

Suspicion de réservoir viral dans le cadre d'une enquête épidémiologique sur un foyer de **septicémie hémorragique virale** survenu en 2013 dans une pisciculture de la Vienne, en zone indemne

Thibaud Roman (1) (thibaud.roman@agriculture.gouv.fr), Matthieu Jamin (2), Joëlle Cabon (3), Marine Baud (3), Laurent Bigarré (3), Thierry Morin (3), Catherine Carriquiriborde (4), Adeline Lanterne (4)

(1) Direction générale de l'alimentation, Bureau de la santé animale, Paris et DRAAF Basse-Normandie, Caen, France

(2) FILI@VET, Réseau Cristal, Saint-Martin-des-Champs, France

(3) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité pathologie virale des poissons, France

(4) DDecPP de la Vienne, Poitiers, France

Résumé

La septicémie hémorragique virale (SHV) est une maladie de poissons d'eau froide mondialement répandue. Si de nombreuses espèces peuvent être porteuses, les salmonidés, et plus particulièrement la truite arc-en-ciel, sont les plus sensibles. Afin de s'en protéger, des zones et des compartiments, dits indemnes, sont constitués et soumis à des règles sanitaires de fonctionnement et de surveillance. Lors d'un épisode de mortalité survenu dans une pisciculture dans une zone indemne (Vienne, France), des investigations moléculaires et épidémiologiques approfondies ont été mises en œuvre pour élucider l'origine du virus. Les données collectées ont conduit à suspecter la filière de poissons d'étang comme source probable de la contamination, sans pour autant identifier avec précision l'origine du virus. Ces données permettent d'ores et déjà de recommander la sectorisation stricte entre la filière d'élevage des poissons d'étang et la salmoniculture, afin d'empêcher la circulation du virus entre des hôtes réservoirs et des hôtes très sensibles.

Mots clés

salmonidés, septicémie hémorragique virale, rhabdovirus, investigation épidémiologique, poissons d'étang

Abstract

Suspicion of viral reservoir during an epidemiological investigation of a fish viral haemorrhagic septicaemia outbreak in a fish farm in a disease-free zone, Vienne, France, 2013

Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) is a cold-water fish disease found worldwide. Several species can be carriers, but Salmonidae and particularly rainbow trout are the most susceptible. To control the disease, disease-free zones and compartments have been established and subjected to health rules and monitoring. In a recent outbreak that occurred in a farm in a virus-free area (Vienne, France), extensive molecular and epidemiological investigations were undertaken to elucidate the origin of the virus. The results led to pond fish being suspected as the source of the virus. Therefore, we recommend strict segmentation between pond fish and salmonid farms to prevent the circulation of the virus between reservoirs and highly susceptible hosts.

Keywords

Salmonidae, viral haemorrhagic septicaemia, rhabdovirus, epidemiological investigation, pond fish

La septicémie hémorragique virale (SHV) est l'une des principales maladies des salmonidés réglementées en France. Présente essentiellement dans l'hémisphère nord, dans les eaux froides, elle touche près de 80 espèces de poissons d'élevage ou sauvages, et est à l'origine de très lourdes pertes économiques pour les élevages affectés (EFSA, 2008; OIE, 2009). C'est une maladie causée par un novirhabdovirus, le VHSV (Tordo *et al.*, 2005). Parmi les espèces élevées traditionnellement, la truite arc-en-ciel (TAC) (*Oncorhynchus mykiss*) est une espèce d'eau vive particulièrement sensible, mais il en existe aussi parmi les poissons d'étang comme le brochet (*Esox lucius*) (Figure 1) et très probablement le black bass (*Micropterus salmoides*) (Figure 2) (Meier et Pfister, 1981; Wizigmann *et al.*, 1980; OIE, 2013). Les éventuels porteurs asymptomatiques représentent un réservoir potentiel de virus et peuvent contribuer à la propagation de la maladie. Afin de se protéger d'éventuelles contaminations, la réglementation européenne prévoit la possibilité de constituer des zones ou des compartiments indemnes de SHV, où des règles de fonctionnement et une surveillance ciblée sont mises en place (Directive 2006/88/EC; Papin *et al.*, 2012). La surveillance consiste en des inspections et des prélèvements destinés à rechercher toute trace d'expression clinique de la maladie.

