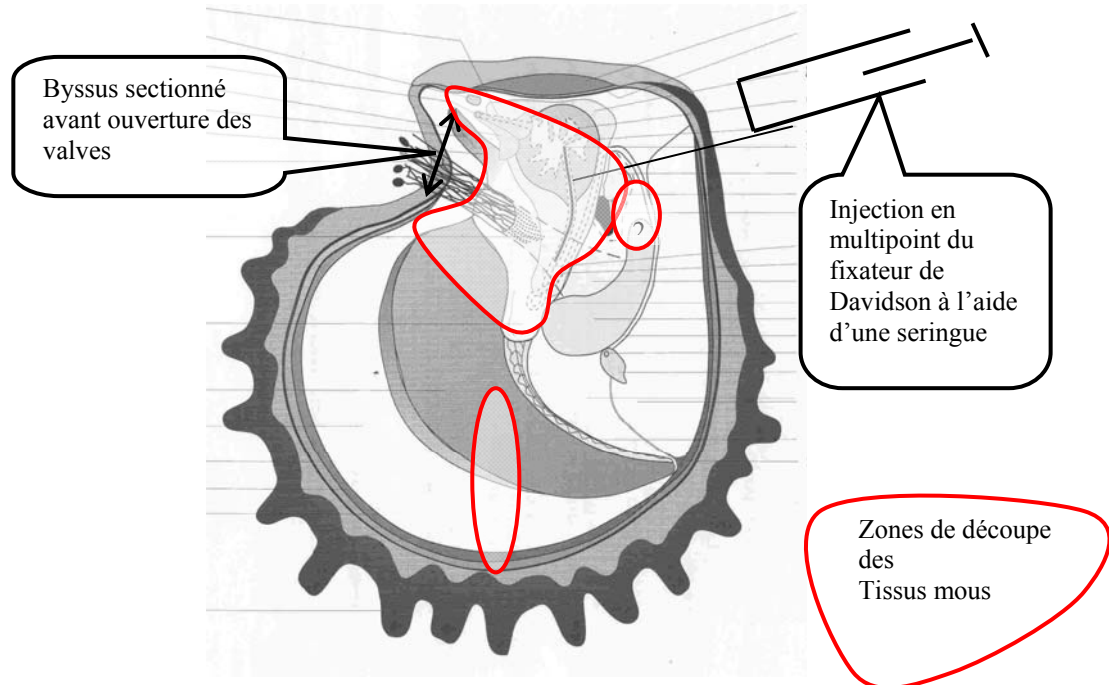


Figure 1 : Schéma des zones de découpe des tissus mous au moment de l'ouverture des huîtres perlières

4. Procédures d'urgence à mettre en place en cas de mortalité anormale

L'objectif majeur est de définir la procédure à mettre en place en cas de mortalité anormale afin de mobiliser les compétences et les informations le plus rapidement possible pour répondre à ces situations de crise et limiter leur impact.

4.1. Au moment des mortalités – Confirmation et évaluation des mortalités

En France, en matière de mortalité anormale, le principal texte de référence est le Décret en conseil d'Etat 98-391 du 19 mai 1998. Une mortalité anormale est définie dans la réglementation comme suit : **mortalité cumulée excédant 15% en 15 jours**.

Les cas de mortalité devront être obligatoirement déclarés par les professionnels (éventuellement le maire de l'île) au Service de la Perliculture – Département Recherche et Développement - qui en informera la personne responsable de l'unité de pathologie et/ou le chef du laboratoire IFREMER-COP (figure 2).

Le Service de la Perliculture devra, dans un premier temps, tenter d'évaluer les origines possibles des mortalités, infectieuses ou non (environnementales, bloom planctoniques, toxicité.....) en réalisant une enquête téléphonique auprès du ou des perliculteurs concernés.

Le questionnaire à compléter est en annexe 4. Afin d'apprécier l'étendue du phénomène il faudra noter le maximum d'informations.

Une fois cette enquête réalisée, il s'agira de décider, en accord avec le responsable de l'unité de pathologie et/ou le chef de laboratoire d'IFREMER-COP, si la piste infectieuse est confirmée. En cas de confirmation, il sera nécessaire d'effectuer une commission de visite composée d'une personne du Service de la perliculture et d'une personne d'IFREMER. Il conviendra de recommander au professionnel de ne pas transférer ses huîtres avant la commission de visite et ce jusqu'à obtention des résultats d'analyses.

4.2. La commission de visite – action concertée PRL - IFREMER

Si le Service de la Perliculture organise une commission de visite, une personne du laboratoire IFREMER y participera et effectuera un (ou des) prélèvement(s) avec un nombre d'animaux s'élevant de 50 à 100 par point échantillonné. L'idéal consiste en un échantillon de 150 animaux, ce qui autorise une détection à 95% d'un niveau de prévalence de 2% (Manuel de diagnostic pour les maladies des Animaux aquatiques, Article 5, OIE). Le nombre de points échantillonnés et le nombre d'individus prélevés seront convenus à l'avance entre le Service de la Perliculture et l'IFREMER en fonction de l'étendue des mortalités déclarées. Au besoin, si la commission de visite met en évidence sur le terrain une mortalité plus étendue que ne le laissaient prévoir les premières informations, les prélèvements seront modifiés.

A noter que les animaux dits « moribonds », c'est à dire en phase sub-létale, seront recherchés en priorité. Ces animaux sont en général légèrement entrouverts, ne réagissent pas ou peu au stimuli et ne sentent pas mauvais (donc ne sont pas en phase de décomposition).

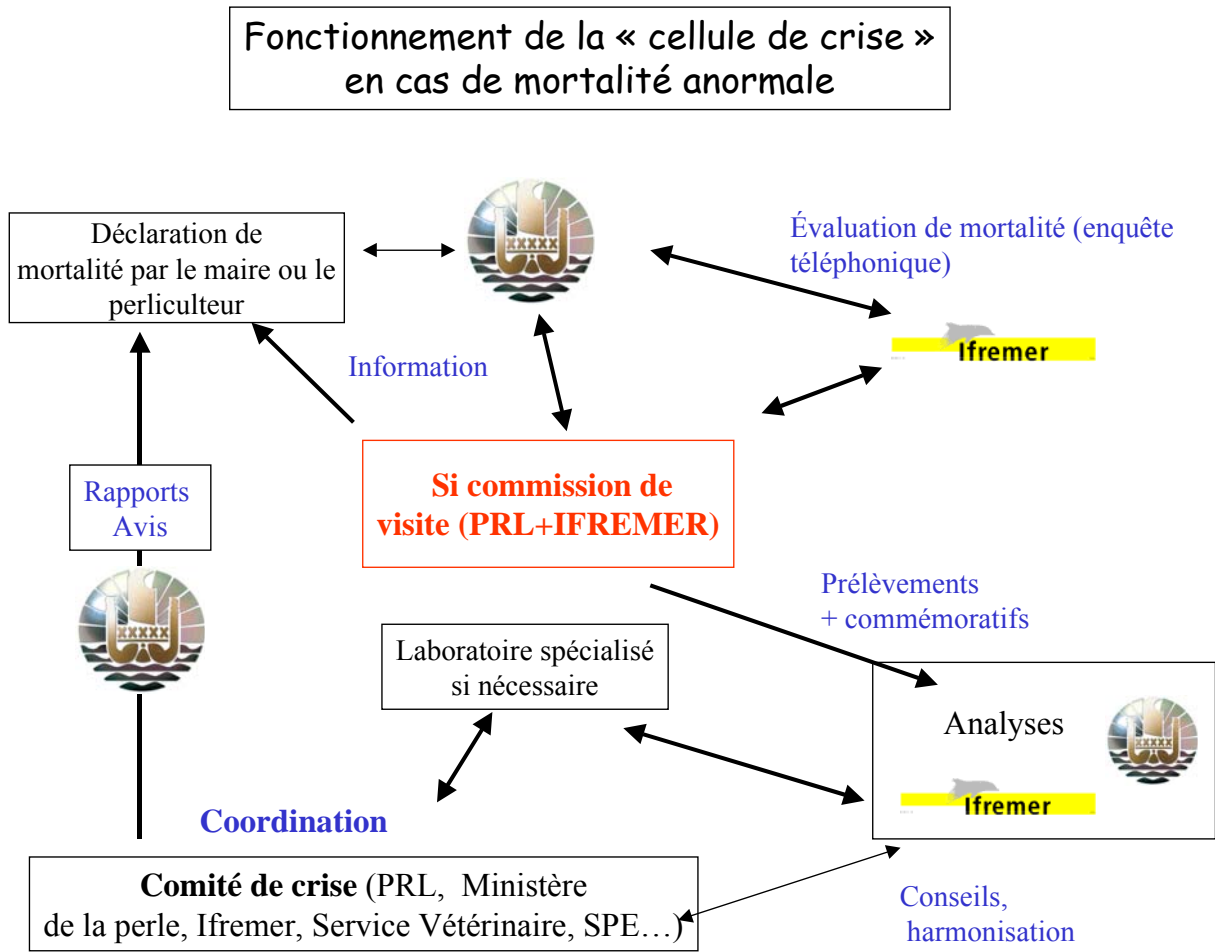


Figure 2 : Organigramme en cas d'épisodes déclarés de mortalité et/ou morbidité anormales

Il s'agira de **décrire la répartition et les taux de mortalités** sur le ou les concessions concernées (comptage d'au moins 10 filières ou 100 individus répartis de façon aléatoire sur la concession).

