

Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer
Classe des Sciences Naturelles et Médicales, N.S., XIX-4, Bruxelles, 1974

Contribution
à l'étude de la Saprolegniose
des poissons en région tropicale

PAR

N. NOLARD-TINTIGNER

Docteur en Sciences
Lauréate de l'Académie

250 F

Koninklijke Academie voor Overzeese Wetenschappen
Klasse voor Natuur- en Geneeskundige Wetenschappen, N.R., XIX-4, Brussel, 1974

Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer
Classe des Sciences Naturelles et Médicales, N.S., XIX-4, Bruxelles, 1974

Contribution
à l'étude de la Saprolegniose
des poissons en région tropicale

PAR

N. NOLARD-TINTIGNER

Docteur en Sciences
Lauréate de l'Académie

Koninklijke Academie voor Overzeese Wetenschappen
Klasse voor Natuur- en Geneeskundige Wetenschappen, N.R., XIX-4, Brussel, 1974

Mémoire présenté au Concours annuel 1973
et couronné par la Classe des Sciences naturelles et médicales
en sa Séance du 26 juin 1973
Rapporteurs: MM. P. BENOIT, P. STANER et R. VANBREUSEGHEM

RESUME

La Saprolégniose est une mycose peu connue dans les régions tropicales. Nous nous sommes plus spécialement intéressés à l'incidence de cette mycose en Afrique.

Nous avons isolé 36 souches de Saprolegniaceae à partir d'échantillons d'eau zaïroise et 2 à partir d'eau indienne. Les champignons isolés sont: *A. ambisexualis*, *A. klebsiana*, *A. prolifer*, *A. racemosa*, *A. sp.*, *A. laevis*, *D. monosporus*, *D. sp.* et *S. sp.*

Douze souches ont été inoculées à des guppys (*L. reticulatus*) et à des xiphos (*X. helleri*). Une seule n'a pas infecté de poissons. Cependant, le taux d'infections mortelles obtenu est inférieur à celui que l'on observe en inoculant, dans les mêmes conditions, des *Saprolegnia* belges. Les genres tropicaux sont moins pathogènes et moins virulents que ceux des régions tempérées.

Le rôle infectant de la spore asexuée dans l'établissement du champignon sur les tissus a pu être confirmé au cours de ces inoculations.

L'étude histologique des lésions a montré que le mécanisme d'action des Saprolegniaceae étudiés ici est identique à celui des *Saprolegnia*. Le champignon provoque la nécrose de la peau, des muscles, des organes internes et de la moelle épinière. Il se développe abondamment dans les vaisseaux sanguins qu'il obstrue.

Nous avons cependant noté de plus fortes réactions de rejet des filaments.

SAMENVATTING

De Saprolegniose is een mykose die weinig gekend is in de tropische streken. Wij hebben ons meer bepaald geïnteresseerd aan de rol van deze mykose in Afrika.

Wij zonderen 36 stammen van Saprolegniaceae af, vertrekkend van stalen afkomstig van water uit Zaïre en 2 vertrekkend van water uit India. De afgezonderde zwammen zijn: *A. ambisexualis*, *A. klebsiana*, *A. prolifera*, *A. racemosa*, *A. sp.*, *A. laevis*, *D. monosporus*, *D. sp.* en *S. sp.*

Twaalf stammen werden geënt bij Guppys (*L. reticulatus*) en Xiphos (*X. helleri*). Eén enkele heeft geen vissen besmet. Nochtans is het bekomen percentage van dodelijke infecties lager dan het percentage bij het inenten, in dezelfde omstandigheden, van Belgische Saprolegnia. De tropische soorten zijn minder ziekteverwekkend en kwaadaardig dan deze van de gematigde streken.

De besmettende rol van de asexuele spore in het zich vestigen van de zwam op de weefsels, kan bevestigd worden bij de inentingen.

De histologische studie van de letsels heeft aangetoond dat het werkingsmechanisme van de hier bestudeerde Saprolegniaceae, identisch is met dat der Saprolegnia. De zwam veroorzaakt de necrose van de huid, de spieren, de inwendige organen en het ruggemerg. Hij ontwikkelt zich overvloedig in de bloedvaten die hij verstopt.

Wij hebben nochtans sterkere uitstotingsreacties van vezels vastgesteld.

Je tiens à remercier Mr le Prof. Dr. R. Vanbreuseghem qui a soutenu et encouragé mes recherches depuis plusieurs années. Je lui suis particulièrement reconnaissante d'ici d'avoir accepté à maintes reprises de s'occuper de la récolte et du transfert des échantillons d'eau du Zaïre et des Indes. Ces prélèvements sont la base même de ce travail.

Je remercie également toutes les personnes qui ont accepté de me fournir des échantillons et des renseignements sur l'incidence de la Saprologniose en Afrique et en particulier Mr le Prof. Breny qui m'a aidée à établir des contacts avec plusieurs centres africains.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du laboratoire de Parasitologie de l'U.L.B.; leur aide me fut précieuse.

INTRODUCTION ET BUTS DU TRAVAIL

La « mousse » ou Saprolegniose des poissons, est une mycose due à l'envahissement des tissus par des Phycomycètes Oomycètes de la famille des Saprolegniaceae. Ces champignons sont normalement des saprophytes aquatiques, ils sont communs dans toutes les eaux douces. La présence de membres de cette famille a été démontrée en de nombreux endroits à travers le monde.

Dans certaines conditions, ces champignons sont capables de passer à l'état parasite. Ils peuvent parasiter de nombreux invertébrés et également certains vertébrés. Quand ils envahissent les tissus des poissons ils en provoquent la mort.

La Saprolegniose est une maladie particulièrement redoutée par les pêcheurs et les pisciculteurs en régions tempérées. Cette mycose est connue en Europe depuis la Moyen-Age et l'on sait que les épidémies sont toujours mortelles pour bon nombre de poissons, surtout que les rivières peuvent se contaminer très rapidement de proche en proche. De nombreuses espèces de poissons ont été touchées par la maladie.

Dans les élevages, que ce soit en Europe, au Japon ou aux Etats-Unis, les pertes dues à la Saprolegniose sont souvent considérables. Fait curieux, il n'existe presque pas d'information concernant cette mycose en région tropicale. En particulier l'Afrique manque totalement de publications à ce sujet. Même les publications concernant les Saprolegniaceae à l'état saprophyte sont quasi inexistantes.

Notre travail a dès lors consisté d'une part à recueillir des renseignements, en prenant contact avec des centres piscicoles locaux, et d'autre part à étudier les possibilités d'existence de cette mycose, en particulier au Zaïre, en Afrique du Sud et aux Indes. Cette seconde partie a porté sur l'isolement de souches de Saprolegniaceae à partir d'échantillons d'eau originaires du Zaïre et des Indes suivi d'essais d'inoculation des souches isolées à 2

espèces de poissons exotiques: le guppy (*Lebistes reticulatus*) et le xipho (*Xiphophorus helleri*).

Le but des essais d'inoculation est d'établir la pathogénicité ou la non-pathogénicité de souches africaines ainsi que de définir le type de lésions que ces champignons sont capables d'infliger aux poissons.

Dans le premier chapitre, nous essayerons d'expliquer les caractéristiques des Saprolegniaceae, de leur morphologie et de leur biologie; nous définirons la Saprolegniose, son épidémiologie et sa symptomatologie. Le deuxième et le troisième chapitre seront consacrés à l'étude des Saprolegniaceae et de la Saprolegniose dans les régions tropicales.

Chapitre Premier

LES SAPROLEGNACEAE ET LA SAPROLEGNIOSE

A. LES SAPROLEGNACEAE

1. POSITION SYSTEMATIQUE

Les Saprolegniaceae appartiennent à la Classe des Phycomycètes. Ce sont donc des champignons à thalle coenocytique, c'est-à-dire non septé, si ce n'est en des endroits particuliers.

Parmi les Phycomycètes, l'ordre des Saprolegniales se range dans la sous-classe de Oomycète dont la caractéristique est la formation de gamétanges mâles et femelles anisogames. D'après la classification de LANGERON-VANBREUSEGHEM (M. LANGERON et R. VANBREUSEGHEM 1952) ils forment avec l'ordre des Monoblepharidiales, l'ordre des Leptomitales et l'ordre des Peronosporales les 4 ordres composant les Oomycètes.

Leurs caractéristiques essentielles sont: la formation d'un véritable mycélium, un mode de reproduction asexuée par formation de spores mobiles biflagellées dans un sporange, un mode de reproduction sexuée par formation d'oogones et d'anthéridies.

2. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET REPRODUCTION

Aspect macroscopique des cultures et mycelium

La morphologie macroscopique du mycelium des divers Saprolegniaceae varie peu. Ces champignons forment un mycélium blanchâtre plus ou moins dichotomisé et tubulaire. Le diamètre est assez irrégulier, généralement de 10 à 30 u. Les septa sont rares. On les observe à la base des divers organes de reproduction.

En culture sur milieux gélosés riches (Sabouraud agar, Corn meal agar, etc.) les Saprolegniaceae développent un abondant feutrage mycélien tant en profondeur qu'en surface.

Il y a, en général, intérêt à cultiver ces champignons sur des fragments végétaux ou animaux dans de l'eau. Ils forment alors des colonies beaucoup plus caractéristiques (fig. 1 et 2). Les filaments mycéliens s'irradient dans l'eau à partir du substrat et l'on observe des filaments de 2 à 4 cm de long en quelques jours. De plus, dans de telles conditions de culture toutes les souches forment des sporanges et même souvent des oogones.

Les sporanges se forment à l'extrémité des hyphes mycéliens. En effet, l'extrémité d'un filament où du cytoplasme dense s'est accumulé, s'isole des hyphes végétatifs par un septum basal. Les noyaux isolés au sein du sporange subissent plusieurs divisions mitotiques puis le cytoplasme s'organise autour de ces noyaux. Les zoospores sont ainsi progressivement formées. M. LANGERON pour éviter la confusion avec les zoospores de nature animale les appelait simbiospores (M. LANGERON et R. VANBREUSEGHEM 1952). A maturité ces zoospores auront acquis deux flagelles. Elles s'échappent du sporange par un pore apical ou latéral. Les spores flagellées peuvent alors soit évoluer quelque temps dans l'eau avant de s'enkyster, soit s'enkyster immédiatement à la sortie du sporange. Du kyste sort une nouvelle spore biflagellée réniforme qui s'enkyste à son tour pour germer ensuite et donner naissance à une nouvelle colonie. Chez certaines espèces, la spore ne s'enkyste qu'une seule fois.

Les organes de reproduction sexuée femelles apparaissent à l'extrémité d'hyphes ou sur de courtes branches latérales. Cette extrémité s'arrondit par suite d'accumulation de cytoplasme puis s'isole du reste du mycelium également par formation d'un septum transversal. Lorsque cette formation, appelée oogone, atteint sa taille définitive, une vacuole centrale se forme délimitant des portions de cytoplasme qui donneront naissance aux oosphères. La division réductionnelle s'est effectuée à ce stade. Simultanément, sur une même hyphe ou sur un filament voisin, se forme l'anthéridie. Les noyaux isolés au sein de l'anthéridie subissent également une méiose. L'organe de reproduction mâle se dirige alors vers l'oogone, perce la paroi et envoie autant de tubes de fécondation qu'il y a d'oosphères. Les zygotes ou oospores résultant de la fécondation s'entourent d'une épaisse membrane de cellulose. Chez les espèces hétérothalliques on distingue des souches mâles et des souches femelles complémentaires.

Outre les organes de reproduction sexuée et asexuée, les Saprolegniaceae produisent également des chlamydospores. On considère traditionnellement que des chlamydospores, encore appelées gemmes sont des formes de résistance produites quand le champignon est placé dans des conditions défavorables, en particulier dans de vieilles cultures. Actuellement, certains auteurs y voient plutôt des éléments indifférenciés capables, selon les conditions écologiques d'évoluer soit en sporange, soit en oogone, soit de germer en un nouveau mycélium.

3. TAXONOMIE

La détermination des Saprolegniaceae repose entièrement sur l'étude de la morphologie comparée des organes de reproduction asexuée et sexuée. Ni l'aspect des colonies, ni leur couleur, ni la dimension des filaments et des chlamydospores ne permettent de déterminer ces champignons. Il n'existe pas non plus de test biochimique à valeur taxonomique.

Dans ce travail, nous nous sommes basé, pour réaliser les déterminations, sur les travaux de: W. CH. COKER 1923; T.W. JOHNSON Jr. 1956; W.W. SCOTT 1964 et R.L. SEYMOUR 1970.

En ce qui concerne la détermination générique, seuls la morphologie des sporanges et le mode de déhiscence des spores ont de l'importance. De telles structures se formant assez facilement sur graines de chanvre, nous avons toujours pu déterminer les champignons étudiés dans ce travail, génériquement. Par contre; toutes les déterminations spécifiques ne purent être réalisées. En effet, la reproduction sexuée s'obtient parfois très difficilement en culture, en particulier il faut parfois attendre des mois avant de l'observer.

4. BIOLOGIE DES SAPROLEGNIACEAE

La plupart des Saprolegniaceae sont aquatiques et vivent dans des eaux douces. Certains sont terrestres; ils se développent alors soit dans des biotopes généralement fort humides, soit à l'état parasite sur des spermatophytes.

Ce sont les espèces aquatiques qui apparaissent sur le poisson et nous intéressent ici. Ces Saprolegniaceae colonisent en général

les détritux végétaux et animaux qui baignent dans les eaux. Ils jouent ainsi, à côté de multiples bactéries et autres microorganismes, un rôle fort important au niveau des écosystèmes. C'est ainsi que certaines espèces assurent la fragmentation des exuvies d'insectes (M.W. DICK 1970).

A l'état saprophyte, ces espèces s'isolent en abondance dans les eaux douces, les rivières, les fleuves, les étangs, les lacs ainsi que dans les petites mares. On ne les isole pas en mer car elles ne supportent pas de fortes salinités. Seules quelques espèces, comme exemple *Saprolegnia diclina* et *Achlya diffusa* (T.W. JOHNSON et J.K. SARROW 1965) vivent dans les estuaires.

On isole ces champignons dans des eaux de pH acide, neutre ou alcalin. R.E. ROBERTS (1963) en isole depuis pH 3,6 jusqu'à pH 8. Cet auteur signale que certaines espèces sont plus fréquentes dans des eaux acides, d'autres dans des eaux alcalines. Les espèces propres aux eaux acides vivent aisément dans des eaux dépourvues de bactéries car elles peuvent détruire les végétaux et les métaboliser, tandis que les espèces propres aux eaux alcalines et aux eaux neutres ne savent pas effectuer toutes les étapes de la transformation et la présence de bactéries leur est indispensable.

Certaines espèces sont donc douées de pouvoir parasitaire. Elles parasitent des algues, des champignons, des invertébrés et quelques vertébrés parmi lesquels les poissons sont les hôtes les plus fréquents. Cependant le parasitisme le plus connu est sans doute celui d'*Aphanomyces astaci*, un Saprolegniaceae parasite de l'écrevisse *Astacus astacus* chez laquelle il provoque la maladie appelée « peste des écrevisses ». Ce champignon a ainsi provoqué la disparition de l'écrevisse européenne d'une grande partie de l'Europe (T. UNESTAM 1966) et seule l'importation d'espèces d'écrevisses américaines hautement résistantes au champignon (UNESTAM 1969) a permis le maintien de ce crustacé partout en Europe.

5. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

La présence des Saprolegniaceae dans les eaux douces en Amérique du Nord et en Europe est connue depuis longtemps. Il suffit pour s'en convaincre de consulter le travail de COKER

(1923). La plupart des travaux entrepris depuis concernent encore ces deux continents.

Sur le continent asiatique, ce champignon a fait spécialement l'objet d'études au Japon et aux Indes. En ce qui concerne l'Afrique, nous avons été frappé par l'inexistence de publications sur ce sujet si ce n'est les récents travaux de R.O. ALABI au Nigeria (1971).

Les différences observées entre les Saprolegniaceae des régions tempérées et ceux isolés en région tropicale concernent d'une part les fluctuations saisonnières et, d'autre part les espèces isolées.

Plusieurs travaux réalisés en Europe et aux Etats-Unis ont en effet, clairement montré, que la sporulation de certains Saprolegniaceae présentait des fluctuations saisonnières: G.M. WATERHOUSE (1942) M.A. NAUMOV (1954); P.E. PERROT (1960); M.W. DICK et H.V. NEWBY (1961); R.E. ROBERTS (1963). C. HUGHES (1962) a pu montrer qu'il était possible de mettre ces fluctuations en rapport avec un caractère morphologique et, dès lors, de classer les Saprolegniaceae en 2 groupes. Le premier groupe renferme toutes les espèces dont les oogones sont dites « centriques ou subcentriques » (ceci tient simplement compte de la disposition des goutellettes lipidiques dans les oospores). Ces espèces présentent de fortes variations saisonnières. Le second groupe renferme des oogones dites « excentriques ». Ces champignons ne subissent pas de fluctuations saisonnières.

