

# LE POINT SUR LA NECROSE HEMATOPOÏETIQUE INFECTIEUSE ET LA SEPTICEMIE HEMORRAGIQUE VIRALE DES SALMONIDES

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Karine, Chantal GENTRIC**

Née, le 6 juin 1974 à MONTAUBAN (Tarn-et-Garonne)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE**

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jean-Paul SEGUELA**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Jacques DUCOS de LAHITTE**  
**M. Stéphane BERTAGNOLI**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

LE POINT SUR LA NECROSE HEMATOPOIETIQUE  
INFECTIEUSE ET LA SEPTICEMIE  
HEMORRAGIQUE VIRALE DES SALMONIDES.  
6608-2001 1



# PLAN

## INTRODUCTION

page 11

## I EPIDEMIOLOGIE ET DIAGNOSTIC APPLIQUES A LA PROPHYLAXIE SANITAIRE

### 1/ Epidémiologie de la nécrose hématoïétique infectieuse et de la septicémie hémorragique virale

page 12

- ✓ Epidémiologie descriptive
- ✓ Epidémiologie synthétique

### 2/ bases du diagnostic

page 19

- ✓ Méthodes d'identification du virus
- ✓ Détection des anticorps sériques sur poissons vivants

### 3/ Application à la réglementation

page 21

- ✓ Niveau mondial
- ✓ Mesures de police sanitaire

## II ELEMENTS DE VIROLOGIE ET DE PATHOLOGIE

### 1/ Structure et vie des virus de la nécrose hématoïétique infectieuse et de la septicémie hémorragique virale

page 35

### 2/ Protéines associées aux *Novivirus*

page 39

- ✓ La glycoprotéine G des *Novivirus*
- ✓ Les autres protéines associées aux *Novivirus*



<b><u>3/ Pathogénie et symptômes de ces deux rhabdoviroses chez les salmonidés</u></b>	page 43
--	---------

### **III LES PREMIERS PAS DE LA PROPHYLAXIE MEDICALE**

<b><u>1/ Vaccins classiques</u></b>	page 46
✓ Vaccins inactivés	
✓ Vaccins atténués	

<b><u>2/ Vers des vaccins de nouvelle génération</u></b>	page 49
✓ Rôle protecteur de peptides synthétiques	
✓ Détermination des épitopes neutralisants de la glycoprotéine	

<b><u>3/ Premiers essais de vaccins recombinants</u></b>	page 54
✓ Utilisation d'un vecteur	
✓ Les vaccins génétiques	

<b><u>4/ Nécessité de renforcer la protection obtenue par les épitopes de la glycoprotéine</u></b>	page 61
✓ Apports de la nucléoprotéine	
✓ Découverte d'une protéine de stress dans l'infection de la N.H.I.	

<b><u>5/ Discussion</u></b>	page 65
-----------------------------	---------

<b><u>CONCLUSION</u></b>	page 68
--------------------------	---------



## *LISTE DES ANNEXES*

ANNEXE 1 : Arrêté Ministériel du 10 avril 1997 modifié par AM du 1 <sup>er</sup> mars 2000	page 74
ANNEXE 2 : Arrêté Ministériel du 22 septembre 1999	page 81
ANNEXE 3 : Arrêté Ministériel du 23 septembre 1999	page 85
ANNEXE 4 : Modèle d'arrêté portant déclaration d'infection de nécrose hématopoïétique infectieuse / septicémie hémorragique virale	page 88
ANNEXE 5 : Formulaire de déclaration de foyer	page 91
ANNEXE 6 : CD-ROM	

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

<b>N.H.I.</b>	: nécrose hématopoïétique infectieuse
<b>S.H.V.</b>	: septicémie hémorragique virale
<b>N</b>	: nucléoprotéine
<b>P</b>	: phosphoprotéine
<b>M</b>	: protéine de matrice
<b>G</b>	: glycoprotéine
<b>NV</b>	: protéine non-virale
<b>L</b>	: polymérase
<b>V.N.H.I.</b>	: virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse
<b>V.S.H.V.</b>	: virus de la septicémie hémorragique virale
<b>R.P.S.</b>	: [ 1 – (taux de mortalité vaccinées / taux de mortalité contrôles) ] x 100
<b>C.M.V.</b>	: cytomégalovirus

## *TABLE DES ILLUSTRATIONS*



<b>DOCUMENT 1 : Liste des espèces reconnues sensibles à la N.H.I.</b>	page 13
<b>DOCUMENT 2 : Liste des espèces reconnues sensibles à la S.H.V.</b>	page 14
<b>DOCUMENT 3 : Complémentarité des extrémités 5' et 3' du génome de V.N.H.I.</b>	page 37
<b>DOCUMENT 4 : Répartition schématique des protéines des <i>Rhabdovirus</i></b>	page 37
<b>DOCUMENT 5 : Position des différents acides aminés de G</b>	page 40
<b>DOCUMENT 6 : Quantités comparatives des protéines virales des différents <i>Rhabdovirus</i></b>	page 43
<b>SCHEMA 1 : Modalités de transmission de la N.H.I. dans le milieu naturel</b>	page 16
<b>SCHEMA 2 : Variation de l'état infectieux d'un poisson au cours de sa vie</b>	page 17
<b>SCHEMA 3 : Conditions de circulation des poissons et de leurs produits dans l'U.E.</b>	page 30
<b>SCHEMA 4 : Décomposition schématique du génome de V.N.H.I.</b>	page 36
<b>SCHEMA 5 : Multiplication des <i>Rhabdovirus</i> dans la cellule-hôte</b>	page 38
<b>SCHEMA 6 : Décomposition d'un monomère de G</b>	page 39
<b>SCHEMA 7 : Chronologie de la pathogénie de la N.H.I. et de la S.H.V.</b>	page 45
<b>CARTE 1 : Répartition des cas de N.H.I. déclarés en 1999</b>	page 23
<b>CARTE 2 : Répartition des cas de S.H.V. déclarés en 1999</b>	page 24



**CARTE 3 : Répartition des cas de N.H.I. déclarés en 2000** page 24

**CARTE 4 : Répartition des cas de S.H.V déclarés en 2000** page 25

**TABLEAU 1 : Conditions d'obtention des appellations** page 28

**DIAGRAMME 1 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec V.N.H.I. tué** page 47

**DIAGRAMME 2 :Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec V.N.H.I. atténué** page 48

**DIAGRAMME 3 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec des protéines recombinantes contre la S.H.V.** page 51

**DIAGRAMME 4 : Réponse en anticorps neutralisants après injection d'un vaccin recombinant contre la S.H.V.** page 55

**DIAGRAMME 5 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec un vaccin recombinant contre la S.H.V.** page 55

**DIAGRAMME 6 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées par un double vaccin recombinant contre la S.H.V. et la N.H.I.** page 57

**DIAGRAMME 7 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec un vaccin génétique contre la N.H.I.** page 59

**DIAGRAMME 8 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec un vaccin génétique contre la S.H.V.** page 59

**DIAGRAMME 9 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec les vaccins de sous-unité de G et de N contre la N.H.I.** page 61

**DIAGRAMME 10 : Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec injection de plasmides de G et de N contre la N.H.I.** page 63



## INTRODUCTION

La nécrose hématopoïétique infectieuse (N.H.I.) et la septicémie hémorragique virale (S.H.V.) sont deux rhabdoviroses des salmonidés légalement reconnues contagieuses en France. Les épidémies qu'elles provoquent chez les jeunes représentent des pertes économiques considérables en salmoniculture. Or, comme pour toute maladie virale, le traitement médical fait défaut.

Des mesures de prophylaxie sanitaire ont donc récemment été mises en place pour limiter l'extension de ces deux fléaux de la pisciculture. Elles sont développées et expliquées à la lumière de l'épidémiologie et du diagnostic dans une première partie. Dans un second temps, nous dressons un tableau succinct de l'étiologie et de la pathologie de ces deux maladies. La prophylaxie médicale apparaît comme une véritable nécessité au fur et à mesure de l'exposé. Cependant à l'heure actuelle, un seul vaccin est reconnu et utilisé en pisciculture, contre une maladie bactérienne, la yersiniose. Les balbutiements de la recherche d'un vaccin contre la S.H.V. et la N.H.I. sont détaillés dans une troisième partie.



# I EPIDEMIOLOGIE ET DIAGNOSTIC APPLIQUES A LA PROPHYLAXIE SANITAIRE

Le développement de la salmoniculture intensive dans les années quatre-vingt en Europe a exacerbé le problème de la septicémie hémorragique virale et de la nécrose hématopoïétique infectieuse. L'épidémiologie de ces deux viroses va nous permettre de comprendre leur omniprésence.

## I 1/ Epidémiologie de la N.H.I. et de la S.H.V.

### ✓ *Epidémiologie descriptive* (2, 26)

Les hôtes naturels de la N.H.I. sont représentés par plusieurs espèces de salmonidés mais ce sont surtout les saumons de l'Atlantique (*Salmo salar*) et du Pacifique (*Oncorhynchus spp.*) ainsi que la truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) qui paient le plus lourd tribut dans la mesure où ces espèces sont élevées. La truite Arc-en-ciel est en effet la première production française en salmoniculture. La première localisation du virus a été faite chez le saumon du Pacifique au nord-ouest des Etats-Unis. Aujourd'hui, la N.H.I. a pu être identifiée aux Etats-Unis, au Japon, à Taiwan, en Belgique, en France, en Corée et en Italie.





Host range of IHNV.

	Scientific name	Reference
Fish species in which natural IHN epizootics have occurred		
Sockeye salmon	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Rucker <i>et al.</i> , 1953
Kokanee salmon	Land-locked <i>O. nerka</i>	Sano <i>et al.</i> , 1977
Chinook salmon	<i>O. tshawytscha</i>	Ross <i>et al.</i> , 1960
Chum salmon	<i>O. keta</i>	Sano <i>et al.</i> , 1977
Cherry salmon	<i>O. masou masou</i>	Sano <i>et al.</i> , 1977
Biwa salmon	<i>O. masou rhodurus</i>	Sano <i>et al.</i> , 1977
Yamame trout	<i>O. masou</i>	Sano <i>et al.</i> , 1977
Amago trout	<i>O. masou macrostomus</i>	Sano <i>et al.</i> , 1977
Rainbow trout	<i>O. mykiss</i>	Amend <i>et al.</i> , 1969
Steelhead trout	Anadromous <i>O. mykiss</i>	Amend <i>et al.</i> , 1969
Cutthroat trout	<i>O. clarki</i>	Parisot, 1962
Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	Mulcahy and Wood, 1986
Brown trout	<i>S. trutta</i>	Yamazaki and Motonishi, 1992
Brook trout	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Yamazaki and Motonishi, 1992
Japanese char	<i>S. leucomaenis</i>	Kimura and Awakura, 1977
Salmonid species of low susceptibility to IHN disease		
Coho salmon	<i>O. kisutch</i>	Wingfield and Chan, 1970
Arctic grayling	<i>Thymallus arcticus</i>	Follett <i>et al.</i> , 1997
Pink salmon	<i>O. gorbuscha</i>	Follett <i>et al.</i> , 1997
Lake trout	<i>Salvelinus namaycush</i>	Yamamoto and Clermont 1990
Arctic char	<i>S. alpinus</i>	Follett <i>et al.</i> , 1997

Document 1 : Liste des espèces reconnues sensibles à la N.H.I.

(d'après Bootland et Léong, 2)

Des espèces autres que des salmonidés sont sensibles à la N.H.I., comme le brochet (*Esox lucius*), l'ombre (*Thymallus thymallus*), la brème de mer (*Sparus aurata*) et le turbot (*Scophthalmus maximus*). De plus, il existe deux espèces de poissons marins pour lesquels l'infection est possible mais qui sont réfractaires à la maladie : le loup (*Morone labrax*) et l'esturgeon (*Acipenser transmontanus*).



Le saumon du Pacifique (*Oncorhynchus spp.*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) sont également sensibles à la S.H.V. Par contre, le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) pourrait ne l'être que dans les conditions expérimentales. Il n'est donc pas considéré comme un hôte naturel de la S.H.V. au niveau des côtes atlantiques de l'Europe.

Host/species	Specific name	Référence
Atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>	Jensen et al. (1979)
Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	Rasmussen (1965)
Brook trout	<i>Salvenilus</i>	Rasmussen (1965)
Brown trout	<i>Salmo trutta</i>	Rasmussen (1965)
Chinook salmon	<i>Oncorhynchus</i>	Winton et al. (1989)
	<i>tshawytscha</i>	
Coho salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Winton et al. (1989)
Golden trout	<i>Salmo aguabonita</i>	Ahne et al. (1976)
Grayling	<i>Thymallus thymallus</i>	Wizigmann et al.
Lake trout	<i>Salvelinus namaycush</i>	Guittino (1973)
Pacific cod	<i>Gadus macrocephalus</i>	Meyers et al. (1992)
Pacific herring	<i>Clupea harengus</i>	Meyers et al. (1994)
Pike	<i>Esox lucius</i>	Meier and Vestergard-Jorgensen
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jensen (1963)
Sea bass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Jensen 1963)
Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	Castric and de Kinkelin (1984)
Whitefish	<i>Coregonus sp.</i>	Ahne and Thomsen
Hybrid rainbow trout x coho salmon	<i>O. mykiss</i> x <i>O. kisutch</i>	Ord et al. (1976)

Document 2 : **Liste des espèces reconnues sensibles à la S.H.V.**

(d'après Smail, 26)

Le loup (*Sparus aurata*) est par contre sensible à la S.H.V. tout comme le brochet (*Esox lucius*) et le turbot (*Scophthalmus maximus*).



La principale localisation des épidémies de S.H.V. se situe dans les piscicultures européennes. Quant aux formes marines, elles ont été localisées plus largement en Alaska, dans l'état de Washington et dans la Mer du Nord.

Il est important de signaler que la sensibilité, notamment en ce qui concerne les salmonidés, peut être variable suivant les conditions du milieu (déjà cité pour le saumon de l'Atlantique et la S.H.V.). Ainsi, la truite fario (*Salmo trutta trutta*) d'origine française semble réfractaire à la N.H.I. alors qu'elle est considérée de manière générale comme un hôte possible de la maladie. De ceci résultent des conséquences très importantes au niveau prophylactique, d'autant plus qu'elle peut, par exemple être, tout de même porteuse du virus.

Les deux maladies lorsqu'elles sévissent en aquaculture, ce qui nous intéresse d'un point de vue économique, se présentent sous la forme d'une épidémie atteignant les jeunes poissons durant l'hiver (température de l'eau de 10-12°C). Dans ces conditions, le taux de mortalité se situe autour de 90%.

### ✓ **Epidémiologie synthétique**

Les deux virus ont une aire de distribution très étendue dans les eaux douces (lacs, rivières et piscicultures) mais sont également présents dans des zones marines dont des nouvelles sont régulièrement découvertes. Le spectre d'hôte est également mis à jour au fur et à mesure des isollements. L'état actuel des connaissances ne permet donc qu'une définition partielle des modalités de contamination par ces deux maladies. La plus étudiée dans ce domaine, comme pour la pathogénie, est la N.H.I.

#### Milieu naturel

Etant donné que les piscicultures sont des milieux ouverts, l'épidémiologie des infections dans le milieu sauvage est capitale pour comprendre et ajuster les règles de prophylaxie sanitaire.

Le schéma 1 résume les différentes modalités de transmission.



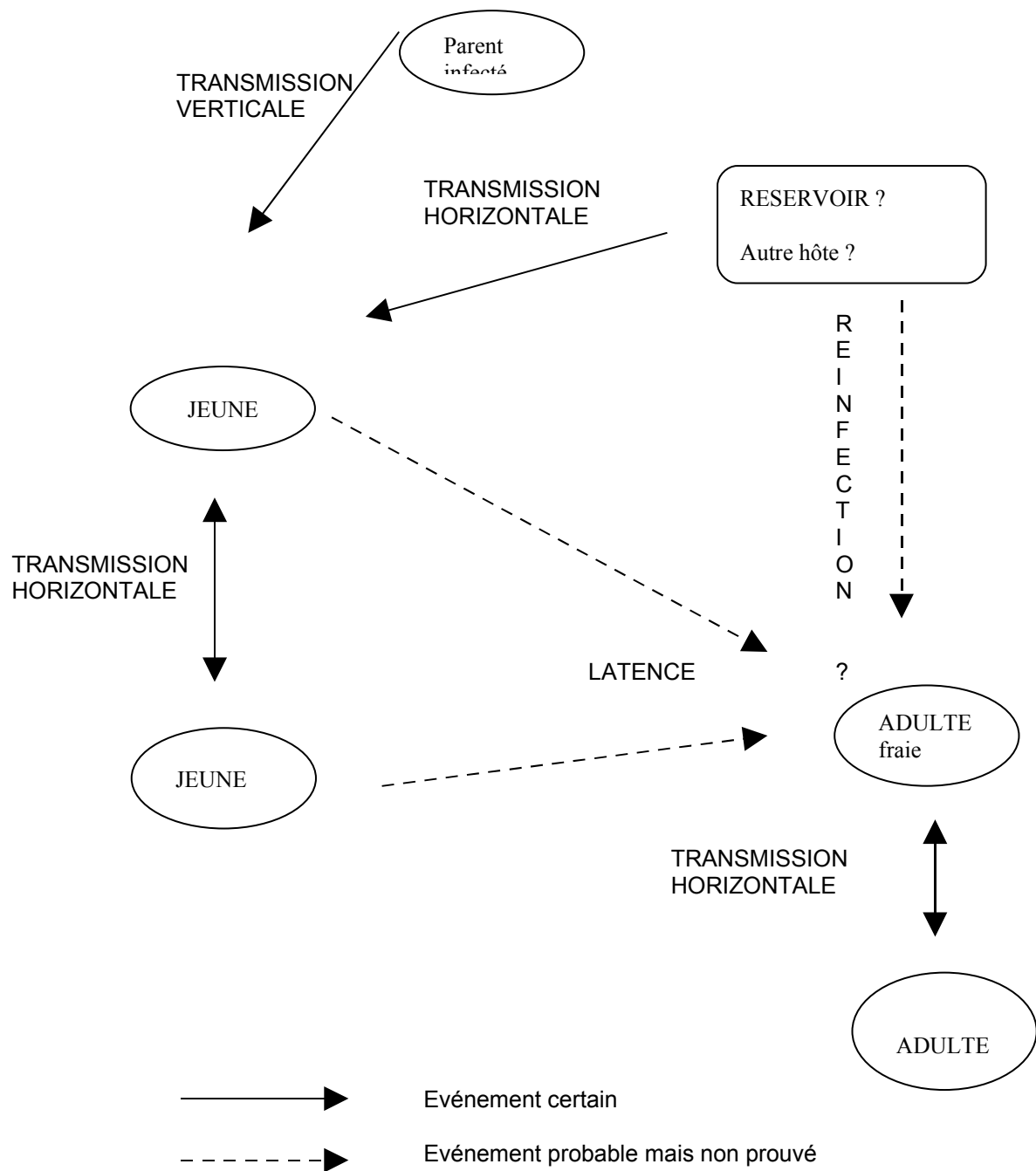


Schéma 1 : **Modalités de transmission de la N.H.I. dans le milieu naturel.**



L'état de latence décrit ci-dessus est encore hypothétique. Il suppose que l'état infectieux d'un poisson donné est variable au cours de sa vie comme décrit dans le schéma 2.

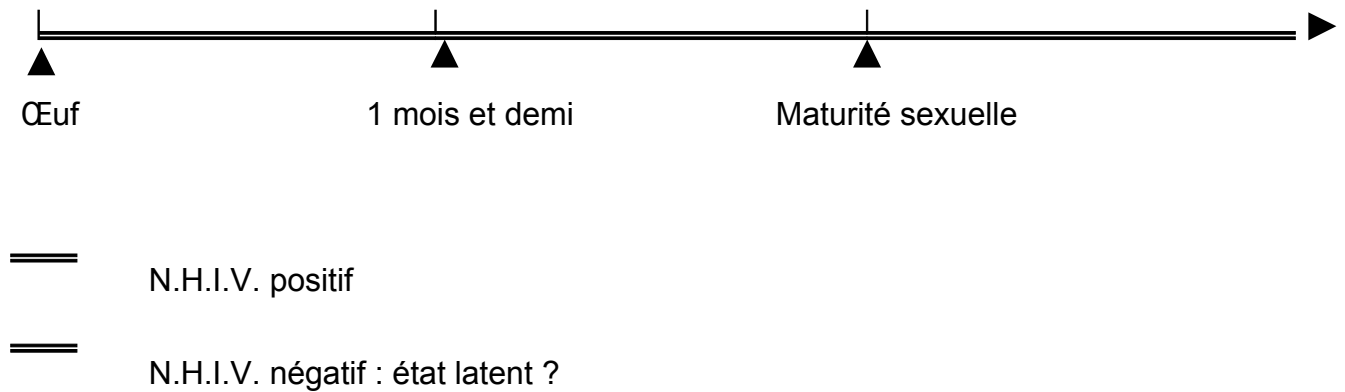


Schéma 2 : **Variation de l'état infectieux d'un poisson au cours de sa vie.**

Si l'on considère cette hypothèse, le stress que représente la migration vers les frayères en ce qui concerne les saumons peut expliquer une immunodéficience responsable de la reprise de l'infection. De plus, le stade de latence a pu être mis en évidence dans les conditions expérimentales.

Quant à une ré-infection, elle suppose l'existence d'un hôte ou d'un réservoir. En effet, le virus ne peut, compte tenu de sa faible résistance, subsister dans l'eau d'une année sur l'autre. Dans le cas du saumon, cette source peut tout à fait être d'origine marine : le loup et l'esturgeon ont déjà été signalés comme pouvant être porteurs. De plus, en tant qu'anadrome, l'esturgeon pourrait contaminer les poissons dulcicoles lors de sa migration. D'autre part, le virus a été mis en évidence dans des invertébrés comme la sangsue du saumon (*Piscicola leech*). Le sédiment peut également constituer un réservoir dans la mesure où le virus y semble plus résistant. La question n'est toujours pas élucidée à ce jour...



Les études concernant la S.H.V. ne permettent pas d'aller aussi loin mais une origine marine du virus est très probable. Le virus a d'ailleurs été isolé notamment chez la morue (*Gadus morrhua*) et le hareng (*Clupea harengus*).

### En pisciculture

Le virus de la N.H.I. a été décelé pour la première fois chez des saumons dans le nord-ouest de Etats-Unis. La dispersion a très certainement été assurée par des viscères non pasteurisés utilisés pour l'alimentation de jeunes poissons, pratique interdite de nos jours.

Aujourd'hui, l'apparition d'une épidémie dans une pisciculture peut relever essentiellement de deux phénomènes :

1/ apport d'œufs contaminés

2/ le passage du milieu naturel à une pisciculture via des vecteurs.

En ce qui concerne les œufs, une véritable transmission verticale c'est-à-dire la présence du virus dans le vitellus , semble écartée pour la N.H.I. Ce serait donc un portage du virus sur l'œuf . La conséquence directe de ce mode de transmission est qu'une désinfection préalable à tout transfert est indispensable.

Le va-et-vient du virus entre le milieu sauvage et les piscicultures est une évidence.

L'eau est le premier vecteur en prendre en compte si elle est infectée en amont de la pisciculture mais son incidence est certainement très faible du fait de la faible résistance du virus et de l'effet dilution.



D'autre part, le transfert de poissons par les hérons par exemple est inéluctable et peut contribuer à la dissémination d'une épidémie. Il apparaît donc indispensable de prendre des mesures efficaces pour repeupler avec des poissons sains en eau douce. En eau saumâtre, la transmission d'une espèce sauvage aux poissons d'élevage est encore moins gérable. C'est le cas des saumons de l'Atlantique (*Salmo salar*) et de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) qui sont pour beaucoup élevées dans des cages flottantes sur la côte atlantique. (15)

## **I 2/ Bases du diagnostic**

Face à l'importance économique de ces deux viroses, des méthodes précises et sûres de diagnostic sont indispensables et préalables à toute prophylaxie.

### **✓ Méthodes d'identification du virus (2, 26)**

Ces techniques de diagnostic direct sont utilisées pour confirmer l'étiologie d'une épidémie dont les symptômes évoquent l'une des viroses. Elles sont réalisées en deux étapes :

- 1/ isolation du virus par culture cellulaire
- 2/ identification du virus.

Le virus est cultivé préférentiellement sur lignée cellulaire EPC pour la N.H.I. et sur lignée BF-2 pour la S.H.V. L'effet cyto-pathogène observable est la formation d'amas cellulaires en forme de grappe dans le premier cas avec margination de la chromatine, l'arrondissement des cellules infectées et la formation de plages sur la culture dans le deuxième.

Une fois l'effet cyto-pathogène (ECP) observé, l'identification définitive du virus peut se réaliser de différentes manières, dont les qualités sont variables et complémentaires.



## Méthodes sérologiques

La séro-neutralisation (SN) utilisant des anticorps monoclonaux ou du sérum de lapin est la méthode de référence mais reste cantonnée à la confirmation d'une épidémie a posteriori dans la mesure où le diagnostic définitif n'est établi qu'au minimum 2 semaines après. Elle est améliorée par l'immunofluorescence dont la sensibilité est très bonne et qui est plus rapide dans la mesure où elle est réalisable avant même l'apparition de l'ECP.

Les tests ELISA et apparentés sont également utilisés. De spécificité bonne, ils présentent de plus une sensibilité tout à fait correcte même si inférieure à la SN mais sont d'utilisation plus simple.

Pour la N.H.I., une technique de coagglutination staphylococcique a été mise au point. Elle présente un intérêt majeur vis-à-vis de la rapidité avec laquelle elle peut être réalisée et est utilisable sur le terrain pour un examen direct. Cependant, si la spécificité de ce test est tout à fait correcte, la sensibilité reste faible.

