



Heike Schmidt-Posthaus, Dr med vet., Dipl ECVP, Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin,
Institut für Tierpathologie, Länggassstrasse 122, Postfach 8466, CH-3001 Bern

^b
**UNIVERSITÄT
BERN**

Vetsuisse-Fakultät Universität Bern
**Zentrum für Fisch- und
Wildtiermedizin**
Institut für Tierpathologie

Berne, septembre 2011

Surmortalité de truites dans le Doubs frontière: Investigations du FIWI effectuées sur un échantillon de truites du Doubs en janvier 2011 Rapport final

Traduction OFEV

Point de départ

Les premières observations de mortalités aiguës du poisson dans le Doubs ont été signalées en mai 2010 déjà. Les poissons mourants étaient recouverts par des champignons. Aucune cause à l'origine de cette mycose ainsi que de la forte mortalité des poissons n'a pu être identifiée. La situation s'est progressivement améliorée pendant le courant de l'automne 2010. Dès le mois de novembre 2010, une mortalité massive du poisson s'est à nouveau manifestée. L'office fédéral de l'environnement (OFEV), d'entente avec les services cantonaux de la pêche des cantons du Jura et de Neuchâtel, a décidé de lancer une campagne d'échantillonnage systématique couvrant plusieurs secteurs du Doubs. Le centre de compétence des maladies du poisson de l'université de Berne (FIWI) a été mandaté pour pratiquer les analyses. Sur chaque site échantillonné, des poissons malades (atteints) et non malades (sains) ont été prélevés pour analyse.

Matériel et procédure

En date du **20.01.2011**, 5 truites saines et 5 truites atteintes, toutes capturées à l'électricité sur un secteur en amont de **Tariche** (à proximité de St. Ursanne), ont été livrées vivantes au FIWI.

En date du **24.01.2011**, 8 poissons apparemment sains et 6 poissons atteints en provenance de **Goumois** (frontière entre le canton du JU et la France à environ 3 km à l'ouest de Saignelégier) ont été livrés vivants au FIWI.

En date du **25.01.2011**, 5 truites apparemment saines et provenant du **Canal de Fuite de l'Usine de Châtelot** (canton NE) ont été livrées vivantes au FIWI. Aucun poisson atteint originaire de ce secteur n'a été livré au FIWI.

Tous les poissons ont été individuellement mis à mort et analysés. La taille de chaque poisson a été mesurée.

Pour diagnostiquer les parasites externes, des prélèvements de peau et de branchie ont été réalisés et observés au microscope.

Les poissons ont été ouverts afin d'identifier d'éventuelles modifications des organes internes.

Des échantillons de rein, de rate, de foie ainsi que de peau (prélevée aux endroits atteints) ont fait l'objet d'analyses bactériologiques (étalement sur une plaque d'agar de sang). Les plaques ont été incubées pendant 72 heures à 22°C et contrôlées journalièrement afin de déceler une croissance bactérienne. En cas de croissance constatée, les bactéries ont été identifiées par le système d'identification bactérienne API et, dans chaque cas, une coloration de Gram a été effectuée.

Par ailleurs, l'intestin des poissons a été ouvert et un prélèvement du contenu intestinal a été observé au microscope afin de rechercher des parasites. Des modifications des organes internes ont également été recherchées à l'aide du microscope.

Des échantillons de peau (avec et sans atteinte), de branchie, de foie, de rate, de rein et d'intestin ont été stockés dans la formaline (10 %). Le jour suivant, ces échantillons ont été utilisés pour une investigation histologique.

Pour la virologie, des échantillons de rate, de cœur, de caecum pylorique et de rein ont été prélevés et regroupés (1. contrôle sains et 2. poissons atteints); ces échantillons ont été immergés pendant une nuit dans une solution d'antibiotiques et placés en cultures cellulaires. Ces dernières ont été contrôlées journalièrement (croissance de virus). Après 7 jours, les cellules ont été sub-cultivées et à nouveau contrôlées journalièrement pendant 7 jours.

Compte tenu des résultats histologiques des poissons du site de Goumois, des tissus tégumentaires et musculaires atteints par les hyphes du champignon ont été montés sur bloc de paraffine et envoyés au CEFAS à Weymouth (GB) pour identification de l'agent pathogène. Un deuxième échantillon des mêmes blocs de paraffine a été envoyé à Klagenfurt (Autriche: "*Landesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen*") pour un "*second opinion*".

