

Un champignon menace les amphibiens

Qu'avons-nous appris sur la chytridiomycose ?

Les maladies infectieuses émergentes représentent un enjeu majeur pour la biodiversité et la santé humaine. Des champignons pathogènes provoquent des mortalités massives dans la faune sauvage comme chez les chauves-souris ou les amphibiens. L'observation du déclin ou la disparition de populations d'amphibiens à la fin du xx^e siècle a généré de nombreux travaux sur des causes « globales ». L'accès à des animaux morts sur le terrain a également permis des études épidémiologiques et l'identification d'un champignon, responsable de la maladie appelée « chytridiomycose ». Avec les synthèses régulières sur ce champignon, des résultats très récents apportent des éléments novateurs sur sa répartition et les facteurs qui concourent à en faire une maladie émergente à enjeu important pour la batrachofaune.

Claude MIAUD*

Lorsque le terrarium du Parc zoologique national de Washington a subi des mortalités massives inexplicées dans son élevage de dendrobate bleu (*Dendrobates azureus*), au moment de la métamorphose, Joyce Longcore, une chercheuse en mycologie de l'Université du Maine (Etats-Unis), a identifié et nommé en 1997 le champignon découvert dans l'épiderme de l'un de ces individus morts. Ce *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) est classé dans l'ordre des chytrides (cf. encadré ci-contre) : des champignons très communs, **hétérotrophes**, **ubiquistes** et cosmopolites qui vivent principalement dans l'eau et le sol. Mais *Bd* est le seul chytride qui parasite un vertébré. Il se développe sur la kératine de l'épiderme¹ des jeunes métamorphosés et des amphibiens adultes, et sur les pièces buccales des têtards.

Chytridiomycose : la maladie

Bd est l'agent **étiologique** de la maladie chytridiomycose. Les individus touchés par l'infection présentent des changements comportementaux (léthargie, manque d'appétit), des troubles neurologiques (perte de réflexes) et des lésions cutanées comme une ternissure et une coloration inégale de la peau, une **hyperplasie** et une kératinisation (épaississement du

1- L'épiderme est constitué de plusieurs couches de **cellules épithéliales** et spécialisées. Les couches épidermiques sont (en partant du plus profond) : les *stratum germinativum*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, et le *stratum corneum*. Les cellules du *stratum corneum* – même dans les couches plus profondes où elles sont moins différenciées en **kératinocytes** – constituent la cible de *Bd*.



Photo Yves Thonnérieux

C'est au dendrobate bleu (*Dendrobates azureus*) que *Bd*, agent de la chytridiomycose, doit son nom.

Les mots écrits en vert dans le texte renvoient au lexique page 50.

*Directeur d'études à l'École pratique des hautes études, UMR 5175 CEFE, Biogéographie et écologie des vertébrés, Montpellier

Vues au microscope optique montrant la colonisation de l'épiderme d'un amphibien par les zoospores de *Bd*. Echelle : le trait noir en bas à droite de chaque cliché mesure 10 μ m



stratum corneum), des ulcérations ou une succession excessive de mues. Mais ces signes cliniques, non spécifiques de la chytridiomycose, contribuent seulement à suspecter la maladie.

On détecte le champignon et la réponse infectieuse éventuelle par l'observation **histologique** de l'épiderme. La méthode actuellement la plus utilisée consiste à réaliser un frottis cutané, puis à extraire et amplifier l'ADN de *Bd*.

Ce champignon perturbe les transports d'électrolytes à travers l'épiderme (la question de la production de toxines est à l'étude). La réponse à l'infection varie selon les espèces : depuis l'absence de symptôme jusqu'à un taux de létalité de 100 %.

Certaines espèces, comme le xénope lisse, ont un épiderme recouvert d'une couche de mucus faisant office de barrière mécanique contre l'infection. En outre, la peau des amphibiens est couverte de **symbiotes** microbiens – comme la bactérie *Janthinobacterium lividum* – capables de diminuer la charge parasitaire ou même d'éliminer *Bd*.

