

CEV : Une maladie émergente omniprésente sur le territoire français.

Etat des lieux et identification génétique – Projet CEViral

J. LAITHIER¹ & A. TOCQUEVILLE¹

Contact : laithier@itavi.asso.fr

¹ ITAVI – Service Aquaculture – ROUEN



Etude financée par :



Résumé

La maladie du sommeil de la carpe dont l'agent responsable est le CEV (Carp Edema Virus) affecte les carpes communes et les carpes koï et provoque des fortes mortalités. L'absence de diagnostic systématique de la maladie et le manque de connaissances à son sujet limite la sensibilisation des acteurs au CEV et ne permet pas la mise en place d'une stratégie efficace de lutte. En France, la quasi totalité du territoire est concernée par la maladie et aucune région ne semble épargnée, les cas surviennent tout au long de l'année, avec des pics saisonniers. Le séquençage du virus a permis de mettre en évidence que des recombinaisons entre les deux génogroupes sont possibles, d'autant plus que le virus est en mutation permanente et de nouvelles souches potentiellement plus virulentes peuvent apparaître. Les études épidémiologiques sont indispensables afin de mettre en évidence et d'interpréter les résultats du séquençage. Des liens ont pu être établis entre des souches similaires du virus et une origine commune du poisson entre différents plans d'eau. La détection préalable du virus avec la méthode de détection dans l'eau de transport (pour les carpes koï) est une méthode prometteuse puisqu'elle permet une bonne représentativité de l'ensemble du lot avec une bonne sensibilité alors même que les individus ne présentent aucun signe clinique de la maladie. Cette méthode est une piste pour la détection du virus chez les carpes communes et notamment dans les cuves de transport où les poissons sont en forte densité. Si la maladie continue d'être propagée année après année dans des nouveaux sites en France, il est indispensable d'avoir une meilleure connaissance par les acteurs des filières piscicoles en étangs, pêche de loisir, production de poissons d'ornements, etc.... au sein de la filière étang de l'existence de cette maladie, des modalités de transmission et de son diagnostic, ce qui permettrait une meilleure réactivité pour identifier les foyers et de renforcer la prévention.

1. Contexte

Le Carp Edema Virus (CEV) affecte aussi bien les carpes communes que les carpes Koï (*Cyprinus carpio*) à tous les stades de vie, juvéniles comme adultes. La maladie du sommeil de la carpe est très contagieuse et se transmet par contact direct entre les poissons ou via l'environnement (le virus peut par exemple persister dans l'eau et infecter des poissons sains). La mortalité induite par le virus est souvent très élevée. De nombreux pisciculteurs et parcours de pêche ont subi des épisodes de fortes mortalités en lien avec le CEV. Les mortalités et notamment celles en étangs sont parfois peu visibles et la maladie du sommeil peut être confondue à tort avec d'autres maladies virales. Les événements de mortalité ne sont pas signalés auprès des vétérinaires aquacoles dont le réseau est vigilant sur le CEV et peu d'analyses sont faites en laboratoire. Le

sous-diagnostic de la maladie résulte en un nombre réel de cas considérablement sous-estimé.

Le projet « CEViral » a pour objectif premier d'améliorer les connaissances sur l'origine et les causes des épisodes de CEV ainsi que sur la transmission, la circulation du virus et de ses variants dans les populations de carpes. La finalité du projet est double, d'une part d'informer au mieux les acteurs sur la propagation du virus et les risques qu'elle implique, et d'autre part de prévoir ensemble une stratégie de lutte contre le CEV. Plusieurs volets ont été étudiés durant ce projet : réaliser un état des lieux des cas positifs de CEV et leur répartition sur le territoire français ; améliorer les techniques de détection du virus en comparant deux méthodes (prélèvement branchial vs écouvillon branchial) ; identifier les souches du virus grâce au séquençage ; mettre en évidence

la dynamique de diffusion du virus au travers des études épidémiologiques ; et enfin envisager les perspectives futures.

Le présent article a pour vocation d'établir le bilan de ce projet et envisage les pistes intéressantes pour la suite.

Facteurs de déclenchement de la maladie :

- **Température** (souches d'eau froide 6-12°C et d'eau tempérée 17-24°C)
- **Stress** : transport du poisson, manipulation, capture...