Résultats

20.01.2011, Tariche: les 5 poissons de contrôle ne présentait aucune particularité macroscopique. Quelques parasites (*Gyrodactylus* sp., *Costia* sp. et sessiles) ont été observés sur la peau et les branchies mais dans une proportion considérée comme normale pour des poissons sauvages. Aucune affection bactérienne, virale ou histologique n'a été constatée.

Chez 4 des 5 poissons atteints, de fortes érosions et ulcérations cutanées ont été constatées sur différentes parties du corps, mais essentiellement dans la région céphalique. Ces altérations cutanées étaient causées par des mycoses d'ampleur variable. Les investigations histologiques ont montré que les hyphes du champignon demeuraient localisés en superficie, c'est-à-dire que l'épiderme du poisson était remplacé par du matériel cellulaire mort et par les hyphes du champignon. Les zones cutanées plus profondes ainsi que la musculature n'étaient pas atteintes et les hyphes du champignon y étaient absents.

En plus de parasites (sur la peau et les branchies), dont la présence a également été observée chez les poissons contrôles, des parasites internes comme *Raphidascaris acus* (larve de nématode) ont été constatés dans l'intestin ainsi que des myxosporidies dans la vésicule biliaire. Dans 2 individus, les larves de nématodes avaient effectué une migration à travers la paroi intestinale jusqu'aux tissus graisseux péri-viscéraux et avaient induits une modification de l'intestin, une inflammation granulomateuse ainsi que des nécroses. Ces phénomènes sont connus et s'observent de manière occasionnelle chez la truite. La cause ayant induit la migration des larves de nématode à travers la paroi intestinale demeure non résolue; probablement peut-elle s'expliquer partiellement par un affaiblissement du poisson.

Aucune bactérie et aucun virus n'a pu être isolé à partir des 5 poissons investigués.

24.01.2011, Goumois: là encore tous les poissons contrôles ne présentaient aucune particularité macroscopique. Les analyses parasitologiques ont mis en évidence la présence de quelques *Gyrodactylus* sp et *Dermocystidium* sp. sur la peau et les branchies. La présence de *Cystidicola farionis* et de *Pomphorhynchus* sp. dans la vessie gazeuse a été observée ainsi que d'acantocéphales dans l'intestin. Le taux d'infestation constaté peut toutefois être considéré comme normal pour des individus sauvages. Chez un individu, une flore bactérienne mixte a été constatée mais probablement sans aucun impact sur l'état de santé du poisson. Pour le reste aucune pathologie d'origine bactérienne, virale ou aucune altération histologique n'a pu être identifiée.

Chez les poissons atteints provenant de Goumois, les mycoses étaient particulièrement développées. 3 des 6 poissons analysés montraient des taux de couverture élevé du champignon, atteignant de grandes parties du corps. Un poisson présentait une ulcération de la nageoire ventrale. Du point de vue histologique, les hyphes du champignon s'étendaient plus en profondeur que dans le cas des poissons de Tariche. En général, des nécroses et des réactions inflammatoires étaient visibles dans la peau et jusque dans la musculature sous-jacente. Chez un poisson, les hyphes s'accompagnaient de nécroses et d'inflammations granulomateuses jusque dans le péritoine et le foie.

L'analyse parasitologique était similaire à celle des poissons contrôles, ce qui semble démontrer que, en l'occurrence, les parasites n'avaient aucune conséquence clinique. Chez un individu (qui par ailleurs ne montrait aucune infestation importante du champignon), des traces de migration des larves de nématodes *Raphidascaris acus* à travers la paroi intestinale ont été constatées, accompagnées de fortes réactions inflammatoires et de nécroses.

Les analyses bactériologiques et virologiques n'ont donné aucun résultat à l'exception d'un individu pour lequel une infection par *Aeromonas sobria* a été diagnostiquée; il s'agit probablement d'une découverte annexe, *Aeromonas sobria* étant considérée comme ubiquiste, fréquemment observée dans l'eau.

25.01.2011, Canal de Fuite de l'Usine de Châtelot: tous les poissons de ce site ne présentaient aucune particularité macroscopique. L'analyse parasitologique a montré la présence de quelques *Gyrodactylus* sp., *Dermocystidium* sp., *Trichodina* sp. et de sessiles sur la peau et les branchies. *Cystidicola farionis* a également été observée dans la vessie gazeuse et quelques vers à tête épineuse (*Metechinorhynchus* sp.) dans l'intestin. Ce taux d'infestation doit également être

considéré comme normal pour des truites sauvages. Aucune affection d'ordre bactérien, viral ou histologique n'a été constatée.

