OBSERVATIONS SUR *Saprolegnia australis* ELLIOTT, AGENT PATHOGENE DE LA SAPROLEGNIOSE DES POISSONS

B. TH. PAPATHEODOROU

Direction des Services Vétérinaires du département d'Achaïa,
Karolou 38, PATRAS, Grèce

RESUME

Saprolegnia australis n'a jamais été rapporté comme cause primaire de la Saprolegniose chez les poissons et son pouvoir pathogène n'a jamais été vérifié par inoculation expérimentale. Nous l'avons isolé sur des gardons (*Rutilus rutilus* L.) atteints d'une mycose et nous l'avons inoculé avec succès à des poissons exotiques. Nous avons ainsi vérifié le potentiel pathogène de cette espèce de champignon et pu établir avec certitude une causalité entre la seule présence de *S. australis* et la Saprolegniose observée.

SUMMARY

Saprolegnia australis has never been reported to be the primary cause of the saprolegniosis among fish and its pathogenic capacity has never been tested through experimental inoculation. We managed to isolate it on roaches affected with a mycosis and we successfully inoculated it on exotic fish. Consequently we checked the pathogenic potential of this species of fungoid growth and managed to establish undoubtedly a causality between the actual presence of *Saprolegnia australis* and the observed saprolegniosis.

INTRODUCTION

Dans les recherches sur la saprolegniose des poissons les premières études mycologiques apparaissent au début de notre siècle et on note, en 1923, un travail fondamental de COKER sur l'étude et la détermination des *Saprolegniaceae*. Depuis, la littérature ichthyomycopathologique ne mentionne pratiquement que le genre *Saprolegnia* dans son ensemble et, dans la plupart de ces rapports, manquent la description des espèces et la vérification du pouvoir pathogène des isolats obtenus. Cependant d'autres genres ont été rencontrés à l'état parasite sur des animaux aquatiques et divers auteurs ont mis en évidence la relation existant entre les maladies des poissons et les espèces des divers genres de champignons *Saprolegniaceae* : le genre *Achlya*, mais également les genres *Aphanomyces*, *Dichthyuchus*, *Leptomitius*, *Pythium* et *Allomyces* (TIFFNEY, 1939 ; SCOTT et O'BIER, 1962 ; SRIVASTAVA et SRIVASTAVA, 1976, 1977, 1978).

En ce qui concerne le genre *Saprolegnia*, depuis le travail de COKER et jusqu'à il y a quelques années, il y avait une forte tendance à considérer que la saprolegniose doit généralement être attribuée à *S. parasitica*. Aujourd'hui, diverses espèces du genre *Saprolegnia* ont été impliquées dans la saprolegniose naturelle et expérimentale des poissons (tableaux 1 et 2), mais *S. australis* n'a jamais été signalé comme agent pathogène unique, il a toujours été trouvé en association et par conséquent impliqué dans des atteintes par un « complexe fongique ».

Le but du présent travail a été d'une part de déterminer précisément l'espèce de champignon parasite, d'autre part de vérifier par inoculation expérimentale son pouvoir pathogène.

MATERIEL ET METHODES

Les observations se rapportent à des gardons (*Rutilus rutilus* L.) appartenant à un lot en élevage dans un bassin expérimental de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (France). Les poissons étaient touchés par la saprolegniose au niveau de la zone caudale.

— Mycologie

Les fragments de champignons prélevés sur les poissons malades sont cultivés dans l'eau distillée stérile en boîte de Petri à la température de 18°C sur graines de chanvre bouillies. Après apparition des colonies, les cultures sont ensuite purifiées par repiquages successifs et suivant la méthode de RAPER (1937) sur Corn-Meal-Agar. Enfin, pour avoir une monoculture, nous avons réalisé des cultures monosporées selon JOHNSON (1956). Pour l'identification de nos souches isolées, nous nous sommes basés sur le travail de SEYMOUR (1970).

Tableau 1 : Espèces de *Saprolegnia* connues à l'état parasite sur les poissons et leurs œufs.

(<i>S. delicata</i>) <i>S. diclina</i>	McKEY (1967), NOLARD-TINTIGNER (1970), WILLOUGHBY (1970), SRIVASTAVA et SRIVASTAVA (1979)
<i>S. ferax</i> (<i>S. mixta</i> et <i>S. monoica</i>)	WALLENTOWITZ (1885), CLINTON (1894), SCOTT et O'BIER (1962), ARASAKI (1958), NOLARD-TINTIGNER (1970)
<i>S. parasitica</i> (<i>Sensu KANOUSE</i>)	HOSHINA et al. (1960), SCOTT et O'BIER (1962), NEISH (1977), SHAH et al. (1977)
<i>S. hypogyna</i>	BOOTSMA (1973), BUCHE MAFF et al. (1979)

Tableau 2 : Espèces de *Saprolegnia* reconnues parasites lors de la saprolegniose expérimentale.

