Deux épidémies de saprolégniose des poissons par *Saprolegnia ferax* (Gruith.) et par *Saprolegnia diclina* (Humphrey)

par Nicole NOLARD-TINTIGNER *

Laboratoire de Parasitologie (Directeur : P^r D^r R. VANBREUSEGHEM)
de l'Université libre de Bruxelles (Belgique)

Résumé

On attribue généralement les épidémies de mousse ou Saprolegniose des poissons à l'envahissement des tissus cutanés par un *Saprolegnia parasitica* Coker.

Au cours d'études portant sur des épidémies de mousse observées en Belgique, nous avons mis en évidence deux épidémies dues à des espèces différentes : *Saprolegnia ferax* et *Saprolegnia diclina*.

S. ferax fut isolé à plusieurs reprises lors d'une épidémie de la perche qui s'était déclarée pendant le mois de novembre 1968.

Il s'agissait d'une épidémie localisée à un seul bac dans une pisciculture.

S. diclina fut isolé en mai 1969 lors d'une épidémie du gardon généralisée à travers le pays.

Toutes les souches furent isolées sur des poissons atteints de Saprolegniose et furent également virulentes lors d'essais d'inoculations à des poissons exotiques.

Summary

All the epidemics of Saprolegniosis of fishes are generally attributed to the invasion of epidermal tissues by *Saprolegnia parasitica*.

(*) Aspirant auprès du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

We have studied some belgian epidemics, two of them are due to different species : *Saprolegnia ferax* and *Saprolegnia diclina*.

S. ferax was isolated several times during an epidemic of the perch in november 1968. It was an epidemic localized in a fisherie.

S. diclina was isolated in may 1969 during an epidemic of the roach generalized through the country.

All the samples were isolated on diseased fishes.

Infection studies using these strains of *S. ferax* and *S. diclina* demonstrated the same pathogenicity on tropical fishes.

La Saprolegniose est une mycose due à l'envahissement des tissus cutanés par des Phycomycètes de la famille des Saprolegniaceae. Elle atteint surtout les poissons.

Bien que cette maladie soit connue depuis longtemps, peu de travaux se rapportent à la nature exacte du champignon incriminé.

On attribue généralement toutes les épidémies de mousse ou Saprolegniose à l'envahissement de tissus cutanés par un *S. parasitica* Coker concluant de la lésion produite à la nature de l'espèce pathogène. Cette erreur est d'autant plus fréquente qu'on a longtemps pensé que *S. parasitica* ne formait pas d'organes de reproduction sexuée. Or, il est fréquent qu'une souche de Saprolegniaceae ne produise pas d'oogones avant plusieurs mois de culture. C'est ainsi que la plupart des épidémies observées ont été attribuées à *S. parasitica*.

On sait depuis les travaux de B. B. Kanouse (1932) que *S. parasitica* forme également des organes de reproduction sexuée.

Néanmoins, quelques études ont montré que d'autres espèces de *Saprolegnia* et même d'autres Saprolegniaceae peuvent également être pathogènes pour les poissons.

C'est ainsi que parmi les épidémies de mousse, outre *S. parasitica* l'espèce la plus fréquemment rapportée est *S. ferax* (Gruith) Thuret (Tableau 1).

Cette espèce fut isolée en 1880 par T. H. Huxley (Huxley, 1882) lors d'une épidémie mortelle des saumons des rivières anglaises. G. H. Drew l'isola en 1909 lors d'une épidémie qui frappait des truites, saumons et anguilles. W. W. Scott (1964) la découvre à plusieurs reprises sur des œufs de truites.

Ajoutons enfin que sur 122 cas de mousse de vertébrés aquatiques W. N. Tiffney (1939 a) a isolé à deux reprises *S. ferax*, une fois sur la carapace d'une tortue : *Chelydra serpentina* et une fois sur un amphibien : *Necturus maculosus*.

Saprolegnia delicata, *Saprolegnia invaderis* et *Saprolegnia mixta* n'ont été isolés chacun qu'une seule fois, *Saprolegnia monoica* à deux reprises (cfr tableau 1).

Ajoutons qu'en réalité de tous ces travaux, seuls ceux de Scott et Tiffney ont étudié les souches jusqu'à obtention d'organes de reproduction sexuée et sont donc des cas où l'espèce a été déterminée avec certitude.

