

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

ANNEE 2002

**ETUDE DE LA CRYPTOARYOSE
(CRYPTOCARYON IRRITANS)
CHEZ LES POISSONS MARINS**

**ESSAIS DE VACCINATION HÉTÉROLOGUE
AVEC *TETRAHYMENA PYRIFORMIS***

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement
le 10 juillet 2002
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Emmanuel MEUNIER

Né le 21 novembre 1976 à Echirolles (38)

JURY

Président : Monsieur Michel MARJOLET
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : Monsieur Guillaume BLANC
Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes

Assesseur : Madame Monique L'HOSTIS
Professeur de parasitologie à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes

Membre invité : Monsieur Laurent SOULIER
Directeur scientifique du musée de la mer de Biarritz

CORPS ENSEIGNANT DE L'E.N.V.N.

Directrice : Maryse HURTREL (Pr)

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE		
NUTRITION-ALIMENTATION	Patrick NGUYEN (Pr) Denis FROMAGOT (Pr)	Henri DUMON (Pr) Lucille MARTIN (MC)
PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE	Marc GOGNY (Pr) Louis PINAULT (Pr) Martine KAMMERER (Pr)	Jean-Dominique Puyt (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (MC) Hervé POULIQUEN (MC)
PHYSIOLOGIE	Pierre SAI (Pr) Jean-Marie BACH (MC)	Lionel MARTIGNAT (MC)
BIOCHIMIE	Brigitte SILIART (Pr) François ANDRE (Pr)	Bruno LE BIZEC (MC)
DEPARTEMENT DE MORPHOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE		
ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES	Patrick COSTIOU (Pr) Eric BETTI (MC)	Claire DOUAT (MC) Claude GUINTARD (MC)
ETHNOZOOTECHE	Bernard DENIS (Pr)	
PATHOLOGIE CHIRURGICALE	Eric AGUADO (MC) Jean-Claude LE NIHOUANNEN (Pr) Béatrice LIJOUR (MC)	Eric GOYENVALLE (MC) Olivier GAUTHIER (MC)
IMAGERIE MEDICALE	Laurent MARESCAUX (MC)	
DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE GENERALE, INFECTIEUSE ET PARASITAIRE		
AQUACULTURE – PATHOLOGIE AQUACOLE	Hervé LE BRIS (Pr)	Guillaume BLANC (MC)
ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Monique WYERS (Pr) Yan CHEREL (Pr)	Frédéric NGUYEN (MCC) Jérôme ABADIE (AERC)
PATHOLOGIE INFECTIEUSE	Jean-Pierre GANIERE (Pr) Geneviève ANDRE-FONTAINE (Pr)	Nathalie RUVOEN-CLOUET (MC)
PARASITOLOGIE	Monique L'HOSTIS (Pr) Patrick BOURDEAU (Pr) Alain MARCHAND (Pr)	Albert AGOULON (MC) Alain CHAUVIN (MC) Catherine IBISCH (AERC)
PATHOLOGIE GENERALE – MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE	Jean-Marc PERSON (Pr) Jean-Louis PELLERIN (Pr)	Emmanuel MOREAU (MC) Hervé SEBBAG (MC)
STATISTIQUES	Chantal THORIN (Pr)	
DEPARTEMENT DE SANTE DES ELEVAGES ET QUALITE DES PRODUITS		
HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Catherine MAGRAS-RESCH (MC) Jean-Michel CAPPELIER (MC) Eric DROMIGNY (MC)	Michel FEDERIGHI (MC) Marie-France PILET (MC)
ZOOTECHE - ECONOMIE	Henri SEEGERS (Pr) Xavier MALHER (Pr) Nathalie BAREILLE (MC)	François BEAUDEAU (MC) Christine FOURICHON (MC)
DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE SPECIALE ET SCIENCES CLINIQUES		
PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR	Arlette LAVAL (Pr) Michel GUIDONI (PrC) Catherine BELLOC (MC)	Isabelle BREYTON (MC) Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (AERC)
PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES	Yves LEGEAY (Pr) Dominique FANEL (Pr)	Jack-Yves DESCHAMPS (MC) Odile SENECAT (MC)
PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Daniel TAINURIER (Pr) Francis FIENI (Pr)	Jean-François BRUYAS (Pr) Isabelle BATTUT (MC)
LANGUES VIVANTES		
ANGLAIS	Marc BRIDOU (PI)	Joe Mc GUIRE (Lecteur)

Pr : Professeur, PrC : Professeur Contractuel, MC : Maître de Conférences, MCC : Maître de Conférences Contractuel, AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche, PI : Professeur Lycée Enseignement Agricole

(mise à jour le : 1^{er} novembre 2000)

A Monsieur Michel Marjolet,
Professeur de parasitologie à la Faculté de Médecine de Nantes

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur Guillaume Blanc,
Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes

Qui nous a soutenu dans notre travail,

Sincères remerciements.

A Monsieur Laurent Soulier,
Docteur vétérinaire et Directeur scientifique du musée de la mer de Biarritz

Qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein de son établissement,

Sincères remerciements.

A Monsieur Bernard Viguès,
Professeur à l'Université de Clermont-Ferrand, Laboratoire de Biologie des Protistes

Qui nous a fait l'honneur de nous procurer sa souche de protozoaires,

Hommages respectueux.

Au Club Aquariophile de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Et en particulier à Emmanuel Leguay pour son aide précieuse lors des essais de vaccination.

Sincères salutations.

A mes parents,

Qui m'ont toujours fait confiance et encouragé au cours de mes études.

A mes frères,

A mes amis proches,

Tapan, Xav', Thevenal, Pierre, Frédo, Pitoche, Bolly, Iñaki, Guillaume, Thomas & Maylis.

Qui ont participé indirectement à la réalisation de ma thèse vétérinaire.

Merci.

A mon Lilou.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	10
ÉTUDE DE LA CRYPTOCARYOSE.....	14
I. INTRODUCTION	14
II. HISTORIQUE	14
III. ETIOLOGIE	15
A. Présentation du phylum des Ciliophora.....	15
B. L'agent pathogène : <i>Cryptocaryon irritans</i>	20
1) Systématique.....	20
2) Morphologie	21
3) Variation intraspécifique.....	22
IV. EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE.....	22
A. Répartition géographique	23
B. Espèces affectées	23
C. Effet de la température	24
D. Cycle biologique.....	25
1) Trophontes	25
2) Tomontes	27
3) Tomites	28
4) Thérontes	29
V. SYMPTOMES ET LÉSIONS.....	33
A. Symptômes	33
B. Lésions.....	34
VI. DIAGNOSTIC	34
A. Epidémioclinique.....	34
B. Anatomicopathologique.....	35
1) Frottis cutanés et branchiaux.....	35
2) Histopathologie.....	35
C. Différentiel	36
1) Sursaturation gazeuse.....	36
2) Lymphocystis.....	36
3) Flagellés.....	37
(a) <i>Amyloodinium ocellatum</i>	37
(b) <i>Crepidoodinium cyprinodontum</i>	38
4) Ciliés.....	39
(a) <i>Brooklynella hostilis</i>	39
(b) <i>Uronema marinum</i>	40
(c) <i>Trichodina spp.</i> , <i>Tripartiella spp.</i> , <i>Trichodinella spp.</i>	41
5) Mycoses	42
(a) <i>Ichthyophonous spp.</i>	42
(b) <i>Exophiala spp.</i>	42
VII. METHODES DE LUTTE	43
A. Thérapeutique	43
1) Méthodes biologiques	43
(a) Récolte des thérontes	43
(b) Piégeage des tomontes.....	44
(c) Méthode par transfert.....	44

2) Méthodes physiques.....	44
(a) Modification de la température	44
(b) Modification de la salinité	44
(i) Hyposalinité.....	45
(ii) Hypersalinité	45
(c) Irradiation par les ultraviolets	45
3) Méthodes chimiques	46
(a) Quinine	46
(b) Vert de malachite (oxalate).....	48
(c) Autres principes actifs.....	49
B. Prophylaxie.....	51
1) Sanitaire.....	51
2) Médicale : la vaccination	51
ESSAIS DE VACCINATION HETEROLOGUE.....	54
I. INTRODUCTION	54
II. MATERIEL ET METHODES.....	55
A. <i>Poecilia sphenops</i>	55
1) Présentation.....	55
2) Adaptation à l'eau de mer	56
B. <i>Tetrahymena pyriformis souche GL</i>	56
1) Présentation.....	56
2) Culture axénique in vitro.....	57
3) Rinçage	59
4) Déciliation.....	60
5) Présentation des vaccins.....	61
C. <i>Cryptocaryon irritans</i>	62
1) Culture in vivo	62
2) Récolte des parasites	62
D. <i>Protocole d'immunisation des poissons</i>	63
E. <i>Epreuve de challenge</i>	64
F. <i>Analyses statistiques</i>	64
III. RESULTATS	64
IV. DISCUSSION	66
CONCLUSION	71
BIBLIOGRAPHIE.....	73
ANNEXE I : STATISTIQUES - KAPLAN MEYER	83
ANNEXE II : STATISTIQUES – PRODUITS LIMITES	85
ANNEXE III : STATISTIQUES – TEMPS MEDIAN DE SURVIE.....	87
ANNEXE IV : STATISTIQUES - COURBES DE SURVIE.....	89
ANNEXE V : PROGRAMMES GRANT (ETATS-UNIS).....	90
I. PROGRAMME GRANT N°93-04027.....	90
II. PROGRAMME GRANT N°95-02023	90
III. PROGRAMME GRANT N°97-02646 ET N°00-02212.....	91

TABLE DES ILLUSTRATIONS

I. LISTE DES CROQUIS

N°	Page	Légende
1	17	Morphologie générale d'un protozoaire (<i>Blepharisma</i>).
2	18	Coupe tridimensionnelle de l'infrastructure ciliaire des Ciliophora.
3	19	Morphologie interne d'un protozoaire (<i>Paramecium</i>).
4	31	Synthèse du cycle biologique de <i>Cryptocaryon irritans</i> .
5	38	<i>Amyloodinium ocellatum</i> .
6	38	<i>Crepidoodinium cyprinodontum</i> .
7	47	Structure chimique de la quinine.
8	49	Structure chimique du vert de malachite.
9	68	Mécanisme d'immobilisation des thérontes au niveau cutané.

II. LISTE DES GRAPHIQUES

N°	Page	Légende
1	29	Corrélation entre le nombre de thérontes de <i>Cryptocaryon irritans</i> produits et le diamètre du tomonte initial, chez différentes espèces, à 20 et 25°C.
2	29	Survie et infectiosité des thérontes de <i>Cryptocaryon irritans</i> à partir de la libération des tomites.
3	31	Répartition de l'émergence des thérontes de <i>Cryptocaryon irritans</i> au cours de la journée.
4	64	Résultats de survie suite aux expériences de vaccination hétérologue avec <i>Tetrahymena pyriformis</i> .

III. LISTE DES PHOTOGRAPHIES

N°	Page	Légende
1	21	Trophonte de <i>Cryptocaryon irritans</i> issu d'un raclage cutané de griset (<i>Spondyliosoma cantharus</i>).
2	21	Trophonte de <i>Cryptocaryon irritans</i> en microscopie photonique.
3	26	Cavité orale d'un trophonte de <i>Cryptocaryon irritans</i> en microscopie électronique.
4	30	Théronite de <i>Cryptocaryon irritans</i> en microscopie électronique.
5	33	Black molly avec des signes cliniques externes de cryptocaryose.
6	35	Coupe histologique de branchies passant par un trophonte de <i>Cryptocaryon irritans</i> .
7	36	Cellules géantes dues à <i>Lymphocystis</i> observées sur la nageoire caudale de <i>Scatophagus argus</i> , observée à l'œil nu.
8	36	Cellules géantes dues à <i>Lymphocystis</i> observées en microscopie photonique.
9	39	Morphologie de <i>Brooklynella hostilis</i> .
10	40	Morphologie d' <i>Uronema marinum</i> en microscopie photonique.
11	41	Morphologie de <i>Trichodina</i> en microscopie photonique.
12	55	La forme sauvage et la forme d'élevage de <i>Poecilia sphenops</i> .
13	57	Différents clichés de <i>Tetrahymena pyriformis</i> en microscopie photonique.
14	61	Comparaison des vaccins à base de <i>Tetrahymena pyriformis</i> vivants et inactivés au formaldéhyde, en microscopie photonique.

IV. LISTE DES TABLEAUX

N°	Page	Légende
I	16	Parallèle entre les ciliés parasites des poissons d'eau douce et des poissons de mer et ayant un mode de vie et un pouvoir pathogène quasiment identiques.
II	23	Poissons marins identifiés comme étant résistants à <i>Cryptocaryon irritans</i> .
III	25	Correspondance entre plusieurs terminologies de <i>Cryptocaryon irritans</i> .
IV	28	Taux d'enkystement des trophontes de <i>Cryptocaryon irritans</i> (souche d'eau chaude) en fonction de la température
V	28	Taux d'excystement des tomites de <i>Cryptocaryon irritans</i> en fonction de l'hôte d'origine et de la température d'incubation.
VI	32	Mesures morphométriques et biologiques de <i>Cryptocaryon irritans</i> chez différentes espèces, d'après différents auteurs.
VII	45	Effet de l'hypersalinité chez <i>Lutjanus campechanus</i> atteints de cryptocaryose.
VIII	50	Présentation des différents traitements chimiques contre la cryptocaryose.
IX	59	Exemples de plusieurs milieux de culture convenant à <i>Tetrahymena pyriformis</i> .
X	63	Présentation des différents lots de back mollies en fonction du type et de la charge vaccinale.
XI	65	Taux de survie des black mollies suite aux expériences de vaccination hétérologue.
XII	66	Comparaison de trois méthodes de vaccination chez les poissons.

INTRODUCTION GENERALE

Le développement de l'aquaculture marine ne cesse de s'accroître depuis une dizaine d'années pour faire face à la raréfaction des pêcheries naturelles, et pour démocratiser cette source alimentaire. Son tonnage a plus que doublé depuis 1990 pour représenter 11,14 millions de tonnes en 1997 (source : FAO). Mais ces nouvelles productions intensives s'accompagnent souvent de l'apparition et de la propagation de maladies. Ces pathologies peuvent remettre en cause la pérennité d'une telle production intensive.

L'apparition d'une maladie d'élevage ne dépend pas uniquement du contact entre le poisson et le bio-agresseur mais résulte d'interactions complexes entre l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement (Snieszko, 1974). En aquaculture d'eau de mer ou d'eau douce, les maladies infectieuses tiennent une place prépondérante et sont à l'origine de lourdes pertes économiques. Le contrôle du processus pathologique nécessite trois types d'interventions :

1. Le contrôle de la qualité de l'environnement par l'épuration de l'eau, l'oxygénation, la thermorégulation, le suivi des paramètres chimiques ;
2. La réduction de la « pression pathogène » par la désinfection des bassins entre deux lots, du matériel et de l'utilisation de médicaments (antibactériens, antiparasitaires, antifongiques ...) ;
3. L'amélioration de la réaction de l'hôte vis-à-vis du pathogène :
 - Par réduction du stress ;
 - Par la stimulation de la réponse immunitaire spécifique ;
 - En agissant sur les mécanismes non spécifiques de la réponse immunitaire par l'utilisation d'immunostimulants.

Ce contrôle des paramètres environnementaux a fait ses preuves en aquaculture d'eau douce mais est plus difficilement envisageable en milieu marin ouvert. En aquaculture marine, on est malheureusement souvent face à une pathologie déjà installée et dont on doit définir un plan de traitement et de prévention. Mais la trilogie, coût des traitements, souvent répétés, diminution des performances zootechniques consécutives à ces traitements et pertes d'effectifs, grèvent lourdement le budget des établissements piscicoles (Vigneulle, 1991). De plus, la concentration de ces produits dans les tissus des poissons présente un risque pour la santé publique (développement d'antibiorésistances ou de cancers) et perturbe l'écosystème dans lequel s'intègre l'établissement aquacole. L'aquaculture marine répond aujourd'hui à plus du quart de la demande de produits aquatiques destinés à la consommation humaine (source : FAO, 1998).

Dans ce contexte, la vaccination apparaît donc comme une priorité ; la prévention des risques infectieux étant toujours préférable au traitement de la maladie établie. De nombreux facteurs peuvent influencer la réponse immunitaire des poissons face à un antigène. Ces facteurs peuvent être inhérents à l'animal (âge, statut sanitaire...), être reliés au vaccin (dose d'antigène, nature de l'antigène...), ou à des facteurs environnementaux. Mais en pisciculture, il n'est pas toujours possible de réunir les conditions optimales afin d'obtenir un vaccin efficace (Ellis, 1988).

La vaccination des bactérioses a été employée avec succès depuis près de 20 ans dans la prévention des maladies causées par des germes comme *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. ou *Yersinia* sp. (Gudding *et al.*, 1999). Aujourd'hui, les bactéries candidates à la vaccination, sont les Gram positives dont l'émergence de nouvelles souches pathogènes est en accroissement depuis quelques années.

A ce jour, il n'existe pas de vaccin commercial contre les maladies parasitaires des poissons, bien que celles-ci soient un réel fléau. Cependant des parasitoses sont en passe d'être prévenues par vaccination. C'est le cas de *Cryptobia salmonicida* (Li & Woo, 1995), *Lepeophtheirus salmonis* (le poux du saumon), ou *Ichthyophthirius multifiliis* (Goven *et al.*, 1980).

Ichthyophthirius multifiliis Fouquet 1876 et *Cryptocaryon irritans* Brown 1951 sont les deux parasites ciliés les plus virulents et les plus fréquents chez les poissons. Ils sont responsables de la « maladie des points blancs » respectivement en eau douce et en eau de mer. La cryptocaryose est endémique au musée de la mer de Biarritz tout comme dans de nombreux aquariums publics de par le monde. Chaque année, en général au début et à la fin de l'été, *Cryptocaryon irritans* se réveille de son état quiescent et fait payer un lourd tribut aux nouveaux pensionnaires du musée de la mer.

Dans le cadre de mon stage de 1^{ère} année de 3^{ème} cycle vétérinaire en « Aquaculture, Pathologie Aquacole et Environnement », et après concertation avec le Directeur Scientifique du Musée de la mer de Biarritz, le Docteur Laurent Soulier, il a été décidé de faire le bilan des connaissances sur cette maladie et de mettre au point un plan de lutte adapté.

La première partie de l'étude est constituée par une synthèse bibliographique faisant un bilan des connaissances acquises sur la cryptocaryose. Présentée sous forme d'une monographie, cette synthèse permettra de mieux comprendre la biologie de *Cryptocaryon irritans*, de reconnaître les premiers signes de la maladie et de proposer les moyens de lutte et de prévention pour faire face aux épidémies.

La cryptocaryose est une maladie dont on sait depuis longtemps que l'immunité acquise naturellement après un épisode infectieux est forte et durable. Face au manque de données

scientifiques sur la faisabilité d'un vaccin en milieu marin, il a été décidé d'entreprendre des essais de vaccination contre la cryptocaryose.

Le choix de la source antigénique s'est rapidement porté sur *Tetrahymena pyriformis*, pour les raisons suivantes :

- Ce protozoaire partage une communauté antigénique avec d'autres Ciliophora ;
- Sa culture *in vitro* est assez simple ;
- Il n'y a aucun risque de contamination croisée, puisqu'il n'est qu'exceptionnellement pathogène et de surcroît en eau douce ;

La seconde partie présente donc les essais de vaccination proprement dits.

Ce projet une fois mené à bien, permettra au Musée de la mer de Biarritz ainsi qu'à d'autres aquariums publics et aquacultures, de mieux comprendre cette maladie et de pouvoir la prévenir ou la combattre avec des armes adaptées, efficaces et sans danger.

ÉTUDE DE LA CRYPTOARYOSE
(*CRYPTOCARYON IRRITANS*)

ÉTUDE DE LA CRYPTOCARYOSE

I. INTRODUCTION

La cryptocaryose ou maladie des points blancs est une maladie contagieuse, cosmopolite, causée par *Cryptocaryon irritans*, un protozoaire cilié holotriche, ectoparasite obligatoire, qui affecte spécifiquement les téléostéens marins. Elle est généralement endémique et des épisodes épidémiques peuvent apparaître chez des poissons jeunes ou affaiblis. Le régime alimentaire histophage du parasite est responsable de graves lésions tégumentaires et branchiales. Ceci a pour conséquences des retards de croissance en aquaculture (Boulanger, 1992) ou une impossibilité de présentation au public pour les aquariums. Dans les cas les plus graves, la mort des poissons survient suite à un déséquilibre osmorégulateur ou à des surinfections.

C'est une pathologie récurrente en aquarium marin, et depuis le milieu des années 1980, elle est en passe de devenir un réel problème pour le développement de l'aquaculture marine dans certaines régions du monde. Quand la maladie se déclare, le traitement est souvent inadapté ou trop tardif, et les pertes économiques sont importantes.

II. HISTORIQUE

Les premiers écrits connus sur la cryptocaryose remontent à Kerbert (Stiles, 1894). Ce n'est que bien plus tard que l'agent pathogène de la cryptocaryose fut décrit au Japon par Sikama (1937). On crut d'abord que ce parasite était la forme marine d'*Ichthyophthirius multifiliis*. Mais Sikama (1961) se rendit compte que sa morphologie est différente (légèrement plus petit) d'*Ichthyophthirius multifiliis*, et proposa de le nommer *Ichthyophthirius marinus*.

Bien que Brown (1951) ait déjà décrit *Cryptocaryon irritans*, parasite cilié pathogène en eau de mer, ce ne fut que 12 ans plus tard que Brown (1963) distingua sans équivoque *Cryptocaryon irritans* d'*Ichthyophthirius multifiliis*.

III. ETIOLOGIE

A. PRESENTATION DU PHYLUM DES CILIOPHORA

Les protozoaires sont des organismes microscopiques appartenant au règne des protistes. Ce sont des organismes unicellulaires, qui à cause de leur membrane nue, ne se retrouvent que dans les habitats humides ou aquatiques comme les océans, les lacs ou le sol. Cette cellule unique est très spécialisée, et capable de remplir toutes les fonctions vitales. Les protozoaires doivent se déplacer, digérer, respirer, éliminer leurs déchets par excrétion, et se reproduire pour survivre. Leur cellule est donc beaucoup plus complexe que celles retrouvées chez les métazoaires.

Parmi les protozoaires, certains sont dotés d'alvéoles corticales sous leur membrane cellulaire : ils constituent le groupe des Alvéolobiontes (ou Alveolata). Ce groupe est subdivisé en trois phylums :

- Apicomplexés (anciennement Sporozoaires) : il s'agit du plus vaste et du mieux connu des taxons des protistes. Il regroupe uniquement des parasites intracellulaires obligatoires, aussi bien de vertébrés que d'invertébrés Exemple : *Toxoplasma gondii* (toxoplasmose), *Cryptosporidium parvum* (cryptosporidiose), *Plasmodium falciparum* (paludisme).
- Dinophytes (anciennement Dinoflagellés) : Ces protozoaires représentent la composante principale du phytoplancton. Cependant, il y a quelques espèces parasites de poissons (*Amyloodinium*, *Crepidodinium*). D'autres sont toxigènes, et peuvent être responsables d'intoxication chez l'homme suite à la consommation de poissons, de mollusques ou de crustacés. Exemple : *Gambierdiscus toxicus* (ciguatoxine), *Dinophysis* (dinophysistoxines), *Alexandrium* (saxitoxine).
- Ciliophora (ou Ciliés) : C'est le phylum le plus évolué et le plus diversifié des protozoaires. Ils sont recouverts de cils, dont certains constituent des structures spécialisées rappelant la bouche et l'anus des organismes supérieurs. Exemples : *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Ichthyophthirius*, *Cryptocaryon*.

Le phylum des Ciliophora comporte 7200 espèces connues, et il est vraisemblable que plusieurs milliers d'espèces de ce groupe restent à découvrir (Wright & Lynn, 1995). La majorité d'entre eux vivent libres et jouent un rôle fondamental au niveau des chaînes trophiques. En effet ils sont les consommateurs principaux de bactéries, du plancton (pico- et nano-diatomées), de dinoflagellés, ou d'amibes, puis ils sont mangés à leur tour par le zooplancton, les crustacés et les poissons larvaires. Ce sont donc des bioindicateurs importants des conditions environnementales au niveau microbien.

Certaines espèces sont symbiotiques, étroitement associées à leur hôte, chacun des deux partenaires trouvant un avantage dans cette association. C'est le cas par exemple des ciliés du rumen des ruminants ou du gros intestin du cheval.

Un faible nombre de ciliés, de l'ordre de 2500, ont adopté un mode de vie parasitaire ou commensale des invertébrés ou des vertébrés (Levine *et al.*, 1980). On peut citer à ce titre chez les poissons, des ciliés parasites vrais comme *Ichthyophthirius multifiliis*, *Cryptocaryon irritans*, *Chilodonella piscicola*, *Chilodonella hexasticha*, *Brooklynella hostilis*, *Trichodina spp.*, *Trichophrya piscium*, *Apiosoma spp.*, *Epistylus spp.*, *Balantidium ctenopharyngodoni*, ou opportunistes comme *Tetrahymena spp.*, *Uronema marinum*, *Colpidium copoda* (Dickerson & Clark, 1996). Le phylum des Ciliophora renferme les protozoaires les plus pathogènes que les poissons puissent rencontrer. Bien qu'ils ne soient pas considérés comme un problème dans le milieu naturel, ces parasites provoquent de lourdes pertes dans les conditions intensives de l'aquaculture.

Tableau I: Parallèle entre les ciliés parasites des poissons d'eau douce et des poissons de mer et ayant un mode de vie et un pouvoir pathogène quasiment identiques.