En région tropicale, il semble que certaines espèces ne subissent pas de fluctuations saisonnières tandis que pour d'autres la saison sèche est la plus favorable. Certaines espèces ne s'isolent même pas en dehors de cette période (ALABI 1971). Dans les régions subtropicales, comme aux Indes, H. CHAUDHURI (1942) et A. HAMID (1942) montrent que la meilleure période pour isoler les champignons aquatiques, parmi lesquels les Saprolegniaceae, se situe après les pluies de la mousson.

Quant aux champignons isolés, la première constatation que l'on est amené à faire à la lecture des quelques travaux concernant les régions tropicales, est la raréfaction relative du genre Saprolegnia. ALABI au Nigéria n'en isole pas une seule fois. D'autre part, HUGHES (1962) a montré, lors d'une étude dans le Sud-Est des Etats-Unis, qu'au plus il se rapprochait des régions à climat tropical, au plus le % d'espèces à oogones excentriques

devenait important. C'est ainsi qu'il observe 98 % d'espèces à oogones excentriques à Puerto-Rico et 100 % à Haïti mais n'en trouve plus que 72,9 % en Floride (H.E. ZIEGLER en 1958 en avait observé 75 %) et 61,4 % en Caroline du Nord. Au Nigéria, ALABI (1971) en observe 82 %.

Il n'est donc pas encore possible de tirer des conclusions concernant la distribution tropicale des diverses espèces de Saprolegniaceae, les travaux sont réellement trop rares. Il semble cependant bien que certaines espèces se développent plus volontiers dans ces régions et que d'autres ont plutôt tendance à rester confinées aux régions tempérées.

B. LA SAPROLEGNIOSE

1. ETIOLOGIE

La Saprolegniose est essentiellement une mycose secondaire. En effet, les Saprolegniaceae parasitent uniquement les poissons ayant subi un traumatisme cutané. Tant que l'ectoderme et les couches muqueuses protectrices sont intacts, le champignon ne s'implante pas sur le poisson. Ceci se vérifie tant expérimentalement que dans la nature.

Lors d'inoculations expérimentales d'*Achlya flagellatta* à des *Fundulus heteroclitus*, W.N. TIFFNEY (1937) a observé la non réceptivité de poissons intacts. En effet, il soumet 25 poissons blessés et 25 poissons sains aux mêmes conditions expérimentales d'inoculation. Il obtient 9 infections positives dans le premier cas et aucune infection parmi les poissons non blessés.

SCOTT (1964), testant le pouvoir pathogène des genres *Achlya*, *Saprolegnia* et *Pythium*, est amené à la même conclusion. Sur 24 poissons non blessés mis en contact avec les champignons, 4 seulement s'infectent et parmi ceux-ci, il put établir que 2 au moins avaient subi des traumatismes accidentels lors des manipulations. Le même auteur obtient d'autre part 91 % d'infections positives quand les poissons sont blessés préalablement à l'inoculation.

Dans la nature, ces traumatismes peuvent être d'origine mécanique — quand le poisson s'est blessé accidentellement — ou d'origine infectieuse. Dans ce dernier cas, la lésion primaire est souvent due à l'action de bactéries ou de virus responsables de

chancres cutanés, ou à d'autres parasites externes qui, abandonnant leur hôte, laissent béante la plaie par laquelle ils étaient fixés au poisson.

Nous voyons donc que les Saprolegniaceae ont en quelque sorte besoin d'une porte d'entrée particulière constituée par un tissu dermique ou musculaire qui a perdu localement ses fonctions protectrices. Ce champignon ne se fixe d'ailleurs pas sur les tissus voisins intacts.

L'action protectrice de l'ectoderme vis-à-vis des Saprolegniaceae se vérifie également dans l'U.D.N. (Ulcerative dermal necrosis). Cette maladie spécifique des Salmonidés se manifeste par l'apparition de lésions nécrosantes sur la tête des saumons. Rapidement, des filaments mycéliens apparaissent sur ces lésions leur conférant l'aspect typique de la Saprolégniose. Les poissons meurent assez rapidement. R.J. ROBERTS, W.M. SHEARER; A.L.S. MUNRO et K.G.R. ELSON (1970) ont émis l'hypothèse de la possibilité d'une origine virale à cette infection et ont montré que ce n'est qu'une fois l'ectoderme profondément altéré, seule la basale subsiste encore, que les filaments mycéliens commencent à apparaître. Sur l'ectoderme voisin moins altéré, ils n'observent pas de filaments.

2. SYMPTOMATOLOGIE

a) *Aspect macroscopique des lésions*

La Saprolégniose apparaît donc comme une mycose cutanée qui se manifeste par l'apparition de touffes de filaments mycéliens externes sur la peau du poisson. Ces filaments baignent dans l'eau (cfr *fig. 3*) et leur extrémité se termine même souvent par des sporanges.

En réalité, les premiers stades de l'infection montrent la formation d'une ulcération blanchâtre de la peau aux endroits préalablement blessés et mis en contact avec le champignon. Au bout de quelques heures, le champignon devient visible à l'œil nu par la masse de filaments mycéliens qui sortent de la lésion. Ces filaments sont de plus en plus nombreux et denses. La lésion qui en résulte prend ainsi l'aspect d'une mousse blanche. C'est de cette image qu'est né le nom communément donné à la maladie par les pêcheurs: « la mousse des poissons ».

Notons cependant que si les poissons vivent dans des eaux boueuses ou vaseuses, ces mousses se teintent en brun suite à la rétention et à l'accumulation, entre les filaments, des particules colorées en suspension dans l'eau.

Ces lésions sont généralement plus ou moins rondes. Leur taille, au moment de la mort du poisson, atteint de quelques millimètres à quelques centimètres de diamètre, suivant la taille du poisson. Des cas d'extension de la maladie à tout un flanc, voire à tout le poisson, ont déjà été signalés.

Au centre de ces lésions, l'ectoderme, le derme et les écailles ont généralement complètement disparu. Les muscles sont ainsi découverts et entrent en contact direct avec l'eau. Les couches musculaires sous-jacentes aux lésions acquièrent d'ailleurs également une consistance spongieuse dénotant une altération des fibres musculaires.

Enfin, ces lésions sont généralement bordées par une zone hémorragique, cutanée et interne, particulièrement visible chez les poissons faiblement colorés.

b) *Localisations des lésions*

Les touffes de filaments mycéliens peuvent se développer sur l'ensemble du corps du poisson. Nous avons cependant noté que, dans la nature, les flancs et les nageoires étaient des sites d'infection plus fréquents. Parmi les diverses nageoires, nous avons observé, chez les poissons d'eaux douces belges (gardon: *Leuciscus rutilus* et carpe: *Cyprinus carpio*), un envahissement préférentiel de la caudale et de la dorsale. Chez les Salmonidés, T.H. HUXLEY (1882) signale une grande fréquence d'envahissement des nageoires adipeuses dorsales.

Les localisations céphaliques ne sont pas rares. Nous en avons observé à plusieurs reprises. Dans ce cas, les yeux sont souvent entrepris et recouverts de filaments mycéliens. Par contre, nous n'avons jamais observé de localisation branchiale dans la nature.

c) *Comportement*

Au début de l'infection, tant que les lésions sont peu étendues, les poissons gardent un comportement normal. Mais, au fur et à mesure que les lésions s'étendent, on voit se manifester divers

troubles du comportement. Les animaux semblent présenter des signes d'asphyxie et de paralysie de plus en plus prononcés; ils nagent par mouvements brusques et saccadés, leur pédoncule caudal n'effectue plus de mouvements ondoyants et semble immobilisé.

Les poissons finissent par se tenir immobiles, couchés sur l'un ou l'autre flanc, soit en surface, soit dans le fond de l'eau.

La paralysie devient de plus en plus importante et s'étend progressivement à tout le corps et aux nageoires.

Cette parasitose entraîne la mort des poissons en quelques jours. On observe, expérimentalement, la mort de petits poissons comme le guppy (adulte mâle) 20 à 24 heures en moyenne après le début de l'infection.

Pour le xipho, les poissons résistent 2 à 3 jours maximum. Il semble qu'il y ait une relation entre la taille du poisson et la vitesse de la mort après inoculation. Dans la nature, nous avons observé des gardons de 15 à 18 centimètres qui survivent 1 ou 2 semaines à leur infection. Il s'agit d'une maladie qui tue très rapidement, surtout les poissons de très petite taille.

3. PATHOGENIE DE LA SAPROLEGNIOSE

Les Saprolegniaceae provoquent la mort des poissons qu'ils parasitent. Des études ont été entreprises depuis longtemps afin de comprendre par quel mécanisme ces champignons exercent leur pouvoir pathogène. En effet, la destruction de fragments de peau et de muscles ne suffit pas à elle-seule pour expliquer la mort des poissons.

En 1939, TIFFNEY avait conclu, de l'étude symptomatologique des poissons qu'il observait, que trois causes de mort étaient possibles:

1° le champignon peut causer la mort par destruction directe des tissus;

2° une sorte de toxine pourrait être secrétée par le champignon, entraînant la paralysie et la mort des poissons parasités;

3° le champignon, en détruisant des portions d'épiderme protecteur, entraînerait le libre passage de l'eau dans les tissus. Il en résulterait une dilution des liquides corporels de ces poissons d'eau douce.

T. HOSHINA, T. SANO, M. SUNAYAMA (1960); S. EGUSA (1963) et N. NOLARD-TINTIGNER (1973) ont étudié le problème de l'existence et de l'action d'une toxine secrétée par les Saprolegniaceae. Ces divers auteurs réalisent des extraits à partir de plusieurs souches de Saprolegnia puis, injectent ces extraits à des poissons. Ces extraits furent préparés à la fois à partir de souches maintenues en culture sur milieu gélose et sur graines de chanvre et à partir de champignons parasites récoltés directement sur des poissons mourants. Des essais d'injections répétées furent même réalisés. Malgré cela, dans aucun cas, il ne fut possible de reproduire les symptômes de la maladie chez les poissons.

Diverses expériences personnelles nous ont également fait rejeter l'hypothèse d'un dérèglement osmotique. Il faut cependant noter que cette dernière hypothèse a été reprise par ROBERTS (1972) à propos de l'U.D.N. Cet auteur considère que la mort des saumons — qui sont, rappelons-le, surinfectés par des Saprolegnia — est certainement due à des troubles circulatoires résultant d'une hémodilution osmotique à travers les téguments endommagés du poisson.

Enfin, nous avons entrepris une étude histologique approfondie (NOLARD-TINTIGNER 1970 et 1973) des poissons atteints de Saprolegniose expérimentale.

Cette étude nous a permis de démontrer que, pour autant que l'on utilise une technique de coloration spécifique de la paroi des Saprolegniaceae comme le Gomori-Grocott (R.E. GROCOTT 1955), on retrouve des filaments mycéliens en grand nombre au niveau d'organes internes, en particulier le système nerveux et le système circulatoire. Nous avons ainsi pu montrer que des souches isolées en Belgique, inoculées à des Xiphos et à des guppys, provoquent la mort de ces poissons par infarcissement des vaisseaux et destruction de la moelle épinière.

4. EPIDEMIOLOGIE

a) *Facteur saisonnier*

Les épidémies de mousses naturelles débutent toujours à la fin de l'hiver et au printemps ou en automne. Il en est en tout cas ainsi dans les régions tempérées. En régions tropicales les informations à ce sujet manquent dans la littérature.

L'importance épidémiologique des saisons et en particulier du climat lié à ces saisons, avait déjà été mise en évidence par HUXLEY en 1882 et s'est vérifiée par la suite.

Les épidémies des saumons (« Salmon disease ») qui ont sévi pendant des années à la fin du XIX^e siècle (HUXLEY 1882 et G. MURRAY 1885) s'étaient déclarées au printemps 1877. Elles se manifestèrent à nouveau en automne puis disparurent en hiver pour réapparaître au printemps de l'année suivante avec plus de virulence encore. Cette maladie se propagea ainsi à travers les rivières anglaises, écossaises et irlandaises pendant plusieurs années, toujours au printemps et en automne.

En 1909, G.H. DREW observe au printemps des truites et des anguilles infectées dans le Colne.

W.N. TIFFNEY et F.T. WOLF (1937) observent une épidémie de Saprologniose parmi des jeunes saumons de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). Cinquante pour cent des animaux s'étaient infectés, représentant une perte de 500.000 jeunes poissons. Deux autres espèces de Salmonidés présentes en même temps ne s'étaient pas infectées (*Salmo fario* et *Salmo irideus*).

Les épidémies de Saprologniose des anguilles japonaises se déclenchent chaque année au printemps (HOSHINA et coll. 1960; EGUSA 1965). En 1956, HOSHINA et OOKUBO ont signalé la disparition de poissons atteints de Saprologniose lorsque la température de l'eau approche les 18°C.

L'épidémie d'U.D.N. qui sévit depuis de nombreuses années à travers la Grande-Bretagne et l'Irlande est probablement une épidémie de mousse particulière aux Salmonidés. Cette maladie a débuté en Irlande à la fin de l'année 1964. Elle fut signalée en Angleterre et en Ecosse en automne 1966 et s'est installée à travers toutes les îles britanniques à partir du printemps 1967.

Etudiant une épidémie d'alevins de truites en Irlande, M.R. STUART et H.T. FULLER (1968) constatent également que le début de l'infection coïncide avec une diminution de la température qui était tombée de 16°C à 10°C la semaine précédente.

Enfin, récemment L.G. WILLOUGHBY (1970) observe une épidémie de la perche dans le lac de Windermere (Grande-Bretagne). Cette épidémie, totalement différente de l'U.D.N. s'était déclarée à la fin du mois de septembre. Le nombre de poissons

atteints de Saprolegniose se situait aux environs de 50 % vers le 15 octobre tandis qu'il n'était plus que de 2 % le 29 octobre.

Nous voyons donc, qu'en région tempérée, la Saprolegniose se déclare précisément au moment où les Saprolegniaceae présentent une sporulation maximum. Ceci est du moins le cas des Saprolegniaceae à oogones centriques ou subcentriques qui sont de loin les plus fréquents dans nos eaux (cfr p. 13). Le lien existant entre la sporulation des champignons aquatiques et l'infection des poissons s'est d'ailleurs confirmé lors d'essais d'infections expérimentales ainsi que par l'étude histologique des lésions aux tout premiers stades de l'infection (NOLARD-TINTIGNER 1973).

Seules les spores asexuées mobiles sont capables de se fixer sur les tissus lésés des poissons, d'y germer en profondeur et d'assurer l'infection.

5. NATURE DU CHAMPIGNON RESPONSABLE DE LA SAPROLEGNIOSE

Existe-t-il, au sein de la famille des Saprolegniaceae, des genres, voire des espèces, plus particulièrement adaptés au parasitisme des poissons?

Dans la littérature, particulièrement dans la littérature de vulgarisation, il est assez courant de considérer que la mousse des poissons est due à l'envahissement des tissus par un *Saprolegnia parasitica* Coker sans qu'aucune allusion ne soit faite à l'existence d'autres espèces ou d'autres genres parasites. Plusieurs travaux ont cependant montré, surtout ces 20 dernières années, que diverses espèces de Saprolegniaceae pouvaient causer la Saprolegniose naturelle ou expérimentale.

En réalité, l'erreur d'appeler *S. parasitica* tout *Saprolegnia* isolé sur un poisson malade est la conséquence de la description qu'en a faite Coker en 1923.

L'auteur se base, pour créer cette nouvelle espèce, sur son origine et sa stérilité. En effet, il isole, sur des poissons saprolegniés, des souches de *Saprolegnia* qui restent stériles malgré de nombreux essais en culture. Or, comme nous l'avons signalé au début de ce travail, certains Saprolegniaceae produisent rarement leurs formes sexuées en culture. On comprend dès lors que cette interprétation soit à l'origine de nombreuses erreurs. Par la suite d'ailleurs, B.B. KANOUSE (1932) reprenant l'étude morpholo-

gique et physiologique de *S. parasitica* trouvera qu'il est possible d'obtenir des oogones à partir des souches de *S. parasitica*.

Nous avons tenté d'établir une liste des Saprolegniaceae isolés à l'état parasite sur des poissons atteints de Saprolégniose ces 30 dernières années. Nous y avons ajouté les genres et espèces de Saprolegniaceae qui avaient pu être inoculés avec succès à divers poissons exotiques.

1. *Achlya ambisexualis*: cette espèce a été signalée par WILLOUGHBY (1970) lors d'une épidémie de la perche. Le champignon y était associé à: *Achlya* sp., *L. caudata* et *S. diclina*.

2. *Achlya americana*: a été isolé deux fois par SCOTT (1964). SCOTT et WARREN (1964) ont reproduit expérimentalement la maladie en inoculant cette espèce.