Il faudra déterminer **le ou les espèces touchées et la classe d'âge concernée** et éventuellement non concernée, **le comportement des lots voisins de ceux des mortalités** et éventuellement, **le comportement des lots touchés transportés vers d'autres secteurs ou îles**.

Il sera indispensable de compléter une fiche de prélèvement par lot échantillonné afin d'éviter les erreurs (interversion de lots par exemple...) et prévoir les modalités d'envoi des différents échantillons le plus rapidement possible au Laboratoire IFREMER à Vairao.

Si les prélèvements sont envoyés le jour même, ils peuvent être laissés en attente dans une glacière. Si les prélèvements sont envoyés le jour suivant, il est préférable de réaliser une double fixation des animaux dans le fixateur de Carson et le fixateur de Davidson (Annexe 2). Le fixateur de Carson autorise une analyse en microscopie électronique ultérieurement si une analyse complémentaire ultrastructurale est nécessaire. Il faut dans ce cas prévoir de transporter le matériel et les réactifs par transport aérien.

4.3. Synthèses des données et avis

Le recueil des données concernant les mortalités anormales se fera au moyen du questionnaire (Annexe 4) que la personne qui effectue le(s) prélèvement(s) devra communiquer au laboratoire d'analyse IFREMER.

Les résultats d'analyse et les renseignements sur le lot seront enregistrés sur une version papier et dans une base de donnée ACCESS (en cours de réalisation au Service de la Perliculture). Son accès sera strictement limité aux personnes habilitées à la consulter (PRL, IFREMER).

Toutes les informations devront parvenir au Service de la Perliculture – Département Recherche et Développement (Sandra Langy et Anne Sandrine Talfer) qui se chargera d'effectuer à chaque étape des synthèses des informations.

Il serait important de créer **une liste électronique**, type forum électronique, pour animer, **recueillir et diffuser le plus rapidement possible les informations**.

Les analyses seront conjointement réalisées par une personne du Service de la Perliculture et le responsable de l'Unité de Pathologie du COP. Ces analyses seront réalisées en histologie en première approche.

A l'issue des analyses, la cellule de crise décidera de la suite à donner. Si une piste infectieuse est confirmée, différents laboratoires d'analyses spécialisés, notamment en métropole (IFREMER, LGP ou LPI) pourront être sollicités. D'autres prélèvements pour la bactériologie ou la virologie pourront alors être demandés au Service de la Perliculture.

Les comptes rendus d'analyse seront expédiés directement et confidentiellement par le Service de la Perliculture aux professionnels concernés et une copie sera envoyée au laboratoire IFREMER.

En l'absence de cadre réglementaire précis en matière de transfert ou d'indemnisation, « la cellule de crise » émettra des conseils ou des avis auprès du Ministère de la Perliculture, qui devra prendre les décisions qu'il jugera nécessaire (interdiction de transfert, éradication....).

Lorsque les analyses effectuées par l'IFREMER écartent l'hypothèse d'un agent infectieux majeur pouvant être à l'origine des mortalités, les transferts sont de nouveau possibles.

5. Résultats des analyses histologiques effectuées en 2003

14 lots ont été prélevés cette année : 3 lots à Rikitea, 2 lots à Fakarava, 4 lots à Tahaa, 3 lots à Takaroa et 2 lots à Makemo. Cela correspond à la première série de prélèvement sauf pour Tahaa où les deux séries de prélèvements ont été réalisées. Les deux séries n'ont pu être effectuées dans tous les sites choisis en raison du retard pris par le Service de la Perliculture dans le recrutement du technicien en histologie.

Ces lots ont été préparés et traités à l'IFREMER. Cela correspond à environ 500 blocs d'huîtres individualisées. Les différentes étapes de préparation des échantillons sont présentées en annexe 2. Les analyses en histologie nécessitent de nombreuses étapes, déshydratation, imprégnation et inclusion des tissus dans la paraffine, réalisation de coupes histologiques de 3µm d'épaisseur, coloration des tissus et enfin analyse au microscope photonique.

Une fiche de résultats d'analyse a été préparée en collaboration entre le Service de la Perliculture et l'IFREMER, et est expédiée confidentiellement aux perliculteurs concernés par le Service de la perliculture (Annexe 5).

Les analyses histologiques effectuées cette année ne font apparaître aucun agent pathogène à déclaration obligatoire à l'Office International des Epizooties (OIE, annexe 6).

Les 406 huîtres d'élevage examinées présentent un degré plus ou moins important d'atteinte parasitaire par des sporozoaires de type **grégarine** et des parasites de type **Rickettsia-like**. Des **zones d'enkystement de métazoaires** ont été également observées. Ces résultats sont présentés toute classe d'âge confondue.

5.1. Les sporozoaires de type Grégarine

5.1.1. Analyse des huîtres perlières, *Pinctada margaritifera*

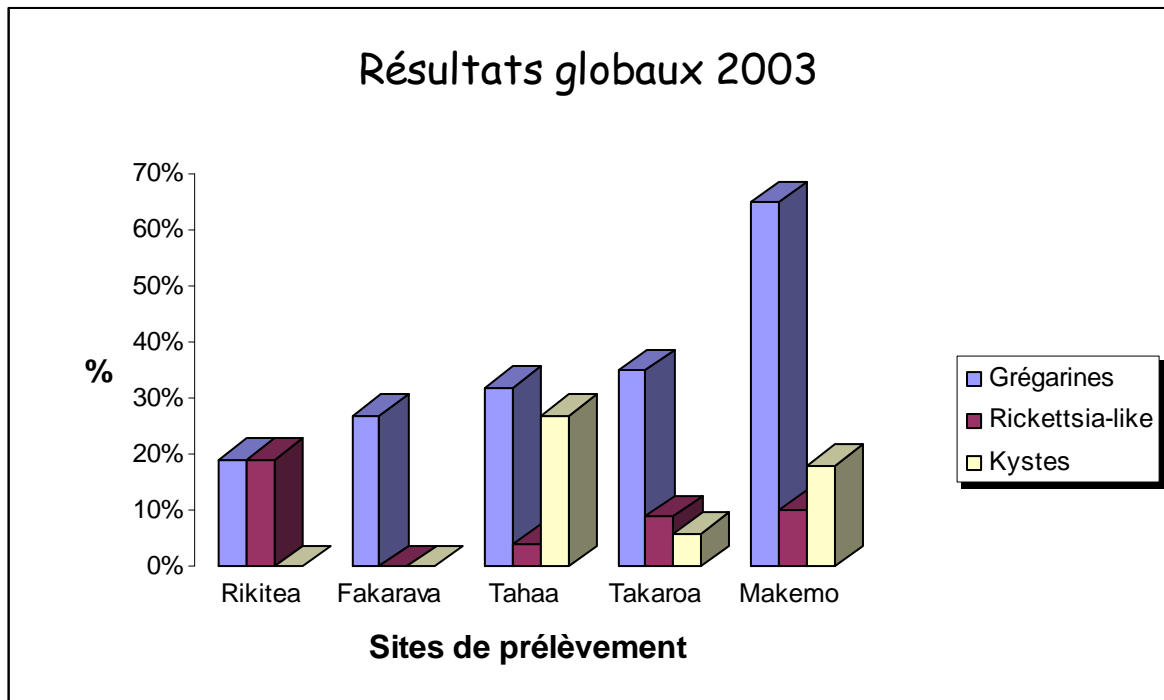


Figure 3 : Pourcentages des différents organismes et zones d'enkystement observés dans les échantillons

Des parasites de type **grégarine** ont été observés dans les prélèvements provenant de **tous les sites**. Les taux d'infection sont compris entre 18,6% et 64,7% (figure 3). Ces pourcentages sont respectivement pour Rikitea, Fakarava, Tahaa, Takaraoa et Makemo de 18,6% (16/86), 26,7% (16/60), 32,5% (39/120), 34,8% (31/89) et 64,7 % (33/51) (figure 3). Après analyse statistique des données (test du χ^2), les taux d'infection sont statistiquement plus élevés à Makemo que chez tous les autres prélèvements, toute classe d'âge confondue. Les lots provenant de Rikitea sont moins infectés que ceux de Tahaa, Takaraoa et Makemo. Il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les prélèvements de Fakarava, Tahaa et Takaraoa.

Ces parasites de l'appareil digestif des huîtres *P. margaritifera* ont déjà été décrits en Polynésie par Chagot *et al.* en 1993 et Fougereuse *et al.* en 1994. Ils 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). Ils sont localisés généralement dans la partie terminale de l'intestin (ou rectum) (figure 4). Les grégarines sont des parasites intracellulaires des cellules de l'épithélium cylindrique digestif. Ils se présentent sous la forme d'une cellule allongée d'environ 10 à 20 μ m (figure 5).

Dans les prélèvements de Rikitea, Tahaa, Takaroa et Makemo, la localisation des parasites s'étend aux portions hautes de l'intestin (figure 6A et B). Chez certains individus, l'infection est plus importante, et les grégarines sont observées dans certains tubules digestifs (figure 7) et dans le tissu conjonctif (figure 8A et B). Ces localisations sont peu fréquentes et souvent associées soit à une désorganisation de l'épithélium (figure 9), soit à une infiltration hémocytaire. Chez certaines huîtres, le nombre important de grégarines entraînent une destruction partielle de l'épithélium (figures 8A et B).