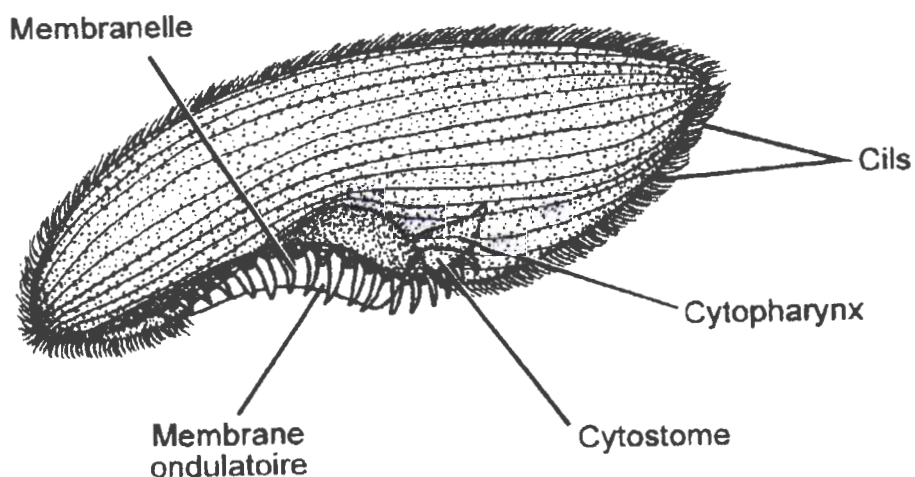
POISSONS D'EAU DOUCE	POISSONS MARINS
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Cryptocaryon irritans</i>
<i>Chilodonella cyprini</i>	<i>Brooklynella hostilis</i>
<i>Tetrahymena corlissi</i>	<i>Uronema marinum</i>
<i>Tetrahymena corlissi</i>	<i>Miamiensis avidus</i>
<i>Trichodina spp.</i>	<i>Trichodina spp.</i>
<i>Tripartiella spp.</i>	<i>Tripartiella spp.</i>
<i>Trichodinella spp.</i>	<i>Trichodinella spp.</i>
<i>Ambiphrya spp.</i>	<i>Ambiphrya spp.</i>
<i>Apiosoma spp.</i>	<i>Scyphidia spp.</i>
<i>Heteropolaria spp.</i>	<i>Zoothamnium spp.</i>
<i>Trichophrya spp.</i>	

Les ciliés sont caractérisés par de nombreux cils sur la surface du corps, et par un double noyau différencié en macro- et micronucleus. Leur taille varie de 10 µm à 450 µm. Ils disposent d'un corps rigide grâce à un cortex fibreux situé sous la membrane plasmique. Les ciliés possèdent un grand nombre d'organites et d'inclusions. On distingue les différentes espèces de ce phylum en fonction :

1. Des caractéristiques de la structure orale :

La nourriture est ingérée par une ouverture permanente appelée **cytostome**. Chez bon nombre de ciliés, le cytostome se trouve à la base d'un **cytopharynx** : c'est un tube soutenu par des microtubules. Ces microtubules peuvent former des tiges épaisses (appelées le **nematodesmata** de sorte que le cytopharynx ressemble à un panier. Certains ciliés, peuvent avoir plusieurs cytostomes disposés au bout des tentacules. D'autres encore ont le cytostome et le cytopharynx repliés dans une indentation de la cellule (appelée **vestibule** ou **infundibulum**) rendant la filtration alimentaire plus efficace. Les Ciliophora sont des organismes hétérotrophes, c'est à dire qu'ils se nourrissent des constituants organiques provenant d'autres êtres vivants.

Croquis 1 : Morphologie générale d'un protozoaire (Blepharisma) – (Houseman, 2001 d'après Livingston)



2. De l'organisation des cils et des organes ciliaires à certains stades de leur développement :

Les cils sont souvent présents en grand nombre, et leurs battements rythmés permettent à l'organisme de se mouvoir ou de créer des courants d'alimentation. En fonction de leur localisation et de leur fonction, on peut classer les cils en deux catégories :

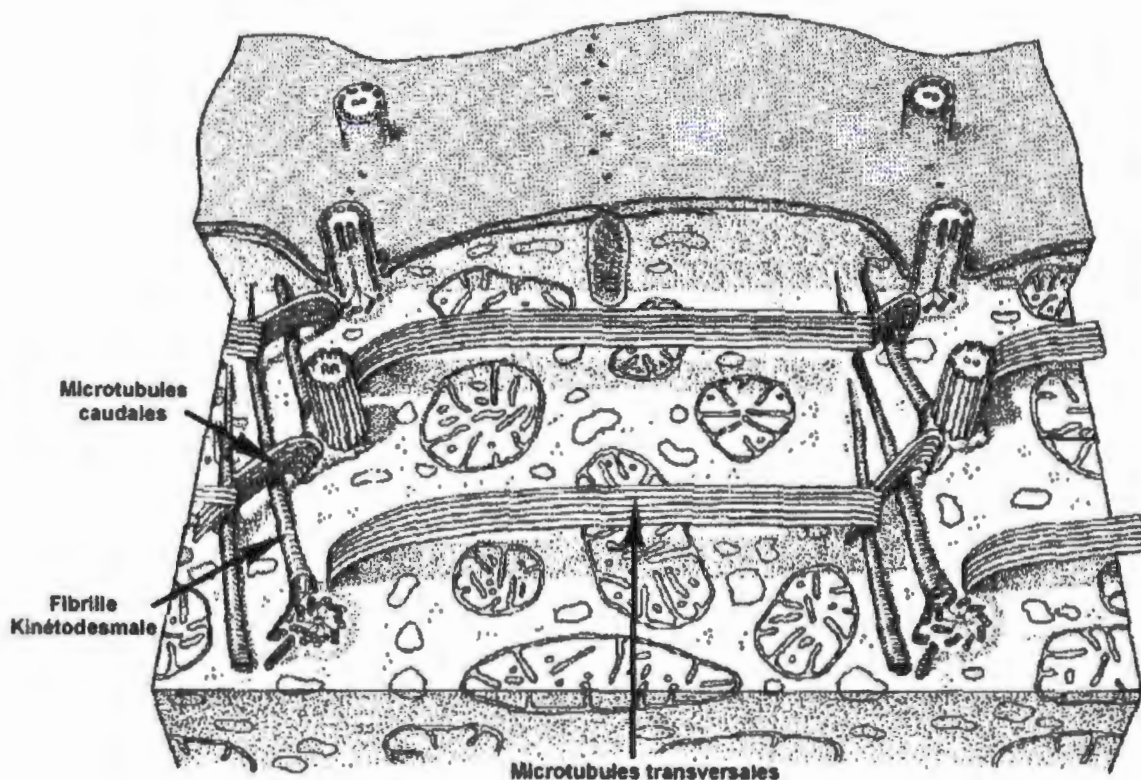
- Les **cils somatiques** qui se situent au niveau du corps, le long de rangées appelées les **kinéties**.
- Les cils composant la **ciliature orale** et qui interviennent dans la capture de la nourriture.

3. Infrastructure ciliaire aussi appelée **infraciliature** :

Elle est responsable de l'ancrage des cils sous la membrane cellulaire. Elle est constituée d'un corps basal associé à trois structures :

- Un ruban de **microtubules transversales** : il s'insère antérieurement au kinéosome, puis se prolonge vers la surface cellulaire où il se plie latéralement, pour se diriger vers le kinéosome adjacent.
- Un ruban de **microtubules caudales** : il s'insère caudalement au kinéosome, puis se prolonge vers la surface cellulaire où il se plie, pour finir par se prolonger en arrière vers l'extrémité postérieure de la cellule.
- Une **fibrille kinéodesmale** s'insère à la base du kinéosome et, habituellement, se prolonge vers l'avant de la cellule.

Croquis 2 : Coupe tridimensionnelle de l'infrastructure ciliaire des Ciliophora (issu de <http://gwis2.circ.gwu.edu/~biodl/Introduction/infraciliature.htm>).



En plus de ces trois types de fibres, le kinéosome peut également être associé à :

B. L'AGENT PATHOGENE : CRYPTOCARYON IRRITANS

1) Systématique

D'après ses caractéristiques morphologiques et structurelles on peut classer l'agent de la cryptocaryose dans la famille des Ichthyophthiridae. Le genre *Cryptocaryon* ne contient qu'une seule espèce : *Cryptocaryon irritans*.

Phylum des Ciliophora :

C'est une taxonomie complexe qui est fondée sur la structure des appareils ciliaires. Ce phylum regroupe les protozoaires avec des cils simples ou des organites ciliaires à au moins un stade du cycle biologique.

Les Ciliophora possèdent deux types de noyaux. Leur reproduction s'effectue soit par division binaire, soit par bourgeonnement et fissions multiples. Parfois il existe des formes sexuées.

Subphylum des Hypostomata

Classe des Oligohymenophorea :

La ciliature orale et somatique des Oligohymenophorea est bien distincte.

Leur cytostome est généralement ventral ou près du pôle antérieur, au fond d'une cavité.

Sous-classe des Hymenostomatia :

Ils sont munis d'une ciliature uniforme et dense avec une bouche ventrale.

Ordre des Hymenostomatida :

Leur cavité buccale est ventrale et associée à des membranelles.

Famille des Ichthyophthiriidae :

Exemples : *Cryptocaryon irritans*, *Ichthyophthirius multifiliis*

2) Morphologie

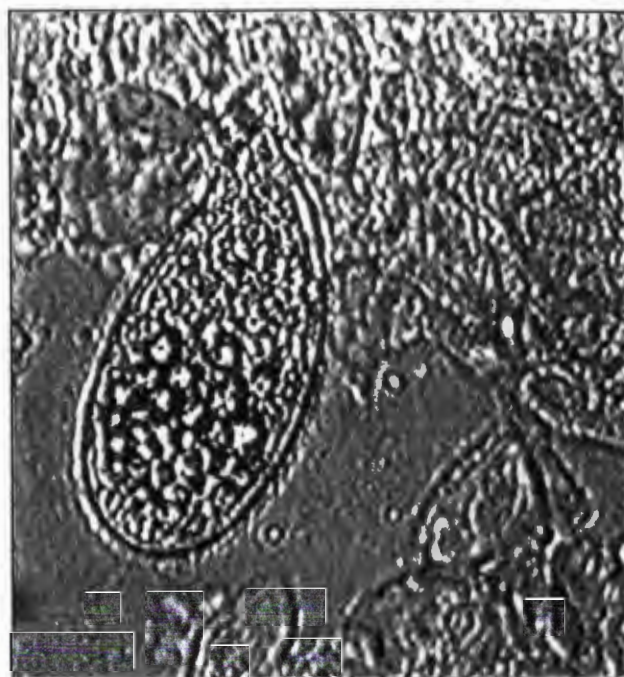
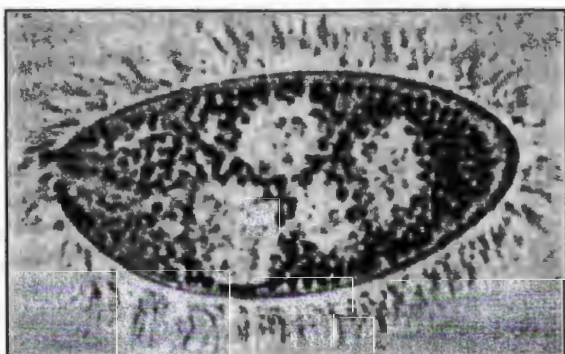
Cryptocaryon irritans est un protozoaire holotriche (ciliature uniforme) de 50 μm à 500 μm selon les stades de son cycle. Le stade le plus facilement observable est le trophonte, fixé au poisson et visible à l'œil nu (0,5 mm). Les autres formes du parasite sont visibles au microscope à un grossissement inférieur à 100.

Photographie 1 (à droite) :

Trophonte de *Cryptocaryon irritans* issu d'un raclage cutané de grisset (*Spondyliosoma cantharus*) issu du Musée de la mer, Biarritz.

Photographie 2 (en bas) :

Trophonte de *Cryptocaryon irritans* en microscopie photonique (Photo de A.Colorni issue de Bruno et al., 1997)



En microscopie photonique, on peut observer de courts filaments locomoteurs (cils) qui ondulent. Cette ciliature est fine et uniforme, disposée en 78 à 80 kinétides méridiens convergeant vers la cavité orale et le pôle opposé.

Le cytoplasme granuleux renferme un gros noyau (macronucleus) subdivisé en quatre corps sphériques disposés en forme de fer à cheval. Ces segments sont ovoïdes, approximativement de 10 μm de longueur et de 8 μm de large et localisés au centre de la cellule (Colorni & Diamant, 1993). Chaque segment contient au moins un à deux nucléoles. Le macronucleus persiste tout au long du cycle de *Cryptocaryon irritans*, ce qui n'est pas le cas de tous les ciliés (Brown, 1963). Mais l'observation du noyau reste très difficile, ce qui lui a valu l'appellation de *Cryptocaryon* (en grec « noyau caché »).

Le micronoyau est compact et sub-sphérique. On peut dénombrer jusqu'à cinq micronuclei selon le stade du cycle biologique. Les micronuclei mesurent approximativement 3-4 μm x 4-5 μm , et sont adjacents de moins de 2 μm du macronucleus (Colorni & Diamant, 1993).

Sikama (1961) a observé une vacuole contractile chez les jeunes trophontes, mais celle-ci n'a jamais été décrite par la suite (Nigrelli & Ruggieri, 1966 ; Canella, 1972 et Colorni &

Diamant, 1993). Actuellement on ne sait pas si *Cryptocaryon irritans* possède une zone bien définie d'évacuation des résidus alimentaires comme un cytoprocte ou un cytopyge.

3) Variation intraspécifique

Jusqu'il y a une dizaine d'années, on pensait que la cryptocaryose ne s'exprimait pas en dessous de 19°C (Nigrelli & Ruggieri, 1966 et Wilkie & Gordin, 1969).

Mais Diamant *et al.* (1991) furent les premiers à découvrir en mer Méditerranée sur *Sparus aurata*, un *Cryptocaryon irritans* plutôt atypique. Il était différent des isolats connus à ce jour puisqu'il se développait dans une gamme de température inhabituelle (température inférieure à 19°C). Cet isolat de *Cryptocaryon irritans* fut d'abord isolé sur la côte nord d'Israël, puis en Espagne. Plus récemment, cette nouvelle souche d'eau froide a été incriminée lors d'une épidémie hivernale (eau entre 12 et 16°C) de cryptocaryose, dans un élevage coréen de *Paralichthys olivaceus* (Jee *et al.*, 2000).

Diggles & Lester (1996c) ont aussi constaté des variations significatives dans le développement de ces deux isolats de *Cryptocaryon irritans*. Selon Diggles & Adlard (1997), des études chinoises ont montré sur un isolat de *Cryptocaryon irritans* un développement plus rapide à 20°C qu'à des températures supérieures ; ce comportement est l'inverse de ce que Nigrelli & Ruggieri (1966), Cheung, Nigrelli & Ruggieri (1979b), Colomi (1985) et Yoshinaga & Dickerson (1994) ont observé avec les souches jusqu'alors isolées.

Le nombre de kinétides de cette souche d'eau froide constitue une des rares différences morphologiques avec la souche classique de *Cryptocaryon irritans* (Diggles & Adlard, 1997). On peut donc penser qu'il existe plusieurs souches de *Cryptocaryon irritans*, adaptées à des niches écologiques bien précises.

Chez *Ichthyophthirius multifiliis* par exemple, les souches sont regroupées selon leur thermotolérance et la morphologie de leur macronucléus (Nigrelli, Pokorny & Ruggieri, 1976).

IV. EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE

La maladie des « points blancs » est aussi appelée « white spots disease », « cryptocaryose », « cryptocaryonosis », « marine Ich » ou « ichthyo de mer ».

A. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

La cryptocaryose est cosmopolite dans les eaux marines tropicales et subtropicales (Diggles & Lester, 1996a ; Sikama, 1961). Cependant cette parasitose clinique est rare à l'état naturel, mais beaucoup plus répandue en élevages ou en aquariums dans la mesure où l'habitat favorise la transmission des parasites monoxènes. Elle s'attaque aux poissons d'aquariums marins partout dans le monde (Nigrelli & Ruggieri, 1966 ; Sindermann, 1977).

B. ESPECES AFFECTEES

La cryptocaryose touche exclusivement les poissons téléostéens marins. Mais *Cryptocaryon irritans* semble sélectif dans le choix de son hôte, contrairement à *Ichthyophthirius multifiliis*. En effet, les infestations sur un récif sont très légères, et n'affectent que très peu d'espèces (Terver, 1975). Colomi (1985) constate que quand une épidémie survient dans un aquarium avec plusieurs espèces de poissons, certains poissons sont plus facilement atteints que d'autres. La sensibilité à la cryptocaryose peut donc varier d'un poisson à l'autre. Cependant selon Nigrelli & Ruggieri (1966) et Wilkie & Gordin (1969), plus d'une centaine d'espèces marines seraient sensibles.

Certaines espèces, par contre, sont naturellement résistantes à *Cryptocaryon irritans*. C'est le cas par exemple des Elasmobranches (raies et requins) ou d'autres espèces, résumées dans le tableau II (Wilkie & Gordin, 1969).

Tableau II: Poissons marins identifiés comme étant résistants à *Cryptocaryon irritans* (Wilkie & Gordin, 1969).

Ordre	Famille	Espèces	Ordre	Famille	Espèces
Anguilliformes	Muraenidae	<i>Gymnothorax mordax</i>	Squaliformes	Heterodontidae	<i>Heterodontus francisci</i>
		<i>Echidna zebra</i>		Scyliorhinidae	<i>Cephaloscyllium uter</i>
		<i>Muraen lentiginosa</i>		Carcharinidae	<i>Triakis semifasciata</i>
Perciformes	Gobiidae	<i>Lythrypnus dalli</i>		Squatinae	<i>Squatina californica</i>
		<i>Lythrypnus zebra</i>		Rhinobatidae	<i>Platyrhinoidis triseriata</i>
Pleuronectiformes	Bothidae	<i>Citharichthys sp.</i>		Rhinobatidae	<i>Rhinobatis productus</i>
		<i>Paralichthys californicus</i>			Dasyatidae
	Pleuronectidae	<i>Hypsopsetta quttulata</i>		Dasyatidae	<i>Urolophus halleri</i>
		<i>Platichthys stellatus</i>			Myliobatidae
		<i>Pleuronichthys coenosus</i>			

Depuis les premières observations faites dans les aquariums marins publics par Sikama (1937) et Nigrelli & Ruggieri (1966), cette maladie est aujourd'hui très répandue (Colorni, 1985 ; Colorni, 1987 ; Diamant *et al.*, 1991 ; Huff & Burns, 1981 ; Nigrelli & Ruggieri, 1966 et Yoshinaga & Dickerson, 1994). La combinaison de la multiplication rapide du parasite avec le milieu confiné que représente l'aquarium, rend cette maladie très contagieuse et dévastatrice dans ces conditions. Cette morbidité élevée, associée à une mortalité forte, laisse peu de poissons survivants après un épisode infectieux (Wilkie & Gordin, 1969).

La cryptocaryose sévit de plus en plus en aquaculture marine d'après Nigrelli & Ruggieri (1966), Sindermann (1977), Huff & Burns (1981), Colorni (1985) et Kaige & Miyazaki (1985). On peut citer entre autres les élevages de :

- *Dicentrarchus labrax* (Diamant *et al.*, 1991)
- *Lutjanus* (Leong, 1992).
- *Sparus aurata* (Diamant *et al.*, 1991)
- *Lates calcarifer* (Leong & Wong, 1990)
- *Epinephelus* (Huff & Burns, 1981 ; Colorni, 1985 ; Kaige & Miyazaki, 1985 ; Rasheed, 1989 ; Boulanger, 1992 et Jee *et al.*, 2000).

C. EFFET DE LA TEMPERATURE

La température affecte le développement de *Cryptocaryon irritans* (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1979b). La cryptocaryose sévit généralement dans des aquariums maintenus entre 20 et 25°C (Nigrelli & Ruggieri, 1966). De nombreux poissons d'eau froide peuvent donc déclarer cette maladie si la température dépasse le seuil de 19°C (Wilkie & Gordin, 1969).

Cependant il faut prendre en considération les nouvelles souches de *Cryptocaryon irritans* d'eau froide, qui se déclarent à des températures inférieures à 16°C, et qui se multiplient plus facilement à basse qu'à haute température.

Ichthyophthirius multifiliis, se rencontre dans des gammes de températures plus étendues ; entre 4 et 24°C selon Post & Vesely (1983).

D. CYCLE BIOLOGIQUE

Cryptocaryon irritans est un parasite obligatoire temporaire avec un cycle monoxène direct. Il y a donc alternance d'une phase exogène libre et d'une phase ectoparasite.

Plusieurs terminologies coexistent dans la littérature pour nommer les différents stades de développement de *Cryptocaryon irritans* : c'est ainsi que l'on peut dénombrer de 4 à 6 formes selon les auteurs (cf. tableau III ci-dessous).

Tableau III : Correspondance entre plusieurs terminologies de *Cryptocaryon irritans*.

Stade du cycle de <i>Cryptocaryon irritans</i>	Terminologie de Canella & Rocchi-Canella (1976)	Terminologie de Lom & Dykova (1992)
Stade qui pénètre dans l'épithélium.	PHORONTE	TROPHONTE
Stade qui se nourrit et grossit aux dépens du poisson.	TROPHONTE	
Stade entre l'abandon de l'hôte et le début de l'enkystement.	PROTOMONTE	TOMONTE
Stade enkysté et en intense division.	TOMONTE	
Cellule fille d'un tomonte encore enkysté.	TOMITE	TOMITE
Stade infectieux, nageant librement dans l'eau.	THERONTE	THERONTE

1) Trophontes

Le stade trophonte est le stade parasitaire. Il se développe en se nourrissant de l'épithélium cutané et branchial (Canella & Rocchi-Canella, 1976). Il se loge dans les couches superficielles, à l'intérieur d'une poche remplie de liquide tissulaire.

Le trophonte se nourrit en ingérant aussi bien des cellules entières que des débris cellulaires. Dans son cytoplasme, le nombre de vacuoles alimentaires augmente au fur et à mesure qu'il mûrit. On identifie au moins 6 types cellulaires différents à l'intérieur de ces vacuoles : des cellules à mucus, des mélanocytes, des érythrocytes, des macrophages, des granulocytes et des leucocytes polynucléaires (Colorni & Diamant, 1993).

Il s'agit d'une cellule ovale dans le stade précoce mesurant 48 x 27 μm . Progressivement, sa longueur augmente pour devenir quasiment sphérique (350 x 450 μm). Son corps est entièrement recouvert de cils (de 7 à 9 μm de longueur), disposés en rangées et dont le nombre s'accroît avec la taille. Une couronne de cils pointus groupés en triplets délimite le cytostome mesurant 20 μm de diamètre (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1981).

Photographie 3 : Cavité orale d'un trophonte de Cryptocaryon irritans en microscopie électronique (Colomi & Diamant, 1993).



Les trophontes de 2 à 3 jours sécrètent une substance qui comble les alvéoles pelliculaires (cavités situées sous la membrane plasmique). Cette substance donne une réaction positive à l'acide périodique de Schiff (Colomi & Diamant, 1993). Cette couche peut atteindre 2 à 3 μm d'épaisseur. La nature de cette substance est incertaine mais il s'agirait des produits de sécrétion des mucocytes décrits par Ewing, Kocan & Ewing (1985) chez les thérontes d'*Ichthyophthirius multifiliis*. Cette sécrétion diminue au fur et à mesure que le trophonte mûrit. Colomi & Diamant (1993) ont émis deux hypothèses quant aux rôles de cette substance :

- Soit cette sécrétion est associée avec une phase de préparation active de métamorphose avant de quitter le poisson hôte ;
- Soit les nombreuses vésicules présentes à l'intérieur de cette substance contiennent des enzymes lytiques de digestion extracellulaire qui aideraient le trophonte en croissance à pénétrer le tégument de l'hôte.

Le diamètre des trophontes augmente avec le temps de résidence sur le poisson et à une vitesse qui dépend beaucoup de la température et de l'hôte (Diggles & Lester, 1996b). Les trophontes de 4 à 5 jours d'âge mesurent 200 x 250 μm . Leur corps a une forme sphéroïde à piriforme, légèrement aplati au milieu, avec une partie effilée et pointue à l'extrémité apicale (Colomi & Diamant, 1993).

Quand le trophonte a atteint sa maturité, il se détache du poisson et se transforme en tomonte. Cette étape dure de 3 à 7 jours à 24 - 27°C (Colorni, 1985).

Les trophontes fixés ont aussi un rôle de dissémination géographique du parasite (Post & Vesely, 1983).

2) Tomontes

Le tomonte va nager activement pendant 12 à 18 heures, puis va progressivement sédimenter. Il sécrète ensuite une paroi kystique, opaque et gluante lui permettant de se fixer au substrat (corail, rochers ou vitre). Cette paroi s'épaissit tout autour de la cellule, englobant aussi bien les cils que les bactéries et les débris cellulaires. Le durcissement de la paroi kystique prend 8 à 12 heures. Cette coque protectrice accroît considérablement la résistance des ciliés, rendant impossible la pénétration d'agents chimiques comme le formaldéhyde. Cette structure a deux fonctions :

- Elle permet de protéger efficacement le protozoaire de l'environnement extérieur lors de la phase de multiplication ;
- C'est une forme de résistance.

Le tomonte enkysté a un diamètre variant de 200 à 400 µm, ce qui permet parfois de l'apercevoir à l'œil nu.

La paroi kystique est édifée à partir des sécrétions des mucocytes (Colorni & Diamant, 1993). Le reliquat des produits de sécrétion des mucocytes de la phase théronite servirait de support à l'édification de la paroi kystique du tomonte. Ewing, Kocan & Ewing (1983) ont mis en évidence le même phénomène chez *Ichthyophthirius multifiliis*. Cependant cette nouvelle structure donne une réaction négative à l'acide périodique de Schiff, ce qui laisse supposer qu'elle est composée de mucopolysaccharides neutres. Cette constatation biochimique indiquerait que le comblement des alvéoles pelliculaires chez les thérontes et l'édification de la paroi kystique chez les protomontes sont deux phénomènes consécutifs et indépendants (Colorni & Diamant, 1993).

Certains auteurs comme Canella & Rocchi-Canella (1976) subdivisent le stade tomonte en deux : le protomonte avant l'enkystement et le tomonte après.

Les conditions optimales pour l'enkystement du trophonte et le développement des tomontes sont une température de 30°C et une salinité de 31 ppt (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1979a). La durée du stade kystique varie de 3 à 28 jours (Colorni, 1985). Les kystes de *Cryptocaryon* sont extrêmement résistants et peuvent survivre très longtemps dans une eau à basse température (Herwig, 1978). A des températures inférieures à 7°C, la division des

tomites est stoppée. Au delà de 37°C, les tomites ne sont plus capables d'éclore et les parasites eux-mêmes meurent.

