

SOMMAIRE

GLOSSAIRE.....	i
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	iii
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	v
CHAPITRE I. INTRODUCTION ET SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
I.1. Introduction	1
I.2. Généralités sur la pisciculture et la carpe	3
I.2.1. Les carpes.....	3
<i>I.2.1.1. Systématique de la carpe commune.....</i>	<i>3</i>
<i>I.2.1.2. Biologie de la carpe commune</i>	<i>4</i>
I.2.2. La place de la carpiculture dans le monde	5
I.2.3. La place de la carpiculture à Madagascar	6
I.2.4. La dynamique des flux en carpiculture à Madagascar	8
I.3. Généralités sur les herpèsvirus	10
I.3.1. Systématique des herpèsvirus.....	10
I.3.2. Cycle biologique de l'herpèsvirus.....	10
I.3.3. Herpèsvirose de type 3 chez la carpe	13
CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	18
II.1. Cadre, période, population de l'étude.....	18
II.2. Kit de diagnostic	20
II.3. Extraction de l'acide nucléique	20
II.3.1. Principe.....	20
II.3.2. Extraction proprement dite.....	21
II.4. PCR en temps réel	23
II.4.1. Principe.....	23

II.4.2.	Recherche du génome complet du KHV	24
II.4.3.	Les amorces ou <i>primers</i>	24
II.4.4.	Alignement des séquences d'amorce	24
II.4.5.	Préparations des témoins positifs, négatifs et du mélange réactionnel	25
CHAPITRE III. RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....		30
III.1.	Enquête sur le terrain	30
III.1.1.	Phénotypes des carpes collectées.....	30
III.1.2.	Carpes collectées et stade d'évolution	30
III.1.3.	Carpes collectées et répartition par district.....	31
III.1.4.	Carpes collectées et sexe.....	32
III.1.5.	Carpes collectées et type d'aménagement	33
III.1.6.	Carpes collectées et répartition selon les poids.....	33
III.2.	Diagnostic du KHV en laboratoire	34
CHAPITRE IV. DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES		38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		36
ANNEXE 1 : Principaux pays producteurs de <i>Cyprinus carpio</i>		I
ANNEXE II : Questionnaire d'enquête utilisé pour la collecte des données.....		II
ANNEXE 4 : Carpe et production aquacole mondiale entre 2010 et 2016.....		IV
ANNEXE 5 : Principaux appareils utilisés en Biologie Moléculaire		V
ABSTRAT		
RESUME		

GLOSSAIRE

Amorce	: Oligonucléotide qui, hybridé avec une matrice d'acide nucléique, permet à une polymérase d'initier la synthèse du brin complémentaire
Bicaténaire	: Macromolécule ou polymère constitué de deux chaînes reliées entre elles
Capside	: Structure protéique entourant le génome d'un virus
Enophtalmie	: Situation anormale du globe oculaire qui est enfoncé plus profondément dans l'orbite qu'à l'état normal
FASTA	: Format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences biologiques de nature nucléique ou protéique
GenBank	: Banque de données de séquences d'acides nucléiques basée à Cambridge (USA).
Herpès-virose	: Pathologie ou infection causée par un herpès virus
Hypersécrétion	: Production anormalement élevée des substances liquides par certains tissus ou organes
Ichtyopathologie	: Pathologie des poissons
Icosaédrique	: Qualificatif d'une structure polyédrique comportant vingt faces
Infection	: Décomposition organique produite par des germes infectieux
Latence	: Qualité d'une propriété dissimulée et amenée à apparaître ultérieurement
Lésions cutanées	: Altération des caractères anatomiques ou histologiques de la peau, qui se trouve alors dans un état anormal
Léthargie	: Sommeil profond et continu, donnant au malade une apparence d'insensibilité complète
Morbidité	: Caractère maladif, ensemble des causes pouvant générer une maladie
Phénotype	: Etat d'un caractère observable chez un organisme vivant
Putréfaction	: Processus par lequel des corps organisés, animaux ou végétaux dès l'instant qu'ils sont privés de vie, dégènèrent sous l'action de facteurs biologiques modifiant complètement leur aspect et leur composition

- Ulcération** : Altération moléculaire d'un tissu par suite d'un processus morbide avec tendance à la nécrose
- Vernaculaire** : Propre à une région ou à un pays ou à ses habitants
- Virulence** : Pouvoir infectieux et pathogène d'un germe

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
Ct	: Cycle thresold
CyHV-1	: Cyprinid Herpesvirus 1
CyHV-2	: Cyprinid Herpesvirus 2
CyHV-3	: Cyprinid Herpesvirus 3
DRZVP	: Département de Recherche Zootechnique, Vétérinaire et Piscicole
EA	: <i>Early Antigen</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FASTA	: Format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences
FOFIFA	: <i>Foiben'ny Fikarohana ho Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra</i> (Centre de Recherche Appliquée au Développement Rural).
G + C	: Guanine plus cytosine
IcHV-1	: Ictalurid Herpesvirus 1
IEA	: <i>Immediate Early Antigen</i>
KHV	: Koï Herpès Virus
LA	: <i>Late Antigen</i>
NCBI	: National Centre of Biotechnology Information
PARRUR	: PArtenariat et Recherche dans le secteur Rural
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPA	: Producteur Privé d'Alevin
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR	: <i>Retro Transcriptase Polymérase Chain Réaction</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les « phénotypes » de la carpe commune	4
Figure 2: Aménagement de type bassin ou étang (<i>Ankazobe</i>)	7
Figure 3: Aménagement de type rizière (<i>Manjakandrina</i>).....	7
Figure 4: Dynamique des flux de la carpe à Madagascar	9
Figure 5: Arbre phylogénétique des principaux herpesvirus	11
Figure 6: Cycle de multiplication des herpesvirus : Infection persistante	13
Figure 7: Cycle de multiplication des herpesvirus : Infection productive	14
Figure 8: <i>Cyprinivirus</i>	15
Figure 9: Signes cliniques de l'herpèsvirose.....	16
Figure 10: Région d'Analamanga et sites d'échantillonnage	18
Figure 11: Conditionnement dans des sachets Ziplock.....	19
Figure 12: Dissection et prélèvement de foie et de branchie	19
Figure 13: Le kit <i>genomic DNA from tissue de Macherey-Nagel</i>	20
Figure 14: Principe de la chromatographie d'affinité	21
Figure 15: Différentes étapes de PCR.....	23
Figure 16: Aligement des amorces sur le génome complet du KHV.....	25
Figure 17: Préparation des échantillons pour analyse PCR	26
Figure 18: Hydrolyse de la sonde Taqman.....	27
Figure 19: Disposition des échantillons dans le thermocycleur.....	28
Figure 20: Courbes des témoins positif (rose) et négatif (bleu) en qPCR.....	28
Figure 21: Profil thermique pour la qPCR	29
Figure 22: Répartition des carpes selon le phénotype.....	30
Figure 23: Répartition des carpes selon la phase d'évolution.....	31
Figure 24: Répartition des carpes selon le sexe	32
Figure 25: Répartition des carpes selon le type d'aménagement.....	33
Figure 26: Poids des carpes collectées	34
Figure 27: Résultat de la qPCR et témoin négatif.....	35
Figure 28: Résultat de la qPCR et témoin positif.....	36
Figure 29: Résultat de la qPCR, échantillons et témoins	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification de la carpe commune.....	3
Tableau 2: Phénotypes de la carpe commune et noms vernaculaires à Madagascar	6
Tableau 3: Amorces ou <i>primers</i>	24
Tableau 4: Réglage du profil thermique selon les phases de la qPCR.....	29
Tableau 5: Répartition des carpes selon le district.....	32
Tableau 6: Résultat de la qPCR des échantillons collectés.....	37

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION
ET
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. INTRODUCTION ET SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Introduction

Initialement appelé koï herpèsvirus (KHV), l'herpèsvirus cyprin de type 3 (CyHV-3) est le troisième de la famille des *Alloherpesviridae* (Gotesman et al., 2013; Waltzek et al., 2005). De répartition mondiale aujourd'hui, le KHV a été retrouvé sur le continent Américain (Etats Unis et au Canada) en Asie (Chine, Japon, Indonésie) en Europe (en Allemagne, en Pologne, en Italie et en France) (Bergmann et al., 2006; Dong et al., 2013; Fournier, 2008; Garver et al., 2010a; Gotesman et al., 2013; Grimmett et al., 2006; Haenen et al., 2004; Ouyang et al., 2018; Sunarto et al., 2005). Ce virus est responsable de la néphrite, de la nécrose branchiale chez la carpe commune (*Cyprinus carpio carpio*) et la carpe d'ornement (*Cyprinus koi*), avec des taux de morbidité et de mortalité élevés (Garver et al., 2010a; Hedrick et al., 2000b; Saulnier et al., 2007; Waltzek et al., 2005; 清水智子 et al., 2006).

Sur le plan épidémiologie, des études précisent le rôle inconditionnel joué par l'importation des poissons d'eau douce en général et de la carpe commune et koï en particulier, dans l'optique d'améliorer les rendements piscicoles. A ce jour, 50 espèces de poisson d'eau douce sont introduites en Asie. Ces diverses introductions ont permis à la Chine, à la Thaïlande, et au Vietnam d'accroître considérablement leur production piscicole. D'autres études ont également décrit l'émergence du KHV sur ce même continent. L'étude réalisée par Richard T. et ses collaborateurs sur le continent Européen et plus précisément en France va dans le même sens (Lazard et Levêque, 2009; Thiéry et al., 2003).

L'Afrique, n'est pas en reste face à cette infection herpétique d'allure grandissante. En effet deux épizooties causées par le KHV ont été rapportées en Afrique du Sud en 2001 et en 2003 (Fournier, 2008). Sur les 212 espèces d'eau douce introduites en Afrique, 7 étaient des carpes communes provenant d'Europe et d'Asie, et comme sur d'autre continent, ces introductions ont été fructueuses. En revanche les rendements escomptés n'ont pas été toujours satisfaisants pour des raisons liées à la gestion d'élevage, aux facteurs génétiques et pathologiques expliquant ainsi la baisse progressive de la production piscicole de l'Afrique chaque année (Lazard et Levêque, 2009; Moreau et al., 1988).

D'après des études menées sur les carpes et les tilapias à Madagascar en 2014, l'infection par le KHV est absente chez ces poissons. Par ailleurs, il existe une forte variabilité génétique entre les diverses espèces de carpe ainsi qu'une dynamique de flux importante entre les différents

acteurs de la filière. Depuis 2014, cette dynamique est grandissante tant sur le plan national qu'international (Lazard et Levêque, 2009; Oswald et al., 2016; Ravakarivelo, 2014; Tchuidjang.M., 2016).

Madagascar a également connu des introductions d'espèces d'eaux douce dans le but d'intensifier sa production (Kiener et Therezien, 1958; Lazard et Levêque, 2009; Lévêque, 1997; Moreau et al., 1988; Rakotoambinima et al., 2009). Les premières introductions de poissons à Madagascar datent de 1861 (Rakotoambinima et al., 2009).

Le problème de la baisse des performances de la carpe à Madagascar pourrait trouver solution dans l'importation de nouvelles souches de carpe. Devant la recrudescence du KHV sur le plan mondial d'une part et du fort dynamisme des flux de la carpe à Madagascar d'autre part, il est indispensable de connaître aujourd'hui encore le statut virologique des carpes de Madagascar face au KHV avant d'initier toute démarche d'importation. Dès lors, il convient de déterminer si Madagascar est toujours indemne du KHV ou non.

Ainsi, l'objectif général de notre étude est de réévaluer le statut virologique de la carpe à Madagascar. L'hypothèse de départ est celle basée sur nos connaissances actuelles à savoir : « Madagascar est indemne à l'infection herpétique de type 3 chez la carpe ».

Dans le cadre des présents travaux, plusieurs méthodes seront mises à profit notamment au niveau de l'échantillonnage et de la collecte des données. Diverses techniques de biologie moléculaire seront mises à contribution : PCR, extraction d'acide nucléique, analyses génomiques, analyse statistique et interprétation des résultats.

Après des rappels bibliographiques sur la pisciculture et l'élevage de la carpe à Madagascar, sur l'herpèsvirus de type 3, seront traités successivement les méthodes puis les résultats avant la discussion et la conclusion.

I.2. Généralités sur la pisciculture et la carpe

I.2.1. Les carpes

Le terme « carpe », est l'appellation vernaculaire et ambiguë des poissons de la famille de *cyprinidae* dont l'origine est chinoise. Ce poisson est largement diffusé dans le monde à ce jour (Hollebecq et Haffray, 1994; Vandeputte, 2009) et il est recensé en France et de par le monde avec plus de 1800 espèces et sous espèces. Parmi cette multitude d'espèces, sont rencontrées la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idellus*), la carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpe à grosse tête (*Hypophthalmichthys nobilis*), la carpe de Wuchang (*Megalobrama amblycephala*), la carpe noire (*Mylopharyngodon piceus*), la carpe amour blanc (*Ctenopharyngodon idella*), la carpe prussienne (*Carassius gibelio*), la carpe à la lune (*Carassius carassius*) et la carpe commune (*Cyprinus carpio*) (FAO, 2018). Par ailleurs, chacune des espèces comporte plusieurs variétés (Keith, 2006; Keith, 2011)

I.2.1.1. Systématique de la carpe commune

La carpe commune appartient au règne animal et le tableau 1 présente sa classification

Tableau 1: Classification de la carpe commune

Embranchement	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Actinopterygii</i>
Ordre	<i>Cypriniforme</i>
Famille	<i>Cyprinidae</i>
Genre et espèce	<i>Cyprinus carpio</i>

La carpe commune est l'une des espèces la plus répandue. Elle présente de nombreuses variétés se distinguant les unes des autres par le phénotype et principalement par leurs écaillures. Les principales sont la carpe écaillée, la carpe cuir, la carpe miroir, la carpe linéaire (voir Figure 1). Pour ce qui est de la carpe koï, son phénotype provient de divers croisements génétiques contrôlés restant encore « secrets » dans les pays qui la commercialisent (Apdra, 2018; Hollebecq et Haffray, 1994).



Carpe écaillée



Carpe linéaire



Carpe cuir



Carpe miroir



Carpe koi

Figure 1: Les « phénotypes » de la carpe commune

(Adapter de <https://www.vetofish.com/definition/carpe-commune>, 2019)

1.2.1.2. Biologie de la carpe commune

L'élevage de la carpe commune ou carpiculture est une pratique mondiale actuellement. Il s'agit d'un poisson au corps allongé et trapu. Ses lèvres sont épaisses et la lèvre supérieure est garnie de 4 barbillons dont 2 courts et 2 longs. Ce poisson possède une longue nageoire dorsale au bord supérieur ondulé alors que la nageoire caudale est très développée avec un bord postérieur échancré. De couleur généralement dorée, le dos de la carpe commune est de couleur sombre avec une coloration variant du verdâtre au brunâtre tandis que son abdomen varie du blanc au jaunâtre.

La carpe commune vit au milieu et à l'aval des cours d'eau, dans des zones inondées, et des eaux superficielles confinées, comme les lacs, les bras morts, les eaux de réservoir telles que les étangs, les rizières. La carpe a un régime alimentaire de type omnivore : elle se nourrit d'herbes, de petits insectes et de crustacés. Vivant dans les fonds, elle mange dans les couches intermédiaires et superficielles de la colonne d'eau. En dessous de 15°C, la carpe s'alimente très peu et sa croissance est réduite. En dessous de 10°C, elle hiberne : elle cesse de s'alimenter et ne grossit plus voire perd du poids jusqu'à ce que l'eau se réchauffe.

La croissance de la carpe est optimale dans les eaux douces de température variant entre 23 et 30°C, avec une salinité pouvant aller jusqu'à 5‰, un pH variant entre 6,5 et 9,0. La carpe peut vivre à de faible concentration d'eau en dioxygène (0,3- 0,5 mg/litre), de même que dans les cas de sursaturation d'eau en dioxygène.

Pour se reproduire, la carpe a besoin d'une eau de température supérieure à 20°C. La reproduction se fait en milieu tropicale pendant toute l'année. A l'âge de la maturité sexuelle entre 2 et 3 ans, les femelles pondent entre 50 et 100000 œufs/ kg de poids vif sur les supports. Ces œufs sont immédiatement arrosés par la laitance d'un ou de plusieurs mâles, la laitance du mâle étant constituée de millions de cellules microscopiques munies d'un flagelle leur permettant de se déplacer dans l'eau. Ces spermatozoïdes vont se diriger vers les ovules pour les féconder. L'incubation dure de 3 à 8 jours dans la végétation, en eaux peu profondes, afin qu'ils restent exposés à la lumière.

A l'éclosion, les alevins mesurent 6 à 8 millimètres de long. Ils sont de 2 à 4 centimètres à l'âge de trois semaines et sont appelés carpillons. Il faudra attendre 2 à 3 années, avec une activité plus fréquente au crépuscule, pour atteindre un poids moyen de 1,5 kg.

La nurserie ou le stade de grossissement des alevins durant 3 à 4 semaines est idéale dans les étangs et les bassins avec une densité de stockage variant de 100 – 400 juvéniles/m². Une alimentation supplémentaire à base de soja, de céréales, de fibres de riz, d'éclats de riz et de viande, d'un mélange de ses différentes matières doit être apportée (Hajlaoui et al., 2016; Rhouma, 1975; Roule, 1932; Van Den Betg et Janssen, 1994).

I.2.2. La place de la carpiculture dans le monde

Depuis quelques décennies, est observée une croissance considérable de la pratique de l'élevage de la carpe en aquaculture (FAO, 2018). En effet, la FAO dans son ouvrage sur la situation mondiale de la pêche et l'aquaculture en 2012, présente la carpiculture comme la plus pratiquée avec un pourcentage voisinant les 72% et une productivité de 24 millions de tonnes en 2010

(FAO, 2012). Le même ouvrage dans sa parution de 2016 indique une augmentation de la consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture du fait de la croissance de la production des espèces piscicoles telles que la carpe, le tilapia, le poisson-chat dans les élevages (FAO, 2016). Cette augmentation s'explique également par la baisse des coûts de production : la carpe est une espèce essentiellement herbivore et n'est donc pas forcément très exigeante en matière d'alimentation (Chevassus-au-Louis et Lazard, 2009). En 2016, parmi les espèces de poisson élevées en aquaculture, la carpe représente à elle seule 39 % avec une prépondérance de la carpe herbivore suivie de l'argentée puis de la commune et de la grosse tête (FAO, 2018). L'annexe 4 présente les principales espèces de poissons aquatiques élevés dans le monde entre 2010 et 2016.

I.2.3. La place de la carpiculture à Madagascar

La carpe est de loin le poisson le plus produit et le plus consommé dans la Grande Ile (Ministère de l'agriculture, 2007). La seule espèce de carpe rencontrée est la carpe commune avec ses quatre phénotypes. Le tableau 2 nous présente la dénomination vernaculaire des différents phénotypes. Nous rencontrons actuellement à Madagascar la carpe koï qui est une sous espèce de la carpe commune (Apdra, 2018).