Les principaux symptômes :

- Hypersécrétion de **mucus**
- **Enophtalmie** : enfoncement des yeux dans la cavité orbitale
- Signe de **léthargie** : **nage en surface** et/ou sur le côté

2. Le projet CEVIRAL

2.1. Origine des carpes

Pour caractériser les souches impliquées, le projet englobe autant les carpes communes et koï en étangs piscicoles que dans les fermes piscicoles, les parcours de pêche, les bassins, dans le milieu naturel, en animalerie, etc. Toutes les mortalités de carpes ayant lieu dans un des sites listés sont compatibles avec le projet.

2.2. Territoire d'étude

Le projet se base sur la totalité du territoire français. Un des objectifs est de comprendre la dynamique de présence et de circulation du virus. Il est donc important de pouvoir retracer les souches sur l'ensemble de la France.

2.3. Un appel aux volontaires : le processus

Dans le but de documenter et de développer les connaissances sur la maladie, le projet CEVIRAL s'inscrit dans une démarche de diagnostic. Pour ce faire, un kit d'échantillonnage est envoyé aux pisciculteurs et autres acteurs volontaires (*fédérations et associations de pêche, propriétaires d'étangs...*) qui souhaitent vérifier la présence du

CEV dans leurs populations de carpes lors d'un événement de mortalités.

2.3.1. Constatation de mortalités

Le premier signe alarmant est un épisode de forte mortalité qui dénote avec la mortalité naturelle. Selon les cas de figure, il est plus ou moins aisé de remarquer les symptômes typiques de la maladie du sommeil, voire même de détecter les mortalités selon la configuration des étangs (*accès, fréquence de passage...*). Dès lors qu'il y a une suspicion de CEV, un kit de prélèvement est envoyé aux participants volontaires qui en font la demande.

2.3.2. Le kit de prélèvement

Le kit permet de réaliser deux prélèvements : un prélèvement branchial classique ainsi qu'un prélèvement par écouvillon branchial. Le but est de distinguer la sensibilité des deux méthodes grâce aux CT (Cycle Threshold) lors des qPCR et ainsi optimiser le diagnostic et mettre en évidence la complémentarité ou la méthode la plus fiable. Il est à noter que l'écouvillon branchial n'est pas une méthode létale et permettrait donc de diagnostiquer des carpes dites « trophées » à forte valeur économique sans tuer l'animal.

Tout l'équipement nécessaire pour prélever est contenu dans le kit (Figure 1). De plus, une fiche commémorative est jointe au kit et permet de renseigner l'historique de(s) maladie(s) sur le site, la température de l'eau, les conditions de survenue de l'épisode de mortalité, etc...



Figure 1 : Détail du contenu d'un kit de prélèvement

2.4. Détection par les laboratoires d'analyses

Dans le cadre du projet, les échantillons sont transmis vers les 3 laboratoires compétents pour la détection du CEV. Ils reçoivent les échantillons et réalisent les analyses de détection du CEV. La répartition des envois aux laboratoires est fonction de la proximité géographique entre les cas de mortalités et les laboratoires du LDA39, du LPL et du LDV34.

Lors d'une détection positive, les participants volontaires sont informés rapidement au travers du rapport d'analyses. L'échantillon positif est conservé par les laboratoires avant d'être envoyé aux autres partenaires du projet : d'abord à l'ANSES pour identification de la souche puis à l'ENVT pour le génotypage complet du virus.

2.5. Travaux d'identification génétique

2.5.1. ANSES

Tous les échantillons positifs sont envoyés au laboratoire de l'ANSES à Plouzané pour tenter de comprendre plus en détail le virus et sa circulation. Chaque échantillon fait l'objet d'un séquençage du gène p4a (qui représente 0.2% du génome du virus) et permet ainsi de déterminer la souche du virus. Une fois identifiées, les souches sont placées sur un arbre phylogénétique.

En incrémentant la base de données, l'arbre devient plus précis et permet d'établir aisément les liens de parenté entre celles-ci (Figure 2).