Tableau IV : Taux d'enkystement des trophontes de Cryptocaryon irritans (souche d'eau chaude) en fonction de la température (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1979b).

Température	< 7°C	7°C	25°C	> 37°C
Taux d'enkystement	0	10 %	77 %	0

A l'intérieur du kyste, le tomonte se divise activement en cellules filles appelées tomites (Yoshinaga & Dickerson, 1994).

3) Tomites

Les tomites émergent du kyste par une petite ouverture de la paroi. Chaque kyste se vide en quelques minutes (Yoshinaga & Dickerson, 1994). Le taux de rupture des kystes varie en fonction de la température et de l'espèce hôte d'origine (cf. tableau V).

Tableau V : Taux d'excystement des tomontes de Cryptocaryon irritans en fonction de l'hôte d'origine et de la température d'incubation (Diggles & Lester, 1996b).

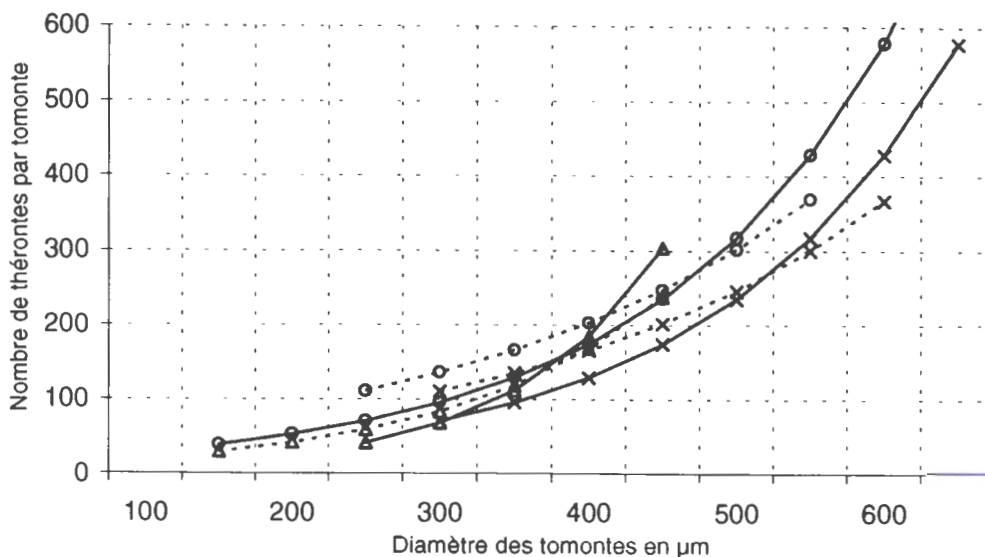
	<i>Lates calcarifer</i>	<i>Macquaria novemaculeata</i>	<i>Acanthopagrus australis</i>
20°C	48 %	32 %	43 %
25°C	37 %	56 %	59 %

Des travaux (Colorni, 1985 ; Nigrelli & Ruggieri, 1966), ont montré que le développement des tomites était asynchrone. L'excystement peut s'étaler sur plusieurs semaines pour des tomontes ayant subi les mêmes conditions environnementales (même hôte, même température ...), ce qui favorise les récurrences après un traitement trop court.

Le nombre de tomites produits dépend de la taille du tomonte initial (cf. graphique 1). En moyenne, chaque tomonte produit environ 200 tomites par division binaire. Les tomites

sont des cellules de petite taille (25 à 60 µm) en forme de poire. Elles sont caractérisées par un nucléus à quatre lobes. Elles évolueront en synthétisant des cils qui leur permettront de percer la paroi kystique et de se transformer en formes libres nageantes aussi appelées thérontes.

Graphique 1 : Corrélation entre le nombre de thérontes de *Cryptocaryon irritans* produits et le diamètre du tomonte initial, chez différentes espèces, à 20 et 25°C (Diggles & Lester, 1996b).

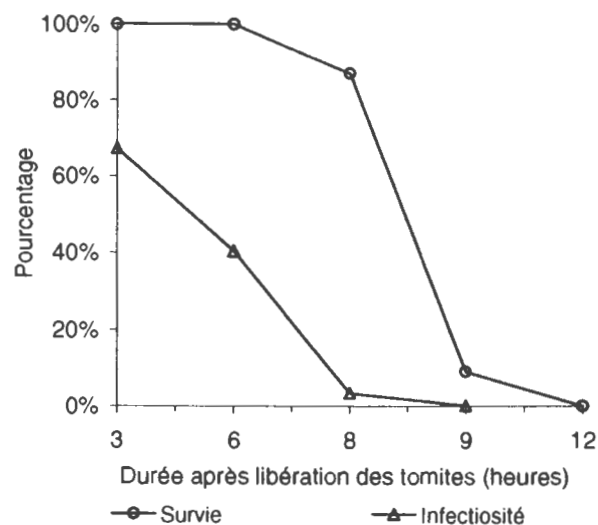


Légende : x: *Acanthopagrus australis* - O: *Lates calcarifer* - Δ: *Macquaria novemaculeata*
 —: à 25°C - ---: à 20°C

4) Thérontes

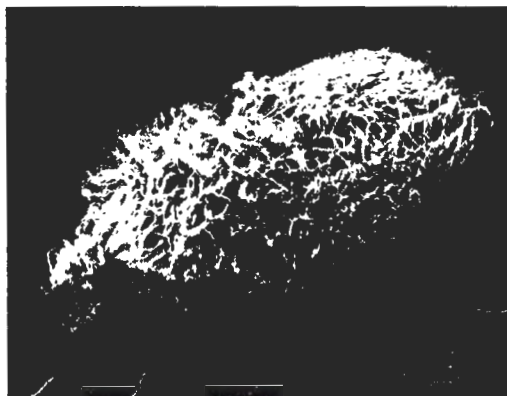
Les thérontes sont les stades infestants. Pour eux, une véritable course contre la montre commence. En effet, ils ne disposent que de quelques heures pour trouver un poisson hôte sans quoi leurs réserves ne leur permettraient pas de survivre plus longtemps. Yoshinaga & Dickerson (1994) ont déterminé une durée de survie de 12 heures. Mais pour Nigrelli & Ruggieri (1966) elle est de 24 heures. Colorni (1985) a même trouvé des thérontes viables après 30 à 36 heures.

Graphique 2 : Survie et infectiosité des thérontes de *Cryptocaryon irritans* à partir de la libération des tomites (Yoshinaga & Dickerson, 1994).



Une fois l'hôte atteint, le théronte doit encore pénétrer à travers l'épithélium branchial ou tégumentaire pour pouvoir se nourrir. Chez le théronte, l'appareil oral est organisé en radula circulaire (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1981). Cette ciliature orale paraît particulièrement spécialisée dans le fouissage et le broutage du tégument des poissons, bien qu'elle ne soit pas encore fonctionnelle à ce stade. Ils utilisent leur radula circulaire pour se fixer au poisson puis creusent l'épiderme en se déplaçant en spirale (Diggles & Lester, 1996b) ; cette phase dure de 30 à 60 secondes à 22-24°C.

Photographie 4 : Théronte de *Cryptocaryon irritans* en microscopie électronique (Colorni & Diamant, 1993).

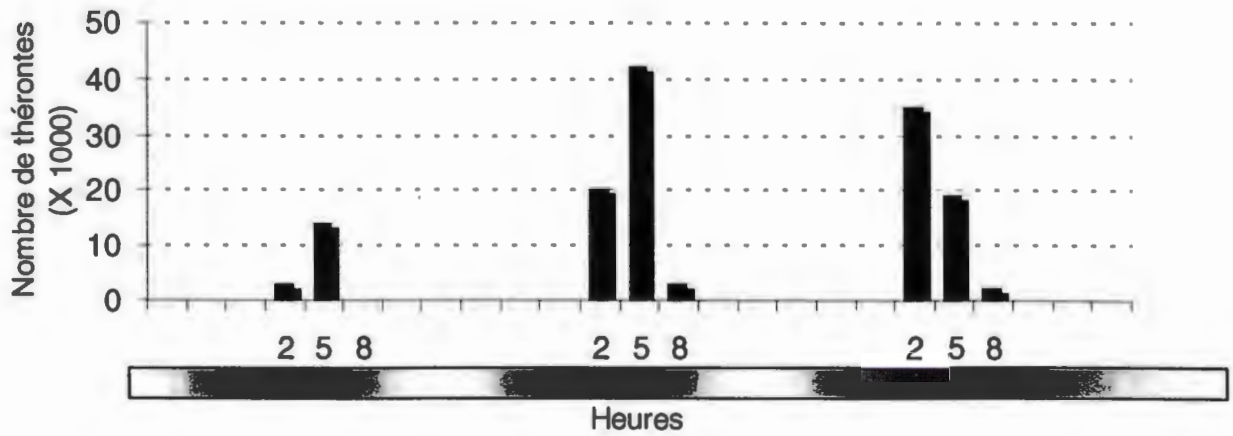


Les phorontes sont les formes ayant pénétré l'épithélium. Ils ressemblent aux thérontes, mais deviennent fusiformes à piriformes et mesurent 20-30 x 50-70 µm. La transformation en phoronte apparaît en quelques heures et un accroissement de leur taille est perceptible en 36-48 heures (Colorni & Diamant, 1993).

En général, les thérontes qui ne parviennent pas à pénétrer rapidement le tégument, s'épuisent et meurent *in situ* (Diggles & Lester, 1996b). Cependant Wahli & Matthews (1999) ont montré que des thérontes d'*Ichthyophthirius multifiliis* qui rencontraient un hôte non réceptif (carpes immunisées), quittaient en moins de deux heures l'épiderme des poissons. Seulement quelques-uns d'entre eux retrouvaient des caractéristiques de thérontes et pouvaient à nouveau réinfecter un hôte. On ne sait pas si un tel mécanisme existe chez *Cryptocaryon irritans*.

Yoshinaga & Dickerson (1994) ont remarqué que la libération des thérontes est orchestrée de manière circadienne. Les thérontes sont libérés entre 2 h 00 et 9 h 00 le matin ; il s'en suit une synchronisation des infestations des poissons dans la matinée. Cette synchronisation ne semble pas être basée sur la périodicité de la lumière, parce que ce comportement se reproduit même dans l'obscurité permanente. Diggles & Lester (1996b) remarquent eux aussi le pic d'éclosion des thérontes le matin entre 2h00 et 6h00.

Graphique 3 : Répartition de l'émergence des thérontes de *Cryptocaryon irritans* au cours de la journée (Yoshinaga & Dickerson, 1994).



Croquis 4 : Synthèse du cycle biologique de *Cryptocaryon irritans* (données d'après Colomi, 1985) chez *Sparus aurata* à 23-25°C

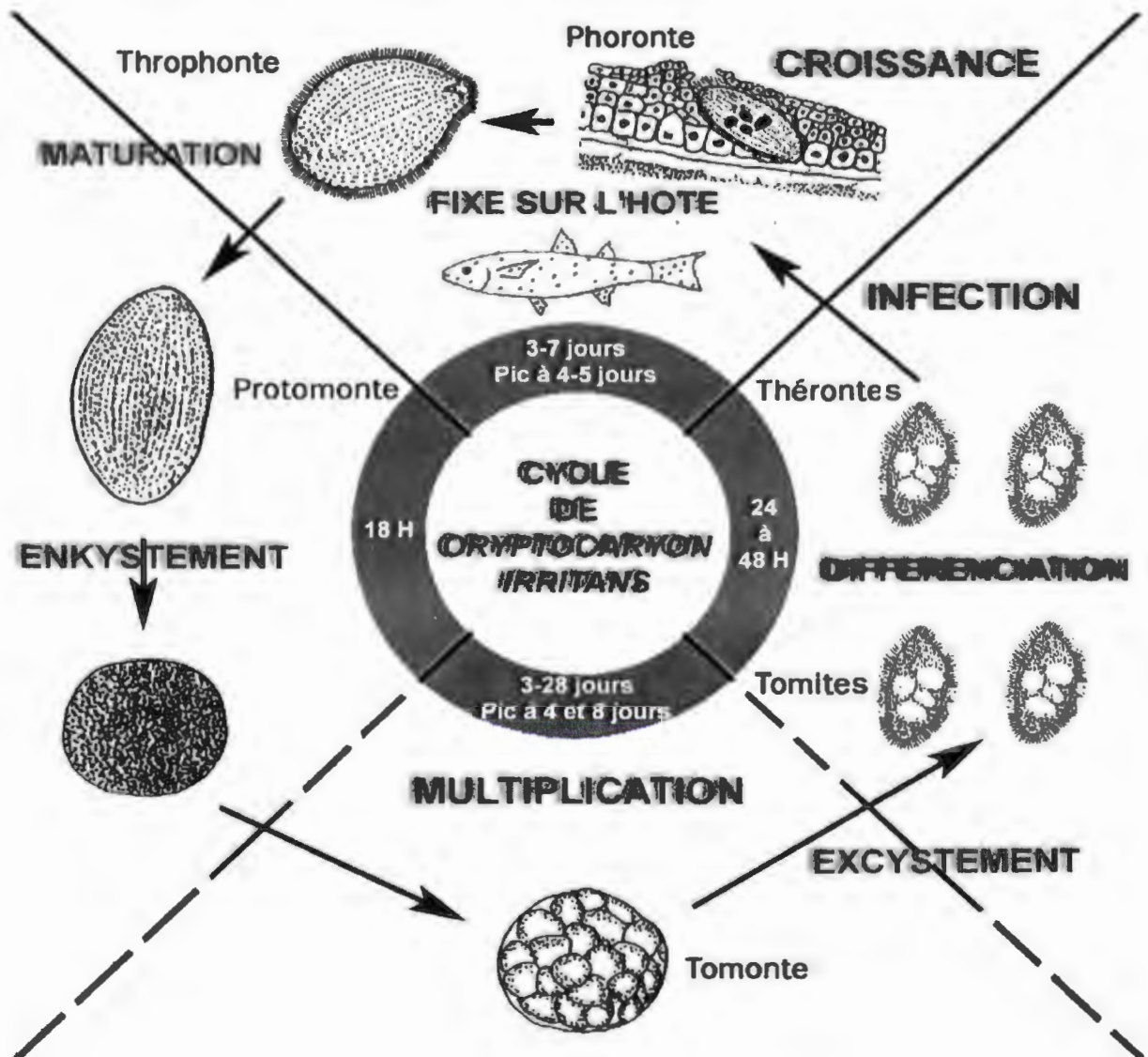


Tableau VI : Mesures morphométriques et biologiques de *Cryptocaryon irritans* chez différentes espèces, d'après différents auteurs :

m: moyenne r: répartition	Colorni (1985)	Burgess P.J. & Matthews R.A. (1994)	Diggles & Lester (1996b)	Diggles & Lester (1996b)	Diggles & Lester (1996b)	Diggles & Lester (1996b)	Diggles & Lester (1996b)	Diggles & Lester (1996b)
Hôtes	<i>Sparus aurata</i>	<i>Chelon labrosus</i>	<i>Lates calcarifer</i>	<i>Lates calcarifer</i>	<i>Macquaria novemaculeata</i>	<i>Macquaria novemaculeata</i>	<i>Macquaria novemaculeata</i>	<i>Acanthopagrus australis</i>
Température	23-25°C	24-26°C	20°C	25°C	20°C	25°C	20°C	25°C
Durée stade parasite (fixé)	3-7 jours pic à J4-J5	2,9 - 4,7 jours m: 3,5 jours	-	-	-	-	-	-
Durée d'incubation des tomontes	3-28 jours pic à J4-J8	3,5-35 jours pic à J5-J7	6-11 jours m: 6,9 jours	3-12 jours m: 5,2 jours	8-10 jours m: 8,7 jours	4-6 jours m: 4,3 jours	7-10 jours m: 7,6 jours	4-7 jours m: 5,4 jours
Dimension des trophontes (L x l en µm)	-	m:353 x 205 r: 203 x 129 à 452 x 332	-	-	-	-	-	-
Dimension des tomontes (L x l en µm)	m: 241 x 214 r: 160 x 150 à 370 x 310	m: 326 x 306 r: 160 x 154 à 406 x 369	m: 384 r: 230 à 540	m: 404 r: 150 à 590	m: 322 r: 155 à 435	m: 317 r: 205 à 410	m: 472 r: 360 à 720	m: 490 r: 335 à 640
Nombre de thérontes produits par tomontes	Moins de 200	r: 119-292 m: 198	m: 248 r: 90 à 605	m: 258 r: 25 à 689	m: 141 r: 20 à 330	m: 135 r: 40 à 240	m: 307 r: 100 à 870	m: 363 r: 85 à 1030
Dimension des thérontes (L x l en µm)	m: 57 x 25 r: 50 x 20 à 70 x 30	m: 56 x 32 r: 40 x 22 à 69 x 44	m: 64 r: 48 à 86	m: 58 r: 38 à 74	m: 68 r: 61 à 72	m: 61 r: 49 à 66	m: 59 r: 49 à 71	m: 53 r: 45 à 63

V. SYMPTOMES ET LESIONS

L'état de maladie se traduit, chez les poissons, par l'apparition d'anomalies du comportement (symptômes) et de l'intégrité corporelle (lésions). Comme pour de nombreux ectoparasites monoxènes, l'apparition des troubles cliniques dépend de l'intensité du parasitisme (De Kinkelin, Michel & Ghittino, 1985).

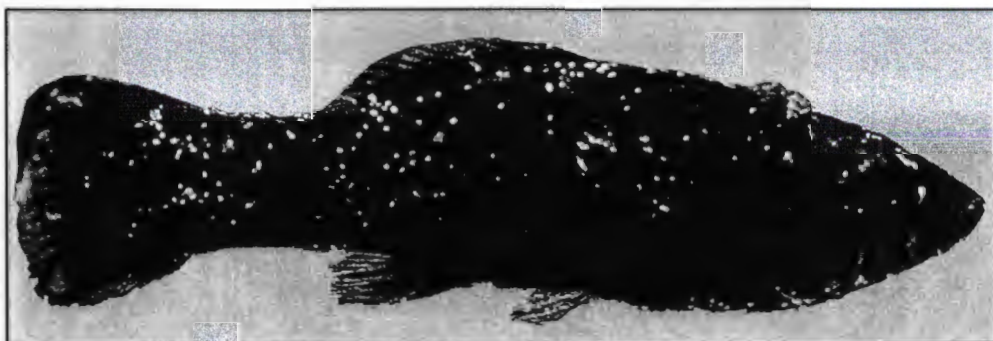
A. SYMPTOMES

La cryptocaryose débute par une décoloration du poisson, puis la peau se recouvre de nombreuses ponctuations blanchâtres ou grisâtres pouvant atteindre 0,5 mm (visibles à l'œil nu). L'infestation commence en général par les nageoires et s'étend ensuite à tout le corps. A ce stade, les nageoires sont rétractées le long du corps puis l'appétit diminue. L'irritation créée par les parasites indispose les poissons et les oblige à se frotter contre le substrat (sol, rochers). Ce prurit est un signe assez précoce qui doit faire suspecter une atteinte par *Cryptocaryon irritans*. Ensuite, l'épiderme se desquame et on observe l'apparition de taches hémorragiques.

Quand l'épithélium branchial est atteint, la respiration devient plus difficile et le poisson entre en phase de détresse respiratoire (augmentation du rythme respiratoire). Dans certaines formes cliniques, le parasite peut atteindre directement les branchies sans signe cutané.

Les yeux aussi peuvent être touchés ; ils deviennent vitreux voire opaques.

Photographie 5 : Black molly avec des signes cliniques externes de cryptocaryose (Yoshinaga & Dickerson, 1994).



Sans traitement ciblé, la maladie évolue vers une aggravation de l'état général et devient rapidement mortelle soit par asphyxie ou déséquilibre osmotique, soit par surinfection bactérienne ou fongique (Diamant *et al.*, 1991 ; Nigrelli & Ruggieri, 1966 ; Yoshinaga & Dickerson, 1994).

B. LESIONS

Les lésions sont essentiellement externes et constituées de pustules contenant les parasites. On peut aussi observer des pétéchies sur la peau (Nigrelli & Ruggieri, 1966 ; Wilkie & Gordin, 1969). En réponse à l'action irritante due au broutage du parasite, le poisson augmente sa sécrétion de mucus. La peau se desquame progressivement et peut même s'ulcérer dans les stades terminaux. Dans les infections sévères, des infections secondaires à *Pseudomonas spp.* peuvent apparaître (Nigrelli & Ruggieri, 1966).

Quand les branchies sont touchées, les lamelles branchiales deviennent hémorragiques. La réaction inflammatoire s'installe et l'épithélium branchial s'hyperplasia pouvant conduire à la fusion des lamelles branchiales.

Si les yeux sont atteints, les poissons développent une kératite.

VI. DIAGNOSTIC

Le diagnostic de la cryptocaryose est simple et rapide. L'observation macroscopique des signes cliniques, couplée à un examen microscopique d'un raclage cutané ou branchial, permet de poser un diagnostic de certitude.

A. EPIDEMIO-CLINIQUE

Le diagnostic est possible grâce à l'observation des symptômes cutanés. La seule présence de points blancs à la surface du corps est en général suffisante pour suspecter la maladie.

La cryptocaryose est généralement une maladie aiguë, très contagieuse, avec une mortalité élevée. Cependant d'après les observations faites par Boulanger (1992) dans un élevage de dorades en bassin, on peut aussi décrire deux autres formes cliniques :

- Une forme suraiguë chez les jeunes individus (de 2 à 80 g), associée à une mortalité très élevée ;
- Une forme chronique chez les poissons plus âgés (plus de 80 g), uniquement associée à un retard de croissance.

De plus, une température favorable à l'accélération du cycle biologique augmentera considérablement l'intensité parasitaire. Mais il faut tout de même prendre certaines précautions quant à l'interprétation de la température de l'eau puisque certaines souches peuvent sévir à des températures inférieures à 19°C (Diamant *et al.*, 1991).

B. ANATOMO-PATHOLOGIQUE

Le diagnostic de certitude passe nécessairement par la mise en œuvre d'observations microscopiques, avec une mise en évidence des *Cryptocaryon irritans*.

1) Frottis cutanés et branchiaux

L'observation en microscopie photonique de frottis de peau ou de branchies révèle la présence de particules ciliées. Elles se caractérisent par un cytoplasme granuleux, possèdent un cytostome marqué et contiennent un gros noyau subdivisé en quatre corps sphériques disposés en forme de fer à cheval. Cependant, ces caractéristiques sont souvent difficiles à observer (cf. photographie 2)

Il faut analyser immédiatement les prélèvements car les parasites sont rapidement détruits une fois séparés de leur hôte.

2) Histopathologie

Sur des coupes histologiques de peau ou de branchies on peut mettre en évidence le parasite.



Photographie 6 : Coupe histologique de branchies passant par un trophonte de *Cryptocaryon irritans*.

C. DIFFERENTIEL

De nombreuses maladies peuvent être confondues avec la cryptocaryose. Il s'agit essentiellement d'ectoparasitoses, mais on peut aussi la confondre avec des troubles physico-chimiques ou avec d'autres agents biologiques comme les virus ou les champignons.

1) Sursaturation gazeuse

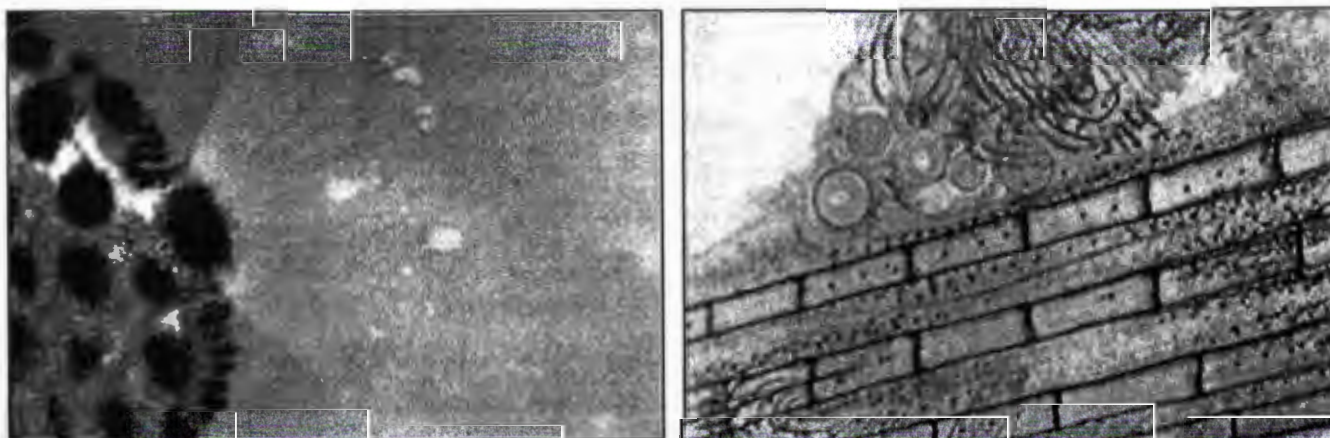
Ce trouble se rencontre uniquement en aquarium suite à des renouvellements importants et rapides de l'eau. Dans les cas extrêmes de petites bulles de gaz peuvent se former au niveau des tissus superficiels comme les branchies, le tissu sous-cutané, les nageoires et les yeux. Cette sursaturation peut provoquer des embolies suivies de complications hémorragiques, de nécroses pouvant conduire à la mort des poissons.

2) Lymphocystis

Aussi connue sous le nom de « maladie des nodules » ou « maladie lymphokystique », cette pathologie se rencontre à la fois en eau douce et eau de mer. Elle semble infecter la plupart des poissons, à l'exception des Salmonidés (Bauer, 1992).

L'agent pathogène est un virus à ADN qui s'adsorbe aux fibroblastes de la peau et des branchies. Il détourne ensuite l'équipement enzymatique de la cellule afin de produire de nombreux virions. En quelques mois la cellule peut augmenter de taille pour arriver jusqu'à mesurer plus de 2 mm de diamètre, ce qui la rend facilement visible à l'œil nu.

Photographies 7 & 8 : Cellules géantes dues à Lymphocystis observées sur la nageoire caudale de Scatophagus argus, à l'œil nu (à gauche) et en microscopie photonique (à droite) (Photographies de Bauer, 1992).