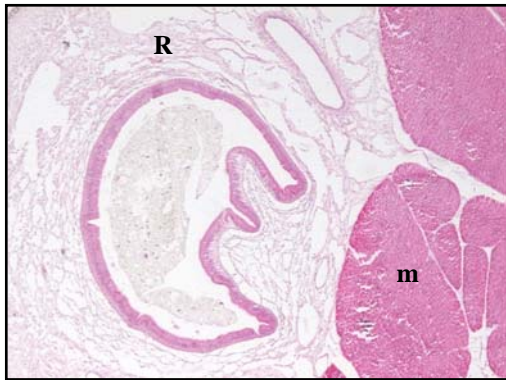


Figure 4 : coupe transversale de la partie terminale de l'intestin ou rectum (R).
m = muscle (x100)

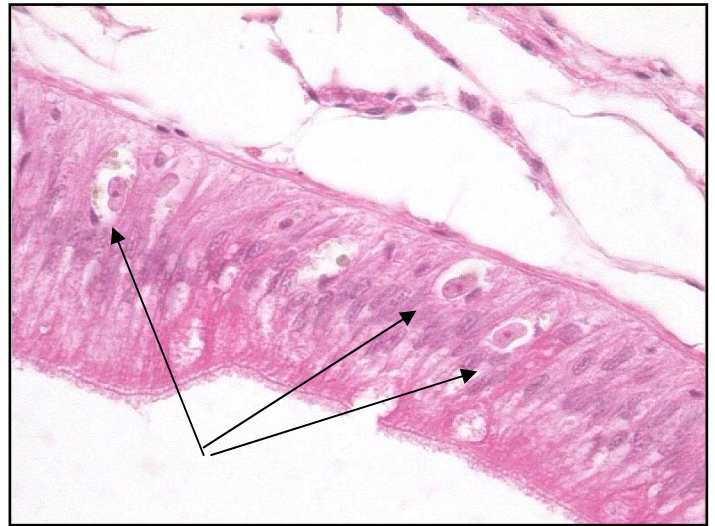


Figure 5 : coupe de l'épithélium du rectum infecté par des grégarines (flèches) (x600)

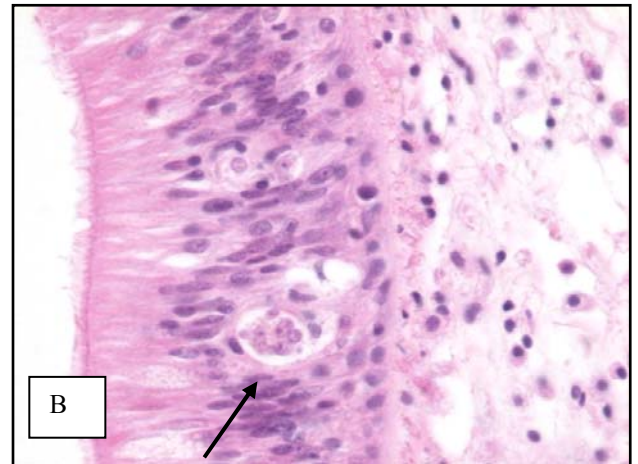
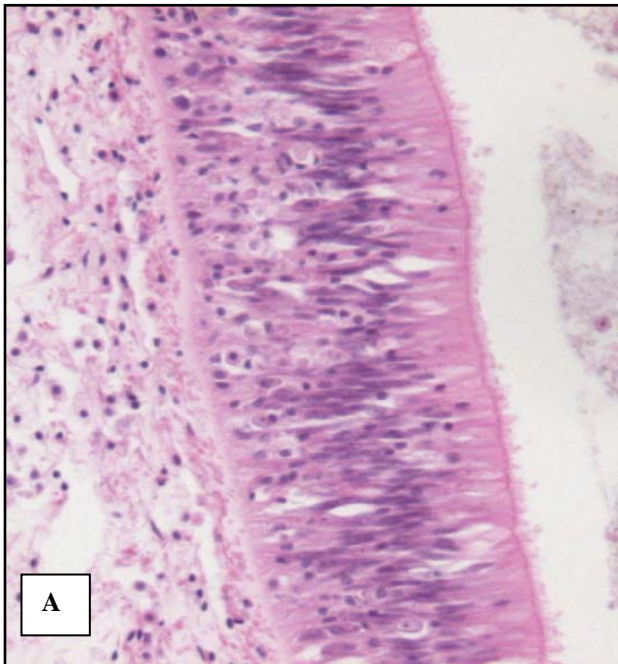


Figure 6 A et B : (A) Coupe de la portion haute de l'intestin infectée par des grégarines (x400). (B) x600 (flèche)



Figure 7 : Sporozoaires de type Grégarine dans l'épithélium de tubule digestif chez *P. margaritifera* (X1000, flèches)

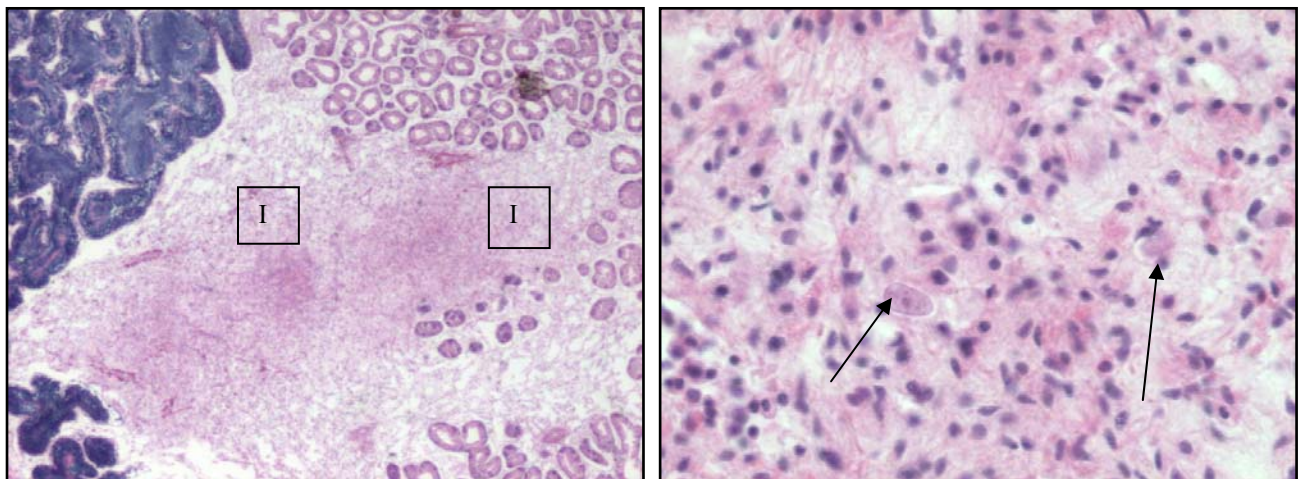


Figure 8 A et B : Zone d'infiltration hémocytaire (I) du tissu conjonctif d'une huître perlière infectée par les grégarines. A : x 100. B x 600 (flèches)

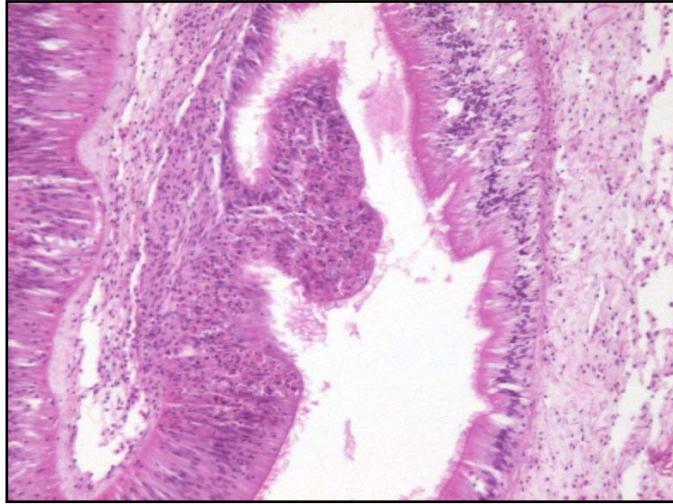


Figure 9 : Zone de l'épithélium du tube digestif haut infectée par des grégarines (x200).

5.1.2. Analyse des espèces *P. maculata*, *Saccostrea cucullata* et *Chama* sp.

Trois autres espèces de mollusques ont été prélevés dans le voisinage immédiat du lieu de prélèvement des huîtres perlières, lorsque cela était possible. Il s'agit de *Pinctada maculata* (pipi), de *Saccostrea cucullata* (kapi kapi) et de *Chamidae* (*chama* sp).

21 *P. maculata* ont été analysées au total. 3/10 provenant de Takaroa présentaient des infections par des grégarines au niveau des tubes digestifs haut et bas. Les prélèvements obtenus à Tahaa (3 individus), Makemo (4 individus) et Rikitea (4 individus) ne présentaient pas d'infection par les grégarines.

Les infections, parfois importantes, observées sur ces échantillons étaient accompagnées d'une désorganisation et d'une destruction partielle de certaines zones de l'épithélium (figures 10 et 11).

Les observations effectuées montrent que les grégarines peuvent être également présentes dans les épithéliums sans qu'aucune réponse de l'hôte ne soit notée (figures 12 A et B).

