

SURVEILLANCE DE LA SEPTICEMIE HEMORRAGIQUE VIRALE CHEZ LE LOUP (*Dicentrarchus labrax*) ET LA DAURADE (*Sparus aurata*) D'ELEVAGE

Nadia CHERIF⁽¹⁾, Ines TLIBA⁽²⁾, Ines NJEH⁽²⁾ et Zied BOUSLEMA⁽³⁾

⁽¹⁾ *Laboratoire de Biotechnologie Bleu et Bioproduits Aquatiques (B3Aqua), INSTM centre La Goulette, Port de Pêche 2060, Tunis, TUNISIE,*

⁽²⁾ *Direction Générale des services vétérinaires,*

⁽³⁾ *Institut Pasteur de Tunis.*

RESUME

La Septicémie Hémorragique Virale est une maladie infectieuse touchant les poissons causée par le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV). Elle touche plus de 50 espèces d'eau douce et marines. Pour cette raison, une investigation épidémiologique et virologique approfondie a été menée conjointement par la Direction Générale des Services Vétérinaires et l'Institut National des Sciences et des Technologies de la Mer, dans le cadre du Projet transfrontalier IEVP "Sécurité et Qualité des Produits Aquacoles: le développement d'une voie commune tuniso-sicilienne" SecurAqua-PS1.3.020, et conformément à la composante « Evaluation des risques pour la santé des consommateurs », les investigations ont permis de confirmer l'absence du VSHV dans les élevages aquacoles existants dans les zones éligibles, et de présenter une simulation de la surveillance de la SHV en vue d'élaborer un programme de surveillance nationale de la SHV chez la Daurade et le Loup dans tous les élevages aquacoles en Tunisie.

Mots clés : Septicémie Hémorragique Virale, loup ; daurade ; épidémiologie

ABSTRACT

Viral Haemorrhagic Septicaemia is an infectious fish disease caused by the viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) that affects fish of over 50 species of freshwater and marine fish worldwide. In the present study, a preliminary epidemiological survey was jointly conducted by the General Veterinary Services Directorate and the National Institute of Sea Science and Technology, under the ENPI cross-border project "Safety and Aquaculture Product Quality". The objective was to determine the state of concerned fish farms towards the presence of this pathogen. Molecular diagnosis showed that all tested samples were negative to the virus; confirming the absence of VHSV in the studies areas. Viral prevalence was less

than 1% in 2012 and 2013 for both fish species; whereas in 2014, prevalence was less than 3% in sea bass fish and less than 2% in sea bream samples. In conclusion, the present simulation of VHS surveillance will be very useful for the development of a national VHS surveillance program for farmed fish in Tunisia.

Key words: Viral Haemorrhagic Septicaemia, sea bass, sea bream, epidemiological survey

INTRODUCTION

La promotion des produits aquacoles requiert la maîtrise de plusieurs enjeux notamment la maîtrise des risques liés aux maladies réglementées spécifiques aux poissons d'élevages. Ainsi la conquête des marchés internationaux exigent des normes zoosanitaires de plus en plus strictes afin d'assurer la sécurité sanitaire des aliments et la durabilité des élevages piscicoles.

La Septicémie Hémorragique Virale (SHV), est l'une des maladies réglementées définie comme dangers sanitaire de première catégorie, qui concerne les espèces d'intérêt halieutique élevées en Tunisie (*Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*) ceci implique la mise en place d'un programme de surveillance approprié. La SHV est réglementée en Tunisie conformément au Décret n° 2004-1198 du 25 mai 2004 fixant la nomenclature des maladies animales réputées contagieuses et édictant les mesures sanitaires communes à ces maladies. À ce

jour, aucun cas de SHV n'a été répertorié dans le territoire Tunisien (Chérif et Hammami, 2013).

Cette pathologie est présente essentiellement dans l'hémisphère nord, dans les eaux froides où elle touche près de 80 espèces de poissons d'élevage ou sauvages entre autre le loup et la Daurade, et est à l'origine de très lourdes pertes économiques pour les élevages atteints (EFSA, 2008 ; OIE, 2015).