Description des foyers

Durant l'hiver 2013-2014, les précipitations abondantes ont provoqué dans l'ensemble de la France des conditions de turbidité importantes et durant de longues périodes. Les poissons soumis à ces conditions de stress permanent sont devenus plus vulnérables à certaines maladies. Le 31 janvier 2013, un pisciculteur (foyer n° 1), qui associe l'élevage de truites arc-en-ciel et la constitution de lots de poissons d'étang dans des bassins séparés mais voisins, s'est inquiété de premiers signes



Figure 1. Brochet (*Esox lucius*)
(source : © Licence de documentation libre GNU)



Figure 2. Black bass (*Micropterus salmoides*)
(source : robposse flickr.com)

cliniques sur ses truites. Suite à l'absence d'amélioration malgré des traitements biocides externes puis une antibiothérapie, il a demandé l'intervention d'un vétérinaire spécialisé en aquaculture sur son site. Le 12 février, celui-ci a constaté la forte mortalité et a suspecté l'apparition d'un foyer de SHV, danger sanitaire de première catégorie (ex-maladie réputée contagieuse: MRC). Il a réalisé des autopsies et des prélèvements pour recherche virale et a alerté la DDecPP 86 qui a pris le 14 février un arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS). Le 20 février, le laboratoire national de référence (LNR) de l'Anses de Ploufragan-Plouzané a confirmé la présence du virus VHSV. Un arrêté portant déclaration d'infection (APDI) a été pris ce même jour, chargeant le même vétérinaire aquacole d'une enquête épidémiologique. L'ensemble du cheptel du pisciculteur sous APDI, soit 31 tonnes de poissons, a été abattu et éliminé par l'équarrissage. Pendant un mois le site a été nettoyé et, le 20 mars, a débuté le protocole de désinfection (OIE, 2013).

Un étang de pêche de plus de 16 ha ayant reçu le 1^{er} février 2013 un lot de truites arc-en-ciel en provenance foyer n° 1, est placé sous APMS le 15 février (Figure 3). Les organes de certains spécimens pêchés présentant des signes cliniques sont prélevés pour analyse. Le 27 février, le LNR confirme la positivité de ces prélèvements, l'étang est alors placé sous APDI (foyer n° 2) qui prescrit notamment une zone de confinement et un périmètre de surveillance.

Les zones précédemment indemnes situées à l'aval de ces deux foyers jusqu'au barrage de Nouâtre (Indre-et-Loire), sont alors considérées comme infectées.



Figure 3. Étang de la Vienne, foyer n° 2. Photo DDecPP de la Vienne, 2013

Matériels et méthodes

Des autopsies sur les TAC ont été réalisées par le vétérinaire aquacole et des prélèvements (rein antérieur, rate, cerveau) provenant des foyers n° 1 et 2 ont été transmis à deux laboratoires agréés, l'IDHESA⁽¹⁾ Quimper et le laboratoire départemental des Pyrénées et des Landes, puis transmis pour confirmation, séquençage et mise en souche au LNR. Une enquête épidémiologique a été menée par ce même vétérinaire, à l'issue de laquelle a été organisé un débat contradictoire entre le vétérinaire, le chef de service de santé animale de la direction départementale en charge de la protection des populations de la Vienne (DDecPP 86) et le référent national aquacole de la direction générale de l'alimentation (DGAL). Ce débat a conduit à l'élimination des hypothèses de contamination les moins probables et à la consolidation du scénario le plus vraisemblable.

Mise en évidence du virus VHSV

La recherche du virus VHSV a été effectuée selon les recommandations de la norme NF U47-220 (norme NF U47-220, 2010). Les organes prélevés sur dix TAC présentant des signes cliniques ont été broyés, dilués puis inoculés à deux lignées cellulaires permissives (RTG-2

et EPC) à 14 °C. Le développement d'effets cytopathiques a été observé régulièrement après la mise en culture. L'identification du virus a été réalisée par immunofluorescence en utilisant des anticorps monoclonaux anti-VHSV (BioX, Belgique), puis confirmée par neutralisation à l'aide d'un sérum de référence spécifique (norme XP U47-023, 2009).

Analyse moléculaire

L'ARN total a été extrait à partir de milieu de cultures cellulaires infectées et soumis à une reverse-transcription (RT) suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (PCR) ciblant la totalité du gène viral de la glycoprotéine d'enveloppe (~1500 paires de bases) (Einer-Jensen *et al.*, 2004). Les produits de PCR ont été clonés : trois clones de l'isolat 50389.2 et douze clones de l'isolat 13-00505 ont été séquencés puis comparés entre eux.

Résultats

Résultats d'analyses

Les analyses virales réalisées à la demande du vétérinaire aquacole à partir d'organes de TAC provenant de la pisciculture (foyer n° 1) puis du second foyer (foyer n° 2) se sont révélées positives pour la présence de VHSV (Tableau 1).