Les prélèvements effectués sur les espèces *S. cucullata* (11 individus) et *C. sp.* (1 individu) en provenance de Tahaa, Takaroa et Rikitea ne présentaient aucune infection par les grégarines.

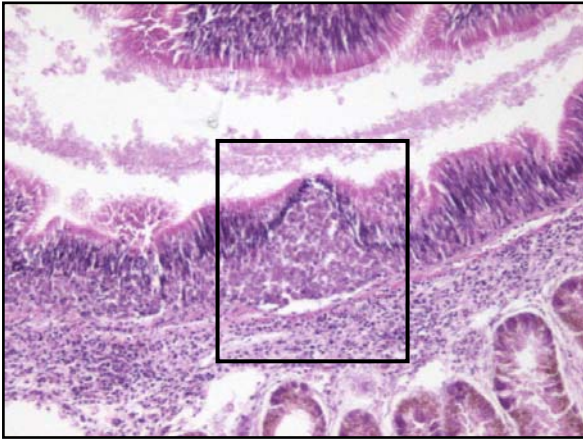


Figure 10 : Zone de l'épithélium digestif haut fortement infecté par des Grégarines (x 400).

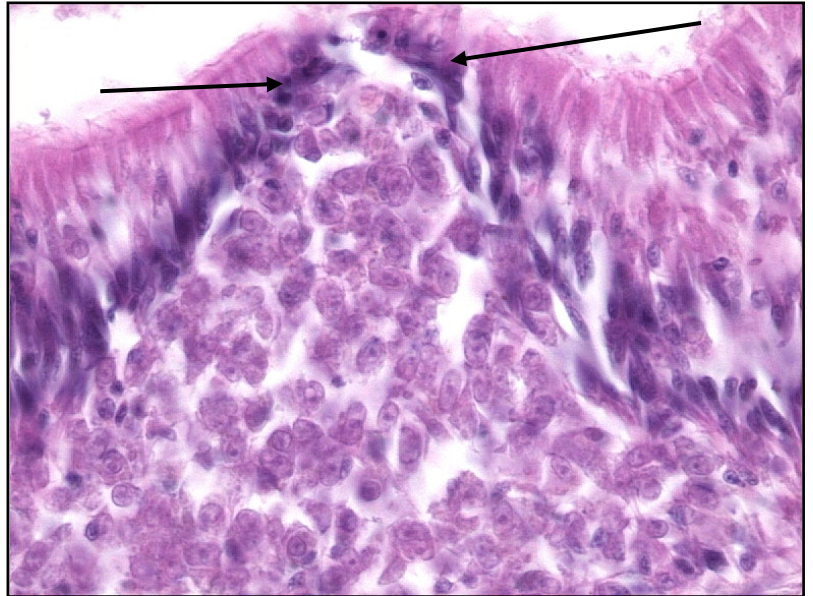
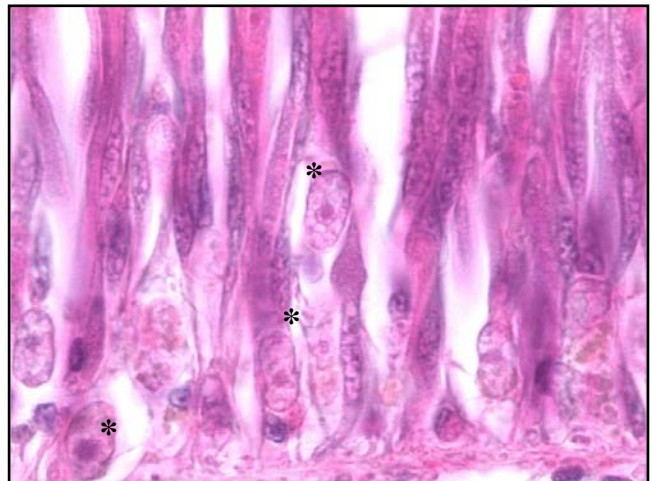
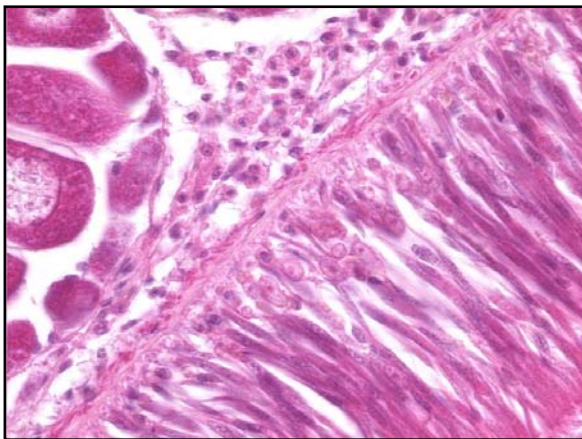


Figure 11 : notez la destruction partielle de l'épithélium fortement infecté par des Grégarines x 600 (flèches).



Figures 12 A et B : zone de l'épithélium du tube digestif haut présentant de nombreuses grégarines (*) au niveau de la membrane basale sans infiltration hémocytaire associée. A : x 400. B : x 1000 (*)

A notre connaissance, aucune description de grégarine n'a encore été rapportée dans la littérature chez *Pinctada maculata*. Les taux de prévalence relativement élevés et les désordres tissulaires observés seront à vérifier l'année prochaine. Il serait intéressant d'augmenter le nombre de prélèvements et d'individus par site afin de suivre les taux d'infection et de prévalence. En effet, le nombre de *P. maculata* est important dans le milieu au voisinage des huîtres perlières en élevage et cette espèce peut représenter un foyer d'infection non négligeable pour les huîtres. Il serait important de vérifier toutefois s'il s'agit de la même espèce de grégarine, notamment par leur caractérisation génomique.

5.2. Les parasites de type Rickettsia-like

5.2.1. Analyse des huîtres perlières, Pinctada margaritifera

Des organismes apparentés à des **Rickettsia-like** ont été également diagnostiqués dans les huîtres originaires de Rikitea, Tahaa, Takarua et Makemo. Les taux d'infection sont respectivement de 18,6%, 4,2%, 9% et 9,8% et (figure 3).

Des procaryotes assimilés à des *Rickettselia* avaient déjà été décrits chez *P. margaritifera* par Comps *et al.* (2001) lors d'analyses histologiques réalisées en 1996 et 1997. Aucune donnée sur les taux d'infection et les taux de prévalence n'est malheureusement disponible.

Ces parasites sont présents dans les épithéliums du tube digestif et des tubules digestifs. Aucune réaction inflammatoire de défense de l'hôte n'est notée associée à leur présence (figures 13 et 14). Une coloration spécifique de Feulgen et Rosenbeck a permis de confirmer la présence de ces microcolonies dans les épithéliums (figure 15).

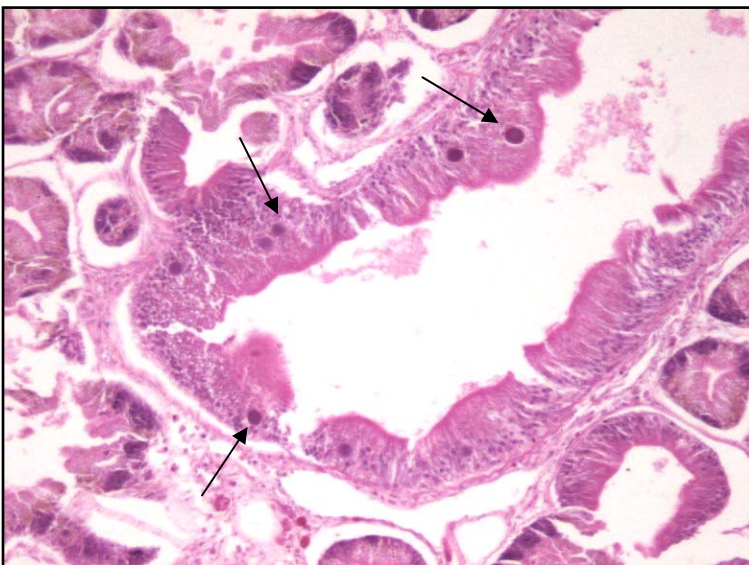


Figure 13 : Coupe de la masse digestive d'une huître infectée par des Rickettsia-like (x250) flèches

Figure 14 : microcolonies à plus fort grossissement (x 1000)