## Méthodes autres

La microscopie électronique reste une méthode utilisable, applicable sur l'eau ou sur un tissu lésé mais elle est très peu spécifique pour différencier ces deux rhabdoviroses. Cependant elle est rapide et sensible.

Des sondes à A.R.N. ont été mises en place pour la S.H.V. Elles sont complémentaires du gène de N et sont au nombre de trois permettant d'en distinguer les trois sérotypes. Utilisées en dot-blotting, elles assurent une spécificité remarquable au dépistage.

Enfin, la PCR amplifiant le gène de N a été développé pour les deux viroses. Cette méthode rapide, très sensible et spécifique permet de repérer facilement les porteurs latents. Ainsi, elle va permettre de gérer le risque épidémiologique sans même nécessiter une culture cellulaire préalable.





Le diagnostic dit direct permet de mettre en évidence à la fois les malades cliniques et les porteurs latents. Pour les cas cliniques, la culture préalable n'est pas indispensable et l'IF ou l'ELISA peuvent être utilisées directement sur des coupes ou des broyats d'organes atteints.

### **✓Détection des anticorps sériques sur poissons vivants**

Ici, ce n'est pas le virus qui est directement recherché mais son passage dans l'organisme. Cette méthode indirecte de diagnostic permet le dépistage des porteurs latents et des animaux immunisés par la recherche d'anticorps sériques et donne donc une image du passé de la pisciculture étudiée vis-à-vis de ces deux viroses.

Elle ne peut en aucun cas permettre d'établir un diagnostic de maladie déclarée au moment de la prise de sang dans la mesure où il est bien établi que la cinétique de la réponse primaire en anticorps est d'apparition lente chez le poisson (seule la réponse non spécifique via le complément... apparaît dans les heures ou jours suivant l'infection.).

Elle présente de plus l'avantage de pouvoir se réaliser sur poisson vivant.

La séro-neutralisation est recommandée lorsqu'il s'agit de déterminer le statut d'une pisciculture mais l'ELISA semble également utilisable sans risque d'erreur majeure. Une liste de laboratoires agréés est établie dans le cadre de la réglementation mais tout résultat positif doit être confirmé par le laboratoire de référence qu'est l'A.F.S.S.A.

### **I 3 Application à la réglementation**

L'épidémiologie d'une part et les possibilités diagnostiques d'autre part éclairent les mesures mises en place pour se prémunir face aux risques engendrés par ces deux M.R.C.



### ✓ **Niveau mondial** (14)

L'O.I.E. a inscrit la S.H.V. (1968) et la N.H.I. (1977) au code zoo sanitaire. Il en découle des recommandations précises pour le commerce international des poissons et produits dérivés. Tout d'abord, l'échange de poissons vivants entre pays est déconseillé. De plus, s'ils ont lieu, les échanges doivent se réaliser entre zones de niveau sanitaire au moins égal.

A cet effet, l'O.I.E. a différencié les piscicultures pour lesquelles un contrôle sanitaire est effectué de celles qui sont non surveillées. Dans le premier cas, trois états sanitaires sont définis :

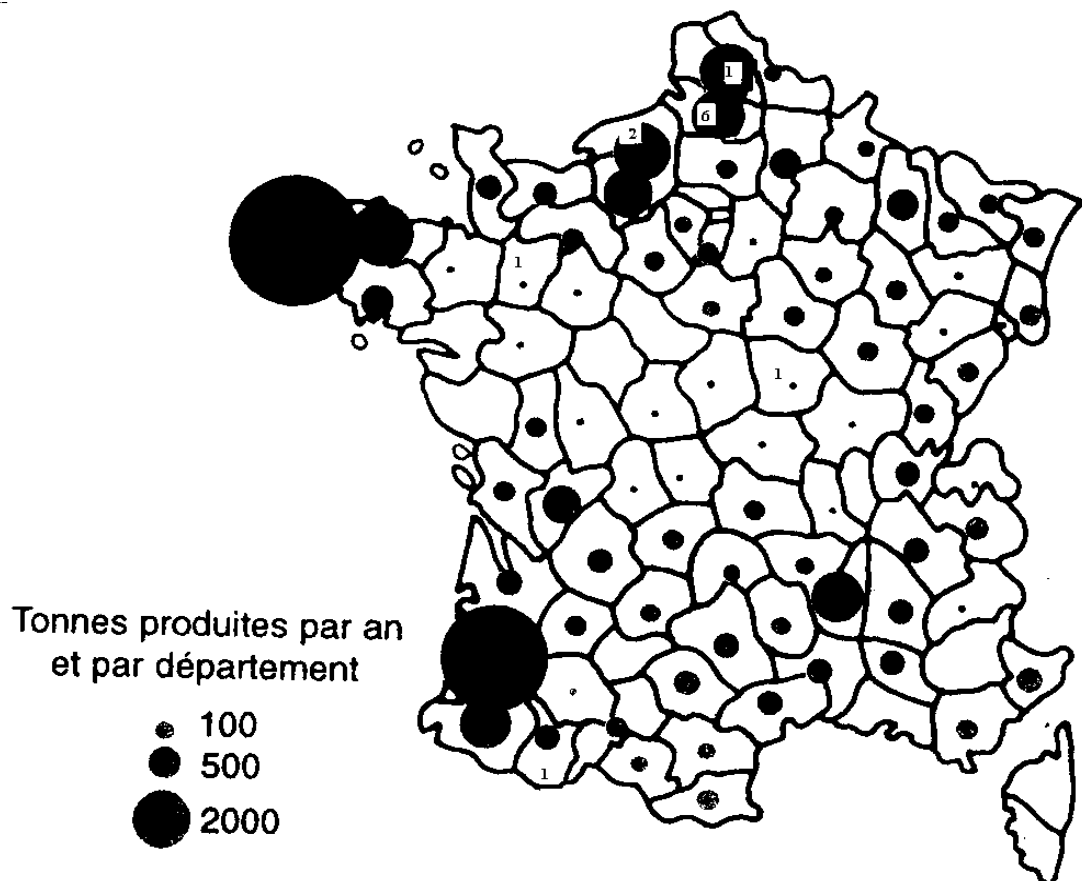
- 1/ les poissons considérés sont dits exempts d'organismes pathogènes des maladies inscrites au code : la contamination en amont est impossible et les analyses sont négatives depuis au moins deux ans
- 2/ les poissons sont dits indemnes : aucun diagnostic de maladie inscrite au code n'a été fait depuis au moins deux ans
- 3/ les poissons sont contrôlés sommairement et ne présentent pas de signe clinique de maladie inscrite au code.

Par l'installation de ce code, l'O.I.E. permet à chaque état de se prémunir partiellement contre la S.H.V. et la N.H.I. En effet, il n'y a pas de caractère obligatoire mais les certificats qui sont délivrés peuvent servir de guide aux services vétérinaires. Chaque état reste libre d'affiner ses conditions d'importation, comme l'a fait l'Union Européenne.



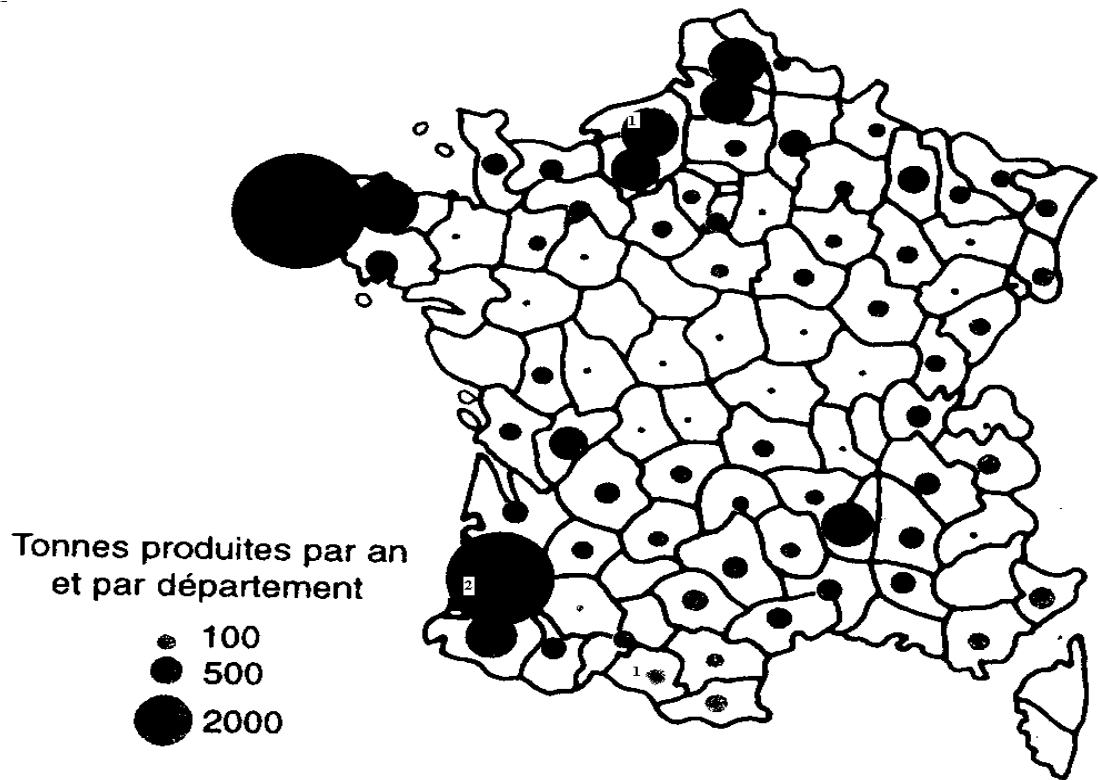
## ✓ Mesures de Police Sanitaire

La S.H.V. et la N.H.I. sont reconnues comme M.L.R.C. depuis le 28 décembre 1995 par le décret n° 95-1408 et il existe dans l'U.E. et en particulier en France une police sanitaire bien définie. La mise en application des textes n'est effective que depuis l'année 1999. La répartition du nombre annuel de cas était donc très certainement sous-estimée jusque là. L'état actuel des piscicultures françaises vis-à-vis de la S.H.V. et de la N.H.I. est résumé dans les cartes ci-après, correspondant aux cas déclarés en 1999 et 2000. La N.H.I. est donc bien omniprésente en France avec 18 cas déclarés en 1999, 23 en 2000. Les chiffres devraient progresser durant les premières années de la prophylaxie sanitaire puisque sa mise en place nécessite des analyses répétées. La S.H.V. est plus sporadique.

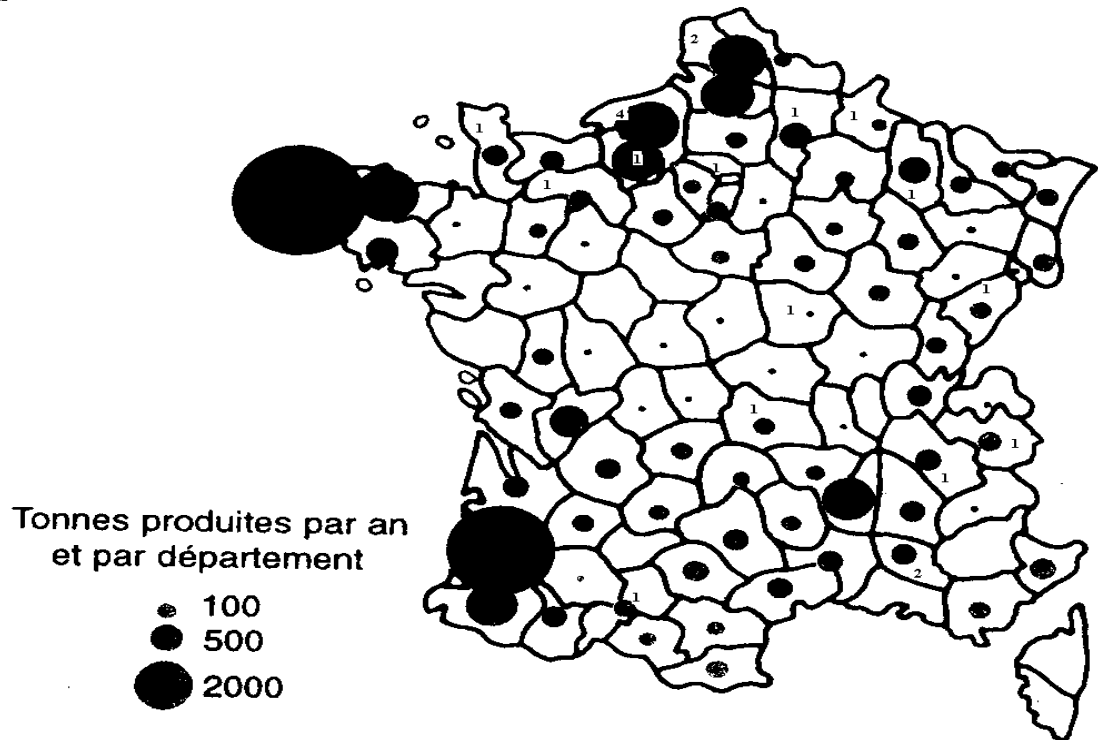


Carte 1 : Répartition des cas de N.H.I. déclarés en 1999

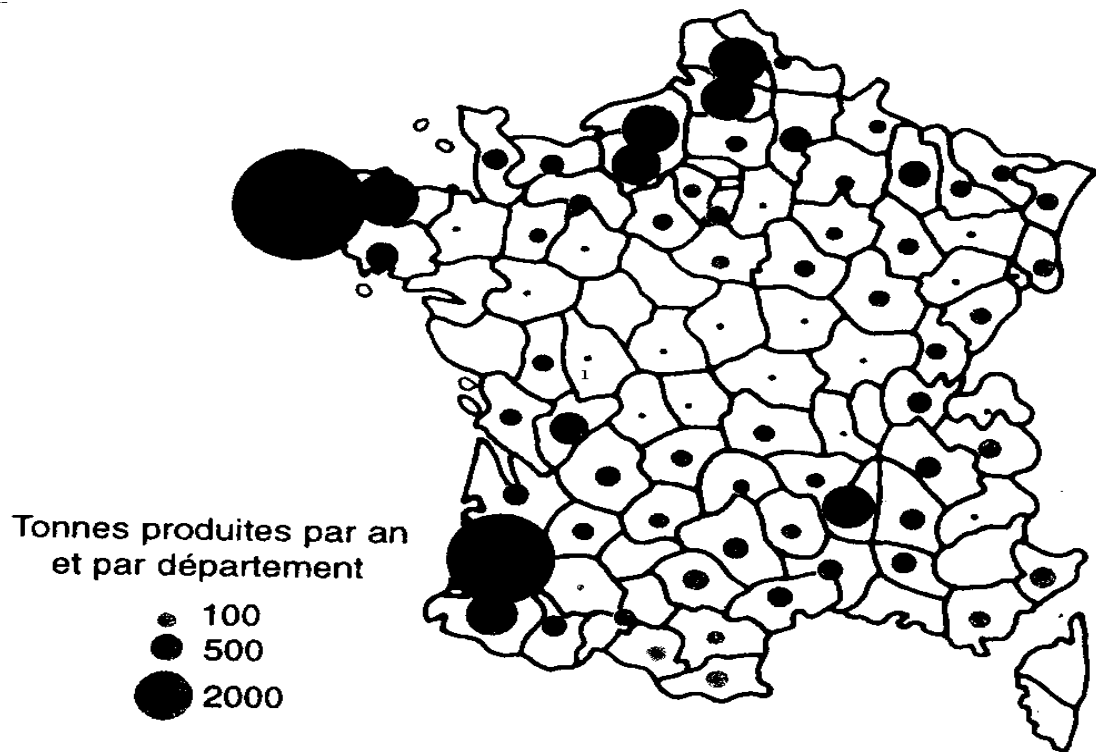




Carte 2 : Répartition des cas de S.H.V. déclarés en 1999



Carte 3 : Répartition des cas de N.H.I. déclarés en 2000



Carte 4 : Répartition des cas de S.H.V. déclarés en 2000

(d'après 25 et les données du ministère de l'agriculture)

La police sanitaire se justifie face à l'absence de traitement des viroses et aux difficultés de la prophylaxie médicale comme il sera démontré plus loin. Il apparaît donc indispensable de mettre en place des règles précises d'échange dans le but de :

- 1/ limiter l'extension des maladies aux différentes exploitations
- 2/ préserver l'environnement naturel qui se trouve en prise directe avec les élevages.

Les espèces définies comme sensibles au vu de la législation française sont les salmonidés, l'ombre, le corégone, le brochet, le turbot et le black-bass pour la S.H.V., les salmonidés et le brochet pour la N.H.I.



Trois arrêtés ministériels interviennent pour définir ces mesures :

- l'arrêté du 10 avril 1997 modifié par celui du 1<sup>er</sup> mars 2000 relatif aux conditions de mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture (annexe 1)
- l'arrêté du 22 septembre 1999 relatif aux mesures de lutte contre les MLRC des poissons (annexe 2)
- l'arrêté du 23 septembre 1999 relatif aux mesures financières de cette lutte (annexe 3)

Conditions de mise sur le marché des animaux et des produits d'aquaculture  
(annexe 1)

La législation détermine à la fois les appellations applicables aux exploitations et aux zones géographiques dans lesquelles elles s'inscrivent ainsi que les modalités d'échanges.

Elle s'applique :

1/ à tout poisson transféré d'un milieu à un autre

2/aux produits dits d'aquaculture comprenant les produits dérivés destinés à l'élevage comme les œufs et les gamètes et ceux destinés à la consommation.



♦ Détermination des appellations

Il existe une appellation de zone indemne qui est acquise en l'absence de toute manifestation de maladie de la liste II (S.H.V. et N.H.I.) depuis 4 ans. Le maintien de la qualification est assurée par des plans de surveillance sous le contrôle des Services Vétérinaires. Ils consistent en :

- 1/ l'inspection de tous les poissons présentant des anomalies
- 2/ l'analyse d'échantillons comme défini dans l'annexe III par des laboratoires agréés, les résultats devant être négatifs pour la S.H.V. et la N.H.I.
- 3/ tous les poissons introduits doivent provenir d'une zone ou d'une exploitation indemne
- 4/ la mise en place de registres des résultats et des mouvements dans chaque exploitation
- 5/ la déclaration de toute mortalité ou de tout symptôme de suspicion de S.H.V. ou de N.H.I.

Toute suspicion est suivie du prélèvement d'au moins dix poissons malades pour analyse. Si les résultats s'avèrent positifs, la qualification est levée, tous les poissons éliminés et il s'ensuit une désinfection et un vide sanitaire d'au moins quinze jours en fonction de la température de l'eau.

Les exploitations (définies comme des zones délimitées d'élevage) sont soumises à trois types d'appellation. Elles sont basées sur le statut des poissons qui les composent, avec des conditions supplémentaires pour l'appellation « indemne ».



Appellation	Indemne en zone indemne	Suspecte d'être infectée	Infectée
Qualité des poissons	Exempts depuis au moins 4 ans de toute manifestation de maladie de la liste II	Présentant des signes cliniques ou des lésions post-mortem ou des tests douteux vis-à-vis des maladies de la liste II	Pour lesquels une M.R.C. a été confirmée et non encore suivie d'une désinfection

Tableau 1 : **Conditions d'obtention des appellations.**

Pour l'appellation « indemne » en zone non indemne, les conditions suivantes doivent également être remplies :

1/ l'alimentation en eau doit se faire par un puits, une source ou un forage et l'eau acheminée par des canalisations afin qu'aucun contact ne soit possible avec des animaux sauvages non contrôlés malades ou des espèces réfractaires mais pouvant constituer un réservoir comme par exemple la truite fario.

2/ un obstacle naturel ou artificiel en aval de l'exploitation doit assurer la protection des eaux naturelles.

La qualification n'est obtenue en première intention que si des contrôles cliniques ainsi que des prélèvements annuels sont apparus négatifs dans les dix dernières années ou si l'exploitation n'a été approvisionnée qu'en poissons issus d'exploitations indemnes à l'issue d'une désinfection et d'un vide sanitaire de 15 jours.

Le maintien de l'appellation « indemne » est reconduit si et seulement si les prélèvements annuels se révèlent négatifs et si tout animal introduit provient d'une exploitation indemne.

Les listes sont établies par la Commission Européenne sur proposition du ministre de l'agriculture et de la pêche.





♦ Contrôle des mouvements

L'arrêté définit également les conditions de circulation des animaux.

La mise sur le marché consiste en trois types de mouvements :

1/ la vente pour la consommation

2/ le transfert

3/ le repeuplement.

Les conditions définies ci-après sont valables pour les mouvements nationaux, intercommunautaires ainsi que pour les importations en provenance d'un pays tiers, en ce qui concerne les poissons vivants et leurs produits dérivés ( semences et poissons destinés à la consommation humaine).

Le schéma 3 rassemble les différentes possibilités de circulation et leurs conditions.





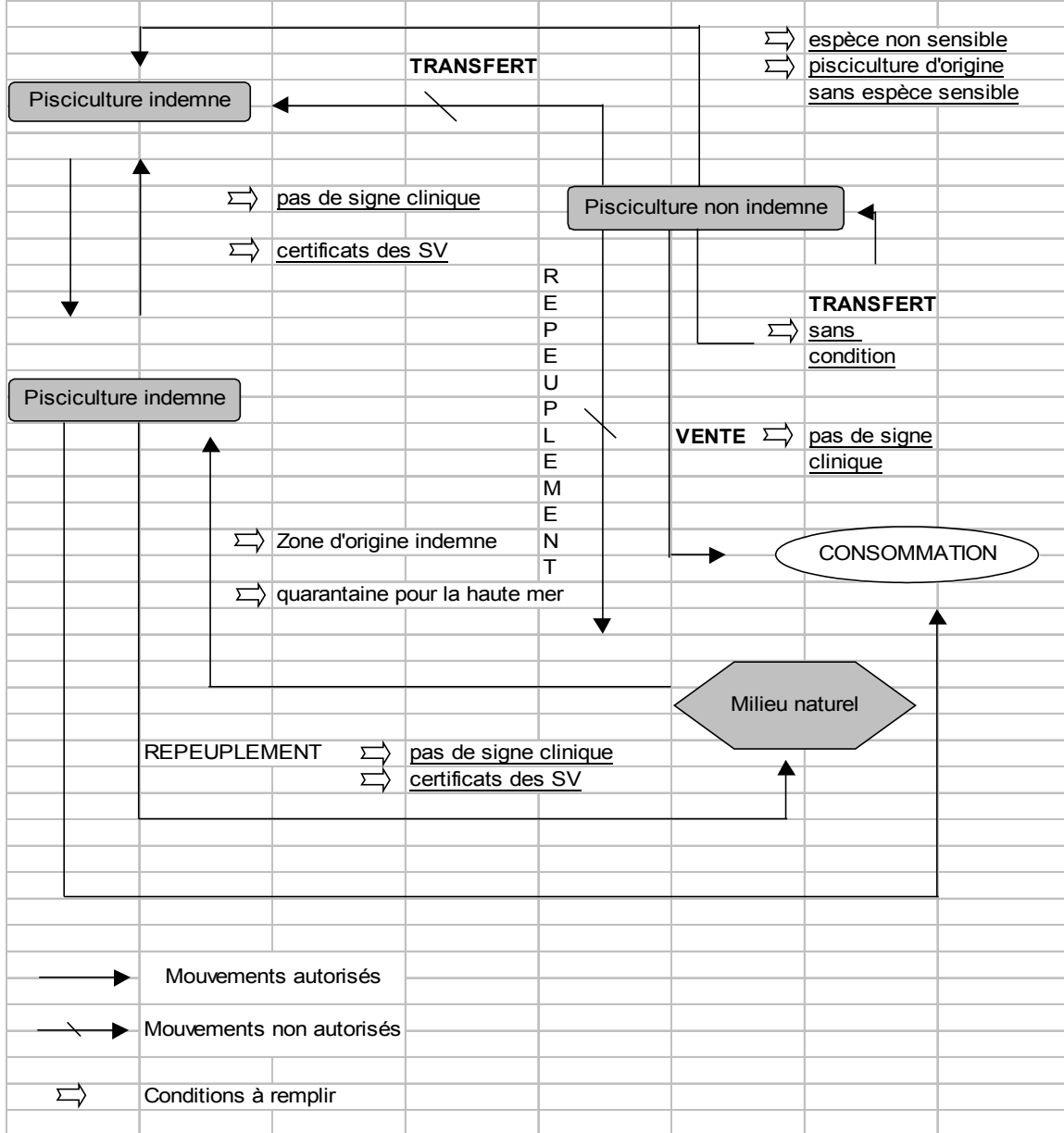


Schéma 3 : Conditions de circulation des poissons et de leurs produits dans l'U.E.



Chaque mouvement est accompagné des certificats vétérinaires nécessaires ainsi que de documents de transport. Ainsi, l'identification précise de tout lot est vérifiable et la traçabilité est assurée.

L'application de ces conditions aux produits dérivés s'explique par l'épidémiologie. D'une part, le transfert de l'infection par les œufs est un mode fréquent de contamination et la désinfection seule, bien que très efficace pourrait s'avérer insuffisante si une véritable ovo -contamination existait réellement. D'autre part, les poissons destinés à la consommation peuvent être dangereux pour le milieu sauvage si les déchets hébergent le virus et sont directement déversés dans les cours d'eau.

La quarantaine exigée pour les poissons provenant de la haute mer se justifie surtout par l'hypothèse d'une origine marine de ces deux maladies.

#### Mesures de lutte contre la S.H.V. ET LA N.H.I. des salmonidés (annexe 2)

Les exploitants dont la pisciculture est inscrite dans un plan de surveillance sont tenus de mettre à jour les registres de leurs résultats et des mouvements de tous leurs produits.

De plus, la vaccination contre la S.H.V. ou la N.H.I. est actuellement interdite en France, quelque soit la nature du vaccin et quelque soit le statut de l'exploitation.

L'arrêté du 22 septembre 1999 décrit de plus les mesures à appliquer lors de suspicion clinique de S.H.V. ou de N.H.I.. Ces mesures sont prises dans le seul but de limiter l'extension des foyers et ont donc un caractère moins invasif que dans le cas de zoonose.