Cette maladie se traduit par une prolifération de nodules au niveau de la peau et des nageoires (cf. photographie 7) et plus rarement dans les organes internes et les muscles. Il s'agit en réalité d'une pseudotumeur, généralement chronique, qui ne provoque qu'exceptionnellement des pertes. Ces nodules apparaissent durs à la palpation, à la différence de nombreux parasites externes. L'observation microscopique d'un fragment de tissu infecté permet de mettre en évidence les cellules géantes avec leur membrane hypertrophiée (cf. photographie 8) et un noyau clair contenant un nucléole (Bauer, 1992).

3) Flagellés

Ce sont des Sarcomastigophora possédant deux flagelles et des pseudopodes, mais pourvus uniquement d'un seul type de noyau. Le groupe des *Oodinium* regroupe deux genres de protozoaires Dinoflagellés (Phytoflagellés) parasites en milieu marin : *Amyloodinium* et *Crepidoodinium*. Ils sont ubiquistes et infestent les branchies et la peau des poissons marins tropicaux et estuariens.

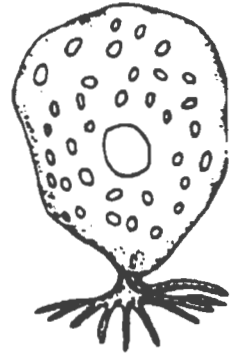
(a) *Amyloodinium ocellatum*

L'amyloodiniose, aussi appelée « Coral fish disease » ou « Salt water velvet », est une maladie qui sévit uniquement en eau chaude. L'infection par *Amyloodinium ocellatum* est une des pathologies les plus redoutées chez les poissons d'aquarium marin en raison de la mortalité très élevée qu'elle provoque et des difficultés de traitement (Nigrelli, 1936 et Lawler, 1977). Elle peut aussi se rencontrer en aquaculture marine (Paperna & Baudin Laurencin, 1979 ; Paperna, 1980 ; Aiello & D'Alba, 1986 et Reed & Francis-Floyd, 1994).

Les branchies et la peau sont les lieux privilégiés de fixation d'*Amyloodinium ocellatum*, mais ils peuvent aussi être déglutis par les poissons et se fixent alors dans l'œsophage (Hojgaard, 1962). Les poissons malades sont anorexiques, avec une respiration plus active. Ils sont craintifs et nagent de façon incoordonnée. La peau a un aspect poussiéreux, parsemée de points gris donnant le nom de « maladie du velours » à l'oodiniose. A la différence de *Cryptocaryon irritans*, aucune grande tache blanche n'est présente à la surface du corps. Les poissons ont plutôt l'air d'avoir été recouverts par une fine poudre de talc. Les infestations massives induisent des hémorragies de la peau et des branchies. Les poissons peuvent également se frotter contre le décor de l'aquarium. Certaines espèces comme *Fundulus grandis*, *Anguilla rostrata*, *Poecilia latipina* sont naturellement résistantes (Noga & Levy, 1995).

Les kystes d'*Amyloodinium ocellatum* libèrent plus de 250 dinospores flagellées, qui vont se fixer sur les branchies et la peau de nouveaux poissons et perdent leurs flagelles (Reed & Francis-Floyd, 1994). Les parasites devenus immobiles (trophontes) utilisent une ventouse munie d'un prolongement ressemblant à une racine (rhizoïde) leur permettant de se fixer à l'épithélium. Par leur rhizoïde, ils absorbent des particules de branchies et de peau et les digèrent dans des vacuoles digestives, détruisant ainsi les épithéliums. Les échanges gazeux au niveau des branchies sont gravement perturbés.

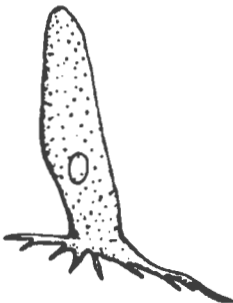
Croquis 5 :



Sa petite taille empêche de le voir à l'œil nu et l'infection est ainsi souvent non diagnostiquée. Pour établir ce diagnostic de certitude, il faut examiner au microscope une préparation de branchies d'un poisson récemment sacrifié. On remarque alors les nombreux parasites entre les lamelles des branchies, immobiles, bruns clairs ou bruns foncés, piriformes ou sphériques de 50 µm à 100 µm. Le protozoaire a une membrane bien visible entourant le corps cellulaire non transparent. Le cytoplasme est granuleux et foncé. Il cache généralement un noyau clair. De nombreux granules d'amidon entourent le noyau et peuvent être mis en évidence par des méthodes de coloration appropriées.

(b) *Crepidoodinium cyprinodontum*

Croquis 6 :



Chez les poissons marins, on rencontre également l'espèce *Crepidoodinium cyprinodontum*. Elle vit uniquement sur les branchies des Cyprinodontidés. De forme ovale, elle atteint 0,67 mm de long, et possède de nombreux chloroplastes bien développés. A l'inverse d'*Amyloodinium ocellatum*, *Crepidoodinium cyprinodontum* ne détruit pas les cellules épithéliales de l'hôte. Il est ainsi extrêmement moins pathogène.

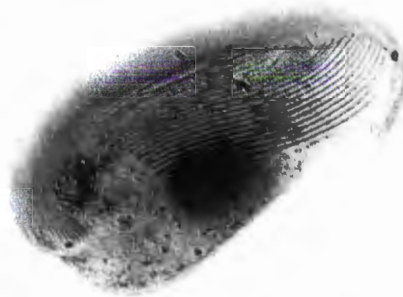
4) Ciliés

(a) *Brooklynella hostilis*

Brooklynella hostilis est un protozoaire cilié souvent confondu avec *Cryptocaryon irritans* ou avec *Amyloodinium ocellatum*. Il appartient à la famille des Hartmanellidae Poche, 1913. Il est le seul représentant de son genre.

Ce parasite ressemble à bien des égards à *Chilodonella*, sa contrepartie en eau douce. Sa distribution est cosmopolite mais il est plus répandu dans les eaux chaudes. En général, *Brooklynella hostilis* est un parasite opportuniste des poissons marins. Cependant, quand les conditions deviennent favorables à sa reproduction, la multiplication très rapide peut causer la mort des poissons (Lom, 1995). Le facteur déclenchant est un affaiblissement des hôtes, consécutif à une variation brutale des conditions environnementales (mauvaise qualité de l'eau, variation de température), à un trouble alimentaire ou à une autre infection. De nombreuses espèces de poissons sont sensibles à cette parasitose. Les épidémies se produisent aussi bien en aquaculture marine qu'en aquarium.

Photographie 9 : Morphologie de *Brooklynella hostilis* (issue du site Internet Parafish <http://www.anicca.net/parafish/>)



Brooklynella hostilis envahit généralement les branchies des téléostéens marins (Lom, 1995). Il broute l'épithélium branchial avec l'armature de son cytopharynx, et se nourrit des débris cellulaires et des cellules sanguines du poisson. Dans les cas d'infestations légères, on n'observe aucun symptôme.

Cependant, dans les cas plus graves, les poissons deviennent léthargiques, délaissent la nourriture. Lorsque les branchies deviennent fortement parasitées, les lamelles branchiales terminales fusionnent puis les poissons entrent en détresse respiratoire. Il induit une mortalité uniquement lors d'infestation massive chez des poissons initialement affaiblis.

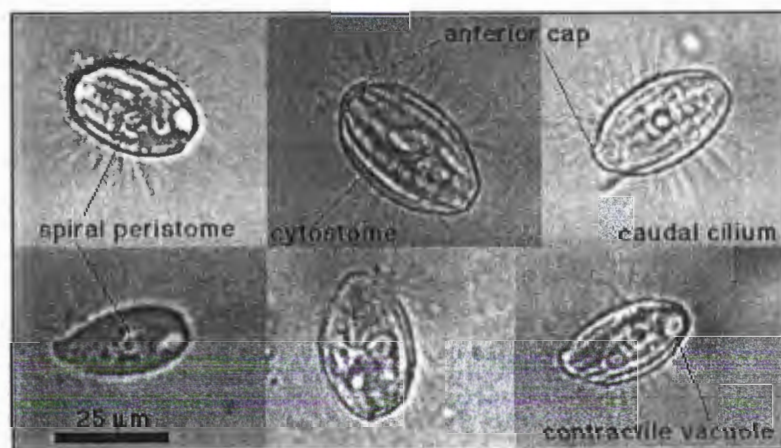
Certaines parties du corps se « fanent » puis cette modification de couleur s'étend au reste du corps au fur et à mesure que l'infection progresse. Les branchies sont pâles, épaissies et peuvent présenter des suffusions hémorragiques. Dans les stades avancés l'épithélium se décompose laissant à nu la totalité des lamelles branchiales secondaires. Ces lésions provoquent la mort rapide des poissons.

Cette parasitose peut être confirmée par râclages de branchies. Les parasites sont mobiles et leur taille varie de 36-86 µm de longueur sur 32-50 µm de large. Sa forme légèrement aplatie le fait ressembler à un cœur ou à un rein formé. Il glisse à la surface du poisson par sa face inférieure plane et uniformément ciliée. Au tiers postérieur de la face inférieure, le parasite dispose d'une glande de fixation lui permettant de s'accrocher à ses hôtes.

(b) *Uronema marinum*

Uronema marinum Dujardin, 1841 (synonyme : *Loxocephalus putrinus* Kahl, 1926) est un parasite opportuniste marin qui envahit les organes internes mais aussi les branchies, la peau, et parfois les muscles des poissons prédisposés à son infection. Il a été incriminé dans la mort de plusieurs espèces de poissons marins d'aquarium (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1980). Quand la peau est atteinte, on peut observer des ulcérations.

Photographie 10 : Morphologie d'*Uronema marinum* en microscopie photonique
(<http://www.nies.go.jp>)



Son corps est ovoïde et mesure 30 à 50 µm de long. Seule sa partie antérieure est dépourvue de cils. Sur le reste du corps les cils sont disposés le long de quinze rangées longitudinales. *Uronema marinum* est muni de cils caudaux d'une longueur équivalente à celle du corps (40 µm). La cavité buccale est triangulaire, plutôt courte (1/6^{ème} de la longueur

du corps), et située au pôle apical. Elle soutient une petite membrane ondulante externe et trois membranelles au fond de la cavité. Le macronucleus est sphérique et situé près de la bouche. Un seul micronucleus est disposé près de lui. *Uronema marinum* possède une vacuole contractile à l'extrémité postérieure de la cellule.

(c) *Trichodina spp.*, *Tripartiella spp.*, *Trichodinella spp.*

Ce sont des ciliés de la famille des Urceolaridae, en forme de disque de 20 à 80 µm avec un ou deux cercles de cils et une couronne de crochets. Ces trois genres se différencient par l'organisation de leur couronne de crochets et de leur noyau. Leur cycle est très simple, sans formation kystique avec une transmission directe d'un poisson à l'autre.

Dans les conditions normales (bonne qualité de l'eau et poissons en bonne santé), les *Trichodina spp.* sont inoffensifs et se nourrissent de particules en suspension dans l'eau. N'étant que faiblement pathogènes, ce n'est que secondairement à un affaiblissement des poissons ou lors de stress (aquarium surpeuplé, hiver rigoureux, manipulations...) que des infestations massives et des troubles peuvent apparaître. Ils peuvent parasiter les poissons marins soit en tant qu'ectoparasite soit en tant qu'endoparasite (tractus urinaire, intestinal ou génital).

Photographie 11 : Morphologie de *Trichodina* en microscopie photonique (issue de Parafish <http://www.anicca.net/parafish/>).



Les poissons se frottent alors contre les supports, et plaquent leurs nageoires le long du corps. On peut observer aussi une augmentation de la sécrétion de mucus. Quand les branchies sont atteintes, l'épithélium s'hypertrophie allant jusqu'à fusionner les lamelles branchiales. Les poissons peuvent succomber de cette détresse respiratoire et métabolique.

Les *Trichodinas spp.* se rencontrent dans de larges gammes de température (de 0 à 25°C). Les trichodinoses sévissent principalement en aquaculture marine et peu en aquarium.

Le diagnostic est réalisé par l'observation microscopique d'un râclage cutané ou branchial. Cette examen ne peut être effectué que sur des poissons récemment sacrifiés car le parasite quitte rapidement l'hôte après sa mort. Les *Trichodina spp.* sont facilement identifiables par leur morphologie typique mais la détermination exacte de l'espèce est très délicate d'autant plus que l'on a identifié plus de 70 espèces marines de *Trichodina spp.*

5) Mycoses

Le diagnostic est posé suite à l'observation de filaments mycéliens en microscopie photonique, à l'état frais ou après une coloration au bleu coton-lactophénol.

(a) *Ichthyophonus spp.*

Ichthyophonus holferi est le champignon pathogène le plus commun en aquaculture marine (Noga & Dykstra, 1986). Cet Oomycète est responsable d'infections cutanées avec parfois des infiltrations musculaires voire péritonéales. La présence de ce champignon induit une forte réaction inflammatoire chronique conduisant au développement de multiples granulomes sous-cutanés ressemblant à des pustules jaunâtres.

(b) *Exophiala spp.*

Ce champignon de la classe des Hyphomycètes, appartient à la famille des Deutéromycètes. Il fut isolé chez différents poissons d'eau douce et de mer : le saumon (Richards, Holliman & Helgason, 1978), le poisson-chat (Fijan, 1969), et infecte probablement d'autres espèces.

Dans les élevages atteints, les poissons deviennent léthargiques puis des nodules dermiques non-ulcératifs apparaissent à la surface du corps. Au niveau des viscères, on peut observer des adhérences entre les organes.

VII. METHODES DE LUTTE

Les méthodes de lutte contre la cryptocaryose peuvent être préventives (la prophylaxie) ou curatives (la thérapeutique).

A. THERAPEUTIQUE

Quand la cryptocaryose est identifiée dans un élevage ou un aquarium, le nombre de poissons morts est souvent déjà important. Comme pour de nombreuses maladies parasitaires, un traitement ciblé, précoce et adapté au type d'élevage, est capital. On n'utilisera pas les mêmes outils thérapeutiques que l'on veuille traiter une aquaculture marine (milieu ouvert) ou un aquarium (milieu fermé). Le vétérinaire aquacole dispose de plusieurs outils pour traiter une épidémie de cryptocaryose :

- Des méthodes de lutte biologique, qui permettent de diminuer la recontamination ;
- Des méthodes de lutte physique, qui permettent de détruire les parasites par la température, l'osmolarité ou les ultraviolets ;
- Des méthodes de lutte chimique : la chimiothérapie.

Les méthodes de lutte biologique et physique ne sont adaptées qu'aux aquariums marins, milieu fermé dont on maîtrise parfaitement l'environnement. Ces trois moyens de lutte peuvent s'utiliser en association pour potentialiser l'efficacité du traitement.

En aquaculture marine, la nature de ce type d'élevage, à savoir un milieu ouvert, rend la maîtrise de l'environnement quasiment impossible. Le vétérinaire ne disposera donc que de la chimiothérapie pour faire face à une épidémie de cryptocaryose.

1) Méthodes biologiques

(a) Récolte des thérontes

Comme les thérontes sont des formes libres nageantes, tout changement massif de l'eau d'un aquarium contaminé réduit temporairement leur charge. Cette opération doit être réalisée de préférence au petit matin pour récolter le maximum d'éléments infestants (thérontes), mais

il est inefficace pour éliminer la source de thérontes que représentent les tomontes (fortement fixés au substrat).

(b) Piégeage des tomontes

D'après Colorni (1987), l'élimination des tomontes enkystés peut être rendue possible par le dépôt de sable fin au fond de l'aquarium. Les tomontes se collent au sable et on les siphonne au moins quatre fois à trois jours d'intervalle. Cette manipulation est bien plus efficace que la précédente, puisqu'un tomonte peut produire plusieurs centaines de tomites.

(c) Méthode par transfert

Il suffit de disposer de deux bassins de quarantaine : on place les poissons malades dans un de ces bassins pendant deux jours. Les trophontes mûrs se détachent du poisson et commencent à se diviser. On transfère alors les poissons dans le second bassin exempt de parasite, tandis qu'on vidange et nettoie le premier, suivi d'un assec. On renouvelle cette procédure jusqu'à ce que tous les trophontes aient quitté leur hôte. La durée du traitement est fonction de la température.

2) Méthodes physiques

(a) Modification de la température

Un abaissement de la température de l'eau en dessous de 19°C permet de ralentir le cycle pour les souches classiques de *Cryptocaryon*. Inversement une augmentation de la température ralentit le cycle de développement des souches d'eau froide (Diamant *et al.*, 1991).

(b) Modification de la salinité

La modification temporaire de la salinité est une méthode alternative pour traiter les poissons euryhalins atteints de cryptocaryose (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1979a et Colorni, 1985). Cette méthode est très adaptée aux poissons destinés à la consommation humaine puisqu'elle ne fait pas intervenir de médicaments et donc de résidus.

(i) Hyposalinité

Une baisse de la salinité est défavorable au parasite quel que soit son stade de développement (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1979b). La cytolyse des tomites se produit à des salinités inférieures à 16 ppt.

Le traitement consiste à abaisser la salinité à 10 ‰ pendant trois heures, et ce quatre fois à trois jours d'intervalle. L'E.A.F.P. (European Association of Fish Pathologists) préconise une salinité de 8 ppt pendant quelques heures à répéter tous les trois jours. Il est très important de surveiller les poissons pendant ces traitements, parce qu'ils subissent un déséquilibre osmotique fort, même si en pratique les *Cryptocaryon* sont plus sensibles à l'hyposalinité que les poissons.

(ii) Hypersalinité

Huff & Burns (1981) ont utilisé l'hypersalinité lors d'une épidémie de *Cryptocaryon* chez *Lutjanus campechanus* dans une ferme marine de Floride. L'augmentation de la sécrétion de mucus est un mécanisme de défense lors d'ectoparasitose, mais cette barrière biologique diminue l'efficacité de la chimiothérapie. L'hypersalinité a pour principal objectif d'éliminer cet excès de mucus avant tout traitement chimique. Les deux jours suivants l'exposition à une salinité de 45 ‰ pendant 20 minutes, Huff & Burns (1981) appliquent une chimiothérapie classique à base de quinine.

Tableau VII : Effet de l'hypersalinité chez *Lutjanus campechanus* atteint de cryptocaryose (D'après Huff & Burns, 1981).

Salinité	Durée	Action sur le mucus	Action sur les parasites	Effet sur les poissons
60 ‰	5 min	Disparition	Osmolyse totale des tomites	Mortalité totale
55 ‰	20 min	Diminution	Trophontes inactifs ou morts	Stress modéré
50 ‰	20 min	Diminution	Trophontes inactifs ou morts	Stress modéré
45 ‰	20 min	Diminution	Trophontes inactifs ou morts	Stress modéré
40 ‰	20 min	Diminution	Quelques trophontes affectés	Stress modéré

(c) Irradiation par les ultraviolets

Gratzek *et al.* (1983) placent les poissons dans une caisse à fond perforé, suspendue dans le bassin de quarantaine. Il équipe le bassin d'un filtre d'une capacité suffisante et d'une

pompe puissante aspirant l'eau dans le bassin, et la renvoyant dans la caisse suspendue après passage sur une lampe UV. Il est important que le débit de la pompe soit suffisant pour entraîner les trophontes libérés à travers la grille, et empêcher les thérontes de pénétrer. La durée du traitement est fonction de la température.

3) Méthodes chimiques

Les trophontes ou trophozoïtes (formes fixées) ne sont pas affectés par les divers traitements anti-parasitaires, et ce, à cause de leur localisation intra épidermique (Post & Vesely, 1983). Cependant, toujours selon Post & Vesely (1983), une partie des trophontes serait quand même atteinte par les traitements lors d'infestation massives.

Contrairement aux traitements en eau douce, la plupart des agents chimiques ne pénètrent pas suffisamment à travers la peau pour être actifs (Herwig, 1978). En effet, en eau douce, les molécules sont absorbées à l'intérieur du poisson par la force osmotique.

Les kystes étant très résistants, aucun traitement ne peut les affecter. Par conséquent, seuls les thérontes (formes nageantes, libres, infestantes) seront sensibles aux agents thérapeutiques. De plus les thérontes ont une durée de vie très brève. Le stade théronie est donc le stade le plus vulnérable de la cryptocaryose.

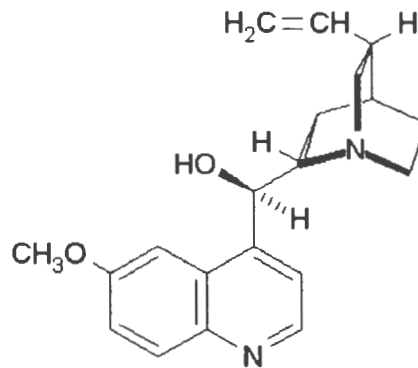
Le principe actif doit être en quantité suffisante pour les tuer avant qu'ils ne se fixent sur leur hôte. Un traitement d'une durée minimum de cinq à dix jours sera nécessaire, pour attendre que tous les kystes aient libéré leurs tomites (Herwig, 1978). Il sera donc important de ne pas arrêter le traitement une fois la disparition totale des symptômes si l'on veut éviter les récurrences. En général la dose toxique pour le poisson est atteinte avant que le parasite ne soit affecté. Le problème est que de nombreux médicaments sont absorbés par le substrat ou rapidement inactivés, ce qui diminue d'autant la concentration présente dans l'aquarium.

Les traitements restent toutefois coûteux et sont responsables d'un stress important. Pour améliorer l'efficacité des traitements et diminuer les coûts, on peut utiliser la découverte de Yoshinaga & Dickerson (1994) : un traitement sera plus efficace s'il est administré au petit matin (période d'émergence des thérontes).

(a) Quinine

La quinine est extraite de l'écorce du quinquina. Les dérivés de quinine sont nombreux et très efficaces dans le traitement de la cryptocaryose.

Croquis 7 : Structure chimique de la quinine.



La quinine se complexe avec les nucléoprotéines (ADN) des protozoaires, inhibant ainsi l'action de l'ADN polymérase. Ceci entraînant une inhibition de la biosynthèse d'ADN et d'ARN, par impossibilité d'incorporation de l'acide phosphorique. De nombreuses enzymes de la respiration et de la glycolyse seraient ainsi bloquées, conduisant à la mort du parasite.

Les traitements à base de dérivés de quinine sont les molécules les plus efficaces, pour traiter la cryptocaryose, mais aussi parmi les plus onéreuses. Il faut donc limiter au maximum le volume d'eau à traiter. Ces molécules sont donc intéressantes à utiliser en aquarium. De plus, il semblerait qu'elles ne détruisent pas les filtres biologiques.

Cependant, les quinine ont des indices thérapeutiques faibles, et des effets secondaires peuvent se déclarer, voire même des cas d'intoxication médicamenteuse. Dans ce cas là, il est urgent de renouveler l'eau. Les premiers signes d'intoxication sont une perte d'équilibre, une augmentation de la fréquence respiratoire et une perte d'appétit.

Quatre dérivés de la quinine sont utilisables pour traiter les poissons atteints de cryptocaryose : le dichlorhydrate de mépacrine, le diphosphate de chloroquine, le diphosphate de primaquine et l'hydrochlorure de quinine :

1. Dichlorhydrate de mépacrine :

Il s'agit chimiquement du Chloro-6-(diéthylamino-4-méthyl-1-butyl) amino-9-méthoxy-2-acridine dichlorhydrate. On l'utilise en bain, à raison de 1 à 1,5 mg par litre d'eau à traiter. Répéter le traitement à la même posologie deux jours plus tard.

2. Diphosphate de chloroquine :

Il s'agit chimiquement du 7-Chloro-4-(4-diéthyl-amino-1-méthylbutylamino) quinoline diorthophosphate, phosphate de chloroquine. On l'utilise en bain, à raison de 10,5 mg par litre d'eau à traiter.

3. Diphosphate de primaquine :

Il s'agit chimiquement du 8-(4-amino-1-méthylbutylamino)-6-méthoxyquinoline diphosphate, (amino-4 méthyl-1butylamino)-8 méthoxy-6 quinoléine. On l'utilise en bain, à raison de 4 mg par litre d'eau à traiter.

4. Hydrochlorure de quinine :

Il s'agit chimiquement du méthoxy-6 quinolyl-4)(vinyl-5 quinuclidinyl-2)méthanol dichlorhydrate. On l'utilise en bain, à raison de 1 à 1,5 mg par litre d'eau à traiter. Répéter le traitement à la même posologie deux jours plus tard. L'hydrochlorure de quinine est plus soluble dans l'eau de mer que le sulfate de quinine, et légèrement plus efficace dans une gamme de pH plus large.

Selon Schmahl, Schmidt & Ritter (1996), l'emploi de quinine incorporée à l'aliment est efficace pour traiter l'Ichthyophthiriose. Après deux à quatre jours d'utilisation d'aliments médicamenteux, contenant cinq grammes de quinine non hydrosoluble par kilogramme d'aliment, le principe actif se retrouve au niveau de la peau des poissons. Dès le neuvième jour, on peut détecter les premiers effets létaux chez les trophontes d'*Ichthyophthirius multifiliis*. Même après douze semaines d'ingestion de ce type d'aliment, aucun effet toxique chez les poissons traités n'a été observé.

(b) Vert de malachite (oxalate)

Aussi appelé China green ou Victoria green, c'est un produit utilisé depuis de nombreuses années en aquaculture d'eau douce et marine. Ce colorant dérivé du triphénylméthane est actif action les protozoaires, mais aussi contre les bactéries Gram positives.

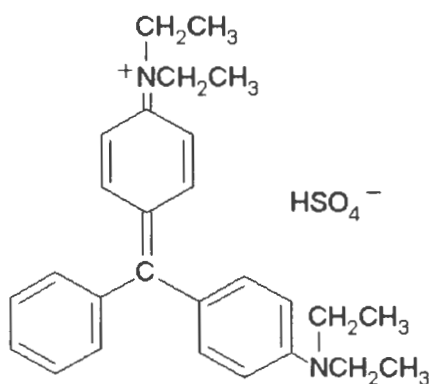
Il est classiquement utilisé en bains, à la dose de 0,05 mg à 0,15 mg par litre d'eau à traiter. En présence d'invertébrés marins, il ne faut pas dépasser la dose de 0,05 mg par litre. Compte tenu de l'inactivation rapide du produit, il est conseillé d'effectuer trois traitements à jours alternés. Mais son intérêt réside dans l'association synergique avec le formaldéhyde : 0.1 ppm de vert de malachite pour 50 ppm de formol. Il est important de choisir une bonne qualité du vert de malachite exempte de zinc.