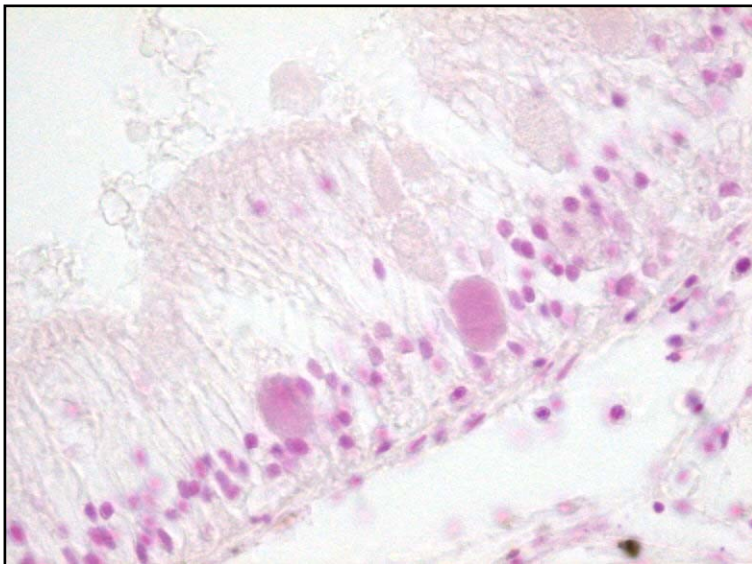
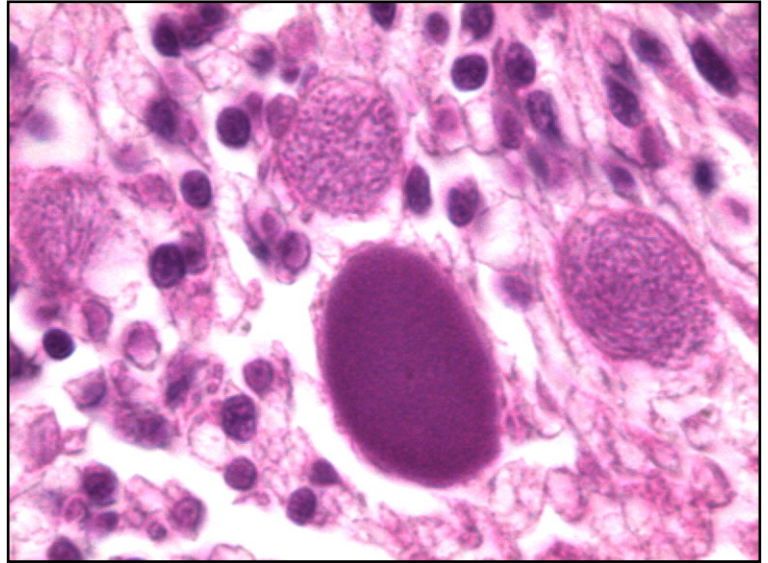


Figure 15 : coloration spécifique de Feulgen et Rosenbeck confirmant la présence de ces microcolonies dans l'épithélium digestif (x400)

Les rickettsies (procaryotes intracellulaires) ont été décrits chez de nombreuses espèces d'huîtres et autres mollusques marins d'élevage. Un organisme apparenté à *Rickettsia* a été observé en France chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas* provoquant des lésions des branchies (Renault et Cochenec, 1994). Chez l'ormeau *Haliotis cracherodii* et occasionnellement chez *H. rufescens* et *H. corrugata*, une rickettsie est associée à des épisodes de mortalité dramatique entraînant une interdiction de la pêche en 1994 (Friedman *et al.*, 2002). Identifiée comme *Candidatus xenohaliotis*, elle se développe dans l'épithélium digestif et provoque une atrophie du pied.

Des infections par des rickettsies ont été rapportées chez *Tridacna crocea* (Goggin and Lester, 1990) et chez *Hippopus hippopus* (Norton *et al.*, 1993).

Récemment, de fortes mortalités chez les espèces d'huîtres *P. fucata* et *P. maxima*, en élevage et en éclosion, ont été associées à la présence d'organismes de type rickettsien (Wu and Pan, 1998, 1999 a, b, c, Wu *et al.*, 2003).

Les taux d'infection et de prévalence restent faibles. Toutefois chez une huître, âgée de 2,5 ans, prélevée à Rikitea, le nombre élevé d'organismes de type *Rickettsia*-like a entraîné une réaction inflammatoire importante au niveau du tissu conjonctif contigu aux tubules infectés (figure 16).

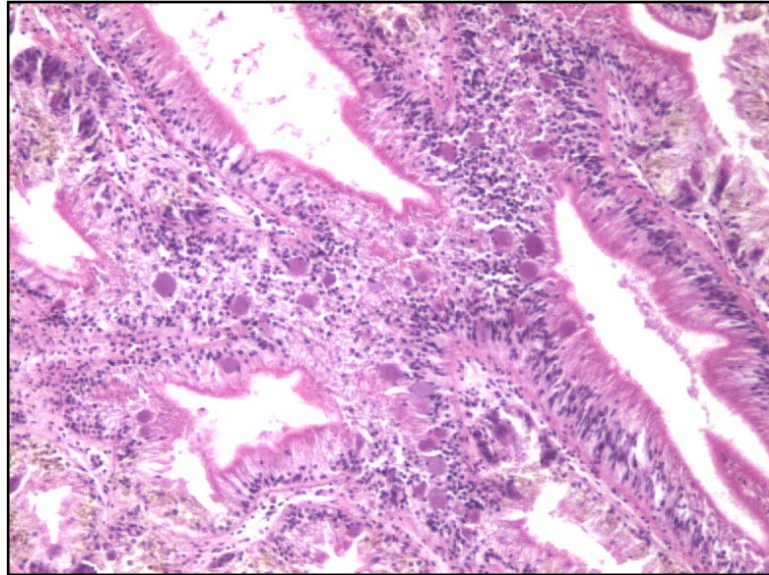


Figure 16 : Inflammation du tissu conjonctif de la masse digestive d'une huître fortement infectée par des *Rickettsia*-like (x 100)

5.2.2. Analyse des espèces *P. maculata*, *Saccostrea cucullata* et *Chama* sp.

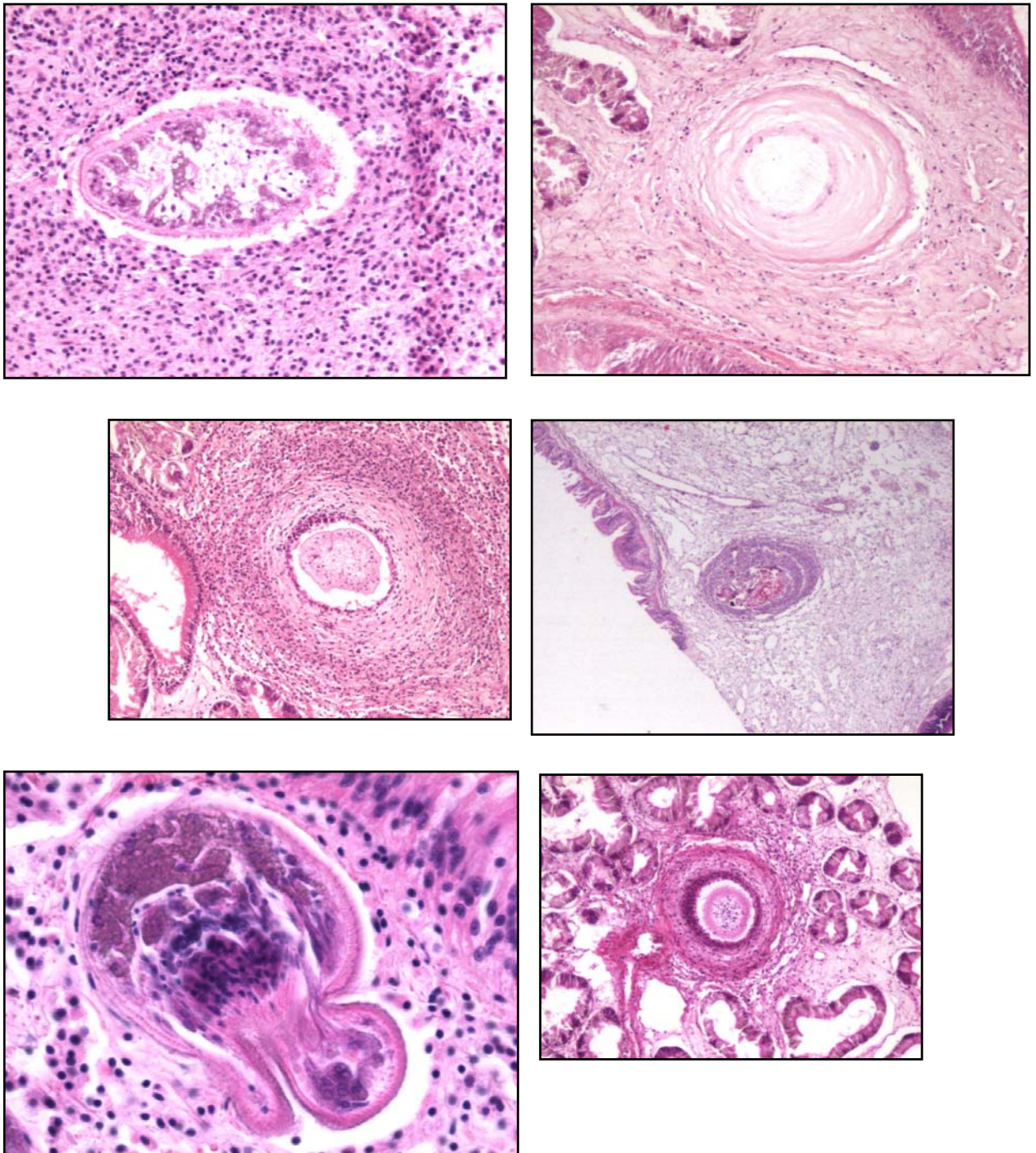
Il n'a pas été observé d'organismes de type rickettsien dans les prélèvements effectués de *P. maculata* (0/21), *S. cucullata* (0/11) et *C. sp* (0/1).