<i>S. diclina</i> (<i>S. delicata</i>)	VISHNIAC et NIGRELLI (1957), SCOTT et O'BIER (1968), NOLARD-TINTIGNER (1970, 1973)
<i>S. ferax</i> (<i>S. mixta</i> et <i>S. monoica</i>)	TIFFNEY (1939), VISHNIAC et NIGRELLI (1957), HOSHINA et al. (1960), SCOTT et O'BIER (1962), NOLARD-TINTIGNER (1970, 1973)
<i>S. parasitica</i>	HOSHINA et al. (1960), NOLARD-TINTIGNER (1973)
<i>S. megasperma</i>	VISHNIAC et NIGRELLI (1957)

Tableau 3 : Inoculation de *S. australis* à deux espèces de poissons exotiques.

Espèce et nombre de poissons		Mycose évidente après	Mort après...	Aucune infection
<i>Lebistes reticulatus</i>	2	12 h	22 h	—
"	2	12 h	36 h	—
<i>Xiphophorus helleri</i>	1	16 h	72 h	—
"	1	—	—	1

— Transmission expérimentale

Pour être certain que les souches isolées représentent l'agent étiologique de la saprolegniose et non pas un coexistant saprophytique, nous avons réalisé des essais d'inoculation expérimentale.

Les champignons utilisés proviennent toujours de cultures « bacteria free » et maintenues sur Corn-Meal-Agar. Après le transfert dans les boîtes de Petri contenant de l'eau distillée stérile ainsi que des graines de chanvre, les souches sporulant abondamment sont utilisées comme matériel d'inoculation.

Les poissons expérimentaux sont des xiphos (*Xiphosphorus helleri*) et des guppys (*Lebistes reticulatus*). Ils sont préalablement baignés avec un fongicide, de préférence le vert de Malachite. Ils sont ensuite anesthésiés par passage dans une solution de tricaïne méthanosulfate (ou MS 222) à un pour mille ou avec l'éther monophénylique de l'éthylène-glycol

à 0,3-0,5 ml/l. Les méthodes de l'inoculation par scarification ou voie intra-musculaire sont identiques à celles décrites par NOLARD-TINTIGNER (1970, 1973). Les poissons traités sont remis en stabulation dans des aquariums dont la température est de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

RESULTATS

— Mycologie

En culture sur graines de chanvre, les souches isolées forment des colonies de 2 à 3 cm de diamètre. Les filaments mycéliens sont denses avec des brindilles espacées, d'un diamètre de 15 à 40 μ , en moyenne et de 80 μ à la base.

Les chlamydospores sont abondantes, de position terminale, assez souvent latérales. Elles sont rondes ou cylindriques, très souvent irrégulières. Ces organes se transforment parfois en oogones et plus fréquemment en sporanges.

Toutes les souches produisent des sporanges en abondance à température ambiante. Les sporanges croissent par prolifération interne. Ils sont filiformes ou cylindriques. Ils sont terminaux ou latéraux et mesurent en moyenne entre 350-650 μ de long (extrêmes 150 et 1 200 μ) et 25-50 μ de diamètre (extrêmes 20 et 55 μ). La déhiscence des spores se fait par un orifice terminal et, pour les sporanges irréguliers, par un ou plusieurs orifices latéraux. Quelquefois, la germination des spores se fait dans les sporanges comme chez le genre *Aplanes*.

Ce champignon a donné des oogones après une période de quatre semaines, à température de $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Elles sont terminales ou latérales, quelquefois subterminales ou intercalaires. Plus ou moins sphériques, elles sont filiformes, fusiformes ou doliformes pour les intercalaires (Fig. 1). Quelquefois, elles se développent à la base d'un sporange vide ou d'une chlamydospore. Chez certaines souches, nous avons eu l'occasion de voir aussi des oogones avec des projections de quelques μ (1-10) qui contiennent des oospores (Fig. 2).

La paroi oogoniale, souvent irrégulière à sa surface interne, peut porter des proéminences parfois difficilement visibles. La tige qui supporte l'oogone, simple et solide, sou-

Fig. 1 : Oogones de *Saprolegnia australis*

- a) Oogone terminale, vue de dessus.
- b) Oogone latérale en formation (située dans un plan différent de celui de la photo).
- c) Oogone intercalaire.

Fig. 2 : Oogone terminale avec projection contenant une spore. On remarque les enveloppements et projections de l'antheridie.

vent longue, mesure habituellement au moins trois fois le diamètre de l'oogone. Les oospores qui remplissent d'habitude l'oogone sont sphériques et occasionnellement elliptiques. Elles varient en nombre de 15 à 20 généralement (extrêmes 1 et 40) et en taille, 21 à 27 μ de diamètre (extrêmes 10 et 30); la taille la plus fréquente est de 23 μ . Elles sont centriques ou subcentriques. L'antheridie dicline, rarement monocline, entoure souvent l'oogone et s'y applique latéralement ou avec des projections (Fig. 1-a et Fig. 2).

Cette étude des souches isolées nous a permis de déterminer qu'il s'agissait de *Saprolegnia australis* Elliot, et de lui seul.