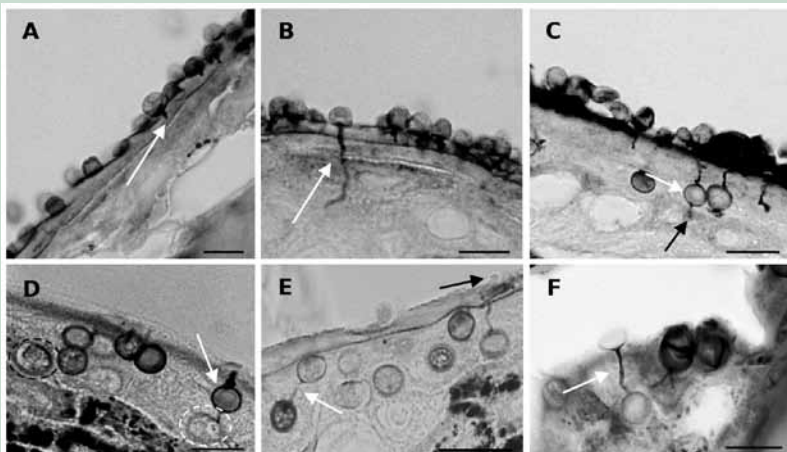
Les amphibiens ont un système immunitaire efficace : une réponse immune innée est la production, par des glandes épidermiques, de peptides antimicrobiens et de métabolites antifongiques, inhibant la croissance de *Bd* et constituant la première ligne de défense contre les infections. Mais leur rôle dans la protection des amphibiens dans la nature reste à évaluer,

Qui est *Batrachochytrium dendrobatidis* ?

Règne : Champignon ; Division : Chytridiomycota ; Classe : Chytridiomycètes ; Ordre : Chytridiales ; Famille : Chytridiaceae
Genre et espèce : *Batrachochytrium dendrobatidis*, Longcore J.E., Pessier A.P. & Nichols D.K. 1999

Bd est un champignon aquatique, avec une reproduction sexuée ou asexuée. Durant son cycle asexué, *Bd* présente une phase mobile, la **zoospore**, qui comporte une tête sphérique de 3 à 5 µm et un flagelle de 20 µm de long. Elle est capable de réaliser des mouvements de l'ordre de quelques centimètres et présente une affinité **chimio-tactile** pour les substrats kératinisés. L'infection se transmet par cette phase mobile : les zoospores (cliché A, flèche blanche) s'enkystent dans les cellules superficielles de l'épiderme de l'hôte. Le flagelle est résorbé, et *Bd* est maintenant en phase fixée dite « germe ». Ce germe développe un tube (cliché B, flèche blanche) et intègre une cellule épidermique puis se propage en s'enfonçant dans les couches épidermiques plus profondes (cliché C). *Bd* entre dans un cycle de maturation avec le développement d'un **sporange** de 10 à 40 µm qui est alors ramené par les cellules épidermiques en différenciation dans la couche superficielle de la peau (clichés D et suivants). Au bout de quelques jours, le sporange contient de nombreuses zoospores qui se libèrent dans l'eau, bouclant ainsi le cycle vital en quatre à cinq jours.

Source : Van Rooij P., Martel A., D'Herde K., Brutyn M., Croubels S, et al. 2012. Germ Tube Mediated Invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibian Skin is Host Dependent. PLoS ONE 7(7): e41481. doi:10.1371/journal.pone.0041481



La kératine de l'épiderme des amphibiens est une kératine « tendre » : *Bd* possède un système enzymatique qui lui permet sa biodégradation. L'étendue de la colonisation de *Bd* dépend des caractéristiques intrinsèques de l'épiderme de l'hôte.

En culture, *Bd* peut se développer dès 4° C, mais sa croissance est la plus rapide entre 17 et 25° C et une température au-delà de 30° C lui est fatale. L'utilisation de ce **preferendum thermique** et la description des variables environnementales des localités où il est observé ont permis des modélisations de la distribution attendue du champignon à l'échelle mondiale. A l'exception des zones arctiques et désertiques, ce champignon apparaît potentiellement cosmopolite.

ainsi que les interactions avec la température et la présence de bactéries colonisant l'épiderme.

La pathogénicité de *Bd* varie également en fonction du stade de développement des individus infectés. Chez le têtard, qui possède de la kératine uniquement au niveau du disque oral, la chytridiomycose n'est pas mortelle. Les jeunes métamorphosés, dont l'épiderme est entièrement kératinisé, sont en revanche très sensibles à l'infection.

L'impact de la chytridiomycose sur les amphibiens

L'implication de la chytridiomycose dans le déclin ou la disparition d'espèces d'amphibiens est connue en Amérique du Nord, en Amérique centrale, en Europe et en Australie.

En Amérique centrale, la décimation de populations d'altitude au Costa Rica est observée dès la fin des années 1980, et la propagation de *Bd* sous la forme d'une vague épidémique du nord au sud de la cordillère de l'isthme de l'Amérique centrale est bien renseignée grâce aux sui-

vis de terrain et à l'existence de collections historiques. Anticipant l'arrivée du pathogène, un programme de suivi de la communauté d'amphibiens est mis en place en 1998 dans le Parc national d'El Copé au Panama. Des transects standards sont réalisés dans une aire de 4 km² de 2000 à 2003, afin d'estimer les abondances des espèces avant l'arrivée de *Bd*, et de 2006 à 2008, pour les estimer après l'épidémie. Sept ans avant l'arrivée de *Bd*, 63 espèces sont identifiées dans l'aire d'étude. *Bd* est détecté sur les premiers individus en 2004.