Tableau 2: Phénotypes de la carpe commune et noms vernaculaires à Madagascar

Genre	Variétés	Nom vernaculaire
<i>Cyprinus carpio</i> (<i>karpa</i>)	Ecaillée	Be kirany
	Linéaire	Tsipika
	Miroir	Ihany
	Cuir	Malama

A Madagascar, l'élevage de la carpe est une activité pratiquée sans distinction du genre : les hommes aussi bien que les femmes sont impliqués dans la filière. Sa pratique dépend dans la plupart des cas du niveau des revenus de l'éleveur : la pisciculture extensive, la pisciculture semi intensive ou encore intensive en fonction des moyens d'investissements disponibles. La différence significative entre ces différents types de pisciculture réside dans le niveau d'investissement financier. La pisciculture intensive est la plus rentable tout en nécessitant le plus d'investissement (Ministère de l'agriculture, 2007; Tchuidjang.M., 2016).

Plusieurs types d'aménagement pour la pratique de la carpiculture sont rencontrés (voir Figure 2 et 3). L'élevage en rizière est une pratique courante. Ainsi, après la récolte du riz, les surfaces

cultivables sont aménagées en bassin piscicole. Quelques fois, l'élevage est initié dès lors que les plants de riz ont fleuri. Cela se justifie par le fait qu'une fois le riz produit, les carpes qui sont des herbivores vont se nourrir des restes de la récolte (Tchuidjang.M., 2016). En plus de l'aménagement des rizières, des bassins ou des étangs sont également fréquemment utilisés.



**Figure 2: Aménagement de type bassin ou étang (*Ankazobe*)
(Auteur, 2018)**



**Figure 3: Aménagement de type rizière (*Manjakandrina*)
(Auteur ; 2018)**

L'élevage de la carpe est généralement couplé avec celui d'autres espèces telles que le tilapia ou encore le black bass. Cette approche permet au producteur de mieux rentabiliser son élevage : bien que la carpe soit très prolifique, elle prend beaucoup de temps pour croître et crée donc un manque à gagner pour l'éleveur. Ce manque à gagner est ainsi compensé par le couplage avec une autre espèce moins prolifique mais à croissance rapide stimulant les ventes (Kiener et Therezien, 1958; Tchuidjang.M., 2016).

Dans la même optique, il existe dans la Grande Ile plusieurs types de pisciculteur : des pisciculteurs œuvrant uniquement dans la production d'alevin ou alevinage, des pisciculteurs travaillant dans le grossissement. Ainsi pour des raisons de stratégie et d'entrepreneuriat, la FAO participe à la promotion de certains propriétaires privés spécialisés en alevinage appelés producteurs privés d'alevins (PPA) dont le rôle principal est de produire suffisamment d'alevins et de fournir à tous les pisciculteurs et les rizipisciculteurs de l'île. Cette promotion a pour conséquence une baisse des prix des alevins car plus disponibles. Elle doit aussi permettre la recherche par les PPA de meilleurs reproducteurs ou géniteurs afin d'augmenter leurs rentabilités tout en fournissant des alevins de meilleure qualité. Cette dernière réside dans la production d'alevins plus rustiques, peu voraces mais à croissance rapide. Ainsi, cette considération conduit aux importations (Oswald et al., 2016; Tchuidjang.M., 2016).

I.2.4. La dynamique des flux en carpiculture à Madagascar

Il existe plusieurs types de producteur d'alevins. En 2014, Ravakarivelo décrit plusieurs types d'élevage produisant les alevins : les grands PPA type FAO, les PPA classiques, les écloséries intermédiaires, les producteurs d'alevins atypique. Le premier type, à savoir celui de la FAO, est caractérisé par un grand nombre de géniteurs, une meilleure production et productivité, et un flux des poissons très important. Le second type, contrairement au premier type, présente moins de géniteur, un flux moins intense et une production et productivité réduite. Cette dynamique des flux des carpes tant sur le plan international avec des importations vers Madagascar que sur le plan national avec des échanges entre les différentes régions piscicoles, constitue un risque énorme en matière d'infection au KHV pour la filière en général et pour la carpe en particulier (Oswald et al., 2016; Ravakarivelo, 2014).

La dynamique des flux de la carpe en 2014 dans les régions piscicoles de Madagascar est schématisée dans la figure 4.

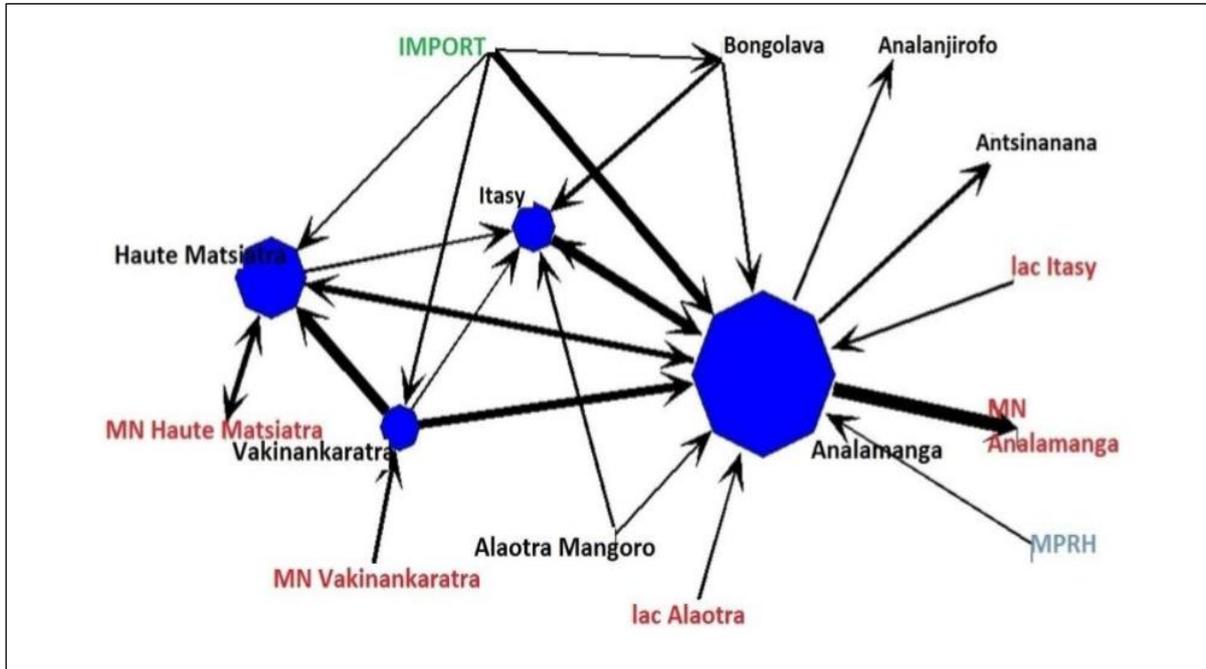


Figure 4: Dynamique des flux de la carpe à Madagascar (Ravakarivelo, 2014)

D'après cette figure, la région d'Analamanga constitue une plaque tournante dans la dynamique des flux de la carpe à Madagascar. Elle peut donc constituer la région la plus à risque dans le cas d'une épizootie au KHV du fait de l'absence d'une réelle surveillance lors des flux, tant sur les plans national qu'international lors des entrées des carpes dans l'île (Oswald et al., 2016; Ravakarivelo, 2014).

Malgré la structuration de la filière pêche, il convient toutefois de noter qu'en matière de chaîne de valeur, de la fourche à la fourchette, ou encore de l'importation et de l'élevage des poissons jusqu'à la consommation, bien des chaînons sont absents. Cette carence touche par exemple l'absence d'institut de surveillance épidémiologique ou de laboratoire ou d'institut de recherche spécialisé sur la pêche et l'aquaculture qui peuvent assurer le diagnostic et la recherche des différentes pathologies observées dans le domaine. Ces maillons sont d'autant plus importants au regard des difficultés auxquelles le pays a dû faire face pendant la crise de la filière crevetticulture avec l'avènement de la maladie du syndrome des taches blanches chez les crevettes. Cette maladie hautement contagieuse et mortelle, causée par le *White spot syndrome virus* (WSSV) ou virus du syndrome des taches blanches qui entraîne des dégâts considérables (de Jesús Durán-Avelar et al., 2015; Idalia, 2008; Probiotiques, 1981)

I.3. Généralités sur les herpèsvirus

I.3.1. Systématique des herpèsvirus

Ubiquitaires, les herpèsvirus sont des virus à ADN bicaténaire, de 150 à 295 kb et codant pour un grand nombre de protéines. Virus enveloppés, ils possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique et sont connus depuis des décennies comme étant responsables des infections herpétiques chez l'homme, les oiseaux, les amphibiens, les mollusques et depuis seulement quelques années chez les poissons dont la carpe et le poisson chat (Arzul, 2001; Arzul et Renault, 2002; Fournier, 2013; Gessain, 2005; Markine-Goriaynoff et al., 2003; Plancoulaine et Gessain, 2005).

La classification phylogénique du virus de l'herpès montre une structuration en 3 familles, 3 sous familles et 17 genres. La première famille est celle des *Herpèsviridae* au sein de laquelle sont retrouvés les virus herpétiques des mammifères, des reptiles et des oiseaux (voir Figure 5). Elle se subdivise en 3 sous familles : alpha, bêta et gamma *Herpèsvirinae* (α , β et γ). La seconde famille est celle correspondant aux *Alloherpèsviridae*, dans laquelle figurent les virus responsables de l'herpès virose chez les poissons et les amphibiens. La dernière famille est celle des *Malacoherpèsviridae*, regroupant en son sein les virus responsables de l'herpès chez les mollusques (Dong et al., 2013; Fournier, 2008; Hedrick et al., 2000a).

Dans la famille des *Alloherpèsviridae*, responsables des infections chez les amphibiens et les poissons, plusieurs virus y sont représentés : le CyHV-1, le CyHV-2, le CyHV-3 responsables de l'herpès virose chez la carpe, ou encore le IchV-1 responsable également de l'herpès virose chez le poisson chat (Fournier, 2008; Gilad et al., 2004; Waltzek et al., 2009; Waltzek et al., 2005).

I.3.2. Cycle biologique de l'herpèsvirus

Il se déroule en plusieurs étapes (Davison, 2010; Flint et al., 2004; Fournier, 2013).

a. L'attachement et la pénétration (Etape 1)

La fixation ou attachement du virus à la surface de la cellule cible se fait par l'intermédiaire les organes d'attachement d'origine virale (glycoprotéine ou spicule virale) qui se lient de façon conformationnelle aux récepteurs cellulaires présents à la surface de la cellule cible.

La pénétration de la capsidie dans le cytoplasme de la cellule cible s'opère après la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cytoplasmique de la cellule. Une fois dans le cytoplasme, la

capside est acheminée via les pores microtubulaire vers la membrane où l'ADN viral sera inoculé dans le noyau de la cellule cible, siège de la réplication de l'acide nucléique viral.

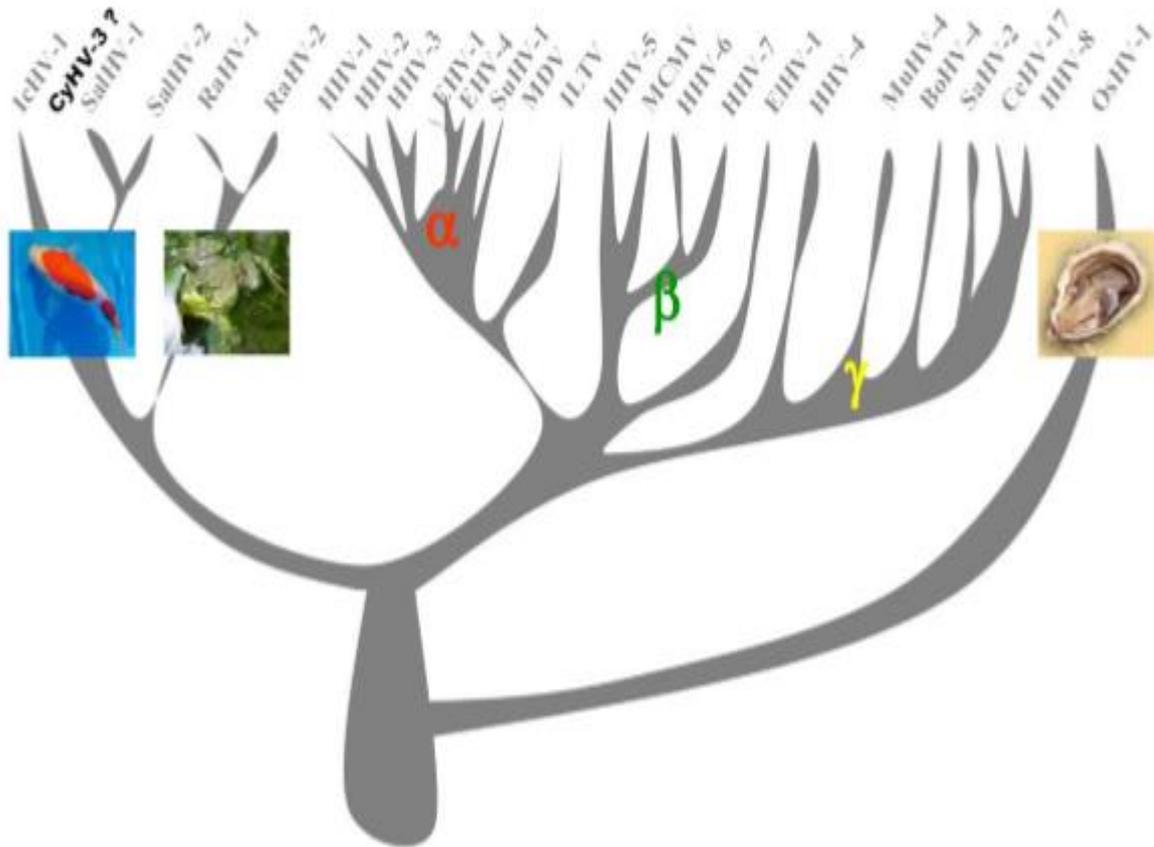


Figure 5: Arbre phylogénétique des principaux herpesvirus (Adapté de Davison par Fournier, 2002)

b. Transcription, traduction et réplication (Etape 2)

Une fois dans le noyau cellulaire, le génome viral va être transcrit en ARNm, puis traduit dans le cytoplasme pour la production des protéines virales. Selon leurs ordres de synthèse, il existe 3 types de protéines :

— Les protéines très précoces ou *Immediate Early Antigen* (IEA) ou protéines alpha (α)

Il s'agit des protéines régulatrices. Ainsi, après leurs synthèses, elles vont se fixer sur l'ADN de la cellule cible et choisir les protéines à être synthétisées (dans quelles proportions) et les protéines dont la synthèse doit être stoppées.

— Les protéines précoces ou *Early Antigen* (EA) ou protéines béta (β)

Il s'agit principalement de protéines enzymatiques de nature virale mais absentes dans la cellule cible. A partir de cette étape, la réplication de génome viral débute.

— Les protéines tardives ou *Late Antigen* (LA) ou protéines gamma (γ).

Les protéines synthétisées à cette étape sont celles destinées à la constitution de la capsidie et des divers téguments.

c. Assemblage des capsides (Etape 3)

L'assemblage des capsides se fait dans le noyau. Il débute par le clivage en des sites spécifiques des concatémères synthétisés et rassemblés dans les capsides nouvellement synthétisées.

d. Acquisition du tégument et de l'enveloppe virale (Etape 4)

Par bourgeonnement, les nouveaux virions vont traverser la membrane nucléaire et passer dans le cytoplasme. Pendant, cette traversée, ils emporteront avec eux une partie de la membrane nucléaire cellulaire et deviendront des virions enveloppés. A la fin de cette étape, les nouveaux virions sortiront de la cellule cible par éclatement de celle-ci, entraînant ainsi sa mort.

Il se peut que le virus une fois dans la cellule hôte, n'exprime que quelques gènes viraux : dans ce cas, la cellule cible survit et le virus y demeure sous forme latent. L'infection est dite persistante ou latente. La latence du virus peut durer très longtemps, voire toute une vie avec possibilité de réactivation. Notons que ce caractère latent est une des particularités de l'herpèsvirus d'où son appellation « Herpès ». Cette caractéristique implique des vérifications de temps en temps du statut de la carpe commune face au virus qui peut être présent dans l'organisme de la carpe toutefois sans s'exprimer.

Les figures 6 et 7 présentent d'une part le cycle biologique du virus en phase de latence avec l'expression d'une partie seulement des gènes viraux, (d'où l'absence des nouveaux virions) et d'autre part le cycle biologique du virus de herpès avec expression de tous les gènes viraux et production des nouveaux virions.

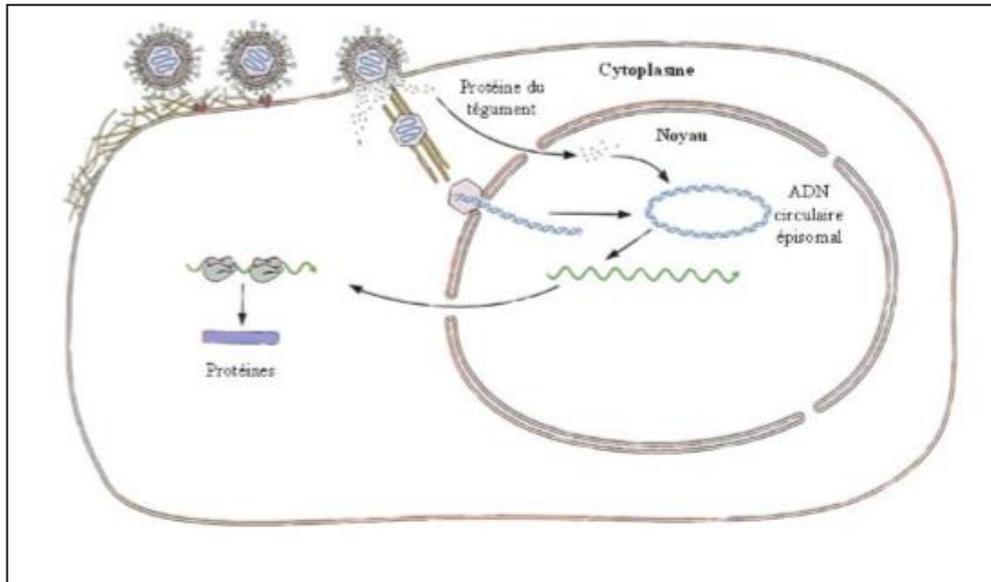


Figure 6: Cycle de multiplication des herpesvirus : Infection persistante (Adapté de Flint et al. par Fournier, 2004)

I.3.3. Herpès virose de type 3 chez la carpe

I.3.3.1. Structure du CyHV-3

Comme tous les *herpesviridae*, le CyHV-3 est un virus à ADN linéaire double brin, enveloppé, dont le génome (le plus grand de cette famille) est de 295 kb. La capside a une structure icosaédrique de diamètre variant entre 100 à 110 nm, tandis que le diamètre du virion mature varie entre 170 et 230 nm (voir Figure 8). Le génome complet étant récemment élucidé, il est constitué d'environ 60 % de nucléotide G + C. Par ailleurs il comporte à ses extrémités deux régions dont les séquences nucléotidiques sont répétitives avec un poids de 22 kb chacune (Aoki et al., 2007; Bercovier et al., 2005; Fournier, 2008).