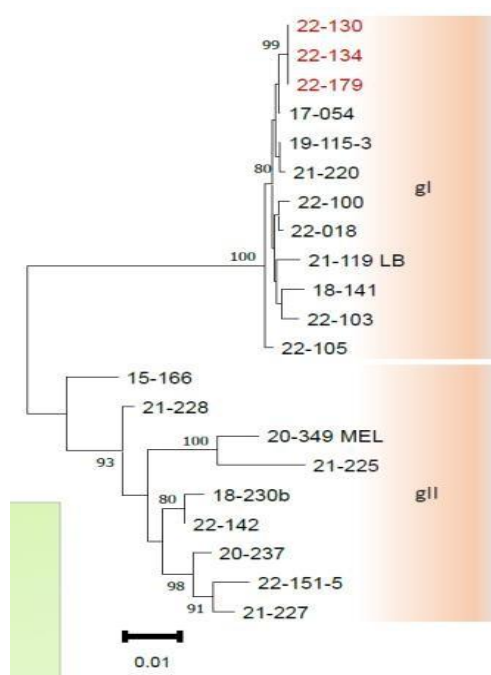


Figure 2 : Relations génétiques entre séquences du gène p4a. En rouge les séquences du Tarn. L'échelle représente le nombre de substitutions par site.

2.5.2. ENVT – Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Les échantillons d'intérêt sont ensuite envoyés à l'ENVT pour déterminer le génome complet du virus. En effet, le génome complet du virus inféodé aux carpes koï (génogroupe de type II) demeure inconnu. En parallèle, l'ENVT continue de tester la détection sur l'eau de transport de carpes koï. Cette technique de détection est avantageuse puisqu'elle ne nécessite pas de manipulation du poisson. De plus, le virus est facilement détectable car les poissons sont confinés dans un volume d'eau restreint pendant plusieurs jours. S'ils sont porteurs du virus et qu'ils en excrètent une quantité trop faible pour une détection sur branchie et par écouvillon, l'eau par contre se concentre en virus au fur et à mesure du temps des sécrétions et il est alors plus simple de détecter le virus.

3. Résultats et pistes de réflexion

3.1. Les sollicitations et les cas positifs

Au global, 135 kits de prélèvements ont été envoyés sur la période du projet. Les sollicitations ont été nombreuses et concernent principalement les AAPPMA (Association Agréée de Pêche et de Protection du Milieu Aquatique) mais aussi les fédérations de pêche, les parcours de pêche privés, les particuliers, les revendeurs de poissons en animalerie, les lycées aquacoles, les vétérinaires, etc...

Le bilan des résultats positifs de la maladie du sommeil de la carpe est le suivant :

- 17 cas positifs ont été identifiés en 2021 (recensés par les laboratoires et vétérinaires avant le début du projet)
- 30 cas positifs sur l'année 2022
- 27 cas positifs de janvier à juin 2023

Soit au total 74 cas positifs répertoriés sur la période de l'étude CEViral.

Il est à noter que le nombre de cas positifs est sensiblement le même entre 2022 et la première moitié de 2023. Cela peut s'expliquer pour plusieurs raisons : il est possible que les cas ont été plus nombreux en 2023 (cependant nous n'avons pas d'historique car aucun recensement de ce genre n'a eu lieu en France auparavant), il est également possible que les cas n'ont au contraire pas augmenté mais qu'il y a eu un plus grand nombre de volontaires pour participer à l'étude (grâce au relai dans la presse spécialisée, lettres d'informations, présentations lors d'AG des associations d'étangs, site internet des fédérations de pêche, interviews, bouche à oreille, etc...), il est certain que la maladie est sous-diagnostiquée.