Le vétérinaire sanitaire ou l'agent des services vétérinaires doit, face à toute suspicion, demander la mise en place d'un arrêté de mise sous surveillance (A.M.S.S.) au préfet concerné dans les élevages qualifiés et réaliser les prélèvements pour virologie nécessaires à la confirmation quelque soit la pisciculture. La suspicion n'est pas nécessairement basée sur des signes cliniques et un résultat positif lors d'un contrôle de qualification est suffisant pour déclarer un foyer suspect de S.H.V. ou de N.H.I. Les services vétérinaires entament une enquête épidémiologique en attendant les résultats de laboratoire.

Dans les exploitations indemnes, un A.M.S.S. entraîne la levée de la qualification en attendant les résultats et aucun transfert n'est autorisé. Dans les piscicultures non qualifiées, le blocage par A.M.S.S. n'est par contre pas obligatoire mais toute dissémination engage la responsabilité civile de l'exploitant.

Si les résultats s'avèrent négatifs, l'A.M.S.S. peut être levé mais il est conseillé de réaliser un nouveau contrôle pour pallier des faux négatifs notamment liés aux conditions de température au moment du prélèvement. Dans le cas contraire, le préfet met en place un arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (A.P.P.D.I.) applicable quelque soit le statut de la pisciculture. (modèles en annexe 4 et 5) Les restrictions de mise sur le marché sont alors différentes suivant le statut de la pisciculture :

1/ dans les piscicultures de qualification indemne, tous les poissons morts ou malades ainsi que les produit d'aquaculture sont détruits ; aucun transfert n'est possible et seul l'engraissement de poissons sans signe clinique est autorisé en vue de la consommation humaine en s'assurant de l'absence de risque de dissémination dans le milieu naturel via les déchets ou lors du transport

2/ dans les autres piscicultures, le transfert de poissons sans signe clinique ou des produits d'aquaculture est autorisé par dérogation du directeur des services vétérinaires vers les exploitations infectées par la même maladie ; les poissons malades sont détruits.



L'A.P.P.D.I. est levé à la fin du vide sanitaire correspondant à une mise en assec d'au moins quinze jours et dont les conditions sont gérées par les services vétérinaires.

Mesures financières accompagnant la lutte contre la S.H.V. et la N.H.I.

(annexe 3)

Ces mesures ont un coût, que se soit pour l'obtention d'une qualification ou pour assainir une exploitation. Les tarifs des analyses appliqués par les laboratoires départementaux en 2001 sont de l'ordre de :

- 330 F la culture cellulaire et 230 F la séro-neutralisation par lot de dix poissons, dans le cadre d'une demande d'agrément,
- 400 F la culture et 260 F la séro-neutralisation dans les autres cas, par exemple lors de suspicion clinique.

Ainsi, le coût des analyses nécessaires à une pisciculture pour être reconnue indemne est estimé à 30 000 F.

L'état participe lors de demande de qualification par une pisciculture. Dans ce cas, il participe pour la moitié au coût des analyses nécessaires à concurrence de 7500 F maximum par an et par pisciculture et prend en charge deux visites sanitaires par an. Les analyses relatives au maintien de la qualification ne sont pas prises en charge.

D'autre part, dans le cadre des mesures de police sanitaire, la visite sanitaire lors d'une suspicion de S.H.V. ou de N.H.I. est financée par l'état, ainsi que les analyses permettant de confirmer la suspicion et la désinfection éventuelle à concurrence de 3000F.

Quant aux indemnités lors de l'élimination de poissons dans le cadre d'un A.P.P.D.I., seules les piscicultures participant au programme de qualification peuvent en bénéficier. L'état rembourse alors l'exploitant de la moitié de la valeur estimée des animaux abattus, avec un maximum de 80 000F, somme de laquelle est déduit le produit de la vente d'animaux transférés quand celle-ci est possible.



La mise en place du programme de qualification reste donc coûteuse pour la pisciculture mais est la condition pour bénéficier d'aides de l'état lors d'épidémie. De plus, les échanges internationaux sont plus aisés si la pisciculture peut justifier d'un statut sanitaire officiel. Les pisciculteurs semblent cependant encore réticents alors que ces mesures présentent des intérêts économiques certains.

La déclaration obligatoire de ces deux MRC est récente : il n'est pas encore possible de mesurer les premiers effets des mesures sanitaires. La découverte d'un foyer s'effectue selon trois modes :

- la découverte de signes cliniques ou de mortalité élevée par le vétérinaire sanitaire exerçant dans la pisciculture
- des résultats sérologiques positifs lors d'une enquête épidémiologique dans le cadre d'un A.P.P.D.I.
- les analyses effectuées lors de la mise en place d'une qualification

C'est ce dernier point qui peut expliquer la réticence des pisciculteurs. Ils peuvent en effet être amenés à détruire leur cheptel en cas d'infection chronique, puisque c'est la séro-neutralisation après culture cellulaire qui est utilisée comme test et qu'elle détecte les porteurs latents, alors que la mise en place de la qualification n'est pas obligatoire.

Ces deux rhabdoviroses sont donc de véritables fléaux économiques et l'intérêt de la recherche d'un vaccin prend ici toute sa signification.



## II ELEMENTS DE VIROLOGIE ET DE PATHOLOGIE

Le traitement des maladies virales est illusoire. La vaccination est donc la seule issue face à ces fléaux. Tout comme la connaissance de l'épidémiologie est indispensable à la mise en place d'une prophylaxie sanitaire, une connaissance précise des virus et de la pathologie qu'ils occasionnent est préalable à la recherche d'un vaccin.

### I 1/ Structure et vie des virus de la N.H.I. et de la S.H.V.

Les virus de la N.H.I. et de la S.H.V. appartiennent à la famille des *Rhabdoviridae*, genre *Novirhabdovirus*, déterminée par la présence de protéines non virales inexistantes chez les autres virus de la famille que sont les *Lyssavirus* (exemple du virus de la rage) et les *Vesiculovirus* (exemple du virus de la stomatite vésiculeuse).

De morphologie en obus, le virion de la N.H.I. mesure environ 70 nm de large sur 110 nm de long, celui de la S.H.V. 70 nm sur 180 nm. (2) Ce sont des virus enveloppés à A.R.N. monocaténaire négatif, linéaire, de 11 kb pour la N.H.I., 12 kb pour la S.H.V. La nucléocapside serait d'environ 18 nm de diamètre (15) et présente une morphologie hélicoïdale. Ces deux virus sont relativement fragiles : ils ne sont stables que quelques semaines dans l'eau à 6-8 °C, maintenue à l'obscurité. (14)

Le génome du virus de la N.H.I., codant pour six protéines, se décompose de la manière suivante :





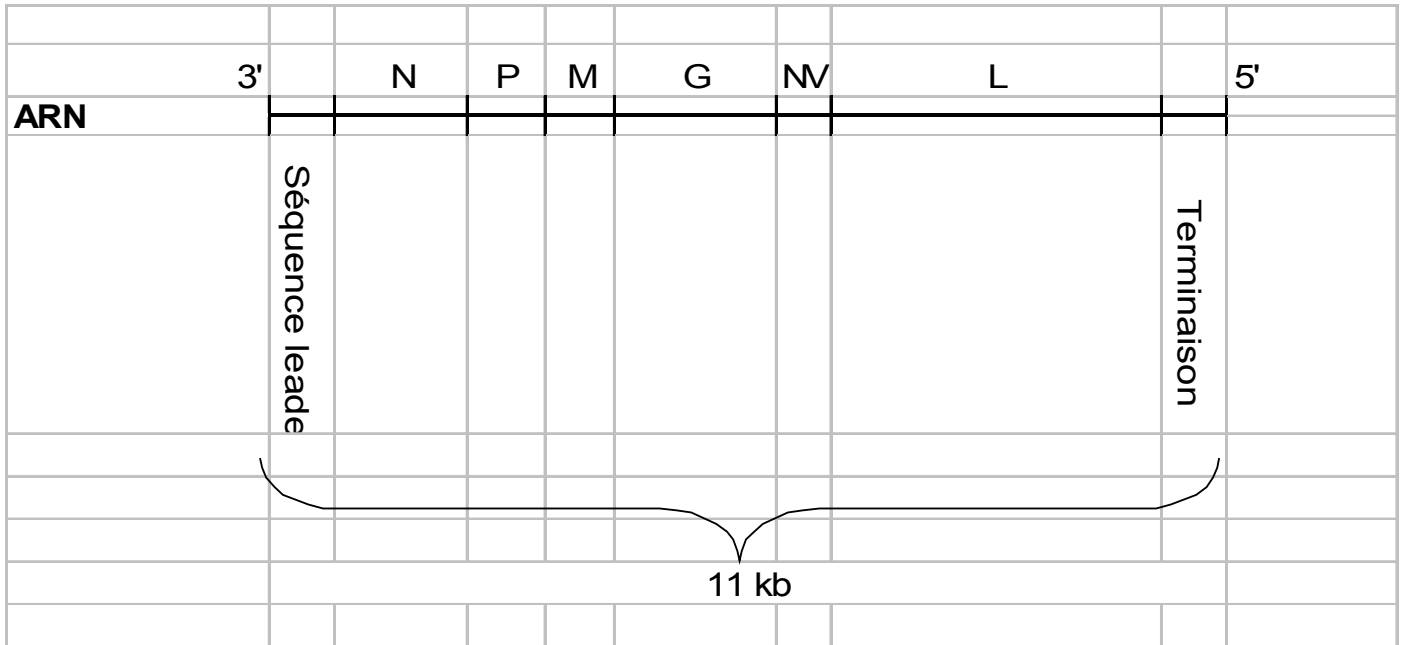


Schéma 4 : **Décomposition schématique du génome de V.N.H.I.**

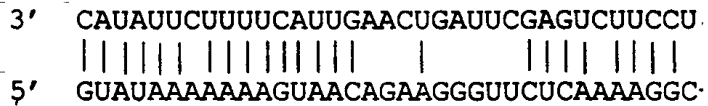
Avec :

- N = gène codant pour la nucléoprotéine
- P ou M1 = gène codant pour la phosphoprotéine
- M ou M2 = gène codant pour la protéine de matrice
- G = gène codant pour la glycoprotéine
- NV = gène codant pour la protéine non virale
- L = gène codant pour la polymérase

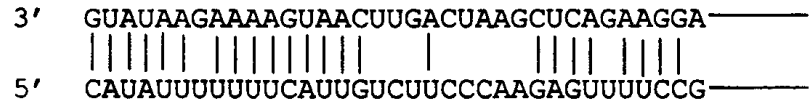
La séquence leader est complémentaire de la terminaison et ces deux structures interviennent dans l'initiation de la synthèse de l'A.R.N.



Negative-sense genome



Positive-sense antigenome

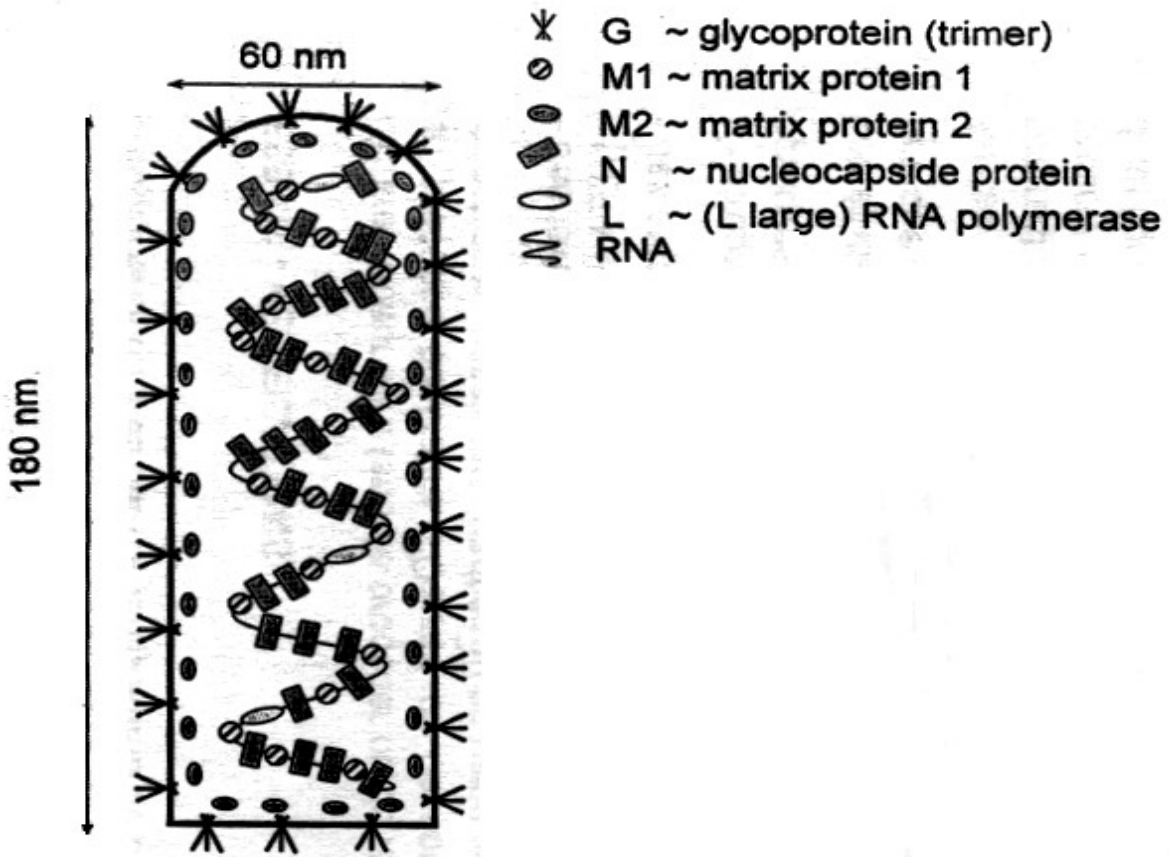


Complementarity of the 3' and 5' ends of the IHNV genome. Sequences are shown in viral RNA negative-sense and antigenomic positive-sense orientations. The complementary regions are shown by the vertical lines between the complementary bases. (Modified from Morzunov *et al.*, 1995.)

Document 3 : **Complémentarité des extrémités 5' et 3' du génome de V.N.H.I. (2)**

Les protéines sont produites dans le sens 3' vers 5' : c'est donc N qui apparaît la première dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Au sein du virus, la répartition de ces protéines semblerait être celle indiquée dans le document 4.



Document 4 : **Répartition schématique des protéines des Rhabdovirus (19)**



L'adsorption du virus à la cellule-hôte s'effectue par l'intermédiaire des spicules que présente la glycoprotéine à la surface de l'enveloppe. La transcription est ensuite initiée par L, l'A.R.N. polymérase A.R.N. dépendante caractéristique des virus à A.R.N. Cette transcription aboutit à la formation :

- 1/ des A.R.N. viraux négatifs produits en série
- 2/ des A.R.N. messagers pour la traduction.

Les modalités de réplication restent inconnues. Quant à la traduction, elle utilise les ribosomes de la cellule- hôte.

Le schéma 7 résume l'activité virale dans une cellule infectée.



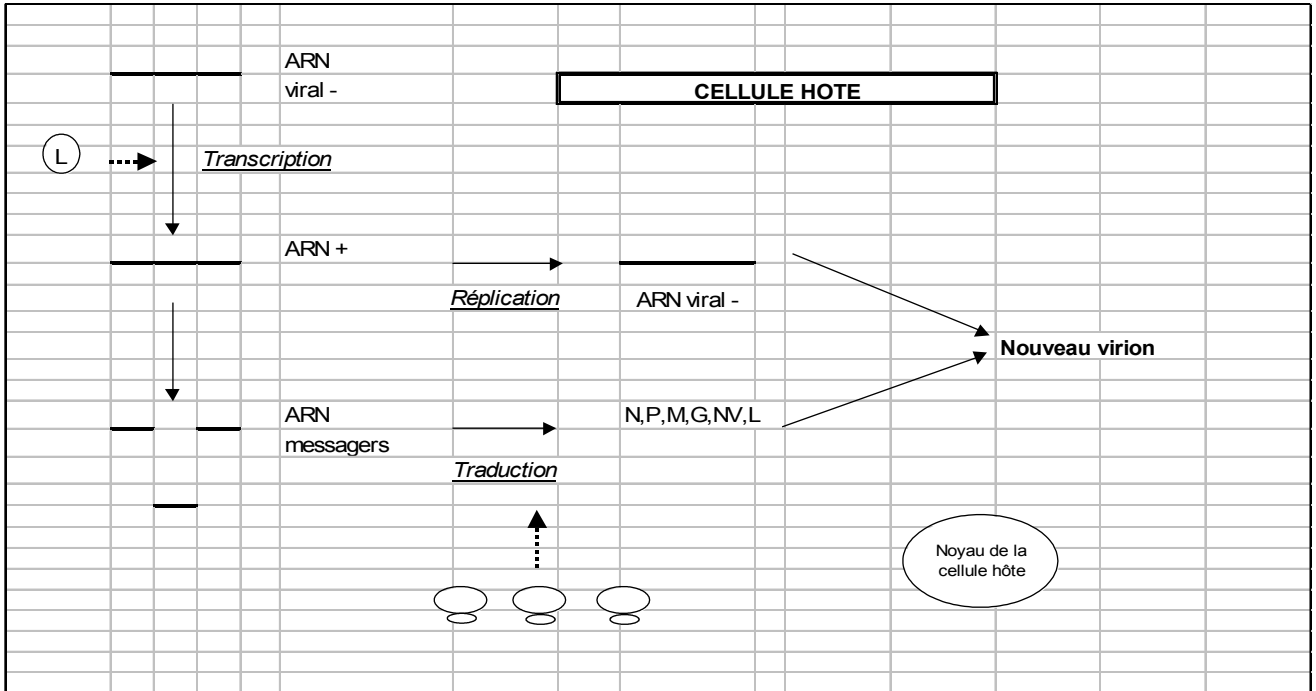


Schéma 5 : **Multiplication des *Rhabdovirus* dans la cellule-hôte.**

Dans le cas de la N.H.I., un A.R.N. messenger code pour plusieurs peptides initiés à différents codons, ce qui ne semble pas être le cas pour le virus de la S.H.V.



## II 2/ Protéines associées aux *Novivirus*

### ✓ *La glycoprotéine des Novivirus* (Coll , 1995)

Les protéines sont les éléments constitutifs qui caractérisent les virus. Leur connaissance s'avère donc une priorité dans l'étude des viroses qui nous intéressent, mais elle reste encore limitée.

Commune aux *Rhabdoviridae*, la glycoprotéine G des virus de la N.H.I. et de la S.H.V. est associée à l'enveloppe où elle forme des spicules, association non covalente de trois monomères de G et d'environ 83 Å espacés de 5 nm.

Son grand intérêt nous incite à lui consacrer une partie différente de celle des autres protéines. En effet, c'est la seule protéine exposée à la surface et elle est reconnue comme la protéine la plus immunogène de ces deux virus, bien qu'elle s'y trouve en faible quantité en comparaison de celle des *Rhabdoviridae* des mammifères.

Chaque monomère G est composé de 508 acides aminés, son poids moléculaire est de 67-70 kDa pour V.N.H.I., 72-80 kDa pour V.S.H.V., donc sensiblement le même que celui de G du virus de la rage qui est de 80 kDa.

Sa structure linéaire est relativement bien connue et peut se résumer comme suit :

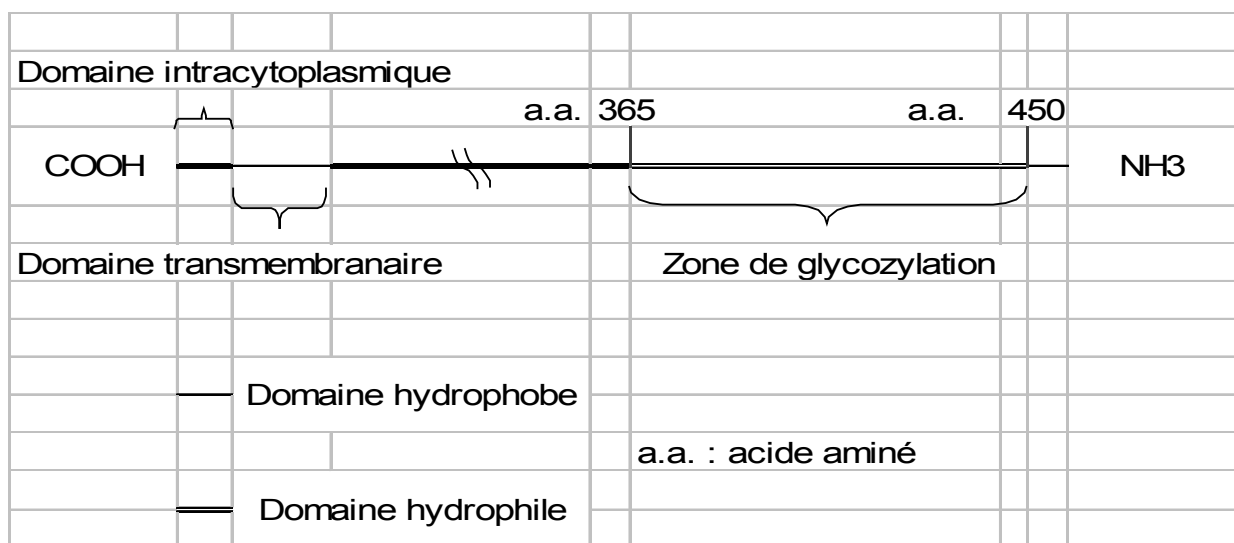
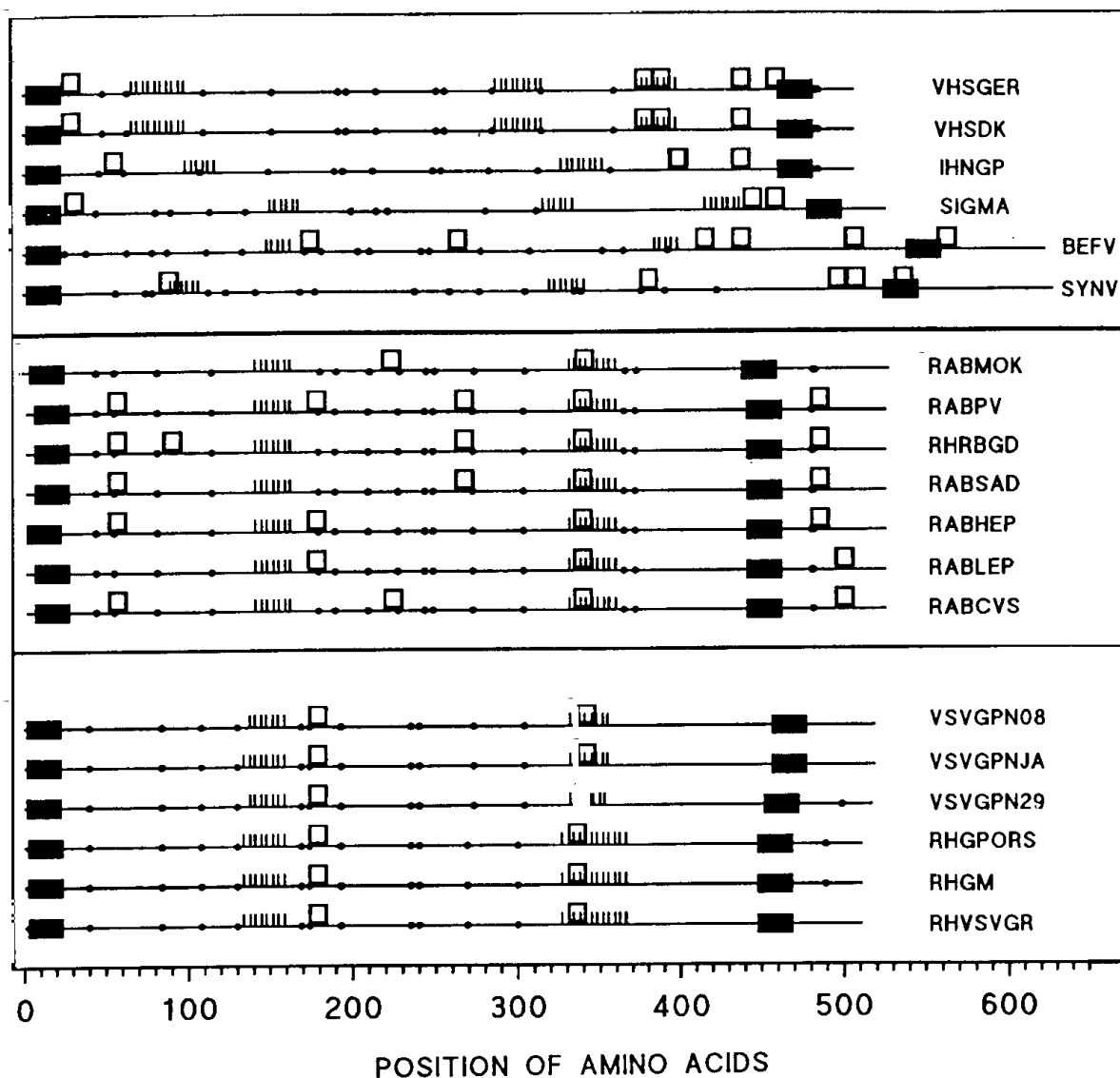


Schéma 6 : **Décomposition d'un monomère de G**





Positions of structural elements of the G of rhabdoviruses.  
 ● Cysteins; □ putative glycosylation aa consensus sequences (in aa single letter code, NXS, T); ■ predicted transmembrane and signal peptides. |||||, newly defined a-d hydrophobic heptad-repeats

Document 4 : **Position des différents acides aminés de G** (Coll, 1995)



Trois rôles lui sont conférés

- 1/ elle assure la reconnaissance avec les récepteurs de la cellule hôte
- 2/ elle intervient largement dans la fusion du virion avec la membrane cellulaire
- 3/ elle permet la reconnaissance du virion par les anticorps monoclonaux.