Tableau 1. Bilan des résultats analytiques obtenus

Analyses de première intention réalisées par des laboratoires agréés			
Foyers	Site	Diagnostic	Date
N° 1	Pisciculture	POSITIF VHSV	18/02/13
N° 2	Étang de pêche	POSITIF VHSV	26/02/13

Analyses de confirmation et séquençage réalisés par le LNR			
Foyers	Diagnostic	Date	Séquence gène glycoprotéine n°
N° 1	POSITIF VHSV	20/02/13	50389.2
N° 2	POSITIF VHSV	27/02/13	13-00505

Les séquences nucléotidiques de la glycoprotéine virale ont été obtenues par le LNR pour les deux souches isolées (50389.2 et 13-00505; Tableau 2). Tous les clones obtenus à partir des deux isolats sont de génotype *Ia* et sont strictement identiques les uns aux autres, excepté un clone issu de l'isolat 13-00505 qui présente treize variations nucléotidiques par rapport à tous les autres. L'identité nucléique de ce clone singulier avec les onze autres est de 99,1 %.

Investigations épidémiologiques

La pisciculture est située au cœur d'une zone indemne de SHV, soumise à une surveillance ciblée annuelle constituée d'une visite clinique et d'un prélèvement de trente poissons pour analyses virales. Aucune déclaration de mortalité n'a été reçue par la DDecPP de la Vienne ni une DDecPP voisine, ni dans une autre pisciculture, ni en étang, en dehors du seul cas d'un client de la pisciculture en cause, livré juste avant toute suspicion de pathologie (foyer n° 2).

La pisciculture est alimentée en eau directement par une fontaine, ensemble de résurgences qui forment un ruisseau, affluent de la Vienne. L'eau de cette résurgence, à forte teneur en CO₂ ne permet pas en l'état une vie piscicole. Elle est dégazée avant d'alimenter la pisciculture.

La pisciculture produit chaque année cinquante tonnes de TAC. Une plate-forme d'alevinage est située en amont et relativement isolée des autres bassins. Elle reçoit de l'extérieur les œufs ou les truitelles destinés à la production de salmonidés, mis ensuite à grossir dans des

(1) Institut départemental d'analyses de conseil et d'expertise en hygiène alimentaire, eau et environnement et santé animale

bassins en aval. Parmi ceux-ci, quelques-uns constituent une zone de stabulation destinée aux poissons d'étang, qui transitent régulièrement et plus ou moins longtemps sur le site.

La mortalité a débuté en aval de ces bassins de stabulation et s'est généralisée à l'ensemble des bassins de grossissement, sans toutefois atteindre les bassins d'alevinage isolés, contenant pourtant la population la plus sensible. Aucun signe clinique n'a pu être remarqué sur les poissons d'étang.

L'enquête épidémiologique réalisée par le vétérinaire aquacole avec la collaboration de la DDecPP de la Vienne s'est intéressée à l'introduction de poissons biologiquement sensibles à la SHV. Aucune entrée de poissons de statut non indemne n'a été repérée. Cependant, cinq entrées de brochets et de black bass ont eu lieu de novembre à janvier. La sensibilité du brochet au VHSV ayant été démontrée et celle du black bass étant fortement suspectée, ces introductions représentent donc autant de sources potentielles de contamination.

Discussion

Compte tenu de la situation hydrologique de la pisciculture, toute contamination via l'eau est exclue. Le risque de contamination via un vecteur animal (oiseau par exemple) suppose l'existence d'un foyer originel à proximité, or aucun foyer proche n'a été détecté. Les deux seules hypothèses expliquant le déclenchement de la maladie sont le réveil d'un virus en portage latent, qui peut être expliqué par des conditions prolongées de stress, et l'introduction du virus, potentiellement répétée, par des poissons porteurs sains, malgré leur statut sanitaire administratif « indemne ».

La température de l'eau du site, stable (12 °C) tout au long de l'année et favorable à l'apparition de la maladie, l'existence d'autres événements de stress documentés et l'introduction régulière (au moins annuelle) de TAC naïves vis-à-vis de la SHV rendent improbables la première hypothèse. En effet, l'une ou l'autre souche virale hébergée aurait provoqué un épisode pathologique plus tôt.

En revanche, l'hypothèse de l'introduction, par des poissons entrant sur site, d'une ou plusieurs souches virales en une ou plusieurs fois est possible. L'absence de signes cliniques sur les stades les plus sensibles permet d'écarter une contamination par la filière salmonicole. L'apparition de la maladie, d'abord en aval des bassins de stabulation des poissons d'étang, désigne cette filière comme la porte d'entrée vraisemblable de l'agent pathogène.

