



Fiche Bio 2010-01 : La biosécurité à l’Ifremer LEAD, Station de Saint-Vincent

J. Herlin
Contact : jherlin@ifremer.fr

Définitions de la biosécurité

- Pour l’aquaculture de crevettes : la pratique d’exclusion des pathogènes spécifiques des cheptels, de structures d’élevage, ou de régions entières, ou de pays, pour prévenir l’expression de maladies à forte conséquence économique (Lightner, 2005).
- Un système de mesures, (intrants, mouvements, autres activités,...), chacune dotées de procédures, qui regroupées, minimisent le risque d’introduction et de dissémination d’organismes infectieux dans ou entre les populations d’animaux aquatiques (Karreman, 2009).

Mise en place de la biosécurité à St-Vincent

Phase 1 : la situation de crise

La démarche de biosécurité au LEAD St-Vincent a été déclenchée par une situation de crise sanitaire. Les crevettes originaires d’Hawaii et conservées sur le site dans le cadre du programme d’introduction de variabilité génétique dans le cheptel calédonien, ont progressivement montré une sensibilité importante (charge virale élevée, mortalité, croissance ralentie, déformations) au virus IHHN (agent pathogène de la Nécrose Hypodermique et Hématopoiétique Infectieuse). Les risques d’une transmission génétique de cette sensibilité à leur descendance et de son développement sur la souche dite « calédonienne » jusqu’alors considérée comme résistante à l’IHHNV, ont été jugés importants. Ils ont conduit, à partir d’octobre 2008, avec l’accord de l’UPRAC et l’appui de la DAVAR, à la suppression des animaux hawaïens ou hybrides (Fig. 1) encore présents dans les bassins de terre du LEAD, au vide sanitaire de ces derniers, et au repeuplement contrôlé du site.

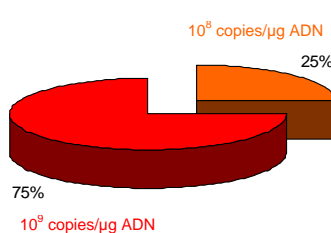


Fig. 1 : Prévalence et charge virale en IHHNV des crevettes hawaïennes prélevées le 21/10/08 au LEAD Saint-Vincent (76 individus analysés)

La gestion de cette crise, concomitamment à la mise en route d’une nouvelle structure d’écloserie a donc servi de déclencheur à la mise en place de cette démarche de biosécurité dans la filière générateurs/écloserie du LEAD St-Vincent.

Phase 2 : le vide sanitaire

Avec l’appui technique et sous le contrôle de la DAVAR (SIVAP/LNC), le vide sanitaire débute avec la destruction des populations d’un bassin d’hawaïennes pures, deux bassins d’hybrides, et quatre bassins de calédoniennes.



Fig. 2 : réalisation de drains sur le pourtour des bassins

Les 17 bassins en terre de la station (8500 m²) ont ensuite subi un traitement de chloration (10 ppm)/ déchloration, puis un chaulage par incorporation d’hydroxyde de calcium (150 g/m²). Quatre labours par bassin ont été effectués durant l’assec, ainsi que la réalisation de

drains (Fig. 2) et de curage des zones d’accumulations de matière organique.

Le matériel comme les filets anti-prédation aviaire, les aérateurs, les cages d’élevage et accessoires, a également été nettoyé et/ou refait.

Phase 3 : le repeuplement

Etant donné qu’il est très difficile d’éradiquer, ou même d’exclure le virus IHHN, le plan de biosécurité s’attache donc à limiter le risque d’expression de la maladie qui lui est associée, l’IHHN, avec comme mesure principale, l’utilisation exclusive d’animaux calédoniens pas ou peu porteurs du virus.

Malgré la motivation et les efforts affichés pour mettre en place ce plan, les contraintes d’activité du centre et l’incertitude de disponibilité de cheptel de repeuplement ont conduit à mener deux opérations à risque:

- en maintenant des animaux sur le site pendant le vide



sanitaire fin 2008, bien que placés en dehors des bassins de terre.

- en utilisant des animaux infectés comme base de repeuplement, et en tablant sur une baisse des portages IHHNV et une absence d’expression de la maladie sur leur descendance.

En conséquence, des crevettes calédoniennes, issues des bassins de testage en mélange avec les hawaïennes, et porteuses du virus à 10⁸ copies/μg ADN ont servi de générateurs avant d’être détruites. Une attention particulière a été portée à l’élevage et à la manipulation des animaux, afin éviter au maximum toute source de stress favorisant la réplication du virus. Ces efforts semblent avoir eu quelques effets puisque la génération suivante (F1), qui a servi au repeuplement des bassins « propres », bien que montrant encore la présence du virus, affichait des valeurs de portage beaucoup plus faibles (autour de 10² à 10³ copies/μg ADN). Les analyses sont réalisées par PCR quantitative.