Tableau 1. — Espèces de *Saprolegnia* isolées à l'état parasitaire sur des poissons

ESPÈCES	AUTEURS
<i>Saprolegnia delica</i>	W. W. Scott 1964.
<i>Saprolegnia ferax</i>	G. P. Clinton 1894 (voir Tiffney 1939 b). G. H. Drew 1909. T. H. Huxley 1882. W. W. Scott 1964.
<i>Saprolegnia invaderis</i>	H. S. Davis et E. C. Lazar 1940 (voir Scott 1964).
<i>Saprolegnia mixta</i>	G. P. Clinton 1894 (voir Tiffney 1939 b).
<i>Saprolegnia monoica</i>	W. W. Scott 1964. Walentowicz 1885 (voir Tiffney 1939 a).
<i>Saprolegnia parasitica</i>	T. Hoshina, T. Sano et M. Sunayama 1960.
(correctement identifiés) ..	W. W. Scott 1964. W. N. Tiffney 1939 a et 1939 b.

Matériel et méthodes.

Nous avons étudié une dizaine d'épidémies qui s'étaient déclarées en Belgique en 1968 et en 1969. Dans chaque cas nous avons isolé le champignon et tenté de le déterminer.

1. TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DES SOUCHES.

Un fragment de champignon est prélevé sur le poisson malade au centre de la plus grande zone recouverte par le champignon. Il est rincé dans plusieurs bains d'eau distillée stérile. Ensuite, le champignon est placé dans une boîte de Pétri renfermant 50 ml d'eau distillée stérile + 100 unités de Pénicilline et 5 demi-graines de chanvre (*Cannabis sativa*) stérilisées par ébullition pendant dix minutes dans de l'eau distillée. Ces cultures sont réalisées à la température de 18 °C environ. Après trois à quatre jours, les graines sont envahies par le champignon. Cette opération est répétée à deux reprises partant chaque fois d'une demi-graine pour en réensemencer cinq autres.

Afin d'éliminer tous les contaminants qui pourraient encore exister on applique alors la technique de l'anneau décrite par J. R. Raper en 1937. On place un anneau au centre d'une boîte de Pétri renfermant du milieu Corn meal agar Difco de telle manière que la moitié de l'anneau se trouve dans le milieu et l'autre à l'extérieur. On sème le champignon au milieu de l'anneau. Les filaments mycéliens pénètrent dans le milieu, passent sous l'anneau et vont coloniser le milieu au-delà de celui-ci. Les bactéries aérobiques restent au centre de l'anneau.

Par la combinaison de ces deux méthodes, on obtient des cultures stériles du point de vue bactérien.

Enfin, pour obtenir des cultures pures nous réalisons des cultures monosporées. Nous captions quelques spores mobiles dans une pipette et les ensemençons sur Corn meal agar. On prélève alors un fragment de la colonie issue d'une spore.

On possède ainsi une culture monosporée stérile.

2. IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON.

On se heurte toujours dans l'étude des *Saprolegniaceae* à la difficulté d'obtention d'organes de reproduction sexuée. Or, toute la classification spécifique de ces champignons repose sur l'étude de ces formes. Plusieurs auteurs (G. Murray 1885, Scott 1964, Tiffney 1939 a) ont observé que les organes de reproduction sexuée n'apparaissent souvent qu'après plusieurs mois de culture. D'autre part, la température semble jouer un rôle important dans l'apparition de ces organes. C'est pourquoi nous réalisons régulièrement des cultures à 7 °C et 20 °C de toutes les souches qui n'ont pas encore produit d'oogones. C'est ainsi que nous avons pu observer des oogones plusieurs mois après avoir isolé les souches.

Pour les déterminations nous nous sommes basé sur les travaux de W. Ch. Coker (1923) et Scott (1964).

3. INOCULATIONS EXPÉRIMENTALES.

Afin de vérifier le pouvoir pathogène des souches isolées, nous avons réalisé des inoculations expérimentales de toutes les cultures étudiées. Après anesthésie *, nous pratiquons une entaille dans la peau du poisson et décollons le derme du muscle à l'aide d'un scalpel sur une surface d'environ 3 mm². Dans cette poche nous glissons quelques filaments mycéliens. L'animal est ensuite placé dans de l'eau fraîche et observé pendant quinze jours.

Le champignon inoculé provient toujours de cultures jeunes qui sporulent abondamment.

Lors des essais d'inoculations expérimentales nous choisissons comme hôte des poissons exotiques (*Lebistes reticulatus*, *Xiphophorus helleri* et *Tilapia* sp.). Des travaux antérieurs (N. Nolard-Tintigner 1969) ont, en effet, montré que ces animaux sont plus sensibles aux inoculations expérimentales de *Saprolegnia* que les poissons des eaux tempérées.

L'utilisation de ces techniques nous a permis de déterminer que deux des épidémies étaient causées, l'une par *S. ferax* (Gruith.) Thuret et l'autre par *S. diclina* Humphrey.