La maladie cause la disparition de 25 espèces et l'abondance décline de 85 à 99 % chez 17 espèces. L'usage d'outils moléculaires a permis d'augmenter le nombre d'espèces découvertes à El Copé de 2000 à 2003 (11 « espèces candidates ») avant l'arrivée de *Bd*, et 5 de celles-ci ont été décimées avant même qu'elles ne soient taxonomiquement décrites...

Vance Vredenburg et son équipe de l'Université de Berkeley (Californie) suivent depuis de nombreuses années les populations de la grenouille à pattes jaunes des montagnes de Californie (*Rana muscosa*) qui colonisent

Une salamandre tachetée (Salamandra salamandra).

La « Laguna de Pájaros » dans le Parc naturel de Peñalara (Espagne) qui accueillait une grande population d'Alytes obstetricans avant son crash provoqué par la chytridiomycose.

Photo Jaime Bosch





Photo Fabien Michel

des centaines de lacs de la Sierra Nevada. De 1996 à 2008, 88 sites aquatiques peuplés par cette grenouille dans 3 régions ont été étudiés. *Bd* est observé pour la première fois en 2004, ainsi que des centaines de grenouilles mortes et mourantes. Sur cette période, le nombre de grenouilles adultes est passé de 9 461 à 505, soit une chute de presque 90 % ! Concomitamment, dans 7 sites non touchés par *Bd*, les populations de *R. muscosa* augmentent de 45 %. Le caractère pathogène de *Bd* sur cette grenouille est montré par des expériences d'inoculation au laboratoire. La chytridiomycose est bien la cause du déclin et met en péril cette espèce dans la Sierra Nevada californienne.

La vitesse de propagation de *Bd* dans cette chaîne de montagne, de 688 m/an, est plus faible que celle observée en Amérique centrale, Amérique du Sud et Australie (17 à 282 km/an).

En Europe, l'impact de *Bd* sur les amphibiens est renseigné par les travaux de l'équipe de Jaime Bosch du Muséum national d'histoire naturelle de Madrid qui a décrit la première mortalité d'amphibiens dans le Parc naturel de Peñalara (Espagne). Durant les étés 1997, 1998 et 1999, une mortalité massive de jeunes alytes accoucheurs (*Alytes obstetricans*) est observée. Cette espèce, présente dans 35 mares, ne l'était plus que dans 5 en 1999, soit une régression de 86 %. De 2001 à 2003, des centaines de larves, juvéniles et adultes de salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*) sont trouvées mortes. Des crapauds communs (*Bufo bufo*) métamorphosés sont également découverts morts ou malades, mais parmi des centaines d'autres en bonne santé. Des analyses histologiques révèlent la présence de *Bd* dans l'épiderme des individus morts.

En 2002, une mortalité massive de jeunes alytes accoucheurs est observée à Ibon Acherito dans la vallée de l'Echo (Pyrénées espagnoles,

Dernière minute !

La salamandre tachetée subit un déclin dramatique dans les Pays-Bas (96 % des populations disparues entre 2010 et 2013). Des animaux sont trouvés morts sur le terrain ainsi que dans un élevage (programme de conservation ex situ). Un champignon cause de fortes ulcérations cutanées et la mort rapide des individus. Inoculé à des alytes accoucheurs – connus pour leur sensibilité à Bd –, le champignon ne se développe pas et les individus survivent. Les caractéristiques génétiques et morphologiques amènent à la description d'une nouvelle espèce de chytride pathogène appelé Batrachochytrium salamandrivorans.

Aragon). Une prospection dans 19 lacs du secteur (en Pyrénées-Atlantiques et Hautes-Pyrénées du côté français) est ensuite réalisée en 2006 par Susan Walter et Matthew Fisher, chercheurs au département des maladies

Mortalité de *Rana muscosa* dans la Sierra Nevada californienne.