Phase 4 : le suivi du cheptel

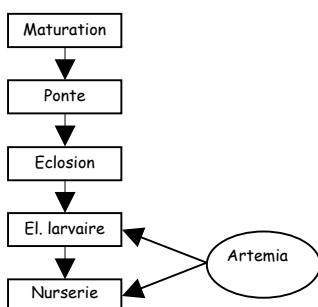
La réflexion s’est ensuite attachée à identifier et évaluer les risques, pour permettre l’application de mesures d’atténuation qui, regroupées, minimisent le risque d’expression de l’IHHNV. Les procédures d’hygiène de routine dans la conduite des productions et dans le contrôle des flux intrants et sortants (animaux, eau, aliments, personnel, équipement, nuisibles,

Fiche biotechnique 2010-01 : La Biosécurité à l'Ifremer LEAD, Station de St-Vincent

déchets) en font partie intégrante, et ont pu être revues à cette occasion.

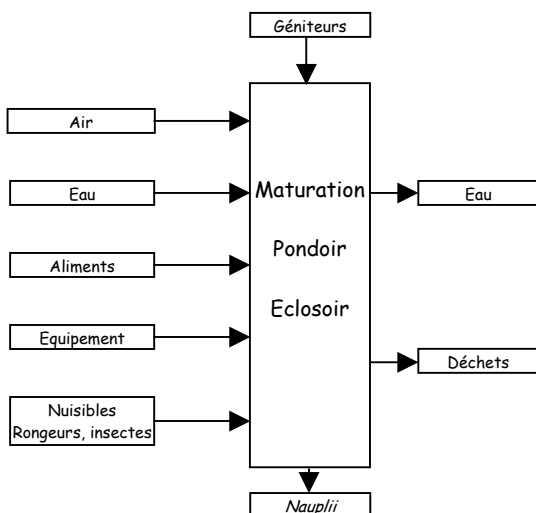
Cas de la filière géniteurs-soutien/écloseries

les produits attendus sont des lots de post-larves indemnes ou porteuses d'IHHNV à un niveau \leq à 10^3 copies/ μ g d'ADN. Ce niveau a été défini empiriquement en fonction de données épidémiologiques de terrain, comme le seuil en dessous duquel la maladie IHHN ne s'exprime pas. Ces animaux ont une finalité de matériel biologique pour l'expérimentation, et pour la production de géniteurs indemnes, en vue de maintenir la souche au sein du laboratoire. Le personnel impliqué a été identifié et désigné : animateur biosécurité et personnel de l'écloserie et bassins, et équipe Pathologie Infection et Epidémiologie (analyses IHHNV).



Les différentes étapes de la production de post-larves de crevettes *L. stylirostris* en écloserie ont été décomposées dans le diagramme de fabrication ci-contre.

LCs étapes ont ensuite été reprises une à une ou regroupées de façon cohérente. L'exemple ci-dessous est celui du regroupement des étapes Maturation/Pontes/Eclosion, étant entendu que la même réflexion s'applique aux autres étapes.



Pour chacune de ces étapes, on procède alors à :

- l'identification des risques d'introduction du pathogène :

- intrants (géniteurs, air, eau, aliments, personnel, équipement, nuisibles)
- sortants (*nauplii*, eau, déchets)
- l'évaluation des risques pour chacun d'eux (faible, moyen, élevé)
- l'élaboration de propositions d'actions d'atténuation des risques.

Le **Tableau 1** ci-dessous montre l'exemple pour l'intrant « géniteurs ».

Les actions zootechniques sont ensuite listées et complétées sous forme de procédures d'opération standards (POS) à appliquer (**Tableau 2**).

La démarche de biosécurité a ainsi permis d'identifier et de définir la pertinence d'analyses IHHNV sur les animaux à des moments particuliers de leur élevage. La transmission verticale du virus présentant un niveau de risque élevé, le contrôle de portage des géniteurs (après épédonculation et première ponte des femelles) semble être la méthode la plus appropriée pour prévenir ce mode de transmission (Motte et al, 2003).

Une autre série d'analyses est réalisée sur les larves en fin d'élevage larvaire et avant ensemencement. Le délai après lequel la maladie s'exprime dans le cas d'une transmission verticale du virus étant de 30 à 60 jours, l'analyse ne devrait être effectuée qu'à l'âge minimum de P35 et juste avant l'ensemencement. Cependant et compte tenu de la difficulté à prolonger la phase nurserie, le choix d'une analyse supplémentaire à mi-élevage en bassin a été retenu.