La Septicémie Hémorragique Virale est une maladie à déclaration obligatoire provoquée par le virus de la Septicémie Hémorragique Virale VSHV (Tordo et al., 2005) appartenant à la famille des *Rhabdoviridés* et au genre des *Novirhabdovirus*. Les signes cliniques apparaissent généralement quand la température de l'eau se situe entre 4 °C et 14 °C. Les symptômes en phase aigüe sont les suivants : exophtalmie, hémorragies oculaires, mélanisme, forte anémie, points hémorragiques abondants dans les muscles et sur les viscères abdominaux, ascite. En fin de crise : symptômes nerveux avec nage anormale en vrille.

La SHV se transmet lors de contacts entre des poissons malades ou porteurs et des poissons sains. Elle peut aussi se transmettre par l'entremise de l'eau contaminée puisque le virus est excrété dans l'urine et dans les fluides sexuels des poissons malades ou porteurs. Le virus peut survivre plusieurs jours dans l'eau, selon la température, les eaux froides (entre 2 et 15°C) étant particulièrement propices à sa survie. Les individus asymptomatiques représentent des réservoirs potentiels du virus et peuvent contribuer à la propagation de la maladie. Plusieurs éléments contribueraient, à divers degrés, à la propagation du virus de la SHV. Les principaux sont le mouvement naturel des poissons, le transfert de poissons infectés (poissons appâts, ensemencements, etc.), le transfert d'eaux contaminées (eau de ballast, eau de transport des poissons, etc.) et l'utilisation d'équipement contaminé.

Dans le cadre du Projet transfrontalier IEVP "Sécurité et Qualité des Produits Aquacoles: le développement d'une voie commune tuniso-sicilienne" SecurAqua-PS1.3.020, et conformément à la composante « Evaluation des risques pour la santé des consommateurs », une étude a été réalisée par la Direction Générale des Services Vétérinaire DGSV (Partenaire 3) en collaboration avec l'Institut National des Sciences et des Technologies de la Mer INSTM (Bénéficiaire) afin de dépister le Virus de la Septicémie Hémorragique Virale chez le loup et la daurade d'élevage dans les zones éligibles en Tunisie durant les années 2012 – 2013 – 2014.

La surveillance de la Septicémie Hémorragique Virale chez le loup et la daurade d'élevage a pour objectifs de :

- Dépister le virus de la septicémie hémorragique virale chez le loup et la daurade d'élevage dans les zones éligibles en Tunisie durant les années 2012 – 2013 – 2014 ;
- Déterminer une prévalence par rapport à une prévalence limite ;

- Assurer une qualification des zones et fermes piscicoles.

MATERIEL ET METHODES

Les échantillons ont été analysés au laboratoire de virologie de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM). Les techniques utilisées pour l'extraction et l'identification du virus sont recommandées par l'OIE et décrites dans le manuel aquatique (OIE, 2015) comme étant une technique de choix pour la surveillance et la déclaration d'un pays indemne de Septicémie hémorragique virale.

1- Matériel biologique

Dans le cadre de ce projet ; un suivi zoo sanitaire a été réalisé chez deux espèces de poissons d'élevage : le loup de mer *Dicentrarchus labrax* et la daurade royale *Sparus aurata* échantillonnés durant les 3 dernières années 2012-2013 et 2014. Pour les besoins de cette étude, un nombre total de 203 pools d'échantillon a été collecté dont 115 échantillons de daurade royale et 88 échantillons de loup de mer à partir des côtes Nord de la Tunisie.

Etant donné que le virus ne résiste pas longtemps dans le milieu extérieur, ni dans les poissons infectés, nous pouvons avancer que la prévalence est variable selon les saisons. Ainsi, l'échantillonnage prend en considération les saisons, en multipliant les prélèvements sur les saisons tempérées (automne et printemps).

Dans le but d'avoir un taux de prévalence limite de 1%, nous avons tenté d'avoir le maximum de prélèvement possible pour chaque espèce. Ainsi, une enquête rétrospective a été établie et nous avons inclus dans notre étude des prélèvements des années précédentes. Le tableau ci-dessous représente le nombre de poissons prélevés pour chaque espèce et chaque année.

Tableau 1: Taille de l'échantillonnage par année et par espèce et taux de prévalence limite.

Espèce	Année	Nombre de prélèvements *	TPL	Risque
LOUP	2012	45	1%	5%
LOUP	2013	31	1%	5%
LOUP	2014	12	3%	5%
DAURADE	2012	45	1%	5%
DAURADE	2013	41	1%	5%
DAURADE	2014	29	2%	5%

*un échantillon = un lot de 10 unités de poissons.