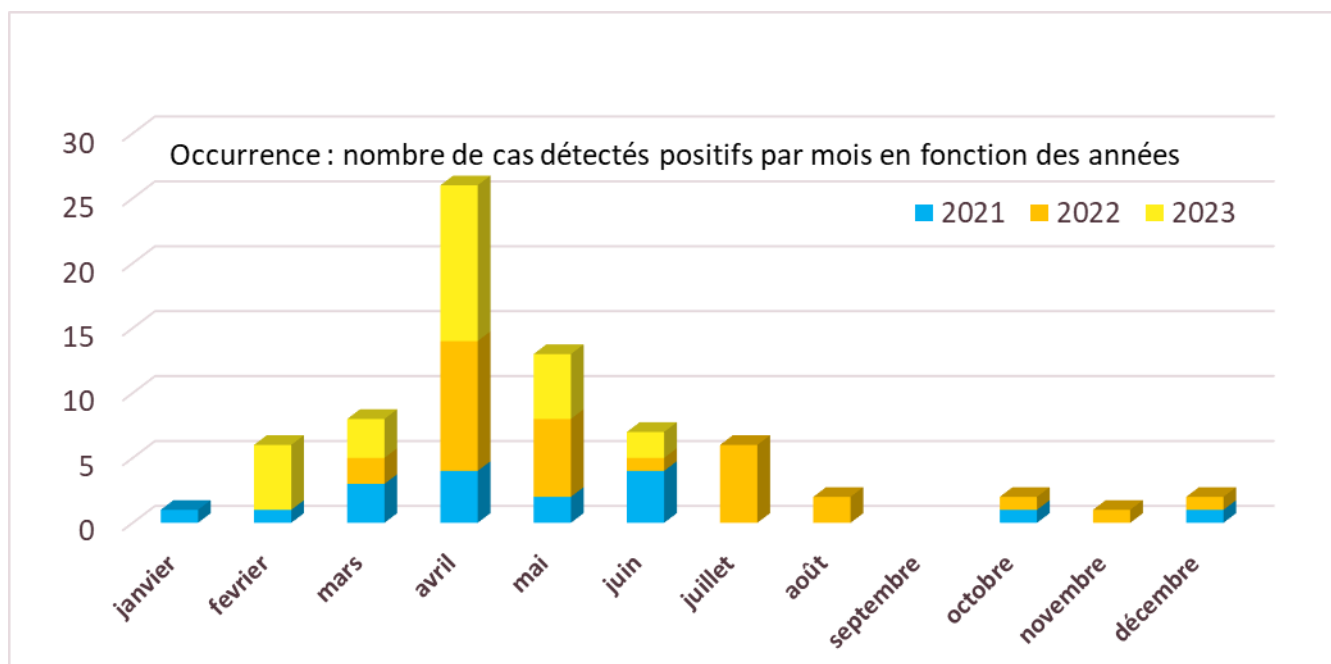


Figure 3 : L'occurrence des cas positifs de CEV au cours des mois sur trois années (2021, 2022 et 2023)

3.2. L'occurrence des cas positifs par année selon les mois

Les cas positifs s'étalent sur toute l'année de janvier à décembre (Figure 3) avec une occurrence fortement accrue durant les mois d'avril et de mai où les températures remontent à la fin de la période hivernale. Après une période de redoux, la hausse des températures est un paramètre important qui influe sur le déclenchement du CEV et induit la maladie du sommeil de la carpe.

3.3. Répartition géographique des cas

L'ensemble du territoire français est concerné par la maladie du sommeil de la carpe. Le virus est omniprésent et aucune région n'est indemne.

Rappelons que le diagnostic de la maladie est basé sur le volontariat des acteurs de la filière piscicole et que la répartition tout comme le nombre de cas positifs n'est pas exhaustive. Néanmoins, les 74 cas positifs sont répartis sur l'ensemble des grandes régions françaises à l'exception de l'Île-de-France où aucun cas positif, sur 3 prélèvements 2022/2023, n'a été recensé dans le cadre du projet CEViral. La majorité des cas se concentrent dans la moitié Est de la France en région Auvergne-Rhône-Alpes (14 cas positifs) et dans la région Grand-Est (11 cas positifs). Au niveau départemental, c'est dans le Nord (59), en Isère (38) et dans les Alpes de Haute-Provence (04) que le maximum de cas positifs a été observé, à savoir 5 cas positifs dans chacun de ces

départements entre janvier 2021 et juin 2023. Au total c'est 37 départements touchés (Figure 4). Au niveau de la distinction des cas positifs entre carpes communes et carpes koï, 17 cas de carpes koïs ont été recensés sur le total des 74 cas positifs.