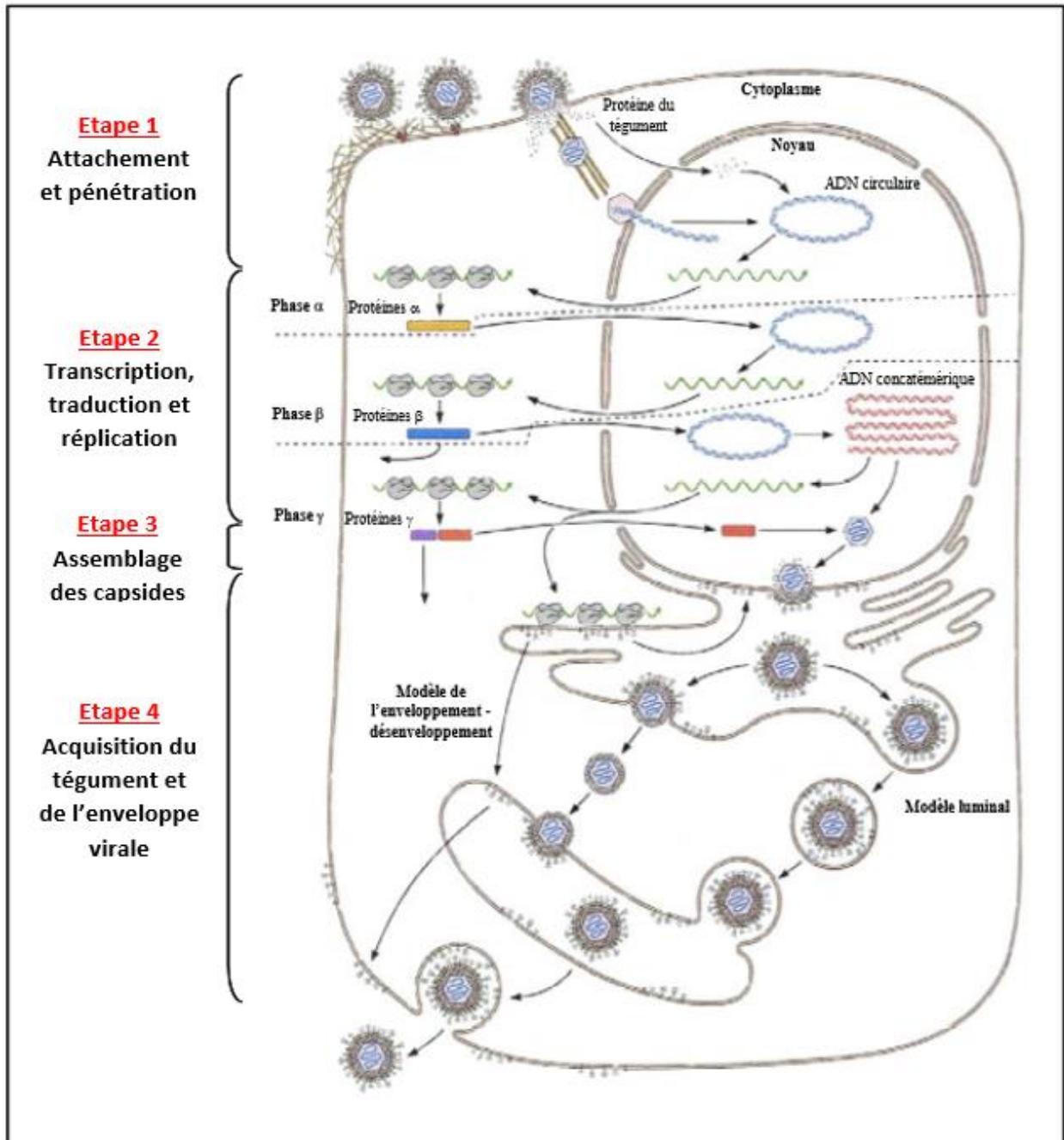


Figure 7: Cycle de multiplication des herpesvirus : Infection productive (Adapté de Fournier, 2004)

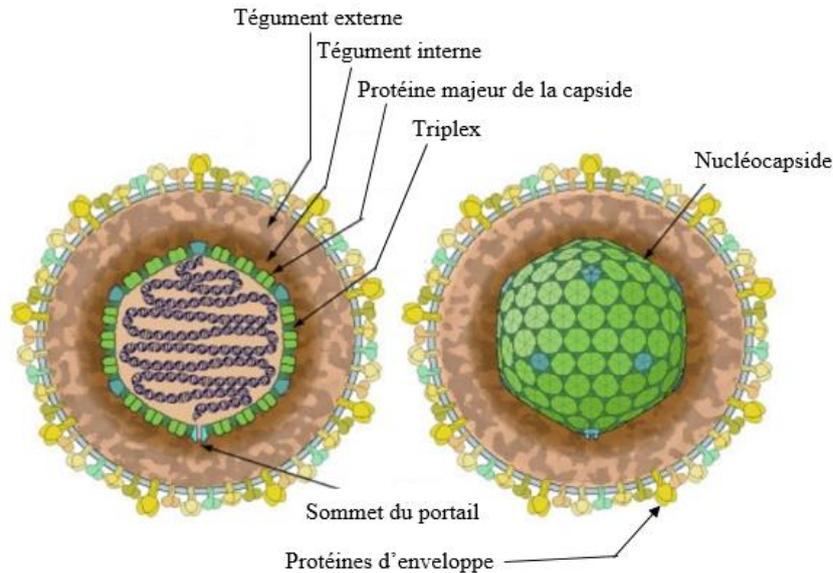


Figure 8: *Cyprinivirus*
(Adapté de ViralZone : <https://viralzone.expasy.org/236>)

1.3.3.2. Mécanismes et manifestations de l'infection

a. Mécanisme d'infection chez la carpe

La transmission virale est horizontale et se fait par les fèces, diverses sécrétions de la carpe déjà infectée, les mollusques et les crustacés infectés (Gilad et al., 2004; Gotesman et al., 2013; Thiéry et al., 2003). Comme tous les herpèsvirus, le CyHV-3 est capable d'infecter son hôte et de rester au stade latent pendant des années. Dans ces différentes sécrétions comportant des virions, ceux-ci sont capables de résister dans le milieu pendant 4h à des températures comprises entre 23°C et 25 °C. L'infection se fait à des températures de l'eau qui varient entre 18 °C et 28°C, la peau étant la voie principale de contamination (El-Matbouli et Soliman, 2011a; Fournier, 2013; Hedrick et al., 2005); En dessous de cette température, le virus est inactivé ou persiste à la phase de latence, et au-dessus de 30°C son action est inhibée (Gilad et al., 2004). Par ailleurs Kasai et al, rapportent l'inactivité du virus en présence de certains désinfectants tel que l'iodophor à 200mg/l ou l'alcool éthylique à 40% (Kasai et al., 2005).

b. Manifestation de l'herpèsvirose chez la carpe

Si la condition principale de permissivité est optimale, à savoir une température qui varie entre 18 et 28 °C, le virus infecte alors le sujet sain. L'infection se manifeste premièrement par la présence d'une léthargie accompagnée quelques fois des phases d'hyperactivité,

secondairement par une énophtalmie (voir Figure 9). La troisième phase se caractérise par une hypersécrétion de mucus et des ulcérations cutanées et bronchiques et la dernière phase est celle des hémorragies cutanées et nécroses bronchiques. Il est à remarquer qu'une carpe infectée en phase de latence est identique à une carpe qui a survécu à l'infection. Elle se comporte comme des réservoirs d'une part et peuvent faire ou refaire la maladie d'autre part (El-Matbouli et Soliman, 2011b; Fabian et al., 2016; Fournier, 2013).



Putréfaction des branchies



Multiples tâches blanches sur le corps



Putréfaction des nageoires



Sécrétion excessive du mucus



Énophtalmie



Chute des écailles et lésions cutanées

Figure 9: Signes cliniques de l'herpès-virose
(Adapter de [aquatechnobel.be](http://www.aquatechnobel.be))

(<http://www.aquatechnobel.be/index.php?pg=poisson/khv4>)

I.3.3.3. Quelques méthodes de diagnostic

a. Test ELISA

L'ELISA « *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* » est un test immunologique utilisé afin de rechercher des anticorps produits par l'organisme et spécifiques des antigènes ou germes infectieux chez un sujet. La recherche de l'anticorps anti CyHV-3 dans le sérum, peut se faire chez des carpes ayant survécus à une infection même une année plus tard. Par contre cette même démarche est difficile à entreprendre entre le moment de l'infection et la manifestation des signes cliniques du fait de la mise en place de la réponse tardive par le système immunitaire ou encore de la virulence du virus qui entraîne des mortalités élevées en quelques jours (Adkison et al., 2005; Coutrot et al., 2007; Soliman et El-Matbouli, 2005; St-Hilaire et al., 2005).

b. Test qPCR

Contrairement à l'ELISA, la PCR « *Réaction de Polymérisation en Chaîne* » est une technique moléculaire directe permettant d'amplifier *in-vitro* une séquence d'acide nucléique (Poitras et Houde, 2002). Il existe plusieurs types de PCR : la PCR standard ou conventionnelle pour la recherche de l'ADN, la RT-PCR ou retro transcriptase PCR pour la recherche de l'ARN, la qPCR pour la PCR quantitative qui peut être effectuée pour quantifier l'ADN (Poitras et Houde, 2002). De nombreuses études portant sur la recherche du CyHV-3 ont utilisé la PCR comme technique de diagnostic (Bergmann et al., 2009; Clouthier et al., 2017; Honjo et al., 2010; Soliman et El-Matbouli, 2005; Thiéry et al., 2003; Tse et Capeau, 2003).

I.3.3.4. Traitement et prophylaxie

L'agent responsable de l'herpès virose étant un virus, il n'existe à ce jour aucun traitement contre cette pathologie. La meilleure mesure reste la prévention (de Kinkelin-Pelletan et Michel, 2014). Les travaux de recherche menés en 2004, par Fournier en Belgique portant sur le clonage du génome de l'herpès virus cyprin-3 en tant que chromosome artificiel bactérien ont permis d'entrevoir des possibilités de production de vaccin contre l'herpès virose (Fournier, 2008). Dans le même ordre d'idée, il a été mis au point en Israël un vaccin contre le KHV. Cependant son utilisation n'est pas encore répandue de par le monde car, elle présenterait quelques inconvénients.

**MATERIELS
ET
METHODES**

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Cadre, période, population de l'étude

Notre étude s'est déroulée dans la région d'Analamanga (voir Figure 10). Sur la période d'octobre à décembre 2018, nous avons collecté 32 carpes, provenant de 16 élevages répartis dans 5 districts sur les 6 que compte la région.

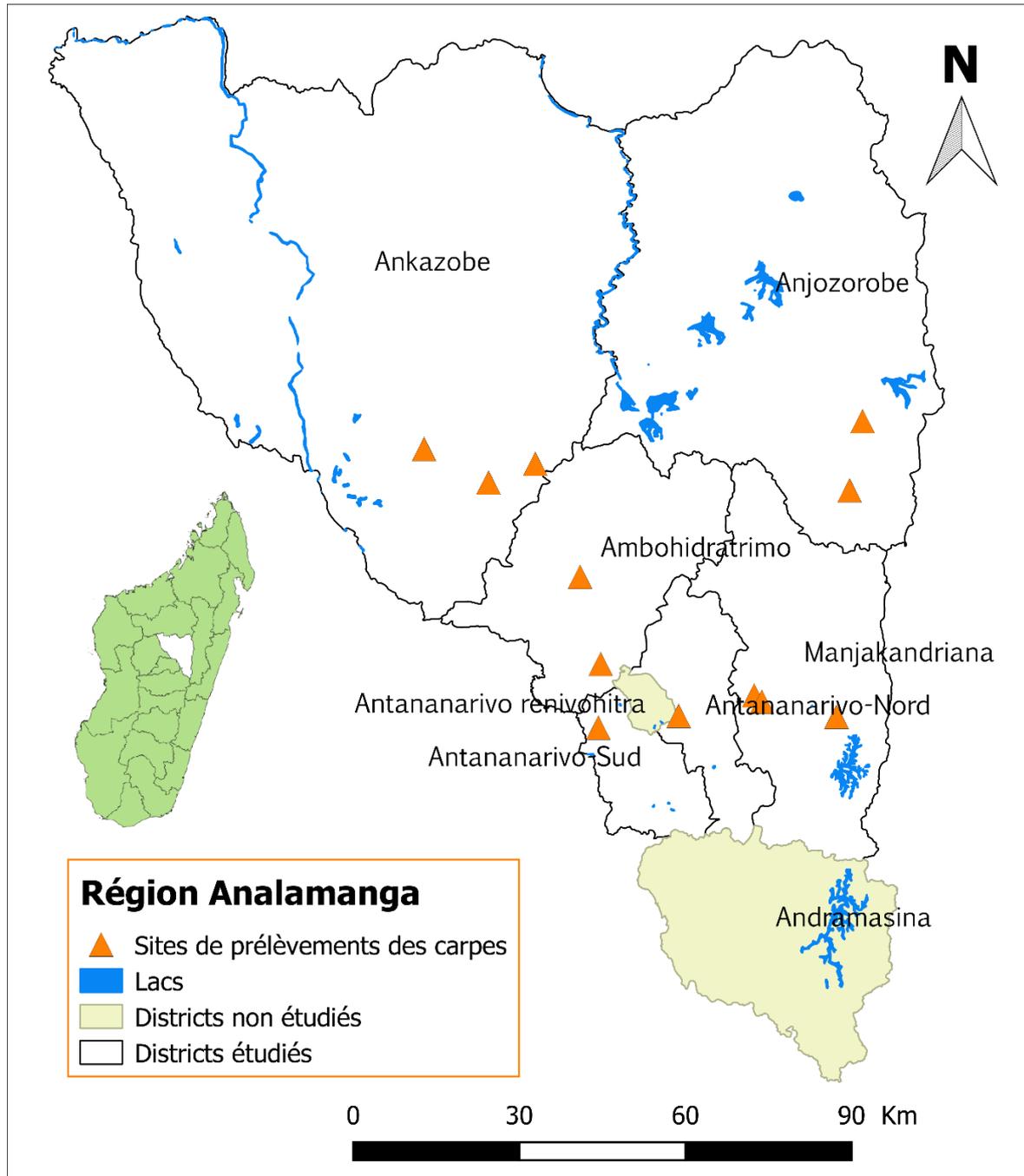


Figure 10: Région d'Analamanga et sites d'échantillonnage (Auteur à partir de QGIS 2.18.14, 2019)

Nous avons mené depuis 2014 nos différents travaux de recherche au sein du DRZVP/FOFIFA. Il s'agit d'un département de recherche comportant plusieurs laboratoires pour la recherche animale parmi lesquels le laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire dans lequel nous avons travaillé pour la présente étude. Orienté uniquement depuis sa genèse sur toutes les autres espèces animales tant de rente que de compagnie à l'exception des poissons d'eau douce, ce laboratoire se voit confier en 2016 de nouvelles responsabilités par la prise en charge de la recherche sur la pisciculture.

Pour cette collecte, un questionnaire d'enquête est préalablement conçu (Annexe 1) et l'échantillonnage est basé sur l'acceptabilité et le choix des éleveurs. Une fois collectées, les carpes sont mises dans une glacière contenant de la glace et directement acheminées au laboratoire où elles subiront une inspection préalable avant la dissection (Figure 11). La dissection permet de prélever le foie et les branchies, de les fixer dans de l'éthanol à 70° et de les stocker pour l'analyse (Figure 12).



Figure 11: Conditionnement dans des sachets Ziplock (Auteur, 2018)

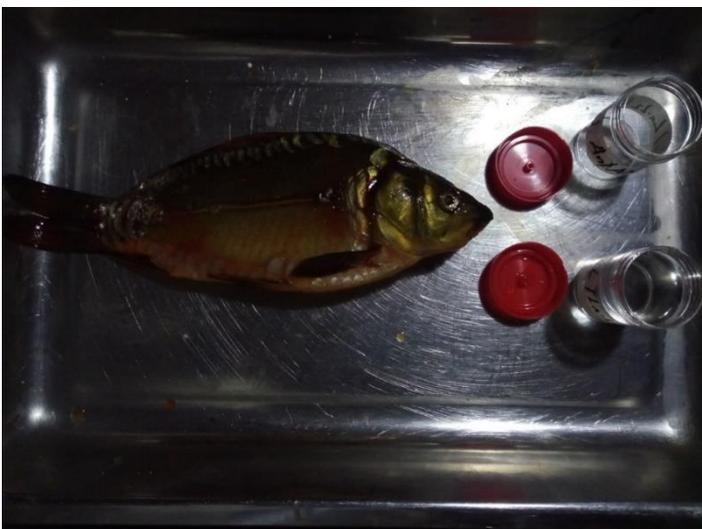


Figure 12: Dissection et prélèvement de foie et de branchie (Auteur, 2018)

II.2. Kit de diagnostic

Le kit utilisé dans le cadre de la recherche des acides nucléiques chez les carpes de la région d'Analamanga est *le kit genomic DNA from tissue de Macherey-Nagel gmbh&co.kg 740952.250* (Figure 13).

Il contient les produits suivants.