Les brochets et les adultes de black bass ont un mode de vie solitaire, à l'exception de la période de reproduction. Les conditions de celle-ci sont contraignantes et pas toujours réalisées (brochet). La reproduction du black bass s'effectue à des températures élevées (18 à 25 °C) incompatibles avec le développement de la maladie (Schlumberger *and* Elie, 2008). Par conséquent, un épisode de SHV en étang, où la densité est faible, peut se traduire par une mortalité discrète et passer inaperçu. Les individus survivants s'immunisent, peuvent héberger le virus de façon asymptomatique, et ne pas être détectés par les méthodes de diagnostic direct du fait d'une multiplication virale limitée.

La présence d'une séquence atypique minoritaire au niveau du foyer n° 2 n'a pas pu donner lieu à des investigations plus poussées, mais suggère l'introduction de deux souches virales dans l'élevage, qui ont eu le temps de diverger à partir d'une séquence ancêtre commune relativement récente. L'hypothèse d'une accumulation rapide de mutations pendant l'épizootie même n'est pas exclue, mais semble peu vraisemblable compte tenu du nombre important de mutations et du fait qu'aucune séquence « intermédiaire » n'a été détectée. Concernant la modalité de l'introduction concomitante de deux souches virales dans l'élevage, soit elles sont issues de deux réservoirs distincts (par exemple un black bass et un brochet), soit un réservoir unique doublement contaminé. Le séquençage de souches isolées lors de potentielles futures investigations dans la région permettra d'en savoir plus sur la persistance dans le temps de chacune des séquences identifiées.

Conclusion

La contamination par des espèces d'étang sensibles reste donc l'hypothèse qui présente la plus forte probabilité et qui est compatible avec l'ensemble des observations, ce qui n'est pas le cas des hypothèses concurrentes. Cependant, l'origine exacte de la ou, potentiellement, des souches contaminantes ne peut être déterminée.

La découverte d'un foyer de SHV dans une zone indemne reste exceptionnelle. De fait, au-delà des aspects économiques, la constitution d'une zone ou d'un compartiment indemne assure une protection contre la survenue de foyers. L'efficacité de cette protection impose d'identifier un réservoir potentiel de virus dans les étangs (Figure 3), où la mortalité est plus difficile à surveiller et constater. La contamination simultanée par deux souches différentes suggère que le rôle de réservoir viral des poissons d'étang n'est pas exceptionnel. L'activité piscicole concernant la filière étang doit donc être strictement isolée des activités les plus sensibles: organisation en aval hydrologique, matériel dédié, ou soigneusement désinfecté avant sa réutilisation en salmoniculture (moyens de transport en particulier), personnel formé pour éviter un portage par les mains ou les vêtements. La sectorisation des deux filières salmonicole et de pisciculture d'étang est donc une mesure non seulement pertinente mais aussi cruciale de maîtrise du risque.

Dans bien des régions, la filière étang ne peut être pour autant ni supprimée, ni laissée en dehors de l'effort sanitaire. Il est donc nécessaire d'approfondir l'analyse de la contamination des étangs en particulier en zone indemne, et de mettre en place des mesures applicables et efficaces pour s'assurer au mieux de leur statut sanitaire.

Références bibliographiques

- Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R., Lorenzen, N., 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.* 85: 1167-1179.
- 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 Journal* 808, 1-144.
- Meier, W., Pfister, K., 1981. Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in pike (*Esox lucius* L.): clinical, macroscopic, histological and electron-microscopical findings; direct visualization of the Egtved-virus. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 123(1):37-49.
- Norme NF U 47-220. Isolement sur culture cellulaire et identification par immunofluorescence du virus de la septicémie hémorragique virale des poissons. Octobre 2010.
- Norme XP U47-023. Recherche d'anticorps contre la septicémie hémorragique virale des salmonidés par la technique de neutralisation virale. Novembre 2009.
- OIE, 2009. Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 279-298.
- OIE, 2013. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. Chapter 1.1.3 - Methods for disinfection of aquaculture establishments.
- OIE, 2013. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. Chapter 2.3.9 - Viral Haemorrhagic Septicaemia.
- Papin, E., Roman, T., Morin, T., 2012. Surveillance des principales maladies réglementées des poissons en 2011 : septicémie hémorragique virale (SHV), nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) et herpès-virose de la carpe (HVC). *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 54, 66-68.
- Schlumberger O., Elie P., 2008. in *Poissons des lacs naturels français*. Ed Quae, Versailles.
- 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.
- Wizigmann G., Baath, C., Hoffmann, R., 1980. Isolation of viral hemorrhagic septicemia (VHS) virus from fry of rainbow trout, pike and grayling. *Zentralbl Veterinarmed B.*;27(1):79-81.