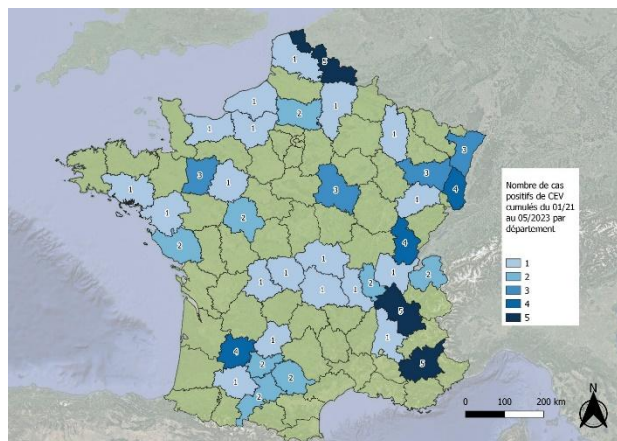


Figure 4 : Répartition géographique des cas positifs à l'échelle départementale sur l'ensemble de la période janvier 2021 à juin 2023

3.4. La diversité du virus

Deux génogroupes se distinguent. Le génogroupe de type I semble spécifique des carpes communes tandis que le génogroupe de type II l'est pour les carpes koï.

Dans le cadre du projet, seule une souche atypique identifiée en 2015 provenant d'une carpe commune possédant un génogroupe de type II a pu être retrouvée parmi les échantillons. Cela implique donc l'existence d'une souche recombinante entre le génogroupe I et II.

Le virus est en mutation perpétuelle : certaines mutations sont anodines alors que d'autres peuvent changer complètement les protéines pour lesquelles les gènes mutants sont codant et ainsi avoir un effet potentiel direct sur la virulence.

Dans le cadre de ce projet, des mélanges de souches ont été mis en évidence dans certains foyers (Figure 5). Une région d'un gène sur un poisson ou sur un groupe de poissons peut avoir muté, plusieurs souches sont ainsi créées. Un groupe de poissons peut ainsi avoir trois souches en co-infection dans un foyer donné. Cette variabilité de souches fournit donc de la matière pour un virus comme le CEV qui est en recombinaison permanente.

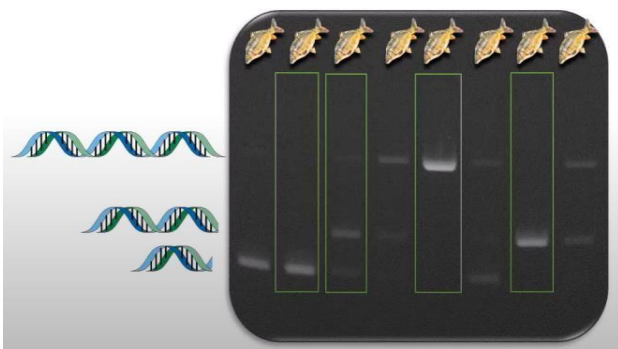


Figure 5 : Electrophorèse d'un même gène avec des tailles différentes selon les souches du virus

Le séquençage et l'identification des souches permet, en les croisant avec les données épidémiologiques, de mettre en évidence les liens possibles entre les foyers.

Par exemple dans le département du Tarn, où les 4 sites ont été identifiés comme positifs au CEV, la même séquence virale a été retrouvée dans trois plans d'eau impliquant un fournisseur commun entre les trois sites. En revanche, sur le quatrième site du Tarn, c'est une autre souche virale qui a été retrouvée alors qu'aucun empoissonnement récent n'a eu lieu dans ce plan d'eau. Dans ce cas, il est possible que la contamination ait eu lieu *via* la faune sauvage et plus particulièrement les oiseaux piscivores qui se déplacent d'un plan d'eau à un autre pouvant introduire le virus dans une population saine. Un transfert illégal de poisson à partir d'un autre

plan d'eau peut également être à l'origine de la contamination du quatrième plan d'eau.

3.5. Les perspectives de détection

3.5.1. Détection sur branchie et écouvillon

Une des matrices les plus intéressantes pour la détection du virus sont les branchies. En effet, il s'agit du centre de réplication du virus le plus important et c'est sur ce tissu que se basent les analyses de détection du virus. Un des objectifs du programme CEViral est d'optimiser le protocole de prélèvement et d'obtenir une méthode de diagnostic sensible à partir d'un morceau de branchie ou bien d'un écouvillon de branchie. La distinction entre les deux méthodes se fait au niveau des CT, plus le nombre de CT est faible plus la détection est rapide.

Il apparaît que l'écouvillon de branchie est un moyen tout aussi efficace que la détection sur branchie (Figure 6).