5.3. Les zones d'enkystement

5.3.1. Analyse des huîtres perlières, *Pinctada margaritifera*

Les échantillons provenant de Takaroa, Makemo et Tahaa présentaient des **zones d'enkystements de métazoaires**. Les pourcentages sont respectivement de 5,6%, 17,6% et 26,7% (figure 3). Les métazoaires n'ont pu être déterminés par les techniques histologiques utilisées. Ces zones présentent différents aspects (figures 17).

Ces zones sont souvent observées au niveau du tissu conjonctif de la masse digestive. 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.



Figures 17 : différents aspects des zones d'enkystement de métazoaires observées dans le tissu conjonctif de la masse digestive des huîtres perlières

Ces organismes ne représentent pas un risque majeur de maladie. Il faudra toutefois surveiller l'évolution des taux d'infestation et tenter de préciser le genre des métazoaires par des analyses d'état frais notamment lorsque cela sera envisageable.

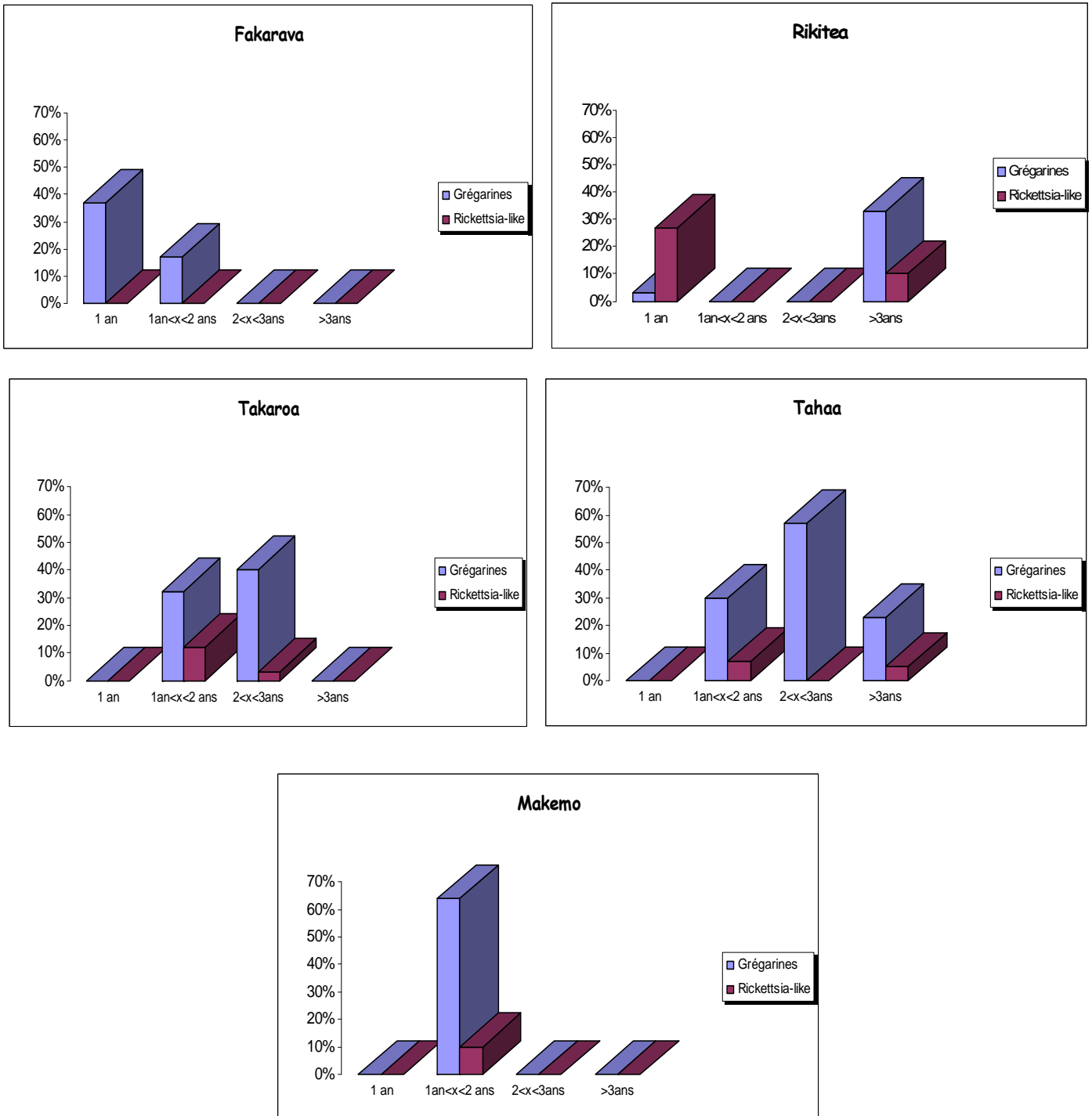
En effet, des cercaires de trématodes de l'espèce *Bucéphalus margaritae* ont déjà été décrits chez des huîtres perlières au Japon, *P. martensi* (Ozaki and Ishibashi, 1934). Ces auteurs ont suggéré que la présence de ces parasites pouvait entraîner des problèmes lors des opérations de greffe.

5.3.2. Analyse des espèces *P. maculata*, *Saccostrea cucullata* et *Chama* sp.

Notons qu'un individu sur 7 de *S. cucullata* et un individu sur 3 de *P. maculata* présentaient les mêmes images de zone d'enkystement que les huîtres perlières au niveau de la masse digestive. Ces deux échantillons provenaient de Tahaa.

5.4. Analyse des résultats par classe d'âge

Nous avons recherché l'effet de la classe d'âge sur les taux d'infection du site, pour les grégarines et les *rickettsia*-like. Quatre classes d'âge ont été définies, inférieure ou égale à 1 an, comprise entre 1 et 2 ans, entre 2 et 3 ans et supérieure à 3 ans (figure 18). Bien que les échantillons prélevés n'aient pu tout recouvrir, toutes les classes d'âge sont infectées par les parasites de type Grégarine et *Rickettsia*-like. Trop peu de prélèvements ont été effectués pour pouvoir en déduire une tendance. Il serait important dans les prélèvements futurs de combler ce manque de données et d'affiner le diagnostic par une analyse précise des taux de prévalence.



Figures 18 : Présentation des résultats, par classe d'âge et par sites, des infections par les grégarines et les parasites de type rickettsien.

6. Conclusions

Cette première année de mise en place du réseau de veille zoosanitaire a été une année test qui nous a permis de vérifier le bon fonctionnement et la faisabilité d'un tel réseau.

Les points forts sont l'intérêt porté par les professionnels à la mise en place de cette surveillance et le bon fonctionnement des collectes et de l'acheminement des échantillons. La formation du personnel de la Perliculture au diagnostic des agents pathogènes rencontrés chez l'huître perlière est pratiquement achevée et devrait aboutir l'année prochaine à une autonomie plus grande en matière de diagnostic. Cette formation devra toutefois être soutenue et complétée par une meilleure connaissance des agents pathogènes décrits chez les mollusques et en particulier ceux listés dans les maladies à déclaration obligatoire de l'Office International des Epizooties (OIE).

Le point majeur de dysfonctionnement a été l'impossibilité, pour le Service de la perliculture, de recruter un technicien pour la préparation des échantillons pour l'histologie. Ce problème s'est donc traduit par une diminution du nombre de prélèvements prévus puisqu'une seule série a pu être réalisée cette année : la conséquence en a été une réduction du nombre d'huîtres analysées : 406 huîtres analysées sur les 900 prévues. Afin de pérenniser ce réseau, son bon fonctionnement et son efficacité, un effort soutenu du Service de la Perliculture est attendu pour recruter le plus rapidement possible un technicien.

On retiendra que les analyses histologiques effectuées cette année ne font apparaître aucun agent pathogène à déclaration obligatoire à l'Office International des Epizooties.

Les 406 huîtres d'élevage examinées présentent un degré plus ou moins important d'atteinte parasitaire par des sporozoaires de type **grégarine** et des parasites de type **Rickettsia-like**. Des **zones d'enkystement de métazoaires** ont été également observées.

Bien que ces parasites ne soient pas associés à des maladies, leur présence entraînent des désordres tissulaires plus ou moins importants qui peuvent rendre l'huître plus sensible au stress de la greffe. Cet état peut conduire à des rejets de greffe et/ou des perles de mauvaises qualités. En particulier, du fait de la modification de la localisation dans les organes des sporozoaires de type grégarine, une attention particulière devrait être apportée l'année prochaine sur les lots fortement infectés. On peut, en effet, s'interroger sur la signification de ce changement. Soit l'infestation évolue, soit ces parasites révèlent un état physiologique affaibli des huîtres. Cela peut correspondre à des modifications du milieu naturel (température, salinité....) et/ou des conditions d'élevage, densités, transfert, pratiques culturelles modifiées....etc.

Dans ces conditions il paraît utile d'effectuer un nombre plus élevé d'analyse afin de mieux décrire ce phénomène et d'approfondir les investigations dans certaines zones plus sensibles (Takarao, Makemo, Tahaa..) d'autant plus que certains perliculteurs semblent préoccupés par la santé des huîtres perlières à Takarao et Manihi. Il paraît d'ores et déjà indispensable de réaliser en 2004 l'ensemble des prélèvements prévus de manière à compléter ces analyses. Une réflexion pourra être menée en début d'année 2004 afin de rediscuter le choix des sites à suivre pour les échantillonnages.