* Anesthésique : solution de MS 222 à la dose de 0,01 % dans de l'eau de ville.

Epidémie à *Saprolegnia ferax* (Gruith.) Thuret.

1. EPIDÉMIOLOGIE.

Au mois de novembre 1968 s'est déclarée dans une pisciculture des environs de Wavre (Belgique) une épidémie qui frappait des perches (*Perca fluviatilis*) stockées dans un bac de stabulation. Ce bassin contenait des animaux de 8 à 12 centimètres.

Il semble que cette épidémie soit due au grand nombre d'animaux qui se trouvaient dans le bac. Les animaux se blessaient mutuellement ou aux filets destinés à leur capture, toutes les blessures constituant une voie de pénétration pour le champignon.

Nous avons observé 18 perches malades. Dans tous les cas la mousse recouvrait la région caudale, envahissant généralement la nageoire dont les rayons étaient le plus souvent détruits.

Tous les animaux touchés par la maladie moururent trois à quatre jours après l'apparition des premiers symptômes. Les lésions au moment de la mort ne dépassaient jamais le tiers de la surface de l'animal.

2. ETUDES DES SOUCHES ISOLÉES.

Les souches isolées au cours de cette épidémie, en culture sur Corn meal agar Difco ou sur graines de chanvre forment des sporanges caractérisés par la prolifération de sporanges secondaires et tertiaires dans les sporanges primaires et par la formation de sporanges latéraux à la base des sporanges primaires.

Des oogones se sont formées au cours de l'hiver 1969. Leur étude a permis de déterminer qu'il s'agissait de *S. ferax* selon la description de Coker (1923).

Les oogones sont généralement rondes et les tiges qui les supportent incurvées (Fig. I, 1 et 2).

Les proéminences de la paroi (« pits » des auteurs anglo-saxons) sont visibles bien que la paroi ait moins de 2 microns d'épaisseur (Fig. I).

On observe des anthéridies sur 5 % des oogones. Quelquefois des oospores se trouvaient dans les branches supportant l'oogone (une seule rangée de forme elliptique) (Fig. I, 3).

Les anthéridies prennent naissance sur la même branche que l'oogone.

3. INOCULATIONS EXPÉRIMENTALES DE *S. ferax*.

Nous avons testé le pouvoir pathogène d'une de ces souches que nous avons inoculée à des poissons exotiques (cf. tableau 2).

La souche de *S. ferax* isolée s'est donc montrée pathogène lors des essais d'inoculation expérimentale et les résultats obtenus correspondent à ceux que nous avons observés lors d'inoculations de diverses autres souches d'autres espèces, notamment de *S. parasitica* (Nolard-Tintigner 1969).

FIG. 1. — Oogones de *S. ferax*. 1 et 3 : Oogones sans anthéridies. 2 : Oogone immature avec anthéridie

Tableau 2

	Nombre de poissons	Infections avec mort dans les 24 heures	Infections avec mort dans les 48 heures	Aucune infection
<i>Xyphophorus helleri</i>	12	6	4	2
<i>Lebistes reticulatus</i>	11	9	—	2
<i>Tilapia</i> sp.	8	5	2	1
Total	31	20	6	6

Epidémie à *Saprolegnia diclina* Humphrey.

1. EPIDÉMIOLOGIE.

Au début du mois de mai 1969 s'est déclarée en Belgique une épidémie généralisée du gardon (*Leuciscus rutilus*).

Cette épidémie a éclaté à la suite de l'augmentation brusque de la température observée à la fin du mois d'avril 1969.

Notre attention s'est portée sur un étang des environs de Bruxelles où l'épidémie avait fait d'importants dommages dans la population de gardons : l'étang Patte-d'oie à Groenendael. C'étaient surtout les gardons de 12 à 18 centimètres qui étaient atteints. Nous en avons étudié 30. La localisation des lésions était assez différente dans chaque cas mais les flancs étaient presque toujours atteints (cf. photo 1), ainsi que l'une ou l'autre des diverses nageoires sans préférence. La zone recouverte par le champignon était profondément attaquée et dans plusieurs cas le muscle était presque complètement détruit ; les organes internes se voyaient par transparence.

PHOTO 1. — Gardon atteint de Saprolegniose à *Saprolegnia diclina*

Heureusement, cette épidémie qui a entraîné de nombreuses pertes s'est arrêtée d'elle-même vers la fin du mois de mai, peut-être à cause de la baisse de température observée à ce moment.

2. ETUDE DES SOUCHES ISOLÉES.

Les souches isolées sur les 30 animaux présentent des caractères identiques. Elles forment des sporanges emboîtés typiques du genre *Saprolegnia* ainsi que des sporanges latéraux à la base d'anciens sporanges vides.