3. *Achlya bisexualis*: isolé à l'état parasite par SCOTT (1964). Fut inoculé avec succès par le même auteur et par VISHNIAC et NIGRELLI (1957).

4. *Achlya flagellata*: TIFFNEY et WOFF ont isolé ce champignon lors d'une épidémie de truitelles. TIFFNEY parvint à reproduire expérimentalement la maladie, sur des poissons blessés.

5. *Achlya klebsiana*, *Achlya racemosa*, *Achlya sparrowii*, *Aphanomyces stellatus*, *Calypotroglia achlyoides*, *Dictyuchus* sp., *Isoachlya monilifera*, *Protoachlya paradoxa*, *Saprolegnia megasperma*, *Thraustotheca clavata* et *T. primoachlya* n'ont jamais été isolés à l'état parasite sur des poissons. Ils furent cependant inoculés avec succès (cfr. tableau p. 22).

6. *Achlya* sp.: diverses souches d'*Achlya* stériles ont été isolées ou/et toujours inoculées avec succès (cfr. tableau).

7. *Aphanomyces laevis*: a été signalé par SCOTT (1964), H.R. SMITH (1940), R.L. SHANORR et H.B. SASLOW (1939). Il fut infectant lors d'inoculations (VISHNIAC et NIGRELLI 1957).

8. *Saprolegnia delicata*: a été isolé à plusieurs reprises par SCOTT (1964) et une fois sur une carpe par NOLARD-TINTIGNER (1973).

9. *Saprolegnia diclina*: a été isolé à plusieurs reprises lors d'une épidémie du gardon (NOLARD-TINTIGNER 1970) et lors d'une épidémie de la perche (WILLOUGHBY 1970).

10. *Saprolegnia ferax*: c'est l'espèce la plus souvent signalée à l'état parasite, dans les ouvrages publiés à la fin du XIXe S. et au début du XXe S., c'est-à-dire avant la création - en 1923 - de

Liste des Saprolegniaceae connus à l'état pathogène sur des poissons.

Champignon: genre-espèce	Type de Saprolé- gniose	Auteur - Année
<i>Achlya ambisexualis</i>	I I P	NOLARD-TINTIGNER 1973 VISHNIAC et NIGRELLI 1957 WILLOUGHBY 1970
<i>Achlya americana</i>	P I	SCOTT 1964 SCOTT et WARREN 1964
<i>Achlya bisexualis</i>	P + I I	SCOTT 1964 VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Achlya flagellata</i>	P P + I	TIFFNEY et WOLFF 1937 TIFFNEY 1939a
<i>Achlya klebsiana</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Achlya racemosa</i>	I	HOSHINA 1960
<i>Achlya sparrowii</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Achlya stellatus</i>	I	HOSHINA 1960
<i>Achlya sp.</i>	I P + I P I P	NOLARD-TINTIGNER 1973 SCOTT 1964 TIFFNEY 1939a VISHNIAC et NIGRELLI 1957 WILLOUGHBY 1970
<i>Aphanomyces laevis</i>	P P P I	SCOTT 1964 SHANORR et SASLOW 1944 SMITH 1940 VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Aphanomyces stellatus</i>	I	HOSHINA 1960
<i>Calyptrolegnia achlyoïdes</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Dictyuchus sp.</i>	I	TIFFNEY 1939a
<i>Isoachlya monilifera</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957

Champignon: genre-espèce	Type de Saprolé- gniose	Auteur - Année
<i>Leptolegnia caudata</i>	P	WILLOUGHBY 1970
<i>Protoachlya paradoxa</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Saprolegnia delica</i>	P I	SCOTT 1964 VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Saprolegnia diclina</i>	P + I P	NOLARD-TINTIGNER 1970, 1973 WILLOUGHBY 1970
<i>Saprolegnia ferax</i>	P I P + I P I	DA SILVA 1970 HOSHINA 1960 NOLARD-TINTIGNER 1970, 1973 SCOTT 1964 TIFFNEY 1939
<i>Saprolegnia hoferi</i>	P	DA SILVA 1970
<i>Saprolegnia megasperma</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Saprolegnia mixta</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Saprolegnia parasitica</i>	P + I P + I P P P P + I P	HOSHINA et coll. 1960 NOLARD-TINTIGNER 1973 SCOTT 1964 STUART et FULLER 1968 TIFFNEY 1939 a et b VISHNIAC et NIGRELLI 1957 WILLOUGHBY 1969
<i>Saprolegnia sp.</i>	P + I P + I P + I	NOLARD-TINTIGNER 1973 SCOTT 1964 SCOTT et WARREN 1964
<i>Thraustotheca clavata</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957
<i>Thraustotheca primoachlya</i>	I	VISHNIAC et NIGRELLI 1957

P = isolé à l'état parasite sur un poisson naturellement infecté.

I = inoculé expérimentalement à un poisson avec succès.

l'espèce *S. parasitica*. *S. ferax* est actuellement, après *S. parasitica*, considéré comme la champignon le plus fréquemment isolé et le plus virulent lors des inoculations expérimentales. D'après SCOTT (1964), on l'isole couramment sur les œufs de poissons. TIFFNEY (1939a) isole ce champignon de deux vertébrés: une tortue (*Chelydra serpentina*) et un triton (*Necturus maculosus*); les deux souches furent très virulentes lors des essais expérimentaux. Nous l'avons également isolé lors d'une épidémie de la perche (NOLARD-TINTIGNER 1970).

DA SILVA l'a observé lors d'épidémies en Amérique du Sud.
11. *Saprolegnia hoferi*: signalé une fois par DA SILVA (1970) en Amérique du Sud.

12. *Saprolegnia parasitica*: reste l'espèce proportionnellement la plus souvent isolée au cours des épidémies. Ce champignon est responsable d'une redoutable épidémie des anguilles qui sévit au Japon pendant plusieurs années (HOSHINA et coll. 1960). C'est également l'espèce isolée sur les lésions ulcéreuses de l'U.D.N. en Grande-Bretagne (STUART et FULLER 1968; WILLOUGHBY 1969). Le pouvoir pathogène de cette espèce lors d'inoculations expérimentales a été confirmé par plusieurs auteurs (cfr. tableau).

13. *Saprolegnia* sp.: bon nombre de *Saprolegnia* isolés sur des poissons restent stériles en culture. Ces champignons sont toujours pathogènes lors d'inoculations expérimentales (SCOTT 1964; NOLARD-TINTIGNER 1973). C'est dans ce groupe que devraient entr'autres figurer 122 souches de *Saprolegnia* stériles, incorrectement appelées *S. parasitica* par TIFFNEY. *Saprolegnia* s.p. a toujours été infectant lors d'inoculations expérimentales.

Notons enfin que quelques autres Saprolegniales associées à des Saprolegniaceae ont pu également être isolées sur des poissons. Il s'agit de *Leptomitius lacteus* (WILLOUGHBY 1970) et *Pythium* sp. (SCOTT 1964; STUART et FULLER 1969).

De nombreux Saprolegniaceae sont donc capables d'agir en tant que parasites de poissons.

Néanmoins, dans la nature, ce sont les genres *Saprolegnia* et *Achlya* qui s'isolent des lésions. Le genre *Leptolegnia* fut isolé par WILLOUGHBY (1970). A part ce cas, tous les autres genres signalés constituent tous des cas de Saprolegniose expérimentale.

Chapitre II

LES SAPROLEGNIACEAE D'ORIGINE TROPICALE OU SUB-TROPICALE

I. INTRODUCTION

Il est intéressant de connaître la distribution des genres et espèces de Saprolegniaceae tropicaux. En effet, c'est la présence même de l'agent pathogène qui conditionne le déclenchement de la parasitose. Si les principaux Saprolegniaceae agents de mousse des poissons étaient inexistants ou très rares dans les eaux africaines par exemple, ceci expliquerait la rareté apparente de la maladie sur ce continent.

Seuls deux travaux d'ALABI (1971 a et b) nous donnent une idée de la distribution des Saprolegniaceae dans les eaux africaines. Cet auteur a isolé des Saprolegniaceae dans la région d'Ibadan-Nigéria tout au long de l'année. Il tente également d'établir les fluctuations saisonnières de ce groupe de champignons en fonction de différents éléments parmi lesquels le climat tropical. Au Nigéria, on observe deux saisons bien distinctes: la saison sèche qui s'étend d'octobre à mars et la saison des pluies qui s'étend d'avril à septembre. Les températures les plus élevées (jusqu'à 37°C dans l'eau) s'observent pendant la saison sèche. ALABI constate qu'il existe des espèces plus fréquentes au cours de l'une ou de l'autre des saisons ou des espèces présentes continuellement. Les espèces isolées tout au long de l'année sont: *Achlya abortiva*, *A. dubia*, *A. prolifera* et *A. debaryana*. Les espèces rencontrées pendant la saison sèche: *Achlya trelesiana*, *A. carolina*, *Brevilegnia bispora*, *B. linearis*, *B. unisperma*, *Dictyuchus monosporus*, *D. achlyoïdes*, *Aphanomyces laevis*, *Pythiopsis cymosa*, et *Traustotheca clavata*. Les espèces rencontrées uniquement pendant la saison des pluies: *Achlya klebsiana*, *A. proliferoides*, *A. megasperma* et *A. racemosa*.

Les techniques d'isolement utilisées par ALABI se basent sur la germination des zoospores mobiles sur des graines (*Crotalaria refusa*).

La sporulation de certaines espèces tropicales subit donc, comme celle de certaines espèces de régions tempérées, des fluctuations saisonnières. Ceci est un des facteurs les plus importants lors du déclenchement des épidémies.

D'autre part, le genre *Saprolegnia* semble avoir disparu. Sur 18 espèces isolées, pas une souche n'appartient au genre *Saprolegnia*. Par contre, le genre *Achlya* domine de loin avec 10 espèces différentes. Parmi celles-ci, nous n'en trouvons malheureusement pas qui ait été isolée lors d'épidémies naturelles. Nous connaissons seulement le pouvoir pathogène d'*Achlya klebsiana* et d'*Achlya racemosa* lors d'inoculations expérimentales.

2. ISOLEMENT ET ETUDE DE SOUCHES ZAIROISES ET INDIENNES

Nous avons réalisé une série d'isollements de souches de *Saprolegniaceae* d'origine tropicale ou sub-tropicale. Notre but était d'une part de posséder quelques informations sur la présence ou l'absence de cette famille dans des eaux chaudes et d'autre part d'étudier expérimentalement, à l'aide de techniques parfaitement connues, la possibilité d'infection de poissons par ces *Saprolegniaceae*.

a) Matériel et méthodes d'isolement et de purification

Isolement

Il fallait mettre au point une technique qui permette d'isoler, en Belgique, des éléments fungiques présents dans des prélèvements d'eau réalisés en région tropicale.

Sur le terrain, un tube à essai, stérilisé au préalable et d'une contenance de 5 à 10 cc, est rempli à moitié de l'eau à étudier. Il est extrêmement important de ne remplir les flacons qu'à demi afin de ne pas y créer une atmosphère anaérobique dans laquelle les spores de *Saprolegniaceae* meurent rapidement.

De cette manière, les flacons peuvent être conservés plusieurs jours. Dans tous les cas, nos flacons furent stockés dans la me-

sure du possible au frigo (plus ou moins 7°C) et envoyés le plus rapidement possible à notre laboratoire. La plupart des échantillons ont ainsi pu être mis en culture au cours de la semaine suivante la récolte.

Le contenu de chaque tube est ensuite réparti dans 2 boîtes de Pétri de 9 cm. de diamètre. Chaque boîte reçoit donc ainsi de 1 à 3 cc d'eau tropicale à laquelle nous ajoutons 10 cc d'eau distillée stérile et 5 demi graines de chanvre préalablement stérilisées par ébullition dans de l'eau pendant 10 min.

L'utilisation de graines de chanvre (*Cannabis sativa*) comme appât pour les Saprolegniaceae est la méthode la plus répandue (JOHNSON 1956; R. EMERSON 1958; SCOTT 1961). Les éléments fungiques en suspension dans l'eau se fixent ainsi sur les graines. Ce sont surtout les spores asexuées mobiles qui iront s'enkyster et germer sur les graines (W.B. COOKE 1963).

Ces boîtes sont ensuite mises à incuber à 27°C pendant 5 à 6 jours. Les graines envahies par un Saprolegniaceae sont ensuite prélevées et les champignons isolés subissent une série de purifications.

Purification

Une série de contaminants: bactéries, protozoaires, algues,... accompagnent les filaments isolés sur graines et s'y développent rapidement. Il faut débarrasser le champignon de ces organismes afin d'obtenir des souches pures.

Chaque primoculture de Saprolegniaceae sur graine de chanvre est transportée dans une nouvelle boîte de Pétri qui renferme également quelques demi graines et 20 cc d'une solution de Pénicilline à la concentration de 50 u/cc dans l'eau distillée. De nombreux contaminants bactériens sont ainsi éliminés.

Chaque colonie subit ensuite une purification mécanique suivant la technique de l'anneau de RAPER (J.R. RAPER 1937). On coule pour cela, dans une boîte de Pétri, du milieu Corn meal agar. Au centre de la boîte, on enfonce dans le milieu un anneau métallique de 1 cm. de hauteur environ, de telle façon qu'une moitié de l'anneau se trouve dans le milieu, et l'autre moitié à l'extérieur. On dépose le champignon au centre de l'anneau sur le milieu de culture. Les filaments mycéliens qui ont un support

en milieu aérobique peuvent se développer dans la gélose, ils passent sous l'anneau et réapparaissent en surface au delà de l'anneau. Les autres micro-organismes se développent uniquement au centre de l'anneau. Il suffit de prélever une colonie de champignons au delà de l'anneau pour obtenir une culture pure.

Cultures monosporées

Rien ne prouve que les cultures de Saprolegniaceae obtenues après isolement et purification ne soient pas un mélange de plusieurs espèces. Afin d'éliminer cette possibilité, nous avons réalisé des cultures monosporées, c'est-à-dire issues de la germination d'une seule spore.

En culture sur graines de chanvre, les Saprolegnia sporulent abondamment. A l'aide d'une pipette, nous captions quelques spores, généralement 2 ou 3. Le contenu de la pipette est ensuite étalé sur une fine surface du milieu Corn meal agar en boîte de Pétri.

Il est possible, à ce moment, de s'assurer que les spores ne se sont pas enkystées l'une à côté de l'autre. Après 24 heures, chaque spore a donné naissance à une petite colonie de filaments. En réalisant des repiquages à partir d'une seule colonie, on obtient des cultures monosporées.

b) *Origine*

Nous avons étudié en tout 141 échantillons d'eau provenant de régions tropicales ou subtropicales; 123 échantillons provenaient du Zaïre et 18 des Indes (1).

Les échantillons du Zaïre se répartissent de la manière suivante:

- 10 prélèvements réalisés en février 1970 dans les ruisseaux et bassins décoratifs du Frère Gillet à Kisantu.
- 10 prélèvements réalisés en novembre 1970 (2) et 20 prélèvements en février 1971 dans les environs de Kinshasa notamment dans la Mbidi.

(1) Je tiens ici à exprimer ma reconnaissance à M. le Prof. Dr. R. VANBREUSEGHEM, qui a participé à la majorité des récoltes et m'a rapporté lui-même bon nombre d'échantillons. Je le remercie également pour les photos de biotopes qui figurent ici.

(2) Je remercie le Dr. Ch. DE VROEY, qui m'a aimablement procuré ces échantillons.

— 20 prélèvements (3) réalisés en novembre 1972 dans 3 fleuves: la Ndjili, la Lukaja et enfin, le Zaïre.

— 83 prélèvements réalisés en février 1973 (4). Cet important ensemble de récoltes recouvrait toute la ville de Kinshasa. De l'eau de toute origine fut récoltée. Nous avons ainsi pu disposer d'eau prélevée dans des caniveaux, dans des marais, des égouts et des mares choisis de manière à avoir une répartition homogène à travers toute la ville. Nous avons également reçu des eaux de ruisseaux (KIN II; Joli Parc), de rivières (BASOKO, KALAMU, FUNA, YOLO, MOMBELE).

Enfin, 18 prélèvements provenant des Indes ont été étudiés en septembre 1970. Il nous a paru intéressant de les étudier en même temps que les souches zaïroises car elles proviennent également de régions à climat chaud. L'eau avait été récoltée dans des rizières d'une ferme expérimentale aux environs de Bangalore.

Nous disposons donc en totalisant ces différentes récoltes de 161 prélèvements. Nous avons obtenu des souches de Saprolegniaceae dans 38 cas (voir tableau p. suivante).

c) *Identification des souches*

Nous avons essayé de déterminer les souches isolées, malheureusement, plusieurs souches n'ont pas encore produit de formes sexuées et suivant la taxonomie moderne, ne peuvent être déterminées spécifiquement.