En plus du réseau de surveillance, nous proposons un schéma d'organisation à mettre en place en cas d'épisodes de mortalité ou de morbidité déclarées. Il est en effet important de

définir dès aujourd'hui la procédure afin de mobiliser les compétences et les informations le plus rapidement possible. Les informations recueillies lors de ces situations de crise apporteront les éléments nécessaires à la prise de décision en matière de réglementation et/ou d'informations auprès des services compétents du territoire et des professionnels.

Enfin, l'analyse histologique des prélèvements d'huîtres perlières mais également des autres mollusques nous a permis de mettre en place une lamotheque de référence de tous les organes ainsi que des tissus sains et parasités de *P. margaritifera*, *P. maculata*, *Saccostrea cucullata* et *Chama* sp.. Cette lamotheque essentielle aux travaux d'expertise en diagnostic complète l'atlas anatomique de l'huître perlière réalisée par Fougerouse et Herbaut (1994), le poster concernant l'histologie des principaux organes de l'huître adulte (D. Saulnier – IFREMER, 2002) et l'atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins (Grizel, 2003).

7. Bibliographie citée

- Chagot, D., Fougerouse, A., Weppe, M., Marquès, A. and 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 III 316, 239-244.
- Chou, Y.H., Chang, S.J., Lee, H.Y. and 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 33, 213-219.
- Chou, Y.H., Li H.J. and Lo C.F. (1994) Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. Fish pathology 29, 171-175.
- Comps, M., Fougerouse, A. and Buestel, D. (1998) A procaryote infecting the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 87-89.
- Comps, M., Herbaut, C. and Fougerouse, A. (1999) Virus-like particles in pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19, 85-88.
- Comps, M., Herbaut, C. and Fougerouse, A. (2000). Abnormal periostracum secretion during the mineralization process of the pearl in the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquatic Living Resources* 13, 49-55.
- Comps, M., Herbaut, C., Fougerouse, A. and Laporte, F. (2001) Progress in pathological characterization of syndrome 85 in the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquatic Living Resources* 14, 195-202.
- Cuif, J.-P. and 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* 9, 187-193.
- Fougerouse-Tsing A. et Herbaut C. (1994). Atlas anatomique de l'huître perlière, *Pinctada margaritifera*. Programme Général de Recherche sur la Nacre.
- Friedman, C.S., Biggs, W., Shields, J.D. and Hedrick, R.P (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *Journal of Shellfish Research* 21(2) : 817-824.
- Goggin, C.L., Lester, R.J.G. (1990). Rickettsiales-like infection in the gills of *Tridacna crocea* from the Great Barrier Reef. *Journal of Invertebrate Pathology* . 56 (1) : 135-138.
- Grizel H. (2003). Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins. Ed H. Grizel. Edition IFREMER – BP 70 – 29280 Plouzané (France).
- Grizel, H (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate, *Ostrea edulis*, et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles. Université de Montpellier, 145pp.

- Grizel, H. (1986) Etudes des mortalités de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* dans l'archipel des Tuamotu (Polynésie française). Contrat d'étude EVAAM-IFREMER n°85/1210177.
- Hine, P.M. and Thorne, T. (1998) *Haplosporidium* sp. (Haplosporidia) in hatchery-reared pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson, 1901), in north Western Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 48-52.
- Hine, P.M. and Thorne, T. (2000) A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Disease of Aquatic organisms* 40(1), 67-78.
- Hirano, M., Kanai, K. and Yoshikoshi, K. (2002) Contact infection trials failed to reproduce the disease condition of mass mortality in cultured pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fisheries Science* 68, 700-702.
- Kimatura, S.-I., Tomaru, Y., Kawabata, Z. and Suzuki, S. (2002) Detection of marine birnavirus in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata* and seawater from different depths. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 211-217.
- Kobayashi, T., Nozawa, N. and Miyazaki T. (1999) Studies on akoya-virus disease associated with mass mortalities in Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. 4 Symp. On Diseases in Asian Aquaculture (DAA IV) Philippines, 22-26 Nov. 1999.
- Kurokawa, T., Suzuki, T., Okauchi, M., Miwa, S., Nagai, K., Nakamura, K., Honjo, T., Nakajima, K., Ashida, K. and 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* 65, 241-251.
- Mao Che, L., Le Campion-Alsumard, T., Boury-Esnault, N., Payri, C., Golubic, S. and Bézac, C. (1996) Biodegradation of shells of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*, by microborers and sponges of French Polynesia. *Marine Biology* 126, 509-519.
- Miyazaki, T., Goto, K., Kobayashi, T., Kageyama, T. and Miyata, M. (1999) Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 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. and Ichikawa, M. (2001) Mass mortalities of Japanese pearl oyster in Uwa sea, Ehime in 1997-1999. *Fish Pathology* 36, 207-216.
- Muroga, K., Inui, Y. and Matsusato, T (1999) Workshop « Emerging diseases of cultured marine molluscs in Japan ». *Fish Pathology* 34(4), 219-220.
- Nasr, D. H. (1982) Observation of the mortality of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in Dongonab Bay, Red Sea. *Aquaculture* 28, 271-281.
- Norton, J.H., Shepherd, M.A. and Prior, H.C. (1993) Papovavirus-like infection of the golden-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*. *Journal of Invertebrate Pathology* 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. Fitt, W.K.-ed. CANBERRA, A.C.T.-Australian Center for International Agriculture Research. 47 : 18-23.
- Ozaki and Ishibashi (1934). Notes on the cercaria of the pearl oyster. Proc. Imp. Acad. Japan, 10:439-441.
- Park, K.I., Choi, K.S. and 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. 21(1), 30-32.
- Pass, D. A. and Perkins F.O. (1985) « Protistan parasites » or residual bodies in *Pinctada maxima*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 46, 208-212
- Pass, D.A., Dybdahl, R. and Mannion, M.M. (1987) Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 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* 9, 159-168.
- Renault T. and Cochenec N. (1994). *Rickettsia*-like organism in the cytoplasm of gill epithelial cells of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Inv. Pathol. 64 : 160-162.
- 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.
- Suzuki, S., Hosono, N. and Kusuda, R. (1977a) Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR. *Journal of Marine Biotechnology* 5, 205-209.
- Suzuki, S., Kamakura, M. and Kusuda, R. (1998a) Isolation of birnavirus from Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Sciences* (Tokyo) 64, 342-343.
- Suzuki, S., Nakata, T., Kamakura, M., Yoshimoto, M., Furukawa, Y., Yamashita, Y. and Kusuda, R. (1997b) Isolation of birnavirus from Agemaki (Jack knife clam) *Sinonovacula costica* and survey of the virus using PCR techniques. *Fish Sciences* (Tokyo) 63, 563-566.
- Suzuki, S., Utsunomiya, I. and Kusuda, R. (1998b) Experimental infection of marine birnavirus strain JPO-96 to Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Bull Mar Sci Fish Kochi Univ* 18, 39-41.
- Tomaru, Y., Kawabata, Z. and 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* 44, 61-68.
- Tun, T. (2000) A review of mass mortalities in pearl oysters. *SPC Pearl Oyster Information Bulletin* 14, 17-20.
- Wolf, P.H. and Sprague, V (1978) An unidentified protistan parasite of the pearl oyster *Pinctada maxima*, in tropical Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* 31(2), 262-263.

Wu X., Li D., Pan J. and Jiang J. (2003). Studies on rickettsia-like organism (RLO) disease of tropical marine pearl oyster – Epidemiological investigation of RLO disease in juvenile populations of maricultured *Pinctada maxima*. *Acta Oceanologia sinica* 22(3) 421-435.

Wu, X. and Pan, J. (1998) 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* 73, 162-172.

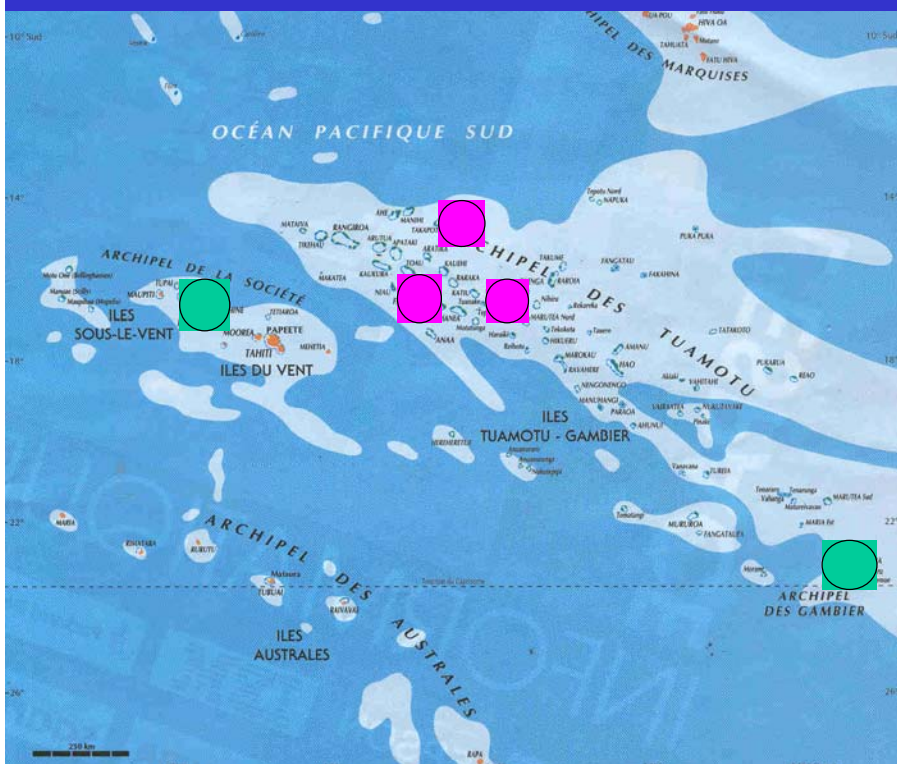
Wu, X. and Pan, J. (1999a) Studies on the rickettsia-like organism disease of tropical marine pearl oyster : II the morphology, morphogenesis and ultrastructure of RLO inclusions, an agent for *Pinctada maxima*. *Oceanologia et Limnologia sinica* 30(1)Janv, 74-80