Ces souches ont produit des oogones du genre *diclina* à la température de 7 °C en culture sur graines de chanvre en octobre 1969 soit six mois après leur isolement.

Toutes les oogones étaient entourées d'anthéridies qui, le plus souvent, n'étaient plus rattachées à des filaments mycéliens (cf. Fig. II). La paroi des oogones présentait quelques proéminences.

FIG. II. — Oogones en chaîne et anthéridies

Cette souche n'a pas, à notre connaissance, été décrite comme parasite de poissons auparavant.

D'après Coker, *S. diclina* se développe dans les ramifications des rivières et les petits cours d'eau. C'est une des espèces les plus communes aux Etats-Unis où elle a été décrite maintes fois à l'état saprophyte. Elle est également connue à l'état saprophyte en Europe.

Son pouvoir pathogène est connu sur des invertébrés. En effet, J.-A. Rioux et F. Achard en 1956 ont isolé une souche de *S. diclina* d'un élevage d'*Aedes berlandi* au stade larvaire chez lequel elle provoquait une entomomycose mortelle.

L'étude de la littérature ne nous a pas livré de traces de cette souche à l'état parasite sur des vertébrés.

3. INOCULATIONS EXPÉRIMENTALES DE *S. diclina*.

Une souche de *S. diclina* a été inoculée à des poissons exotiques pour tester son pouvoir pathogène.

Tableau 3

	Nombre total d'essais	Infection mortelle dans les 24 heures	Infection mortelle dans les 48 heures	Pas d'infection
<i>Xyphophorus helleri</i> .	6	2	4	—
<i>Lebistes reticulatus</i> .	7	7	—	—
<i>Tilapia</i> sp.	7	1	4	2
Total	20	10	8	2

Cette souche fut donc fortement virulente lors des inoculations expérimentales.

Conclusion.

La mise en évidence d'un nouveau cas de Saprolegniose à *S. ferax* et d'un premier cas à *S. diclina* nous amène à penser avec de nombreux auteurs que lorsque certaines conditions, encore mal définies, — mais qui se traduisent toutes par un affaiblissement du poisson — apparaissent, toutes les espèces de *Saprolegnia* pourraient acquérir un pouvoir parasitaire.

Une étude plus poussée des espèces ne se limitant pas à mettre l'étiquette *S. parasitica* sur tout *Saprolegnia* isolé de poissons malades, comme cela se fait trop souvent, permettrait sans doute de mettre en évidence des espèces de *Saprolegnia* qui n'ont pas été décrites à l'état parasitaire auparavant.

Bibliographie

- COKER (W. Ch.), 1923. — The *Saprolegniaceae*. Univ. of North Carolina Press.
 DREW (G. H.), 1909. — Some notes on parasitic and other diseases of Fishes. *Parasitology*, 2: 193-201.
 HOSHINA (T.) et OOKUBO (M.), 1956. — On a fungi disease of eel. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 42: 1-13.

- , SANO (T.) et SUNAMAYA (M.), 1960. — Studies on the Saprolegniosis of eel. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 47 : 59-79.
- HUXLEY (T. H.), 1882. — Saprolegnia in Relation to Salmon Disease. *Quart. J. Microscopical Sc.*, 23 : 311-333.
- KANOUSE (B. B.), 1932. — A physiological and morphological study of *Saprolegnia parasitica*. *Mycologia*, 24 : 431-452.
- MURRAY (Y. G.), 1885. — Inoculation of Fishes with *Saprolegnia ferax*. *J. Bot.*, 23 : 302.
- NOLARD-TINTIGNER (N.), 1969. — Observations récentes sur la Saprolégniose des poissons. *Bull. Soc. française Mycol. Méd.*, 17 : 29-30.
- RAPER (J. R.), 1937. — A method of freeing fungi from bacterial contamination. *Science*, 85 : 342.
- SCOTT (W. W.), 1964. — Fungi associated with Fish diseases. *Developments in Industrial microbiol.*, 5 : 109-123.
- , et WARREN (O. Ch.), 1964. — Studies of the host range and chemical control of fungi associated with diseased tropical fish. *Technical bull.*, mai, 171.
- TIFFNEY (W. N.), 1939 a. — The identity of certain species of the *Saprolegniaceae* parasitic to Fish. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 55 : 134-153.
- , 1939 b. — The host range of *Saprolegnia parasitica*. *Mycologia*, 31 (3) : 310-321.
- VISHNIAC (H. S.) et NIGRELLI (R. F.), 1957. — The ability of *Saprolegniaceae* to parasitize platyfish. *Zoologica*, 42 : 131-134.
-