Les taux de prévalence limite ont été calculés à partir de la méthode décrite dans la référence : Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre

les maladies animales transmissibles majeures (Toma et al. , 2010).

2-Traitements des échantillons :

Le traitement des échantillons se déroule en cinq étapes:

Le prélèvement: Les organes cibles (cerveau, œil, rate et cœur) sont prélevés à l'aide de ciseaux et d'une pince stérile. Le changement d'instrument ou la stérilisation de ce dernier est indispensable entre chaque lot de poisson.

Le broyage: Les organes cibles prélevés sont broyés à l'aide d'un mortier avec du sable de quartz stérile.

La dilution: le broyat obtenu est dilué (1:10 v/v) avec du Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) contenant 2% d'une solution d'antibiotique Anti- Anti (antibiotique-antimycotique 100 X (Gibco)).

La centrifugation: La centrifugation permet d'éliminer les débris tissulaires. Les homogénats obtenus lors de l'étape précédente (dilution) ont été ensuite centrifugés à une vitesse de 6000 tours par minute pendant 20 minutes à une température de 4°C.

Le stockage: les surnageants sont récupérés et aliquotés dans des tubes eppendorf bien étiquetés (nom, date et identifiant) puis conservés à -80°C.

3- Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 200µl des surnageants de tissus de poissons. L'extraction a été faite en utilisant le kit d'extraction Micro to Midi RNA extraction kit (Invitrogen, life technologie) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN est élué avec l'ARNase free water (40µl) puis conservé à -80°C.

4-Quantification des acides nucléiques :

L'ARN total a été quantifié par un Nanodrop ND-2000 (Thermo scientific). Cette technologie est utilisée pour mesurer rapidement et efficacement de 0.5 à 2 gouttes µl de solution.

5- Détection moléculaire du VHSV par une RT-PCR en temps réel:

La PCR en temps réel a été effectuée dans l'appareil 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, life technologies). Les amplifications ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25µl et les concentrations de réactifs et les paramètres de la réaction sont décrits dans le manuel de diagnostic de l'OIE (2015).

RESULTATS ET CONCLUSIONS

Tous les prélèvements étudiés ont été négatifs à la VHS. Les résultats nous amènent à conclure que la prévalence de la VHS dans les élevages des zones éligibles durant les années 2012 et 2013 est inférieure à 1% à un risque d'erreur alpha=5%. Pour le loup, en 2014 les résultats montrent que la prévalence de la VHS est inférieure à 3% à un

risque d'erreur de 5%. Pour la daurade, en 2014, les résultats montrent que la prévalence de la VHS est inférieure à 2% à un risque d'erreur de 5%.

La présente étude a permis de confirmer l'absence de VSHV dans les élevages aquacoles existants dans les zones éligibles, et présente une simulation de la surveillance de la SHV en vue d'élaborer un programme de surveillance national de la SHV chez la Daurade et le Loup dans tous les élevages avec un nombre de prélèvements supérieur ou égal à 300 individus (afin d'avoir une prévalence limite de 1%).

REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet **SecurAqua** PS1.3.020 "Sécurité et Qualité des Produits Aquacoles le Développement d'une Voie Commune Tuniso-Sicilienne" co-financé par l'Union Européenne à travers la coopération transfrontalière Italie-Tunisie (Programme Instrument Européen de Voisinage et de Partenariat-IEVP).

BIBLIOGRAPHIE

- CHERIF N. ET HAMMAMI S. (2013). Absence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and infectious hemorrhagic necrosis virus (IHN) in a Tunisian fish farm: a case study. *Archs. Inst. Pasteur Tunis*, 89 (1-4).
- EFSA (2008). Aquatic species susceptible to diseases listed in Directive 2006/88/EC Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). *The EFSA J.* 808, 1-144.
- OIE (2015). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. p 279-298.
- TORDO, N., BENMANSOUR, A., CALISHER, A., DIETZGEN, R.G., FANG, R.-X., JACKSON, A.O., KURATH, G., NADIN-DAVIS, S., TESH, R.B., WALKER, P.J. (2005). Rhabdoviridae in Virus Taxonomy 8th report. Editors Fauquet, C., Mayp, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A : 1258pp.
- TOMA, B., DUFOUR, B., BENET, J.J., SANAA, M., SHAW A. et MOUTOU, F. (2010). Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures, 3^{ème} édition, ed. Aeema, pp600.