Le tableau suivant donne la liste des différents Saprolegniaceae isolés, leur numéro de référence, leur origine et la date de leur récolte.

(3) Le Dr. P. VAN WETTERE, ainsi que Me ANTOINE, trouveront également ici mes remerciements à l'occasion de l'aide qu'ils m'ont apportée.

(4) Mes plus vifs remerciements au Père BOUILLON et aux membres de son laboratoire grâce à qui cette impressionnante récolte qui fut extrêmement intéressante put avoir lieu.

Tableau de la répartition des souches de Saprolegniaceae isolées à partir d'eaux zairoises et indiennes.

N° souche	Origine	Date	Identification
E ₃₅	Ruisseau. Jardin du Père Gillet. Kisantu	Février 1970	<i>Aphanomyces laevis</i>
E ₃₆	Bassin à Eulophia Jardin du Père Gillet. Kisantu	Février 1970	<i>Achlya</i> sp.
E ₃₉	Eau rizières Bangalore. Indes	Août 1970	<i>Achlya</i> sp.
E ₄₀	Eau rizières Bangalore. Indes	Août 1970	<i>Achlya ambisexualis</i>
E ₄₁	Kinshasa	Novembre 1970	<i>Achlya</i> sp.
E ₄₂	Kinshasa	Novembre 1970	<i>Achlya</i> sp.
E ₄₃	Kinshasa	Novembre 1970	<i>Achlya</i> sp.
E ₄₄	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₄₅	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Achlya prolifera</i>
E ₄₆	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Achlya</i> sp.
E ₄₇	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Dictyuchus monosporus</i>
E ₄₈	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Achlya ambisexualis</i>
E ₄₉	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Achlya</i> sp.
E ₅₀	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Achlya ambisexualis</i>
E ₅₁	Mbidi. Zaire	Février 1971	<i>Saprolegnia</i> sp.
E ₅₃	Ndjili. Zaire	Novembre 1972	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₅₄	Ndjili. Zaire	Novembre 1972	<i>Dictyuchus</i> sp.

N° souche	Origine	Date	Identification
E ₅₅	Ndjili. Zaire	Novembre 1972	<i>Achlya</i> sp.
E ₅₆	Lukaja. Zaire	Novembre 1972	<i>Achlya ambisexualis</i>
E ₅₇	Lukaja. Zaire	Novembre 1972	<i>Achlya</i> sp.
E ₅₈	Lukaja. Zaire	Novembre 1972	<i>Achlya</i> sp.
E ₅₉	Lukaja. Zaire	Novembre 1972	<i>Dictyuchus monosporus</i>
E ₆₀	Lukaja. Zaire	Novembre 1972	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₆₁	Ndjili. Zaire	Novembre 1972	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₆₃	Av. Olsen Ruisseau	Février 1973	<i>Achlya racemosa</i>
E ₆₄	Av. Olsen Ruisseau	Février 1973	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₆₅	Av. Olsen Ruisseau	Février 1973	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₆₆	Av. Olsen Ruisseau	Février 1973	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₆₇	Caniveau près hôpital de Makala, zone de Bumbu	Février 1973	<i>Achlya klebsiana</i>
E ₆₈	Ruisseau, av. de la Plaine. Joli Parc	Février 1973	<i>Achlya prolifera</i>
E ₆₉	Caniveau, route des poids lourds. Pont Skol	Février 1973	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₇₀	Rivière Basoko	Février 1973	<i>Dictyuchus monosporus</i>
E ₇₁	Caniveau, av. du Ht Commandement, près du Camp Kokolo	Février 1973	<i>Dictyuchus</i> sp.

N° souche	Origine	Date	Identification
E ₇₂	Rivière Kalamu, pont sur av. Bokasa	Février 1973	<i>Achlya prolifera</i>
E ₇₃	Ruisseau descendant le Joli Parc à l'ouest de l'av. Ma Campagne	Février 1973	<i>Achlya</i> sp.
E ₇₄	Rivière Basoko, pont av. de l'OUA	Février 1973	<i>Dictyuchus</i> sp.
E ₇₅	Ruisseau le long de la Lumumba, après échangeur de Limette	Février 1973	<i>Aphanomyces</i> sp.
E ₇₆	cfr supra (E ₇₂)	Février 1973	<i>Achlya</i> sp.

Nous voyons que les champignons isolés appartiennent tous aux genres *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus* et *Saprolegnia*.

Achlya fut isolé 21 fois. Ce genre vient donc en premier lieu en ce qui concerne la fréquence des genres présents. Nous notons également la fréquence élevée du genre *Dictyuchus* (14 *Dictyuchus*, tous originaires du Zaïre).

Parmi les espèces qui ont fructifié, nous avons identifié: *Achlya ambisexualis* (1), *Achlya klebsiana*, *Achlya prolifera*, *Achlya racemosa*, *Achlya* sp., *Aphanomyces laevis*, *Dictyuchus monosporus*, *Dictyuchus* sp. et *Saprolegnia* sp.

Les figures 4, 5, 6, et 7 illustrent la morphologie microscopique de quelques-unes des souches isolées. Les figures 4, 6 et 7 représentent différents types de sporanges, la figure 5 une oogone de *Achlya prolifera*.

d) Importance de la température pour la sporulation et la croissance

Afin de réaliser les inoculations expérimentales, il est nécessaire de posséder des souches sporulant abondamment. Les diver-

(1) Il s'agit d'une espèce hétérosexuée. Ces souches ont fructifié en présence d'une souche femelle n° CBS 101.50 (Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn).

ses souches de Saprolegniaceae que nous avons isolées en Belgique (NOLARD-TINTIGNER 1973) présentent une croissance et surtout une sporulation quasi maximales entre 20 et 22°C. C'est pourquoi nous incubons nos cultures à la température ordinaire du laboratoire. Nous avons remarqué que les souches africaines ne sporulaient pas très bien dans ces conditions. Par contre, placées à 27°C, elles montrent une croissance très rapide et une sporulation beaucoup plus abondante. Nous avons alors testé la croissance de ces champignons à des températures élevées. A 37°, les Saprolegniaceae belges cessent de se développer et certains sont rapidement tués. Tous les Saprolegniaceae africains par contre présentent un taux de croissance tout à fait normal. Nous avons même réalisé le test en milieu gélose (Corn meal agar) avec les souches E₅₈, E₅₇, E₆₇, E₆₈, E₇₂, et E₇₃. A 37°C ces cultures recouvrent complètement une boîte de Pétri de 9 cm. de diamètre en 5 jours. Il existe donc des différences dans la croissance et la sporulation de différentes souches de Saprolegniaceae suivant leur origine. Ceci sera un facteur très important lors de l'étude du pouvoir pathogène des souches.

3. OBSERVATION DE SAPROLEGNIACEAE ORIGINAIRES D'AFRIQUE DU SUD

Au cours de ce travail, nous avons pu disposer de 9 échantillons de Saprolegniaceae originaires d'Afrique du Sud (5). Les échantillons provenaient de la région du Cap, pour la plupart de « Jonkershoek Fish Station » où règne un climat de type méditerranéen.

Il s'agissait dans tous les cas de Saprolegniaceae prélevés en même temps que leur substrat naturel: cadavres animaux, déchets organiques,... et non de Saprolegniaceae captés sur des appâts.

C'est ainsi que nous avons reçu deux xénopes (cfr fig. 8) dont le corps était entièrement recouvert d'un *Saprolegnia* sp. qui sporulait abondamment au moment de la fixation.

(5) Je remercie vivement M. S.J. MC VEIGH, du « Department of Nature Conservation » à Jonkershoek Cape ainsi que M. R. MC POTT, « Transvaal Provincial Administration » Prétoria qui ont eu l'amabilité de répondre à mes demandes et de m'envoyer les différents spécimens étudiés ici.

Plusieurs insectes (cfr. fig. 9) étaient également recouverts de *Saprolegnia* typiques. Sur les photos, on remarque aisément les sporanges terminaux (épaississement des hyphes).

Tous ces échantillons étaient malheureusement fixés au liquide de Bouin. Nous n'avons donc pas pu en faire de culture. L'observation de ces souches nous apporte néanmoins différentes informations en ce qui concerne les genres de Saprolegniaceae présents dans une région africaine à climat doux.

En effet, tous les échantillons originaires du Cap appartiennent au genre *Saprolegnia*. Les différents substrats sont: *Pterophylum scalare*, *Xenopus laevis*, *Sandelia capensis*, *Musca domestica*, divers insectes et des fragments d'œufs cuits servant à nourrir les jeunes poissons.

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1° Des Saprolegniaceae ont pu être isolés à partir de toutes les récoltes d'eaux que nous avons eues à traiter.

Il a été particulièrement intéressant d'isoler des Saprolegniaceae zaïrois car, en ce qui concerne cette région, le catalogue des champignons signalés au Congo belge et au Ruandi Urundi par F. H. HENDRICKX (1948) ne donne aucune information sur la présence d'aucun membre de l'ordre des Saprolegniales et ce groupe de champignons ne semble pas avoir fait l'objet de publications par la suite.

2° A l'issue de ce travail préliminaire à l'étude de la Saprolegniose, nous pouvons peut-être tenter de comparer les souches que nous avons isolées d'eaux africaines et indiennes avec celles que nous avons isolées en Belgique depuis quelques années. Nous disposons de 29 souches belges isolées d'eaux à l'état saprophyte (technique de la graine de chanvre) et de 43 souches isolées sur des poissons belges vivants. Sur l'ensemble de ces 72 souches, nous trouvons un seul *Achlya* et 71 *Saprolegnia*.

En conséquence, il apparaît bien que le genre *Saprolegnia* est plus répandu dans les régions tempérées ou « méditerranéennes » tandis que les genres *Achlya* et *Dictyuchus* prédominent dans les régions tropicales. Ceci correspond aux résultats obtenus par ALABI (1971) au Nigéria.

Il sera très intéressant d'étudier les répercussions possibles de ces différences génériques sur la Saprolégniose des poissons.

3° Nous avons pu observer que la température joue un rôle important sur le développement et la sporulation des souches tropicales. En effet, alors qu'aucune des 72 souches belges ne se développe à 37°C, au contraire, toutes les souches zaïroises s'y développent fort bien et leur sporulation atteint un maximum aux environs de 27°C. Les températures requises par les champignons aquatiques tropicaux sont donc bien proportionnelles aux températures locales et ce n'est pas dans une faible sporulation consécutive aux trop fortes températures que peut être recherchée l'explication de la rareté des Saprolégniotes africaines.

Nous voyons par contre, que dans les eaux tropicales, les Saprolegnia deviennent extrêmement rares. Sur 38 souches isolées, nous ne retrouvons qu'un seul Saprolegnia et deux Aphanomyces. Les genres Achlya et Dictyuchus deviennent prédominants avec 21 Achlya et 14 Dictyuchus.

L'étude de la répartition des genres devient encore plus intéressante si on y ajoute les échantillons de la région du Cap où règne un climat méditerranéen. Seuls des Saprolegnia ont été observés. Bien sûr, les techniques d'isolement de ces derniers échantillons et des autres ne sont pas comparables. Mais, nous savons que les différents Saprolegniaceae se développent aussi bien les uns que les autres sur les cadavres d'animaux. Le fait que seul le genre Saprolegnia soit observé sur des échantillons d'origine naturelle peut dès lors être considéré comme une indication valable de la composition de la mycoflore des eaux Sud-africaines qui le contenaient.

4° Enfin, plusieurs souches isolées n'ont pas encore fructifié ce qui rend les déterminations spécifiques impossibles. Parmi les souches identifiées, nous trouvons: *Aphanomyces laevis*, *Achlya ambisexualis*, *Achlya prolifera*, *Dictyuchus monosporus*, *Achlya racemosa* et *Achlya klebsiana*.

Nous observons donc, conformément à l'hypothèse émise par HUGHES (1962), une majorité d'espèces à oogones excentriques. Seuls *Achlya racemosa* et *Dictyuchus monosporus* n'appartiennent pas à ce groupe.

Chapitre III

ETUDE DE LA SAPROLEGNIOSE TROPICALE

A. INTRODUCTION

La Saprolégniose des poissons en région tropicale n'a pas, jusqu'à présent, attiré l'attention des chercheurs.

Devant le manque d'intérêt suscité apparemment par ce problème, nous étions même tentés, il y a quelque temps, d'imaginer que cette maladie ne s'y déclarait simplement pas.

De toute manière, il nous semblait qu'elle était d'un intérêt limité. Des épidémies mortelles pour des centaines ou des milliers de poissons, comme nous en connaissons presque chaque année en Europe, ne sévissent jamais dans ces régions.

Quelles pouvaient en être les causes?

— L'inexistence de Saprolegniaceae dans les eaux tropicales ou bien le manque de pouvoir pathogène de ces souches?

— La résistance des poissons tropicaux aux infections par des Saprolegniaceae?

— Ou bien encore l'existence de conditions climatiques, écologiques rendant impossibles les infections par Saprolegniaceae?

Nous avons tenté de répondre à ces questions en nous intéressant plus spécialement à la situation de la Saprolégniose en Afrique.

Nous savons déjà (Chapitre II) que les Saprolegniaceae ne sont pas absents, bien loin de là, des eaux tropicales.

Les souches isolées vont nous permettre d'entamer une étude *approfondie* de la Saprolégniose provoquée par des souches tropicales.

Mais, avant d'entreprendre une étude expérimentale de cette affection, il nous a semblé nécessaire de récolter le plus possible d'informations locales sur la mousse.

La plupart des indications qui suivent proviennent de correspondance avec des centres de recherche ou de coordination scientifique locaux.

— En Afrique du Sud (1), la Saprolegniose est une maladie assez répandue, considérée même par certains comme d'une incidence économique élevée (F.A.O.) dans les eaux douces polluées près des zones industrielles.

D'une façon générale, les auteurs s'accordent à dire que cette maladie se déclare après des périodes froides ou exceptionnellement froides. Elle se localise aussi bien dans les viviers, les fleuves, les bassins et les barrages. Quand elle s'installe, la mortalité est élevée. De nombreuses espèces de poissons succombent dans les eaux douces près des zones industrielles polluées par divers produits chimiques (F.A.O.).

La plupart des poissons des eaux tempérées y sont sensibles. Ce champignon s'attaque en majorité aux *Tilapia*, par ex. *Tilapia mossambica*, aux *Barbus spp* et *Labeo sp.* *T. mossambica* est atteint dès que la température tombe en dessous de 17°C.

— En Haute Volta (2), en Côte d'Ivoire (3), et au Sénégal (4), la Saprolegniose n'a pas été observée.

— Au Kénia, la Saprolegniose n'est pas connue.

— A Madagascar (5), la maladie existe mais est confinée aux régions montagneuses, là où règne un climat assez froid. C'est par exemple le cas de la station piscicole d'Ampamaterana à 1060 m. d'altitude. La Saprolegniose s'y déclare en hiver, quand la température descend aux environs de 12°C. Le seul poisson sur lequel la maladie est signalée est la *Paratilapia pollerii*.

— En Rhodésie (6), la Saprolegniose n'est pas considérée comme un problème sérieux mais toutes les espèces de poissons

(1) Je tiens à exprimer mes remerciements au Dr. R.G. NOBLE, Coordinator For Environmental Sciences, South African Council for Scientific and Industrial Research qui m'a fourni de nombreux renseignements et m'a aidée à correspondre avec plusieurs centres piscicoles Sud-africains.

(2) (3) (4) Je remercie M. le Dr. R. Gidel, Centre Muraz à Bobo-dioulasso, M. le Dr. Aldrin, Ecole des Pêches à Bouaké et M. le Dr. Reizer, Centre technique forestier tropical Richard-Toll, qui ont aimablement répondu à mes demandes d'informations.

(5) Je remercie également M. le Dr. P. Morissens-Centre technique forestier tropical-Tananarive qui m'a procuré ces renseignements sur Madagascar.

(6) Les renseignements concernant la Rhodésie ont été transmis par M. H. TOOTS, du Fisheries Research Center à Salisbury. Nous le remercions.

d'eaux douces peuvent être atteintes. La maladie se déclare sur les Cichlidae, Cyprinidae, Claridae, etc. dont la peau est altérée par le transport ou le stockage. La mousse apparaît également quand la température de l'eau tombe pendant l'hiver. Les poissons meurent dans tous les cas.

Cette maladie revêt cependant une importance considérable actuellement sur le lac McIlwaine où elle tue de nombreux poissons affaiblis suite à la pollution de l'eau.

— En Tanzanie, la maladie s'attaque surtout aux nageoires et à la queue de jeunes alevins, principalement dans les étangs et les barrages dans des conditions défavorables (F.A.O. Annuaire de la Santé Animale).

— Au Zaïre, cette mycose ne nous a pas été signalée.