D'après Schmahl *et al.* (1992a), onze jours d'ingestion d'un aliment médicamenteux, contenant du vert de malachite non hydrosoluble, sont nécessaires pour venir à bout de l'Ichthyophthiriose. La dose contenue dans l'aliment n'est pas précisée. Dès le quatrième jour, les premiers trophontes meurent. De plus, aucun effet secondaire ne survient chez les poissons traités pendant deux mois.

Deux problèmes majeurs se posent avec l'emploi du vert de malachite :

1. Tout d'abord, il s'agit d'un produit toxique pour les poissons. Il faut donc surveiller tout signe évoquant une intoxication ;
2. Mais surtout, son utilisation est de plus en plus décriée, à cause de la nature cancérigène des résidus dans les chairs de poissons destinés à la consommation humaine. A l'heure actuelle, aucune limite maximale de résidus (LMR) n'a pu être déterminée, ce qui a eu pour conséquence son interdiction dans de nombreux pays européens.

Croquis 8 : Structure chimique du Vert de Malachite.



(c) Autres principes actifs

Il existe de nombreux autres traitements thérapeutiques plus ou moins efficaces contre les thérontes de *Cryptocaryon irritans*. Ils sont répertoriés dans le tableau VIII.

Principes actifs	Posologie et précautions d'emploi
<p>Chlorure d'acriflavine $C_{14}H_{14}ClN_3 + C_{14}H_{14}N$ Mélange sensiblement équimolaire d'acridine et de proflavine</p>	<p>3 à 10 ppm. en bains prolongés. La dose est progressivement ajoutée sur 24 heures. Après 3 ou 4 jours, filtrer sur charbon actif jusqu'à perte de la fluorescence verdâtre. Si le traitement dépasse une semaine il y a risque de stérilité et d'altération du mucus de la peau et des branchies. L'acriflavine fragilise la barrière cutanée et rend les poissons plus vulnérables à une infection bactérienne. Eviter tout contact avec la peau car irritant et mutagène possible.</p>
<p>Bleu de méthylène $(C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O)$ Bis-(diméthylamino)-3,7 phenazathionium chlorure</p>	<p>3 mL de cette solution mère à 1 % pour 10 L d'eau d'aquarium. Le bain doit être prolongé. Dans le cas où la teinte bleutée s'estompe rapidement, il faut rajouter un peu de produit. Les coraux absorbent ce colorant plus ou moins irréversiblement. Il est donc conseillé d'administrer le bleu de méthylène dans un bac vide. Selon (Post and Vesely 1983), en eau douce, le bleu de méthylène ne pénètre que superficiellement dans le mucus cutané. Précaution : garder la solution mère dans l'obscurité.</p>
<p>Formol (CH_2O)</p>	<p>0,5 mL de formol à 37 % ou 40 % pour 10 L d'eau à traiter. Le formol se solubilise très lentement en milieu salé, il est donc conseillé soit d'effectuer des dilutions préalables soit de bien brasser le bac de traitement. Un précipité blanc est souvent présent sur les bouteilles anciennes. Il s'agit de paraformaldéhyde, très toxique pour les poissons. Ce précipité ne doit surtout pas se retrouver dans le bac de quarantaine. Traiter de préférence dans un bac nu (sans décors). Attention, le formol peut contenir de petites quantités d'alcool méthylique et d'acide formique, et le contact avec la peau peut provoquer une dermatose allergique chez l'homme.</p>
<p>Permanganate de potassium $(KMNO_4)$</p>	<p>On peut utiliser deux types de traitements : En bains de 10 à 45 secondes dans une solution à 1000 ppm. En ajoutant une solution à 0,2 % de permanganate de potassium à raison de 1 cm³ pour 20 L d'eau de l'aquarium.</p>
<p>Sulfate de cuivre ou de zinc $(Cu-SO_4$ ou $Zn-SO_4)$</p>	<p>Attention, est proscrit en présence d'invertébrés marins. (Herwig 1978) préconise 0,15 à 0,25 ppm pendant 30 jours. (Brugerolles 1992) utilise 1 mL pour 4 litres d'une solution mère contenant 4 g de sulfate de cuivre et 0,25 g d'acide citrique cristallisé dans 1 L d'eau distillée. Le sulfate de cuivre est progressivement inactivé par le carbonate de calcium présent dans l'eau (Nigrelli and Ruggieri 1966). La présence d'acide citrique par son action chélatrice, permet de prolonger le maintien du cuivre en solution avant qu'il ne finisse par précipiter sous forme de $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2 \cdot H_2O$. La forme chélatée du cuivre est beaucoup moins efficace que l'ion libre. Nigrelli & Ruggieri 1966 utilisent donc un mélange de 0,42 ppm d'acétate de cuivre $(Cu(CH_3COO)_2)$, 5,26 ppm de formol et 4,8 ppm de Tampon Tris.</p>
<p>Dimétrizole $(C_5H_7N_3O_2)$</p>	<p>5 mg/L en bains continus ou 40 mg/L pendant 48 h. Conservation à 4°C.</p>
<p>Pyriméthamine $(C_{12}H_{13}ClN_4)$</p>	<p>Deviens dangereux à partir de 1-2 mg / L. Attention très toxique. A conserver à 20°C</p>
<p>Métronidazole $(C_6H_9N_3O_3)$</p>	<p>7 mg/L en bains continus. Ce produit dispose d'un large intervalle thérapeutique. A conserver entre 2 et 8°C.</p>
<p>Sulfathiazole $(C_9H_9N_3O_2S_2)$</p>	<p>65 mg/L pour tuer les tomites. Produit irritant et sensibilisant.</p>
<p>2 amino 5 nitrothiazole $(C_3H_3N_3O_2S)$</p>	<p>D'après les études in vitro de (Post and Vesely 1983) le 2amino 5nitrothiazole serait létal pour les trophozoïtes.</p>

Tableau VIII : Présentation des différents traitements chimiques contre la cryptocaryose (d'après Herwig (1978), modifié et complété).

B. PROPHYLAXIE

Le parasitisme est fréquent, sinon constant en élevage, mais les maladies parasitaires ne s'extériorisent que lorsque sont réunis :

- La présence du parasite ;
- Des conditions environnementales favorables à sa prolifération ;
- Un hôte fragilisé.

En agissant sur ces trois facteurs, on peut ainsi limiter l'apparition de la cryptocaryose.

1) Sanitaire

La prophylaxie sanitaire n'est pas infaillible, mais elle permet de réduire le risque d'épidémie. Tout organisme introduit dans un aquarium ou un élevage est susceptible d'être porteur de *Cryptocaryon irritans*. Il faut noter que les végétaux peuvent aussi être vecteurs passifs de kystes. Donc avant toute nouvelle introduction de poissons il est impératif de leur faire subir une quarantaine, période durant laquelle ils seront observés scrupuleusement afin de déceler tout signe de maladie. Auquel cas, cette quarantaine devra être complétée par une chimiothérapie adaptée et maintenue jusqu'à négativation des prélèvements. Une fois les poissons introduits dans les bassins d'élevage ou un aquarium, la limitation du stress diminue le risque de multiplication des parasites. Il est nécessaire à ce titre de pratiquer des sédations correctes lors de tout transfert.

Suite à un épisode de cryptocaryose, il faudrait réaliser un vide sanitaire (mise à sec) avec augmentation de la température, sur plusieurs jours. Remplacer toutes les masses filtrantes et le sable qui peuvent contenir des kystes.

2) Médicale : la vaccination

La vaccination semble être une alternative plus économique que le traitement thérapeutique (Dickerson *et al.*, 1984). Elle permet de renforcer les défenses naturelles des poissons, afin de lutter contre *Cryptocaryon irritans*. De plus, le coût, les rejets et les résidus des molécules chimiques employées, s'en trouvent fortement diminués.

Mais l'incapacité de culture *in vitro* du parasite est un frein à l'obtention de quantités suffisantes d'antigènes (cils) en vue de la réalisation d'un vaccin homologue (Dickerson *et al.*, 1984).

Face au fort développement de l'aquaculture marine, la nécessité d'un vaccin contre la cryptocaryose semble primordiale. Malheureusement à ce jour, peu d'essais ont été entrepris à part un programme américain (cf. Programme Grant n°93-04027 en annexe) de 1993 soutenu par une subvention de 50000 \$ US. Ce projet dirigé par Eric R. James, de l'Université de Caroline du Sud, a pour but de mettre au point un vaccin applicable dans des conditions d'élevage intensif. A ce jour, ce programme a été stoppé sans donner de résultats.

**ESSAIS DE VACCINATION
HETEROLOGUE CONTRE
CRYPTOCARYON IRRITANS
AVEC *TETRAHYMENA*
*PYRIFORMIS***

I. INTRODUCTION

Ichthyophthirius multifiliis s'est rapidement imposé comme modèle d'étude de l'immunité induite par les Ciliophora. Le gouvernement américain s'est engagé dans plusieurs programmes ambitieux, pour la mise au point d'un vaccin contre *Ichthyophthirius multifiliis* (cf. annexe Programmes Grant « Molecular approaches toward the control of *Ichthyophthirius multifiliis* infection », « Can a DNA vaccine induce cutaneous immunity in Fish »). Les premiers résultats publiés semblent très prometteurs.

Au vu des avancées scientifiques dans la réalisation d'un vaccin contre l'ichthyophthiriose, et face au manque d'études sur la cryptocaryose, il apparaît important d'entreprendre des essais de vaccination en eau de mer. En se basant sur les connaissances acquises de l'immunité induite par les Ciliophora d'eau douce et de la communauté antigénique des Ichthyophthiridae, on peut penser qu'une vaccination hétérologue contre la cryptocaryose est envisageable. En effet, à ce jour, aucun essai publié de ce genre n'a été entrepris bien qu'un programme de recherche américain (cf. annexe V) de 1993 portait précisément sur ce thème.

Dickerson *et al.* (1984) et Goven, Dawe & Gratzek (1981b) ont utilisé avec succès *Tetrahymena pyriformis* pour vacciner des poissons d'eau douce contre l'ichthyophthiriose. Mais cette communauté antigénique ne se limite pas à ces deux germes et englobe bon nombre d'autres ectoparasitoses comme *Oodinium pillularis*, *Ichthyobodo necatrix*, *Chilodonella cyprini* et *Trichodina sp.* (Wolf & Markiw, 1982 et Ling, Sin & Lam, 1993). A la lumière de ces résultats et de la proximité phylogénique entre *Ichthyophthirius multifiliis* et *Cryptocaryon irritans*, il semble évident que *Tetrahymena pyriformis* peut être un bon candidat pour nos essais en eau de mer. De plus il ne nécessite pas de passage obligatoire sur un hôte, ce qui le rend facilement cultivable *in vitro*.

Comme *Tetrahymena pyriformis* ne survit pas en milieu marin, nous ne pouvons l'administrer que par injection ou par voie orale. Dans nos essais, seule la voie injectable intrapéritonéale sera explorée.

Nous utiliserons comme hôte des black mollies acclimatés à l'eau de mer. L'intérêt majeur d'utiliser ces poissons d'eau douce dans une étude sur l'immunité est essentiellement dû à sa naïveté certaine face à *Cryptocaryon irritans*. Une partie du stock sera destinée à la multiplication de *Cryptocaryon irritans*, et l'autre aux essais de vaccination.

II. MATERIEL ET METHODES

A. POECILIA SPHENOPS

1) Présentation

Poecilia sphenops Valenciennes, 1846 communément appelé black molly est un poisson tropical ornemental, vivant principalement en eau douce et parfois en eau saumâtre. Ce Cyprinodontidé de la famille des Poeciliidae est originaire de l'Amérique centrale jusqu'au nord de l'Amérique du sud (Mexique, Colombie, Vénézuéla). La forme sauvage est très colorée et ressemble au guppy *Poecilia reticulata*. Les mâles peuvent mesurer jusqu'à 6 cm et les femelles 10 cm. Le maintien de cette espèce en aquarium nécessite une gamme de pH entre 7,5 et 8,2, une dureté entre 11,0 et 30,0°dH et une température entre 19 et 28°C. Dans le milieu naturel, le régime alimentaire de *Poecilia sphenops* est constitué de vers, de petits crustacés, d'insectes et de matière végétale. En aquarium, ce poisson se nourrit d'algues et accepte les aliments secs industriels. On regroupe souvent à tort sous le terme de black mollies *Poecilia latipinna* aussi appelé molly lune noire.

Photographies 12 : *Poecilia sphenops*, à gauche la forme sauvage et à droite la forme d'élevage communément appelée black molly (<http://www.fishbase.org>).



Sa première importation en Europe remonte à 1809 par Umlauff à Hambourg. La variété d'élevage noire est apparue en 1909, puis après sa production dans les aquacultures sud-américaines et asiatiques, cette espèce est devenue très populaire auprès des aquariophiles.

De plus, c'est une espèce ovovivipare qui est très prolifique en aquarium. Après 28 jours de gestation, une femelle peut donner naissance à 20 à 150 alevins. Actuellement, il est très facile de s'en procurer chez des particuliers.

C'est le cas pour une partie du stock que nous utiliserons ; les alevins sont nés au club aquariophile de l'école nationale vétérinaire de Toulouse. Ils n'ont jamais exprimé une quelconque parasitose clinique. Ce lot de poissons est issu du même couple parental et il est assez homogène en taille (de 4 à 5 cm). Ces black mollies seront utilisés pour les essais de vaccination.

Un second lot de poissons sera constitué. Ils serviront d'hôtes pour la multiplication *in vivo* de *Cryptocaryon irritans*. Ces poissons ont été achetés dans le commerce aquariophile.

2) Adaptation à l'eau de mer

Selon les études de Yoshinaga & Dickerson (1994), les black mollies adaptés à l'eau de mer semblent être un bon moyen pour cultiver des *Cryptocaryon irritans*.

Les black mollies ont besoin de quatre jours d'acclimatation par palier, pour survivre en eau de mer. Les différentes étapes de salinité utilisées correspondent aux ratios suivants :

- 1 : 3 / Une part d'eau de mer (à 30 ‰) pour trois parts d'eau douce ;
- 2 : 2 / Deux parts d'eau de mer (à 30 ‰) pour trois parts d'eau douce ;
- 3 : 1 / Trois parts d'eau de mer (à 30 ‰) pour un part d'eau douce.

Ils sont maintenus dans deux aquariums de 120 L. Nous utiliserons du sel marin synthétique (Instant Ocean ®).

Quotidiennement on procède à des analyses de la qualité de l'eau : température, salinité (par mesure de la densité), pH et composés de dégradation (par test colorimétriques). Les poissons sont nourris avec le même aliment sec (flocons de marque Tetra ®).

Dès que l'on doit manipuler des poissons, on les tranquillise par balnéation dans une solution de phénoxy-2-éthanol à la dose de 2 mL pour 10 L d'eau.

B. TETRAHYMENA PYRIFORMIS SOUCHE GL

1) Présentation

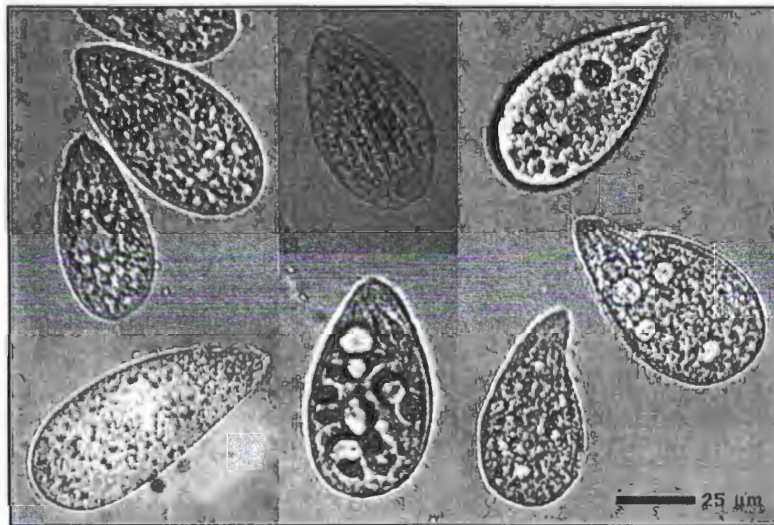
Les protozoaires du genre *Tetrahymena* appartiennent à la famille des Tetrahymenidae comme *Cryptocaryon*. Cependant, peu d'espèces de ce genre sont pathogènes. On peut citer à ce titre *Tetrahymena corlissi* pathogène d'eau douce (Hoffman *et al.*, 1975). Quant à

Tetrahymena pyriformis, il peut exceptionnellement parasiter les poissons d'eau douce, mais toujours de manière opportuniste.

Tetrahymena pyriformis est un protozoaire cilié libre, facilement cultivable *in vitro*. *Glaucoma pyriformis* ou *Tetrahymena geleii* en sont des synonymes.

En 1940, Furgason a isolé un type particulier de *Tetrahymena pyriformis* dépourvu de micronoyau. Cet état du génome supprime toute possibilité de conjugaison. Cette souche très particulière de *Tetrahymena pyriformis* (appelée GL), est maintenue depuis plus de 60 ans, sans modification du phénotype (Nilsson, 2000). Cette stabilité génomique en fait un très bon candidat pour une procédure standardisée de vaccination hétérologue contre la cryptocaryose.

Photographie 13 : Différents clichés de *Tetrahymena pyriformis* en microscopie photonique (<http://www.nies.go.jp>).



Nous utiliserons une souche de *Tetrahymena pyriformis* GL, issue du Laboratoire de Biologie des Protistes de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand.

2) Culture axénique in vitro

Compte tenu de son statut de parasite facultatif, *Tetrahymena pyriformis* peut être cultivé *in vitro* sur milieu enrichi et axénique, et maintenu dans de l'eau douce entre 20-28°C à un pH compris en 7,2 et 7,4 (Elliot, 1973).

Il existe de nombreux milieux de culture adaptés à *Tetrahymena pyriformis* (cf. tableau IX). Le milieu de culture que nous avons décidé de retenir est le même que celui employé par le Professeur Bernard Viguès. Il s'agit du milieu PL-Sel contenant 1 % de protéose peptone

(Difco ® Réf : 211693^α), 0,5 % d'extrait de levures (Difco ® Réf : 212740^α) et 0,5 % de chlorure de sodium (Sigma ® Réf : S-9625^β). Pour le préparer on procède ainsi :

1. Dissoudre les composantes, dans l'ordre, un à un, dans environ 80% du volume final ;
2. Aliquoter le volume requis dans des erlens ou des tubes. Boucher les erlens avec un bouchon de styromousse et recouvrir d'un papier aluminium ;
3. Stériliser 20 minutes à 120 °C ;
4. Garder à température ambiante et maintenir à l'abri de la lumière au moins 48 heures. Jeter les milieux contaminés (ils deviennent troubles) ;
5. Conserver à 4°C jusqu'à emploi ;
6. Pré-incuber les tubes une heure avant emploi à 20-25°C (température de la culture mère) ;

Remarque : une petite quantité de solide dans le milieu n'affecte pas la culture.

Pour le stock, on utilise des tubes en pyrex à bouchon de 20 mL remplis avec 6 mL de milieu de culture. Ensuite, on ensemence stérilement (au bec benzène), environ 0,5 mL d'une ancienne culture. La température de stockage est de 20-25 °C. Il faut procéder à un repiquage stérile du stock toutes les semaines voire tous les 15 jours. Mais la culture peut rester viable pendant 1 mois maximum sans repiquage. A plus de 35°C, la souche est perdue.

Pour la culture, les milieux sont répartis dans des bouteilles en pyrex d'un litre, remplies à moitié. On les ensemence avec 1 à 2 mL de culture mère de *Tetrahymena*. Puis on incube ensuite à 28°C ; à cette température, la culture est en phase exponentielle de croissance pendant 3-4 jours, ensuite la mort cellulaire commence.

Certains chercheurs complètent leurs milieux avec des additifs de culture comme la pénicilline, la streptomycine ou du fungizone (Gibco ® Réf : 15240-013). L'emploi de ces produits n'est pas nécessaire pour de petites cultures, et doit être proscrit pour la maintenance du stock. Nous avons réalisé plusieurs essais avec différents antibiotiques. Mais en général quand une culture est contaminée, il est préférable de l'exclure et d'en recommencer une nouvelle. Nous ne supplémenterons donc pas les cultures avec ce genre d'additifs.

D'autres milieux de culture sont aussi adaptés au maintien ou à la croissance de *Tetrahymena pyriformis* (cf. tableau IX). Les milieux PLG ou LLG sont des milieux riches, intéressants pour obtenir de bonnes densités cellulaires. Le milieu PLG+ est utilisé pour les études du génome de *Tetrahymena* ; les protozoaires commencent à se multiplier après

^α Produits disponibles chez BD France S.A. – Division Diagnostic – 11 rue Aristide Berges – F3880 Pont de Claix – Tel : 04.76.68.36.36 – Fax : 04.76.68.35.04

^β Sigma Aldrich – 80 rue de Luzais – BP 701 – L'Isle d'Abeau Chesnes – 38297 Saint Quentin Fallavier – Tel : 08.00.21.14.08 – Fax : 08.00.03.10.52

dilution du milieu au 1:5 avec un tampon Tris à 10 mM et pH 7,4. Le milieu 357 est un milieu pauvre adéquat pour le maintien des souches.

Tableau IX : Exemples de plusieurs milieux de culture convenant à Tetrahymena pyriformis.

Milieux	Protéose peptone	Extraits de levures	Glucose	Compléments
PL	2 %	0,25 %		Complété à l'eau distillée
PLG	2 %	0,1 %	0,2 %	Complété à l'eau distillée
PLG + pH	1 %	0,25 %	0,2 %	Complété à l'eau distillée
PLG + EDTA	1 %	0,1 %	0,2 %	0.003 g/L de EDTA Complété à l'eau distillée
PL-Sel	1 %	0,5 %		0,5 % NaCl Complété à l'eau distillée
PLG+	0,25 %	0,25 %	0,5 %	0.024 g/L de Citrate de Fer (à incorporer dans l'eau bouillante) 0.27 g/L de KH ₂ PO ₄ 0.25 g/L de MgSO ₄ -7H ₂ 0.007 g/L de CaCl ₂ Complété à l'eau distillée
357	0,5 %			0,2 g de K ₂ HPO ₄ Complété à l'eau distillée
LLG		0,25 %	1 %	1 % de lait en poudre Complété à l'eau distillée

Remarque : Les milieux cultures du tableau ci-dessus doivent être stérilisés par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C, avant d'êtreensemencés.

3) Rinçage

Il est nécessaire de rincer correctement les *Tetrahymena pyriformis* pour éliminer le milieu de culture. On récolte donc par siphonnage une culture après 3-4 jours d'incubation à 28°C, en évitant de prélever le culot, riche en débris cellulaires. Une centrifugation à 500 g pendant 5 minutes permet de rassembler les protozoaires au niveau du culot. Après les avoir récoltés par pipetage, on les dilue au 1:5 dans de l'eau distillée contenant 5 ‰ de NaCl. L'opération est répétée une seconde fois. On obtient ainsi, un résidu de protéose inférieur à 100 mg par litre de vaccin.

4) Déciliation

Les cils peuvent être séparés de la cellule par diverses techniques combinant l'application de produits divers, une agitation vigoureuse, et des centrifugations différentielles.

Child & Mazia (1956) traitent une culture de *Tetrahymena pyriformis* par l'éthanol à 40 % à -10°C, puis par la digitonine à 1%. Les cils détachés flottent librement et leurs structures sont protégées par l'adjonction d'une solution de chlorure de potassium à 0,05 M.

Puis Child (1959) supprime la digitonine ; après action de l'éthanol à 40 % à -10°C, les cellules sont centrifugées, puis placées dans un bain de KCl à 0,1 M et à pH 7, fortement agité. Les cils se détachent des cellules dont ils sont ensuite séparés par centrifugation différentielle ; un traitement par une solution de glycérol à 20% à -8°C, suivi d'une agitation à 0°C, produit le même effet. Dans les deux cas, les cinétosomes et le système fibrillaire, restent associés au corps cellulaire.

La technique de Watson & Hopkins (1962) consiste à immerger les *Tetrahymena* dans une solution contenant de l'éthanol à 10 %, de l'EDTA (acide éthylène diamine-tétra acétique). L'adjonction d'une solution de CaCl₂ à 25 mM provoque la chute spontanée des cils, sans avoir recours à une agitation mécanique. Les cils sont séparés ensuite des corps cellulaires par centrifugation différentielle à 500 g pendant 10 minutes.

Gibbons (1965b) obtient à partir de *Tetrahymena pyriformis* refroidis à 0°C, puis traités à -20°C par une solution à 60% de glycérol tamponnée à pH 8, la séparation des cils dans un état d'intégrité tel qu'ils peuvent être réactivés et effectuer de vigoureux mouvements de flexion.

Gibbons (1965a) traite des *Tetrahymena pyriformis*, obtenus à partir de 10 litres de culture, par une variante de la technique précédente : les protozoaires sont lavés à 4°C dans une solution contenant NaCl 30 mM et sucrose 0,2 M, concentrés, puis plongés dans une solution à 0°C contenant 11% d'éthanol, de l'EDTA 2,5 mM dans un tampon tris-thioglycolate 15 mM et pH=8,3. L'addition rapide, avec agitation, de 12 mL de CaCl₂ 1 M, provoque la chute des cils. Une brève centrifugation à 1000 g permet d'obtenir un culot de corps cellulaires. La centrifugation de surnageant à 1500 g pendant 20 minutes permet de rassembler les cils, qui remis en suspension dans la solution TMSK (MgSO₄ 2,5 mM, tampon tris 30 mM (pH=8,3), sucrose 0,2 M, KCl 25 mM) conservent leur forme et leur structure.