L'A.R.N. messenger correspondant à G permet la production d'un précurseur de G, de 63 kDa, non glycosylé. En effet, G est constituée pour 10% d'hydrates de carbone qui assurent la conformation définitive à la molécule. La glycosylation est alors assurée par les enzymes de la cellule hôte. Cette étape semble déterminante pour l'activité du virus puisque des traitements bloquant cette étape inhibent l'activité virale. De plus, il est remarquable que la zone glycosylée corresponde au domaine extra-cytoplasmique. Sachant que la formation d'épitopes est soumise à la structure tertiaire de la protéine, le rôle de G dans l'immunité induite par le virus apparaît nettement. Chaque monomère est ensuite mis en forme en présence de deux molécules chaperonnes et d'enzymes prévenant l'agrégation. Lorsque chaque monomère est correctement conformé, l'assemblage en trimère pour former les spicules est alors possible en présence d'énergie fournie là encore par la cellule - hôte.

#### ✓ **Les autres protéines associées aux Novivirus (2, 26)**

La première protéine virale à être produite est N, ou nucléoprotéine, de 40.5-44 kDa pour V.N.H.I., 38-41 kDa pour V.S.H.V. C'est également celle qui est produite en plus grande quantité. En effet, elle représenterait 25% des protéines totales du virus de la S.H.V. contre 10% pour G. Elle est associée au génome viral.



C'est ensuite une protéine phosphorylée, ou M1, qui est produite, avec un PM de 25.6 kDa pour V.N.H.I. et 21.5-25 kDa pour V.S.H.V. Celle-ci est composée de 230 acides aminés pour V.N.H.I. et il est à signaler que non seulement cette protéine est hautement conservée entre les différents souches de N.H.I. mais également que l'on observe 38% de similitude entre celle de V.N.H.I. et celle de V.S.H.V.

M2 est une protéine de matrice de 195 acides aminés pour V.N.H.I. pour un PM de 21.8 kDa et 19 kDa pour V.S.H.V. Le taux de similitude entre les M2 des deux virus est de 37%.

Enfin, L est l'A.R.N.-polymérase A.R.N. dépendante caractéristique des virus à A.R.N. classe II, de 150-225.2 kDa pour V.N.H.I., 157-190 kDa pour V.S.H.V. Elle intervient dans l'A.R.N. polymérisation mais aussi la cap-méthylation et la poly-A polymérisation, opérations préalables à la transcription.

Outre les cinq protéines virales (comprenant G), il existe chez les *Novivirus* une protéine non virale d'environ 12kDa, hautement conservée entre les différentes souches, et dont le rôle reste inconnu à ce jour.





### Proteins of rhabdoviruses

Protein	M.W. (KDa)	Estimated number of molecules/virion			
		VSV	Rabies	IHNV	VHSV
L	≈ 200	50	72	43	14
G	57	1205	1335	166	107
N	50	1258	1325	766	892
M1 (NS)	33	466	691	270	464
M2 (M)	23	1826	1148	1192	956

*VSV* Vesicular stomatitis virus ; Rabies ; *IHNV* infectious haematopoietic necrosis virus ; *VHSV* viral haemorrhagic septicaemia virus . *IHNV* and *VHSV* have a sixth protein not present in the virions of about 12 KDa (NV)

#### Document 6 : Quantités comparatives des protéines virales des différents

#### Rhabdovirus (6)

### II 3/ Symptômes et pathogénie de ces deux rhabdoviroses chez les salmonidés

Après avoir décrit les virus responsables des deux maladies étudiées, ainsi que leur activité au niveau cellulaire, voyons son expression au niveau de l'organisme infecté.

Ces deux maladies se rencontrent chez de jeunes poissons, en eau froide. L'infection peut se rencontrer dans des eaux de 3 à 18°C pour la N.H.I. et de 2 à 12°C pour la S.H.V. avec un optimum entre 10 et 12°C pour la première, 9 à 12°C pour la deuxième. Ce sont donc des maladies printanières et automnales, exceptionnelles au-delà de 15°C. La mortalité atteint 90% et plus chez des poissons de moins de deux mois pour la N.H.I., 80% et plus pour la S.H.V. puis diminue considérablement jusqu'à atteindre moins de 50% pour des adultes. L'âge, en degrés-jour, des poissons, tout comme la température de l'eau sont donc deux des facteurs les plus importants dans l'apparition de la maladie. Ainsi, pour la N.H.I., la sensibilité est maximale jusqu'à un poids de 8g.



Elles se définissent comme deux infections généralisées nécrotico-hémorragiques. Dans les deux cas, les poissons sont léthargiques, présentent une coloration brune inhabituelle, une exophtalmie fréquente.

Des symptômes nerveux sont rencontrés avec du « tourner en rond » et des phases d'hyperactivité pour la N.H.I., une nage en surface pouvant être hélicoïdale pour la S.H.V.

Des hémorragies ponctiformes et nombreuses sont présentes, entraînant la formation de pétéchies. Ces dernières sont surtout visibles à la base des nageoires pour la N.H.I., autour des yeux pour la S.H.V. mais également sur les organes internes notamment le foie, le rein, la rate pour la N.H.I. et les muscles squelettiques pour la S.H.V.

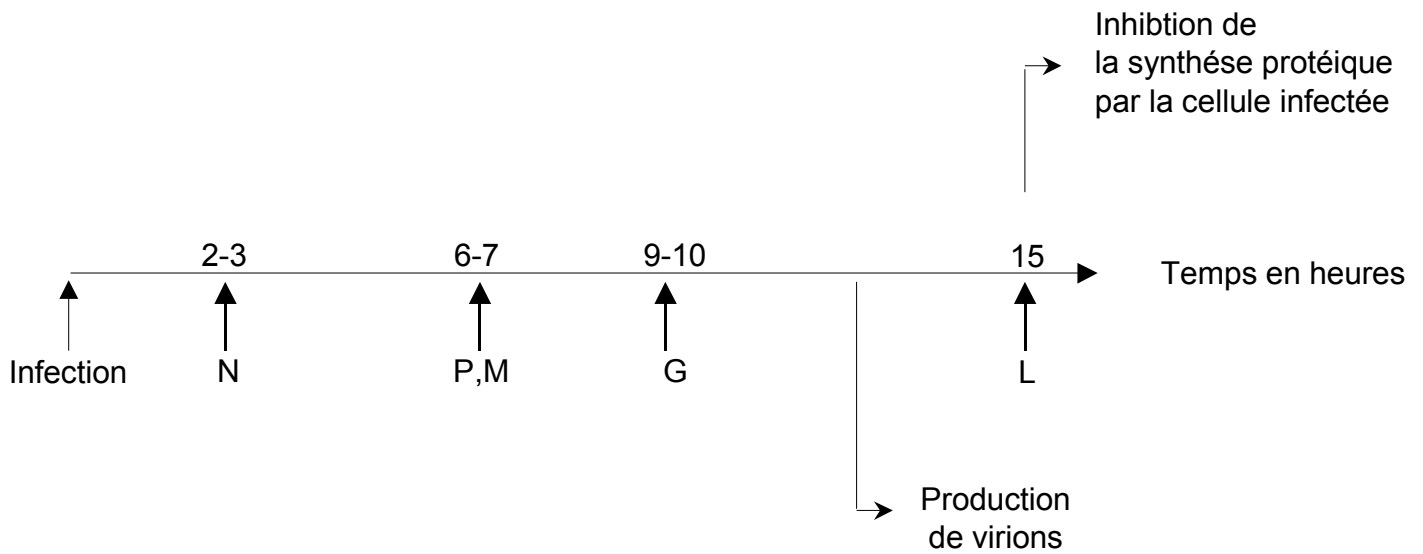
L'anémie qui est systématique décolore les ouïes et les organes internes.

Enfin, une nécrose marquée atteint systématiquement le rein dont la zone de tissu hématopoïétique en priorité puis les glomérules et tubules. Un leucotropisme marqué induit une neutropénie, et plus spécifiquement la lyse des mélanomacrophages avec V.S.H.V. et la dégénération des cellules granulomateuses du tube digestif pour V.N.H.I.

Deux formes sont habituellement décrites, l'une aiguë rencontrée chez les jeunes et l'autre d'aspect plus chronique et dont les symptômes sont plus frustes, chez les poissons plus âgés. D'autre part, un portage latent semble intervenir pouvant évoluer en forme clinique à la faveur d'un stress.

La pathogénie consiste en l'abolition totale de la synthèse protéique par la cellule infectée, intervenant environs quinze heures après le début de l'infection alors que de nouveaux virions apparaissent dès la douzième ou treizième heure post-infection comme le précise le schéma 7.





→ Présence de la protéine précisée dans le cytoplasme

Schéma 7 : **Chronologie de la pathogénie de S.H.V. et de N.H.I.**

La sensibilité de la cellule hôte dépend essentiellement de la présence d'un récepteur pour G sur sa membrane et du concours de plusieurs éléments intracellulaires assurant une possible réplication du virion. Ce dernier pénètre dans la cellule par endocytose, phénomène énergie-dépendant. Il est à signaler que l'existence d'un récepteur commun à tous les rhabdovirus a été suggérée. (Coll, 6)

### **III LES PREMIERS PAS DE LA PROPHYLAXIE MEDICALE**



Comme cela a été développé, la prophylaxie sanitaire ne permet pas d'enrayer les épidémies de N.H.I. et de S.H.V. rapidement et définitivement, d'autant plus que l'épidémiologie n'est pas complètement élucidée à ce jour. De plus, son coût est lourd. La découverte d'un vaccin utilisable sans risque et à grande échelle dans les piscicultures serait donc la bienvenue.

Avec la vaccination, on cherche à stimuler la réponse immunitaire spécifique mais il est nécessaire de garder à l'esprit que chez les poissons, la première réponse est non spécifique.

### **III 1/ Vaccins classiques** (Coll, 6 et Lorenzen et al, 19)

La présence d'anticorps neutralisants spécifiques dans le sérum de truites rescapées d'une infection naturelle par le V.N.H.I. ou le V.S.H.V. a suscité les premières recherches sur des vaccins.

#### **✓ Vaccins inactivés**

Des tentatives de vaccination à l'aide de vaccins tués ont été réalisées. Les résultats obtenus sont intéressants du point de vue de la protection mais de nombreux problèmes inhérents à ce type de vaccination existent pour une utilisation à grande échelle dans les piscicultures.

Les résultats suivants ont été obtenus pour la N.H.I., à l'aide de virus inactivés par la  $\beta$ -propiolactone. (Amend, 1976) La vaccination est réalisée par injection de 0.05 mL de vaccin à la concentration de  $10^{7.3}$  TCID 50/mL à de jeunes truites. L'infection est transmise par injection sous-cutanée et l'eau du bassin est maintenue à 10°C.



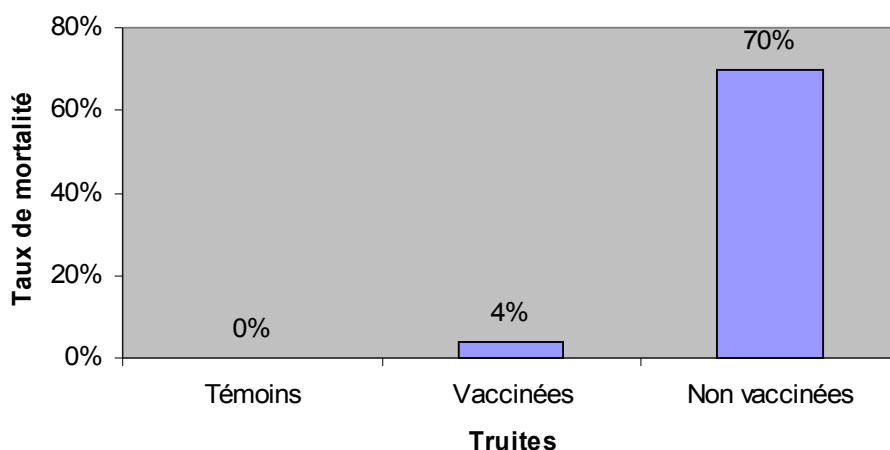


Diagramme 1 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées par V.N.H.I. tué.**

Des résultats semblables ont été obtenus pour la S.H.V.

Le RPS est de 94.3 donc la protection obtenue est très intéressante et l'immunogénicité est bonne lors de leur administration par injection. Cependant, ce moyen est lourd et ne correspond pas à une utilisation aisée à grande échelle.

De plus, leur non-multiplication dans l'organisme et l'emploi des adjuvants souvent nécessaire participent à leur coût élevé. En effet, les anticorps neutralisants ne persisteraient que jusqu'à trois mois, ce qui est insuffisant pour couvrir la vie économique du poisson, ceci d'autant plus si le poisson est destiné au repeuplement ou à la reproduction.

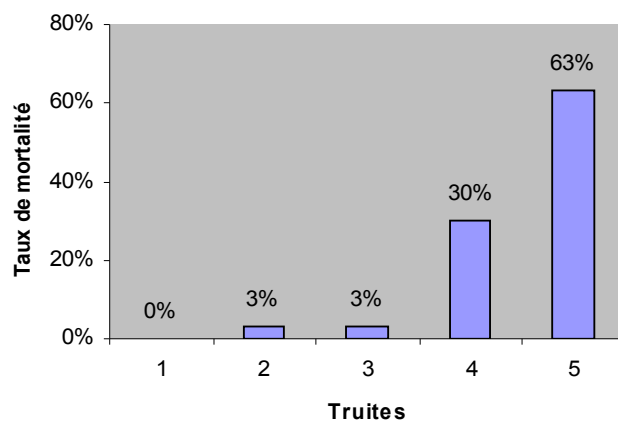
Cependant, la modalité de production de ces vaccins reste simple, ce qui, ajouté à leur innocuité, en fait des vaccins potentiellement utilisables sous réserve de réduire les coûts de production et de trouver un moyen d'injection automatique.



✓ Vaccins atténués

Les vaccins atténués utilisent des souches virales dont la pathogénicité est limitée au maximum mais dont l'avantage par rapport aux vaccins morts est notamment leur multiplication après administration.

Des essais à l'aide de mutants sélectionnés par développement en présence d'anticorps monoclonaux neutralisants ont également donné de bons résultats avec une administration par bains à des truitelles de 0,9 g.



1 : Témoin

2 : Vaccinées avec  $10^5$  TCID 50/mL

3 : Vaccinées avec  $10^4$  TCID 50/mL

4 : Vaccinées avec  $10^3$  TCID 50/mL

5 : Non vaccinées

Diagramme 2 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées par V.N.H.I. atténué.**



Des essais de même ordre ont été réalisés pour la S.H.V. avec de bons résultats par balnéation. Cependant, les résultats semblent moins intéressants dans les conditions naturelles.

Ce type de vaccination serait plus abordable que la précédente du fait de l'utilisation possible des bains comme voie d'administration. De plus, la multiplication du virus atténué dans l'organisme réduit le nombre de rappels et donc le coût d'une campagne de vaccination.

La pathogénicité résiduelle a malgré tout été évaluée à une mortalité de 3% dans l'expérience citée, ce qui est donc non négligeable compte tenu de plus du risque de réversibilité des mutations. Ainsi, ces vaccins sont interdits en France dans la mesure où d'une part, la pisciculture n'est pas un milieu fermé et d'autre part qu'une partie des élevages est utilisée pour le repeuplement des rivières, donc que le risque pour les populations sauvages est grand. Cependant, leur utilisation dans les zones les plus touchées serait peut-être une alternative aux pertes considérables, à condition de mentionner la vaccination sur les certificats vétérinaires et d'adapter la réglementation.

### **III 2/ Vers des vaccins de nouvelle génération**

Les différents problèmes rencontrés avec les vaccins de type précédent nous amènent à recourir aux vaccins de nouvelle génération. Les efforts de recherche ont tout d'abord porté sur la glycoprotéine G des *Rhabdoviridae* étudiés. En effet cette molécule est rapidement apparue comme la protéine la plus immunogène. C'est la réponse humorale à des épitopes de G qui a dirigé les premières recherches. Son exposition à la surface du virus et sa structure tertiaire ont déjà été signalées comme des éléments importants dans son immunogénicité.



### ✓ **Rôle protecteur de peptides synthétiques**

La première étape a consisté à étudier la réponse à des peptides censés renfermer un épitope de G.

Ainsi des peptides synthétiques, représentant des sites antigéniques de G de V.N.H.I. ont été produits par des plasmides dans *Escherichia coli*. (Xu, 1991) Ce sont des alevins qui ont été immunisés par l'injection de ces peptides. Dans ce cas, seule une partie de G est utilisée, correspondant à un épitope. De manière plus générale et en l'absence de données plus précises sur la localisation des épitopes, il est possible d'utiliser une reproduction plus large de la protéine. La meilleure protection a été observée avec le peptide produit par p XL3 correspondant aux acides aminés 270 à 336.

La stimulation de la réponse immunitaire de truites contre la S.H.V. par des protéines recombinantes de séquences de G et de N dans *Escherichia coli*, *Yersinia ruckeri* et *Saccharomyces cerevisiae* a ainsi été testée. (Coll et al, 1994)

Les codes sont les suivants :

- N1 et G1 : protéines purifiées provenant du virus
- N2 et G7 : extraits de protéines recombinantes produites par *E. coli*
- G25, G27 et G34 : extraits de protéines recombinantes produites dans *Y. ruckeri*
- G3, G4 et N3 : extraits de protéines recombinantes produites dans *S. cerevisiae*





Les réactions avec des anticorps monoclonaux (AcM) ont donné les résultats suivants :

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
<b>2 D 5</b>	+	+	+
<b>2 C 9</b>	+	+	+
<b>3 E 7</b>	+	-	+

	<b>G1</b>	<b>G25</b>	<b>G34</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
<b>1 H 10</b>	+	+	+	-	+
<b>1 F 10</b>	+	-	+	+	+

1 H 10 étant neutralisant à l'inverse de 1 F 10.

Aucun AcM ne réagit avec G7, ce qui, ajouté à l'absence de réaction de N2 avec un des AcM anti-N, laisse supposer que l'absence de protéine de fusion chez *Escherichia coli* entraîne un défaut de conformation indispensable à la formation d'un épitope.

Les différentes protéines recombinantes ont ensuite été testées suivant plusieurs expériences. Dans un premier temps, elles ont été utilisées en tant que vaccins par balnéation. Les résultats sont les suivants :



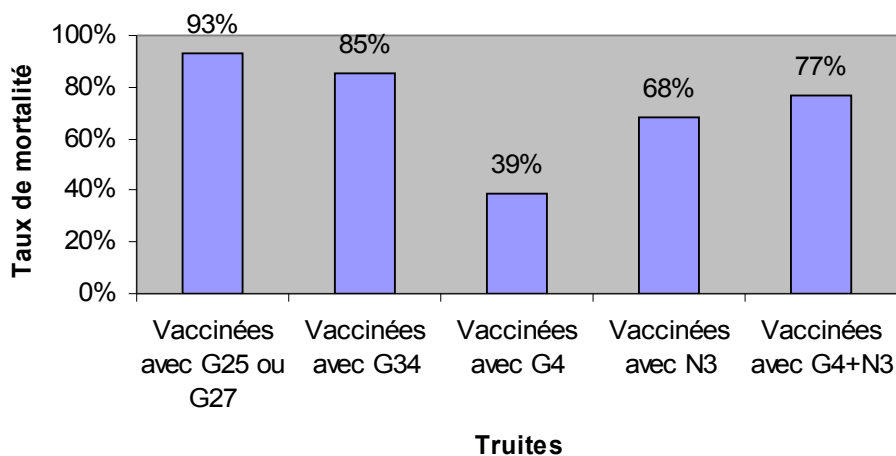


Diagramme 3 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées par des protéines recombinantes contre la S.H.V.**

Il apparaît ici que les résultats sont également décevants pour les protéines produites par *Yersinia ruckeri*, bien que celle-ci soit munie d'une protéine de fusion.

Par contre, N3 et G4 induisent des niveaux de protection équivalents d'après les auteurs à ceux obtenus par le virus atténué et ce par balnéation. Ces deux protéines recombinantes sont de bonnes candidates pour l'obtention d'un vaccin.

L'absence d'immunogénicité des protéines produites par *Escherichia coli* est regrettable en terme de rentabilité. En effet, alors que la production de protéines recombinantes représente 30% de la production totale de protéines pour *Escherichia coli*, elle n'en représente que 1% pour *Saccharomyces cerevisiae*. (Leong et al, 1994)

#### ✓ **Détermination des épitopes neutralisants de G**

Il est donc rapidement apparu nécessaire de connaître les épitopes neutralisants de G de manière plus précise afin de cibler la production de peptides immunogènes.



### Travaux portant sur le virus de la N.H.I.

L'utilisation de mutants sélectionnés par l'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de déterminer la présence de deux sites antigéniques sur G. (Huang et al, 1996) Le premier, site Ag I, constitué des acides aminés 230 et 231 serait conformation-dépendant et hautement conservé dans les différentes souches. Le deuxième, site Ag II, de rôle apparemment majeur dans la neutralisation, est constitué de deux portions : les acides aminés 272, 273, 275 et 276 d'une part, 78 et 81 d'autre part formant une boucle dans la structure tertiaire. Cet épitope discontinu serait de plus constitué d'au moins une portion linéaire donc très intéressante pour la vaccination car non conformation-dépendante. Cependant, ce dernier épitope semble moins conservé entre les différentes souches.

### Travaux portant sur la S.H.V.

Des résultats moins précis permettent de localiser deux sites antigéniques sur G de V.S.H.V. (Fernandez et al, 1998) Le premier épitope est situé entre les acides aminés 98 et 114, le deuxième entre les acides aminés 300 et 400 et tous deux sont linéaires. La réponse immunitaire à ces deux séquences semble consister pour une part en une stimulation de la production des leucocytes.

Des expériences similaires aux précédentes seraient à réaliser à la lumière de ces connaissances plus précises des épitopes.



### **III 3/ Premiers essais de vaccins recombinants**

La vaccination par la technologie de l'A.D.N. tient de l'obtention d'une réponse immunitaire à des sites antigéniques de la protéine immunogène mais l'épitope est produit directement dans l'organisme à protéger. C'est donc le gène qui est introduit, seul ou à l'aide d'un vecteur. Elle s'inscrit dans le prolongement de la vaccination via des peptides synthétiques.

#### ***✓ utilisation d'un vecteur***

G de V.S.H.V. a été cloné dans un baculovirus développé sur cellule d'insecte. (Lecoq et al, 1994) La protéine recombinante obtenue, Gr est reconnue par les anticorps monoclonaux L7 et C10, ce dernier étant neutralisant, donc l'immunogénicité de la protéine recombinante semble similaire à celle de G. Des cellules ont ensuite été infectées par le baculovirus recombinant (non recombinant pour les contrôles.). Ces dernières constituent la substance vaccinale.

La réponse en anticorps neutralisants de truites différemment vaccinées est détaillée ci-après :



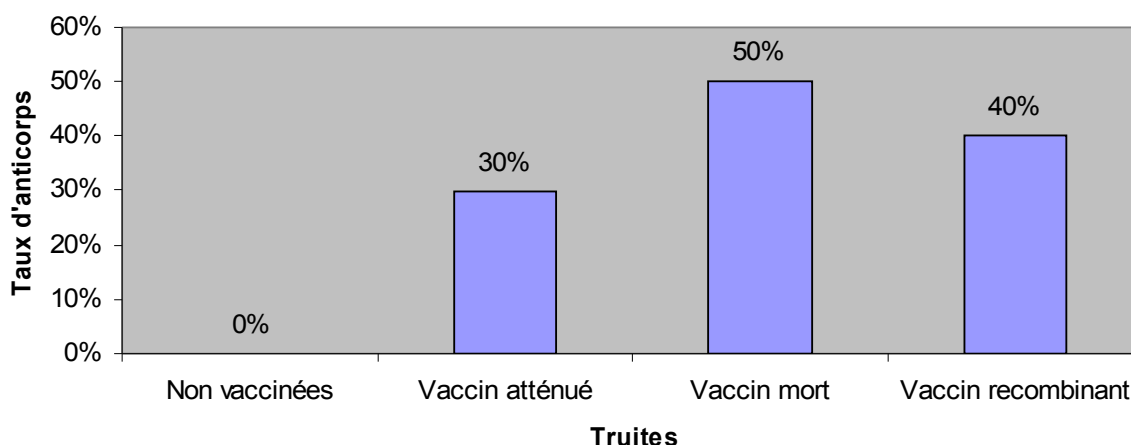


Diagramme 4 : **Réponse en anticorps neutralisants après injection d'un vaccin recombinant contre la S.H.V.**

La vaccination de truitelles de 2 à 3 g, élevées à une température de 10-11°C a donné de plus les résultats suivants :

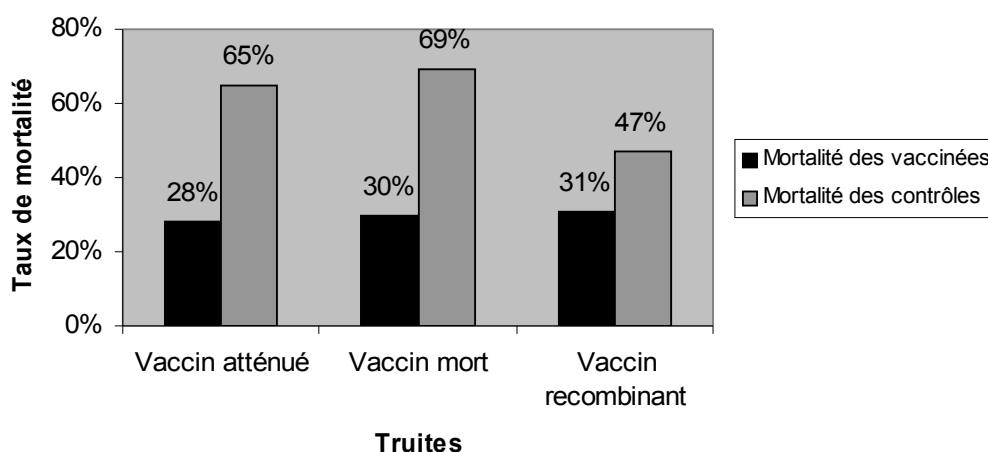


Diagramme 5 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées avec un vaccin recombinant contre la S.H.V.**



Le vaccin atténué a été administré par bain, les vaccins mort et recombinant par injection intra-péritonéale. La vaccination par technologie de l'A.D.N. a consisté en l'administration de  $10^5$  cellules infectées par le baculovirus recombinant.