A la lecture de cette liste de renseignements recueillis dans quelques régions d'Afrique, nous pouvons déjà constater que:

1) La Saprolegniose est connue dans les régions *les plus froides*, par ex. à Madagascar où la maladie se déclare en Montagne et dans diverses régions d'Afrique du Sud où la maladie est observée à la fin des périodes froides.

2) La Saprolegniose apparaît dans les plans d'eau aménagés (barrages, par ex. en Tanzanie, en Afrique du Sud) ou dans des eaux altérées par la pollution (Rhodésie, Tanzanie, Afrique du Sud). En milieu naturel, surtout fluvial (Sénégal, Côte d'Ivoire, Zaïre) on observe très rarement des animaux malades, quelle que soit la maladie d'ailleurs, car les prédateurs, encore nombreux quand l'action de l'homme ne les a pas décimés, s'attaquent aux animaux malades ou affaiblis. Ils « nettoient » en quelque sorte constamment les eaux et diminuent le nombre d'animaux malades ce qui constitue une des meilleures mesures prophylactiques qui existent pour prévenir les épidémies de Saprolegniose.

B. ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGÈNE DES SOUCHES TROPICALES

1. ESSAIS D'INOCULATION

a) Matériel

Nous avons réalisé nos essais d'inoculation expérimentale sur deux espèces de poissons exotiques faciles à maintenir en élevage

et qui supportaient normalement une température de 24°C environ. Il s'agit du guppy: *Lebistes reticulatus* et du xipho: *Xiphophorus helleri*. Nous utilisons des poissons adultes de 2 à 3 cm. pour les guppys et 4 à 5 cm. pour les xiphos.

Les souches de champignons utilisées pour les inoculations proviennent toujours de culture sur graines de chanvre dans l'eau distillée. Nous pouvons ainsi prélever aisément les filaments mycéliens et les organes de reproduction qui flottent dans l'eau. L'âge des cultures inoculées varie de 3 à 7 jours.

b) Méthodes d'inoculation

Le mode d'inoculation le plus proche du mode de contamination naturelle consiste à placer simplement une culture de champignon dans l'eau d'un aquarium qui renferme les animaux que l'on veut infecter. Cette technique a toujours été utilisée par les divers auteurs qui ont réalisé des inoculations expérimentales.

Nous avons voulu y ajouter une technique d'inoculation plus directe qui crée un contact constant entre le champignon et le poisson. Elle consiste à placer un fragment de culture sous la peau du poisson. Cette technique, bien que totalement artificielle, présente l'avantage de permettre l'étude du pouvoir infectant de n'importe quelle phase du cycle du champignon en réalisant un contact certain entre la souche étudiée et le poisson.

1° Anesthésie

Les poissons sont anesthésiés par passage dans une solution de MS222 (7) à 0,01 % dans l'eau de ville. Ils y séjournent 2 à 3 minutes jusqu'à ce que plus aucun mouvement ne soit perceptible. Nous les déposons ensuite sur un linge humide et les opérons sous la loupe binoculaire. Cette opération ne dure que 20 à 30 secondes. Les poissons sont alors remis dans l'aquarium expérimental. Le réveil se fait après 4 à 5 minutes.

2° Technique d'inoculation par scarification

La scarification consiste à enlever 4 à 5 écailles puis à gratter l'ectoderme résiduel afin de mettre les couches dermiques à nu.

(7) MS222: tricaïne-méthanosulfanate-Sandoz.

Le poisson est ensuite déposé dans son aquarium et on ajoute à l'eau la culture infectante (culture sur graine de chanvre).

3° *Technique d'inoculation intramusculaire*

La peau est incisée à l'aide d'un scalpel et nous décollons l'ectoderme et le derme des muscles sur environ 3mm² en maintenant le scalpel dans l'incision. Un fragment de culture d'une dizaine d'hypes est alors glissé le long du scalpel et déposé au fond de la poche pratiquée. A l'aide de cette technique, nous déposons donc le champignon au sein des couches musculaires sous-jacentes à l'incision.

c) *Expériences*

Nous avons essayé de reproduire expérimentalement la mousse en inoculant 12 souches tropicales différentes appartenant aux genres *Achlya*, *Dictyuchus* et *Saprolegnia*.

L'ensemble de nos essais d'inoculation peut se décomposer en 2 séries distinctes qui diffèrent dans le nombre de spores asexuées produites au moment des inoculations.

Dans la première série, nous avons inoculé des souches qui avaient été incubées à température ordinaire et qui furent sélectionnées en fonction de leur faible taux de sporulation.

Dans la seconde série, nous avons inoculé des souches incubées 4 jours à 26°C et sélectionnées en fonction de leur sporulation abondante.

Dans chaque cas, nous avons inoculé des guppys et des xiphos. Les guppys sont inoculés par la technique de la scarification, les xiphos par inoculation intramusculaire.

d) *Résultats*

1ère série: souches à faible taux de sporulation.

Chaque souche a été inoculée à 2 guppys et 1 xipho. Aucun des 34 animaux inoculés ne n'est infesté. Tous ont survécu à l'expérience et aucune touffe de filaments n'est jamais apparue même dans les cas d'inoculation « in situ » de quelques hyphes. Les Saprolegniaceae inoculés lors de ces expériences semblent donc incapables de s'établir en tant que parasites.

2ème série: souche à taux de sporulation élevé.

Chaque souche a été inoculée à un nombre variable de poissons. En effet, dès les premiers essais, nous avons observé un certain taux de poissons positifs. C'est pourquoi un plus grand nombre d'animaux fut inoculé avec chaque souche.

Il nous a paru intéressant de grouper ces expériences d'après les genres de champignons inoculés (cf. tableau p. 42).

Toutes les souches testées furent donc capables de se comporter en tant que parasites de poisson blessé, à l'exception de la souche E₅₉.

2. MORPHOLOGIE MACROSCOPIQUE DES LÉSIONS

La symptomatologie des lésions est à peu près comparable chez le guppy après scarification et chez le xipho après inoculation intramusculaire. On observe, 6 à 8 heures après l'inoculation, l'apparition sur la lésion de filaments mycéliens courts, serrés. Environ 16 heures après le début de l'expérience, cette touffe s'est agrandie. Les filaments mycéliens qui baignent dans l'eau sont le plus souvent très longs, comme en témoigne la *fig. 10*.

Nous avons cependant observé des guérisons de poissons à ce stade. En effet, la touffe de champignon qui siège sur le poisson peut évoluer de deux manières.

Dans le premier cas, 24 heures environ après scarification, la touffe de filaments mycéliens se détache en un seul bloc, en entraînant avec elle les tissus nécrotiques du poisson. A l'emplacement de la lésion fungique ne subsiste alors qu'une petite lésion ronde qui cicatrise rapidement. Ces lésions correspondent aux poissons qui figurent dans les colonnes II.b du tableau de la page 42.

Dans le second cas, cette masse fungique continue encore quelque temps à s'étendre et 24 à 48 heures après inoculation, les poissons meurent des suites de cet envahissement. Les poissons mourants présentent des signes d'asphyxie et de déséquilibre typiques de cette maladie. Les lésions sont également bordées de zones nécrotiques et d'hémorragies cutanées et internes (cfr. *fig 11*).

3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A l'issue de cette étude expérimentale du pouvoir pathogène des souches, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

Résultats des inoculations expérimentales de 12 souches en sporulation à *Lebistes reticulatus* et *Xiphophorus helleri*.

Souche: n° - espèce	Guppy				Xipho			
	I	II			I	II		
		a	b	c		a	b	c
E ₃₀ . <i>A. sp.</i>	20	14	1	5	15	6	4	5
E ₄₅ . <i>A. prolifera</i>	6	—	6	—				
E ₄₈ . <i>A. ambisexualis</i>	10	3	5	2	13	6	3	4
E ₄₉ . <i>A. sp.</i>	10	2	3	5				
E ₆₇ . <i>A. klebsiana</i>	8	5	2	1	5	2	1	2
E ₆₈ . <i>A. prolifera</i>					4	2	—	2
E ₇₂ . <i>A. prolifera</i>	5	5	—	—				
E ₇₃ . <i>A. sp.</i>	15	12	2	1	10	3	6	1
Total Achlya:	74	41	19	14	47	19	14	14
E ₅₀ . <i>D. sp.</i>	4	—	—	4	3	—	—	3
E ₇₀ . <i>D. monosporus</i>	6	4	2	—	3	—	2	1
E ₇₁ . <i>D. sp.</i>	10	6	2	2				
Total Dictyuchus:	20	10	4	6	6	—	2	4
E ₈₁ . <i>S. sp.</i>	5	5	—	—	5	2	3	—

I = nombre total de poissons inoculés

II.a = infection et mort

b = infection suivie de rejet puis guérison

c = pas d'infection

1. Les souches d'origines zaïroises et indiennes sont toutes capables de se développer sur le poisson lors d'inoculations expérimentales réalisées dans les conditions que nous avons définies.

2. Les essais d'inoculations de souches à faible taux de sporulation ont toujours été négatifs. Même lors d'introduction de filaments au sein des muscles du poisson, aucune infection ne s'est jamais développée. Ceci confirme des résultats obtenus précédemment sur des souches belges.

Par contre, lors d'inoculation de souches à haut taux de sporulation, toutes les souches (à l'exception de la souche E₅₉) ont produit des Saprolegniososes expérimentales.

Ceci est fort intéressant. En effet, des essais de culture de Saprolegniaceae sur graines de chanvre ont montré que la sporulation de nos souches africaines se déclenchait préférentiellement à des températures voisines de 26°C et se poursuivait au moins jusqu'à 37°C. Autrement dit, les Saprolegniaceae sporulent également dans les eaux tropicales, même si les températures qui y règnent sont élevées. Dès lors, une des conditions essentielles à l'apparition de Saprolegniose des poissons se réalise certainement dans les eaux tropicales, à savoir une abondance de spores.

3. Les deux principaux genres de Saprolegniaceae isolés en eaux tropicales présentent un pouvoir pathogène à peu près comparable.

Pour le genre *Achlya*, nous observons chez le guppy 54 % d'infections positives mortelles, 25 % d'infections suivies de guérison et 19 % d'infections négatives.

Chez le xipho, ces chiffres sont de 40 % d'infections positives mortelles, 29 % d'infections suivies de rejet et 29 % d'infections négatives.

Pour le genre *Dictyuchus*, nous obtenons chez le guppy 50 % d'infections mortelles, 20 % d'infections suivies de rejet et 30 % de poissons non infectés; chez le xipho, nous ne disposons pas d'un échantillonnage suffisant pour réaliser des calculs de pourcentages valables.

4. La virulence des Saprolegniaceae tropicaux a été moins importante que celle de Saprolegniaceae belges inoculés dans les mêmes conditions de sporulation et sur les mêmes hôtes. En effet,

nous avons obtenu, dans une étude précédente, chez le guppy 82 % d'infections positives (pour 50 % ici) et 62 % d'infections positives chez le xipho (40 % dans ce travail). Les infections suivies de rejet étaient extrêmement rares lorsque les champignons inoculés provenaient de cultures sporulantes. Or, ce type de réaction oscille dans le cas de Saprolegniaceae tropicaux entre 20 et 29 %.

Il semble donc que les différents champignons aquatiques tropicaux utilisés dans ce travail éprouvent plus de difficultés à franchir le cap du saprophytisme au parasitisme. De plus, dans le cas des inoculations par scarification, des touffes de filaments apparaissent sur la blessure cutanée et ne sont éliminées que plus ou moins 20 heures après. Donc, même lors d'un début de parasitose, les champignons sont rejetés par la suite. A moins que les filaments n'envahissent en réalité que les tissus nécrosés par la scarification.

C. ÉTUDE HISTOLOGIQUE DES LÉSIONS

1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Diverses études histologiques de poissons atteints de Saprolegniose soit naturelle soit expérimentale ont montré que les filaments mycéliens envahissent rapidement la peau: ectoderme et derme, et les premières couches musculaires (HUXLEY 1882; VISHNIAC et NIGRELLI 1957; EGUSA 1963).

Ces altérations histologiques, même lorsque les lésions sont fort étendues, ne suffisent cependant pas à justifier la mort des poissons parasités.

Dans un travail précédent (NOLARD-TINTIGNER 1970-1972), nous avons recherché la présence éventuelle de filaments au sein d'organes internes essentiels. Cette étude a montré que le champignon pénètre en profondeur, traverse tous les tissus et se développe particulièrement bien dans les vaisseaux sanguins et dans la moelle épinière.

Étant donné l'évolution assez différente des inoculations de souches d'origine belge et africaine, il nous a paru fort intéressant d'observer histologiquement la pénétration de ces souches

zaïroises et indiennes qui donnent lieu à un pourcentage si élevé d'infections suivies de rejet.

2. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Les poissons étudiés sont fixés dans du liquide de Bouin ordinaire, décalcifiés par passage dans un bain de 1 à 2 h. de RDO (8) et enrobés à la paraffine après déshydratation à l'alcool butylique.

Du point de vue technique de coloration, le problème est de mettre le champignon en évidence au sein des tissus parasités c'est-à-dire de trouver une coloration fungique sélective. Malheureusement, les Saprolegniaceae forment des filaments qui vieillissent très vite et se vident alors de leur contenu cytoplasmique qui est remplacé par des vacuoles. Les colorations cytoplasmiques ne conviennent donc pas ici.

Il faut avoir recours à une coloration qui imprègne les parois constituées d'éléments de cellulose (AINSWORTH 1955). Nous avons utilisé la technique de Gomori à l'argent méthénamine telle qu'elle a été modifiée par GROCOTT (R.G. GROCOTT 1955). La paroi du champignon se colore en brun-noir et le champignon peut être facilement repéré au sein de n'importe quel tissu.

Nous avons associé à cette coloration, une coloration topographique: Hémalun-Ploxine-Vert lumière.

Toutes les photos histologiques qui illustrent ce travail ont été réalisées à partir de coupes colorées suivant cette technique.

3. DESCRIPTION DES LÉSIONS HISTOLOGIQUES MORTELLES

Nous avons étudié histologiquement 20 poissons inoculés expérimentalement avec des souches de Saprolegniaceae. Parmi ceux-ci, 8 ont été fixés au moment de leur mort, 6 alors qu'ils présentaient une touffe de filaments sur les flancs et pouvaient encore évoluer soit en infection mortelle soit en rejet et 6 autres enfin en voie de guérison.

(8) RDO: laboratoire Eurobio. Paris.

a) *Lésions après scarification et mise en contact*

Nous avons réalisé l'étude histologique complète des 8 guppys morts de Saprolegniose et fixés au moment de leur mort. Les animaux meurent environ le lendemain de l'inoculation. Ces poissons avaient été inoculés avec les souches E₆₇ (*A. klebsiana*), E₇₁ (*Dictyuchus sp.*), et E₇₂ (*Achlya sp.*).

Aucune différence ne put être constatée du point de vue des altérations histologiques. C'est pourquoi les descriptions suivantes se rapportent à l'ensemble des observations.

1. Le champignon s'est développé sur la peau réalisant la nécrose « classique » de la mousse des poissons avec destruction complète de l'ectoderme au centre de la lésion. On ne décèle généralement plus qu'une fine couche dermique à ce niveau (Cfr fig. 12).

C'est un enchevêtrement de filaments mycéliens qui a généralement pris la place des tissus originaux. Les écailles, qui ne sont plus soutenues par le derme, tombent ou quelques fois flottent, emprisonnées entre les filaments.

Notons également sur cette première photo histologique l'aspect étrange des hyphes de Saprolegniaceae en coupe. Cet aspect irrégulier est dû au diamètre des filaments et, surtout, à l'irrégularité de leur épaisseur. Les différents genres de Saprolegniaceae offrent en coupe un aspect absolument identique.

Les coupes qui passent par les bords de la lésion fungique montrent la zone de croissance « latérale » du champignon. Les filaments s'y insèrent entre les couches de cellules et le derme, ils disloquent ainsi ces éléments ce qui entraîne leur nécrose de proche en proche.

Au niveau du derme, les coupes montrent généralement une importante infiltration histiolympocytaire. Cette réaction est beaucoup plus importante ici que lors d'inoculations de souches d'eaux tempérées.

Signalons également que nous avons pu observer la germination de zoospores enkystées sur le derme (cfr. fig. 13). Des rangées de spores se sont fixées sur le derme aux endroits lésés expérimentalement. La fig. 13 montre bien l'importante quantité de spores qui vient ainsi recouvrir les surfaces scarifiées.

2. Les filaments pénètrent profondément dans la musculature. Dans certains cas, le champignon traverse le poisson de part en part.

Les hyphes entraînent une profonde altération des fibres musculaires (cfr. *fig. 14*). Les fibres parasitées entrent en nécrose et leur striation disparaît ainsi rapidement. Le tissu prend ainsi un aspect spongieux.

3. Les filaments pénètrent dans le système circulatoire quand le hasard de leur croissance provoque leur rencontre avec des vaisseaux. Ils percent la paroi des veines et artères et se développent abondamment dans leur lumière (cfr. *fig. 15*).