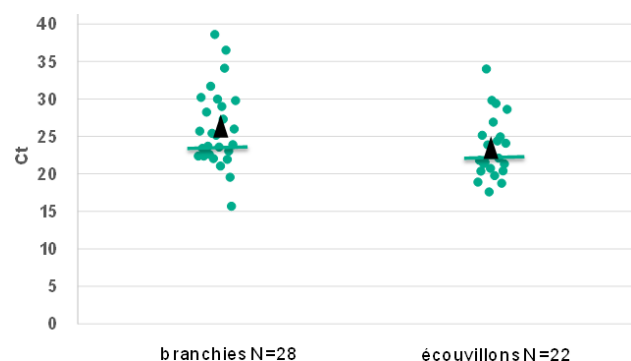


Figure 6 : Résultats des CT de la détection du virus CEV par PCR pour les échantillons de branchies (N=28) et d'écouvillons de branchies (N=22) positifs.

Branchie : sur 28 cas positifs, la moyenne des CT est de $26,1 \pm 5,2$

Écouvillon : sur 22 cas positifs, la moyenne des CT est de $23,4 \pm 4,2$

Les résultats sont cohérents entre les deux matrices et il n'y a pas de dégradation marquée de la performance de diagnostic si on prend un écouvillon plutôt qu'un échantillon de branchies. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux méthodes, le diagnostic sur écouvillon semble être une méthode, plus simple et moins invasive, tout aussi valable que la méthode traditionnelle sur branchies.

3.5.2. Détection dans l'eau

La détection du virus est normalement réalisée lorsque la mortalité est constatée. Il est délicat de réaliser une détection précoce de la maladie tant qu'il n'y a pas de signes cliniques de la maladie ni de mortalité car la charge virale est trop faible pour être détectable. Cependant, avant l'apparition des signes cliniques ou de mortalité, une excrétion importante du virus peut être détectée suite à un stress. Ainsi, il serait possible de détecter la présence du virus dans l'eau de transport.

Un exemple concret d'étude de la faisabilité de la détection du virus du CEV sur l'eau de transport a été réalisé par l'ENVT. Des koï sont importés directement du Japon dans des poches d'eau où plusieurs individus sont allotés par 100 individus. A leur arrivée ils sont placés en aquarium et l'eau de transport est mise en pot pour les prélèvements. Douze heures plus tard, un pool de 5 poissons sont choisis au hasard dans la population et sont anesthésiés pour réaliser un prélèvement par écouvillon branchial. Des prélèvements de branchies ont également été réalisés sur les koï mortes naturellement. L'objectif est de quantifier l'ADN du CEV par qPCR en comparant les méthodes.

Sur 23 lots testés, l'écouvillon ressort 1 seule fois comme positif au CEV mais en trop petite quantité pour être quantifié alors que l'eau de transport ressort 15 fois positive dont 10 fois en quantité suffisante pour que la charge virale puisse être quantifiée (Figure 7). Cette différence s'explique par le fait que l'eau de transport est représentative de l'ensemble du lot de koï dans son ensemble et non pas de quelques individus seulement.

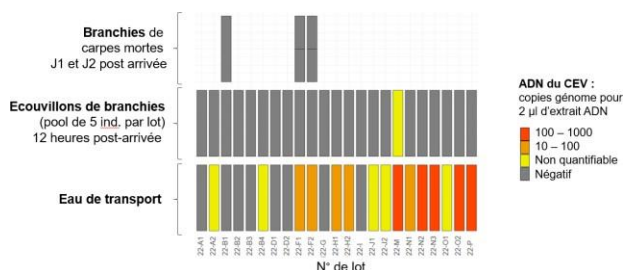


Figure 7 : Comparaison de la charge virale détectée entre écouvillon branchial et l'eau de transport de 23 lots de carpes koï.

La méthode de détection du virus du CEV grâce à l'eau de transport ne nécessite pas de manipulation du poisson, elle présente une meilleure sensibilité et est représentative d'un lot entier. Il y a donc moins de risque de passer à côté de l'introduction de CEV. Il serait intéressant de poursuivre ces tests sur koï mais également sur les carpes communes dans les cuves de transport.