- Wash buffer B5
- Buffer B1
- Wash buffer BW
- Lysis buffer B3
- Elution buffer BE
- Lysis buffer T1
- Protéinase buffer PB
- Colonne en silicone



Figure 13: Le kit genomic DNA from tissue de Macherey-Nagel (Auteur, 2018)

II.3. Extraction de l'acide nucléique

II.3.1. Principe

Le principe de l'extraction de l'acide nucléique est celui de la chromatographie d'affinité (Figure 14). Il utilise une phase stationnaire constituée d'un support macromoléculaire chimique inerte et poreux sur lequel est greffée par covalence une molécule organique ou effecteur qui présente une affinité sélective pour certains constituants de l'échantillon à analyser. Lors du passage de la solution non purifiée à travers la colonne, la molécule désirée se lie à l'effecteur alors que les autres composants sont élués. La molécule désirée est ensuite obtenue par des modifications de la phase mobile. Les modifications sont ici générées par des modifications du pH ou par l'ajout d'un compétiteur (Bienboire-Frosini, 2016; Chapuis et al., 2005; Nicolas-Simonnot, 1991)

Le kit utilisé contient plusieurs tampons de lavage « *Wash buffer* » qui ont pour rôle de laver ou d'éliminer toutes les impuretés qui ne se sont pas greffées à la molécule à purifier. Il contient également plusieurs solutions de lyse « *Lysis buffer* » dont le rôle est de lyser les membranes

cytoplasmique et cellulaire pour permettre d'avoir accès à l'acide nucléique contenu dans le noyau cellulaire. Le kit contient également un tampon d'éluion « *elution buffer* » qui permet d'éluier ou de détacher l'acide nucléique de la phase organique de forte affinité une fois toutes les impuretés enlevées. Il renferme aussi une enzyme, la protéinase K, dont le rôle est de dégrader la plupart des impuretés d'origine protéique. Notons que l'éthanol utilisé a pour rôle de précipiter l'acide nucléique lors de l'extraction (Desquesnes et Tresse, 1996; Niepceron et al., 2009; Raoudha et al., 2012)

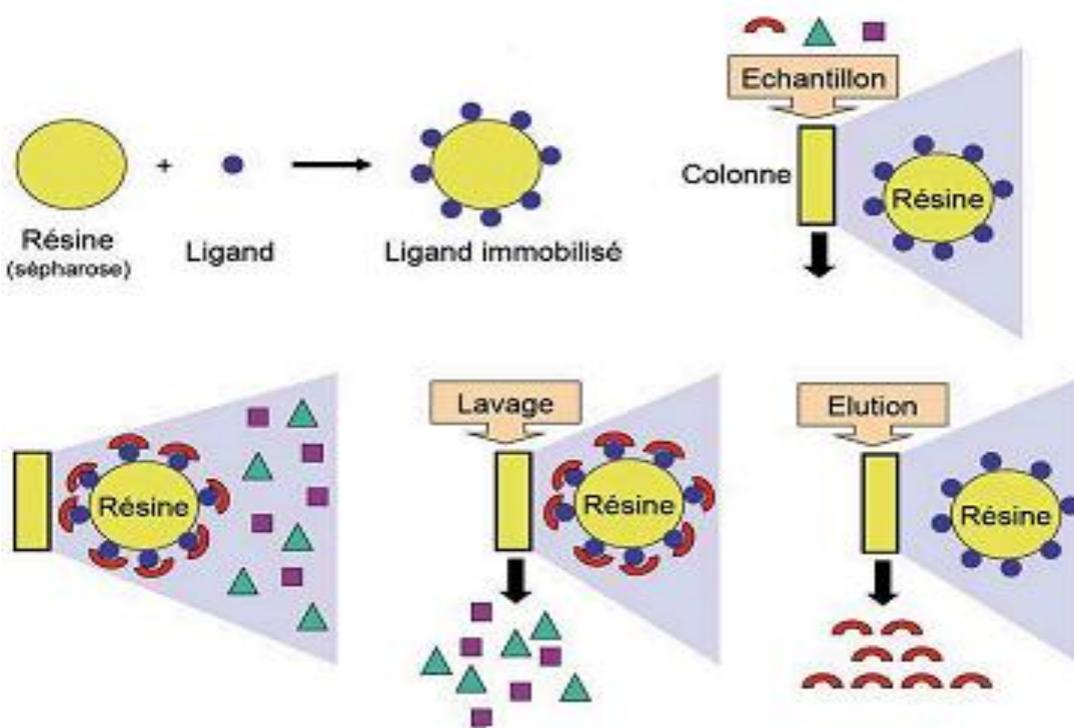


Figure 14: Principe de la chromatographie d'affinité (Ladram et Camus, 2012)

II.3.2. Extraction proprement dite

Elle est réalisée en plusieurs étapes conformément aux recommandations du kit fourni.

II.3.2.1. Préparation des réactifs

Certains réactifs sont préparés à l'avance avant l'extraction proprement dite. Il s'agit du tampon de lyse B3 obtenue en transférant le contenu du tampon B1 dans le flacon contenant le tampon B3. L'ensemble est homogénéisé puis dénommé « *tampon B3* ». Pour le tampon de lavage B5 ou tampon B5, le volume d'éthanol indiqué est ajouté au flacon contenant le tampon B5.

Pour la protéinase K, le volume de tampon PB indiqué est ajouté pour dissoudre la protéinase K sous forme lyophilisée.

II.3.2.2. Préparation de l'échantillon

25mg pour chacun de nos échantillons (foie et branchie) sont prélevés puis broyés dans 75µl de PBS (*phosphate buffered saline*) ou tampon de phosphate salin en présence de sable. L'ensemble est ensuite homogénéisé et le surnageant récupéré.

II.3.2.3. Extraction de l'ADN proprement dite

a. Pré-lyse de l'échantillon

Sont ajoutés dans le surnageant, 180 µl de tampon T1 et 25 µl de protéinase K. Une homogénéisation au vortex et une incubation à 56°C pendant 1 à 3 h avec des agitations régulières, permettent d'obtenir une lyse complète des membranes cellulaires.

b. Lyse de l'échantillon

L'échantillon obtenu de la pré-lyse est mélangé puis additionné de 200 µl de tampon B3. Après une agitation vigoureuse et une incubation à 70°C pendant 10min, le mélange est soumis à une centrifugation pendant 5min à haute vitesse (11.000xg) et le surnageant est transféré dans un nouveau microtube de 1,5ml.

c. Ajout de l'éthanol

Dans le surnageant obtenu, sont ajoutés 210 µl d'éthanol (96-100%) pour la précipitation de l'ADN. Après une agitation énergétique un mince filament apparaît dans la solution. Après la collecte de tous les précipités dans une colonne, cette dernière est placée dans des tubes collecteurs pour une centrifugation pendant 1min à 11.000xg. Au terme de la centrifugation, les surnageants sont jetés. Certains de nos échantillons pour lesquels nous soupçonnons une extraction incomplète ont fait l'objet d'une nouvelle centrifugation pendant 1min à 11.000xg.

d. Lavage de la membrane en silicone

Le premier lavage consiste en l'ajout de 500 µl de tampon BW dans la colonne et en une centrifugation pendant 1min à 11.000xg. La solution récupérée dans le collecteur est jetée et la colonne est de nouveau placée dans le collecteur.

Le deuxième lavage consiste en l'ajout de 600 µl de tampon B5 dans la colonne puis en une centrifugation pendant 1min à 11.000xg. Le surnageant est écarté et de nouveau la colonne est placée dans le collecteur.

e. Séchage de la membrane en silicone

Pour éliminer l'éthanol résiduel, au terme du second lavage, la colonne est centrifugée pendant 1min à 11.000xg. La colonne est ensuite placée dans un microtube de 1,5ml auquel sont ajoutés

100 µl de tampon BE préchauffé (70°C). Après une incubation à la température ambiante pendant 1min est entreprise une centrifugation pendant également 1min à 11.000xg.

II.4. PCR en temps réel

II.4.1. Principe

La PCR ou réaction de polymérase en chaîne fut inventée par K. Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Elle permet d'obtenir par répllication *in vitro* de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. L'ADN matriciel peut être de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire obtenu par qPCR à partir d'un extrait d'ARN messenger (ARN poly-A), ou encore de l'ADN mitochondrial (Figure 15).

La qPCR, combine l'amplification des séquences d'ADN répliquées ou amplicons et la quantification des amplicons formés. Cette quantification se fait par l'intermédiaire d'un signal fluorescent et la fluorescence est proportionnelle au nombre d'amplicons générés dans la solution Une fois tous les réactifs placés dans la microcupule, la PCR est faite en 3 étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (Figure 15). Ces 3 étapes constituent un cycle et après 40 cycles le nombre de copies est portée à plusieurs millions (Bustin, 2005; Fraga et al., 2008; Poitras et Houde, 2002).

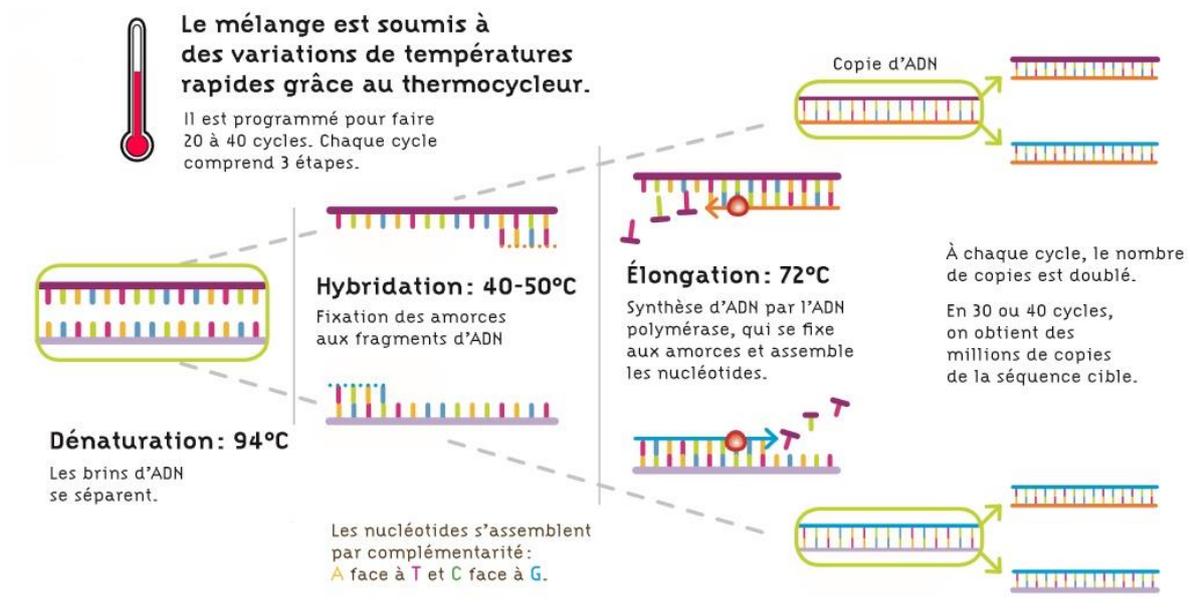


Figure 15: Différentes étapes de PCR
(Adapter de Isabelle aguilar, 2008)

http://www.genethon.fr/wp-content/uploads/2011/08/10-pcr_et_sequencage.pdf

II.4.2. Recherche du génome complet du KHV

Elle est faite sur le site américain NCBI ou *National Centre of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ainsi, diverses séquences du KHV complète ou non y sont disponibles en fichier FASTA dans la base des données GenBank. Nous choisirons dans la suite de nos travaux, et dans NCBI la séquence du génome complet du KHV ayant pour numéro d'accèsion MG 925491.1

II.4.3. Les amorces ou *primers*

Dans notre étude, comme dans celle de Gilad et al. un couple d'amorces pour le criblage de l'ADN (KHV-86f / KHV-163r) est utilisé (Tableau 3) (Gilad et al., 2004).

Tableau 3: Amorces ou *primers*

Cible	Nom du primer	Séquence (5' - 3')
KHV	KHV-86f	GACGCCGGAGACCTTGTTG
	KHV-163r	CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT

II.4.4. Alignement des séquences d'amorce

Dans la base des données NCBI, est choisie la séquence MG 925491.1 correspondant au génome complet du KHV avec une identité de 99% et un gap de 0%. De même en utilisant la technique par alignement des séquences dans la même base de données, il ressort que le *primer* KHV-86f comportant 18 nucléotides est identique et s'aligne parfaitement avec 18 nucléotides de la séquence MG 925491.1. Cet alignement parfait dans le génome complet va du nucléotide numéro 165335 au nucléotide 165352. Il en est de même pour l'amorce KHV-163r, qui comme la précédente amorce s'aligne parfaitement avec une séquence du génome complet et ceci du nucléotide 165412 au nucléotide 165389 soit un alignement homologue de 24 nucléotides. La figure 16 nous présente les alignements des amorces sur le génome complet du KHV.

Download ▾ GenBank Graphics				
Cyprinid herpesvirus 3 strain T, complete genome				
Sequence ID: MG925491.1 Length: 295104 Number of Matches: 1				
Range 1: 165335 to 165352 GenBank Graphics			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
36.2 bits(18)	5.1	18/18(100%)	0/18(0%)	Plus/Plus
Query 1		GACGCCGGAGACCTTGTG	18	
Sbjct 165335		GACGCCGGAGACCTTGTG	165352	

Alignement Amorce KHV-86f sur le génome complet du KHV

Download ▾ GenBank Graphics				
Cyprinid herpesvirus 3 strain T, complete genome				
Sequence ID: MG925491.1 Length: 295104 Number of Matches: 1				
Range 1: 165389 to 165412 GenBank Graphics			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
48.1 bits(24)	0.003	24/24(100%)	0/24(0%)	Plus/Plus
Query 1		AACAAGGACAAAAATAAGAACCCG	24	
Sbjct 165389		AACAAGGACAAAAATAAGAACCCG	165412	

Alignement Amorce KHV-163r sur le génome complet du KHV

**Figure 16: Alignement des amorces sur le génome complet du KHV
(Adapter par l'auteur de NCBI, 2019)**

II.4.5. Préparations des témoins positifs, négatifs et du mélange réactionnel

II.4.5.1. Les témoins positifs et négatifs

Les témoins positifs sont fournis dans le kit GENEKAM ; ils sont faits à base d'ADN du virus de l'herpès virus cyprin de type 3. Les témoins négatifs sont constitués du mélange réactionnel.

II.4.5.2. Le mélange réactionnaire

Pour la préparation du mélange réactionnel pour une micro plaque de 20 puits, les réactifs A et B fournis dans le kit GENEKAM *one step* KHV *Real Time* PCR sont décongelés, puis dans un micro tube RNase / DNase *free* de 1,5 ml sont mélangés respectivement 160 µl du tube A et 200 µl du tube B (Figure 17).

Au terme des préparations, le mélange réactionnel est reparti dans les cupules à raison de 18 µl/puits aux quels sont ajoutés 2 µl d'extrait d'ADN. 2 µl de contrôle positif sont distribués dans les deux puits D2 et D3, également 2 µl de contrôle négatif dans les deux puits D4 et D5.

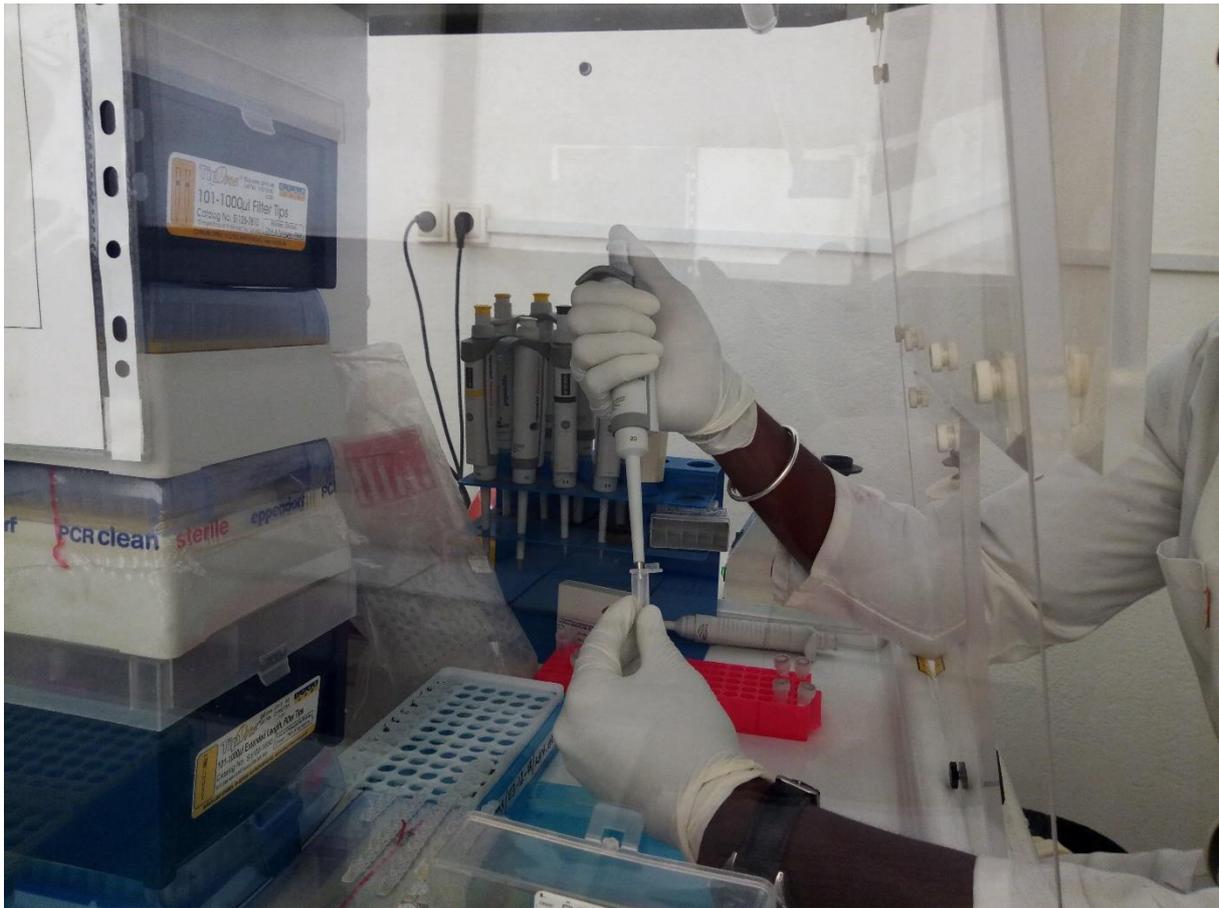


Figure 17: Préparation des échantillons pour analyse PCR (Auteur, 2018)

II.4.5.3. Techniques

La technique utilisée pour quantifier les amplicons est celle dite d'hydrolyse de sondes (*Taqman assay*). Cette technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à la séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation de la PCR autre que son action de synthèse de l'ADN en présence des matrices et initiée par les amorces.

Le fluorochrome émetteur utilisé dans notre cas est la FAM ; 6-carboxyfluorocein, fixée à l'extrémité 5' alors que le fluorochrome suppresseur est le TAMRA ; 6- carboxy-tetramethyl-rhodamine fixé à l'extrémité 3'. Après l'hybridation caractérisée par la fixation de la sonde et des amorces sur leurs séquences complémentaires, l'élongation débute. La Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à sa rencontre avec la sonde hybridée qu'elle va déplacer et l'hydrolyser avec son activité 5' exonucléasique (Figure 18). Ce déplacement va entraîner la libération du « reporter » fluorescent de l'environnement

du suppresseur conduisant ainsi à l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (Poitras et Houde, 2002).