Les analyses PCR avec séquençage effectuées au CEFAS (Angleterre) ont identifié une séquence de l'oomycète *Saprolegnia parasitica*. Les investigations effectuées à Klagenfurt (second opinion) ont également identifié une séquence de *Saprolegnia parasitica* ou *Saprolegnia salmonis*.

Résumé

Aucune anomalie ou affection particulière n'a été constatée chez les poissons prélevés et considérés comme sains.

Chez les poissons atteints, la mycose était de loin la pathologie la plus spectaculaire. Alors que les poissons de Tariche n'étaient touchés qu'en surface, les truites de Goumois étaient infectées en profondeur par les hyphes, dans un cas ces derniers se prolongeant jusque dans la musculature ventrale avec des adhérences dans le foie. L'agent pathogène à l'origine de cette infection a été identifié par deux laboratoires indépendants comme l'oomycète *Saprolegnia parasitica* ou *Saprolegnia salmonis*.

L'oomycète *Saprolegnia parasitica* et ses espèces apparentées de la classe des Saprolegniomycetidae touchent plusieurs espèces de poissons, d'amphibiens et de crustacés et ce aussi bien en aquaculture que dans le milieu naturel (Philipps *et al.*, 2008). *Saprolegnia parasitica* a des conséquences économiques importantes, en particulier pour le poisson chat, le saumon et la truite arc-en-ciel. Cette maladie coûte annuellement des millions de dollars aux aquacultures, spécialement aux USA, en Ecosse, en Scandinavie, au Chili, au Japon et au Canada (Hussein & Hatai, 2002). Les espèces de *Saprolegnia* sont également à l'origine de chutes de populations de poissons et d'amphibiens dans le milieu naturel (Aller-Gancedo & Fernandez-Diez, 1986, vanWest, 2006). Les espèces de *Saprolegnia* entraînent en général des infections tégumentaires superficielles dont la pathogenèse reste toutefois complexe et dont leur rôle exact dans le développement de la maladie est souvent peu clair. *Saprolegnia* a longtemps été considéré comme un agent secondaire apparaissant en général après un dommage traumatique du tégument, en cas de surpopulation, de mauvaise qualité des eaux ainsi que de maladie parasitaire, bactérienne ou virale. On suppose que la défense immunitaire du poisson est essentiellement assurée par les couches superficielles des muqueuses de la peau, par l'intégrité de l'épiderme et par la réponse cellulaire sous forme d'activité phagocytaire non spécifique des cellules immunes (Hodkinson & Hunter, 1970; Sohnle & Chusid, 1983; Wood *et al.*, 1986; Pickering, 1994). Une Saprolegniase primaire a été décrite pour la première fois par Hoshima & Ookubo

(1956) et Hoshima *et al.* (1960) dans un élevage d'anguille. Aujourd'hui, il est reconnu que *Saprolegnia* peut générer des pertes considérables de poissons en aquaculture. Cela concerne principalement les géniteurs femelles (Pickering & Willoughby, 1982; Noga, 1993, Bruno & Wood, 1999), fait confirmé suite au déclenchement clinique de la maladie après adjonction d'hormones sexuelles (Roth, 1972; Robertson *et al.*, 1963).

Dans le cas du Doubs, la maladie est apparue essentiellement pendant la période de fraie (ou juste après). Il reste à démontrer si, dans le cas du milieu naturel en question, des modifications de la défense immunitaire du poisson sont intervenues ou si la virulence de l'oomycète a augmenté. Dans ce contexte et afin de mieux cerner les mesures à prendre, les investigations du pathogène (en l'occurrence *Saprolegnia parasitica*) doivent être menées en relation directe avec les modifications intervenues dans l'environnement du poisson.

Bibliographie

Aller-Gancedo, J.M. & Fernández-Díez, M. (1986). *Saprolegnia* infection in wild brown trout (*Salmo trutta*) in the rivers of León (Spain). *Z. Bakteriol Hygiene* 262: 17-18.

Bruno, D.W. & Wood, B.P. (1999). *Saprolegnia* and other Oomycetes. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish diseases and disorders*, Vol 3: viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, p 599-659.