Goven, Lawe & Gratzek (1980) concentrent une culture de *Tetrahymena pyriformis* par centrifugation à 500 g pendant 10 min, puis les parasites sont lavés deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS), puis remis en suspension dans 2,5 mL de PBS et déciliés selon la méthode décrite par Rosenbaum & Carlson (1969) : un choc osmotique froid suivi d'un passage au travers d'une seringue hypodermique (18 g) ; les cellules sont concentrées par

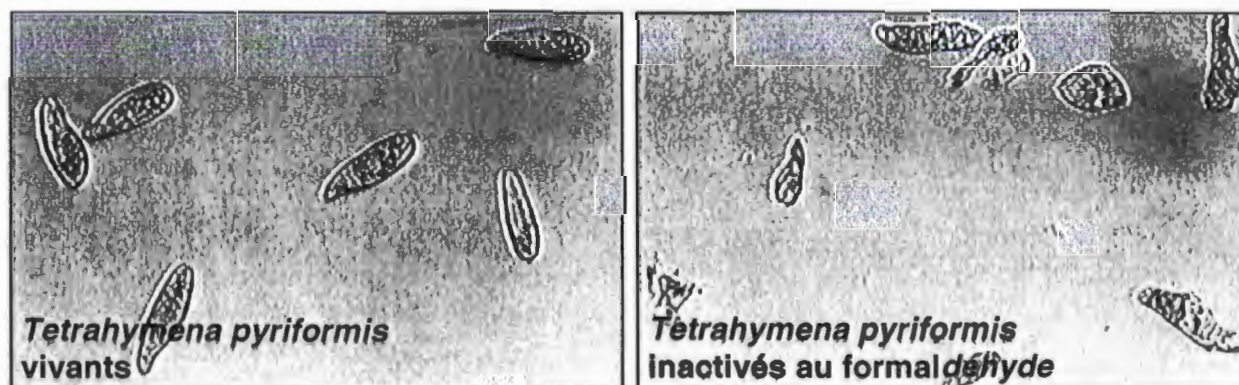
centrifugation à 500 g pendant 10 minutes. Le surnageant contient alors les cils. On les place ensuite dans un tube de dialyse et on les concentre avec du carboxyméthyl cellulose. Les cils ainsi concentrés sont remis en suspension dans du PBS et maintenus à 4°C.

Dans le cadre de nos expériences, on utilisera la technique de déciliation décrite par Gibbons (1965a), car elle préserve la structure des cils. D'après cette méthode, un litre de culture de *Tetrahymena pyriformis* permet d'obtenir 10 mg de protéines ciliaires.

5) Présentation des vaccins

Trois types de vaccins hétérologues vont être testés. Le premier est un vaccin vivant de *Tetrahymena pyriformis*, le second, un vaccin inactivé au formol, et le troisième un vaccin à base de cils.

Photographie 14 : Comparaison des vaccins à base de *Tetrahymena pyriformis* vivants et inactivés au formaldéhyde, en microscopie photonique.



Le dosage des deux vaccins complets est quantifié en microscope photonique. On récolte stérilement avec une pipette pasteur 1 mL auquel on rajoute 5 μ L de formaldéhyde 37%. Après avoir mélangé, on dénombre les protozoaires à l'aide d'une cellule de Malassay. On détermine ensuite la densité initiale par règle de trois.

Le vaccin à base de *Tetrahymena pyriformis* inactivés, est réalisé à partir du vaccin vivant auquel on ajoute, goutte à goutte, du formaldéhyde, jusqu'à la mort des protozoaires.

Pour le vaccin composé de cils de *Tetrahymena pyriformis*, son titrage est basé sur le nombre de protozoaires déciliés. On n'utilisera pas la méthode semi-quantitative colorimétrique de Bradford (1976) qui fait intervenir le bleu de Coumassie, et prend comme référence l'ovalbumine.

Le vaccin placebo sera composé d'eau distillée contenant 5 ‰ de NaCl.

C. CRYPTOCARYON IRRITANS

1) Culture in vivo

A la différence de *Tetrahymana*, les protozoaires du genre *Ichthyophthirius* et *Cryptocaryon* sont des parasites stricts ; ils nécessitent un passage sur un hôte pour boucler leur cycle biologique. La culture *in vitro* est donc beaucoup plus délicate et complexe que pour *Tetrahymana*. Eckless & Matthews (1993) et Kua (1998) ont échoué dans leurs essais de culture *in vitro* respectivement d'*Ichthyophthirius multifiliis* et de *Cryptocaryon irritans*.

En s'inspirant des travaux de Dickerson *et al.* (1984) sur *Ichthyophthirius multifiliis*, les premiers essais de transmissions expérimentales en aquarium de *Cryptocaryon irritans* sont ceux de Colomi (1985) qui a utilisé des juvéniles de *Sparus aurata* comme hôtes. Burgess & Matthews (1994) ont utilisé ce principe de passage en série mais sur le mulot gris *Chelon labrosus* : elle a permis plus de 34 passages successifs.

C'est cette méthode qui sera utilisée pour obtenir l'inoculum nécessaire à l'étape d'infestation expérimentale. La méthode de passage en série consiste à faire cohabiter dans un aquarium d'eau de mer de 120 litres, un lot de poissons infectés (diagnostiqués par la mise en évidence au microscope des parasites, sur un râclage cutané) avec un lot de poissons sains. Dès qu'un individu décède, on le remplace par un nouveau sujet sain. Les poissons sont maintenus à une température de 23-25°C afin de favoriser le développement des *Cryptocaryon*. Pour vérifier la propagation de la maladie, on effectue régulièrement des râclages cutanés. Notre culture *in vivo* de *Cryptocaryon irritans* utilisera les black mollies comme espèce hôte, achetés en animalerie (magasin « l'Amazonie » à Toulouse). La souche de *Cryptocaryon irritans* utilisée a été isolée sur un griset (*Spondyliosoma cantharus*) provenant du musée de la mer de Biarritz.

2) Récolte des parasites

Pour favoriser le détachement des trophontes mûrs, Yoshinaga & Dickerson (1994) procèdent à une augmentation de la température à 26-27°C. Le lendemain matin, les poissons sont retirés, la filtration et l'aération sont coupées pour limiter les turbulences et favoriser la sédimentation des tomites. Pour récupérer les tomites enkystés fixés au substrat, Diggle & Lester (1996b) nettoient au pinceau le fond de l'aquarium. Ensuite ils les rincent plusieurs fois avec de l'eau de mer.

Après avoir transféré les blacks mollies, nous évacuerons lentement l'eau de l'aquarium, par siphonnage par le haut, en ne laissant qu'environ 5 litres d'eau au fond. Pendant la vidange, il faut faire en sorte de ne pas agiter le fond de l'aquarium. Ensuite, on brosse au pinceau la vitre du sol, de manière à remettre en suspension les tomites enkystés, puis rapidement on récupère cette eau. L'eau récoltée contenant les tomites, est stockée à 15°C dans l'obscurité, jusqu'à l'épreuve d'infection expérimentale.

D. PROTOCOLE D'IMMUNISATION DES POISSONS

Goven, Lawe & Gratzek (1980) immunisent avec succès des poissons-chats contre l'ichthyophthiriose, avec deux injections intrapéritonéales, à deux semaines d'intervalle. Dans son essai de vaccination hétérologue contre l'ichthyophthiriose, Houghton, Healey & Matthews (1992) ont mis en évidence après une injection intrapéritonéale de *Tetrahymana pyriformis*, un pic d'anticorps décalé de six semaines. Par contre, s'ils réalisent un rappel de vaccination quatre semaines plus tard, ils observent un second pic d'anticorps situé à dix semaines, avec un titrage bien plus élevé.

Tableau X : Présentation des différents lots de back mollies et du protocole de vaccination retenu.

Expériences	Nombre d'individus	Type de vaccin	1 ^{ère} injection J0	2 ^{ème} injection J15
Témoin	10 B.mollies	Aucun	Aucune	Aucune
Placebo	30 B. mollies	NaCl 5 ‰ en IP	0,1 mL	0,1 mL
«Cils »	10 B.mollies	Cils de <i>T.pyriformis</i> en IP	Equivalent à 12000 cellules / 0,1 mL	Equivalent à 10000 cellules / 0,1 mL
« Inactivés »	10 B.mollies	<i>T.pyriformis</i> inactivés en IP	12000 cellules / 0,1 mL	10000 cellules / 0,1 mL
« Vivants »	10 B.mollies	<i>T.pyriformis</i> vivants en IP	12000 cellules / 0,1 mL	10000 cellules / 0,1 mL

Nous procéderons donc à deux injections intrapéritonéales séparées de 15 jours d'intervalle, conformément à l'expérience de Goven, Lawe & Gratzek (1980).

E. EPREUVE DE CHALLENGE

Comme le premier pic d'anticorps apparaît six semaines après l'injection de primo vaccination, nous avons choisi de procéder à l'épreuve de challenge trois semaines après l'injection de rappel. De sorte que l'arrivée des premiers anticorps, coïncide avec celle des thérontes de *Cryptocaryon irritans*.

L'infestation est standardisée : les tomontes enkystés de *Cryptocaryon irritans* sont répartis proportionnellement au nombre d'individus du lot à infester. Tous les lots, y compris les témoins, seront exposés à une dose potentiellement létale de *Cryptocaryon irritans*.

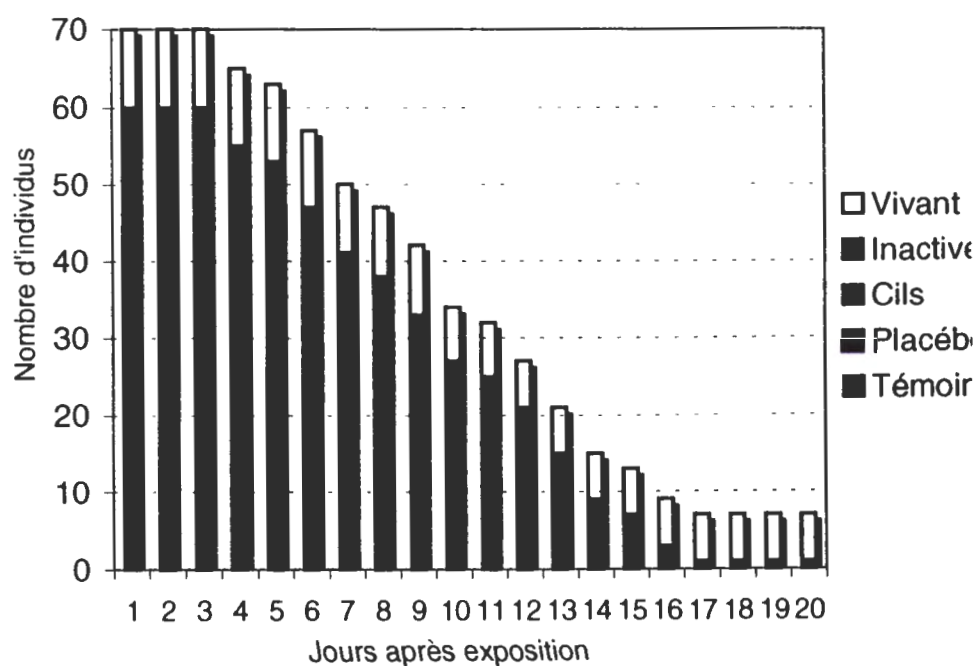
F. ANALYSES STATISTIQUES

Pour étudier la pertinence des résultats obtenus nous utiliserons les analyses statistiques du Log Rank. Le Log Rank (également appelé Peto-Peto-Wilcoxon ou Mantel-Haenzel) donne des pondérations égales à toutes les observations, il est optimal pour mettre en évidence les différences entre des courbes de survie dont les fonctions de risque sont proportionnelles.

III. RESULTATS

L'enregistrement des résultats, à savoir le dénombrement des individus morts dans chaque lot, s'est déroulé sur une période de vingt jours après l'infection expérimentale (Point de départ J_0 dans le graphique 4).

Graphique 4 : Résultats de survie suite aux expériences de vaccination hétérologue avec Tetrahymena pyriformis.



Dès le second jour de l'épreuve de challenge, les premiers signes cliniques cutanés apparaissent. Ensuite, la mortalité débute à partir du quatrième jour. Les résultats finaux des taux de mortalités des différents lots, au terme des trois semaines, sont résumés dans le tableau XI.

Tableau XI : Taux de survie des black mollies suite aux expériences de vaccination hétérologue.

Lots par type de vaccin	Nombre d'individus à J ₀	Taux de survie à J ₂₀	Intervalle de confiance (95 %)	
Témoins (non injectés)	10	0 %	0	28,59
Placebos (5‰ NaCl)	30	0 %	0	9,76
Cils de <i>T.pyriformis</i>	10	0 %	0	28,59
<i>T.pyriformis</i> inactivés	10	10 %	0	28,59
<i>T.pyriformis</i> vivants	10	60 %	29,64	90,36

Selon la nature du *Tetrahymena pyriformis* injecté, on observe des différences significatives dans la protection des poissons, suite à une exposition à une dose létale de *Cryptocaryon irritans*.

Une première injection de 12000 cellules vivantes, suivie quinze jours plus tard d'un rappel de vaccination de 10000 cellules confèrent une protection modérée mais significative de 60 % (IC_{95%} = 30-90%). Seulement 10 % (IC_{95%}= 0-28%) des individus ayant reçu le vaccin inactivé ont survécu à l'épreuve. Quant aux témoins, aux placebos et ceux ayant été vaccinés avec des cils, ils ont tous succombé en moins de 17 jours.

Le pourcentage relatif de survie (RPS) grâce à l'injection intrapéritonéale de *Tetrahymena pyriformis* vivants est de 60 %.

$$RPS = 1 - (\% \text{ mortalité du lot vacciné}) \times 100 / (\% \text{ mortalité du lot témoin})$$

La probabilité que l'efficacité des différents vaccins soit égale, n'est que de 0,92 % d'après le test du Log Rank.

IV. DISCUSSION

Les résultats obtenus pour nos essais de vaccination hétérologue sont prometteurs et proches de ceux observés lors d'autres expériences contre l'ichthyophthiriose. Mais cependant, on se doit de s'interroger pour comprendre les variations de l'immunité conférée par les différents lots expérimentés.

Concernant la voie de pénétration des antigènes, l'exposition cutanée d'une grande quantité de *Tetrahymena pyriformis* conférerait une meilleure immunité contre l'ichthyophthiriose que l'injection intrapéritonéale (Dickerson *et al.*, 1984). Il est évident qu'un vaccin par balnéation serait plus adapté à l'aquaculture ou à l'aquariologie, mais les cellules de *Tetrahymena* ne supporteraient pas la pression osmotique du milieu marin. En revanche, la voie intrapéritonéale induit une plus longue efficacité de la vaccination chez les poissons (cf. tableau XII).

Tableau XII : Comparaison de trois méthodes de vaccination chez les poissons (Vinitnantharat, Gravningen & Greger, 1999).

	Immersion	Injection	Oral
Application	Facile	Délicate	Très facile
Stress	Léger	Modéré	Aucun
Travail	Modéré	Intensif	Aucun
Efficacité	Bonne	Excellente	Passable
Durée	3-12 mois	12-24 mois	2-4 mois

De plus, il est important de savoir que l'origine des souches de *Tetrahymena pyriformis* influence l'efficacité d'une telle vaccination. En effet, Phillips (1967) a identifié plusieurs groupes sérologiques chez *Tetrahymena pyriformis*, basés sur les antigènes d'immobilisation. Dans son expérience, Dickerson *et al.* (1984) ont fait des essais de vaccination hétérologue contre l'ichthyophthiriose avec différentes souches de *Tetrahymena pyriformis*. Selon la provenance des souches, des différences significatives de protection ont été mises en évidence. De plus, il semblerait que l'expression des antigènes d'immobilisation chez *Tetrahymena* soit dépendante de la température et de l'environnement (Bannon, Perkins-Dameron & Nash-Allen, 1986).

Le choix d'une espèce d'eau douce pour des essais de vaccination contre une maladie marine constitue un biais dû à la barrière d'espèce. On ne sait pas si les mécanismes intervenus dans l'immunité des black mollies sont identiques chez des poissons marins, dans les mêmes conditions expérimentales. Mais cette espèce a été retenue parce que l'on disposait d'un lot de black mollies suffisamment important et issu, de surcroît, du même couple parental.

En effet, on sait depuis Sin, Ling & Lam (1994) qu'un transfert de l'immunité maternelle est possible et qu'il peut protéger les alevins contre l'ichthyophthiriose. Pour pouvoir s'affranchir de ce biais, il fallait absolument disposer d'un ensemble de poissons issus du même couple parental. Les lots placebos et témoins ont montré que les black mollies utilisés n'ont pas bénéficié d'un tel transfert d'immunité par leur mère.

La durée de vie des thérontes de *Cryptocaryon irritans*, est un paramètre qui influence fortement la cinétique de l'infection. Elle est inférieure à 12 heures (cf. graphique 2), quand le parasite est cultivé sur *Poecilia sphenops* (Yoshinaga & Dickerson, 1994). Quand l'hôte est un poisson marin, ce temps peut être multiplié par deux (Nigrelli & Ruggieri, 1966) voire trois (Colomi, 1985).

Les poissons Téléostéens ont comme les Vertébrés supérieurs, un système immunitaire bien développé, composé de différentes populations leucocytaires. Les lymphocytes sont les populations cellulaires prédominantes et l'existence de la dichotomie lymphocytes B(-like) et lymphocytes T(-like) est bien connue chez de nombreuses espèces d'eau douce et marines (Miller, Ryczyn *et al.*, 1994 ; Scapigliati, Mazzini *et al.*, 1995). Mais les mécanismes immunitaires induits par les ectoparasitoses ne sont que partiellement connus.

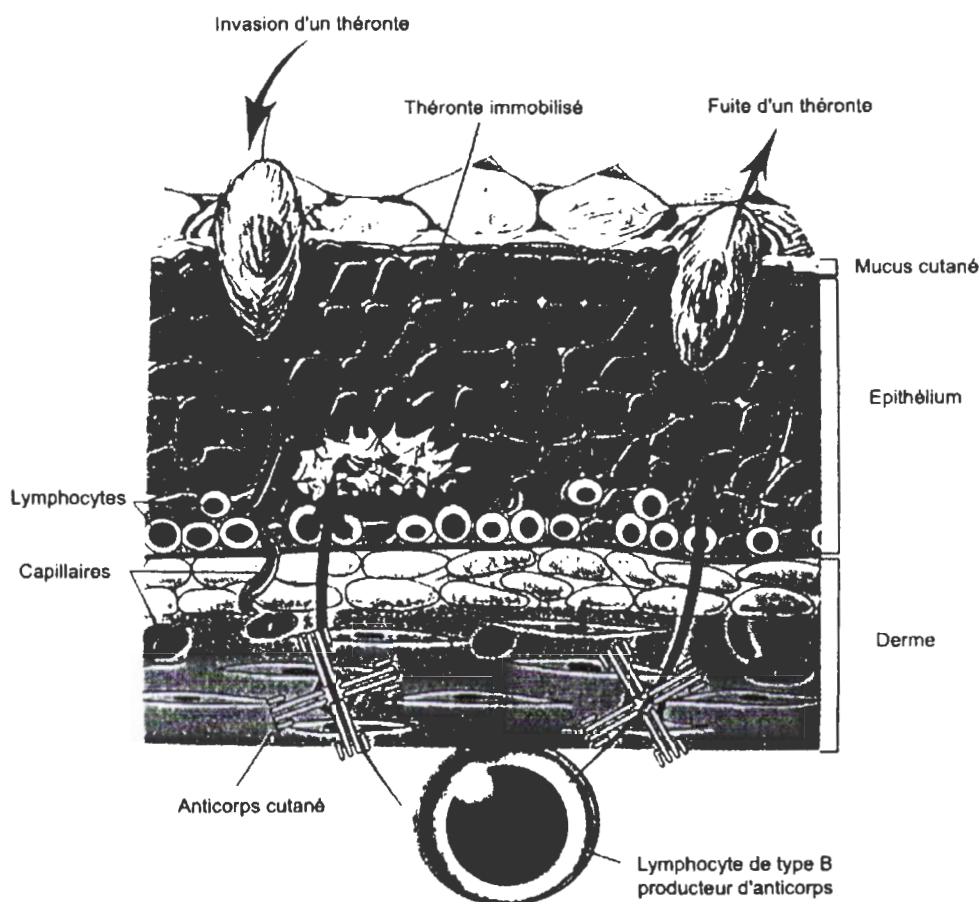
D'après Hines & Spira (1974), le sérum issu de poissons immunisés contre *Ichthyophthirius multifiliis* est capable d'immobiliser le parasite *in vitro*. Puis Goven, Dawe & Gratzek (1981a) ont prouvé que la vaccination à base de protozoaires stimule la production d'anticorps agglutinant et immobilisant qui sont ensuite sécrétés dans le mucus externe des poissons. Goven, Dawe & Gratzek (1981b) ont fini par identifier la source antigénique responsable de l'immunité chez les poissons : il s'agit des cils des protozoaires. Ces antigènes (appelés antigènes d'immobilisation ou i-antigènes) sont très abondants à la surface des protéines membranaires ciliaires d'*Ichthyophthirius multifiliis* (Dickerson, Clark & Findly, 1989). Le rôle biologique de ces i-antigènes reste encore aujourd'hui inconnu. Leur structure est très analogue à celle observée chez d'autres ciliés comme *Paramecium* ou *Tetrahymena* (Watson, Alexander & Silvester, 1964 ; Lin & Dickerson, 1992 et Clark, Lin & Dickerson, 1995). Ces protéines de membrane présentent toutes une extrémité glycosyl-phosphatidylinositol (Ko & Thompson, 1992).

On sait que pour une même espèce de Ciliophora, il existe plusieurs sérotypes d'i-antigènes. Par exemple chez *Ichthyophthirius multifiliis*, cinq sérotypes ont été isolés (notés de A à E), avec un poids moléculaire variant entre 40 et 60 kDa. *In vitro*, un sérotype d'i-

anticorps ne peut avoir de réaction croisée d'immobilisation (Dickerson, Clark & Leff, 1993). Or les résultats de la Western Blot employée par Dickerson, Clark & Leff (1993) montrent que ces antigènes d'immobilisation issus de différents sérotypes d'*Ichthyophthirius multifiliis*, partagent des déterminants antigéniques communs. Donc les anticorps d'immobilisation pourraient aussi être dirigés vers ces mêmes épitopes de ces protéines membranaires. Les essais réussis d'immunisation croisée entre souches hétérologues, chez des poissons-chats (*Ictalurus punctatus*), confirment cette hypothèse (Leff, Yoshinaga & Dickerson, 1994).

Les anticorps d'immobilisation se retrouvent au niveau du mucus des poissons, puis se fixent aux protéines de surface des Ciliophora pour provoquer l'inhibition de la motilité cellulaire (cf. croquis 9). Ling, Sin & Lam (1993) ont même observé une corrélation entre la protection et la quantité d'anticorps du mucus et du plasma. Les IgM du mucus cutané ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces de poissons (Bradshaw, Richard & Sigel, 1971).

Croquis 9 : Mécanisme d'immobilisation des thérontes au niveau cutané (Dickerson & Clark, 1998).



L'injection d'anticorps monoclonaux murins contre ces i-antigènes induit une protection passive aux poissons contre *Ichthyophthirius multifiliis* (Clark, Lin & Dickerson, 1995 ; Clark, Lin & Dickerson, 1996 et Lin, Clark & Dickerson, 1996). Inversement l'injection de ces i-antigènes à des poissons stimule la production d'anticorps d'immunisation et les

protègent (X. Wang, H.W. Dickerson, données non publiées, d'après Dickerson & Clark, 1998). Par exemple, vingt microgrammes d'immunoglobulines monoclonales de classe G de souris administrées en intrapéritonéale, suffisent à protéger fortement un poisson-chat juvénile de 10 grammes contre *Ichthyophthirius multifiliis* (Lin, Clark & Dickerson, 1996).

Mais ces mécanismes humoraux n'expliquent pas à eux seuls l'immunité conférée aux poissons. En effet, Houghton & Matthews (1990) ont mis en évidence que des carpes préalablement immunisées contre *Ichthyophthirius multifiliis* puis immunodéprimées par corticothérapie, ne survivaient pas à l'infestation bien que l'aptitude de leur sérum à immobiliser ces parasites soit encore élevée. De même, certains essais d'immunisation passive échouent : l'injection intrapéritonéale d'anticorps monoclonaux de souris de classe M (IgM) ou d'anticorps tétramériques de poissons (IgM-like) ne parviennent pas à eux seuls à immuniser les poissons, bien qu'ils immobilisent le parasite *in vitro* (Lin, Clark & Dickerson, 1996). leurs résultats laissent penser que d'autres mécanismes immunitaires non humoraux interviennent. Selon les travaux de Houghton, Healey & Matthews (1992), l'immunité acquise contre *Ichthyophthirius multifiliis* reposerait aussi sur des mécanismes cellulaires et non spécifiques. Il pourrait s'agir des cellules cytotoxiques non spécifiques (NCC) (en anglais « non-specific cytotoxic cells »). Ce sont des cellules sanguines capables de détruire *in vitro* les cellules tumorales humaines et murines. Elles sont l'équivalent des cellules NK (en anglais « natural killer ») des mammifères (Graves, Evans & Dawe, 1985a). Lors d'une infestation de *Ichthyophthirius multifiliis* chez *Ictalurus punctatus*, leur quantité augmente au niveau du sang périphérique (Graves, Evans & Dawe, 1985b). Des études *in vitro* de (Graves, Evans & Dawe, 1985a) ont démontré l'activité lytique des cellules NCC sur des *Tetrahymena pyriformis* préalablement immobilisées chimiquement ou sérologiquement.

Maki, Brown & Dickerson (2001) ont découvert fortuitement que lors d'infections massives d'*Ichthyophthirius multifiliis*, des trophontes pouvaient se localiser dans la cavité péritonéale de poissons-chats (*Ictalurus punctatus*). Cette présence inattendue du parasite près de l'intestin et des vaisseaux sanguins mésentériques, est accompagnée d'une inflammation légère, et d'une réaction immunitaire dirigée contre les i-antigènes. On peut naturellement imaginer que pour les lots ayant reçu des *Tetrahymena pyriformis* vivants, le temps de persistance a été plus élevé. Ceci expliquerait peut être les différences de protection avec les lots ayant reçu le vaccin inerte (entiers inactivés ou à base de cils). Une autre hypothèse est que la méthode de déciliation employée ou l'inactivation par le formaldéhyde aurait pu dénaturer la structure tertiaire des i-antigènes, ce qui rendrait inefficaces les anticorps produits.