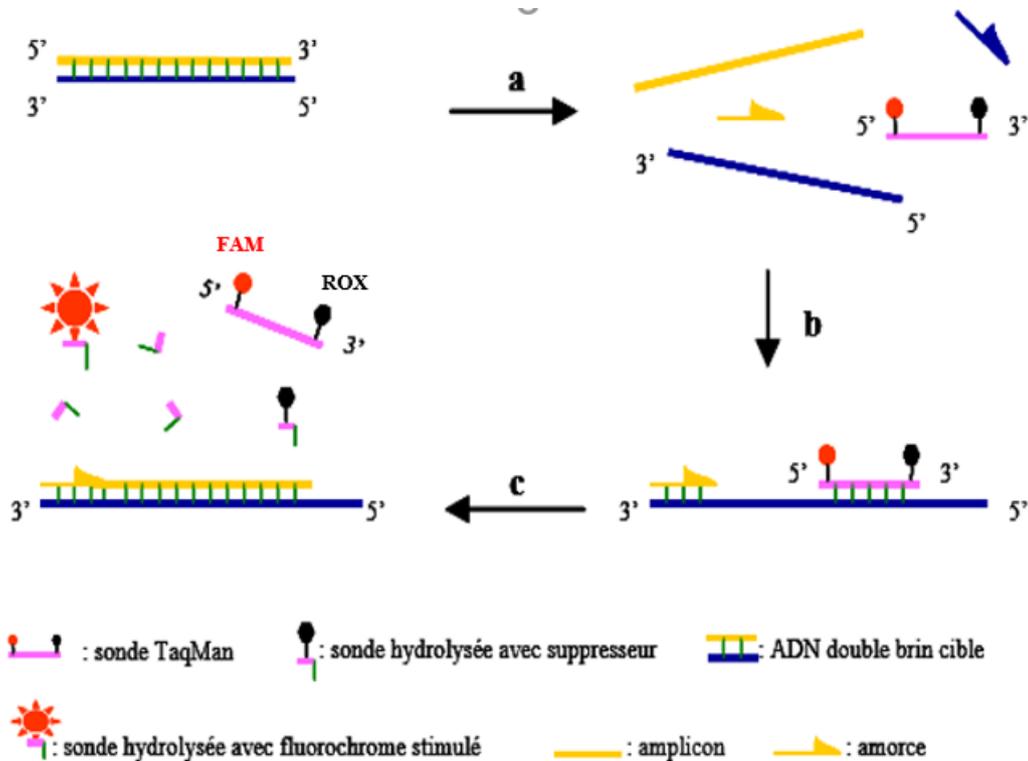


Figure 18: Hydrolyse de la sonde Taqman
(Adapté de Poitras et Houde, 2002)

II.4.5.4. Disposition des échantillons dans les plaques (Mx 3000P Stratagène®)

Après le dépôt des 16 échantillons dans les microcupules, sont rajoutés deux témoins positifs et deux témoins négatifs dans 4 microcupules. La figure 19 présente l'organisation de la microplaque.

Nos 16 échantillons disposés de A1 à A5 (inconnus), puis de B1 à B5 (inconnus), ensuite de C1 à C5 (inconnus) soit 15 échantillons, le 16 -ème sera mis dans la microcupule D1 (inconnu). Deux témoins positifs (NPC) sont placés dans les puits D2 et D3, puis les négatifs dans les puits D4 à D5 (NTC). ROX et FAM étant les émetteurs de fluorescence lors de la réaction, l'analyse est positive lorsque pour nos échantillons sont obtenues des courbes sigmoïdes s'apparentant à celle des témoins positifs, produites avant le 36 -ème cycle qui est le cycle seuil ($Ct < 36$). Elle sera négative lorsque celles-ci s'apparentent à celle des témoins négatifs qui sont des lignes droites (Figure 20).

Plate Setup		Thermal Profile Setup						
	All	1	2	3	4	5	6	7
A	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown		
	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM		
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown		
	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM		
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown		
	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM		
D	Unknown	NPC	NPC	NTC	NTC			
	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM	ROX FAM			
E								

Figure 19: Disposition des échantillons dans le thermocycleur (Auteur, 2018)

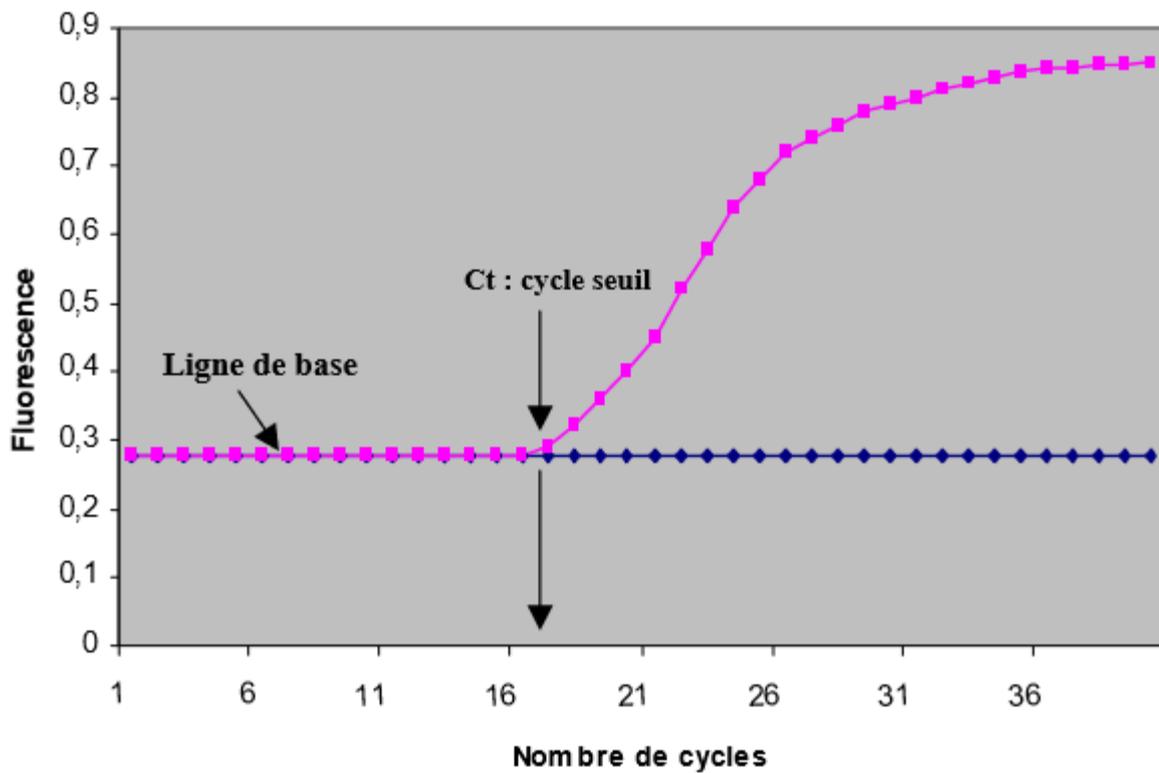


Figure 20: Courbes des témoins positif (rose) et négatif (bleu) en qPCR (Poitras et Houde, 2002)

II.4.5.5. Réglage du profil thermique du Thermocycleur (Mx 3000P Stratagène®)

Après le réglage de la plaque, le profil thermique doit être également réglé conformément aux différentes phases. Le tableau 4 présente les différents réglages thermiques à effectuer avant le lancement de l'analyse.

Tableau 4: Réglage du profil thermique selon les phases de la qPCR

Phases	Numéro du segment	Température (°C)	Durée de la phase	Nombre total de cycle	Durée totale
Activation de la Taq polymérase	1	95	3 minutes	1	1h24mn34s
Dénaturation	2	95	10 secondes		
Hybridation	3	60	1 minutes		
Elongation	4	72	5 secondes		

De même, la figure 21, montre une capture d'écran du profil thermique après réglage sur le logiciel MXpro des paramètres tel que le temps, la température et le nombre de cycle en fonction de leurs étapes ou segment dans le tableau précédent.

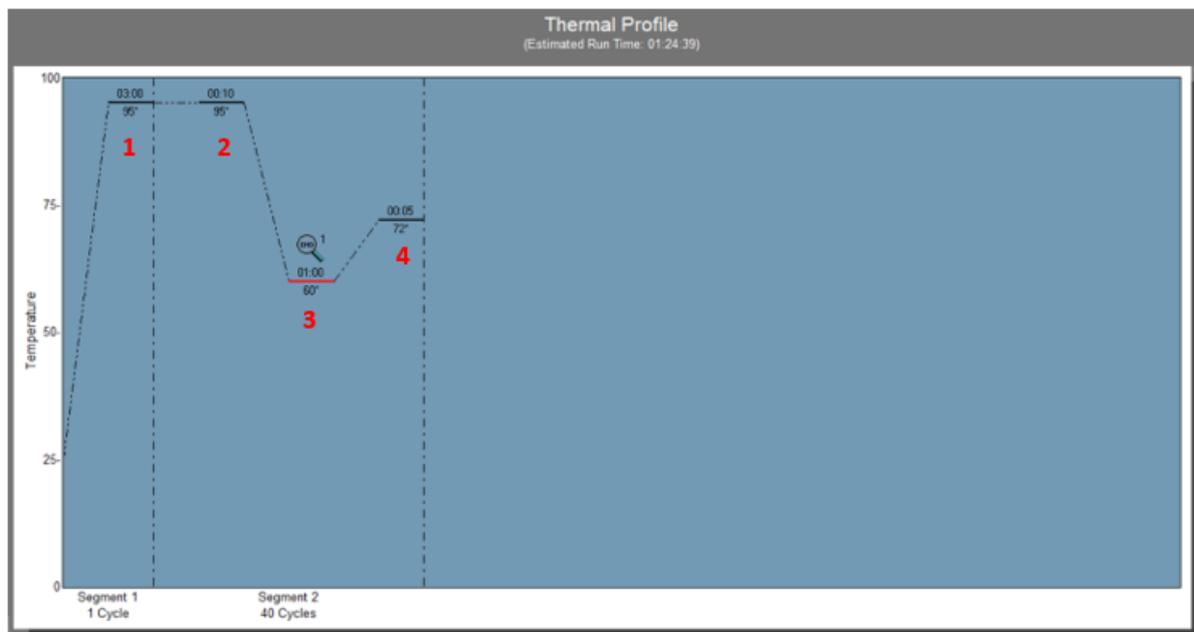


Figure 21: Profil thermique pour la qPCR (Auteur, 2018)

RESULTATS
ET
INTERPRETATION

CHAPITRE III. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

III.1. Enquête sur le terrain

III.1.1. Phénotypes des carpes collectées

Sont collectées dans la région d'Analamanga, 32 carpes tout phénotype confondu, ceci en fonction de l'acceptabilité des pisciculteurs. Pour ces 32 carpes, le phénotype miroir représente 47% de l'ensemble des poissons collectés tandis que le phénotype le moins représenté est koï avec seulement 6%. Les phénotypes écaillé, linéaire et cuir représente respectivement 25 ; 13 et 9 % de l'échantillon. La figure 22 présente la répartition des carpes en fonction du phénotype.

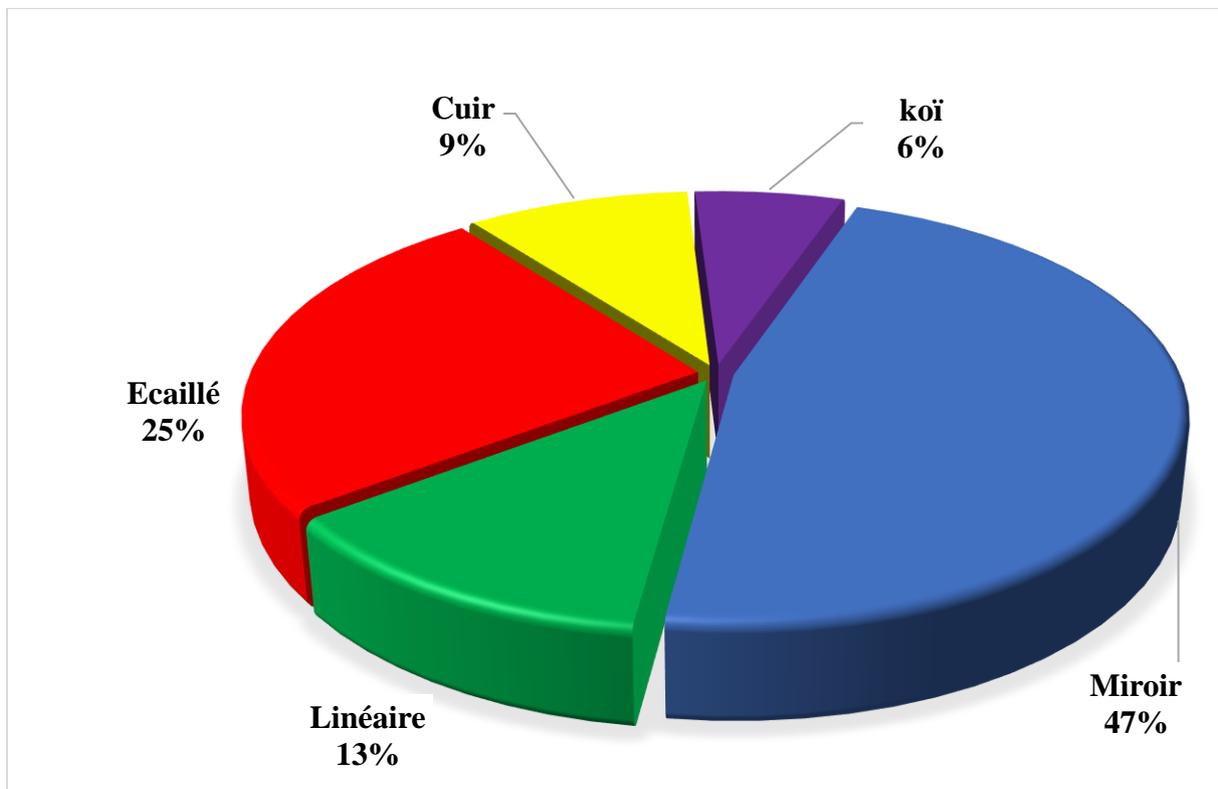


Figure 22: Répartition des carpes selon le phénotype

III.1.2. Carpes collectées et stade d'évolution

La figure 23 présente une répartition de notre population de carpes selon le stade d'évolution. En effet, dans les élevages divers stades d'évolution sont observés en fonction des objectifs et des résultats attendus. Ainsi, 14 carpes sur les 32 échantillonnées sont au stade de

grossissement. Pour les reproducteurs, ils sont respectivement 8 pré-géniteurs et 2 géniteurs. 8 carpes sont au stade de croissance parmi les quelles 2 sont des carpes d'ornement ou carpe koi.

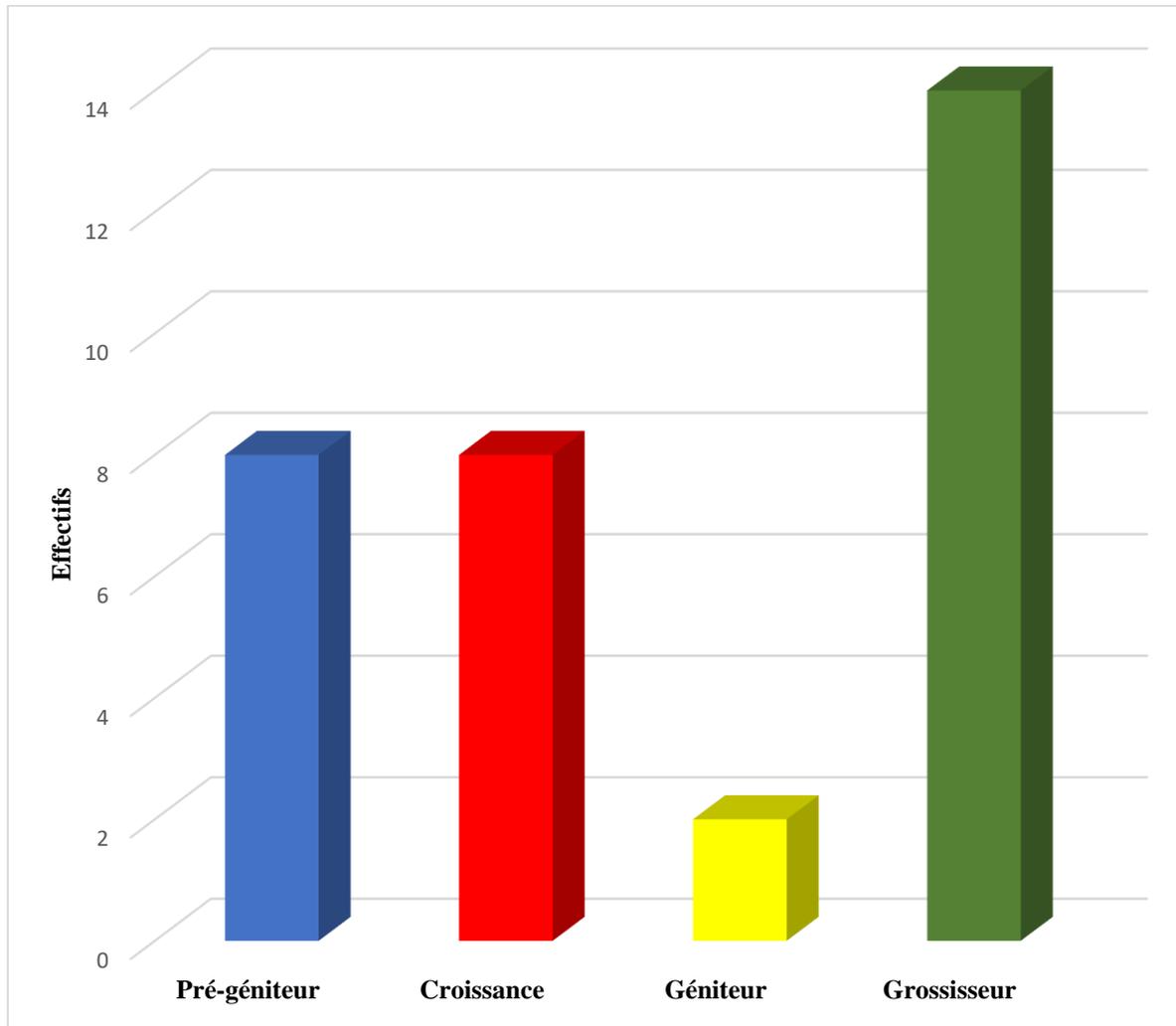


Figure 23: Répartition des carpes selon la phase d'évolution

III.1.3. Carpes collectées et répartition par district

La région d'Analamanga comporte 6 districts : Ambohidratrimo, Manjakandrina, Avaradrano, Ankazobe, Anjozorobe et Atsimondrano. Le tableau 4 présente une répartition de notre population d'étude selon les districts de prélèvement.

Ainsi, 8 carpes proviennent du district de Manjakandrina et 8 autres du district d'Ankazobe. Tous les autres districts ont chacun une taille d'échantillon de 4 carpes, pour un total de 32 carpes (Tableau 5).

Tableau 5: Répartition des carpes selon le district

Districts	Effectifs
Ambohidratrimo	4
Ankazobe	8
Anjzorobe	4
Atsimondrano	4
Avaradrano	4
Manjakandrina	8
TOTAL	32

III.1.4. Carpes collectées et sexe

Dans notre échantillon, 63 % des carpes sont des femelles et 37% des mâles. La figure 24 illustre de façon plus explicite cette répartition.