Initialement traitées par l'Université d'Arizona (Lightner), les analyses par PCR quantitative sont effectuées depuis janvier 2009 par l'équipe PIE (capacité analytique de 20 échantillons en 48 heures).

La détermination de la taille de l'échantillon a tenu compte de résultats d'analyses effectuées par cette équipe au moment du vide sanitaire, résultats qui semblaient indiquer que l'on pouvait considérer que le niveau de charge virale est uniformément réparti dans un bassin.

Pour les géniteurs, 1 pool de 5 animaux par bac (population de 300 animaux) est donc prélevé.

En ce qui concerne les larves, ces dernières servant à l'établissement des générations suivantes, la démarche est plus sévère et seul un pourcentage \leq 10% d'animaux faiblement porteurs dans la population échantillonnée (entre 10 000 et 15 000 animaux) est jugé acceptable. Quatre pools de 10 animaux par bac d'élevage larvaire sont prélevés.

Le seuil de charge virale IHHNV étant fixé à 10^3 copies/ μ g ADN :

- si les lots de géniteurs dépassent ce seuil, en l'absence d'option de remplacement, ces lots peuvent quand même être utilisés pour produire des post-larves. Les lots de géniteurs sont ensuite détruits.
- si les lots de post-larves dépassent ce seuil, ils sont systématiquement détruits.

Le schéma 1 montre le devenir des différents lots de géniteurs qui ont été élevés à Saint-Vincent depuis le vide sanitaire en octobre 2008.

Tableau 1 : évaluation et actions d'atténuation pour l'intrant géniteurs

IDENTIFICATION	EVALUATION		ACTIONS D'ATTENUATION
	Niveau de risque pathogène (général)	Niveau de risque IHHNV	
INTRANTS			Moyens/Procédures de gestion du risque
GENITEURS	Elevé	Elevé	<p>Avant stockage en maturation : désinfection par baignation des animaux à 5 ppm pendant 1 mn = 2 ml de solution iodée à 10% dans une poubelle de 40 L d'eau de mer.</p> <p>Analyse IHHNV : le seuil de charge virale IHHNV est fixé à 10^3 copies/μg ADN : si les lots de géniteurs dépassent ce seuil, en l'absence d'option de remplacement, ces lots peuvent quand même être utilisés pour produire des post-larves avant d'être détruits.</p> <p>Avant fécondation : désinfection des ♀ par baignation des animaux à 5 ppm pendant 1 mn = 50 μl de solution iodée à 10% dans une bassine de 3 L d'eau de mer.</p>

Fiche biotechnique 2010-01 : La Biosécurité à l'Ifremer LEAD, Station de St-Vincent

Tableau 2 : différentes procédures d'opération standards pour les étapes Ponte, maturation et éclosion