Dans les trois cas, la différence entre les vaccinées et les non vaccinées est significative mais le vaccin recombinant reste d'efficacité inférieure avec un R.P.S. de 33,9 contre 57,6 pour le vaccin atténué.

De plus, les Gr obtenues sont de PM différent or ce dernier est corrélé au degré de glycosylation donc à la conformation de la protéine. Cependant, toutes sont correctement repliées pour former un épitope neutralisant . Il apparaît donc possible d'utiliser le baculovirus recombinant comme vaccin, la réponse immunitaire semblant préférentiellement d'origine humorale. En terme de rentabilité, le baculovirus est intéressant dans la mesure où la production de protéines recombinantes représente 10% de la production totale.

Des essais par immersion ont également été réalisés mais n'ont pas suscité de réponse.

Devant les résultats encourageants des essais de vaccination par vaccin recombinant et les pertes importantes engendrées par ces deux maladies, l'obtention d'une double protection semble intéressante. Ceci paraît d'autant plus envisageable qu'il existerait un épitope commun entre les G du virus de la N.H.I. et celui de la S.H.V.

Des plasmides codant pour des épitopes de G dans une souche avirulente de *Aeromonas salmonicida* ont été produits. (Noonan et al, 1995) Les épitopes ont été amplifiés puis introduits dans *Escherichia coli* afin de produire des plasmides. Ceux-ci ont ensuite été transférés vers la souche avirulente A440 de *Aeromonas salmonicida* par conjugaison.



La vaccination a consisté en l'administration sous forme de spray ou par immersion de *Aeromonas salmonicida* contenant les plasmides, vivantes ou formolées. L'infection a ensuite été obtenue par la cohabitation des lots testés et de poissons infectés. Il a été vérifié que les protéines produites par *Escherichia coli* et exprimant les épitopes sont de poids moléculaire sensiblement équivalent à celui des séquences de nucléotides exprimés. Les résultats obtenus sont les suivants lors d'administration du vaccin par spray :

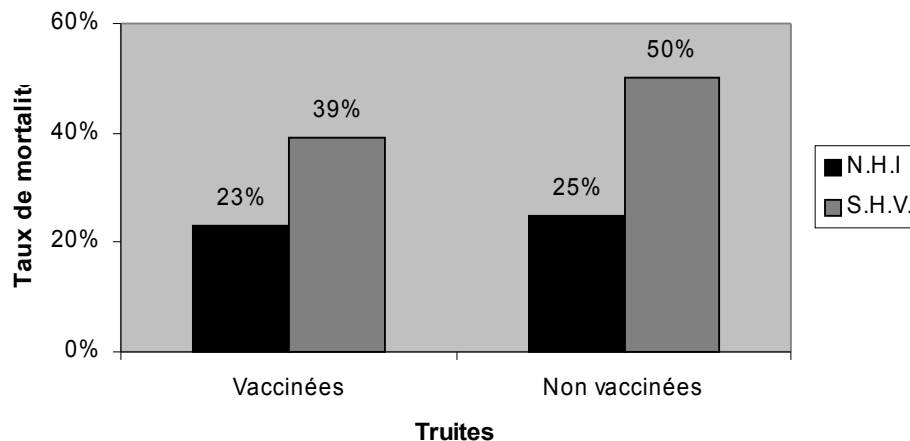


Diagramme 6 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées contre la S.H.V. et la N.H.I. par un double vaccin recombinant.**

Les essais utilisant les souches tuées de *Aeromonas salmonicida* et ceux consistant à administrer le vaccin par immersion n'ont pas donné satisfaction.

Avec une protection dont le RPS est respectivement de 41 et 50 pour la N.H.I. et la S.H.V., les résultats sont plutôt encourageants mais il est difficile de les comparer, dans la mesure où l'infection est propagée de manière différente par rapport aux autres vaccins testés. Par contre, il n'est pas donné de renseignements concernant la nature de l'immunité obtenue.



La portée multiple de ce vaccin est donc très intéressante, d'autant plus que l'administration par spray semble plus accessible que les injections. Les auteurs précisent que l'utilisation de promoteurs permettant de perpétuer la synthèse des épitopes au-delà de 48h apporterait un avantage non négligeable à ce type de vaccin, même si la multiplication de *Aeromonas salmonicida* est suffisante pour obtenir une réponse immunitaire prolongée.

### ✓ **Les vaccins génétiques**

Avec les vaccins précédents, l'épitope est produit par le vecteur qui est introduit dans l'hôte. Ici, l'épitope est injecté directement dans les muscles squelettiques de l'hôte et ce sont ses propres cellules qui l'expriment. Ainsi, le peptide immunogène est délivré en continu. Comme avec les précédents, il n'existe aucun risque de virulence contrairement aux vaccins atténués. Ce type de vaccination a déjà fait ses preuves dans la vaccination contre la rage.

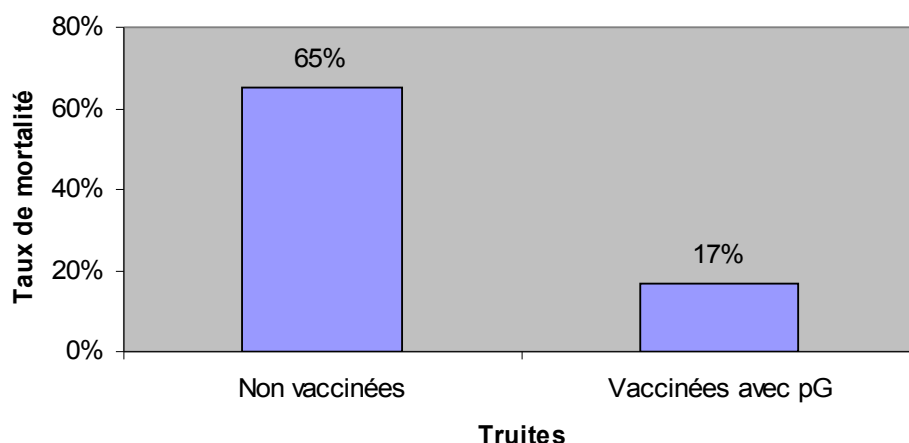
Des myocytes ont été transfectés par le plasmide pCMV4-G codant pour G de V.N.H.I. (Anderson et al, 1996) Il s'en est suivi la production de G dans leur cytoplasme. L'injection de 10 µg de plasmide en intra-musculaire a donc été réalisée chez des truitelles de 1 g afin de tester son efficacité en tant que vaccin contre la N.H.I.

Le titre en anticorps a été significatif à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine post-injection et s'est maintenu au même taux au moins jusqu'à la 14<sup>ème</sup> semaine. Une injection de rappel a été expérimentée mais n'a pas apporté d'élément intéressant. La protection obtenue par rapport à une infection équivalent à 10<sup>8</sup> PFU/2L de virus à la 6<sup>ème</sup> semaine a donné les résultats suivants :





Diagramme 7 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites**



**vaccinées avec un vaccin génétique contre la N.H.I**

Avec un RPS de 75%, ce vaccin contre la N.H.I. présente donc un net intérêt.

Des truites de 13 g ont été vaccinées dans le même esprit par l'injection de plasmides correspondant à G et N de V.S.H.V. Différents lots ont été testés, vaccinés avec p CMV G seul, p CMV N ou une association des deux plasmides. (Lorenzen et al, 1998) L'infection a été transmise par  $9.10^5$  TCID 50/mL d'eau de virus, à une température de 10°C, sept semaines et demi après la vaccination. Les résultats en terme de mortalité sont les suivants :

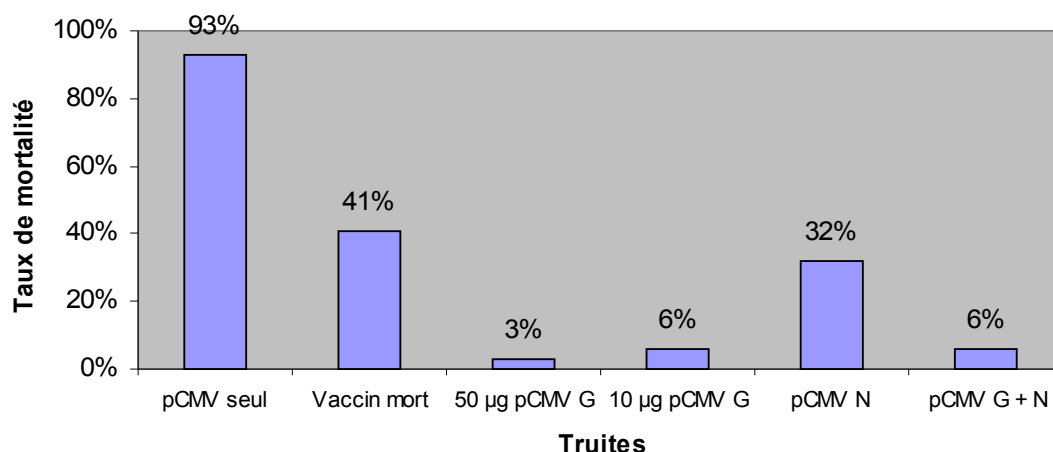


Diagramme 8 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites**

**vaccinées avec un vaccin génétique contre la S.H.V.**

La vaccination avec le plasmide de G est d'un intérêt majeur : le RPS de 97% lors de l'injection de 50 µg de plasmide est le plus important qui ait été obtenu pour la



S.H.V. La différence n'est pas significative avec 10 µg, avec un R.P.S. de 94. La protection obtenue consiste en une activité neutralisante. Cette dernière n'existe pas lors de l'introduction du plasmide de N seul, cependant, la protection obtenue est supérieure à celle du vaccin mort (RPS de 66 contre 56). Ce dernier élément n'a pas été obtenu avec le vaccin contre la N.H.I. Les auteurs y voient deux origines possibles :

- la pathogénie des deux maladies est sensiblement différentes et les données actuelles ne sont pas suffisantes pour répondre
- les truites utilisées dans l'expérience précédente (1 g contre 13 g ici) n'avaient pas atteint une immunocompétence suffisante pour répondre aux épitopes de N qui, vraisemblablement, engendrent une immunité cellulaire.

L'expérience a été renouvelée en associant des plasmides pcDNA codant pour G de V.N.H.I. et de V.S.H.V. ainsi que celle du virus de la rage en tant que contrôle. (Boudinot et al, 1998) Il a été vérifié que les protéines produites in vitro correspondent vis-à-vis de leur poids moléculaire aux séquences codées.

Les plasmides sont injectés en intra-musculaire. Ils ont ensuite été identifiés jusqu'à 28 jours post-injection et les G recombinantes ont pu être identifiées jusqu'à 21 jours post-injection. Ces dernières sont localisées dans le cytoplasme des cellules musculaires périphériques mais également dans les cellules du tissu conjonctif ainsi que dans les cellules endothéliales des éléments vasculaires avoisinants. Ceci est d'un grand intérêt dans la mesure où l'on peut penser que toutes sortes d'immunité peuvent alors rentrer en jeu si peu que la forme circulante de la protéine soit immunogène.



L'injection de 30 µg de plasmide en I.M. à des truites de 150 à 200g, à J0, J23 et J38 induit la production d'anticorps neutralisants détectables dès le 23<sup>ème</sup> jour et atteignant des taux significatifs dès le 38<sup>ème</sup> jour. Ces anticorps ont une spécificité marquée et il n'apparaît pas de réaction croisée même lors de l'injection simultanée des deux plasmides pcDNA S.H.V. et pcDNA N.H.I. L'efficacité est également appréciable vis-à-vis des deux maladies lors de la vaccination combinée avec des taux en anticorps et des cinétiques d'apparition identiques. Il est à noter que l'injection de serum provenant de truites ainsi immunisées à de jeunes truites naïves induit une protection passive efficace à 100% contre les deux maladies. De plus, une activation du CMH II donc l'intervention de l'immunité cellulaire a été mise en évidence.

### **III 4/ Renforcement de la protection obtenue par les épitopes de G**

#### **✓ Apports de N**

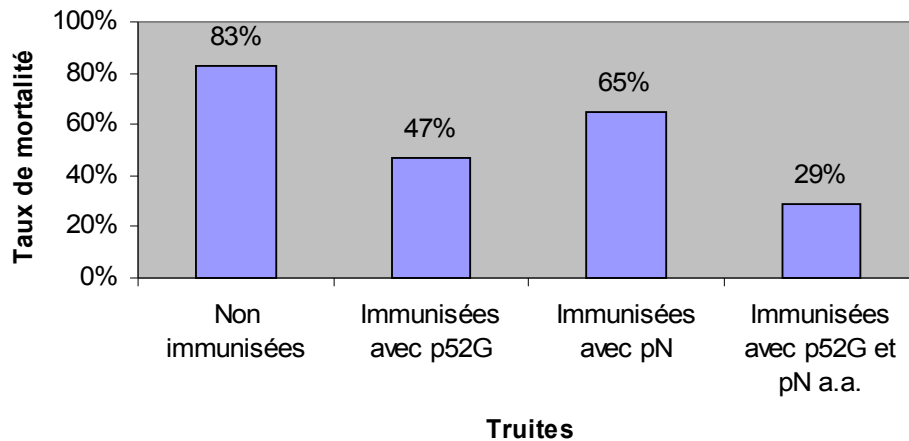
L'immunisation de poissons par le sérum de truites préalablement vaccinées par introduction des épitopes de G a montré que ces derniers ont une activité neutralisante. D'autre part, les connaissances sur le virus de la rage laissent supposer que l'épitope de N induirait une réaction immunitaire consistant soit en une augmentation de la production des lymphocytes Th soit en la production de lymphocytes Tc.

Le rôle de N dans la protection obtenue par d'éventuels vaccins de sous-unité de G de V.N.H.I. a donc été testé. Des essais de vaccination avec le peptide p52, protéine de fusion du fragment correspondant aux acides aminés 336 à 444 de G et de trp E dans *Escherichia coli*, ont été réalisés avec ou sans l'adjonction de la protéine de fusion de N. (Oberg et al, 1991)



Les résultats suivants ont été obtenus lors de vaccination par balnéation à l'aide 3 mg/mL de protéine pour 100 truitelles de 0.4 g, les protéines recombinantes représentant environ 10% de la teneur totale en protéine du lysat utilisé :

Diagramme 9 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites**



**vaccinées avec des sous-unité de G et de N contre la N.H.I.**

On obtient donc une augmentation de la protection de 20 à 25% lorsque l'on associe G et N ( RPS de 64 ) par rapport à G seule ( RPS de 43 ). De plus, il existe une protection croisée par rapport aux autres souches de virus que celle utilisée pour la production des plasmides.

Quelque soit leur mode d'action, des peptides synthétiques de N pourraient donc être utilisés comme adjuvants dans les vaccins contre la N.H.I.



Les mêmes auteurs ont répété la comparaison lorsqu'ils ont étudié les vaccins génétiques dans une expérience déjà citée page 58. En injectant les plasmides codant pour G et N de V.N.H.I. de manière simultanée, la production d'anticorps anti-G a été plus précoce et plus intense que lors de l'injection de plasmide codant pour G seul.

En aucun cas il n'est apparu d'anticorps spécifiques à N cependant, que ce soit lors de l'injection des plasmides codant pour G et N ou pour N seule. De plus, la protection obtenue par l'injection simultanée des deux plasmides n'est pas significativement supérieure à celle obtenue par pG seul :

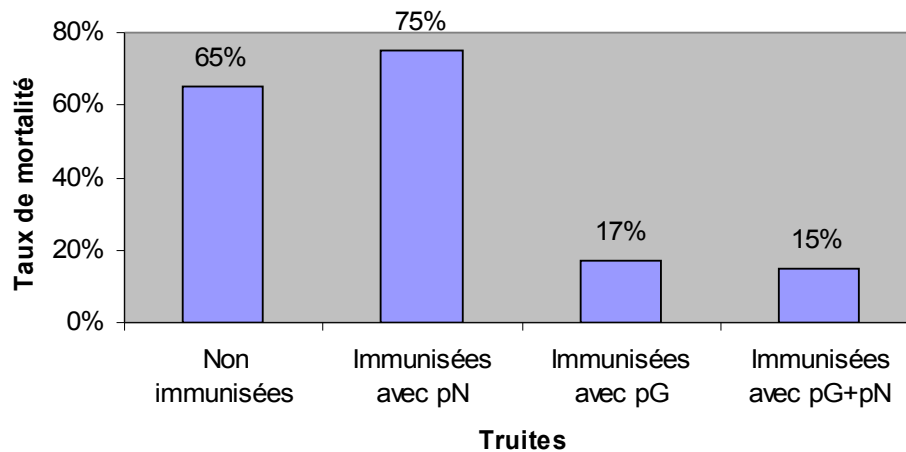


Diagramme 10 : **Taux de mortalité à l'infestation d'épreuve de truites vaccinées par injection de plasmide de G et N contre la N.H.I.**



Cette discordance des effets de N pourrait s'expliquer par la taille et donc l'immunocompétence des truites mais l'expérience précédente contredit cette hypothèse.

La même différence se rencontre avec la S.H.V. Dans la recherche d'un vaccin génétique contre la S.H.V. déjà citée page 59, le RPS n'est pas significativement amélioré par l'ajout du plasmide p CMV N à p CMV G seul (94 contre 97).

L'absence de production d'anticorps anti-N et l'augmentation du taux en anticorps anti-G en présence de pN permet de supposer que son action s'exerce en activant les cellules T, notamment Th pouvant potentialiser l'action des anticorps anti-G comme observé.

Là encore, la nécessité de maîtriser la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez les poissons semble déterminante dans l'évolution des expériences vaccinales.

#### **✓ Découverte d'une protéine de stress dans l'infection de la N.H.I.**

Lors d'infection virale, certaines protéines dites « protéines de stress », produites par les cellules lorsqu'elles sont soumises à une agression extérieure telle que la chaleur (...), le sont en quantité supérieure lorsque la cellule est infectée par un virus. Une telle protéine dans des cellules infectées par le virus de la N.H.I. a été découverte. (Lee et al, 1996) De PM de 90 kDa, celle-ci ne correspond pas aux autres protéines de stress déjà identifiées. De plus, elle se retrouve à la surface du virus lors d'infection et est immunogène. En effet, elle induit la production d'anticorps spécifiques qui se trouvent être neutralisants. L'épitope identifié à l'aide d'un anticorps monoclonal pourrait donc être intégré à de futurs vaccins.



### III 5/ Discussion

La recherche d'un vaccin contre la N.H.I. et la S.H.V. a débuté dans les années 80 et différentes équipes y travaillent depuis en parallèle.

Dans tous les essais, le vaccin testé est évalué par la protection obtenue, en terme de modification de la mortalité. A ce stade des recherches, c'est surtout l'activité neutralisante des anticorps qui est recherchée. Or, la nécessité de se pencher sur la réaction immunitaire à médiation cellulaire a déjà été signalée.

Le système de défense des poissons est aussi capable d'opsonisation, et de lyse cellulaire. Cette dernière est réalisée par les macrophages, l'interféron et les cellules cytotoxiques non spécifiques (C.C.N.) assimilables aux cellules N.K. des mammifères. C'est donc en priorité une réponse non spécifique. Cependant, les macrophages et les C.C.N. présentent à leur surface les récepteurs Fc permettant une coopération cellulaire avec les anticorps. C'est dans ce cadre que la vaccination peut induire une protection supplémentaire. (5)

D'autre part, toutes les protéines recombinantes stimulent la lymphoprolifération chez des truites survivantes mais pas chez des truites naïves. Cette notion a été effleurée dans une expérience précédemment citée page 50. Les auteurs ont en effet vérifié que les protéines recombinantes de G et de N de V.S.H.V. qu'ils avaient produites entraînent une augmentation de la proportion des cellules adhérentes dans la population des leucocytes que sont les macrophages et les mélanomacrophages. La taille des leucocytes stimulés par le virus mort ou les protéines recombinantes produites sur *Saccharomyces cerevisiae* est également augmentée par rapport aux leucocytes normaux. Cette direction est tout à fait intéressante mais soulève le problème des rappels.



En effet, il est reconnu qu'il n'existe pas chez les poissons de réponse secondaire à la suite d'un rappel de vaccination comme chez les mammifères. Seule une augmentation de la synthèse d'anticorps est observée si un rappel est fait en début de réponse primaire. Cependant, les résultats précédents ne sont valables que chez des poissons préalablement immunisés donc un rappel serait nécessaire pour obtenir cet effet non négligeable en terme de protection.

Le succès est donc encore loin. En effet, il faut rajouter à la méconnaissance de la pathogénie des viroses tous les problèmes liés au fonctionnement des poïkilothermes. Lorsqu'un vaccin efficace aura été trouvé, il conviendra de définir précisément les conditions dans lesquelles il devra être utilisé. La température de l'eau devra être adaptée sachant que la réaction immunitaire spécifique en dépend. Ainsi, la cinétique de production des anticorps est plus rapide chez une truite élevée à 16°C que chez une truite élevée à 6°C. (14) La production d'anticorps semble maximale entre 10 et 15°C, élément dont il faudra donc tenir compte pour vacciner en pisciculture. D'autre part, il faudra préciser à quel moment de la vie du poisson la vaccination devra être réalisée. Le rôle de l'âge en degré-jour voire de la taille est très certainement fondamental.

La voie d'administration est un autre point très important dont la preuve est faite dans les différentes expériences. Si l'on élimine les injections intra-péritonéales qui sont les plus sûres mais les moins utilisables en pisciculture, on peut considérer deux portes d'entrée du vaccin. La première est la peau qui permet une vaccination facile par balnéation, la deuxième est la muqueuse digestive intéressante pour une vaccination par voie orale. Lors d'infection, le virus doit traverser le mucus cutané et digestif afin d'atteindre les organes internes. Cette barrière pourrait donc être mise à profit et stimulée pour développer une protection locale. Des poissons immunisés contre *Aeromonas hydrophila* ont en effet développé une réaction immunitaire locale avec présence d'anticorps spécifiques dans le mucus cutané et surtout intestinal après administration orale du vaccin.





La multiplication de V.N.H.I. a bien été décelée suite à l'exposition de truites de 5,4 g au virus par injection ou par balnéation, les deux jours suivants. Puis l'activité virale a disparu quatorze jours après, laissant supposer l'installation d'une immunité. Cependant, aucun anticorps anti-N.H.I. n'a été détecté et l'immunité mise en place est très certainement non spécifique. (Cain et al, 1996) L'intérêt des vaccins administrés par voie orale ou par balnéation ne réside donc a priori que dans leur facilité d'emploi. Le problème des administrations par injection réside à la fois dans la taille des alevins à vacciner et dans le nombre. Une alternative serait la vaccination des femelles génitrices. En effet, l'immunité acquise contre la N.H.I. de mères vaccinées a été transférée aux alevins et la protection a perduré pendant vingt - cinq jours. (Oshima et al, 1996) La vaccination des mères permettrait donc de limiter la manipulation d'animaux de taille insuffisante pour des injections à grande échelle.

A ce jour, aucun vaccin contre la S.H.V. ou la N.H.I. n'a obtenu d'A.M.M. Des différentes voies explorées, celle des vaccins génétiques semble la plus prometteuse. En effet, le R.P.S. obtenu est le plus élevé pour la S.H.V. avec 97 et assez élevé pour la N.H.I. avec 75. Ils sont sûrs, de production industrielle facile même si de nombreux contrôles sont à mettre en œuvre. Leur coût pourrait être bas dans la mesure où une faible dose de substance vaccinale est nécessaire : la protection est dose-dépendante mais constante au-delà de 1 µg de plasmide par truite. (Heppel, 1998) L'expérience précédemment citée page 58 de transfection des myocytes par p CMV4-G mériterait donc de confirmer ses résultats encourageants à des doses moindres. Il reste, si ces vaccins sont validés, à les faire accepter par les consommateurs.



## CONCLUSION

Les deux M.L.R.C. que sont la S.H.V. et la N.H.I. posent des problèmes majeurs en salmoniculture sur le plan économique, via les pertes économiques et les limitations de marché, mais aussi en milieu naturel pour le risque sanitaire. Des mesures réglementaires de prophylaxie sanitaire sont en place depuis 1997 mais n'ont pas encore eu de répercussion sensible. Parallèlement, la recherche d'un vaccin n'a toujours pas abouti à une prophylaxie médicale efficace et commercialisable. La découverte d'un vaccin ouvrirait la voie à l'éradication de ces deux fléaux mais la prophylaxie sanitaire semble être la seule issue à l'heure actuelle. La police sanitaire n'est pas obligatoire dans tous ses aspects et doit être associée à des mesures draconiennes de désinfection des œufs importés dans une pisciculture ainsi que du matériel. Les antiseptiques iodés sont les plus appropriés. Une nouvelle voie commence à être explorée : la sélection de truites résistantes. Des truites arc-en-ciel résistantes à la S.H.V. ont ainsi été obtenues et la mortalité est inférieure à 10% dans les familles obtenues.



## **BIBLIOGRAPHIE**

1/ ANDERSON, E., MOURICH, D., FAHREBKURUG, S., LA PATRA, S., SHEPHERD, J. and LEONG, J.C. - *Genetic immunization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) against infection hematopoietic necrosis virus.* - Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1996, vol. **5** (2), pp 114-122.