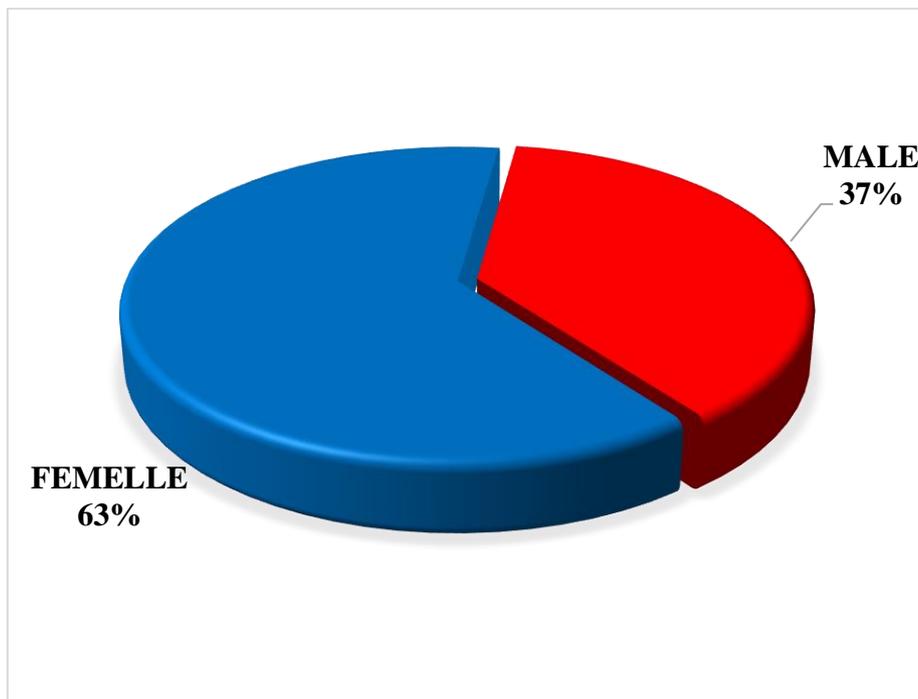


Figure 24: Répartition des carpes selon le sexe

III.1.5. Carpes collectées et type d'aménagement

La pratique de la carpiculture pouvant se faire dans divers types d'aménagement, les carpes collectées proviennent d'élevages en étang ou bassin en rizière. Ainsi 80% des animaux de notre échantillon viennent des étangs et le reste (soit 20 %) des rizières (Figure 25).

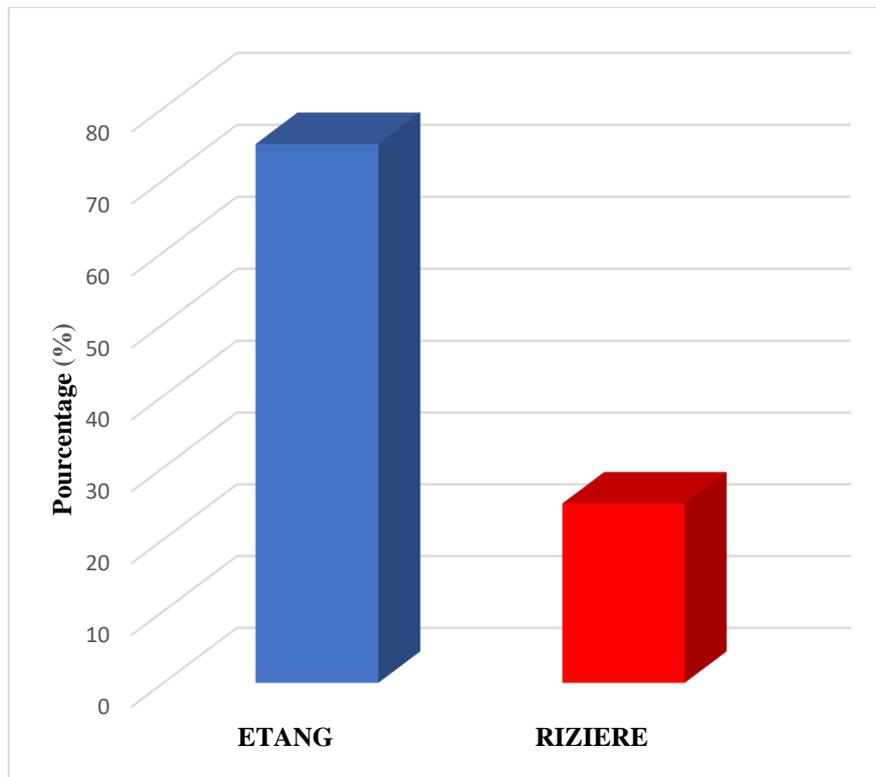


Figure 25: Répartition des carpes selon le type d'aménagement

III.1.6. Carpes collectées et répartition selon les poids

De notre échantillon, il ressort que la carpe la plus lourde a un poids de 585 g et provient du district d'Ambodratsimo. La carpe avec le plus faible poids est issue du district de Manjakandrina avec un poids de 35g. Le traitement en statistique descriptive des poids de nos animaux avec le logiciel statistique XLSTAT est résumé dans la figure 26.

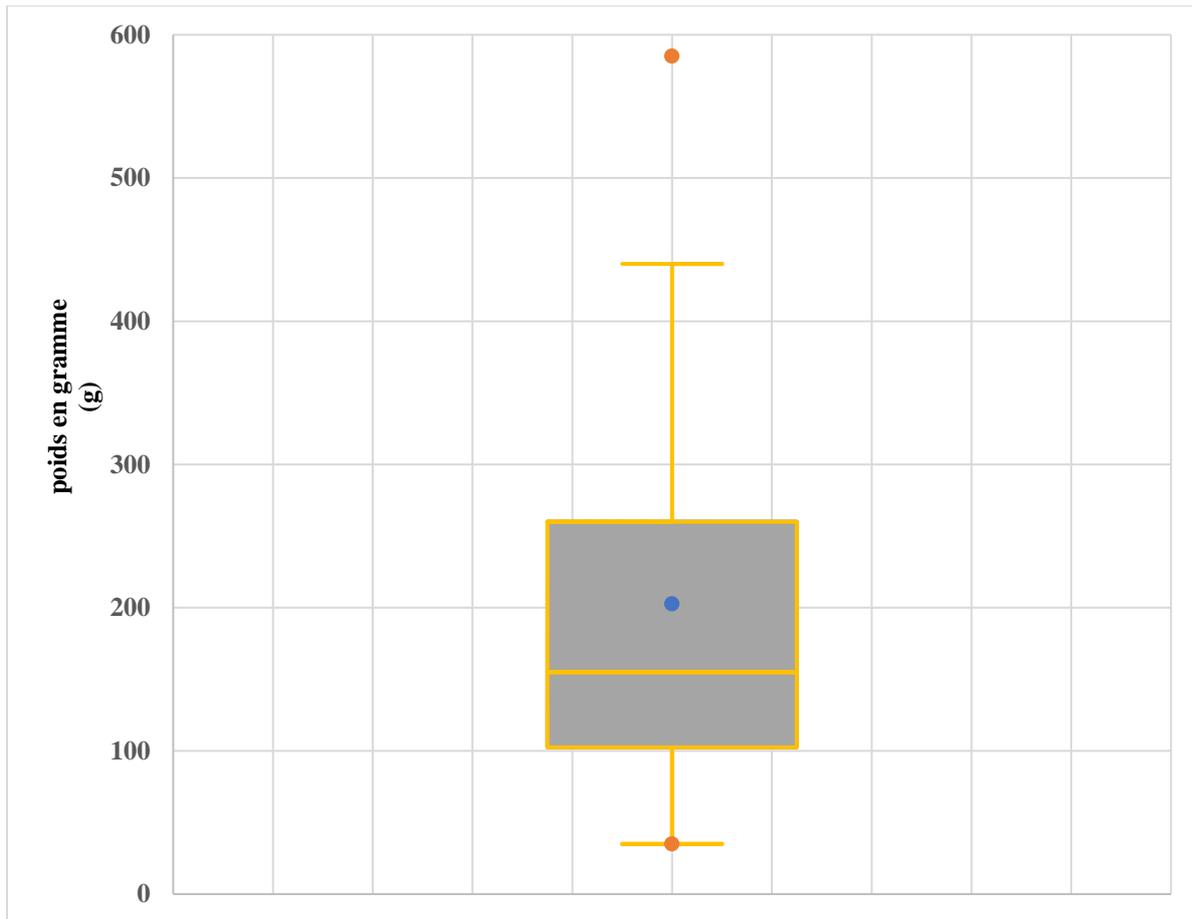


Figure 26: Poids des carpes collectées

Il ressort de cette description que d'une part la médiane des poids de notre échantillon est de 155g et d'autre part 50% de notre échantillon a un poids variant entre 102,5g correspondant au premier quartile (Q_1) et 260g correspondant au troisième quartile(Q_3).

III.2. Diagnostic du KHV en laboratoire

Au terme des 40 cycles d'amplification, nous avons isolé dans un premier temps la courbe correspondant à l'un de nos témoins négatifs, soit celui de la microcupule D4 qui est similaire à celle du second témoin négatif disposé en D5.

La courbe presque droite s'explique par le fait qu'en absence d'ADN d'intérêt, aucun signal fluorescent n'est émis et aucune courbe sigmoïde n'est obtenue.

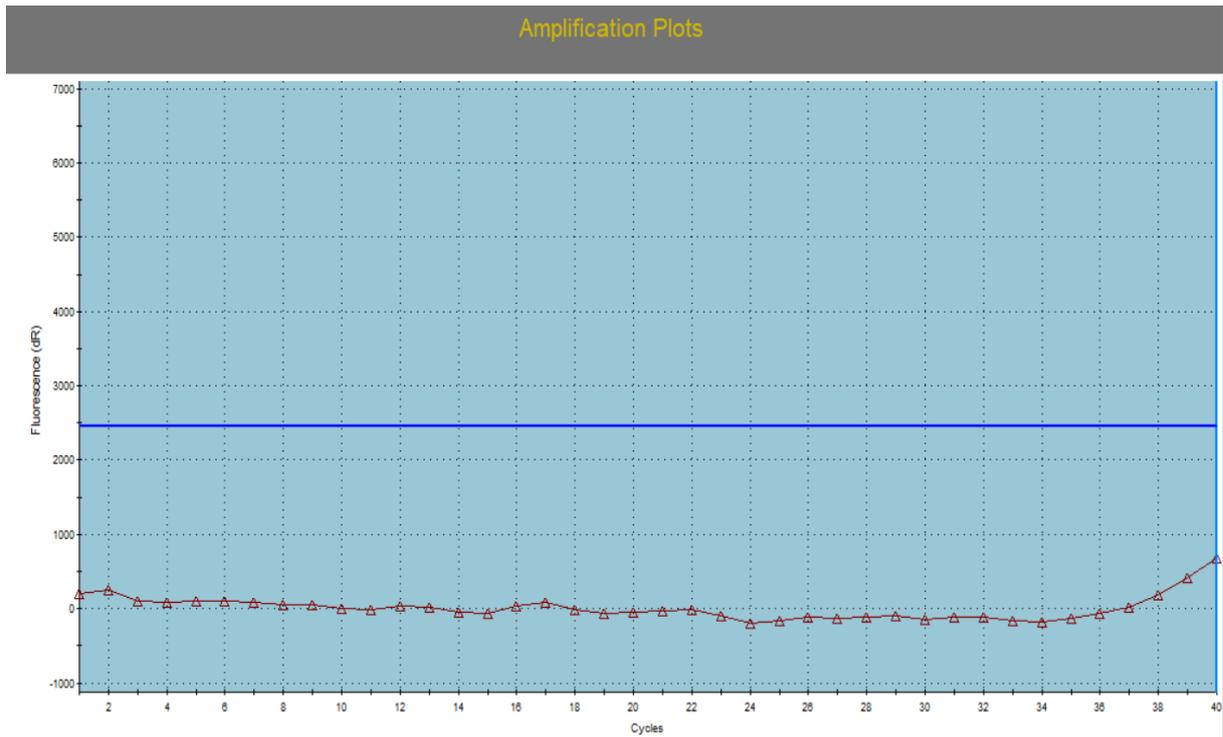


Figure 27: Résultat de la qPCR et témoin négatif

Dans un second temps, nous avons isolé l'une des courbes des témoins positifs, représentée à la figure 28 et correspondant à celle de la microcupule D3. Elle est d'ailleurs identique à celle de la microcupule D4 où est déposé second témoin positif. Il s'agit dans tous les cas d'une courbe sigmoïdale ayant un $Ct = 23,75$ bien avant le cycle seuil (36 -ème cycle). De plus, la courbe sigmoïdale est indicative du signal fluorescent et comporte trois phases :

- La première phase qui est exponentielle et témoigne de l'accumulation de la fluorescence
- La seconde phase qui est linéaire où la fluorescence redouble à chaque cycle
- La dernière phase où les réactifs s'épuisent sur la courbe autour du 40 -ème cycle

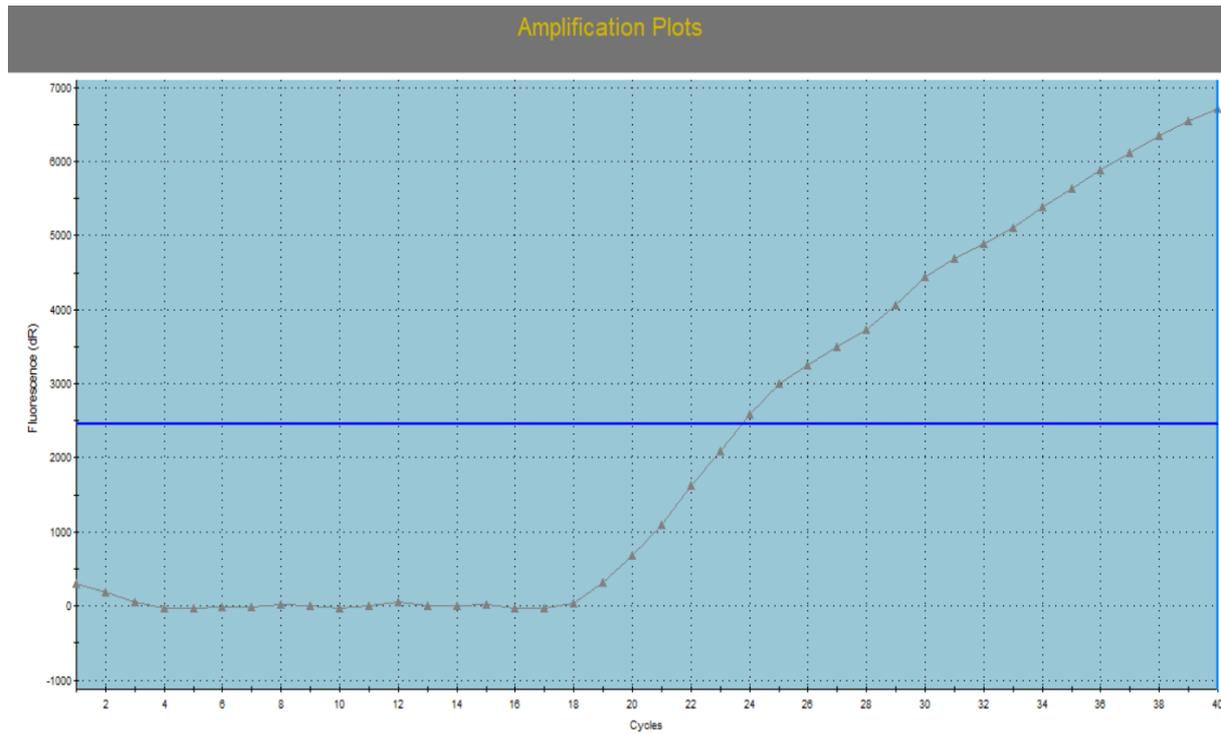


Figure 28: Résultat de la qCR et témoin positif

Enfin, nous avons considéré ensemble les courbes correspondantes à nos 16 échantillons et nos 4 témoins, les deux négatifs et les deux positifs (voir Figure 29). Il convient de constater la présence de 2 courbes d'allure sigmoïdale correspondant à nos deux témoins positifs alors que toutes les autres courbes sont plates correspondant à tous nos échantillons et aux deux témoins négatifs. De cette observation, nous pouvons dire qu'aucun ADN de notre échantillon n'a présenté la séquence d'ADN d'intérêt d'où l'absence du signal fluorescent. Ainsi nous déduisons que tous les éléments constitutifs de notre échantillonnage sont négatifs à l'herpès virus cyprin de type 3 ou KHV (Voir tableau 6).

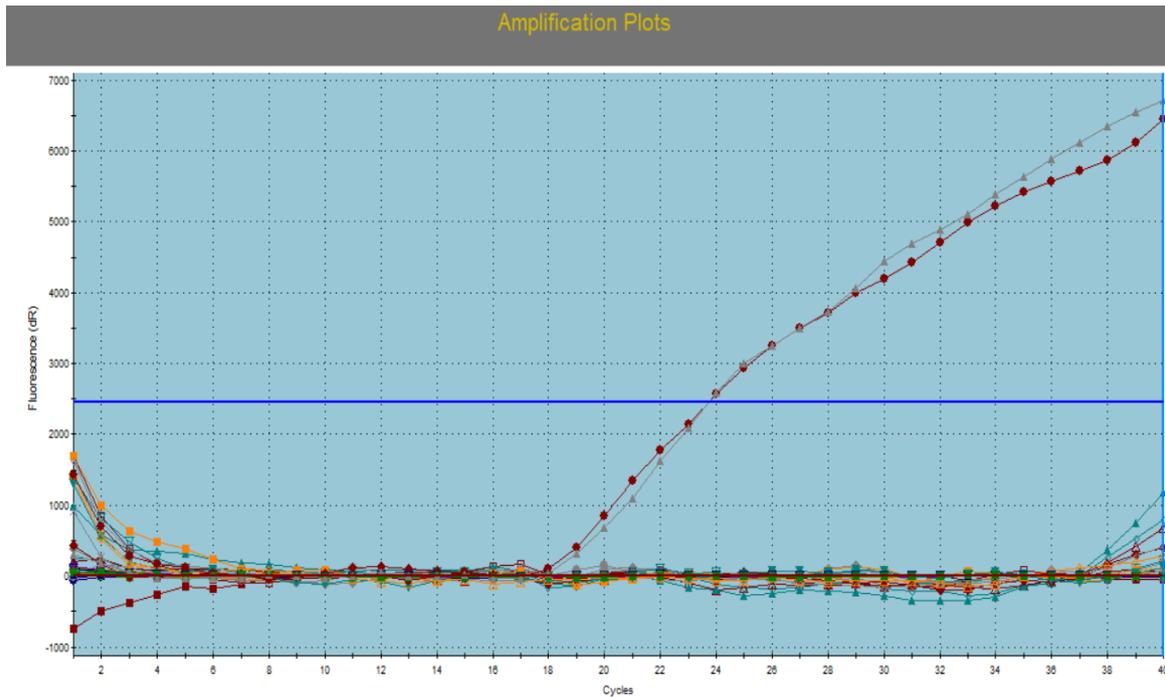


Figure 29: Résultat de la qPCR, échantillons et témoins

Le tableau 6 présente les résultats de la qPCR des échantillons selon les districts et les différentes variétés de carpes collectées dans la région d'Analamanga

Tableau 6: Résultat de la qPCR des échantillons collectés

District	Variétés de carpes	Effectifs	Résultat de la qPCR
Ambohidratsimo	Ecaillée	4	Négatif
	Miroir		
Anjozorobe	Cuir	8	Négatif
	Miroir		
Ankazobe	Cuir	4	Négatif
	Koi		
Miroir	Miroir	4	Négatif
	Ecaillée		
Avaradrano	Ecaillée	4	Négatif
Manjakandrina	Miroir	8	Négatif
	Cuir		

**DISCUSSION
CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

CHAPITRE IV. DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de notre étude est de réévaluer le statut de Madagascar en matière d'infection à l'herpès virus de type 3 chez la carpe, et ce avant toute démarche d'importation de carpe à destination de Madagascar. Bien que nos résultats semblent suggérer *a priori* que Madagascar demeure indemne de l'herpès virose de type 3, quelques points méritent d'être discutés afin de tirer des recommandations.