4. Conclusion

La présence de la maladie du sommeil de la carpe était jusqu'alors sous-estimée en France au vu du nombre de cas positifs détectés lors du projet. Il est présent sur l'entièreté des zones d'étangs du territoire et quasiment aucune région n'est épargnée. Il est possible que le CEV devienne encore plus pathogène du fait des mutations virales permanentes. Il faut continuer les recherches en ce sens et suivre les recombinaisons entre les deux génogroupes qui sont possibles les carpes koï pouvant être infectées avec la souche des carpes communes et inversement. Les études épidémiologiques sur le terrain et le génotypage (jusqu'au séquençage) sont indispensables afin de comprendre et suivre la diffusion du virus et la propagation de la maladie. La méthode de détection sur écouvillon est considérée comme une méthode fiable et plus simple à réaliser que le prélèvement de branchie. A l'avenir, la détection dans l'eau de transport des carpes pourrait se faire systématiquement alors même que les individus sont sains d'apparence et ne présentent aucun symptôme. Cette méthode est une piste sérieuse à prendre en compte pour la détection du virus chez les carpes communes, notamment dans les cuves de transport. En somme, l'étude a permis de sensibiliser davantage les acteurs impliqués dans la gestion des plans d'eau à la maladie du sommeil de la carpe et plus généralement à faire connaître la maladie. Si elle continue d'être propagée au fil des ans dans des nouveaux sites, il est indispensable d'avoir une meilleure connaissance au sein de la filière étang de l'existence de cette maladie et de son diagnostic, ce qui laisse espérer une plus grande réactivité pour identifier les foyers et renforcer la prévention.

5. Remerciements

L'équipe de l'ITAVI remercie les partenaires ANSES (M Baud, L. Bigarré, D. Flores, A. Huneau, S. Lebouquin, L. Pallandre, R. Thomas) et ENVT (S. Bertagnoli, G. Croville, L. Montacq)

et les personnes ayant participé au projet : LDA39, LPL, LDV34, les vétérinaires aquacoles, les pisciculteurs, les fédérations de pêche, AAPPMA et les particuliers. Cette étude a été financée en partie par le Fonds Européens pour les Affaires Maritimes et la Pêche.

Références bibliographiques

- Bigarré L., Baud M., Pallandre L., Meunier E., Leguay E. 2016. « Maladie du sommeil de la Carpe : état des lieux des connaissances et situation épidémiologique en France ». Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 76.
- Flores D., Baud M., Pallandre L., Lautraite A., Thomas R., Pozet F., Keck N., Guillermand M-O., Laithier J., Tocqueville A., Prouff B., Le Bouquin-Leneveu S., Bigarré L. 2023. « Premiers foyers de la maladie du sommeil de la carpe dans le Tarn ». Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 98(1) : 1-4

Abréviations

- AAPPMA : Association Agréée pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique
- ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- CEV : Carp Edema Virus
- ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
- FEAMP : Fonds Européens des Affaires Maritimes et la Pêche
- ITAVI : Institut Technique des filières Avicole, Cunicole et Piscicole
- LDA39 : Laboratoire Départemental d'Analyses du Jura
- LDV34 : Laboratoire Départemental Vétérinaire de l'Hérault
- LPL : Laboratoire des Pyrénées et des Landes

Abstract : Carp Edema Virus, an emerging disease ubiquitous in France

Carp sleeping disease, caused by CEV (Carp Edema Virus), affects both common and koi carp, causing high mortality rates. The lack of systematic diagnosis and knowledge of the disease limits awareness of CEV and prevents the implementation of an effective control strategy. In France, almost the entire country is affected by the disease, and no region seems to be spared, with cases occurring throughout the year. Virus sequencing has shown that recombinations between the two genogroups are possible, especially as the virus is constantly mutating and new, potentially more virulent strains may emerge. Epidemiological studies are essential to highlight and understand the sequencing results. Links have been established between similar strains of the virus and a common origin of fish between different water bodies. Pre-detection of the virus using the transport water detection method is a promising approach, since it enables the entire batch to be accurately represented, even when the individuals show no clinical signs of the disease. This method is a promising way of detecting the virus in common carp, particularly in high-density transport tanks. If the disease continues to be propagated year after year in new sites in France, it is vital that all those involved in the pond farming, recreational fishing and ornamental fish production sectors have a better understanding of the existence of this disease and its diagnosis, which would enable them to react more quickly to identify outbreaks and reinforce prevention.