Les filaments enchevêtrés obstruent parfois complètement le passage du sang. Des hémorragies y sont souvent associées. De telles images sont fréquentes au niveau de l'aorte et de la veine caudale.

4. Les coupes transversales de moelle épinière (*fig. 16*) réalisées au niveau de la touffe fungique, montrent également que les filaments pénètrent dans le système nerveux. Leur croissance provoque la nécrose totale de la moelle épinière, du moins de la portion de moelle la plus proche du site d'inoculation. On ne distingue plus, ni substance blanche, ni substance grise. Ce tissu devient uniformément vacuolaire.

5. En fait, il semble bien qu'aucun tissu ne résiste à l'envahissement par les Saprolegniaceae. Sur la *fig 17* on voit, en effet, des filaments mycéliens qui traversent le cartilage cranial d'un guppy scarifié sur la tête. Les filaments ont traversé la musculature puis pénétré le crâne du poisson.

Il est curieux de constater que les filaments s'épaississent pendant leur passage à travers le crâne.

6. Au niveau des organes internes, nous avons pu observer une fois la présence de filaments dans le foie et dans les îlots diffus de pancréas, comme le montre la *fig. 18*. Dans ce cas, l'organe n'était pas encore altéré.

7. Enfin, il nous paraît intéressant de signaler un cas d'infection de l'œil. Il s'agit d'un guppy dont l'œil avait sans doute été lésé lors des manipulations. Une importante touffe de champignon le surmontait le lendemain de l'inoculation. Sur la coupe

(fig. 19), on distingue l'importante masse mycélienne qui recouvre tout l'œil.

b) *Lésions histologiques après inoculation intramusculaire*

Les coupes de poissons mourant de Saprolegniose après inoculation par introduction intramusculaire de filaments montrent des altérations profondes identiques à celles qui viennent d'être décrites.

Ce sont également les spores présentes dans l'inoculum (cfr. fig. 20) qui germent et assurent le passage au parasitisme.

En ce qui concerne les coupes de poissons réalisées 16 h. après inoculation, c'est-à-dire quand une réaction de type rejet peut encore se déclarer, nous avons pu observer que la masse de filaments inoculée est souvent entourée d'une bordure d'éléments inflammatoires histiolympocytaires qui l'isolent en quelque sorte des tissus voisins (fig. 21) Aucun filament ne s'engage en profondeur et les seuls filaments qui ont pu se développer se dirigent vers l'extérieur. Ils recouvrent alors l'incision pratiquée lors de l'inoculation.

Une telle image est probablement celle qui précède la réaction de rejet.

4. CONCLUSION

1. L'étude histologique des lésions produites par des Saprolegniaceae tropicaux a donc montré que ces champignons envahissent les tissus.

Ils se fixent uniquement aux endroits où l'ectoderme a été lésé puis envahissent le poisson en profondeur. Ils traversent le derme dont ils provoquent la disparition quasi totale puis s'enfoncent dans la musculature. Les fibres musculaires envahies entrent rapidement en nécrose et ce tissu prend un aspect spongieux et se colore alors très faiblement.

Le champignon progresse apparemment à travers tous les tissus, nous avons observé des filaments dans le foie, le pancréas et même le cartilage cranial. En effet, les Saprolegniaceae sont capables de traverser le crâne des poissons inoculés sur la tête. Dans ce cas, le champignon se creuse en quelque sorte des cavités de passage. Tout ceci se passe rapidement; toutes nos observa-

tions ont été faites, rappelons-le, sur des poissons infectés depuis 16 à 48 heures seulement.

C'est au niveau du système circulatoire et du système nerveux central que le champignon exerce son action pathogène la plus importante. Les hyphes pénètrent dans la lumière des vaisseaux et s'y développent abondamment en formant d'importantes masses de filaments qui obstruent les vaisseaux et s'opposent au libre passage du flux sanguin.

Dans la moelle épinière, les filaments sont généralement assez peu nombreux mais leur présence entraîne l'apparition de zones nécrotiques spinales importantes. Toute structure cellulaire disparaît, la moelle épinière se vacuolise.

Ce tableau histologique ressemble à celui que nous avons obtenu en inoculant dans les mêmes conditions des souches belges. Nous l'avons toujours observé sur nos poissons mourants.

Les Saprolegniaceae: *Saprolegnia*, *Achlya* et *Dictyuchus*, provoquent donc la mort des poissons qu'ils parasitent par nécrose successive des différents organes qu'ils envahissent et par infarctisation des principaux vaisseaux sanguins.

2. Les coupes histologiques ont également montré que ce sont bien les spores asexuées qui se fixent sur le derme puis germent. Elles sont donc ainsi à l'origine de l'infection. Le rôle infectant de cette spore se confirme également lors des inoculations intramusculaires.

3. Enfin, signalons que l'inoculation de souches tropicales provoquent le déclenchement d'une réaction inflammatoire nettement plus importante que l'inoculation de souches belges. Nous avons même observé, dans de nombreux cas, le rejet de filaments issus de la germination de quelques spores. Seules les inoculations où les spores sont très nombreuses et tapissent en quelque sorte le derme lésé semblent pouvoir se maintenir et donner lieu à une Saprolégniose mortelle classique.

CONCLUSIONS

1. La Saprolégniose des poissons est une mycose des poissons d'eau douce peu connue dans les régions tropicales.

Son incidence économique y est généralement faible. Nous pouvons tenter d'expliquer la rareté des Saprolégnioses tropicales et en particulier des Saprolégnioses africaines auxquelles nous nous sommes plus particulièrement intéressé dans ce travail.

Les biotopes africains dans lesquels la mousse a été observée se situent dans des régions à climat assez doux, comme la région du Cap en Afrique du Sud, ou en altitude. La mousse s'y déclare quand la température tombe relativement bas. La Saprolégniose se manifeste également dans des régions à climat tropical. Elle s'observe alors dans des plans d'eau aménagés tels les lacs de barrages, ou dans des fleuves où sévissent les divers types de pollution consécutifs à l'industrialisation.

Apparemment, la Saprolégniose n'est pas connue en région tropicale dans les eaux naturelles « sauvages » non altérées par l'industrie. Dans de telles conditions, les animaux malades s'observent en effet rarement, car, affaiblis, ils sont rapidement une proie rêvée pour la masse des prédateurs.

2. Notre étude expérimentale a tenté de définir les possibilités d'existence de Saprolégnioses dans les eaux naturelles tropicales.

Nos essais d'isolement montrent que les Saprolegniaceae sont présents dans toutes les eaux douces. Trente-huit souches d'origines très diverses ont ainsi été isolées. Le fait que ces souches sporulent abondamment à 26°C et se développent encore normalement à 37° C nous apprend d'autre part que les spores de Saprolegniaceae (seuls éléments infectants vis-à-vis des poissons) sont présentes en quantité dans les eaux tropicales. En effet, ce fait est important car le ralentissement de la sporulation des Saprolegniaceae quand la température dépasse 25° C pouvait expliquer l'inexistence de la maladie.

Les genres et espèces de Saprolegniaceae tropicaux sont-ils infectants pour le poisson ?

Si on s'en réfère à la littérature actuelle, on remarque que la liste des Saprolegniaceae isolés à partir de poissons malades à travers le monde tend à s'allonger de plus en plus. La tendance est d'ailleurs à considérer que tous les Saprolegniaceae sont capables, dans des conditions particulières, de parasiter les poissons. Néanmoins, il faut bien reconnaître que le genre *Saprolegnia* est de loin le plus fréquemment isolé sur les lésions naturelles. Les autres genres ne constituent bien souvent que des observations isolées qui portent souvent sur des poissons maintenus dans de mauvaises conditions.

Or, ce genre, qui est le plus répandu à l'état saprophyte en Belgique par ex., ne s'isole que très rarement en Afrique. Ce sont les genres *Achlya* et *Dictyuchus* qui y sont les plus nombreux.

Nous avons reproduit les expériences d'inoculations expérimentales que nous avons faites avec des *Saprolegnia* belges en inoculant cette fois les genres isolés à partir d'eaux tropicales. Dans cette expérience, les conditions maximales d'infection sont réalisées. Douze souches différentes ont été inoculées. A l'exception d'une seule, toutes se sont avérées pathogènes pour des guppys et des xiphos. Mais le pourcentage d'infections obtenu est inférieur à celui que nous obtenons avec les *Saprolegnia* belges (la moitié environ des poissons s'infectent et meurent de Saprolegniose tandis que presque tous meurent de Saprolegniose avec les *Saprolegnia* belges). De plus, entre 20 et 25 % de poissons présentent un début de mousse qui est suivi d'un rejet de l'ensemble des filaments mycéliens.

Les Saprolegniaceae africains ont donc été incontestablement moins pathogènes et aussi moins virulents que les Saprolegniaceae belges. Il est probable que dans la nature, *Achlya* et *Dictyuchus* n'attaquent que des poissons affaiblis. Ceci expliquerait en partie la rareté des mousses en Afrique centrale.

Il est significatif à cet égard, que dans une région comme la région du Cap, en Afrique du Sud, où la Saprolegniose est économiquement un problème important, le genre *Saprolegnia* est le plus répandu. En effet, tous les échantillons de Saprolegniaceae originaires de cette région que nous avons étudiés appartenaient au genre *Saprolegnia*.

Nous pensons donc que les Saprolegniaceae d'origine tropicale sont effectivement capables de parasiter des poissons blessés mais qu'ils représentent pour les poissons un danger de contamination moins grand que les Saprolegniaceae d'eaux plus froides. Le principal genre pathogène pour les poissons, *Saprolegnia*, est quasi absent des eaux tropicales.

La combinaison de ces deux éléments: absence relative du genre le plus pathogène et présence de nombreux prédateurs qui débarrassent continuellement les cours d'eaux des animaux malades et des cadavres explique le fait que la Saprolegniose n'est pas ou presque pas observée en région tropicale.

3. L'étude histologique des guppys et xiphos expérimentaux a montré d'autre part qu'une réaction inflammatoire assez importante entraînait parfois le rejet des filaments qui s'étaient fixés sur le poisson. Quant aux évolutions mortelles, elles se concrétisent à l'histologie par la progression d'*Achlya* et *Dictyuchus* à travers tous les tissus suivant le même schéma que *Saprolegnia*: derme, muscle, cartilage, moelle épinière et vaisseaux sanguins sont envahis. La mort est consécutive à l'apparition de masses fungiques importantes dans les vaisseaux et à la nécrose de la moelle épinière envahie. Il est assez curieux de noter à ce propos que le même type d'envahissement des vaisseaux se rencontre dans la mucormycose, mycose humaine également produite par des Phycomycètes appartenant aux genres *Rhizopus* et *Absidia*.

BIBLIOGRAPHIE

- AINSWORTH, G.C., SUSSMAN, A.S. (1965): The Fungi — an advanced treatise. Vol. I. The Fungal Cell. Academic Press. N.-Y, and London.
- ALABI, R.O. (1971 a): Factors affecting seasonal occurrence of Saprolegniaceae in Nigeria. Trans. Brit. Mycol. Soc., 56, (2), 289-299.
- ALABI, R.O. (1971 b): Seasonal periodicity of Saprolegniaceae at Ibadan, Nigeria. Trans. Brit. Mycol. Soc., 56, (3), 337-341.
- BESSEY, E.A. (1961): Morphology and Taxonomy of Fungi. Hafner Publishing Company, New-York.
- CHAUDHURI, H. (1942): Indian water moulds. Proc. Ind. Acad. Sc. B, 25, 206-224.
- COKER, W. Ch. (1923): The Saprolegniaceae. Univ. of North Carolina Press.
- COOKE, W.B. (1963): A laboratory guide to Fungi in polluted waters, sewage and treatment systems (identification and culture). Public Health Service.
- COUCH, J.N. (1931): Observations on some species of water moulds connecting Achlya and Dictyuchus. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 46, (2), 225-230.
- DICK, M.W., NEWBY, H.V. (1961): The occurrence and distribution of Saprolegniaceae in certain soils of S.E. Britain. I. Occurrence. J. Ecol., 49, 403-420.
- DICK, M.W. (1970): Saprolegniaceae on insect exuviae. Trans. Brit. Mycol. Soc., 55, 449-458.
- DICK, M.W., (1971): The Ecology of Saprolegniaceae in Lentic and Littoral Muds with a General Theory of Fungi in the Lake Ecosystem. J. Gen. Microbiol. 65, 325-337.
- EGUSA, S. (1963): Studies on Saprolegniosis of the Eel. I. Resistance of the Eel to fungus infections. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 29 (1), 27-36.
- EGUSA, S. (1965): The existence of a primary infectious disease in the so-called « Fungus disease » in pond-reared eels. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 31 (7), 517-526.
- EMERSON, R. (1958): Mycological organization: Saprolegniales. Mycologia, 50, 608-614.
- F.A.O. (1969): Annuaire de la Santé Animale, F.A.O., Rome.

- GAUMAN, E.A. (1952): The Fungi. Hafner Publishing Company, N.-Y., London.
- GILMAN, J.C. (1957): A manual of Soil Fungi. The Iowa State College Press.
- GROCOTT, R.G. (1955): Stain for fungi in tissues sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. Am. J. Clin. Path., 25, 975-979.
- HAMID, A. (1942): Indian water moulds. Proc. Ind. Acad. Sc. B., 15, 206-224.
- HENDRICKX, F.H. (1948): Sylloge Fungorum Congosium. Ed. INEAC, Série Scientifique, n° 35.
- HOSHINA, T., OOKUBO, M. (1956): On a fungi disease of eel. J. Tokio Univ. Fish., 42, 1-13.
- HOSHINA, T., SANO, T., SUNAYAMA, M. (1960): Studies on the Saprolegniosis of eel. J. Tokio Univ. Fisch., 47, 59-79.
- HUET, M. (1970): Traité de Pisciculture. Ed. Ch. De Wijngaert, Bruxelles, 4ème édition.
- HUGHES, C. (1962): Seasonal Periodicity of the Saprolegniaceae in the South Eastern United States. Trans. Brit. Mycol. Soc. 45, (4), 519-531.
- HUXLEY, T.H. (1882): Saprolegnia in relation to Salmon Disease. Quart. J. Microscop. Sc., 22, 311-333.
- JOHNSON, T.W. Jr. (1956): The genus Achlya: morphology and taxonomy. University of Michigan Press.
- JOHNSON T.W. Jr., SPARROW, F.K. Jr. (1965): Fungi in oceans and estuaries. Publish. J. Cramer.
- KANOUSE, B.B. (1932): A physiological and morphological study of *Saprolegnia parasitica*. Mycologia, 24, 431-452.
- LANGERON, M., VANBREUSEGHEM, R. (1952): Précis de Mycologie. Masson, Paris, 2ème édition.
- MAWDESLEY-THOMAS, L.E. (1972): Diseases of Fish. Academic Press, London.
- NOLARD-TINTIGNER, N. (1967): La Saprolegniose du gardon (*Leuciscus rutilus*) et de la carpe miroir (*Cyprinus carpio*). Acta Zool. Path. Antverp., 43, 107-127.
- NOLARD-TINTIGNER, N. (1970): Deux épidémies de Saprolegniose des poissons par *Saprolegnia ferax* et par *Saprolegnia diclina*. Ann. Parasit. 45, 761-770.
- NOLARD-TINTIGNER, N. (1971): Cause de la mort dans la Saprolegniose expérimentale du poisson. Bull. Cl. Sci. Acad. Roy. Belg., 57 (2), 185-191.