JOUR	PHASES	GESTION DES FLUIDES	ALIMENTATION	ACTIONS ZOOTECHNIE	ACTIONS BIOSECURITE
J -1	PREPARATION DES BACS MATURATION	Remplir avec eau à 26 °/00 et température à 26°C Les maintenir ainsi pendant 48 h (J-1 => J 1)			
	PREPARATION PECHE	Remplir la remorque compartimentée avec de l'eau à 26 °/00			
J 0	PECHE GENITEURS		Ne pas nourrir les animaux	Pêche tôt le matin, de préférence à l'épervier Séparer ♂ et ♀ sans dépasser plus de 30 ♂ et 20 ♀ par compartiment.	
	BACS MATURATION	♂ : 0 % renouvellement ♀ : 0 % renouvellement		♂ : charge maximale : 550 g/m ² (= 70 ♂ de 40 g pour les bacs intérieurs de 5 m ²) ♀ : charge maximale : 450 g/m ² (= 45 ♀ de 50 g pour les bacs intérieurs de 5 m ²) Photopériode décalée jour/nuit = 14h/10h Allumage 19 h, arrêt 9 h Suivi : 8 h et 15 h Température, Salinité, Mortalité et Mues	Chaussures réservées à l'écloserie et désinfection des mains au gel alcool avant entrée dans la salle de maturation Bain iodé des animaux à 5 ppm pendant 1 mn = 2 ml de solution iodée à 10 % dans une poubelle de 40 L d'eau de mer
J 1	BACS MATURATION			Suivi : 8 h et 15 h Température, Salinité, Mortalité et Mues	
J 2		15h renouvellement ♂ : 100 % = 3,4 L/mn ♀ : 50 % = 1,7 L/mn	15h : MSV Géniteurs 20 g pour ♂ et ♀	Suivi : 8h et 15h Température, Salinité, Mortalité et Mues	
J 3		Renouvellement ♂ : 100 % = 3,4 L/mn ♀ : 50 % = 1,7 L/mn	♂ : 8 h : 50g calmar 13 h : 20 g MSV Géniteurs 16 h : 20 g MSV Géniteurs ♀ : 8 h : 50 g calmar 13 h : 20 g MSV Géniteurs 16 h : 6 à 10 moules selon la taille.	Siphonner les restes avant distribution ration Suivi : 8 h et 15 h Température, Salinité, Mortalité et Mues	Aliment frais : Ne sortir que le nécessaire à un repas Ne pas recongeler (utilisation de couteau à découper le congelé)
J 4	EPEDONCULATION	♂ : arrêt régulation thermique si température extérieure <28 et >22°C ♀ : après épédonculation augmentation température de 2°C / jour jusqu'à 29°C. Renouvellement d'eau 100 % = 3,5 L/mn Remplissage réserve + EDTA	♂ : 8 h : 50g calmar 13 h : 20 g MSV Géniteurs 16 h : 20 g MSV Géniteurs ♀ : 16 h : 6 à 10 moules selon la taille	Suivi : 8h et 15h Température, Salinité, Mortalité et Mues	
J 5-J6 à J14	MATURATION ET FECONDATION		♂ : 8 h : 50 g calmar 13 h : 20 g MSV Géniteurs 16 h : 20 g MSV Géniteurs ♀ : 8 h : 50 g calmar 13 h : 20 g MSV Géniteurs 16 h : 6 à 10 moules selon la taille	Comptage approximatif des ♀ matures Pêche des ♂ : pesée, déspermation Pêche des ♀ : pesée, désinfection, fécondation. Suivi : 8 h et 15 h : Température, Salinité, Mortalité et Mues	1 épuisette par bac, ou la rincer dans un bain de chlore entre 2 bacs 1 panier par bac ♀ : Bain iodé à 5 ppm pendant 1 mn = 50 µl de solution iodée à 10% dans une bassine de 3L d'eau de mer Prélèvement pour analyse IHNV sur géniteurs ♂ déspermés
Envir on J10	PONDOIRS	Remplissage avec eau chauffée de la réserve Pas de bullage		1 ♀ par pondoir Observation 1 fois par heure, Si ponte, prise d'échantillon pour taux de fécondation 1 h après. Après la ponte, baguage de la ♀, remise dans bac initial et léger bullage dans pondoir	Prélèvement pour analyse IHNV sur géniteurs ♀ avant remise dans bac d'origine
Envir on J11	ECLOSOIR	Remplissage avec eau chauffée de la réserve		Récupération des œufs en douceur. Pas + de 2 pontes par éclosoir.	Rinçage du matériel entre 2 pontes
	DECHETS				Coquilles de moules dans poubelles. Siphonage des bacs dans puisards Géniteurs utilisés > 10 ³ copies/µg ADN = consommation humaine EXCLUSIVEMENT autorisée Géniteurs < 103 copies/µg ADN = consommation humaine ou autre utilisation autorisée INCINERATION DE TOUS LES GÉNITEURS MORTS, MUES ET ALIMENTS NON CONSOMMÉS

Résultats et conclusions

En utilisant cette méthode, la présence du virus sur les F2 et F3 n'a plus été détectée à ce jour. Parallèlement, une population issue du bassin L de la ferme FAO et qui constituait une option de repeuplement supplémentaire avec des animaux se situant dans la limite autorisée (10^2 à 10^3 copies/ μ g ADN), a également produit une F1 sans détection d'IHHNV.

L'ensemble du cheptel présent à St-Vincent doit maintenant servir à maintenir une souche de crevette calédonienne dotée d'une traçabilité et d'un suivi sanitaire au niveau de l'IHHNV, permettant l'utilisation d'animaux expérimentaux plus fiables et représentant aussi un potentiel pour la filière calédonienne.

La poursuite de ces mesures est envisagée dans le prochain projet comme un outil d'aide à la minimisation des problèmes potentiels, à leur compréhension en cas d'apparition, et à la fiabilisation des résultats.

La démarche se veut évolutive, et prend en compte la possibilité de changements physiques, biologiques, ou opérationnels qui nécessitent des mises à jour, en fonction des résultats obtenus et de l'évolution des connaissances scientifiques (veille scientifique).

La sensibilisation du personnel concerné, ainsi que son extension à d'autres équipes (logistique) est prévue pour encourager l'adoption et l'efficacité du plan.

Enfin l'expérience et les connaissances acquises permettront de continuer l'appui et le soutien à la filière dans ce domaine.

Schéma 1 : devenir des différents lots d'animaux ayant été élevés à Saint-Vincent et état sanitaire des lots présents au 09/03/2010 (nb : schéma lisible en affichage de l'écran à 500%)