Le fait que des Ciliophora ectoparasites puissent se retrouver à l'intérieur de l'organisme ouvre des perspectives intéressantes. A côté du système immunitaire systémique, et du tissu sanguin, les poissons possèdent aussi un système immunitaire associé aux muqueuses (MALT ou Mucosa Associated Lymphoid Tissue) susceptible de représenter une

masse lymphoïde très importante (Dogget & Harris 1991) en particulier au niveau de l'intestin postérieur. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin présente une diversité cellulaire au sein de la muqueuse intestinale : de nombreux leucocytes tels que les lymphocytes, les granulocytes et les macrophages y sont présents de façon diffuse (Rombout, Bot & Tavernier-Thiele, 1989). Ce système immunitaire intestinal a certainement été activé lors de nos essais de vaccination intrapéritonéale. On pourrait donc envisager des essais de vaccination contre la cryptocaryose par voie orale en utilisant soit des *Tetrahymena pyriformis* enkystés soit vivants encapsulés.

CONCLUSION

Une lutte efficace contre les pathologies infectieuses et parasitaires en élevages aquacoles ou en aquariums nécessite l'amélioration des conditions environnementales et le renforcement du potentiel immunitaire des poissons. Suite aux discussions menées à Edinburgh lors de la 8^{ème} conférence internationale de l'E.A.F.P. (European Association of Fish Pathologist), il est apparu que la mise au point de vaccins anti-protazoaires était primordiale pour l'Asie et les Etats-Unis (Schnick *et al.*, 1999).

L'objectif de cette thèse n'était pas de concevoir un vaccin commercialisable mais de démontrer que l'on pouvait utiliser une source antigénique d'eau douce comme *Tetrahymena pyriformis* pour immuniser des poissons contre *Cryptocaryon irritans*, maladie marine. Tous les travaux en cours pour l'élaboration d'un tel type de vaccin portent exclusivement sur *Ichthyophthirius multifiliis*. Il s'est imposé comme un modèle pour l'étude de l'immunité induite suite à une ectoparasitose, certainement à cause de sa relative facilité d'expérimentation en eau douce. Mais nos expériences ont confirmé celles de Yoshinaga & Dickerson (1994) sur la faisabilité de multiplication *in vivo* de *Cryptocaryon irritans* sur *Poecilia sphenops* (Black molly) acclimatés à l'eau de mer.

Les résultats obtenus dans nos essais de vaccination hétérologue contre la cryptocaryose sont prometteurs : plus de la moitié (60 %) des poissons vaccinés par voie intrapéritonéale avec des *Tetrahymena pyriformis* vivants, sont immunisés contre une infestation létale de *Cryptocaryon irritans*. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à vacciner nos black mollies, avec des *Tetrahymena pyriformis* morts (cils ou entiers).

Cependant, cette protection de 60 % n'est pas encore suffisante. L'influence de la variabilité des antigènes d'immobilisation de *Tetrahymena* (en fonction de l'environnement de culture) sur la protection des poissons, est un point qui mériterait d'être éclairci.

Les avantages de ce type de vaccination hétérologue sont nombreux ; la source d'antigènes est facilement cultivable *in vitro*, peu onéreuse, disponible rapidement en grande quantité et sans risque de contamination croisée. Cependant, compte tenu de la nécessité d'injections d'organismes vivants, ce vaccin ne peut être mis en pratique que sur de petits effectifs, et préparé à la demande. Bien qu'en règle générale les vaccins intrapéritonéaux soient plus efficaces, la facilité d'emploi et le coût de la vaccination par voie orale remportent plus de succès auprès des aquaculteurs. La perspective d'une vaccination hétérologue par voie orale semble possible d'après les observations de Maki, Brown & Dickerson (2001). Il serait donc nécessaire d'entreprendre ce genre d'études.

Un emploi systématique de ce type de vaccin, couplé à une quarantaine et un traitement préventif des nouveaux entrants permettraient de réduire considérablement l'impact de la cryptocaryose dans les aquariums publics. De même, la vaccination en aquaculture dès les stades sensibles (les juvéniles essentiellement) permettrait de diminuer les pertes dues aux mortalités ou aux retards de croissance.

En traitement préventif on peut conseiller à ce titre l'emploi de principes actifs dérivés de la quinine ou simplement une simple baisse de la salinité. Le vert de malachite donne de bons résultats, mais son emploi devrait se limiter aux aquariums. Il est très réglementé pour les aquacultures européennes et risque de ne plus être autorisé compte tenu de l'impossibilité, à l'heure actuelle, de déterminer une limite maximale de résidus.

Des méthodes de protection immunitaire non spécifique des poissons contre la cryptocaryose sont à l'étude. C'est le cas par exemple de l'administration de lactoferrines bovines (Kakuka & Kurokura, 1995 ; Yamauchi *et al.*, 1998) : ce sont des glycoprotéines fixant le fer, qui agissent en diminuant la biodisponibilité de cet élément pour les bactéries et les parasites.

Comme les gènes codant les i-antigènes (protéines des membranes ciliaires avec une extrémité glycosyl-phosphatidylinositol) sont d'ores et déjà connus et isolés (Clark *et al.*, 2001). Ils sont le principal sujet d'étude de travaux récents et à venir. Ils seront sans nul doute, le support du développement de futurs vaccins biotechnologiques. Un certain nombre d'approches vaccinales sont envisagées :

- L'incorporation de ces gènes dans des vecteurs d'expression plasmidique comme *Escherichia coli* ou *Tetrahymena thermophila* pour le développement de vaccins recombinants de sous unités protéiques.
- L'immunisation génétique par l'emploi de vaccin ADN.

Des outils moléculaires (sondes oligonucléotidiques) ont déjà montré leur efficacité pour le diagnostic des différents isolats géographiques d'*Ichthyophthirius multifiliis*.

Certainement, dans un futur proche, le premier vaccin anti-*Ichthyophthirius multifiliis* sera mis sur le marché. Il sera alors important pour faciliter sa commercialisation, qu'il soit plurivalent, c'est-à-dire capable d'immuniser les poissons contre les principales ciliophoroses qui sévissent en aquaculture aussi bien d'eau douce que marine.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Aiello P. & D'Alba A. (1986)** , "Amyloodinium ocellatum infestation in yellowtail, *Seriola dumerili*, intensively reared in Sicily, Italy." *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 6 : 110-111.
2. **Bannon G.A., Perkins-Dameron R., Nash-Allen A. (1986)** , "Structure and expression of two temperature-specific surface proteins in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*." *Molecular and Cellular Biology*, 6 : 3240-3245.
3. **Bauer R. (1992)** , "Maladie des poissons d'aquarium." *Dans la collection "Les petits animaux familiers et leurs maladies"*. Editions Maloine., pp. 236.
4. **Boulanger P. (1992)** , "Contribution à l'étude de la Cryptocaryose : observation dans un élevage de dorades en bassin." *Thèse de Doctorat Vétérinaire - Université Claude Bernard - Lyon*.
5. **Bradford M. (1976)** , "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-cycle binding." *Analytical Biochemistry*, 72 : 248.
6. **Bradshaw C.M., Richard A.S. & Sigel M. (1971)** , "IgM antibodies in fish mucus." *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine*, 136 : 1122-1124.
7. **Brown E.M. (1951)** , "A new parasitic protozoan, the causal organism of a white spot disease in marine fish *Cryptocaryon irritans* gen. et sp. n." *Agenda Scientific Meetings of the Zoological, London, 1950*, 11 : 1-2.
8. **Brown E.M. (1963)** , "Studies on *Cryptocaryon irritans* Brown." *Progress of Protozoology , Proceedings of the 1st International Congress on Protozoology. Academic Press, New York*, 1 : 284-287.
9. **Brugerolles L. (1992)** , "Les poissons marins tropicaux : maintien en captivité et pathologie." *Thèse de Doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon*.
10. **Bruno D.W., Alderman D.J. & Schlotfeldt H.J. (1997)** , "What should I do ? A practical guide for the marine fish farmer." *European Association of Fish Pathologists*, pp. 64.
11. **Burgess P.J. & Matthews R.A. (1994)** , "A standardized method for the in vivo maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host." *Journal of Parasitology*, 80 (2) : 288-292.
12. **Canella M.F. (1972)** , "Ce qu'on ne connaît pas sur un holotriche ectoparasite des poissons marins, découvert par le Dr. Sikama et appelé *Cryptocaryon irritans* par Miss Brown. Contribution à la connaissance des Ciliés, VII. Annali dell'Università di Ferrara, Nuova Serie, Sez. III, Biologia Animale III. Università di Ferrara, Italy." 9 : 107-132.

13. **Canella M.F. & Rocchi-Canella I. (1976)** , "Biologie des Ophryoglenine (cilié hyménostomes histophages). *Annali dell'Università di Ferrara, Nuovo Serie, Sez.III. Università die Ferrara, Italy.*" 3 (Suppl. 2) : 1-510.
14. **Cheung P.J., Nigrelli R.F. & Ruggieri G.D. (1979a)** , "Effect of temperature, salinity and pH in endozootics of protozoan diseases in captive fishes." *Wildlife Diseases Associations Conference, Stillwater, Oklahoma.*, (Résumé).
15. **Cheung P.J., Nigrelli R.F. & Ruggieri G.D. (1979b)** , "Studies on cryptocaryoniasis in marine fish : effect of temperature and salinity on the reproductive cycle of *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951." *Journal of Fish Diseases*, 2 : 93-97.
16. **Cheung P.J., Nigrelli R.F. & Ruggieri G.D. (1980)** , "Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliate : Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes." *Journal of Fish Diseases*, 3 : 295-303.
17. **Cheung P.J., Nigrelli R.F. & Ruggieri G.D. (1981)** , "Scanning electron microscopy on *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, a parasitic ciliate in marine fish." *Journal of Aquaculture*, 2 : 70-72.
18. **Child F.M. (1959)** , "The Characterization of the cilia of *Tetrahymena pyriformis*." *Experimentale Cell Research*, 18 : 258-267.
19. **Child F.M. & Mazia D. (1956)** , "A method for the isolation of the parts of ciliates." *Experientia*, 12 : 161-165.
20. **Clark T.G., Gao Y., Gaertig J., Wang X. & Cheng G. (2001)** , "The i-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-anchored proteins." *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48 : 332-337.
21. **Clark T.G., Lin T.L. & Dickerson H.W. (1995)** , "Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* : their role in protective immunity." *Annual Review of Fish Diseases*, 5 : 113-131.
22. **Clark T.G., Lin T.L. & Dickerson H.W. (1996)** , "Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (13) : 6825-6833.
23. **Colorni A. (1985)** , "Aspect of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and the hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*." *Diseases of Aquatic Organisms*, 1 : 19-27.
24. **Colorni A. (1987)** , "Biology of *Cryptocaryon irritans* and strategies for its control." *Aquaculture*, 67 : 236-237.
25. **Colorni A. & Diamant A. (1993)** , "Ultrastructural features of *Cryptocaryon irritans* : a ciliate parasite of marine fish." *European Journal of Protistology*, 29 : 425-434.
26. **De Kinkelin P., Michel C. & Ghittino P. (1985)** , "Précis de pathologie des poissons." Paris , *Institut National de Recherche Agronomique – Office International des Epizooties*, 348 pp.

27. **Diamant A., Issar G., Colorni A. & Paperna I. (1991)** , "A pathogenic *Cryptocaryon irritans* like ciliate from the Mediterranean sea." *Bulletin European Association of Fish Pathologist*, 11 : 122-124.
28. **Dickerson H. & Clark T. (1998)** , "*Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes." *Immunological Reviews*, 166 : 377-384.
29. **Dickerson H.W., Brown J., Dawe D.L. & Gratzek J.B. (1984)** , "*Tetrahymena pyriformis* as a protective antigen against *Ichthyophthirius multifiliis* infection : comparisons between isolates and ciliary preparations." *Journal of Fish Biology*, 24 : 523-528.
30. **Dickerson H.W. & Clark T.G. (1996)** , "Immune response of fishes to ciliates." *Annual Review of Fish Diseases*, 6 : 107-120.
31. **Dickerson H.W., Clark, T.G. & Findly R.C. (1989)** , "*Ichthyophthirius multifiliis* has membrane-associated immobilization antigens." *Journal of Protozoology*, 36 (2) : 159-164.
32. **Dickerson H.W., Clark T.G. & Leff A.A. (1993)** , "Serotypic variation among isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* based on immobilization." *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40 (6) : 816-820.
33. **Diggles B.K. & Adlard R.D. (1997)** , "Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*." *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44 (1) : 25-32.
34. **Diggles B.K. & Lester R.J. (1996a)** , "Infections of *Cryptocaryon irritans* on wild fish from S-E Queensland." *Diseases of Aquatic Organisms (in press)*.
35. **Diggles B.K. & Lester R.J. (1996b)** , "Influence of temperature and host species on the development of *Cryptocaryon irritans*." *Journal of Parasitology*, 82 (1) : 45-51.
36. **Diggles B.K. & Lester R.J. (1996c)** , "Variation in the development of two isolates of *Cryptocaryon irritans*." *Journal of Parasitology*, 82 (3) : 384-391.
37. **Dogget T.A. & Harris J.E. (1991)** , "Morphology of the gut associated lymphoid tissue of *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption." *Fish and Shellfish Immunology*, 1 : 213-227.
38. **Eckless L.M. & Matthews R.A. (1993)** , "*Ichthyophthirius multifiliis* : axenic isolation and short-term maintenance in selected monophasic media." *Journal of Fish Diseases*, 16 : 437-447.
39. **Elliot, A.M. (1973)** , "*Biology of Tetrahymena*", Edité par Stroudsbert. Pennsylvania Dowden: Hutchinson & Ross.
40. **Ellis, A.E. (1988)** , "Optimizing factors for fish vaccination". In *Fish Vaccination*, Editions Ellis Academic Press, London, pp.32-46.
41. **Ewing M.S., Kocan K.M. & Ewing S.A. (1983)** , "*Ichthyophthirius multifiliis* : morphology of the cyst wall." *Transaction of the American Microscopical Society*, 102 : 122-128.

42. Ewing M.S., Kocan K.M. & Ewing S.A. (1985) , "*Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) invasion of gill epithelium." *Journal of Protozoology*, 32 : 305-310.
43. Fijan N. (1969) , "Systematic mycosis in channel catfish." *Bulletin of the Wildlife Diseases Association*, 5 : 109-110.
44. Gibbons I.R. (1965a) , "Chemical dissection of Cilia." *Archives Biologiques (Liège)*, 76 : 317-352.
45. Gibbons I.R. (1965b) , "Reactivation of glycerinated cilia from *Tetrahymena pyriformis*." *Journal of Cell Biology*, 25 : 400-402.
46. Goven B.A, Dawe D.L. & Gratzek J.B. (1981a) , "In vitro demonstration of serological cross-reactivity between *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and *Tetrahymena pyriformis* Lwoff." *Developmental and Comparative Immunology*, 5 (2) : 283-291.
47. Goven B.A, Dawe D.L. & Gratzek J.B. (1981b) , "Protection of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) by immunization with varying doses of *Tetrahymena pyriformis* (Lowff) cilia." *Aquaculture*, 23 : 269-273.
48. Goven B.A., Lawe D.L. & Gratzek J.B. (1980) , "Protection of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) by immunization." *Journal of Fish Biology*, 17 : 311-316.
49. Gratzek J.B., Gilbert J.P., Lohr A.L., Shotts E.B. & Brown J. (1983) , "Ultraviolet light control of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet in a closed fish culture recirculation system." *Journal of Fish Diseases*, 6 : 145-153.
50. Graves S.S., Evans D.L. & Dawe D.L. (1985a) , "Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*." *Journal of Immunology*, 134 (1) : 78-85.
51. Graves S.S., Evans D.L. & Dawe D.L. (1985b) , "Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*." *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 8 (1) : 43-51.
52. Gudding R., Lillehaug A. & Evensen O. (1999) , "Recent developments in fish vaccinology." *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72 (1-2) : 203-214.
53. Herwig N. (1978) , "Notes on the treatment of *Cryptocaryon*." *Drum and Croaker*, 18 : 6-12.
54. Hines R.S. & Spira D.T. (1974) , "Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.). V. Acquired immunity." *Journal of Fish Biology*, 6 : 373-378.
55. Hoffman G.L., Landolt M., Camper J.E., Coats D.W., Stookey J.L. & Burek J.D. (1975) , "A disease of freshwater fishes caused by *Tetrahymena corlissi* Thompson, 1955, and a key for identification of holotrich ciliates of freshwater fishes." *Journal of Parasitology*, 61 (2) : 217-23.

56. **Hojgaard M. (1962)** , "Experiences made in Denmark's Akvarium concerning the treatment of *Oodinium ocellatum*." *Bulletin de l'Institut Océanographique (Monaco)*, Numéro spécial 1A : 77-79.
57. **Houghton G., Healey L.J. & Matthews R.A. (1992)** , "The cellular proliferative response, humoral antibody response, and cross reactivity studies of *Tetrahymena pyriformis* with *Ichthyophthirius multifiliis* in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.)." *Developmental and Comparative Immunology*, 16 (4) : 301-312.
58. **Houghton G. & Matthews R.A. (1990)** , "Immunosuppression in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L. : the effects of the corticosteroids triamcinolone acetonide and hydrocortisone 21-hemisuccinate (cortisol) an acquired immunity and the humoral antibody response to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet." *Journal of Fish Diseases*, 13 : 269-280.
59. **Houseman J.G. (2001)** , "Animaux : structure et fonction – 23: Protozoa et Porifera" Département de Biologie – Université d'Ottawa, consulté sur Internet le 23/12/2002, http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2521/labo/Protocoles/Protozoa_and_Porifera.pdf.
60. **Huff J.A. & Burns C.D. (1981)** , "Hypersaline and chemical control of *Cryptocaryon irritans* in red snapper *Lutjanus campechanus*, monoculture." *Aquaculture*, 22 : 181-184.
61. **Jee B.Y., Kim K.H., Park S.I. & Kim Y.C. (2000)** , "A new strain of *Cryptocaryon irritans* from the cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*." *Diseases of Aquatic Organisms*, 43 (3) : 211-215.
62. **Kaige N. & Miyazaki T. (1985)** , "A histopathological study of white spot disease in Japanese flounder." *Fish Pathology*, 20 : 61-64.
63. **Kakuka I. & Kurokura H. (1995)** , "Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritans* infection of red sea bream." *Fish Pathology*, 30 : 289-290.
64. **Ko Y.G. & Thompson G.A. Jr (1992)** , "Immobilization antigens from *Tetrahymena thermophila* are glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins." *Journal of Protozoology*, 39 : 719-723.
65. **Kua B.C. (1998)** , "In-vitro cultivation of the fish protozoan parasite *Cryptocaryon irritans* ." *Université de Sains, Malaysia*.
66. **Lawler A.R. (1977)** , "The parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in marine aquaria." *Drum and Croaker*, 17 : 17-20.
67. **Leff A.A., Yoshinaga T. & Dickerson H.W. (1994)** , "Cross immunity in channel catfish against two immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*." *Journal of Fish Diseases*, 17 : 429-432.
68. **Leong T.S. (1992)** , "Diseases of brackishwater and marine fish cultured in some Asian countries." In: Shariff M., Subasinghe R.P., Arthur J.R. *Diseases in Asian Aquaculture I. Fish Health Section. Asian Fisheries Society, Manila.*, 223-236.

69. **Leong T.S. & Wong S.Y. (1990)** , "Parasites of healthy and diseased juvenile grouper (*Epinephelus malabaricus* Bloch and Schneider) and seabass (*Lates calcarifer* Bloch) in floating cages in Penang, Malaysia." *Asian Fisheries Society*, 3 : 319-327.
70. **Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. & Wallace F.G. (1980)** , "A newly revised classification of the protozoa." *Journal of Protozoology*, 27 (1) : 37-58.
71. **Li S. & Woo P.T. (1995)** , "Efficacy of a live *Cryptobia salmositica* vaccine, and the mechanism of protection in vaccinated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, against cryptobiosis." *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48 (3-4) : 343-353.
72. **Lin T.L., Clark T.G. & Dickerson H. (1996)** , "Passive immunization of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against the ciliated protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by use of murine monoclonal antibodies." *Infection and Immunity*, 64 (10) : 4085-4090.
73. **Lin T.L. & Dickerson H.W. (1992)** , "Purification and partial characterization of immobilization antigens from *Ichthyophthirius multifiliis*." *Journal of Protozoology*, 39 (4) : 457-463.
74. **Ling K.H., Sin Y.M. & Lam T.J. (1993)** , "Protection of goldfish against some common ectoparasitic protozoans using *Ichthyophthirius multifiliis* and *Tetrahymena pyriformis* for vaccination." *Aquaculture*, 116 : 303-314.
75. **Lom J. (1995)** , "Trichonidae and other ciliates." In *Woo, P. (ed.) Fish diseases and disorders, volume I, Protozoan and metazoan infections. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K., 229-262.*
76. **Lom J. & Dykova I. (1992)** , "Protozoan parasites of fishes." *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 26.
77. **Maki J.L., Brown C.C. & Dickerson H.W. (2001)** , "Occurrence of *Ichthyophthirius multifiliis* within the peritoneal cavities of infected channel catfish *Ictalurus punctatus*." *Diseases of Aquatic Organisms*, 44 (1) : 41-45.
78. **Miller N.W., Ryczyn M.A., Wilson M.R., Warr G.W., Naftel J.P. & Clem L.W. (1994)** , "Development and characterization of channel catfish long term B cell lines." *Journal of Immunology*, 152 (5) : 2180-2189.
79. **Nigrelli R.F. (1936)** , "The morphology, cytology, and life history of *Oodinium ocellatum* Brown, a dinoflagellate parasitic on marine fishes." *Zoologica*, 21 : 129-164.
80. **Nigrelli R.F, Pokorny K.S. & Ruggieri G.D. (1976)** , "Notes on *Ichthyophthirius multifiliis*, a ciliate parasitic on fresh- water fishes, with some remarks on possible physiological races and species." *Transaction of the American Microscopical Society*, 95 (4) : 607-613.

81. **Nigrelli R.F. & Ruggieri G. (1966)** , "Enzootics in the New York Aquarium caused by *Cryptocaryon irritans*, Brown, 1951 (= *Ichthyophthirius marinus*, Sikama, 1961), a histophagous ciliate in the skin, eyes and gills of marine fishes." *Zoologica New York*, 51 : 97-107.
82. **Nilsson J.R. (2000)** , "How to Explain Survival for more than 60 Years of Amicronucleate *Tetrahymena pyriformis* GL? Conflict between Morphological and Biochemical Evidence ." *Journal of Eukaryotic Microbiology, Scandinavian section society of protozoologist, 22nd Annual Meeting, 2000 (résumé)*.
83. **Noga E.J. & Dykstra M.J. (1986)** , "Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe)." *Journal of Fish Diseases*, 9 : 47-53.
84. **Noga E.J. & Levy M.G. (1995)** , "Dinoflagellida (Phylum Sarcomastigophora)." In : *Fish diseases and disorders. Volume 1 : Protozoan and Metazoan Infections. Edited by P.T.K. Woo - ix + 808 pp.*, 1-25.
85. **Paperna I. (1980)** , "*Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea : epizootiology and pathology." *Journal of Fish Diseases*, 3 : 363-372.
86. **Paperna I. & Baudin Laurencin F. (1979)** , "Parasitic infections of sea bass, *Dicentrarchus labrax* and gilt head sea bream, *Sparus aurata*, in mariculture facilities in France." *Aquaculture*, 16 : 173-175.
87. **Phillips R.B. (1967)** , "Inheritance of T serotypes in *Tetrahymena*." *Genetics*, 56 : 667-681.
88. **Post G. & Vesely K.R. (1983)** , "Administration of drugs by hyperosmotic or vaccum infiltration of surfactant immersion ineffective for control of intradermally encysted *Ichthyophthirius multifiliis*." *Progressive Fish-Culturist*, 45 : 164-166.
89. **Rasheed V.M. (1989)** , "Diseases of cultured brown-spotted grouper *Epinephelus tauvina* and silvery black porgy *Acanthopagrus cuvieri* in Kuwait." *Journal of Aquatic Animal Health*, 1 : 102-107.
90. **Reed P.A. & Francis-Floyd R.T. (1994)** , "Amyloodinium Infections of Marine Fish." *Fact Sheet VM-90, College of Veterinary Medicine, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida (URL: http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_VM004)*.
91. **Richards R.H., Holliman A. & Helgason S. (1978)** , "Naturally occurring *Exophiala salmonis* infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L)." *Journal of Fish Diseases*, 1 : 357-369.
92. **Rombout J.H.W.M., Bot H.E. & Taverne-Thiele A.J. (1989)** , "Immunological importance of the second gut segment of carpe. II. Characterization of mucosal leucocytes." *Journal of Fish Biology*, 35 : 167-178.
93. **Rosenbaum J.L. & Carlson K. (1969)** , "Cilia regeneration in *Tetrahymena* and its inhibition by colchicine." *Journal of Cell Biology*, 40 : 415-425.