Hodkinson, M. & Hunter, A. (1970). Immune response of U.D.N.-infected salmon to *Saprolegnia*. *J Fish Biol* 2:305-311.

Hoshima, T. & Ookuba, M. (1956). On a fungi disease of eel. *J Tokyo Univ Fish* 42, 1-13.

Hoshina, T., Sano, T. & Sunayamo, M. (1960). Studies on the saprolegniasis of eel. *J Tokyo Univ Fish* 47, 59-79.

Hussein, M.M.A. & Hatai, K. (2002). Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. *Fisheries Science* 68: 1067-1072.

Noga, E.J. (1993). Water mold infections of freshwater fish: recent advances. *Ann Rev Fish Dis* 3: 291–304.

Phillips, A.J., Anderson, V.L., Robertson E.J., Secombes, C.J. & van West, P. (2008). New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* 16, 13-19.

Pickering, A.D. & Willoughby, L.G. (1982). *Saprolegnia* infections of salmonid fish. In: Roberts RJ (ed) Microbial diseases of fish. Academic Press, London, p 271-297.

Pickering, A.D. (1994). Factors influencing the susceptibility of salmonid fish to saprolegniasis. In: Mueller GJ (ed) Salmon saprolegniosis. US Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, OR, p 67-86.

Roth, R.R. (1972). Some factors contributing to the development of fungus infection in freshwater fish. *J Wild Dis* 8, 24-28.

Robertson ,O.H., Hane, S., Wexler, B.C. & Rinfret, A.R. (1963). The effect of hydrocortisone on immature rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 3, 422-436.

Sohnle, P.G. & Chusid, M.J. (1983). Defence against infection with filamentous fungi in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol A* 74: 71-76.

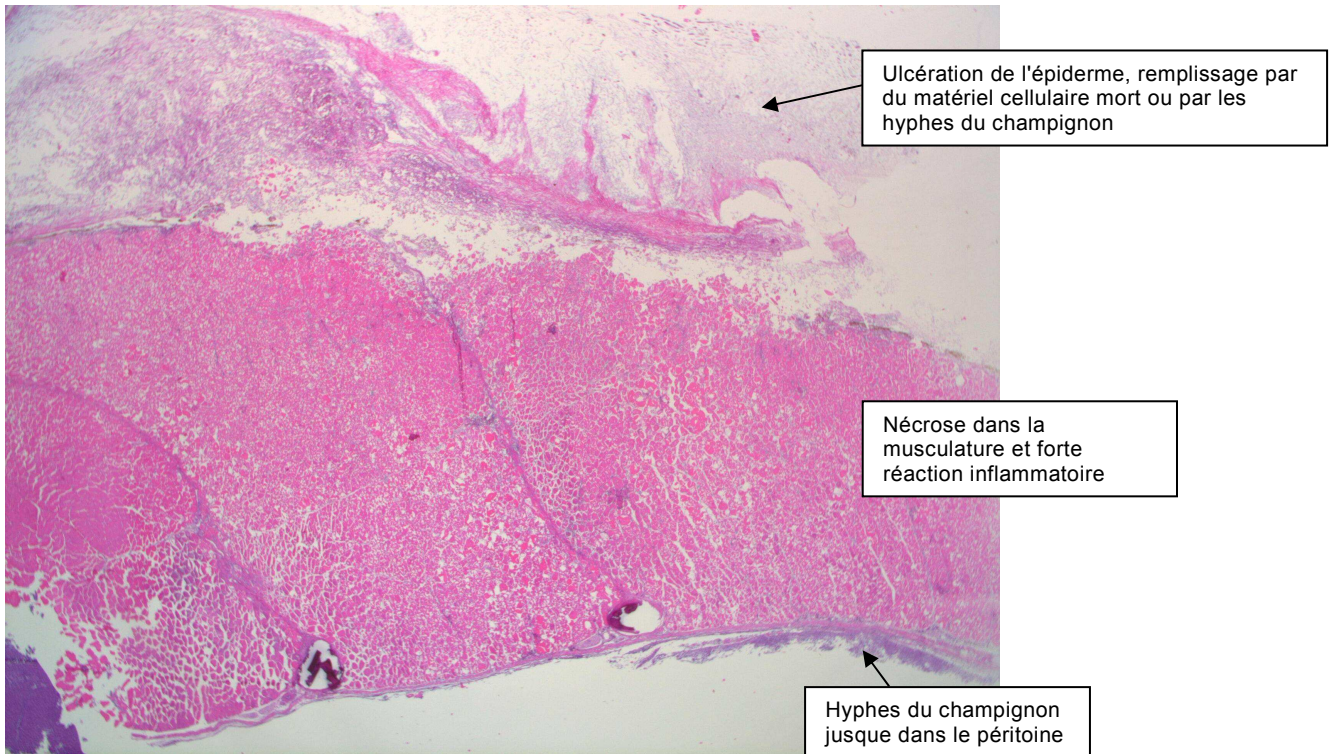
van West, P. (2006). *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20, 99-104.