— Transmission expérimentale

Avec une seule souche bien sporulante, nous avons inoculé 4 guppys par scarification cutanée et 2 xyphos au moyen d'une poche intramusculaire. Nous avons observé, 8 à 12 heures après inoculation, l'apparition de filaments mycéliens sur les lésions artificielles (Fig. 3). La mort des poissons infectés survient en moins de 48 heures pour les guppys et en moins de trois jours pour les xyphos.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Saprolegnia australis a été récolté à l'état saprophyte en Nouvelle-Zélande par ELLIOTT. Ce champignon n'a été signalé à l'état parasite qu'une seule fois. En effet, PICKERING et WILLOUGHBY, en 1976, isolent une souche de *S. australis* en association avec d'autres champignons et principalement avec *Leptomitius* et *Achlya* qui se développaient sur les lésions de perches malades. Ce champignon a été ainsi associé dans le « complexe fongique » des poissons, sans toutefois qu'on ait la preuve expérimentale de son pouvoir pathogène.

Après avoir isolé *S. australis* en tant que parasite unique d'une saprolegniose spontanée, nous l'avons inoculé avec succès à des poissons exotiques, ce qui a permis de vérifier le pouvoir pathogène de cette espèce de champignon. L'utilisation de spores issues de souches sporulant en cultures stériles a permis la réussite de 5 inoculations sur 6, ce qui suggère l'intérêt de déterminer la dose infestante. Lorsque l'inoculation est réussie, elle est rapidement évidente et l'infestation est très vite généralisée. En effet, l'étude histologique des poissons expérimentaux montre la présence des hyphes mycéliens dans la musculature et les organes profonds, notamment autour et dans les vaisseaux principaux (aorte et veine) (Fig. 4). Il apparaît ainsi que la mort rapide des sujets peut éventuellement survenir par thrombose occlusive.

Fig. 3 : Etat d'un sujet (*Lebistes*) portant deux touffes de filaments mycéliens (flèches) 24 heures après inoculation expérimentale.

Fig. 4 : Coupe histologique dans le corps d'un *Xiphophorus* inoculé : hyphes mycéliens (flèches) autour des vaisseaux dorsaux et dans ceux-ci.

BIBLIOGRAPHIE

- BOOTSMA R., 1973. Infection with *Saprolegnia* in pike culture (*Esox lucius* L.) *Aquaculture*, 2, 385-394.
- BUCHE-MAFF D., CANLEY-MAFF G.D., GRAIG J.F., PICKERING A.P. et WILLOUGHBY L.G., 1979. Further studies of an epizootic of perch (*Perca fluviatilis*) of incertain aetiology. *J. of Fish Diseases*, 2, 297-311.
- COKER W.C., 1923. The *Saprolegniaceae*. *University of North Carolina Press*.
- HOSHINA T., SANO T. et SYNAYAMA M., 1960. Studies on the saprolegniosis of eel. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 47, 59-79.
- HUXLEY T.H., 1882. *Saprolegnia* in relation to the Salmon disease. *Quart. J. Microscop. Sci.*, 22, 311-333.
- MURRAY G., 1885. Notes on the inoculation of fishes with *Saprolegnia ferax*. *J. Bot.*, 23, 302-308.
- NOLARD-TINTIGNER N., 1970. Deux épidémies de saprolegnirose des poissons par *Saprolegnia ferax* (Gruith) et par *Saprolegnia diclina* (Humphrey). *Ann. Pars. Hum. Comp.*, 45, 761-770.
- NOLARD-TINTIGNER N., 1973. Etude expérimentale sur l'épidémiologie et la pathogénie de la saprolegnirose chez *Lebistes reticulatus* (Peters) et *Xiphophorus helleri* (Hechel). *Acta. Zool. Path. Antwerp.*, 57, 1-127.
- PICKERING A.D. et WILLOUGHBY L.G., 1977. Epidermal lesions and fungal infection on the perch (*Perca fluviatilis* L.) in Windermere. *J. Fish. Biol.*, 11, 349-359.
- SCOTT W.N. et O'BIER A.H., 1962. Aquatic fungi associated with disease fish and fish eggs. *Prog. Fish. Cultur.*, 24 (1), 3-15.
- SCOTT W.N. et WARREN C.O. Jr., 1964. Studies of the host range and chemical control of fungi associated with diseased tropical fish. *Virg. Agr. Exp. St. Techn. Bull.*, 171, Blackburg.
- SEYMOUR R.L., 1970. The genus *Saprolegnia*. *Nova Herwigia*, XIX, 1-124. J. Cramer. Lehre.
- SRIVASTAVA R.C. et SRIVASTAVA G.C., 1978 ; Fungi associated with the diseases of freshwater fishes. *Mycopathologia*, 63 (2), 121-126.
- TIFFNEY N.N., 1939. The identity of certain species of *Saprolegniaceae* parasitic to fish. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 55, 135-151.
- VISHNIAC H.S. et NIGRELLI R.F., 1957. The ability of the *Saprolegniaceae* to parasitise platy fish. *Zoologica*, N.Y., 42, 131-134.