- NOLARD-TINTIGNER, N. (1973): Etude expérimentale sur l'épidémiologie et la pathogénie de la Saprolegniose chez *Lebistes reticulatus* Peters et *Xiphophorus helleri* Heckel. Acta Zool. Path. Antverp., 57, 1-127.
- PERROT, P.E. (1960): The Ecology of some Aquatic Phycomycetes. Trans. Brit. Mycol. Soc., 43, 19-30.
- RAPER, J.R. (1937): A method of freeing fungi from bacterial contamination. Science, 85, 342.
- RAPER, J.R. (1940): Sexuality in *Achlya ambisexualis*. Mycologia, 32, 710-727.
- REICHENBACK-KLINKE, H.H., ELKAN, (1965): The principal diseases of Lower Vertebrates. Academic Press, London, N.-Y.
- ROBERTS, R.E. (1963): A study of the distribution of certain members of the Saprolegniales. Trans. Brit. Mycol. Soc., 46, 216-224.
- ROBERTS, R.J. (1972): Ulcerative dermal necrosis (U.D.N.) of Salmon, dans Diseases of Fish. Academic Press, London, N. 4.
- ROBERTS, R.J., BAAL, H.J. MUNRO, A.L.S. et SHEARER, W.M. (1971): Studies on ulcerative dermal necrosis of salmonids: III. The healing process in fish maintained under experimental conditions. J. Fish. Biol. 3, 221-224.
- ROBERTS, R.J., SHEARER, W.M., MUNRO, A.L.S. (1969): The pathology of ulcerative dermal necrosis of Scottish Salmon. J. Path. Bact., 97, 563-565.
- ROBERTS, R.J., SHEARER, W.M. MUNRO, A.L.S., ELSON, K.G.R. (1970): Studies on Ulcerative dermal necrosis of Salmonids. II. The sequential pathology of the lesions. J. Fish. Biol., 2, 373-378.
- SCHÄPERCLAUS, W. (1954): Fischkrankheiten. Akademie Verlag, Berlin.
- SCOTT, W.W. (1961): A monograph of the genus *Aphanomyces*. Tech. Bull. Univ. Exp. St. 151.
- SCOTT, W.W., POWELL, J.R., SEYMOUR, R.L. (1963): Pure culture techniques applied to the growth of *Saprolegnia* spp. on a chemically defined medium. Virginia Journal of Science, 4(2), 42-46.
- SCOTT, W.W. (1964): Fungi Associated with Fish Diseases. Develop. Ind. Microbiol. 5; 109-123.
- SCOTT, W.W., WARREN, Ch.O.Jr. (1964): Studies of the host range and chemical control of fungi associated with diseased tropical fish. Virginia Agricultural Experiment Station, Technical Bull., 171.
- SEYMOUR, R.L. (1970): The genus *Saprolegnia* Nova Hedwigia XIX, J. Cramer, Iehre.
- SHANORR, T., SASLOW, H.B. (1939): *Aphanomyces* as a fish parasite. Mycologia, 31, 310-321.
- SILVA LACAZ (DA), C., MINAMI, P.S. PURCHIO, A. (1970): O Grande Mundo dos Fungos, Editora Poligono, Universidade de São Paulo.

- SPARROW F.K. Jr. (1960): Aquatic Phycomycetes. 2d ed. Univ. Michigan Press: Ann. Arbor.
- STUART, M.R. FULLER, H.T. (1968): Mycological aspects of diseased Atlantic Salmon. *Nature*, 217, 90-91.
- THAKUR, J.I. (1970): Studies on aquatic fungi of Varanasi, X. Additional new or interesting records of aquatic Phycomycetes. *Hydrobiologia*, 36, 179-186.
- TIFFNEY, W.N., WOLF, F.T. (1937): *Achlya flagellata* as a fish parasite. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 53, 298-300.
- TIFFNEY, W.N. (1939 a): The identity of certain species of the Saprolegniaceae parasitic to fish. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 55, 134-153.
- TIFFNEY, W.N. (1939 b): The host range of *Saprolegnia parasitica*. *Mycologia*, 31 (3), 310-321.
- UNESTAM, T. (1969): Resistance to the crayfish in some american, japanese and european crayfish. *Inst. Freshwater Res.* 49, 1-8.
- UNESTAM, T. (1970): The Host Parasite Relationship between Freshwater and the Crayfish Disease Fungus *Aphanomyces astaci*: Response to Infection by a susceptible and a resistant Species. *J. Gen. Microbiol.* 60, 77-90.
- VANBREUSEGHEM, R. (1953): Etiologie des Mycoses. *Archives belges Dermatologie et Syphiligraphie*, 9(3), 225-235.
- VANBREUSEGHEM, R. (1966): Guide pratique de Mycologie Médicale et Vétérinaire. Masson, Paris.
- VAN DUIJN, C. (1967): Diseases of Fishes, Iliffe Books, London, 2d Ed.
- VISHNIAC, H.S. NIGRELL, R.F. (1957): The ability of Saprolegniaceae to parasitize platyfish. *Zoologica*, 42, 131-134.
- WATERHOUSE, G.M. (1942): Water moulds of Hogsmill Rives. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 25, 315-325.
- WESTON, W.H. (1941): The role of the aquatic fungi in hydrobiology. Univ. of Wisconsin Press 411.
- WILLOUGHBY, L.G. (1962): The occurrence and distribution of reproductive spores of Saprolegniales in freshwater. *J. Ecol.* 50, 733-759.
- WILLOUGHBY, L.G., COLLINS, V.G. (1966): A study of the distribution of fungal spores and bacteria in Blelarn Tarn and its associated streams. *Nova Hedwigia*, 12 (1/2), 149-171.
- WILLOUGHBY, L.G. (1969): Salmon disease in Windermere and the River Leven: The fungal aspect. *Salm. Trans. Mag.* 186, 124-129.
- WILLOUGHBY, L.G. (1970): Mycological aspects of a disease of young perch (*Perca fluviatilis*) in Windermere. *J. Fish Biol.* 2 (2), 113-116.
- ZIEGLER, A.W. (1958): The Saprolegniaceae of Florida. *Mycologia*, 50, 693-696.

TABLES DES MATIERES

RÉSUMÉ	3
SAMENVATTING	4
INTRODUCTION ET BUTS DU TRAVAIL	7
CHAPITRE PREMIER	
LES SAPROLEGNIACEAE ET LA SAPROLEGNIOSE	9
A. Les saprolegniaceae	9
1. Position systématique	9
2. Caractères morphologiques et reproduction	9
3. Taxonomie	11
4. Biologie des saproleniaceae	11
5. Distribution géographique	12
B. La saprolegniose	14
1. Etiologie	14
2. Symptomatologie	15
a. <i>Aspect macroscopique des lésions</i>	15
b. <i>Location des lésions</i>	16
c. <i>Comportement</i>	16
3. Pathogénie de la saprolegniose	17
4. Epidémiologie	18
5. Nature du champignon responsable de la saprolegniose	20
CHAPITRE II	
LES SAPROLEGNIACEAE D'ORIGINE TROPICALE OU SUBTROPICALE	25
1. Introduction	25
2. Isolement et études de souches Zaïroises et Indiennes	26
a. <i>Matériel et méthodes d'isolement et de purification</i>	26
b. <i>Origine</i>	28
c. <i>Identification des souches</i>	29
d. <i>Importance de la température sur la sporulation et la croissance</i>	32
3. Observation des saprolegniaceae originaires d'Afrique du Sud	33
4. Conclusion	34
CHAPITRE III	
ÉTUDE DE LA SAPROLEGNIOSE TROPICALE	36
A. Introduction	36
B. Etude du pouvoir pathogène des souches tropicales	38

1. Essais d'inoculation	38
a. <i>Matériel</i>	38
b. <i>Méthodes d'inoculation</i>	39
c. <i>Expériences</i>	40
d. <i>Résultats</i>	40
2. Morphologie macroscopique des lésions	41
3. Discussion et conclusions	41
C. Etude histologique des lésions	44
1. Introduction bibliographique	44
2. Techniques histologiques	45
3. Description des lésions histologiques mortelles	45
a. <i>Lésions après scarification et mise en contact</i>	46
b. <i>Lésions histologiques après inoculation intramusculaire</i>	48
4. Conclusions	48
CONCLUSIONS	50
BIBLIOGRAPHIE	53
TABLE DES MATIÈRES	57

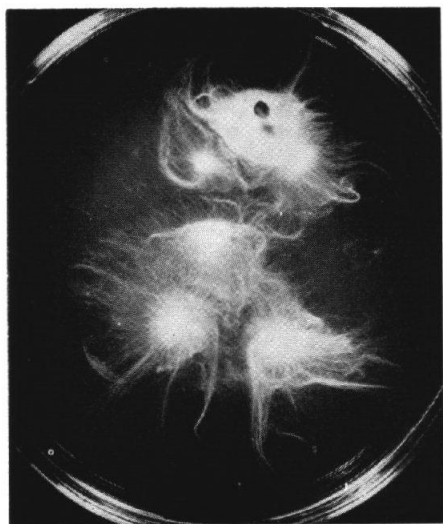


Fig. 1. — Souche E₀₁: *Achlya klebsiana*.

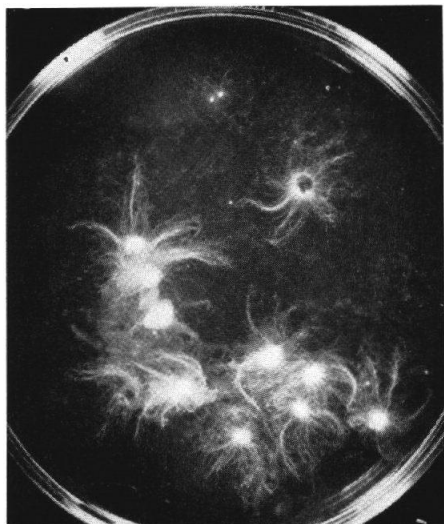


Fig. 2. — Souche E₁₂: *Dictyuchus monosporus*.

Fig. 1. et 2. — Cultures sur graines de chanvre dans de l'eau distillée. Croissance de 5 jours.

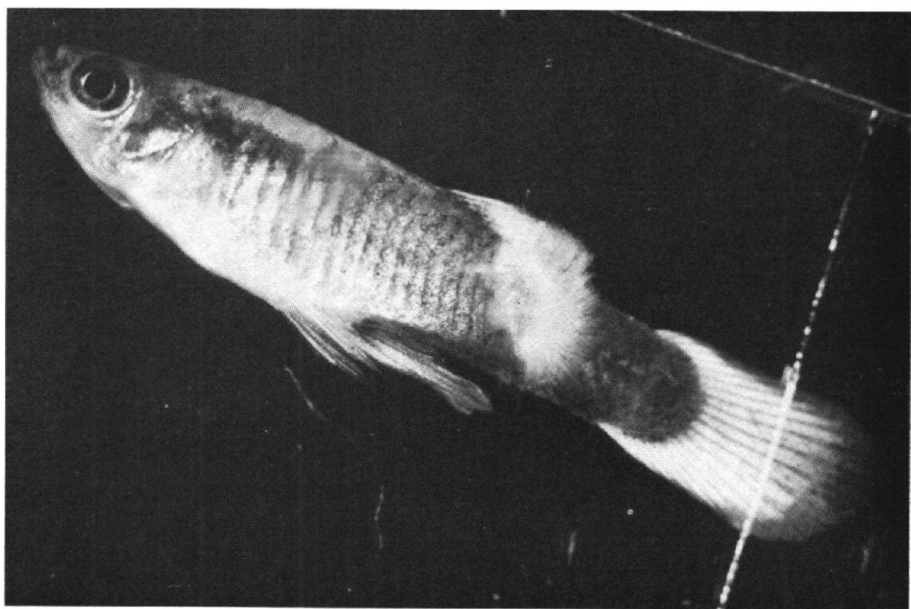


Fig. 3. — Saprolegniose expérimentale chez *Lebistes reticulatus*.

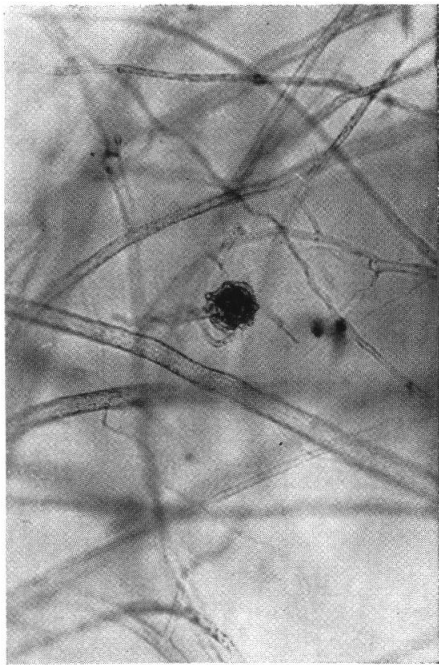
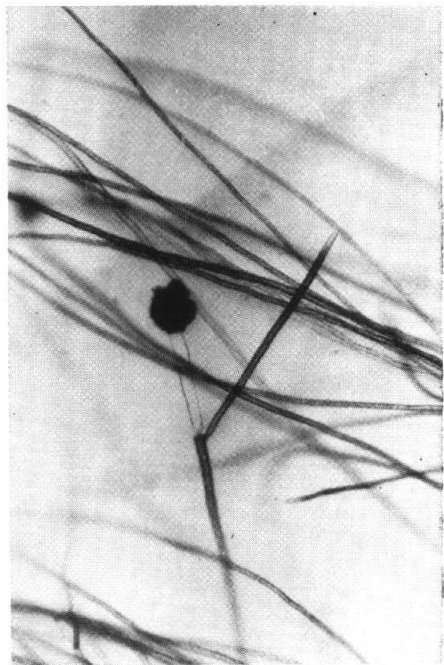


Fig. 4. et 5. — Souche E_{ss}: *Achlya prolifera*.

Culture sur graine de chanvre dans l'eau distillée. Sporange isolé avec sphère de spores. Le filament mycélien continue sa croissance latéralement.

Fig. 5. — Oogone et anthéridies.

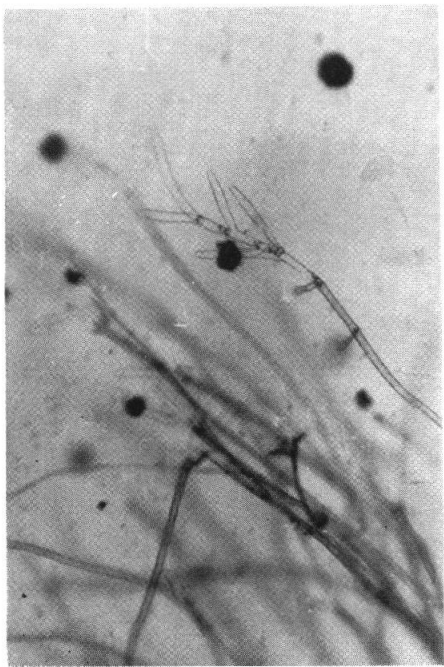


Fig. 6. — Souche E_{or}: *Achlya klebsiana*. On remarque une succession basipétale de sporanges vides et plusieurs sphères de spores (taches sombres).

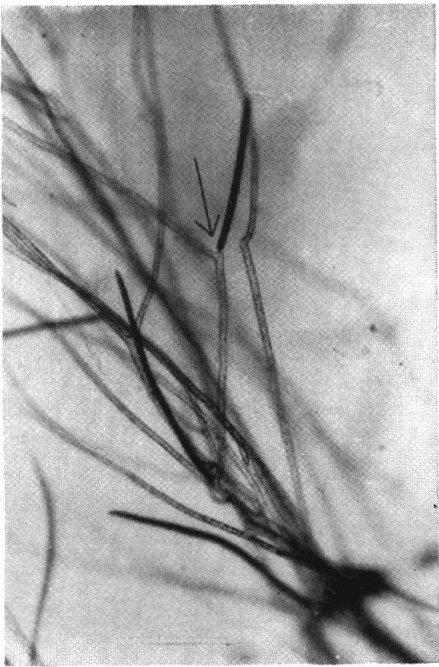


Fig. 7. — Souche E_{or}: *Dictyuchus* sp. Les sporanges sont prêts à se détacher du filament. Dans ce genre, les sporanges quittent les filaments mycéliens et se vident ensuite.

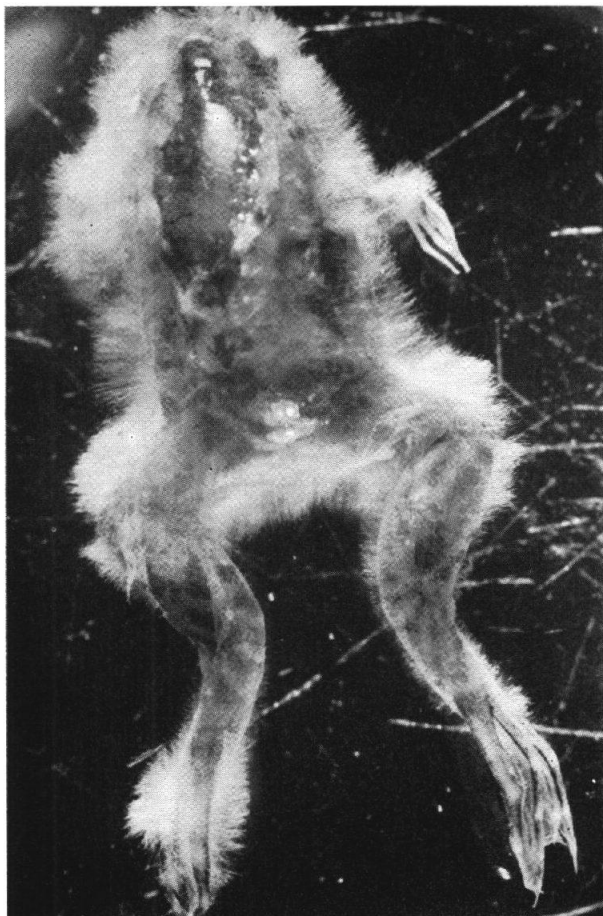


Fig. 8. — *Xenopus laevis*, entièrement recouvert par *Saprolegnia* sp. Jonkershoek Fish Station, Afrique du Sud.