— Importance de la carpe à Madagascar

La pisciculture et la carpe occupent une place de choix dans le quotidien des habitants de la Grande Ile. En effet cette activité permet aux pisciculteurs et rizipisciculteurs d'avoir des revenus annuels considérables. De plus, la consommation de la carpe à Madagascar est très répandue de par son prix très abordable par rapport à celui d'autres protéines d'origine animale telles la viande de bovin ou de poulet. L'ouvrage sur le recensement agricole à Madagascar dans sa parution en 2007 stipule pour aller dans le même sens que la pratique de la pisciculture se fait à Madagascar sans distinction de genre d'une part, et que la carpe représente avec le tilapia l'un des 2 poissons le plus consommé d'autre part (Bard, 1971; Lemasson, 1957; Ministère de l'agriculture, 2007; Moreau, 1972; Moreau, 1980a; Moreau, 1980b; Therezien, 1960)

— Echantillon et site d'élevage

Notre population d'étude dans le cadre des présents travaux est constituée de 34 carpes comportant les quatre phénotypes (carpe cuir, carpe miroir, carpe écaillée, carpe linéaire) et la carpe koï provenant de 17 élevages. La taille de l'échantillon d'une part et le nombre de site de prélèvement d'autre part sont nettement inférieurs à ceux de Ravakarivelo et ses collaborateurs en 2014 à Madagascar avec 110 carpes provenant de 26 sites de prélèvements (Ravakarivelo, 2016). Cependant contrairement à la présente étude, cet échantillon de 2014 ne comportait pas de carpe d'ornement. L'étude réalisée par Bergmann et ses collaborateurs en Pologne et correspondant à la première détection du KHV, portait sur 3 lots de carpes comportant chacun 15 poissons soit un total de 45 carpes. Une autre différence correspondait également à l'étendue des poids des carpes : en effet dans notre étude, l'étendue des poids est de 550g (585 – 35) tandis que celle de Bergmann et de ses collaborateurs était de 105g (135 - 30), nettement inférieure à la nôtre (Bergmann et al., 2006). Ainsi, une augmentation d'une part du nombre d'élevage et d'autre part du nombre de poissons récoltés pourrait fournir des résultats

assimilables au notre et donc nous conforter sur le statut indemne de Madagascar face au KHV ou au contraire nous fournir des résultats différents des nôtres.

— **Notre région d'étude**

En 2014, la collecte des échantillons est faite dans plusieurs régions de Madagascar où la pratique de la pisciculture et particulièrement de l'élevage de la carpe est important : il s'agissait des régions d'Analamanga, d'Itasy, de la Haute Mtsiatra et du Vakinankaratra. Notre étude par contre est réalisée uniquement dans la région d'Analamanga. Bien que cette dernière région constitue le pôle par excellence de la dynamique des flux des poissons d'eau douce, il n'en demeure pas qu'une collecte des échantillons et des analyses en laboratoire dans les autres régions constituerait une démarche plus appropriée afin d'avoir un statut plus global et plus efficient de la Grande l'Ile face au KHV (Ravakarivelo, 2016).

— **La dynamique des flux et chaîne de valeur**

Au regard de la dynamique des flux observée en 2014 et présentant une allure grandissante (Oswald et al., 2016), nous pensons qu'il serait opportun de mettre sur pieds les autres chaînons de la chaîne de valeur. Ces chaînons sont dans un premier temps la réglementation des textes liés aux importations des produits de la pêche et de l'aquaculture, tant vivants que morts. Il s'agit dans un second temps de créer un laboratoire ou un institut de recherche d'ichtyopathologie sur des produits de la pêche et de l'aquaculture, l'intérêt étant ici de poser des diagnostics pour toutes les pathologies rencontrées chez les poissons qu'elles soient virales, parasitaires, bactériennes ou fongiques. Un deuxième intérêt consiste en des recherches sur la production, la reproduction, la santé, l'alimentation comme dans des secteurs tel que l'agriculture (Blancard et al., 2012). Un autre chaînon tout aussi important est la mise en place d'un réseau de surveillance épidémiologique comportant diverses cellules de veille comme pour d'autres pathologies animale et humaine, ceci afin de garantir la sécurité et l'état sanitaire des poissons qui font l'objet des flux tant sur le plan national qu'international (Artois et al., 2004; Pottier, 2008). Ces différentes mesures sont justifiées par la fréquence grandissante sur la Grande Ile de producteurs de carpes koïs, poissons d'ornement et dont l'introduction à Madagascar ne fait pas toujours l'objet d'un réel suivi sanitaire. De plus, l'épizootie liée à la maladie du syndrome des taches blanches à Madagascar quelques années auparavant a généré une perte économique considérable et la fermeture de diverses stations de crevetticulture (de Jesús Durán-Avelar et al., 2015; Idalia, 2008; Probiotiques, 1981; Randrianarivelo, 2010).

Pour le quotidien, il serait important de prendre des mesures de sécurité sanitaire (dont des inspections sanitaires) avant tout transport, toute commercialisation et toute consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture comme dans plusieurs autres pays. Il serait, également important que le ministère en charge de la pêche et de l'aquaculture via sa cellule de surveillance puisse avoir des informations sur les différents mouvements ou flux sur les importations tant sur le plan national qu'international. Cette démarche permettra une meilleure mobilisation et une meilleure gestion de la crise en cas d'éventuelle épizootie à l'herpèsvirus cyprin de type 3. Ses différentes mesures vont dans le même sens que celles préconisées en 2016 à l'issue du projet PARRUR, projet auquel nous avons pris part et qui portait notamment sur l'évaluation de la variabilité génétique de la carpe, sur le statut de Madagascar face à l'herpès virus cyprin de type 3 et aussi sur les parasites chez la carpe et le tilapia (Adoukonou et al., 2014; Oswald et al., 2016; Prudhomme, 1957; Prudhomme et Pantaleon, 1959)

— **Méthode de diagnostic**

Dans le cadre de notre diagnostic, nous avons utilisé à l'aide du le kit *genomic DNA from tissue de Macherey-Nagel gmbh&co.kg 740952.250* la méthode de PCR en temps réel avec la sonde Taqman qui de plus en plus est utilisée actuellement dans divers cas de diagnostic du KHV. Bien que couteuse, la sonde est de fixation plus spécifique lors de l'hybridation sur sa séquence complémentaire et fournit ainsi une meilleure quantification des amplicons de par la fluorescence émise à chaque cycle (Gilad et al., 2004; Kamimura et al., 2007). Cependant plusieurs études rapportent également la PCR conventionnelle ou encore la PCR nichée ou encore l'ELISA comme méthodes de diagnostic du virus de l'herpès virose chez la carpe. (Bergmann et al., 2006; Bustin, 2005; Mathys et al., 2007; Matras et al., 2012; Matsui et al., 2008; Sano et al., 2004).

— **Statut herpétique de Madagascar**

Bien qu'indemne en 2014 et 2018 contrairement à bien des pays, malgré des importations non maîtrisées sur le plan national et international des carpes à différents stade d'évolution et malgré le caractère latent de l'infection par le virus de l'herpès, Madagascar se doit de reconduire la même étude dans quelques années afin de s'assurer du statut indemne de Madagascar face au KHV (Baumer et al., 2013; Dong et al., 2013; Garver et al., 2010b; Hedrick et al., 2000b; Oswald et al., 2016).

En filigrane, nous pensons qu'il serait important de mettre en place une réelle mesure de surveillance lors des importations et des exportations de carpe à Madagascar bien que le pays

demeure indemne à l'herpèsvirus cyprin de type 3. Notons également que l'importation des espèces de poisson d'eau douce en général et de la carpe en particulier constituerait un réel avantage pour le décollage de la filière piscicole à Madagascar. Ainsi l'importation de la carpe est une démarche intéressante et pourvoyeuse de richesse pour l'Ile. Une dynamique des flux de carpe intense et contrôlée est caractéristique de l'accroissement de la technicité piscicole.

Il conviendrait pour la suite :

- i. De mener des travaux sur la génétique et les pathologies des poissons d'eau douce en général et celle de la carpe en particulier à Madagascar afin d'évaluer le niveau de dégradation génétique (consanguinité) et ou de variabilité génétique.
- ii. De réévaluer le statut de Madagascar face au CyHV-3 dans toute sa globalité en prenant en compte toutes les régions impliquées dans la carpiculture de façon périodique
- iii. De rechercher le KHV dans tous les pays de la sous-région Océan Indien, de solliciter les différents pays pour la mise en place d'un réseau de surveillance épidémiologique afin de maîtriser la propagation de l'herpèsvirus cyprin de type 3 déjà présent en Afrique du Sud.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adkison, M.A., Gilad, O. and Hedrick, R.P., 2005. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathology*, 40(2): 53-62.
- Adoukonou, A., Amoussou, G.R., Alapini Kakpo, G. and Adjou, E.S., 2014. Evaluation de la qualité sanitaire des poissons mis sous glace au port de pêche artisanale de cotonou: cas du *pseudotolithus typus*, EPAC/UAC.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H. and Hedrick, R.P., 2007. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J Virol*, 81(10): 5058-65.
- Apdra, 2018. Potentiel et gestion de la ressource génétique de la carpe à Madagascar
- Artois, M., Loukiadis, E., Garin-Bastuji, B., Thorel, M. and Hars, J., 2004. Infection des mammifères sauvages par *Mycobacterium bovis*—Risque de transmission aux bovins domestiques. *Bulletin Épidémiologique, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, 13: 1-3.
- Arzul, I., 2001. Herpèsvirus infectant les bivalves marins: détection, génome et transmission, *Herpesviruses infecting marine bivalves: detection, genome and transmission*, Université de Montpellier II.
- Arzul, I. and Renault, T., 2002. Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie*, 6(3): 169-74.
- Bard, J., 1971. La production des eaux continentales en Afrique francophone au Sud du Sahara et à Madagascar. *Bois & Forêts des tropiques*, 140(140): 3-12.
- Baumer, A., Fabian, M., Wilkens, M.R., Steinhagen, D. and Runge, M., 2013. Epidemiology of cyprinid herpesvirus-3 infection in latently infected carp from aquaculture. *Dis Aquat Organ*, 105(2): 101-8.
- Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A. and Hedrick, R.P., 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol*, 5: 13.
- Bergmann, S., Kempter, J., Sadowski, J. and Fichtner, D., 2006. First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. *Bulletin-european association of fish pathologists*, 26(2): 97.
- Bergmann, S., Schütze, H., Fischer, U., Fichtner, D., Riechardt, M., Meyer, K., Schrudde, D. and Kempter, J., 2009. Detection of koi herpes virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 29(5): 145-152.
- Bienboire-Frosini, M.C., 2016. Développement d'une méthode de purification non dénaturante non dénaturante de la protéine Fel d 1, en vue de l'identification de son possible ligand par GC-MS.
- Blancard, D., Vanhuffel, L., Chesneau, T. and Armand, J., 2012. Inventaire des maladies et des bioagresseurs des cultures légumières de Mayotte. Rapport de mission, INRA, France.
- Bustin, S.A., 2005. Real-time PCR. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*, 10(1): 117-1.
- Chapuis, F., Pichon, V. and Hennion, M.-C., 2005. Méthode de préconcentration par extraction en phase solide: principe et application aux industries environnementales et pétrolières. *Oil & gas science and technology*, 60(6): 899-912.
- Chevassus-au-Louis, B. and Lazard, J., 2009. Situation et perspectives de la pisciculture dans le monde: consommation et production. *Cahiers Agricultures*, 18(2-3): 82-90 (1).
- Clouthier, S.C., McClure, C., Schroeder, T., Desai, M., Hawley, L., Khatkar, S., Lindsay, M., Lowe, G., Richard, J. and Anderson, E.D., 2017. Diagnostic validation of three test methods for detection of cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *Dis Aquat Organ*, 123(2): 101-122.
- Coutrot, E., Blancher-Sardou, M., Marchou, B., Apoil, P., De Lahitte, J.D. and Blancher, A., 2007. Place du diagnostic biologique de l'herpès vireux B (cehv1) chez le macaque dans la gestion du risque de transmission à l'homme. *Revue Méd. Vét*, 158(7): 367-379.
- Davison, A.J., 2010. Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology*, 143(1): 52-69.

- de Jesús Durán-Avelar, M., Pérez-Enríquez, R., Zambrano-Zaragoza, J.F., Montoya-Rodríguez, L., Vázquez-Juárez, R. and Vibanco-Pérez, N., 2015. Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010-2012. *Diseases of aquatic organisms*, 114(1): 11-20.
- de Kinkelin-Pelletan, P. and Michel, C., 2014. Historique de la pathologie et des développements sanitaires dans la pisciculture française. *Cahiers Agricultures*, 23(1): 47-52.
- Desquesnes, M. and Tresse, L., 1996. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 49(4): 322-327.
- Dong, C., Li, X., Weng, S., Xie, S. and He, J., 2013. Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mainland China. *Vet Microbiol*, 162(1): 239-44.
- El-Matbouli, M. and Soliman, H., 2011a. Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naive common carp by cohabitation. *Research in Veterinary Science*, 90(3): 536-539.
- El-Matbouli, M. and Soliman, H., 2011b. Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naive common carp by cohabitation. *Res Vet Sci*, 90(3): 536-9.
- Fabian, M., Baumer, A., Adamek, M. and Steinhagen, D., 2016. Transmission of Cyprinid herpesvirus 3 by wild fish species--results from infection experiments. *J Fish Dis*, 39(5): 625-8.
- FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2012.
- FAO, 2016. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous, 224 pp.
- FAO, 2018. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018, Atteindre les objectifs de développement durable., 237 pp.
- Flint, J., Racaniello, V., Rall, G. and Skalka, A., 2004. Structure, genome organization, and infectious cycles. *Principles of virology*, 2nd edition ASM Press, Washington DC, USA: 811-812.
- Fournier, G., 2008. Clonage du génome l'herpesvirus cyprin-3 en tant que chromosome artificiel bactérien, Université de Liège, Liège, Belgium.
- Fournier, G., 2013. Etude des portes d'entrée de l'Herpèsvirus cyprin 3 chez *Cyprinus carpio*/Study of the portals of entry of Cyprinid herpesvirus 3 in *Cyprinus carpio*.
- Fraga, D., Meulia, T. and Fenster, S., 2008. Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*(1): 10.3. 1-10.3. 34.
- Garver, K.A., Al-Hussiney, L., Hawley, L.M., Schroeder, T., Edes, S., LePage, V., Contador, E., Russell, S., Lord, S. and Stevenson, R.M., 2010a. Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4): 1242-1251.
- Garver, K.A., Al-Hussiney, L., Hawley, L.M., Schroeder, T., Edes, S., LePage, V., Contador, E., Russell, S., Lord, S., Stevenson, R.M., Souter, B., Wright, E. and Lumsden, J.S., 2010b. Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *J Wildl Dis*, 46(4): 1242-51.
- Gessain, A., 2005. Herpèsvirus humain 8. Aspects virologiques, cliniques et épidémiologiques. *EMC-Maladies infectieuses*, 2(4): 163-177.
- Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F.J., Leutenegger, C.M., Bercovier, H. and Hedrick, R.P., 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aquat Organ*, 60(3): 179-87.
- Gotesman, M., Kattlun, J., Bergmann, S.M. and El-Matbouli, M., 2013. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. *Dis Aquat Organ*, 105(2): 163-74.
- Grimmett, S.G., Warg, J.V., Getchell, R.G., Johnson, D.J. and Bowser, P.R., 2006. An unusual koi herpesvirus associated with a mortality event of common carp *Cyprinus carpio* in New York State, USA. *Journal of wildlife diseases*, 42(3): 658-662.
- Haenen, O., Way, K., Bergmann, S. and Ariel, E., 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24(6): 293-307.

- Hajlaoui, W., Mili, S., Troudi, D. and Missaoui, H., 2016. Étude de la biologie de reproduction chez la carpe commune *Cyprinus carpio communis* pêchée dans la retenue du barrage de Sidi Saâd (Centre de la Tunisie). *Bull. Soc. zool. Fr*, 141(1): 25-39.
- Hedrick, R., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J., Marty, G., Nordhausen, R., Kebus, M., Bercovier, H. and Eldar, A., 2000a. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(1): 44-57.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M.J., Bercovier, H. and Eldar, A., 2000b. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *J Aquat Anim Health*, 12(1): 44-57.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S.C., McDowell, T.S., Waltzek, T.B., Kelley, G.O. and Adkison, M.A., 2005. Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, 2(1): V7.
- Hollebecq, M. and Haffray, P., 1994. Revue bibliographique. L'amélioration génétique de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): état des connaissances. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*(333): 93-124.
- Honjo, M.N., Minamoto, T., Matsui, K., Uchii, K., Yamanaka, H., Suzuki, A.A., Kohmatsu, Y., Iida, T. and Kawabata, Z., 2010. Quantification of cyprinid herpesvirus 3 in environmental water by using an external standard virus. *Appl Environ Microbiol*, 76(1): 161-8.
- Idalia, H.H.R., 2008. Etapes précoces de l'infection du WSSV chez la crevette, Université de Montpellier II.
- Kamimura, S., Hagi, T., Kurata, S., Takatsu, K., Sogo, H., Hoshino, T. and Nakamura, K., 2007. Evaluation of quenching probe (QProbe)-PCR assay for quantification of the koi herpes virus (KHV). *Microbes and Environments*, 22(3): 223-231.
- Kasai, H., Muto, Y. and Yoshimizu, M., 2005. Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathology*, 40(3): 137-138.
- Keith, P., Marquet, G., Valade, P., Bosc, P. and Vigneux, E., 2006. Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce des Comores, Mascareignes et Seychelles, 250 pp.
- Keith, P., Persat, H., Feuteun, E. and Allardi, J., 2011. Les poissons d'eau douce de France, 552 pp.
- Kiener, A. and Therezien, Y., 1958. Développement et orientation de la pisciculture à Madagascar. *Bulletin Français de Pisciculture*(191): 74-85.
- Lazard, J. and Levêque, C., 2009. Introductions et transferts d'espèces de poissons d'eau douce. *Cahiers Agricultures*, 18(2-3): 157-163.
- Lemasson, J., 1957. Chronique piscicole: réflexions sur la pêche et la pisciculture à Madagascar. *Bois & Forêts des tropiques*, 52(52): 57-61.
- Lévêque, C., 1997. Introductions de nouvelles espèces de poissons dans les eaux douces tropicales: objectifs et conséquences. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*(344-345): 79-91.
- Markine-Goriaynoff, N., Minner, F., De Fays, K., Gillet, L., Thiry, E., Pastoret, P.-P. and Vanderplasschen, A., 2003. L'herpèsvirus bovin 4. *Ann Méd Vét*, 147: 173-205.
- Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., Donnio, P., Février, F., Le Coustumier, A. and Bifani, P., 2007. La PCR en temps réel: principe et application en infectiologie. *Antibiotiques*, 9(3): 205-211.
- Matras, M., Antychowicz, J., Castric, J. and Bergmann, S.M., 2012. CyHV-3 infection dynamics in common carp (*Cyprinus carpio*)—evaluation of diagnostic methods. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56(2): 127-132.
- Matsui, K., Honjo, M., Kohmatsu, Y., Uchii, K., Yonekura, R. and Kawabata, Z.i., 2008. Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshwater Biology*, 53(6): 1262-1272.
- Ministère de l'agriculture, d.l.e.e.d.l.p., 2007. Recensement de l'agriculture (ra) Campagne agricole 2004-2005, Tome I.
- Moreau, J., 1972. Perspectives offertes par la rizipisciculture à Madagascar. *Terre malgache*, Tany Malagasy, 14.
- Moreau, J., 1980a. Le lac Alaotra a Madagascar: Cinquante ans d'aménagement des pêches.