2/ BOOTLAND, L.M. and LEONG, J.C. – *Infection hematopoietic necrosis virus.* – IN : WOO P.T.K., BRUNO D.W.- *Fish Diseases and Disorders* - CAB INTERNATIONAL, 1999 – vol. **3** : Viral, Bacterial and Fungal Infections, chap. 2, pp 57- 121.

3/ BOUDINOT, P., BLANCO , M., de KINKELIN, P. and BENMANSOUR, A. – *Combined D.N.A. immunization with the glycoprotein gene of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus induces double-specific protective immunity and nonspecific responses in Rainbow trout.* – Virology, 1998, vol. **249**, pp 297-306.

4/ CAIN, K.D., LA PATRA, S.E., BALDWIN, T.J., SHEWMAKER, B., JONES, J. and RISTOW, S.S. – *Characterization of mucosal immunity in rainbow trout Oncorhynchus mykiss challenged with infectious hematopoietic necrosis virus : identification of antiviral activity.* Diseases of Aquatic Organisms, 1996, vol. **27**, pp 161-172.

5/ CHARLEMAGNE, J. – *Immunologie des poissons.* – IN : PASTORET, GUAERTS et BAZIN – *Immunologie animale.* – Médecine-Sciences Flammarion, 1990- chap. 44, pp 433 – 445.

6/ COLL, J.M. – *Immunization with viral antigens : Infectious Hematopoietic Necrosis.* – Developments in Biological Standardization , 1997, vol. **90**, pp 211 – 220.



7/ FERNANDEZ – ALONSO, M., LORENZO, G., PEREZ, L., BULLIDO, R., ESTEPA, A., LORENZEN, N. and COLL, J.M. – *Mapping of linear antibody epitopes of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus.* – Diseases of aquatic organisms, 1998, November 30, vol. **34**, pp 167-176.

8/ FRANCE : Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie et Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation. – Arrêté du 10 avril 1997 modifié par l'Arrêté du 1<sup>er</sup> mars 2000 : Conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture. – Journal Officiel du 03 juin 1997 et du 21 mars 2000.

9/ FRANCE : Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie et Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation. – Arrêté du 22 septembre 1999 : Mesures de lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons. – Journal Officiel du 16 octobre 1999, n° 241, p. 15506.

10/ FRANCE : Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie et Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation. – Arrêté du 23 septembre 1999 : Mesures financières relatives à la lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons. – Journal OFFICIEL du 16 octobre 1999, n° 241, p. 15508.

11/ FRANCE : Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation. – Note de service du 21 juin 2000 : Mesures de lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons. – D.G.A.L. / S.D.S.P.A. / N2000-8081.

12/ HEPPEL, J., LORENZEN, N., ARMSTRONG, N.K., WU, T., LORENZEN, E., EINER-JENSEN, K., SCHORR, J. and DAVIS, H.L. – *Development of DNA vaccines for fish : vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model.* – Fish and Shellfish Immunology, 1998, vol. **8**, pp 271-286.



13/ HUANG, C., CHIEN, M.S., LANDOLT, M., BATTIS, W. and WINTON, J. – *Mapping the neutralizing epitopes on the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus.* – Journal of General Virology, 1996, vol. **77**, pp 3033 – 3040.

14/ de KINKELIN, P., BERNARD, J. and HATTENBERGER – BAUDUY, A.M. – *Immunisation des poissons contre les viroses sévissant en eau froide.* – IN : Vaccination des poissons. - INRA, 1984 – pp 189-220.

15/ de. KINKELIN, P., MICHEL, CH. et GHITTINO, P. – *Précis de pathologie des poissons.* - INRA-OIE, 1985 – 348 p.

16/ LECOCQ – XHONNEUX, F., THIRY, M., DHEUR, I., ROSSINS, M., VANDERHEISDEN, N., MARTIAL, J., and de KINKELIN, P. – *A recombinant viral hemorrhagic septicemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout.* –Journal of General Virology, 1994, vol. **75**, pp 1579 – 1587.

17/ LEE, J.Y., CHO, W.J., DO, J.W., KIM, H.J., PARK, J.W., PARK, M.A., SOHN, S.G., JEONG, G. and HAH, Y.C. – *Monoclonal antibodies raised against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (I.H.N.V.) G protein and a cellular 90 kDa protein neutralize I.H.N.V. infection in vitro.* – Journal of General Virology, 1996, vol. **77**, pp 1731 – 1737.

18/ LEONG, J.C., ANDERSON, E., BOOTLAND, L.M., CHIOU, P.W., JOHNSON, M., KIM, C., MOURICH, D. and TROBRIDGE, G. – *Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant D.N.A. technologies.* – Developments in Biological Standardization, 1997, vol **90**, pp 267-277.

19/ LORENZEN, N. and OLESEL, N.J. – *Immunisation with viral antigens : Viral Haemorrhagic Septicaemia.* – Developments in Biological Standardization, 1997, vol. **90**, pp 201 – 209.



20/ LORENZEN, N., LORENZEN, E., EINER-JENSEN, K., HEPPEL, J., WU, T. and DAVIS, H. –*Protective immunity to V.H.S. in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) following DNA vaccination.*- Fish and Shellfish Immunology, 1998, vol. **8**, pp 261-270.

21/ LORENZEN, N., OLESEN, N.J and KOCH, C. – *Immunity to VHS virus in rainbow trout.* – Aquaculture, 1999, vol. **172**, pp 41-61.

22/ NOONAN, B., ENZMANN, P.J. and TRUST, T.J. – *Recombinant Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Viral Hemorrhagic Septicemia Virus glycoprotein epitopes expressed in Aeromonas salmonicida induce protective immunity in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).* – Applied and Environmental Microbiology, 1995, Oct., pp 3586 – 3591.

23/ OBERG, L .A., WIRKKULA, J., MOURICH, D. AND LEONG, J.C. – *Bacterially expressed nucleoprotein of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish.* – Journal of Virology, 1991, Aug., vol. **65**, n°8, pp 4486 – 4489.

24/ OSHIMA, S.I., HATA, J.I., SEGAWA, C. and YAMASHITA, S . – *Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious haematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout.* 6 Journal of General Virology, 1996 – Vol **77**, pp 2441 – 2445.

25/ PETIT, J. – *Un point sur...environnement et aquaculture.* INRA, 1999 – Tome 1 – 214 p.

26/ SMAIL, S.A. – *Viral Hemorrhagic septicemia.* – IN : WOO, P.T.K., BRUNO, D.W. - Fish Diseases and Disorders. - CAB INTERNATIONAL, 1999 – Vol. **3** : Viral, Bacterial and Fungal Infections, chap. 3, pp 123 – 146.



## ANNEXE 1

### Arrêté du 10 avril 1997 relatif aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture (JORF du 03/06/97)

modifié par :

\*1\* AM du 1<sup>er</sup> mars 2000 (JORF du 21/03/2000)

Le ministre de l'économie et des finances et le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation,

Vu la directive 91/67/CEE du conseil du 28 janvier 1991 relative aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture, modifiée par les directives 93/54/CEE du Conseil du 24 juin 1993 et 95/22/CE du Conseil du 22 juin 1995 ;

Vu la décision 92/532/CEE de la Commission du 19 novembre 1992 fixant les plans d'échantillonnage et les méthodes de diagnostic pour la détection et la confirmation de la présence de certaines maladies de poissons, modifiée par la décision 96/240/CE de la Commission du 5 février 1996 ;

Vu la décision 93/22/CEE de la Commission du 11 décembre 1992 fixant les modèles des documents de transport prévus à l'article 14 de la directive 91/67/CEE ;

Vu le code rural, notamment ses articles 214, 215-8, 224, 225, 275-1, à 275-9 et 337 ;

Vu le code des douanes, notamment son article 38 ;

Vu le décret n°63-136 du 18 février 1963 relatif aux mesures de lutte contre les maladies des animaux ;

Vu le décret n°95-1408 du 28 décembre 1995 ajoutant à la Nomenclature des maladies des animaux réputées contagieuses la nécrose hématopoïétique infectieuse et la septicémie hémorragique virale de certaines espèces de poissons ainsi que l'anémie infectieuse du saumon ;

Vu l'arrêté du 30 mars 1987 concernant la prohibition de l'importation des poissons vivants, d'œufs et de sperme vivants de poissons ;

Vu l'arrêté du 6 juin 1994 modifié relatif aux conditions sanitaires d'importation d'animaux vivants, de produits d'origine animale et de denrées animales ou d'origine animale en provenance des pays tiers ;

Vu l'arrêté du 9 juin 1994 relatif aux règles applicables aux échanges d'animaux vivants, de semences et d'embryons et à l'organisation des contrôles vétérinaires ;

Vu l'avis de la Commission nationale vétérinaire,  
Arrêtent :

Art. 1er. - Le présent arrêté définit les conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture, à l'exclusion des mollusques et crustacés marins.

Le présent arrêté s'applique sans préjudice des dispositions communautaires ou nationales relatives à la conservation des espèces.

Art. 2. - Aux fins du présent arrêté, on entend par :

1. Animaux d'aquaculture : les poissons marins et d'eau douce, les crustacés et mollusques d'eau douce, vivants, quel que soit leur stade de développement, provenant d'une exploitation et ceux d'origine sauvage destinés à une exploitation ;

2. Produits d'aquaculture : les produits dérivés des animaux d'aquaculture, qu'ils soient destinés à l'élevage, tels que les œufs et les gamètes, ou à la consommation humaine ;

3. Exploitation : d'une manière générale, toute installation continentale ou littorale, géographiquement délimitée, dans laquelle des animaux d'espèces d'aquaculture sont élevés ou détenus en vue de leur mise sur le marché ;

4. Exploitation indemne (ou agréée au sens de la directive 91/67/CEE) : exploitation continentale ou littorale non située dans une zone indemne mais remplissant, selon le cas, les conditions des articles 15 ou 16 et reconnue comme telle par la Commission européenne ;

5. Exploitation suspectée d'être infectée : exploitation qui détient des poissons présentant soit des signes cliniques soit des lésions *post mortem* soit des réactions douteuses à des tests effectués par un laboratoire agréé permettant de suspecter une maladie réputée contagieuse ;

6. Exploitation infectée : exploitation qui détient des poissons sur lesquels la présence d'une maladie réputée contagieuse a été confirmée ainsi que l'exploitation vidée et non encore désinfectée ;

7. Zone continentale : soit un territoire comprenant un ou plusieurs bassins versants entiers, depuis les sources des cours d'eau jusqu'à la zone d'influence de la mer, soit une partie d'un bassin versant depuis les sources des cours d'eau jusqu'à une barrière naturelle ou artificielle qui empêche la migration des poissons se trouvant en aval ;

8. Zone littorale : partie de côte, d'eau marine ou d'estuaire, clairement délimitée géographiquement et représentant un système hydrologique homogène ou une série de ces systèmes ;

9. Zone indemne (ou agréée au sens de la directive 91/67/CEE) : zone continentale ou littorale, remplissant, selon le cas, les conditions de l'article 11 ou 14 et reconnue comme telle par la Commission européenne ;

10. Visite sanitaire : contrôle d'une exploitation ou d'une zone continentale ou littorale, effectué par les agents des services vétérinaires ou toute personne habilitée par ces services. Elle comporte au moins une inspection des animaux présentant des anomalies et un prélèvement d'échantillons à destination d'un laboratoire agréé ;

11. Mise sur le marché : la détention, la mise en vente, la vente, la livraison, le transfert et le repeuplement d'animaux et de produits d'aquaculture, y compris ceux importés d'un pays tiers et ceux en provenance ou à destination d'un Etat membre de la Communauté européenne ;

12. Laboratoire agréé : tout laboratoire figurant sur une liste établie par le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation, chargé par lui d'effectuer sous sa responsabilité, les tests de diagnostic et de confirmation de la présence des maladies figurant à l'annexe I.

\*1 13. Zone non indemne : zone ou partie de zone continentale ou littorale ne remplissant pas les conditions prévues au point 9 et excluant toute exploitation indemne. 1\*

Les qualifications définies aux points 4 et 9 ci-dessus ne préjugent pas de l'agrément des exploitations concernées par le décret n°90-804 du 7 septembre 1990 pris pour l'application de l'article L.232-12 du code rural et relatif à

CDR de l'INFOMA 21/03/2000



l'agrément des établissements de pisciculture ou d'aquaculture.

**TITRE Ier  
MISE SUR LE MARCHÉ**

Art. 3. - Pour être mis sur le marché les animaux d'aquaculture doivent répondre aux exigences générales suivantes :

- a) Ils ne présentant aucun signe clinique de maladie au jour d'embarquement ;
- b) Ils ne sont pas destinés à la destruction ou à l'abattage dans le cadre d'un plan d'éradication d'une maladie visée à l'annexe I ;
- c) Ils ne proviennent pas d'une exploitation infectée ou suspectée d'être infectée d'une maladie réputée contagieuse.

Pour être mis sur le marché, les produits d'aquaculture destinés à la reproduction, œufs et gamètes, doivent provenir d'animaux répondant aux exigences énoncées aux points a, b et c ci-dessus.

Pour être mis sur le marché, les produits d'aquaculture destinés à la consommation doivent provenir d'animaux répondant à l'exigence énoncée au point a ci-dessus.

Art. 4. - Outre les exigences générales de l'article précédent, les animaux d'aquaculture des espèces sensibles aux maladies de la liste II de l'annexe I, leurs œufs ou leurs gamètes, introduits dans une zone ou une exploitation indemne, doivent être accompagnés d'un document de transport conforme aux modèles 1 ou 2 de l'annexe II attestant qu'ils proviennent, selon le cas, d'une zone ou d'une exploitation indemne et délivré selon les dispositions de l'article 9.

Un arrêté du ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation prévoit des garanties complémentaires à respecter pour l'introduction dans une zone indemne de poissons provenant d'une exploitation indemne.

Art. 5. - Outre les exigences générales de l'article 3 et sans préjudice des mesures relatives aux maladies visées à la liste III de l'annexe I, les animaux et produits d'aquaculture n'appartenant pas aux espèces sensibles aux maladies de la liste II de l'annexe I introduits dans une zone ou une exploitation indemne doivent être accompagnés d'un document de transport conforme au modèle 3 de l'annexe II attestant qu'ils proviennent, selon le cas, d'une zone ou d'une exploitation indemne ou d'une exploitation située dans une zone non indemne, mais ne renfermant pas d'animaux appartenant aux espèces sensibles aux maladies de la liste II de l'annexe I et n'étant pas en contact avec des cours d'eau ou des eaux littorales ou d'estuaires, et délivré selon les dispositions de l'article 9.

Art. 6. - Outre les exigences générales de l'article 3 et sans préjudice des mesures relatives aux maladies de la liste III de l'annexe I, les poissons ou crustacés sauvages, leurs œufs et gamètes introduits dans une zone ou une exploitation indemne doivent être accompagnés d'un document du modèle 4 de l'annexe II attestant qu'ils proviennent d'une zone indemne et délivré selon les dispositions de l'article 9.

Lorsqu'ils sont pêchés en haute mer et destinés à la reproduction dans une zone ou une exploitation indemne, ces animaux font l'objet d'une mise en quarantaine sous la surveillance d'un vétérinaire sanitaire, dans des installations et des conditions appropriées.

Art. 7. - Les dispositions des articles 5 et 6 ne s'appliquent pas aux poissons tropicaux d'ornement maintenus en permanence en aquarium.

Art. 8. - Les poissons sensibles aux maladies des listes I et II de l'annexe I originaires d'une zone non indemne et destinés

à une zone indemne en vue de la consommation humaine doivent être abattus et éviscérés avant leur expédition.

\*1 Art. 8 bis. - Outre les exigences générales de l'article 3, les lots de poissons d'élevage vivants sensibles à la nécrose hémato-poïétique infectieuse ou à la septicémie hémorragique virale, leurs œufs et leurs gamètes lors d'échanges intracommunautaires entre zones non indemnes doivent être accompagnés d'un certificat conforme au modèle 5 de l'annexe II.

Art. 8 ter. - En dérogation au point c de l'article 3 ci-dessus et au point 5 de l'article 3 de l'arrêté du 9 juin 1994 susvisé, les lots de poissons d'élevage vivants, leurs œufs ou gamètes peuvent faire l'objet d'échanges intracommunautaires entre exploitations infectées par la même maladie. Lors de ces échanges, les lots doivent être accompagnés d'un certificat conforme au modèle 6 de l'annexe II. 1\*

**TITRE II  
TRANSPORT**

Art. 9. - \*1 Les documents de transport visés aux articles 4 à 6 et les certificats visés aux articles 8 bis et 8 ter sont établis par les services vétérinaires, en français et dans la langue officielle du lieu de destination, dans les quarante-huit heures, hors dimanche et jour férié, précédant le chargement.

Chaque envoi d'animaux ou de produits d'aquaculture est identifié de façon précise, afin de permettre de retrouver l'exploitation d'origine et de vérifier la concordance de ces animaux ou produits avec les renseignements figurant sur le document de transport ou le certificat qui les accompagne. Ces renseignements doivent être apposés directement sur le conteneur ou sur une étiquette qui lui est attachée ou sur le document de transport ou le certificat. 1\*

Art. 10. - Les animaux d'aquaculture sont acheminés dans les délais les plus brefs vers le lieu de destination à l'aide de moyens de transport préalablement nettoyés et désinfectés avec un désinfectant autorisé.

Si de l'eau est utilisée pour le transport terrestre, les véhicules sont aménagés de telle sorte qu'elle ne puisse pas s'écouler du véhicule pendant le transport. Le transport est effectué de manière à assurer une protection efficace du statut sanitaire des animaux d'aquaculture. Le renouvellement de l'eau est effectué dans des installations autorisées qui répondent aux conditions suivantes :

- l'eau de renouvellement n'est pas susceptible de transmettre les maladies des listes I et II de l'annexe I ;
- l'eau de rejet est désinfectée ou épanchée sans qu'un déversement direct dans des eaux libres ne puisse se produire.

La liste des installations de renouvellement autorisées est établie par le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation.

**TITRE III  
ZONES ET EXPLOITATIONS INDEMNES  
Chapitre Ier  
Zones indemnes**

\*1 Art. 11. - Pour être reconnue indemne, une zone continentale doit répondre aux conditions suivantes :

Tous les poissons sont exempts, depuis au moins quatre ans, de toute manifestation de l'existence d'une ou de plusieurs des maladies de la liste II de l'annexe I ;

Toutes les exploitations sont placées sous la surveillance des services vétérinaires. Pendant deux ans, deux visites annuelles ont lieu durant les périodes où la température de l'eau est favorable au développement de ces maladies. S'il n'existe aucune exploitation dans la zone, ces visites sont réalisées dans la partie aval du bassin versant. Chaque visite comporte :





- une inspection des poissons présentant des anomalies ;
- un prélèvement d'échantillons pour l'obtention du statut indemne, selon le plan établi à l'annexe III ; les échantillons sont analysés dans un laboratoire agréé ;
- les examens de laboratoires sur les poissons prélevés lors de ces visites donnent des résultats négatifs en ce qui concerne les agents des maladies de la liste II de l'annexe I. 1°

Art. 12. - Pour continuer à être reconnue indemne, une zone continentale doit présenter les garanties suivantes :

- les poissons introduits dans la zone proviennent d'une zone ou d'une exploitation indemne ;
- les responsables de chaque exploitation tiennent un registre où figurent les résultats des visites sanitaires et les mouvements d'animaux ;

- \*1 Toutes les exploitations sont placées sous la surveillance des services vétérinaires. Deux visites annuelles ont lieu durant les périodes où la température de l'eau est favorable au développement des maladies de la liste II de l'annexe I, sauf dans le cas des exploitations ne détenant pas de géniteur pour lesquelles la fréquence est réduite à une fois par an. S'il n'existe aucune exploitation dans la zone, ces visites sont réalisées dans la partie aval du bassin versant. Chaque visite comporte :

- une inspection des poissons présentant des anomalies ;

- un prélèvement d'échantillons pour le maintien du statut indemne, selon le plan établi à l'annexe III. Les échantillons sont analysés dans un laboratoire agréé ; toutefois, les prélèvements sont effectués chaque année par roulement, dans 50 % des exploitations de la zone. 1°

- les résultats des examens de laboratoire pratiqués sur les poissons prélevés sont négatifs en ce qui concerne les agents des maladies de la liste II de l'annexe I.

Art. 13. - Toute mortalité anormale ou tout autre symptôme pouvant constituer une suspicion de maladie de la liste II de l'annexe I sont déclarés dans les meilleurs délais aux services vétérinaires qui en informent immédiatement le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation (directeur général de l'alimentation), qui suspend la reconnaissance du statut indemne de la zone continentale, ou d'une partie de cette zone.

Un prélèvement d'au moins dix poissons malades est adressé à un laboratoire agréé.

En cas de résultats négatifs pour les agents pathogènes en cause, le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation lève la suspension. Toutefois, si un résultat est douteux, une nouvelle visite sanitaire est effectuée dans les quinze jours suivant le premier prélèvement. Si les résultats sont à nouveau négatifs, ou s'il n'y a plus d'animaux malades, la suspension est levée.

En cas de résultats positifs, le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation supprime la reconnaissance du statut indemne de la zone et en informe la Commission européenne qui modifie la liste des zones reconnues indemnes.

Pour être à nouveau reconnues indemnes, les zones doivent répondre aux conditions suivantes :

- lors de la confirmation du foyer, tous les poissons des exploitations infectées sont abattus, leurs produits éliminés et les installations et le matériel désinfectés ;
- après l'élimination du foyer, une procédure de qualification telle que prévue à l'article 11 doit être mise en œuvre.

Art. 14. - Pour être reconnue indemne, une zone littorale doit répondre aux conditions énoncées à l'article 11.

Pour continuer à être reconnue indemne, une zone littorale doit répondre aux conditions énoncées à l'article 12.

Le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation suspend, rétablit ou supprime la

CDR de l'INFOMA 21/03/2000

reconnaissance du statut indemne de la zone littorale, selon les règles fixées par l'article 13.

## Chapitre II

### Exploitations indemnes dans une zone non indemne

Art. 15. - Pour être reconnue indemne, une exploitation continentale non située dans une zone indemne doit répondre aux conditions suivantes :

- elle est alimentée en eau de puits, de source ou de forage. Si le point d'alimentation en eau se trouve éloigné de l'exploitation, l'eau doit être acheminée par une canalisation ou un conduit naturel pour autant que cela ne constitue pas une source de contamination et ne permette pas l'introduction de poissons sauvages ;

- il existe en aval de l'exploitation un obstacle naturel ou artificiel qui empêche la pénétration de poissons sauvages ;

- si nécessaire, elle est protégée contre l'inondation ;

- elle répond elle-même à tous les critères fixés pour une zone à l'article 11 ; en outre, lorsque la reconnaissance du statut indemne est demandée sur la base de données historiques sur une période de dix ans, l'exploitation doit avoir été soumise à un contrôle clinique et à un prélèvement d'échantillons au moins une fois par an.

Une exploitation qui répond aux conditions de l'alinéa précédent, exceptée celle du quatrième tiret, et qui commence son activité avec des animaux ou produits d'aquaculture originaires d'une zone ou d'une exploitation indemne, peut être reconnue indemne sans subir les prélèvements requis pour l'octroi du statut indemne.

Une exploitation qui répond aux conditions du premier alinéa du présent article, exceptée celle du quatrième tiret, et qui recommence à fonctionner après une interruption à partir d'animaux ou de produits d'aquaculture originaires d'une zone ou d'une exploitation indemne, peut être reconnue indemne sans subir les prélèvements requis pour l'octroi du statut indemne, à condition que :

- l'historique sanitaire de l'exploitation soit connu des services vétérinaires depuis quatre ans ;

- aucun cas de maladie de la liste II de l'annexe I n'ait été déclaré dans cette exploitation au cours des quatre dernières années ;

- préalablement à l'introduction des animaux ou des produits d'aquaculture, les installations aient été nettoyées, désinfectées et soumises à un vide sanitaire d'au moins quinze jours, sous contrôle officiel.

Pour continuer à être reconnue indemne, une exploitation doit présenter les garanties prévues à l'article 12. Dans ce cas, les prélèvements sont effectués chaque année.

Le préfet, sur proposition du directeur des services vétérinaires, suspend, rétablit ou supprime la reconnaissance du statut indemne de l'exploitation continentale selon les règles fixées par l'article 13, et en informe le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation.

Art. 16. - Pour être reconnue indemne, une exploitation littorale doit répondre aux conditions suivantes :

- elle est alimentée en eau par un système comprenant une installation susceptible de détruire les agents des maladies de la liste II de l'annexe I ;

- elle répond elle-même à tous les critères fixés pour une zone à l'article 11.

Pour continuer à être reconnue indemne, cette exploitation doit présenter les garanties prévues à l'article 12.

Le préfet, sur proposition du directeur des services vétérinaires, suspend, rétablit ou supprime la reconnaissance du statut indemne de l'exploitation littorale selon les règles fixées par l'article 13, et en informe le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation.

Art. 17. - La liste des zones indemnes et des exploitations indemnes dans une zone non indemne est établie par la



Commission européenne, sur proposition du ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation.

**Chapitre III  
Programmes de qualification**

Art. 18. - Lorsqu'il est établi un programme visant à permettre à une zone ou à une exploitation d'être reconnue indemne vis-à-vis d'une des maladies visées par les listes II et III de l'annexe I, le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation (directeur général de l'alimentation), sur proposition du directeur des services vétérinaires concerné, soumet ce programme à la Commission des Communautés européennes.

Y sont indiqués notamment :

- la situation de la maladie concernée et la justification du programme ;
- la zone ou l'exploitation et les espèces visées ;
- les mesures à prendre par les services de contrôle officiels pour assurer le bon déroulement du programme ;
- les plans d'échantillonnage qui prennent en compte la présence d'animaux aquatiques sauvages ;
- le nombre et la répartition des laboratoires agréés concernés et les méthodes de diagnostic qu'ils mettent en œuvre ;
- les mesures fixant les conditions sanitaires d'introduction des animaux et produits d'aquaculture ;
- les mesures réglementaires de lutte en cas de confirmation d'une de ces maladies.