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

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

Annexe 1

Le réseau de suivi zoosanitaire des huîtres perlières, *Pinctada margaritifera* Convention PRL-IFREMER (2003)



- * 5 zones de prélèvement
 - 2 îles hautes
 - 3 atolls
- * 2 à 3 sites par zone
- * 30 individus par site
- * 2 prélèvements par an



= environ 900 huîtres perlières analysées
+/- 80 autres mollusques avoisinants

Annexe 2

Préparation des fixateurs de Davidson et Carson

Fixateur de Davidson

Eau de mer	1200 ml
Alcool à 95%	1200 ml
Formaldéhyde 38%	300 ml
Glycerol	400 ml
Acide acétique glacial 10% extemporanément	

Fixateur de Carson

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	23.8 g
NaOH	5.2 g
Eau distillée	900 ml
Formaldéhyde 38%	100 ml
Ajuster le pH entre 7.2 et 7.4	

Annexe 3

1. Prélèvements et fixation des tissus (sur site)

Les agents du Service de la Perliculture, en mission dans les atolls, prélèvent 30 échantillons de nacres et 5 échantillons de chaque autre coquillage bivalve présent. Il peut s'agir de *pipi*, *kapi kapi*, d'arche, de *Chama* ou de *pahua*.

Pour chaque nacre, les tissus prélevés concernent le manteau, les branchies, le muscle adducteur et le rectum, la poche perlière et la masse viscérale comprenant la glande digestive, tube digestif et la gonade. Les tissus sont placés, au moins 48 heures, dans des pilluliers remplis de liquide de fixation, le Davidson. Chaque animal est identifié par un numéro.

2. Mise en attente des tissus (sur site ou à Papeete)

Les échantillons sont ensuite ramenés à Papeete où le fixateur de Davidson est remplacé par de l'alcool à 70 °. Les tissus peuvent rester longtemps dans ce bain qui constitue un bain d'attente.

3. Mise en cassette des tissus (IFREMER)

La suite du traitement des tissus est effectuée au Centre Océanologique du Pacifique (IFREMER), à Vairao.

Pour chaque animal, les tissus sont recoupés au scalpel pour être placés dans des cassettes afin de pouvoir subir les différentes étapes de déshydratation puis d'imprégnation dans la paraffine.

4. Traitement des tissus dans l'automate à inclusion

Les cassettes sont placées dans l'automate à inclusion où les tissus sont déshydratés dans des bains croissants d'alcool :

- alcool 70° : 2 bains de 1 h
- alcool 80° : 2 bains de 1 h
- alcool 95° : 2 bains de 1 h
- alcool 100° : 2 bains de 1 h
- xylène : 2 bains de 1 h

Après la série des alcools, les cassettes baignent dans 4 bains de 30 minutes de paraffine liquide : cette étape permet l'imprégnation des tissus, c'est-à-dire que la paraffine va pénétrer dans toutes les cellules des tissus pour remplacer l'eau et occuper tous les espaces vides.

Habituellement, les cassettes sont placées dans l'automate à inclusion l'après-midi, pour que la déshydratation des tissus et leur imprégnation aient lieu dans la nuit.

5. Inclusion des tissus dans la paraffine

Le lendemain matin, les cassettes sont sorties de l'automate à inclusion pour être placées dans une étuve à 60 °C, en attendant l'inclusion des tissus dans la paraffine.

Quand nous le pouvons, tous les tissus d'un même animal sont inclus dans le même bloc.

6. Coupes histologiques au microtome

Pour que les blocs se coupent facilement au microtome, ils sont au préalable refroidis dans le congélateur. Les coupes, effectuées à une épaisseur de 3 μm , sont dépliées dans le bain-marie, puis recueillies sur une lame.

7. Coloration des lames histologiques

Les lames sont mises à sécher au moins 24 heures, avant d'être colorées par la coloration de routine qu'est l'Hématoxyline-Eosine.

Avant toute coloration, les coupes histologiques sont déparaffinées et hydratées. Après coloration, elles sont déshydratées, puis montées entre lame et lamelle.

8. Délai entre la fixation des tissus et les observations au microscope

Le délai minimum entre la fixation et l'inclusion est de 5 jours :

- ✓ 2 jours dans le Davidson
- ✓ 1 jour dans l'alcool 70° afin de rincer les tissus
- ✓ 1 jour pour la mise en cassette et le passage dans l'automate à inclusion
- ✓ le lendemain : mise en blocs

Dans le meilleur des cas, nous avons pu faire l'inclusion des tissus 6 jours après la fixation. Mais, pour certains lots, un délai de 19 jours a pu être observé avant d'obtenir les blocs histologiques. Les raisons de ces délais s'expliquent par :

- ✓ le délai d'acheminement des prélèvements sur Papeete (fréquence aérienne selon les atolls ou archipels),
- ✓ la disponibilité du cadre du service de la Perliculture qui ne va à IFREMER que 2 à 3 fois par semaine,
- ✓ le temps passé à redécouper les tissus pour les mettre en cassettes : une journée pour re-prélever les tissus sur 47 à 60 échantillons de nacre (selon la taille des animaux, l'extraction ou non de keishi),
- ✓ le nombre maximal de cassettes à passer dans l'automate à inclusion est de 52.

9. Observation des lames histologiques

L'observation des lames s'effectue au microscope quand les coupes ont séché.

10. Rédaction d'un rapport d'analyses

Ce rapport sera envoyé au perliculteur concerné.

Annexe 4

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: ≤ 1 an > 1 an et ≤ 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	Ile	Lieu ou localisation GPS	Age ou taille au moment du transfert
Captage				
Transfert 1				
Transfert 2				
Transfert 3				

● **Caractéristiques propres au prélèvement réalisé :**

<p>Nombre d'individus prélevés <input type="text"/> Mode prélèvement : Extrait direct <input type="checkbox"/> Plongée <input type="checkbox"/></p> <p>Profondeur sous surface (m) : <input type="text"/></p> <p>Choix échant : au hasard <input type="checkbox"/> parmi les moribonds <input type="checkbox"/> autre, préciser : <input type="text"/></p>
--

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^{bre} 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 phytoplanctonique

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 5 (Fiche d'analyse)



1. Service de la Perliculture
Tél. (689) 50 00 00
Fax (689) 43 81 59
BP 9047 Motu Uta

Papeete, le

RESULTATS DES ANALYSES

- RESEAU DE VEILLE ZOO-SANITAIRE -

Identification du prélèvement

N° d'identification du lot :
Nom du perliculteur (facultatif) :
Date du prélèvement : Date de fixation : Date d'analyse :
Ile de prélèvement : Origine du lot : N° de filière :
Age des huîtres perlières :
Nature des huîtres perlières :
Motif du prélèvement :

Résultats

Nombre d'individus analysés :
Observations histologiques :
.....
.....
.....

Commentaires sur les parasites observés :
.....

Département Recherche & Développement
Service de la Perliculture

Dr Nathalie COCHENNEC-LAUREAU
Responsable de l'Unité
"Immuno-histo-pathologie"
IFREMER – COP

Annexe 6

Quelques définitions de l'Office International des Epizooties (OIE)

Maladies à déclaration obligatoire à l'OIE

désigne la liste **des maladies transmissibles** qui sont considérées comme importantes du point de vue socio-économique et/ou sanitaire au niveau national et dont les effets sur les échanges internationaux d'animaux aquatiques et de produits d'animaux aquatiques ne sont pas négligeables.

Maladie

désigne toute infection, clinique ou non, provoquée par un ou plusieurs des agents pathogènes étiologiques des maladies visées dans le Code de l'OIE.

Agent pathogène

désigne un organisme qui provoque l'une des maladies figurant dans le Code de l'OIE ou contribue à son développement.

Surveillance

désigne un ensemble de recherches menées systématiquement sur une population d'animaux aquatiques donnée en vue de détecter, **à des fins prophylactiques**, l'existence de maladies ; ces recherches peuvent prévoir de soumettre une population à des examens.

Les maladies listées par l'OIE

Maladies à déclaration obligatoire à l'OIE

Bonamiose (*Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosus*, *Mikrocytos roughleyi*)

Maladie MSX (*Haplosporidium nelsoni*)

Marteiliose (*Marteilia refringens*, *M. sydneyi*)

Mikrocytose (*Mikrocytos mackini*)

Perkinsose (*Perkinsus marinus*, *P. olseni/atlanticus*).

Autres maladies importantes

Maladie SSO (*Haplosporidium costale*)

Syndrome du dépérissement de l'ormeau (*Candidatus Xenohalictis californiensis*).