94. Scapigliati G., Mazzini M., Mastrolia L., Romano N. & Abelli L. (1995) , "Production and characterisation of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Teleostea, Percichthyidae)." *Fish and Shellfish Immunology*, 5 : 393-405.
95. Schmahl G., Ruider S., Mehlhorn H., Schmidt H. & Ritter G. (1992a) , " Treatment of fish parasites. Effects of a medicated food containing malachite green on *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Hymenostomatida, Ciliophora) in ornamental fish." *Parasitology Research*, 78 (3) : 183-192.
96. Schmahl G., Schmidt H. & Ritter G. (1996) , "The control of ichthyophthiriasis by a medicated food containing quinine: efficacy tests and ultrastructure investigations." *Parasitology Research*, 82 (8) : 697-705.
97. Schnick R.A., Alderman D.J., Armstrong R., Le Gouvello R., Ishihara S., Lacierda E.C., Percival S. & Roth M. (1999) , "Worldwide Aquaculture drug and vaccine registration progress." URL: [http:// ag.ansc.purdue.edu/ aquanic /ljsa/ aquadrugs/ publications/world_drug_progress_9-20-99.htm](http://ag.ansc.purdue.edu/aquanic/ljsa/aquadrugs/publications/world_drug_progress_9-20-99.htm).
98. Sikama Y. (1937) , "Preminary report on the white spot disease in marine fishes." *Suisan Gakukai*, 7 : 149-160.
99. Sikama Y. (1961) , "On a new species of *Ichthyophthirius* found in marine fishes." *Science Report of the Yokosuka City Museum*, 6 : 66-70.
100. Sin Y.M., Ling K.H. & Lam T.J. (1994) , "Passive transfer of protective immunity against ivhthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tiliapis." *Aquaculture*, 120 : 229-237
101. Sindermann C.J. (1977) , "Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture." *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 6 .
102. Snieszko S.F. (1974) , "The effects of environmental stress on outbreaks of infections diseases of fishes." *Journal of Fish Biology*, 6 (2) : 197-208.
103. Stiles C.W. (1894) , "Reports on a parasitic protozoan observed on fish in the aquarium." *Bulletin of the United States Fisheries Commission*, 13 : 173-170.
104. Terver (1975) , "Contribution à la biologie et aux techniques des élevages en aquarium." *Thèse de Doctorat - Université de Nancy I*.
105. Vigneulle M. (1991) , "Vaccination par voie orale de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) contre la yersiniose à *Yersinia ruckeri*." *Thèse de Doctorat - Université de Bretagne Occidentale*."145 p.
106. Vinitnantharat S., Gravningen K. & Greger E. (1999) , "Fish vaccines." *Advances in Veterinary Medicine*, 41 : 539-550.
107. Wahli T. & Matthews R.A. (1999) , "Ichthyophthiriasis in carp *Cyprinus carpio*: infectivity of trophonts prematurely exiting both the immune and non-immune host." *Diseases of Aquatic Organisms*, 36 (3) : 201-7.

108. **Watson M.R., Alexander J.B. & Silvester N.R. (1964)** , "The cilia of *Tetrahymena pyriformis*. Fractionation of isolated cilia." *Experimentale Cell Research*, 33 : 112-129.
109. **Watson M.R. & Hopkins J.M. (1962)** , "Isolated cilia from *Tetrahymena pyriformis*." *Experimental Cell Research*, 28 : 280-295.
110. **Wilkie D.W. & Gordin H. (1969)** , "Outbreak of cryptocaryoniasis in marine aquaria at Scripps Institute of Oceanography." *California Fish and Game*, 55 : 227-236.
111. **Wolf K. & Markiw M.E. (1982)** , "Ichthyophthiriasis : immersion immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using *Tetrahymena thermophila* as a protective immunogen." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39 : 1722-1725.
112. **Wright A.D. & Lynn D.H. (1995)** , "Phylogeny of the fish parasite *Ichthyophthirius* and its relatives *Ophryoglena* and *Tetrahymena* (Ciliophora, Hymenostomatia) inferred from 18S ribosomal RNA sequences." *Molecular Biology and Evolution*, 12 (2) : 285-290.
113. **Yamauchi K., Wakabayashi H., Hashimoto S., Teraguchi S., Hayasawa H. & Tomita M. (1998)** , "Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers." *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 443 : 261-265.
114. **Yoshinaga T. & Dickerson H.W. (1994)** , "Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* on a saltwater-adapted *Poecilia* hybrid, the black molly." *Journal of Aquatic Animal Health*, 6 : 197-201.

ANNEXES

ANNEXE I : STATISTIQUES - KAPLAN MEYER

Lots	Event Time (T)	Cumulative Survival S(T)	Standard Error of S(T)	Lower 95% C.L. for S(T)	Upper 95% C.L. for S(T)	At Risk
Témoins	1,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin cils	1,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin inactivé	1,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin placebo	1,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	30
Vaccin vivant	1,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Témoins	2,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin cils	2,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin inactivé	2,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin placebo	2,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	30
Vaccin vivant	2,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Témoins	3,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin cils	3,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin inactivé	3,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin placebo	3,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	30
Vaccin vivant	3,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Témoins	4,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Vaccin cils	4,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Vaccin inactivé	4,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Vaccin placebo	4,0	0,9000	0,0548	0,7926	1,0000	30
Vaccin vivant	4,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Témoins	5,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Vaccin cils	5,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Vaccin inactivé	5,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Vaccin placebo	5,0	0,8667	0,0621	0,7450	0,9883	27
Vaccin vivant	5,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Témoins	6,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9
Vaccin cils	6,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Vaccin inactivé	6,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Vaccin placebo	6,0	0,7333	0,0807	0,5751	0,8916	26
Vaccin vivant	6,0	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	10
Témoins	7,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9
Vaccin cils	7,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9
Vaccin inactivé	7,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9
Vaccin placebo	7,0	0,6667	0,0861	0,4980	0,8354	22
Vaccin vivant	7,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Témoins	8,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Vaccin cils	8,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9
Vaccin inactivé	8,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Vaccin placebo	8,0	0,6333	0,0880	0,4609	0,8058	20
Vaccin vivant	8,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Témoins	9,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Vaccin cils	9,0	0,5000	0,1581	0,1901	0,8099	7
Vaccin inactivé	9,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Vaccin placebo	9,0	0,5333	0,0911	0,3548	0,7119	19
Vaccin vivant	9,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10
Témoins	10,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	6
Vaccin cils	10,0	0,5000	0,1581	0,1901	0,8099	7
Vaccin inactivé	10,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	6
Vaccin placebo	10,0	0,4667	0,0911	0,2881	0,6452	16
Vaccin vivant	10,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9

Lots	Event Time (T)	Cumulative Survival S(T)	Standard Error of S(T)	Lower 95% C.L. for S(T)	Upper 95% C.L. for S(T)	At Risk
Témoins	11,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	6
Vaccin cils	11,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	5
Vaccin inactivé	11,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	6
Vaccin placebo	11,0	0,4333	0,0905	0,2560	0,6107	14
Vaccin vivant	11,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9
Témoins	12,0	0,3000	0,1449	0,0160	0,5840	4
Vaccin cils	12,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	5
Vaccin inactivé	12,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	6
Vaccin placebo	12,0	0,3333	0,0861	0,1646	0,5020	13
Vaccin vivant	12,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	13,0	0,3000	0,1449	0,0160	0,5840	4
Vaccin cils	13,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	4
Vaccin inactivé	13,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	4
Vaccin placebo	13,0	0,2667	0,0807	0,1084	0,4249	10
Vaccin vivant	13,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	14,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	3
Vaccin cils	14,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin inactivé	14,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	4
Vaccin placebo	14,0	0,1333	0,0621	0,0117	0,2550	8
Vaccin vivant	14,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	15,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	3
Vaccin cils	15,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin inactivé	15,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin placebo	15,0	0,1000	0,0548	0,0000	0,2074	4
Vaccin vivant	15,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	16,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin cils	16,0					
Vaccin inactivé	16,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin placebo	16,0	0,0333	0,0328	0,0000	0,0976	3
Vaccin vivant	16,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	17,0					
Vaccin cils	17,0					
Vaccin inactivé	17,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin placebo	17,0					
Vaccin vivant	17,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	18,0					
Vaccin cils	18,0					
Vaccin inactivé	18,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin placebo	18,0					
Vaccin vivant	18,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	19,0					
Vaccin cils	19,0					
Vaccin inactivé	19,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2
Vaccin placebo	19,0					
Vaccin vivant	19,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7
Témoins	20,0					
Vaccin cils	20,0					
Vaccin inactivé	20,0					
Vaccin placebo	20,0					
Vaccin vivant	20,0					

ANNEXE II : STATISTIQUES – PRODUITS LIMITES

Témoins :

Event Time (T)	Cumulative Survival S(T)	Standard Error of S(T)	Lower 95% C.L. for S(T)	Upper 95% C.L. for S(T)	At Risk	Count	Total Events
4,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10	1	1
6,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9	2	3
8,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7	1	4
10,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	6	2	6
12,0	0,3000	0,1449	0,0160	0,5840	4	1	7
14,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	3	1	8
16,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2	1	9
17,0	0,0000				1	1	10

Vaccin cils:

Event Time (T)	Cumulative Survival S(T)	Standard Error of S(T)	Lower 95% C.L. for S(T)	Upper 95% C.L. for S(T)	At Risk	Count	Total Events
5,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10	1	1
7,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9	2	3
9,0	0,5000	0,1581	0,1901	0,8099	7	2	5
11,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	5	1	6
13,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	4	2	8
14,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2	1	9
16,0	0,0000				1	1	10

Vaccin inactivé:

Event Time (T)	Cumulative Survival S(T)	Standard Error of S(T)	Lower 95% C.L. for S(T)	Upper 95% C.L. for S(T)	At Risk	Count	Total Events
4,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10	1	1
7,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9	2	3
8,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7	1	4
10,0	0,4000	0,1549	0,0964	0,7036	6	2	6
13,0	0,2000	0,1265	0,0000	0,4479	4	2	8
15,0	0,1000	0,0949	0,0000	0,2859	2	1	9
20,0+					1	1	9

Vaccin vivant:

Event Time (T)	Cumulative Survival S(T)	Standard Error of S(T)	Lower 95% C.L. for S(T)	Upper 95% C.L. for S(T)	At Risk	Count	Total Events
7,0	0,9000	0,0949	0,7141	1,0000	10	1	1
10,0	0,7000	0,1449	0,4160	0,9840	9	2	3
12,0	0,6000	0,1549	0,2964	0,9036	7	1	4
20,0+					6	6	4

Vaccin placebo:

Event Time (T)	Cumulative Survival S(T)	Standard Error of S(T)	Lower 95% C.L. for S(T)	Upper 95% C.L. for S(T)	At Risk	Count	Total Events
4,0	0,9000	0,0548	0,7926	1,0000	30	3	3
5,0	0,8667	0,0621	0,7450	0,9883	27	1	4
6,0	0,7333	0,0807	0,5751	0,8916	26	4	8
7,0	0,6667	0,0861	0,4980	0,8354	22	2	10
8,0	0,6333	0,0880	0,4609	0,8058	20	1	11
9,0	0,5333	0,0911	0,3548	0,7119	19	3	14
10,0	0,4667	0,0911	0,2881	0,6452	16	2	16
11,0	0,4333	0,0905	0,2560	0,6107	14	1	17
12,0	0,3333	0,0861	0,1646	0,5020	13	3	20
13,0	0,2667	0,0807	0,1084	0,4249	10	2	22
14,0	0,1333	0,0621	0,0117	0,2550	8	4	26
15,0	0,1000	0,0548	0,0000	0,2074	4	1	27
16,0	0,0333	0,0328	0,0000	0,0976	3	2	29
17,0	0,0000				1	1	30

ANNEXE III : STATISTIQUES – TEMPS MEDIAN DE SURVIE

Lot : Témoins :

Time	Median Remaining Lifetime	Standard Error	Lower 95% C.L.	Upper 95% C.L.
1,0	9,5	0,79057	8,0	11,0
2,0	8,5	0,79057	7,0	10,0
3,0	7,5	0,79057	6,0	9,0
4,0	6,5	0,79057	5,0	8,0
5,0	5,8	0,75000	4,3	7,2
6,0	4,8	0,75000	3,3	6,2
7,0	5,5	1,32288	2,9	8,1
8,0	4,5	1,32288	1,9	7,1
9,0	5,0	1,22474	2,6	7,4
10,0	4,0	1,22474	1,6	6,4
11,0	5,0	1,00000	3,0	7,0
12,0	4,0	1,00000	2,0	6,0
13,0	3,5	0,86603	1,8	5,2
14,0	2,5	0,86603	0,8	4,2
15,0	2,0	0,70711	0,6	3,4
16,0	1,0	0,70711	0,0	2,4
17,0	0,5	0,50000	0,0	1,5
18,0				
19,0				
20,0				

Lot : Vaccin cils :

Time	Median Remaining Lifetime	Standard Error	Lower 95% C.L.	Upper 95% C.L.
1,0	10,0	1,58114	6,9	13,1
2,0	9,0	1,58114	5,9	12,1
3,0	8,0	1,58114	4,9	11,1
4,0	7,0	1,58114	3,9	10,1
5,0	6,0	1,58114	2,9	9,1
6,0	5,5	1,50000	2,6	8,4
7,0	4,5	1,50000	1,6	7,4
8,0	5,3	0,66144	4,0	6,5
9,0	4,3	0,66144	3,0	5,5
10,0	3,8	0,55902	2,7	4,8
11,0	2,8	0,55902	1,7	3,8
12,0	2,0	1,00000	0,0	4,0
13,0	1,0	1,00000	0,0	3,0
14,0	2,0	0,70711	0,6	3,4
15,0	1,5	0,50000	0,5	2,5
16,0	0,5	0,50000	0,0	1,5
17,0				
18,0				
19,0				
20,0				

Lot : Vaccin inactivé :

Time	Median Remaining Lifetime	Standard Error	Lower 95% C.L.	Upper 95% C.L.
1,0	9,5	0,79057	8,0	11,0
2,0	8,5	0,79057	7,0	10,0
3,0	7,5	0,79057	6,0	9,0
4,0	6,5	0,79057	5,0	8,0
5,0	5,8	0,75000	4,3	7,2
6,0	4,8	0,75000	3,3	6,2
7,0	3,8	0,75000	2,3	5,2
8,0	5,3	0,66144	4,0	6,5
9,0	4,5	0,61237	3,3	5,7
10,0	3,5	0,61237	2,3	4,7
11,0	4,0	1,00000	2,0	6,0
12,0	3,0	1,00000	1,0	5,0
13,0	2,0	1,00000	0,0	4,0
14,0				
15,0				
16,0				
17,0				
18,0				
19,0				
20,0				

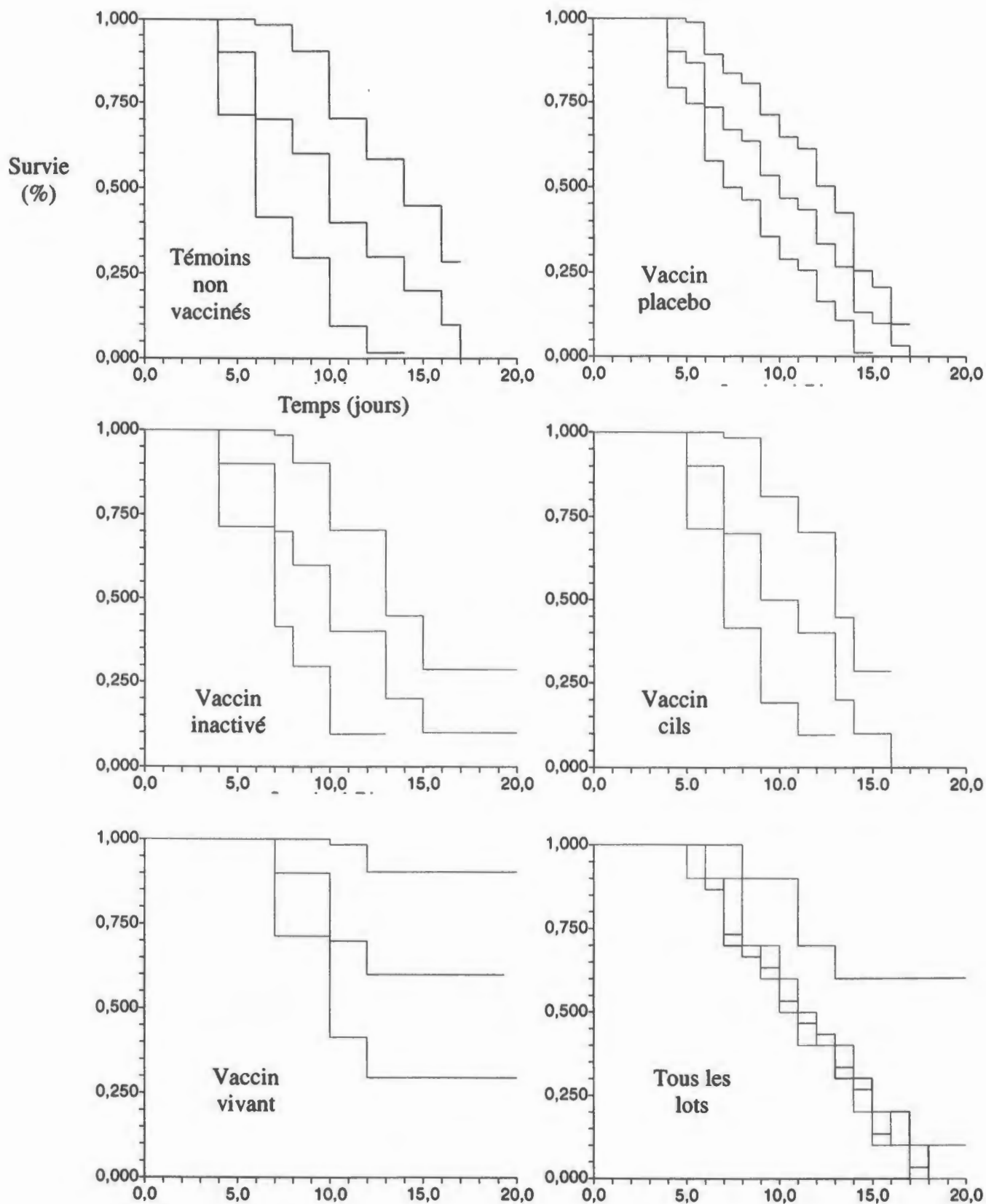
Lot : Vaccin placébo :

Time	Median Remaining Lifetime	Standard Error	Lower 95% C.L.	Upper 95% C.L.
1,0	9,5	1,36931	6,8	12,2
2,0	8,5	1,36931	5,8	11,2
3,0	7,5	1,36931	4,8	10,2
4,0	6,5	1,36931	3,8	9,2
5,0	6,5	2,59808	1,4	11,6
6,0	6,0	0,84984	4,3	7,7
7,0	5,7	0,78174	4,1	7,2
8,0	5,0	0,74536	3,5	6,5
9,0	4,3	1,08972	2,1	6,4
10,0	4,0	0,50000	3,0	5,0
11,0	3,3	0,46771	2,3	4,2
12,0	2,4	0,45069	1,5	3,3
13,0	1,8	0,39528	1,0	2,5
14,0	1,0	1,41421	0,0	3,8
15,0	1,5	0,50000	0,5	2,5
16,0	0,8	0,43301	0,0	1,6
17,0	0,5	0,50000	0,0	1,5
18,0				
19,0				
20,0				

Lot : Vaccin vivant :

Non calculable

ANNEXE IV : STATISTIQUES - COURBES DE SURVIE



ANNEXE V : PROGRAMMES GRANT (ETATS-UNIS)

I. PROGRAMME GRANT N°93-04027

“ Vaccination Against Cryptocaryon ”

Strengthening Program
Medical University of South Carolina
Eric R. James
\$50,000

Aquaculture of marine fin fish is a developing resource of significant potential for the U.S. agricultural and food industries. As with any intensive farming practices there is a constant threat from sudden outbreaks of disease. Certain parasitic diseases of marine food fish have already been shown to be devastating to fish stocks at densities well below those planned for marine fish farming. Most significant of these parasitic disease is cryptocaryoniasis, which once it becomes established in a fish population, is rapidly lethal. There is evidence that marine fish can acquire immunity to this infection under highly controlled conditions and a prototype vaccine (Schmahl et al. 1992b) has been developed to a related disease of freshwater fish. The aim of this project is to develop a vaccine against cryptocaryoniasis for use in marine fish under mariculture conditions. The study will establish cultures of the marine fish pathogen, *Cryptocaryon irritans*, identify the antigens of *C. irritans* responsible for inducing protective immunity in red drum and evaluate and compare the protection elicited by the anti-Ich vaccine. The immunological responses of red drum to vaccination will be assayed, the disease will be monitored in vaccinated fish and gains in bodyweight will be measured. Non-vaccinated fish will serve as controls. The project goal will be to demonstrate effective vaccination in stock fish principally by reduced mortality and morbidity but also by increases in body weight.

II. PROGRAMME GRANT N°95-02023

“ Molecular Approaches Toward the Control of *Ichthyophthirius* Infection ”

Dickerson, H.W.; Clark, T.G.
University of Georgia; Department of Medical Microbiology; Athens, GA 30602-7386
Grant 95-37204-2139; \$249,000; 3 Years

Ichthyophthirius multifiliis (commonly known as Ich) is a protozoan parasite of freshwater fish with major impact on commercial aquaculture worldwide. The proposed

research will build on previous work in this laboratory to develop a practical means of protecting farm-raised channel catfish against the parasite. While the disease is usually lethal, fish can acquire immunity against infection. We have identified a pair of Ich membrane proteins thought to be responsible for the development of the protective immune response. The genes which encode these proteins have been isolated and will be used for the production of a recombinant vaccine following their expression in bacteria (*E. coli*), or in the ciliated protozoan *Tetrahymena*. The expression of a parasite antigen on the surface of a non-pathogenic protozoan such as *Tetrahymena* would represent a novel approach to the development of vaccines for use in aquaculture. While directed specifically towards Ich, these studies could have wide ranging application in the prevention and control of microbial pathogens of fish in general. The principal advantages of these approaches (aside from preventing disease), would be the elimination of antibiotics and other chemicals (which lead to resistant microbial strains and contamination of surface and ground waters with potentially harmful residues).

III. PROGRAMME GRANT N°97-02646 ET N°00-02212

“Can a DNA Vaccine Induce Cutaneous Immunity in Fish “?

Clark, T.G.; Dickerson, H.W.

Cornell University; Department of Microbiology & Immunology; Ithaca, NY 14853

Grant 97-35204-4481; \$190,000; 3 Years

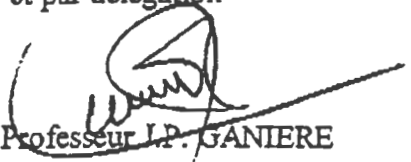
Grant 00-35204-9223; \$280,000; 3 Years

DNA vaccines have recently emerged as an important new tools in the fight against infectious disease. Such vaccines are composed of "naked" DNA which can be expressed as foreign protein following their introduction into recipient animals. In mammals, resulting immune responses have been shown to provide strong protection against a variety of microbial pathogens. Recent studies have suggested that DNA vaccines may be useful in aquaculture as well. To test this idea, attempts will be made to develop a DNA vaccine against *Ichthyophthirius multifiliis*, a protozoan parasite of freshwater fish. As the etiologic agent of "white spot", *Ichthyophthirius* has substantial impact on commercial aquaculture in this country and abroad. In addition, it provides a unique model for the study of host-parasite interactions leading to immunity in fish. We have identified antigens on the parasite surface which can elicit protective resistance against *I. multifiliis* and have cloned the genes encoding these antigens. These genes will be modified for expression in teleosts and then introduced into channel catfish as recombinant DNA vaccines. The immune response to parasite antigens will be determined by measuring the levels of serum and mucus antibodies in vaccinated fish, and the extent of protection afforded by such vaccines tested by direct parasite challenge. Aquaculture represents one of the fastest growing areas of agribusiness in the United States. Because fish raised under intensive farming conditions are highly susceptible to infectious disease, the use of DNA vaccines may prove extremely useful in boosting productivity within this arena.

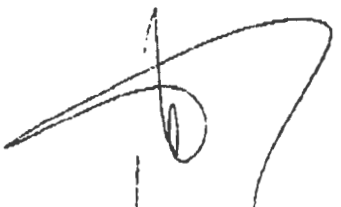
Vu : Le Professeur Rapporteur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire
de Nantes


Professeur *Blanc*

Vu : pour le Directeur de l'Ecole
Nationale Vétérinaire
de Nantes
et par délégation


Professeur I.P. GANIERE

Vu : Le Président de la Thèse


Professeur *A. Mouzard*

Vu : Le Doyen de la Faculté
de Médecine de Nantes

Professeur A. MOUZARD

Vu et permis d'imprimer

Nom : MEUNIER

Prénom : Emmanuel

Monsieur Emmanuel MEUNIER, 2002

**ETUDE DE LA CRYPTOCARYOSE (*CRYPTOCARYON IRRITANS*)
CHEZ LES POISSONS MARINS**

**ESSAIS DE VACCINATION HETEROLOGUE
AVEC *TETRAHYMENA PYRIFORMIS***

RESUME :

La cryptocaryose ou maladie des points blancs, est une ectoparasitose généralement tropicale et sub-tropicale. Elle affecte spécifiquement les poissons téléostéens marins. Cette maladie est très fréquente en aquarium, et sévit de plus en plus en aquaculture. En effet, avec la découverte de nouvelles souches d'eau froide de *Cryptocaryon irritans*, son aire de répartition ne cesse de s'étendre. Quand les conditions deviennent favorables à la multiplication du parasite, la mortalité peut être élevée. Les traitements disponibles ne sont pas toujours efficaces et cette pathologie persiste à l'état d'enzootie. Les poissons ayant survécu à l'infestation, développent une immunité forte et durable. De nombreux essais de vaccinations ont été menés avec succès chez *Ichthyophthirius multifiliis*, l'équivalent en eau douce de *Cryptocaryon irritans*.

C'est pour ces raisons que nous avons entrepris des essais de vaccination contre *Cryptocaryon irritans*. Compte tenu de son statut de parasite obligatoire, la production de grandes quantités d'antigènes est difficile. Or de nombreuses études ont montré que les Ciliophora partageaient une communauté antigénique, permettant ainsi aux poissons d'acquérir une immunité croisée. *Tetrahymena pyriformis*, protozoaire cilié opportuniste, en fait partie, et sa culture *in vitro* est simple. Il a donc servi de source d'antigènes pour nos essais de vaccination, dits hétérologues. Notre étude a montré que l'injection intrapéritonéale de *Tetrahymena pyriformis* vivants, immunise 60 % des poissons contre une infestation létale de *Cryptocaryon irritans*.

MOTS CLES :

Parasitisme - Ciliophora – *Cryptocaryon irritans* – *Tetrahymena pyriformis* - vaccination

COMPOSITION DU JURY :

Président : **Monsieur Michel MARJOLET**
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes.

Rapporteur : **Monsieur Guillaume Blanc**
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Assesneur : **Madame Monique L'HOSTIS**
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Membre invité : **Monsieur Laurent SOULIER**
Directeur scientifique du musée de la mer de Biarritz.

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Route de Lалуque
F-40990 GOURBERA