**TITRE IV  
DISPOSITIONS GENERALES**

Art. 19. - Les contrevenants aux prescriptions du présent arrêté sont passibles des peines prévues par l'article 337 du code rural et le décret du 18 février 1963 susvisés.

Art. 20. - A l'article 1er de l'arrêté du 30 mars 1987 susvisé, il est inséré, après le mot : "importation", les mots suivants: "en provenance de pays tiers".

L'arrêté du 27 mai 1994 relatif aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture est abrogé.

Art. 21. - Le directeur général de l'alimentation au ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation et les préfets sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 10 avril 1997.

Le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation,  
Philippe VASSEUR  
Le ministre de l'économie et des finances, Jean ARTHUIS

**ANNEXE I  
LISTE DES MALADIES ET DES ESPECES SENSIBLES**

1 MALADIES	2 ESPECES SENSIBLES
LISTE I	
Poissons anémie infectieuse du saumon (AIS)	Saumon de l'Atlantique ( <i>Salmo salar</i> ).
LISTE II	
Poissons Speticémie hémorragique virale (SHV)	Salmonidés. Ombre ( <i>Thymallus thymallus</i> ). Corégone ( <i>Corégone sp.</i> ). Brochet ( <i>Esox lucius</i> ).
Nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI)	Turbot ( <i>Sophthalmus maximus</i> ).  Salmonidés. Brochet ( <i>Esox lucius</i> ).
LISTE III	
Poissons Nécrose pancréatique infectieuse (NPI) Virémie printanière de la carpe (VPC). Corynébactériose ( <i>Renibacterium Salmoninarum</i> ) ..... Furonculose ( <i>Aeromonas salmonicida</i> ) . Yersiniose ou maladie de la bouche rouge (ERM) ( <i>Yersinia ruckeri</i> ) Gyrodactylose( <i>Gyrodactylus salaris</i> )	A préciser lors de l'établissement du programme de lutte.
Crustacés Peste de l'écrevisse ( <i>Aphanomyces astaci</i> )	



Etat membre d'origine : .....  
 Exploitation d'origine : .....  
 Nom : .....  
 Adresse : .....

II. - Description du lot :

	ANIMAUX VIVANTS	OEUFS	GAMETES
Espèces Nom commun..... Nom scientifique.....			
Quantité Nombre..... Poids total..... Poids moyen.....			

III. - Destination du lot :

Etat membre de destination : .....  
 Destinataire :  
 Nom : .....  
 Adresse : .....  
 Lieu de destination : .....

IV. - Moyen de transport :

Nature : .....  
 Identification : .....

V. - Attestation sanitaire :

Je soussigné certifie que les animaux ou les produits faisant l'objet du présent envoi proviennent (2) :

a) De la zone (3) : .....  
 agréée en ce qui concerne la ou les maladies suivantes (4) : .....

b) De l'exploitation suivante (5) : .....  
 agréée en ce qui concerne les maladies suivantes : .....  
 en conformité avec la décision (4) : .....

c) De l'exploitation suivante (5) : .....  
 située dans une zone non agréée ne contenant pas de poissons, ou de crustacés (2) appartenant aux espèces sensibles visées à l'annexe A, listes I et II de la directive 91/67/CEE. Cette exploitation n'est pas en contact avec des cours d'eau ou des eaux littorales ou d'estuaire.

Fait à ....., le .....

Nom du service officiel .....  
 (nom en lettres capitales)

Cachet du service officiel .....  
 (titre du signataire)

(signature)

(1) Le présent document doit être au moins dans la ou les langues de l'Etat membre de destination

(2) Biffer la ou les mentions inutiles.

(3) Description de la zone.

(4) Indiquer le numéro de la décision communautaire sur la base de laquelle l'agrément a été accordé.

(5) Nom et adresse de l'exploitation.

ANNEXE II  
 MODELE 4

Document de transport pour les poissons ou crustacés sauvages vivants, leurs œufs et gamètes

Le présent document (1) doit accompagner le lot destiné à être introduit dans :

- une zone agréée (2) ;
- une exploitation agréée (2).

I. - Origine du lot :

Etat membre d'origine : .....  
 Lieu d'origine : .....  
 Nom : .....  
 Adresse : .....

II. - Description du lot :

	ANIMAUX VIVANTS	OEUFS	GAMETES
Espèces Nom commun..... Nom scientifique.....			
Quantité Nombre..... Poids total..... Poids moyen.....			

III. - Destination du lot :

Etat membre de destination : .....  
 Destinataire :  
 Nom : .....



CIREV/INFOMA162.RTF

Adresse : .....

Lieu de destination : .....

IV. - Moyen de transport :  
 Nature : .....  
 Identification : .....

V. - Attestation sanitaire :  
 Je soussigné certifie que les animaux ou les produits faisant l'objet du présent envoi proviennent de la zone suivante  
 (3) : ..... agréée en ce qui concerne la ou les maladies suivantes : .....

en conformité avec la décision (4) : .....

Fait à ..... le .....

Nom du service officiel .....  
 (nom en lettres capitales)

Cachet du service officiel .....  
 (titre du signataire)  
 .....  
 (signature)

- (1) Le présent document doit être au moins dans la ou les langues de l'Etat membre de destination.  
 (2) Biffer la mention inutile.  
 (3) Description de la zone.  
 (4) Indiquer le numéro de la décision communautaire sur la base de laquelle l'agrément a été accordé.

\*1

ANNEXE II  
 MODELE 5

Certificat zoosanitaire pour les poissons d'élevage vivants sensibles à la nécrose hématopoïétique infectieuse et à la septicémie hémorragique virale, leurs œufs et gamètes dans les échanges intracommunautaires entre zones non agréées  
 Numéro codé (1)

I. - Origine du lot

Etat membre d'origine :  
 Exploitation d'origine :  
 Nom .....  
 Adresse

II. - Description du lot

	ANIMAUX vivants	OEUFs	GAMETES
Espèces			
Nom commun.....			
Nom scientifique.....			
Quantité			
Nombre.....			
Poids total.....			
Poids moyen.....			

III. - Destination du lot

Etat membre de destination : .....  
 Destinataire :  
 Nom .....  
 Adresse .....  
 Lieu de destination : .....

IV. - Moyen de transport

Nature : .....  
 Identification : .....

V. - Certificat sanitaire

Je, soussigné, certifie que les animaux qui composent le présent lot :  
 - ne présentaient aucun signe clinique de maladie le jour du chargement ;  
 - ne sont pas destinés à être détruits ou abattus dans le cadre d'un régime d'éradication d'une maladie énumérée à l'annexe A de la directive 91/67/CEE du Conseil relative aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture ;  
 - ne proviennent pas d'une exploitation qui fait l'objet d'une interdiction pour des raisons zoosanitaires, notamment d'une exploitation qui est infectée par la nécrose hématopoïétique infectieuse et la septicémie hémorragique virale, et n'ont pas été en contact avec des animaux d'une telle exploitation ;  
 ou que les œufs/gamètes composant le présent lot ont été obtenus à partir d'animaux remplissant ces critères.

Fait à ..... le .....

Nom du service officiel .....  
 Nom du fonctionnaire signataire.....  
 (en lettres majuscules)  
 Signature (2) ..... Cachet du service officiel

- (1) Attribué par le service officiel.  
 (2) La couleur du cachet et de la signature doit être différente de celle de l'imprimé.

ANNEXE II

CDR de l'INFOMA 21/03/2000



**ANNEXE III  
PLANS D'ECHANTILLONNAGE**

Obtention du statut indemne : programme de qualification sur deux ans.

	NOMBRE De visites annuelles	NOMBRE de poissons prélevés	NOMBRE de liquides ovariens prélevés
<i>Première et deuxième année</i>			
<i>Zone continentale</i>			
Exploitation détenant des géniteurs	2	120 (première visite) 150 (deuxième visite)	30 (première visite) 0
Exploitation ne détenant que des géniteurs	2	0 0	150 (première visite) 150 (deuxième visite)
Exploitation ne détenant pas de géniteurs	2	150 (première visite) 150 (deuxième visite)	0 0
<i>Zone littorale</i>			
Exploitation détenant des géniteurs	2	120 (première visite) 150 (deuxième visite)	30 (première visite) 0
Exploitation autre que de salmonidés ne détenant pas de géniteurs.	2	150 (première visite) 150 (deuxième visite)	0 0
Exploitation de salmonidés ne détenant pas de géniteurs	2	30 (première visite) 30 (deuxième visite)	0 0
Nombre maximum de poissons prélevés analysé en mélange/analyse : 10.			

Maintien du statut indemne : visites et prélèvements à réaliser tous les ans à partir de l'obtention du statut indemne.

	NOMBRE de visites annuelles	NOMBRE de poissons prélevés	NOMBRE de liquides ovariens prélevés
<i>Zone continentale</i>			
Exploitation détenant des géniteurs	2	20 (première ou deuxième visite)	10 (première ou deuxième visite)
Exploitation ne détenant que des géniteurs	2	0	30 (première ou deuxième visite)
Exploitation ne détenant pas de géniteurs	1	30	0
<i>Zone littorale</i>			
Exploitation détenant des géniteurs	2	20 (première ou deuxième visite)	10 (première ou deuxième visite)
Exploitation ne détenant pas de géniteurs	1	30	0
Nombre maximum de poissons prélevés analysé en mélange/analyse : 10			

CDR de l'INFOMA 21/03/2000



1999198

**ARRÊTÉ MINISTÉRIEL DU 22 SEPTEMBRE 1999**

établissant des mesures de lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons

(JO n°241 du 16 octobre 1999, page 15506)

NOR : AGRG9902024A

- Le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie et le ministre de l'agriculture et de la pêche,
- Vu la directive 91/67/CEE du Conseil du 28 janvier 1991 modifiée, relative aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture ;
  - Vu la directive 93/53/CEE du Conseil du 24 juin 1993 établissant des mesures communautaires minimales de lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons ;
  - Vu le code rural, notamment ses articles 214, 215-1 à 215-8, 225 à 228, 264 à 269, 328, 329 et 331 ;
  - Vu le décret n°63-136 du 18 février 1963 relatif aux mesures de lutte contre les maladies des animaux ;
  - Vu le décret n°99-822 du 16 septembre 1999 ajoutant à la nomenclature des maladies des animaux réputées contagieuses la nécrose hémotopoiétique infectieuse et la septicémie hémorragique virale de certaines espèces de poissons ainsi que l'anémie infectieuse du saumon ;
  - Vu l'arrêté du 28 décembre 1992 portant réglementation des conditions d'hygiène applicables dans les établissements de manipulation des produits de la pêche ;
  - Vu l'arrêté du 10 avril 1997 relatif aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture ;
  - Vu l'avis de la Commission nationale vétérinaire (comité consultatif de la santé et de la protection animale) en date du 24 juin 1998 ;
  - Vu l'avis de l'Agence française de la sécurité sanitaire des aliments en date du 12 août 1999,

Arrêtent

**Titre Ier : Dispositions générales****Article 1er**

Le présent arrêté définit les mesures de lutte à appliquer en cas de suspicion ou de confirmation d'un cas de maladie réputée contagieuse tel que fixé par le décret du 16 septembre 1999 susvisé.

**Article 2**

Aux fins du présent arrêté, on entend par :

1. « **Animaux d'aquaculture** » : les poissons marins et d'eau douce vivants, quel que soit leur stade de développement, provenant d'une exploitation et ceux d'origine sauvage destinés à une exploitation ;
2. « **Produits d'aquaculture** » : les produits dérivés des animaux d'aquaculture, qu'ils soient destinés à l'élevage, tels que les oeufs et les gamètes, ou à la consommation humaine ;
3. « **Zone continentale** » : soit un territoire comprenant un ou plusieurs bassins versants entiers, depuis les sources des cours d'eau jusqu'à la zone d'influence de la mer, soit une partie d'un bassin versant depuis les sources des cours d'eau jusqu'à une barrière naturelle ou artificielle qui empêche la migration des poissons se trouvant en aval ;
4. « **Zone littorale** » : partie de côte, d'eau marine ou d'estuaire, clairement délimitée géographiquement et représentant un système hydrologique homogène, ou une série de ces systèmes ;
5. « **Exploitation** » : d'une manière générale, toute installation continentale ou littorale, géographiquement délimitée, dans laquelle des animaux d'aquaculture sont élevés ou détenus en vue de leur mise sur le marché au sens du point 9 ;
6. « **Zone indemne** » (ou agréée au sens de la directive 91/67/CEE) : zone continentale ou littorale, remplissant, selon le cas, les conditions de l'article 11 ou de l'article 14 de l'arrêté du 10 avril 1997 susvisé et reconnue comme telle par la Commission européenne ;
7. « **Exploitation indemne** » (ou agréée au sens de la directive 91/67/CEE) : exploitation continentale ou littorale non située dans une zone indemne mais remplissant, selon le cas, les conditions de l'article 15 ou de l'article 16 de l'arrêté du 10 avril 1997 susvisé et reconnue comme telle par la Commission européenne ;
8. « **Visite sanitaire** » : contrôle d'une exploitation ou d'une zone continentale ou littorale effectué par les agents des services vétérinaires ou le vétérinaire sanitaire de l'exploitation. Elle comporte au moins une inspection des animaux présentant des anomalies accompagnée le cas échéant d'un prélèvement d'échantillons à destination d'un laboratoire de diagnostic agréé ;
9. « **Mise sur le marché** » : la détention ou l'exposition en vue de la vente, la mise en vente, la vente, la livraison, le transfert ou toute autre manière de mise sur le marché, y compris ceux importés d'un pays tiers et ceux en provenance ou à destination d'un Etat membre de l'Union européenne, à l'exception de la vente au détail d'animaux morts ;
10. « **Poisson suspect d'être infecté** » : tout poisson présentant soit des signes cliniques, soit des lésions post mortem permettant de suspecter une maladie réputée contagieuse, soit encore des réactions à des épreuves de laboratoire ne permettant pas d'infirmier le diagnostic ;
11. « **Poisson infecté** » : tout poisson sur lequel la présence d'une maladie réputée contagieuse a été confirmée, conformément aux dispositions du décret du 16 septembre 1999 susvisé ;
12. « **Exploitation suspecte d'être infectée** » : exploitation qui détient des poissons suspects d'être infectés ;
13. « **Exploitation infectée** » : exploitation qui détient des poissons infectés, ainsi que l'exploitation vidée non encore désinfectée.

**Article 3**

Toutes les exploitations qui détiennent ou élèvent des poissons des espèces sensibles aux maladies réputées contagieuses telles que fixées par le décret du 16 septembre 1999 susvisé doivent être déclarées par leur exploitant au préfet.  
Chaque exploitant tient un registre sur lequel figurent :



- les dates de réception, les quantités, les espèces, les tailles, l'origine, le fournisseur et l'identification du véhicule de transport des poissons vivants, oeufs ou gamètes introduits dans l'exploitation ;
- les dates d'expédition et toutes les informations concernant les poissons vivants, oeufs et gamètes quittant l'exploitation ainsi que leur destination et le détail des modalités d'expédition et de désinfection des moyens de transport ;
- la mortalité constatée.

Ce registre doit être tenu au jour le jour et conservé pendant quatre ans ; il est tenu à la disposition des agents chargés du contrôle.

#### Article 4

Le laboratoire national de référence en matière de maladies réglementées des poissons est l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) :

- AFSSA Alfort : laboratoire central de recherche vétérinaire, 22, rue Pierre-Curie, BP 27, 94703 Maisons-Alfort ;
- AFSSA Brest : laboratoire de pathologie des animaux aquatiques, technopôle, Brest-Iroise, BP 70, 29280 Plouzane.

Le laboratoire national de référence est chargé :

- d'effectuer certains diagnostics ;
- de confirmer les résultats positifs obtenus dans les laboratoires de diagnostics agréés, d'identifier l'agent pathogène en cause, notamment lors de la première manifestation d'une maladie, et de conserver des isolats des agents pathogènes identifiés ;
- de coordonner les méthodes de diagnostic des maladies des poissons ainsi que l'utilisation des réactifs ;
- d'organiser périodiquement des tests comparatifs entre les laboratoires de diagnostic agréés et contrôler la qualité des réactifs de diagnostic utilisés ;
- de coopérer avec le laboratoire communautaire de référence désigné à l'annexe B de la directive 93/53/CEE susvisée.

Un laboratoire de diagnostic agréé est un laboratoire figurant sur une liste établie par le ministre de l'agriculture et de la pêche, notamment après avis du laboratoire national de référence, et chargé à ce titre d'effectuer les tests de diagnostic et de confirmation de la présence d'une des maladies réputées contagieuses des poissons fixées par le décret du 16 septembre 1999 susvisé.

Pour la mise en oeuvre des mesures prévues au présent arrêté, les analyses de diagnostic des maladies réputées contagieuses des poissons sont effectuées par un laboratoire de diagnostic agréé ou par le laboratoire de référence.

### Titre II : Mesures de lutte contre l'anémie infectieuse du saumon

#### Article 5

La vaccination contre l'anémie infectieuse du saumon est interdite.

### Chapitre Ier : Mesures en cas de suspicion

#### Article 6

Lorsque dans une exploitation se trouvent des poissons suspects d'être infectés, le préfet prend, sur proposition du directeur des services, un arrêté de mise sous surveillance de cette exploitation. Cet arrêté prescrit la mise en oeuvre des mesures suivantes :

- 1° Tous les poissons et leurs produits sont isolés, séquestrés, contrôlés et recensés ; l'exploitant tient à jour ce recensement de manière à prendre en compte notamment l'évolution de la mortalité ;
- 2° Les examens cliniques et les prélèvements nécessaires au diagnostic sont effectués conformément aux instructions du ministre de l'agriculture et de la pêche ;
- 3° Aucun poisson vivant ou mort, ni oeuf ou gamète ne peut entrer dans l'exploitation ou en sortir sans autorisation du directeur des services vétérinaires ;
- 4° Toute entrée ou sortie d'aliments pour animaux, d'ustensiles, d'objets et d'autres substances, tels que les déchets, susceptibles de transmettre la maladie est subordonnée si nécessaire à l'autorisation du directeur des services vétérinaires qui établit les conditions requises afin de prévenir la propagation de l'agent pathogène ;
- 5° Les poissons morts et leurs viscères sont éliminés et toutes les autres mesures propres à éviter la propagation de l'agent pathogène, notamment les procédures de désinfection aux entrées et aux sorties de l'exploitation, sont mises en oeuvre.

Dès la suspicion de la maladie, et avant même sa déclaration et la notification de l'arrêté de mise sous surveillance, l'exploitant met en oeuvre toutes les mesures nécessaires pour se conformer aux dispositions ci-dessus, à l'exclusion de celles prévues au point 2.

#### Article 7

Le directeur des services vétérinaires effectue une enquête épidémiologique, portant notamment sur :

- la durée de la période pendant laquelle la maladie peut avoir existé dans l'exploitation avant d'avoir été notifiée ou suspectée ;
- l'origine possible de la maladie dans l'exploitation et l'identification des autres exploitations dans lesquelles se trouvent des oeufs, des gamètes et des poissons d'espèces sensibles, qui peuvent avoir été infectés ;
- les mouvements des poissons, des oeufs et gamètes, des véhicules, des personnes, de tout matériel ou de toute matière susceptibles d'avoir transporté l'agent de la maladie à partir ou vers des exploitations concernées.

Les prélèvements nécessaires à l'enquête épidémiologique sont effectués conformément aux instructions du ministre de l'agriculture et de la pêche.

#### Article 8

Sur proposition du directeur des services vétérinaires, le préfet peut appliquer l'une quelconque des mesures prévues à l'article 6 à d'autres exploitations dans le cas où leur implantation, leur topographie et les contacts avec l'exploitation placée sous surveillance permettent de soupçonner une contamination.

#### Article 9

L'arrêté de mise sous surveillance est levé lorsque toute suspicion de la maladie est écartée.

### Chapitre II : Mesures en cas de confirmation

#### Article 10

Lorsque l'existence de l'anémie infectieuse du saumon est confirmée, le préfet prend, sur proposition du directeur des services vétérinaires, un arrêté portant déclaration d'infection de l'exploitation. En complément des mesures prévues à l'article 6 du présent arrêté, l'exploitation est soumise aux mesures suivantes :



- 1° Tous les poissons de l'exploitation sont mis à mort sans délai. Les poissons morts ou mis à mort, les oeufs, les gamètes, les viscères et tous les déchets susceptibles d'être contaminés sont détruits sous le contrôle des services vétérinaires ;
- 2° Par dérogation au 1o, les poissons ayant atteint la taille commerciale et ne présentant aucun signe clinique de maladie peuvent être abattus et éviscérés en vue de la commercialisation ou de la transformation pour l'alimentation humaine, sous le contrôle des services vétérinaires. Dans ce cas, les poissons doivent être préparés et transformés dans un établissement de manipulation des produits de la pêche agréé au titre de l'arrêté du 29 décembre 1992 susvisé. Le directeur des services vétérinaires veille à ce que ces opérations et le traitement des déchets et des eaux usées soient effectués de manière à détruire l'agent pathogène ;
- 3° Après exécution des opérations visées aux points 1° et 2° ci-dessus, les bassins, les cages d'élevage, les bâtiments utilisés pour l'hébergement des poissons, des oeufs et des gamètes, leurs abords, les véhicules de transport et tout le matériel susceptible d'être contaminé sont nettoyés et désinfectés sans délai sous le contrôle des services vétérinaires.

**Article 11**

Une visite sanitaire systématique est effectuée dans toutes les exploitations du bassin versant ou de la zone littorale où est située l'exploitation infectée. En cas de confirmation de l'existence de la maladie, les exploitations infectées sont soumises aux mesures prévues à l'article 10 du présent arrêté.

**Article 12**

Si l'enquête épidémiologique révèle que la maladie peut avoir été introduite à partir d'un autre bassin versant ou d'une autre zone littorale ou communiquée à un autre bassin versant ou une autre zone littorale, notamment à la suite d'un mouvement de poissons, d'oeufs, de gamètes, d'animaux, de véhicules ou de personnes, lesdites zones ou exploitations sont suspectes d'être infectées et soumises aux mesures prévues à l'article 6.

Si la présence de la maladie est confirmée, les mesures de l'article 10 leur sont appliquées.

**Article 13**

La levée de l'arrêté portant déclaration d'infection et la réintroduction d'oeufs, de gamètes ou de poissons dans l'exploitation ne peuvent intervenir qu'après exécution des opérations visées au 3° de l'article 10 et réalisation d'un vide sanitaire d'au moins quinze jours avant la remise en eau des installations.

**Article 14**

Lorsque des poissons d'origine sauvage qui n'appartiennent pas à une exploitation, ainsi que des poissons des lacs, étangs ou autres sites destinés à la pratique de la pêche, d'agrément ou détenant des poissons d'ornement, sont suspects d'être infectés ou sont infectés, le préfet prescrit les mesures appropriées à mettre en oeuvre.

**Titre III : Mesures de lutte contre la nécrose hématoïétique infectieuse et la septicémie hémorragique virale****Article 15**

La vaccination contre la nécrose hématoïétique infectieuse et la vaccination contre la septicémie hémorragique virale sont interdites dans les zones indemnes et les exploitations indemnes ainsi que dans les zones ou les exploitations qui mettent en oeuvre des programmes de qualification en vue de l'obtention de l'agrément communautaire relatif au statut indemne de ces maladies.

**Article 16**

Lorsque la nécrose hématoïétique infectieuse ou la septicémie hémorragique virale est suspectée dans une exploitation indemne ou une zone indemne, le préfet prend, sur proposition du directeur des services vétérinaires, un arrêté de mise sous surveillance de cette exploitation ou de tout ou partie de la zone.

L'arrêté de mise sous surveillance prescrit l'isolement et la séquestration des animaux, les examens cliniques et les prélèvements nécessaires à la confirmation de la maladie, ainsi que toute mesure nécessaire pour éviter la propagation de la maladie.

En outre, cet arrêté prescrit la mise en oeuvre d'une enquête épidémiologique telle que décrite à l'article 7 du présent arrêté.

**Article 17**

L'arrêté de mise sous surveillance est levé lorsque toute suspicion de la maladie est écartée.

**Article 18**

Lorsque l'existence de la nécrose hématoïétique infectieuse ou la septicémie hémorragique virale est officiellement confirmée dans une zone indemne ou une exploitation indemne, le préfet prend, sur proposition du directeur des services vétérinaires, et conformément à l'article 228 du code rural, un arrêté portant déclaration d'infection de l'exploitation.

L'arrêté portant déclaration d'infection prescrit toute mesure nécessaire pour éviter la propagation de la maladie.

Les poissons morts ou présentant des signes cliniques et tous les déchets sont détruits sans délai sous le contrôle des services vétérinaires.

Les bâtiments et leurs abords, les véhicules de transport et tout le matériel susceptible d'être contaminé sont nettoyés et désinfectés sous le contrôle des services vétérinaires.

La sortie des animaux et produits d'aquaculture, excepté ceux destinés à la consommation humaine, est interdite.

Lorsque l'abattage a été décidé en vue de l'éradication du foyer, le directeur des services vétérinaires peut autoriser l'engraissement des poissons ne présentant aucun signe clinique de maladie jusqu'à la taille commerciale, en vue de leur commercialisation ou de leur transformation pour l'alimentation humaine.

**Article 19**

Si l'enquête épidémiologique révèle que la maladie peut avoir été introduite à partir d'une autre zone indemne ou d'une autre exploitation indemne ou communiquée à une autre zone indemne ou exploitation indemne notamment à la suite d'un mouvement de poissons, d'oeufs, de gamètes, d'animaux, de véhicules ou de personnes alors lesdites zones ou exploitations sont soumises aux mesures prévues à l'article 16.