- Moreau, J., 1980b. Le lac Alaotra à Madagascar: cinquante ans d'aménagement des pêches.
- Moreau, J., Arrignon, J. and Jubb, R., 1988. Les introductions d'espèces étrangères dans les eaux continentales africaines: intérêt et limites= Introduction of foreign fishes in african inland waters: suitability and problems.
- Nicolas-Simonnot, M.-O., 1991. Contribution à l'étude de la chromatographie frontale des protéines par échange d'anions: application à l'albumine du serum bovin, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Niepceron, A., Audinet-Pouvreau, B., Garrido, S. and Licois, D., 2009. Développement d'un outil de diagnostic sensible (PCR) pour détecter spécifiquement *Eimeria intestinalis*.
- Oswald, M., Ravakarivelo, M., Mikolasek, O., Rasamoelina, H., De Verdal, H., Bentz, B., Pepey, E., Cousseau, F. and Vandeputte, M., 2016. Croiser une approche compréhensive des systèmes d'élevage piscicole et leur diagnostic génétique-de l'ambition aux résultats.
- Ouyang, P., Yang, R., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., Lai, W., Huang, X., Chen, D., Fang, J., Chen, Z., Tang, L. and Yin, L., 2018. First detection of carp edema virus in association with cyprinid herpesvirus 3 in cultured ornamental koi, *Cyprinus carpio* L., in China. *Aquaculture*.
- Plancoulaine, S. and Gessain, A., 2005. Aspects épidémiologiques de l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8) et du sarcome de Kaposi. *Médecine et maladies infectieuses*, 35(5): 314-321.
- Poitras, E. and Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*, 2(2): 2-11.
- Pottier, A., 2008. Influence des modifications des facteurs environnementaux, socio-économiques & culturels sur l'épidémiologie des maladies vectorielles.
- Probiotiques, D., 1981. Les pathogènes des crevettes péneïdes: Exemple des élevages larvaires à Madagascar, intérêt thérapeutique, Université d'Antananarivo.
- Prudhomme, M., 1957. Inspection sanitaire des poissons, mollusques et crustacés comestibles d'eau douce et de la mer. Paris: Vigot frères.
- Prudhomme, M. and Pantaleon, J., 1959. Sur un cas de myxosporidiose du saumon. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*.
- Rakotoambinima, S., Desprez, D., David, G., Bosc, P. and Le Roux, Y., 2009. Caractérisation des environnements écologiques et socio-économiques de la production piscicole continentale à Madagascar. *Les Cahiers d'Outre-Mer. Revue de géographie de Bordeaux*, 62(248): 471-488.
- Randrianarivelo, R., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar# *Cinnamosma fragrans*#, alternative aux antibiotiques en crevetticulture, Université d'Antananarivo.
- Raoudha, A., Amel, S., Hassen, G. and Azeiz, O.B., 2012. Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (polymorphism chain reaction) pour l'application des marqueurs RAPD (random amplified polymorphism DNA) chez *Stipa lagascae*. *Acta Botanica Gallica*, 159(1): 73-78.
- Ravakarivelo, M., 2014. Étude de la variabilité génétique des populations de carpe et de tilapia à Madagascar: liens avec la gestion et le flux des gènes.
- Ravakarivelo, M.O.F., Raeliarijaona G.M., Tchuidjang Meheloune J., Rakotomanana O.D., Raliniaina M., Rasamoelina Andriamanivo H., 2016. Herpesvirose de la carpe Koï (KHV) situation, risque et enjeux pour Madagascar.
- Rhouma, A., 1975. L'élevage de la carpe en Tunisie. Quelques aspects de sa biologie. *Bulletin Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche Salambô*, 4: 97-113.
- Roule, L., 1932. La biologie de la carpe et la base scientifique de l'élevage de la carpe. *Bulletin Français de Pisciculture*(54): 177-180.
- Sano, M., Ito, T., Kurita, J., Yanai, T., Watanabe, N., Miwa, S. and Iida, T., 2004. First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathology*, 39(3): 165-167.
- Saulnier, D., Reynaud, Y., Arzul, I., Miossec, L., Le Roux, F. and Goarant, C., 2007. Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole: quelques scénarios illustrés d'exemples. *INRA Productions Animales*, 20(3): 207-212.

- Soliman, H. and El-Matbouli, M., 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology*, 2: 83.
- St-Hilaire, S., Beevers, N., Way, K., Le Deuff, R., Martin, P. and Joiner, C., 2005. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Diseases of aquatic organisms*, 67(1-2): 15-23.
- Sunarto, A., Rukyani, A. and Itami, T., 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of Fisheries Research Agency*, 2: 15-22.
- Tchuidjang, M., J., 2016. Etude exploratoire des parasites chez la carpe et le tilapia à Madagascar. 108.
- Therezien, Y., 1960. L'introduction de poissons d'eau douce à Madagascar, leur influence sur la modification du biotope. *Bulletin Français de Pisciculture*(199): 45-61.
- Thiéry, R., Pozet, F. and de Kinkelin, P., 2003. Deux maladies virales émergentes chez les poissons: la nodaviriose des espèces marines et l'herpesviriose de la carpe koi, *Cyprinus carpio*. *Epidémiol. Santé Anim*, 44: 83-94.
- Tse, C. and Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel, *Annales de Biologie Clinique*, pp. 279-293.
- Van Den Betg, F. and Janssen, J., 1994. Manuel pour le développement de la pisciculture à Madagascar, volume 2: Marketing et gestion financière d'une microentreprise de production d'alevins en milieu rural. Ministère d'Etat à l'Agriculture et au Développement rural, Direction des Ressources Halieutiques. Mars.
- Vandeputte, M., 2009. L'amélioration génétique de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *Cahiers Agricultures*, 18(2-3): 256-261 (1).
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Alfaro, M.E., Kurobe, T., Davison, A.J. and Hedrick, R.P., 2009. Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Diseases of aquatic organisms*, 84(3): 179-194.
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Stone, D.M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A.J. and Hedrick, R.P., 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *Journal of General Virology*, 86(6): 1659-1667.
- 清水智子, 吉田夏子, 笠井久会 and 吉水守, 2006. Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *魚病研究*, 41(4): 153-157.

ANNEXES

ANNEXE II : Questionnaire d'enquête utilisé pour la collecte des données

Questionnaire d'enquête

- Identifiant carpe: Date :.....
- Région:
- District:
- Commune:.....
- Fokontany:.....
- Nom de l'exploitant.....
- Site : Elevage Milieu naturel
- Type de carpe : Miroir Ecaillée Cuir Koï
- Nombre prélevé sur le site : Sexe de la carpe : Mâle Femelle
- Poids de la carpe : g photo
- Stade de développement de la carpe : Pré géniteur géniteur
Grossisseur croissance
(.....)
- GPS : Longitude : Latitude : Altitude :
- Type d'aménagement élevage: Rizière Cage
Etang nappe Etang dérivation
- Superficie de la structure d'accueil:
- Nombre empoissonné :.....
- Informations sur la santé et l'état du poisson

.....

.....

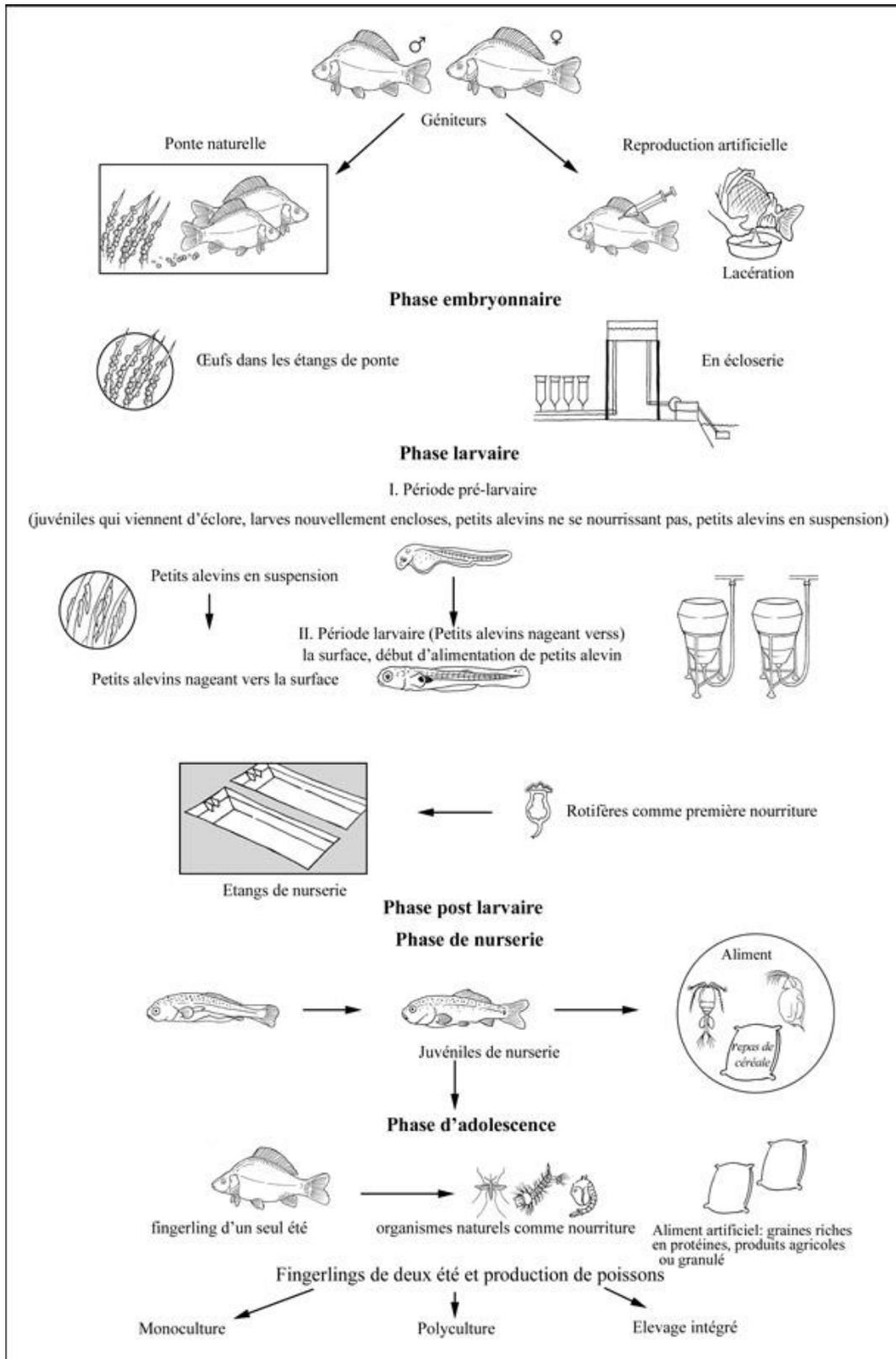
.....

.....

.....

.....

ANNEXE 3 : Biologie de la reproduction chez la carpe



(Source : FAO)

ANNEXE 4 : Carpe et production aquacole mondiale entre 2010 et 2016

Catégories	2010	2012	2014	2016	% du total (2016)
Poissons					
Carpe herbivore (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	4 362	5 018	5 539	6 068	11
Carpe argentée (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	4 100	4 193	4 968	5 301	10
Carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i>)	3 421	3 753	4 161	4 557	8
Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	2 537	3 260	3 677	4 200	8
Carpe à grosse tête (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	2 587	2 901	3 255	3 527	7
<i>Carassius</i> spp.	2 216	2 451	2 769	3 006	6
Catla (<i>Catla catla</i>)	2 977	2 761	2 770	2 961	6
Poissons d'eau douce nca (<i>Osteichthyes</i>)	1 378	1 942	2 063	2 362	4
Saumon de l'Atlantique (<i>Salmo salar</i>)	1 437	2 074	2 348	2 248	4
Labéo Roho (<i>Labeo rohita</i>)	1 133	1 566	1 670	1 843	3
<i>Pangasius</i> spp.	1 307	1 575	1 616	1 741	3
Chano (<i>Chanos chanos</i>)	809	943	1 041	1 188	2
Tilapias nca (<i>Oreochromis</i> [= <i>Tilapia</i>] spp.)	628	876	1 163	1 177	2
<i>Clarias</i> spp.	353	554	809	979	2
Poissons marins nca (<i>Osteichthyes</i>)	477	585	684	844	2
Carpe de Wuchang (<i>Megalobrama amblycephala</i>)	652	706	783	826	2
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	752	883	796	814	2
Cyprinidés nca (<i>Cyprinidae</i>)	719	620	724	670	1
Carpe noire (<i>Mylopharyngodon piceus</i>)	424	495	557	632	1
Poisson tête de serpent (<i>Channa argus</i>)	377	481	511	518	1
Autres poissons	5 849	6 815	7 774	8 629	16
Total poissons	38 494	44 453	49 679	54 091	100

(FAO, 2016)

ANNEXE 5 : Principaux appareils utilisés en Biologie Moléculaire



Balance de précision (Sartorius ®)



Agitateur (Vortex-Génie 2®)



Thermocycleur (Mx 3000P Stratagène®)



Centrifugeuse (SIGMA®)



Glacière de terrain



Agitateur magnétique chauffant (Nuaova II ®)



Hotte PCR Filtre HEPA (captair ®Bio)



Thermoshaker (confort ®)



Ice pack

ABSTRAT

Nom : TCHUIDJANG MEHELOUNE
Prénom : Jobert
Spécialité : Biochimie Fondamentale et Appliquée aux Sciences Médicales
Title : Revaluation of Madagascar infection's status by the cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3)

The cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) or Koi herpesvirus (KHV) is the virus responsible of the carp's herpesvirose.

From the world wild segmentation, this pathology drives to a high level of morbidity and mortality in breeding, which has an impact on the production and revenues.

As many other countries in the world, Madagascar recourses to various importations of surface water fishes with the aim of increasing its national fish production. Unfortunately, those importations are not always supervised by the ministry in charge of fisheries and fish farming.

A study (which we partook in 2014) on KHV and the carp genetic variability showed that in Madagascar they didn't exist virus of herpesvirose for carp and in another hand, they existed a high carp dynamics fluxes between the various fishing regions in Madagascar and aboard.

Observing the viral expansion, the growth of fluxes, and the viral latency, we have taught it's important to reevaluate the status of Madagascar regarding KHV.

This study is conducted in the region of Analamanga, based on 32 carps from 17 fish framings in 5 districts. Different methods and technics were used in laboratory for the extraction of DNA and for the qPCR just to mention the least. We also have had recourse to various software as XLSTAT for data analysis and QGIS for the graphical concept of our various sampling sites just to mention the least.

As results of our study, after the qPCR, it has been noticed that Madagascar is still unharmed with the cyprinid herpesvirus 3, furthermore we have recommended the implementation of an epidemiological monitoring network with monitoring units and an adequate supervision of different importations of the surface water fish in general and of the carp in particular.

Keys words : Carpiculture, herpesvirus, phenotype, latency, qPCR

Encadreurs : Professeur ANDRIANTSIMAHAVANDY A. Abel
Docteur MAMINIAINA Olivier Fridolin

Laboratoire : Virology and Molecular biology
FOFIFA-Département de Recherche Zootechniques, vétérinaires et piscicole (DRZVP)
Rue Farafaty-Ampandrianomby BP 04-Antananarivo

RESUME

Nom : TCHUIDJANG MEHELOUNE
Prénom : Jobert
Spécialité : Biochimie Fondamentale et Appliquée aux Sciences Médicales
Titre : Réévaluation du statut de Madagascar à l'infection par l'herpèsvirus cyprin de type 3 (CyHV-3)

L'herpèsvirus cyprin de type 3 (CyHV-3) ou Koi herpèsvirus (KHV) est le virus responsable de l'herpèsvirose chez la carpe. De répartition mondiale aujourd'hui, cette pathologie entraîne dans les élevages de forts taux de morbidité et de mortalité impactant la production et les revenus.

Madagascar, comme plusieurs pays dans le monde a recours à diverses importations de poisson d'eau douce dans l'optique d'augmenter sa production piscicole national. Malheureusement, ces importations ne sont pas toujours bien encadrées par le ministère en charge de la pêche et de l'aquaculture.

Des études auxquelles nous avons pris part en 2014, portant notamment sur le KHV et la variabilité génétique chez la carpe ont montré l'absence à Madagascar du virus de herpèsvirose chez la carpe malgré une énorme dynamique des flux de carpes entre les différentes régions piscicole de Madagascar et l'extérieur.

Devant l'expansion virale, le flux croissant, et la latence virale il nous a apparu important de réévaluer le statut de Madagascar face en matière d'infection par le KHV.

La présente étude est faite dans la région d'Analamanga, et elle porte sur 32 carpes provenant de 17 élevages piscicoles répartis dans 5 districts. Au laboratoire diverses techniques et méthodes sont utilisées notamment la qPCR sur des extraits d'organes des carpes. De plus, plusieurs logiciels sont employés tel que le logiciel XLStat pour l'analyse des données ou encore le logiciel QGIS pour la conception graphique des différents sites de prélèvement.

D'après les résultats obtenus par la qPCR, Madagascar reste encore indemne de l'herpèsvirus cyprin de type 3. Par ailleurs nous avons recommandé la mise en place d'un réseau de surveillance épidémiologique avec des cellules de veilles et un meilleur encadrement des différentes importations des poissons d'eau douce en général et de la carpe en particulier.

Mots clés : Carpiculture, herpèsvirose, herpèsvirus, phénotype, latence, qPCR

Encadreurs : Professeur ANDRIANTSIMAHAVANDY A. Abel
Docteur MAMINIAINA Olivier Fridolin

Laboratoire : Virology and Molecular biology
FOFIFA- Département de Recherche Zootechniques, vétérinaires et piscicole (DRZVP)
Rue Farafaty-Ampandrianomby BP 04-Antananarivo