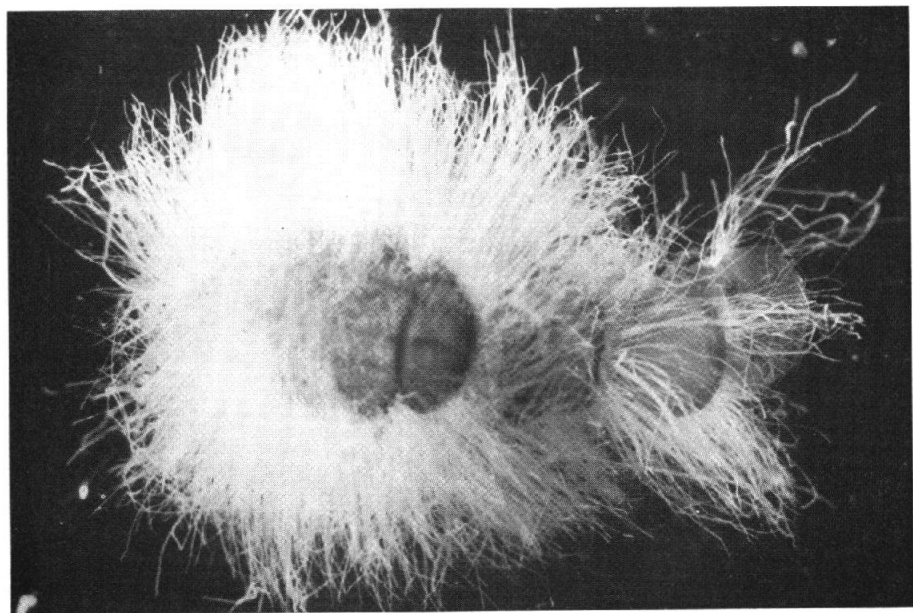


Fig. 9. — Développement de *Saprolegnia* sp. sur un fragment de cadavre d'insecte.
Jonkershoek Fish Station. Afrique du Sud.

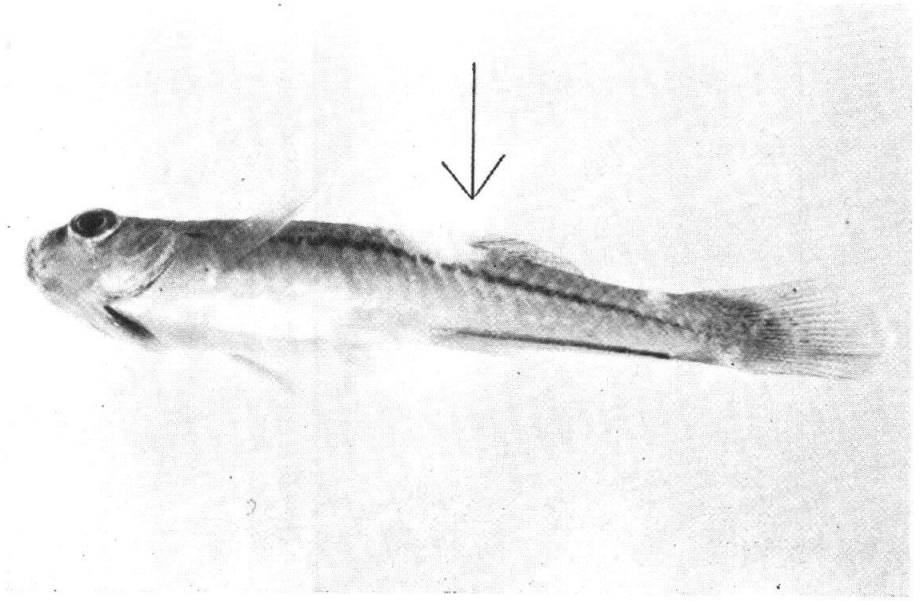


Fig. 10. — *Xiphophorus helleri* 16 heures après inoculation intramusculaire par *A. sp.* (souche E₃₃). Les filaments mycéliens sont fort longs.

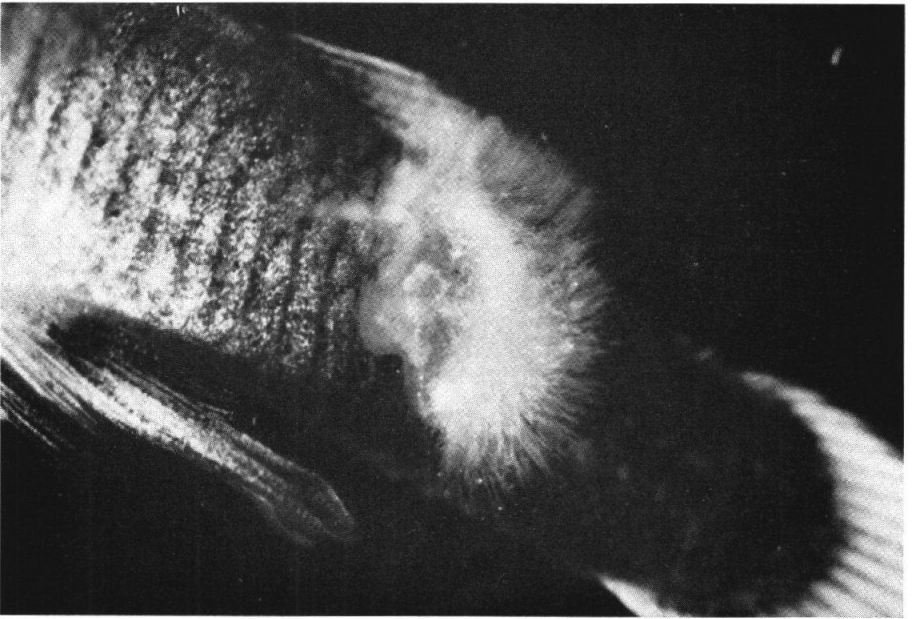


Fig. 11. — Saprolégniose expérimentale du guppy (*L. reticulatus*) 24 heures après exposition à la souche. Cette photo montre la bordure de tissus nécrotiques autour de la touffe de filaments.

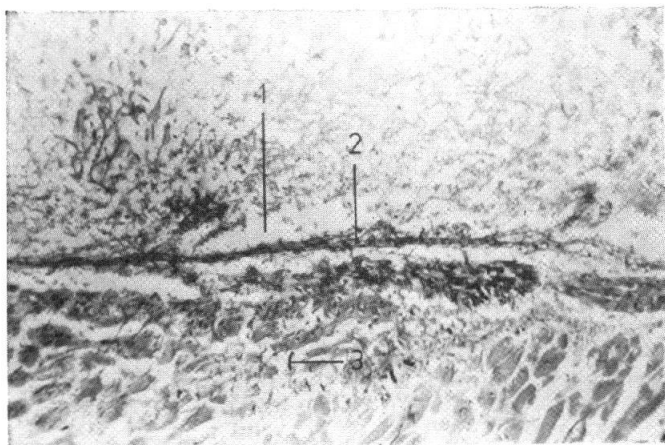


Fig. 12. — Coupe au centre de la lésion fungique.

1. Ancienne localisation de l'ectoderme recouverte de filaments.
2. Derme quasi complètement nécrosé.
3. Mycélium dans la musculature.

X 350

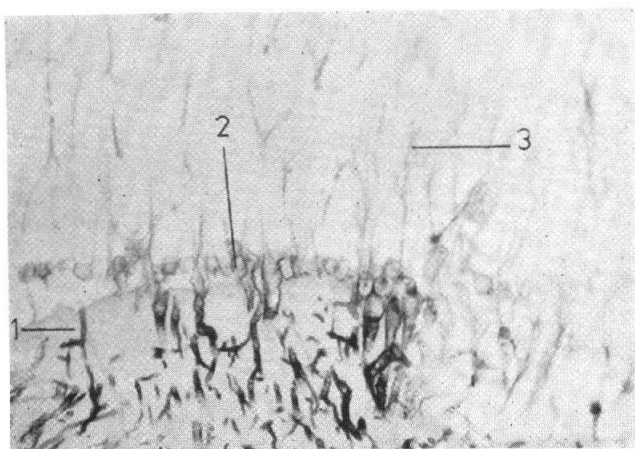
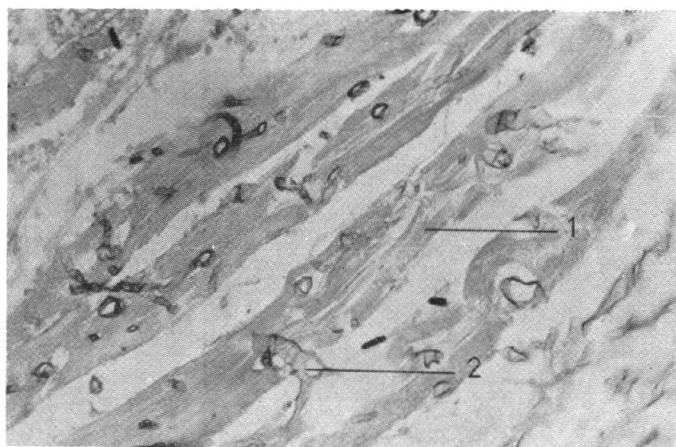


Fig. 13. — *Lebistes reticulatus*: germination de zoospores d'*A.sp.* sur le derme.

1. Tube de germination.
2. Spore.
3. Filaments externes.

X 1.400



1. Fibre musculaire nécrotique.

2. Filament mycélien.

Fig. 14. — Musculature de *L. reticulatus* envahie par *Asp.*
X 875

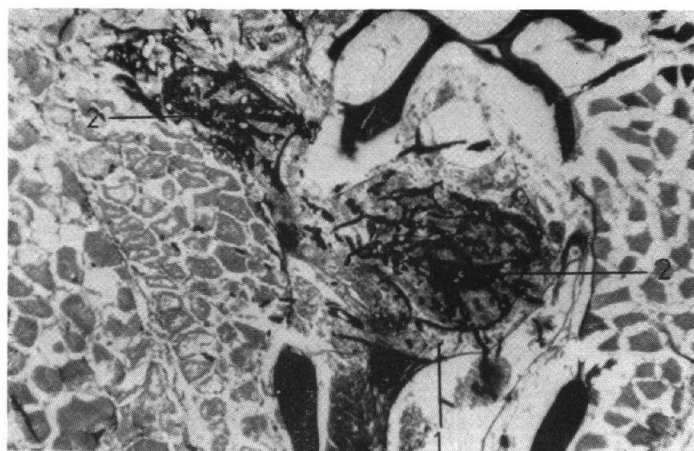


Fig. 15. — *L. reticulatus* atteint de Saprolognieuse.
Coupe transversale au niveau de la lésion fungique.

1. Aorte

2. Masse de filaments mycéliens

X 350



Fig. 16. — *L. reticulatus* atteint de Saprolognieuse.
Coupe transversale au niveau de la lésion fungique.
La flèche montre un filament parasite au sein de la
moelle épinière.
X 350

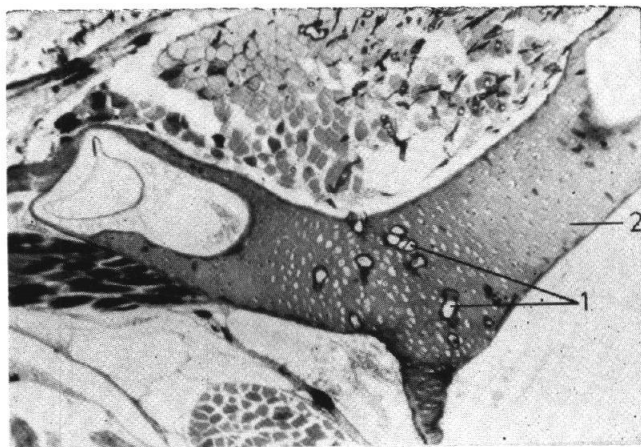


Fig. 17. — *L. reticulatus* atteint de Saprolognieuse céphalique.
Coupe à travers le crâne au niveau de la lésion.
1. Filament mycélien. — 2. Cartilage.
X 875

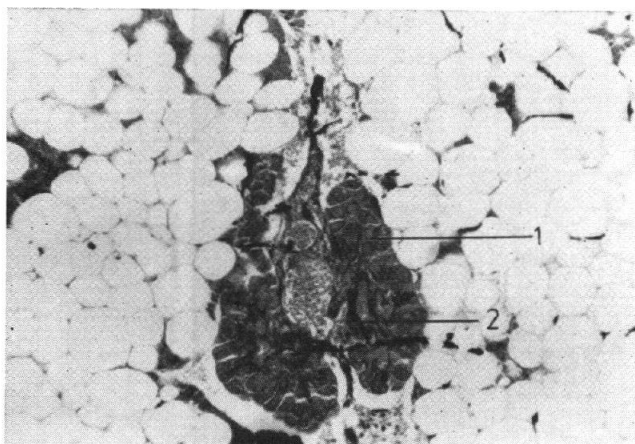


Fig. 18. — *L. reticulatus* atteint de Saprolégniose.
Coupe transversale.
1. Pancréas.
2. Filament mycélien.
X 350

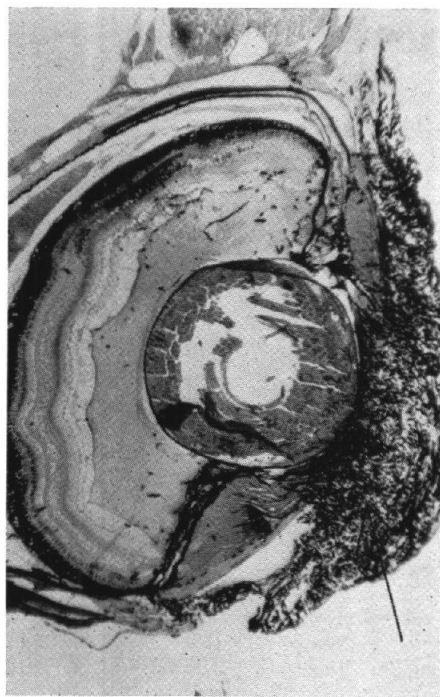


Fig. 19. — Œil de *L. reticulatus* envahi par *A. klebsiana*.
La flèche indique la touffe de filaments mycéliens colorés en noir.
X 350

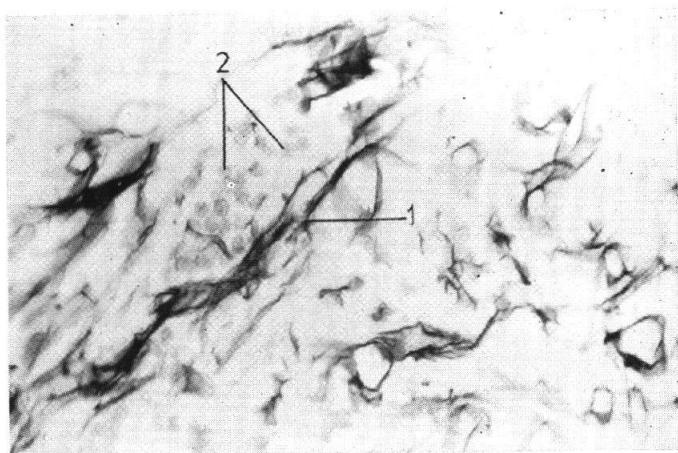


Fig. 20. — *Xiphophorus belleri*, coupe au sein d'une touffe fungique inoculée dans les muscles.

1. Filament mycélien.

2. Spores.

X 1400

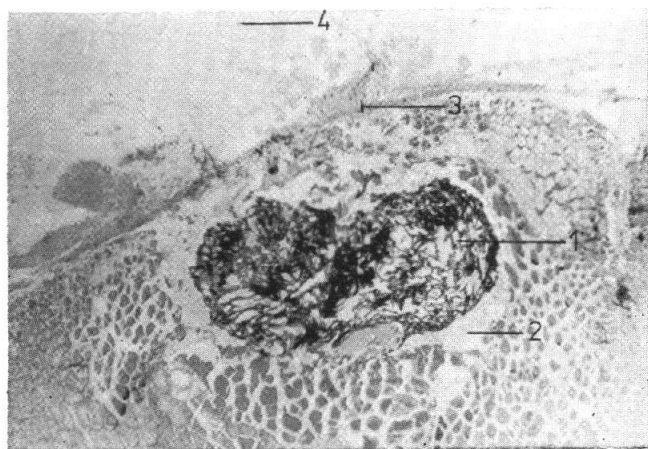


Fig. 21. — *X. belleri*, 16 h. après inoculation intramusculaire par *A. sp.*

1. Inoculum fungique.

2. Zone à infiltration d'histiocytes.

3. Filaments parasites.

4. Touffe apparente macroscopiquement sur la peau.

X 350

Achévé d'imprimer le 14 juin 1974
par l'Imprimerie SNOECK-DUCAJU et Fils, S.A., Gand-Bruxelles