**Article 20**



Lorsque la nécrose hématoïétique infectieuse ou la septicémie hémorragique virale est suspectée dans une exploitation non indemne, le directeur des services vétérinaires fait procéder aux examens cliniques et aux prélèvements nécessaires à la confirmation ou à l'infirmité de la maladie.

#### Article 21

Lorsque l'existence de la nécrose hématoïétique infectieuse ou de la septicémie hémorragique virale est confirmée dans une exploitation non indemne, le préfet prend, sur proposition du directeur des services vétérinaires, un arrêté portant déclaration d'infection qui prescrit toute mesure nécessaire pour éviter la propagation de la maladie.

Sous le contrôle des services vétérinaires, les poissons présentant des signes cliniques ou morts et tous les déchets sont détruits sans délai, les bâtiments et leurs abords, les véhicules de transport et tout le matériel susceptible d'être contaminé sont nettoyés et désinfectés.

En dérogation à l'article 3, point c, de l'arrêté du 10 avril 1997 susvisé, le directeur des services vétérinaires peut autoriser la sortie de l'exploitation infectée d'oeufs, de gamètes ou de poissons vivants ne présentant aucun signe clinique à destination d'exploitations infectées par la même maladie ou pour l'abattage en vue de leur commercialisation ou de leur transformation pour l'alimentation.

#### Article 22

L'arrêté portant déclaration d'infection prévu aux articles 18 et 21 du présent arrêté peut être levé sur proposition du directeur des services vétérinaires après exécution, mutatis mutandis, des opérations visées à l'article 10, points 1 et 3, du présent arrêté et réalisation d'un vide sanitaire d'une durée fixée en fonction de la température, et en tout état de cause d'au moins quinze jours, avant la remise en eau des installations.

#### Titre IV : Dispositions finales

#### Article 23

La destruction des poissons morts ou mis à mort relève du service public de l'équarrissage, conformément à l'article 264 du code rural.

#### Article 24

L'arrêté du 16 mars 1987 relatif à la lutte contre les maladies réputées contagieuses des salmonidés et l'arrêté du 25 mars 1987 relatif aux mesures de lutte contre les maladies réputées contagieuses des salmonidés en rivière sont abrogés.

#### Article 25

Sans préjudice de l'application des articles 328, 329 et 331 du code rural, les infractions aux dispositions du présent arrêté donnent lieu à l'application des peines prévues par le décret du 18 février 1963 susvisé.

#### Article 26

La directrice générale de l'alimentation au ministère de l'agriculture et de la pêche, le directeur du budget au ministère de l'économie, des finances et de l'industrie et les préfets sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 22 septembre 1999.

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,  
Pour le ministre et par délégation :  
La directrice générale de l'alimentation,  
M. Guillou

Le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie,  
Pour le ministre et par délégation :  
Par empêchement du directeur du budget :  
Le sous-directeur,  
F. Mordacq

+++++



1999199

**ARRÊTÉ MINISTÉRIEL DU 23 SEPTEMBRE 1999**

établissant des mesures financières relatives à la lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons

(JO n°241 du 16 octobre 1999, page 15508)

NOR : AGRG9902025A

- Le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie et le ministre de l'agriculture et de la pêche,
- Vu le code rural, notamment ses articles 214, 224 et 225 ;
  - Vu le décret n°90-437 du 28 mai 1990 fixant les conditions et les modalités de règlement des frais occasionnés par les déplacements des personnels civils sur le territoire métropolitain de la France lorsqu'ils sont à la charge des budgets de l'Etat, des établissements publics nationaux à caractère administratif et de certains organismes subventionnés ;
  - Vu le décret n°99-822 du 16 septembre 1999 ajoutant à la nomenclature des maladies des animaux réputées contagieuses la nécrose hémato-poïétique infectieuse et la septicémie hémorragique virale de certaines espèces de poissons ainsi que l'anémie infectieuse du saumon ;
  - Vu l'arrêté du 10 avril 1997 relatif aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture ;
  - Vu l'arrêté du 22 septembre 1999 établissant des mesures de lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons ;
  - Vu l'avis de la Commission nationale vétérinaire (comité consultatif de la santé et de la protection animale) en date du 18 juin 1999 ;
  - Vu l'avis de l'Agence française de la sécurité sanitaire des aliments en date du 9 août 1999,

Arrêtent

**Article 1er**

Dans chaque département, le préfet, compte tenu des mesures prescrites par l'arrêté du 22 septembre 1999 susvisé assure la répartition et le versement des indemnités et rémunérations prévues par le présent arrêté.

Les montants des participations financières de l'Etat inscrits dans le présent arrêté sont calculés sur des montants hors taxes.

Participation de l'Etat au titre de l'obtention de la qualification  
des élevages vis-à-vis de la NHI et de la SHV

**Article 2**

Dans le cadre de l'application d'un programme de qualification volontaire des élevages en vue de l'obtention d'une qualification d'élevage ou de zone indemne vis-à-vis des maladies réputées contagieuses, mis en oeuvre après validation par le directeur des services vétérinaires du département, il est attribué aux pisciculteurs, au titre de la participation de l'Etat au coût des prélèvements et analyses, une somme égale à la moitié du coût de ces interventions, avec un maximum de 7 500 F par pisciculture et par an.

**Article 3**

L'Etat participe financièrement aux visites sanitaires réalisées dans le cadre d'un programme de qualification tel que visé à l'article 2 et exécutées par des vétérinaires sanitaires.

Pour chaque visite sanitaire de l'établissement, comprenant l'examen des lots de poissons présents dans l'établissement, la réalisation des prélèvements nécessaires, l'envoi ou la remise de ces prélèvements au laboratoire, le contrôle du registre d'élevage, la rédaction du compte rendu d'intervention correspondant, il est alloué quatre fois le montant de l'acte médical défini par l'ordre des vétérinaires.

Deux visites, au maximum, sont prises en charge par exploitation et par an.

Participation de l'Etat au titre de la police sanitaire  
vis-à-vis des maladies réputées contagieuses des poissons

**Article 4**

L'Etat rémunère les vétérinaires sanitaires chargés de l'exécution des mesures de police sanitaire prescrites par l'arrêté du 22 septembre 1999 susvisé, dans les conditions suivantes :

- a) Visite de l'établissement lors de suspicion de maladie réputée contagieuse comprenant :
  - l'examen des lots de poissons suspects ;
  - la visite de l'établissement suspect ;
  - la réalisation des prélèvements nécessaires ;
  - l'envoi ou la remise de ces prélèvements au laboratoire ;
  - les prescriptions au responsable de l'établissement des mesures sanitaires à respecter ;
  - la rédaction des documents et des comptes rendus d'intervention correspondants.

Il est alloué huit fois le montant de l'acte médical défini par l'ordre des vétérinaires.  
Une seule visite est prise en charge par suspicion.
- b) Visite de l'établissement déclaré infecté de maladie réputée contagieuse comprenant :
  - le recensement des animaux et produits d'aquaculture présents dans l'établissement ;
  - la visite de l'établissement suspect ;
  - la réalisation d'une enquête épidémiologique dans l'élevage d'origine en liaison avec le directeur des services vétérinaires afin de repérer l'ensemble des animaux susceptibles d'être atteints ou de transmettre la maladie ;
  - le contrôle de l'application par la personne responsable des mesures prescrites par l'arrêté préfectoral portant déclaration d'infection ;
  - la rédaction des documents et des comptes rendus d'interventions correspondants.

Il est alloué huit fois le montant de l'acte médical défini par l'ordre des vétérinaires.
- c) Visite de tout établissement relié épidémiologiquement à un foyer de maladie réputée contagieuse comprenant :
  - le recensement des animaux et produits d'aquaculture présents dans l'établissement ;



- l'examen des lots de poissons présents dans l'établissement ;
  - la réalisation des prélèvements nécessaires ;
  - l'envoi ou la remise de ces prélèvements au laboratoire ;
  - les prescriptions au responsable de l'établissement des mesures sanitaires à respecter ;
  - la rédaction des documents et des comptes rendus d'intervention correspondants.
- Il est alloué huit fois le montant de l'acte médical défini par l'ordre des vétérinaires.

**Article 5**

L'Etat prend à sa charge les analyses réalisées pour la confirmation d'une maladie réputée contagieuse des poissons ainsi que celles afférentes à l'enquête épidémiologique décrite à l'article 7 de l'arrêté du 22 septembre 1999 susvisé.

**Article 6**

Sous réserve que la pisciculture soit engagée antérieurement à la déclaration de suspicion d'infection dans un programme de qualification volontaire des élevages en vue de l'obtention d'une qualification d'élevage ou de zone indemne vis-à-vis des maladies réputées contagieuses, mis en oeuvre après validation par le directeur des services vétérinaires du département, ou qu'elle soit officiellement agréée au titre de l'arrêté du 10 avril 1997 susvisé, à cette même date, il est alloué une indemnité aux propriétaires des animaux d'aquaculture éliminés en application de l'article 10 et de l'article 22 de l'arrêté du 22 septembre 1999 susvisé. Le montant de cette indemnité est égal à 50 % de la valeur d'estimation des animaux éliminés. Il ne peut toutefois excéder 80 000 F.

Pour l'estimation de la valeur des animaux d'aquaculture, il est fait abstraction de la maladie réputée contagieuse dont ils sont atteints.

L'estimation est faite par le directeur des services vétérinaires, ou son représentant, en accord avec le propriétaire.

En cas de désaccord, elle est réalisée par un expert choisi par le propriétaire sur une liste dressée par arrêté préfectoral.

En cas d'urgence, l'estimation peut être faite après réalisation de l'élimination.

**Article 7**

Dans les cas où la chair des animaux d'aquaculture éliminés aura été livrée en vue de la consommation et dans le cas où des animaux auront été destinés à un élevage infecté de la même maladie selon les conditions de la dérogation prévue à l'article 21 de l'arrêté du 22 septembre 1999 susvisé, le produit de la vente perçue par le propriétaire sera déduit de la valeur d'estimation calculée conformément à l'article précédent.

**Article 8**

L'Etat participe financièrement aux opérations de désinfection des exploitations déclarées infectées de maladie réputée contagieuse des poissons.

Lorsqu'elles sont effectuées dans les conditions et les délais prescrits par le directeur des services vétérinaires, les opérations de désinfection prévues par l'arrêté du 22 septembre 1999 susvisé font l'objet d'une participation financière de l'Etat, dans la limite des sommes effectivement engagées par le responsable de l'établissement.

Le montant maximum de l'aide allouée par l'Etat à ce titre est fixé à 3 000 F par établissement.

Le mandatement des participations mentionnées aux alinéas précédents est subordonné à la production au directeur des services vétérinaires de factures acquittées ou d'un relevé justificatif des sommes effectivement dépensées.

**Article 9**

Les indemnités prévues à l'article 6 du présent arrêté ne sont pas attribuées dans les cas suivants :

- a) Introduction de poissons, oeufs ou gamètes en infraction avec le programme de qualification des exploitations vis-à-vis des maladies réputées contagieuses tel que visé à l'article 2 ;
- b) Non-respect par le responsable de l'établissement infecté des prescriptions de l'arrêté portant déclaration d'infection ou de l'arrêté préfectoral de mise sous surveillance de son établissement ;
- c) Toute négligence grave du responsable de l'établissement de nature à favoriser l'apparition ou l'extension de la maladie ;
- d) Toute circonstance faisant apparaître l'intention abusive du responsable de l'établissement de détourner la réglementation de son objet.

**Article 10**

Les indemnités mentionnées dans le présent arrêté sont allouées par le ministre de l'agriculture et de la forêt, dans la limite des crédits dont il dispose.

**Article 11**

Les experts chargés de procéder à l'estimation d'un cheptel piscicole tel que prévu à l'article 6 du présent arrêté sont rémunérés sur la base d'une vacation par dix tonnes ou fraction de dix tonnes de poissons éliminés.

Le taux de la vacation est fixé à 1/200 de la rémunération brute mensuelle d'un agent de l'Etat classé à l'indice brut 658 (traitement brut et indemnité de résidence au taux de la troisième zone).

**Article 12**

Pour les déplacements afférents aux visites mentionnées à l'article 4 et à l'article 6 du présent arrêté, les experts et les vétérinaires sanitaires perçoivent des indemnités kilométriques calculées selon les modalités applicables aux fonctionnaires et agents de l'Etat conformément aux dispositions du décret du 28 mai 1990 susvisé.

**Article 13**

L'arrêté du 9 novembre 1987 relatif à l'indemnisation des propriétaires de salmonidés éliminés dans le cadre du plan d'assainissement des exploitations atteintes de maladies réputées contagieuses des salmonidés est abrogé.

**Article 14**

La directrice générale de l'alimentation au ministère de l'agriculture et de la pêche, le directeur du budget au ministère de l'économie, des finances et de l'industrie et les préfets sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.



Fait à Paris, le 23 septembre 1999.

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,  
Pour le ministre et par délégation :  
La directrice générale de l'alimentation,  
M. Guillou

Le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie,  
Pour le ministre et par délégation :  
Par empêchement du directeur du budget :  
Le sous-directeur,  
F. Mordacq

+++++



ANNEXE 4

**Modèle d'arrêté portant déclaration d'infection de  
nécrose hématoïétique infectieuse / septicémie hémorragique virale**

Vu le code rural, notamment, les articles 214, 215-1 à 215-8, 225 à 228, 264 à 269, 328, 329 à 331;

Vu le décret n° 63-136 du 18 février 1963 relatif aux mesures de lutte contre les maladies des animaux ;

Vu le décret modifié n° 71-636 du 21 juillet 1971 pris pour l'application des articles 258, 259 et 262 du code rural et relatif à l'inspection sanitaire et qualitative des animaux vivants et des denrées animales ou d'origine animale ;

Vu le décret n° 99-822 du 16 septembre 1999 ajoutant à la nomenclature des maladies des animaux réputées contagieuses la nécrose hématoïétique infectieuse et la septicémie hémorragique virale de certaines espèces de poissons ainsi que l'anémie infectieuse du saumon ;

Vu l'arrêté interministériel du 10 avril 1997 relatif aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 septembre 1999 établissant des mesures de lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons ;

Vu l'arrêté interministériel du 23 septembre 1999 établissant des mesures financières relative à la lutte contre les maladies réputées contagieuses des poissons,

Vu l'arrêté préfectoral n° . . . . . donnant délégation de signature

Vu l'isolement du virus de la nécrose hématoïétique infectieuse (NHI)/ de la septicémie hémorragique virale (SHV) à la suite de l'examen réalisé par le laboratoire de diagnostic agréé . . . . . le . . . . ., analyse n° (référence de l'analyse) . . . . . sur des . . . . . (préciser l'espèce)  
provenant de l'exploitation de (nom et adresse de l'exploitant) . . . . . située sur la rivière (si exploitation en eau libre). . . . .

CONSIDERANT QUE, PAR CONSÉQUENT, le cheptel piscicole de l'exploitation de M. . . . .  
. . . . . est atteint de la nécrose hématoïétique infectieuse / septicémie hémorragique virale, et qu' il convient de prendre les mesures nécessaires pour éviter toute diffusion de la maladie, conformément aux dispositions réglementaires en vigueur,

SUR proposition du directeur des services vétérinaires

**A R R E T E**

Article 1<sup>er</sup> : L'exploitation de M. . . . . domicilié. . . . . située sur la rivière (supprimer si eau close). . . . . au lieu-dit. . . . . est déclarée atteinte de nécrose hématoïétique infectieuse / septicémie hémorragique virale. Elle est placée sous la surveillance du directeur des services vétérinaires.



Article 2: Le périmètre déclaré infecté est constitué de l'ensemble des installations de l'exploitation (préciser si nécessaire).

Article 3 : La présente déclaration d'infection entraîne l'application des mesures suivantes dans ladite exploitation :

Les poissons morts ou présentant des signes cliniques et tous les déchets sont détruits sans délai sous le contrôle des services vétérinaires

Aucun poisson vivant ou mort, œuf ou gamète ne peut entrer dans l'exploitation sans autorisation du directeur des services vétérinaires. La sortie des animaux et produits d'aquaculture est interdite, excepté pour la commercialisation ou la transformation en vue de la consommation humaine, sous contrôle du directeur des services vétérinaires.

Par dérogation, le directeur des services vétérinaires peut autoriser, sous couvert d'un laissez passer, la sortie de poissons et de produits d'aquaculture issus de poissons, ne présentant pas de signes cliniques, vers une autre exploitation atteinte de la même maladie avec l'accord du directeur des services vétérinaires de l'exploitation de destination.

Les poissons et les produits d'aquaculture mis sur le marché et destinés à la consommation humaine doivent provenir d'animaux ne présentant pas de signes cliniques au moment de l'abattage. Ils seront éviscérés sur place ou dans un établissement agréé, avant leur mise sur le marché, dans des conditions évitant tout risque de dissémination des agents pathogènes et dans le respect des règles sanitaires.

- Il est strictement interdit d'utiliser les poissons, œufs ou gamètes provenant de cette exploitation pour réempoissonner ou réensemencer le milieu naturel (mer, cours d'eau, lacs...).
- Des moyens appropriés de désinfection doivent être utilisés aux entrées et sorties de l'exploitation et toutes les autres mesures propres à éviter la propagation de l'agent pathogène sont mises en œuvre à la diligence de l'exploitant.
- Toute matière et tout déchet susceptibles d'être contaminés sont soumis à un traitement assurant la destruction des agents responsables de l'apparition des maladies réputées contagieuses des salmonidés.

Article 4 : Le vétérinaire sanitaire ou un agent des services vétérinaires effectue une enquête épidémiologique approfondie pour déterminer les sources possibles de l'infection et identifier les exploitations qui ont pu se contaminer. Cette enquête est réalisée notamment dans toutes les exploitations et dispositifs contenant des espèces sensibles de la zone comprise entre ..... en amont et ..... en aval de l'exploitation infectée et dans toutes les exploitations ayant un lien épidémiologique (entrée, sortie de poissons et produits d'aquaculture) susceptible d'expliquer l'origine et l'extension de la contamination.

Article 5 : La levée de l'arrêté portant déclaration d'infection pourra intervenir sur proposition du directeur des services vétérinaires après la constatation par celui-ci ou son représentant de l'exécution effective des opérations mentionnées ci-dessous :

La totalité des poissons et produits d'aquacultures (toutes espèces, sensibles et non sensibles) présente sur l'exploitation est éliminée.



- L'exploitation est mise à sec.
- Les bâtiments et leurs abords, les bassins, les véhicules de transport et tout le matériel sont nettoyés et désinfectés de manière à empêcher toute pollution du milieu naturel.

Après la mise à sec, le nettoyage et la désinfection, un vide sanitaire d'une durée fixée en fonction des conditions d'ensoleillement, et en tout état de cause d'au moins quinze jours, avant la remise en eaux des installations, est respecté.

Article 6 : Les infractions aux dispositions du présent arrêté seront constatées et poursuivies conformément aux textes en vigueur.

Article 7 : Le secrétaire général de la préfecture, le maire de la commune de . . . . . le commandant du groupement de gendarmerie, le directeur des services vétérinaires et le docteur . . . . . vétérinaire sanitaire à . . . . . sont chargés chacun en ce qui les concerne de l'exécution du présent arrêté.

Fait à . . . . ., le

Pour le préfet et par délégation  
Le directeur des services vétérinaires



## Formulaire de déclaration de foyer

**DECLARATION D'UN FOYER DE : NHI  SHV**

*(à envoyer à la DGAL/SDSPA/Bureau santé animale – Télécopie 01 49 55 43 98 pour chaque foyer)  
dès confirmation du laboratoire*

N° d'ordre du foyer dans le département : ..../.../.....  
*(N° minéralogique /millésime de l'année/ N° d'ordre du foyer dans l'année considérée par maladie)*

Commune du foyer :

Coordonnées de la pisciculture :

**Type de pisciculture :**  
ESPECES PRESENTES

**TONNAGE ANNUEL**                      Tonnes

**Alimentation en eau:\***

*\*Cocher toutes les cases utiles*

- mer
- source
- dérivation de rivière
- étang
- eau close
- autre:  
*(préciser)*

Nom du cours  
d'eau:

**Type d'activité:\***

- reproduction
- grossissement
- éclosion
- autre:  
*(préciser)*

**Devenir de la production:\***

- pêche de loisir
- repeuplement du milieu naturel
- consommation / transformation
- vente à d'autres pisciculteurs
- autre:  
*(préciser)*

**Qualification sanitaire antérieure de la pisciculture**

- zone agréée
- exploitation agréée
- zone en cours d'agrément
- exploitation en cours d'agrément
- statut inconnu
- autre :

**Analyse et signes cliniques dans l'élevage**

Date du résultat : .. / .. / .. .

Laboratoire ayant réalisé l'analyse :

Méthode utilisée : isolement sur culture cellulaire et identification par neutralisation virale et immunofluorescence

Date du prélèvement : .. / .. / .. .

motif du prélèvement:  signes cliniques  
 lien épidémiologique  
 analyse de qualification  
autre *(préciser)* :

Prise d'un APMS ou d'un courrier signifiant que l'élevage est suspect :  oui      date  
 non

Signes cliniques se rapportant à la NHI/SHV dans l'exploitation  oui  
 non

Effectifs atteints *(description : espèces et catégories concernées)*

Type de foyer :  primaire  
 secondaire → foyer d'origine *(référence)* :  
et coordonnées





**Origine de la maladie**

inconnue – enquête en cours

inconnue – non élucidée après enquête

contamination de voisinage

introduction de poissons, œufs ou gamètes

objets inanimés

infection latente dans l'élevage

réapparition

autre (préciser)

Date présumée de l'infection : . . / . . / . . . . .

**Etat des effectifs au moment de la déclaration (en nombre et non en tonnage)**

Nombre de poissons présents	
Nombre de poissons trouvés morts	
Nombre de poissons cliniquement atteints	
Nombre de poissons abattus	
Nombre de poissons détruits	

**Gestion du foyer : (indiquer les données connues à la date de la déclaration)**

Date de l'APDI : . . / . . / . . . . .

Mesures mises en œuvre :

Séquestration de l'élevage

oui

non

Enquête épidémiologique

oui

non

Devenir des poissons trouvés morts

Equarrissage

autre (préciser) :

Devenir des poissons cliniquement atteints

Equarrissage

autre (préciser) :

Devenir des autres poissons :

- ayant atteints une taille commerciale

Consommation humaine

Equarrissage

Non connu

autre (préciser) :

- autres

Engraissement

Equarrissage

Non connu

autre (préciser) :

Destruction de tous les poissons de l'exploitation  
(animaux destinés à l'équarrissage)

oui

date (estimée) :

non

Abattage de tous les poissons de l'exploitation  
(récupération en vue de la consommation humaine)

oui

date (estimée)

non

Autres mesures mise en œuvre (préciser) :

**Suivi du foyer : (à compléter ultérieurement)**

Date de désinfection : . . / . . / . . . . .

Date de levée de l'APDI : . . / . . / . . . . .



TOULOUSE, 2001

NOM : GENTRIC

PRENOM : KARINE

TITRE : LE POINT SUR LA NECROSE HEMATOPOÏETIQUE INFECTIEUSE ET LA SEPTICEMIE HEMORRAGIQUE VIRALE DES SALMONIDES

RESUME :

La Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (N.H.I.) et la Septicémie Virale Hémorragique (S.H.V.) sont deux viroses qui infectent les salmonidés. Nous nous y intéressons ici en tant que fléaux de la salmoniculture. L'épidémiologie dans le milieu naturel n'est pas totalement élucidée à ce jour. Déclarées maladies légalement reconnues contagieuses en France depuis 1985, leur déclaration est obligatoire. Des qualifications ont été mises en place pour les piscicultures afin de gérer les risques liés aux échanges. Des mesures de police sanitaire y sont associées. Cependant, les effets de ces mesures réglementaires n'apparaîtront pas rapidement. Un vaccin serait donc salvateur. Les virus impliqués appartiennent à la famille des *Rhabdoviridae*, genre *Novirhabdovirus*. Ils exposent à leur surface une glycoprotéine très immunogène et donc d'intérêt majeur dans la recherche d'un vaccin. Différentes équipes travaillent en parallèle pour découvrir de nouvelles pistes dans la vaccination. Le meilleur compromis entre la protection engendrée et les exigences techniques et sanitaires a été obtenu avec les vaccins génétiques. A ce jour, les différentes voies ont été explorées mais des connaissances plus précises sur les poissons et leur système de défense éclaireraient les premières avancées.

MOTS CLES : SALMONIDES – MLRC – NECROSE HEMATOPOIETIQUE INFECTIEUSE – SEPTICEMIE HEMORRAGIQUE VIRALE

---

ENGLISH TITLE : SUM UP INFECTIOUS HAEMATOPOIETIC NECROSIS AND VIRAL HEMORRAGIC SEPTICEMIA

ABSTRACT :

Infectious Haematopietic Necrosis (I.H.N.) and Viral Hemorrhagic Septicemia (V.H.S.) are two viral infections that infect salmonids. We interest in them as scourge of salmon farming. Epidemiology in natural environment is not completly elucidate today. Since they have been declared as lawfully recognized contagious in France in 1985, their declaration is mandatory. Labels have been introduced for fish farming in order to manage risk linked to swap. Sanitary police are joined. Nevertheless, the effects of these statutory procedúres won't be immediate. A vaccine would be saving. Viruses implied belong to *Rhabdoviridae* family, *Novirhabdovirus* kind. They expose a glycoprotein to their surface, very immunogenic and of large interest for the research of a vaccine. Different research teams work at the same time in order to discover new trails in vaccination. Best compromise between protection and technical and sanitary requirements is obtained with genetic vaccines. Today, different ways have been examined but a more precise knowledge about fishes and their immune defence system is needed to clarify first overhangs.

KEY WORDS : SALMONIDS – LEGALLY CONTAGIOUS DISEASES - INFECTIOUS HAEMATOPOIETIC NECROSIS – VIRAL HEMORRAGIC SEPTICEMIA