Wood, S.W., Willoughby, L.G. & Beakes, G.W. (1986). Preliminary evidence for inhibition of *Saprolegnia* fungus in the mucus of brown trout, *Salmo trutta* L., following experimental challenge. *J Fish Dis* 9: 557-560.

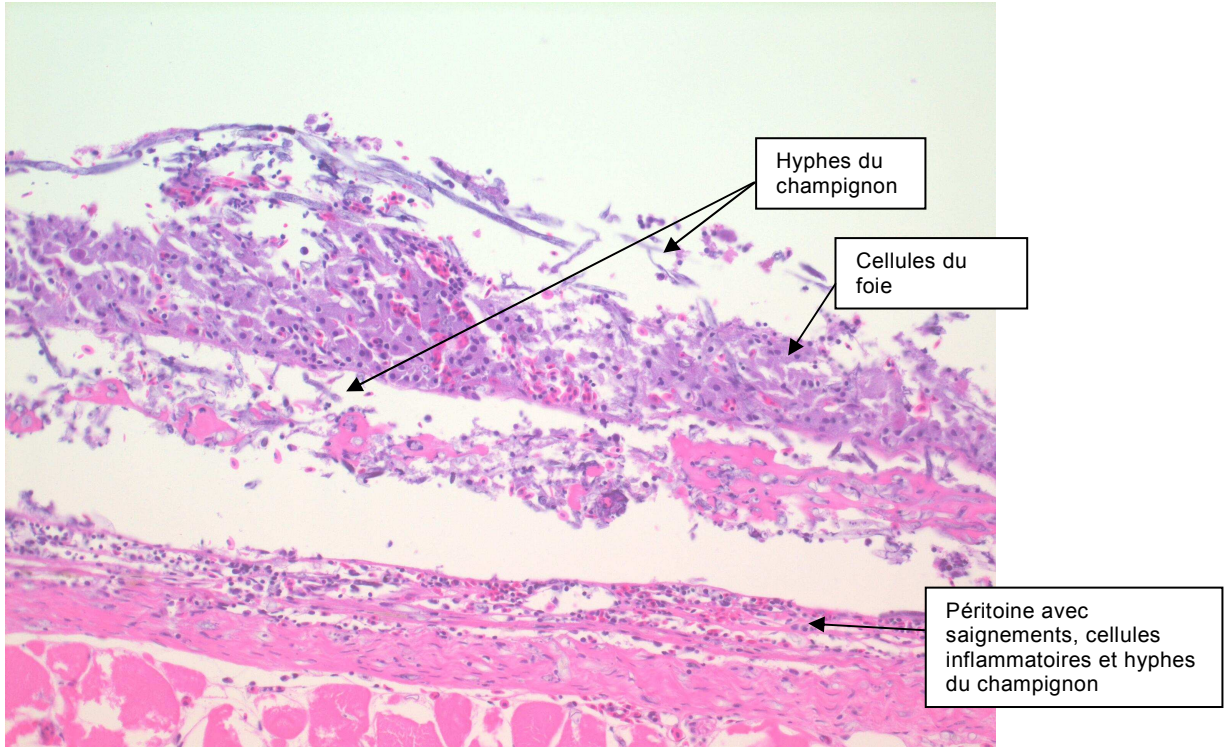
Figures



Truite du Doubs du site de Tariche avec mycose importante sur la zone céphalique



Coupe histologique d'une truite atteinte en provenance du site de Goumois. Les couches superficielles de la peau sont remplacées par du matériel cellulaire mort, des hyphes du champignon et de quelques cellules inflammatoires. La musculature sous-jacente est nécrosée, les hyphes du champignon croissent à travers toutes les couches de la peau et de la musculature jusque dans le péritoine.



Vue rapprochée des hyphes du champignon dans le péritoine et le foie