Photo Vance T. Vredenburg





Photo Valérie Guittet

Un crapaud commun (*Bufo bufo*).

infectieuses de l'Imperial College de Londres. *Bd* est découvert dans 5 des 19 populations d'amphibiens échantillonnées. Des amphibiens morts (alytes et salamandres tachetées) sont trouvés dans les deux lacs les plus proches d'Ibon Acherito (moins de 10 km), en vallée d'Aspe (Pyrénées-Atlantiques). Ces mortalités sont les premières associées à la chytridiomycose en France, ce qui génère de nombreuses études dans les Pyrénées par les épidémiologistes londoniens, l'équipe de Dirk Schmeller du laboratoire d'Ecologie du CNRS de Moulis (Ariège), avec la collaboration du Parc national des Pyrénées. A partir de 2006, les enquêtes menées dans la chaîne des Pyrénées montrent que *Bd* est présent dans deux régions (Béarn et Néouvielle), dans plusieurs lacs de montagne où des mortalités d'alytes affectent jusqu'à 80 % des individus à la métamorphose. Des études sont menées dans certains lacs afin de comprendre les mécanismes de l'émergence de *Bd*, son effet sur les populations d'amphibiens et les méthodes de limitation de son impact.

La répartition de *Bd* en France

Selon l'étude épidémiologique lancée en 2011 en France² dans le cadre du programme européen RACE³ et permise par l'implication de très nombreuses structures (Parcs nationaux

et régionaux, réserves, conservatoires, départements, ONG, entreprises privées), *Bd* est présent dans toutes les régions de France, avec une occurrence globale⁴ de 32 % et une prévalence⁵ moyenne de 16 % dans les sites où il est observé.

Bd est détecté sur la plupart des espèces (11 anoures et 7 urodèles) avec des prévalences très variées, allant de 16 % chez les grenouilles « vertes » à moins de 5 % chez la grenouille rousse, le crapaud commun et les tritons.

Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles observées à ce jour dans 9 autres pays d'Europe occidentale.

L'avancée des connaissances épidémiologiques sur *Bd* apporte donc un tableau paradoxal, avec des régions du monde où sont observées des mortalités massives, et de nombreuses autres où *Bd* est largement répandu sans mortalité évidente⁶.

Vers la résolution du paradoxe

L'accumulation d'études de génétique de *Bd* originaires de différentes régions du monde et d'expériences d'inoculation sur de nombreuses espèces sert à avancer dans la résolution de ce paradoxe.

L'équipe de Matthew Fisher de l'Imperial College de Londres a réalisé le séquençage du génome complet (24 millions de nucléotides) de 20 isolats de *Bd* collectés en Afrique du Sud, Amérique du Nord et centrale, Australie et Europe, sur 11 espèces d'amphibiens. Huit de ces isolats proviennent de régions du monde où des mortalités massives sont documentées. La comparaison des génomes met en évidence trois lignées très divergentes. Le premier regroupement comprend les isolats récoltés sur les cinq continents et associés à des mortalités (lignée *Bd*-GPL). L'isolat récolté en Suisse forme un autre groupe. Enfin, les isolats d'Afrique du Sud

2- Plus de 300 populations échantillonnées.

3- Risk Assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity - <http://www.bd-maps.eu/>.

4- Nombre de sites avec au moins un individu *Bd*+ par rapport au nombre total de sites échantillonnés.

5- Nombre d'individus *Bd*+ par rapport au nombre d'individus par site.

6- Un bon exemple, étudié par Benedikt Schmidt, chercheur à l'Université de Zurich, est la situation de l'alyte accoucheur en Suisse. Cet amphibien a vu ses populations décliner de 50 % au cours des vingt-cinq dernières années, sans dégradation de ses habitats, l'une des causes majeures de la disparition des amphibiens en Europe. *Bd* est largement répandu en Suisse, mais aucune mortalité massive n'a jamais été observée sur le terrain dans ce pays. Toutefois, à ce jour quatre jeunes alytes métamorphosés ont été trouvés morts et présentaient une forte charge de zoospores de *Bd*.

et d'Espagne (Majorque) forment le troisième regroupement. Des chercheurs japonais, chinois et américains ont récemment confirmé l'existence de nouvelles lignées infestant des espèces endémiques au Japon, en Chine et au Brésil.

Des expériences d'inoculation confirment la forte virulence de la lignée *Bd*-GPL par rapport aux autres lignées identifiées. Enfin, la connaissance du génome des lignées a mis en évidence un phénomène de recombinaison (mélange de génomes) au sein de la lignée *Bd*-GPL, à une date très récente (xx^e siècle).

Le scénario qui apparaît est que ce champignon parasite des amphibiens existe sous la forme de nombreuses lignées réparties sur tous les continents, avec une coévolution hôte-parasite permettant le maintien de cette interaction. Des amphibiens comme la grenouille taureau, les grenouilles « vertes » et le xénope lisse font l'objet depuis le début du xx^e siècle d'un commerce intensif pour la consommation et la recherche médicale. Ces espèces, récoltées sur des marchés en Asie ou dans des fermes d'élevage, comportent souvent des charges en zoospores de *Bd* importantes. Relâchées ou échappées dans la nature, elles ont favorisé le contact avec des lignées de *Bd* préexistantes et, ainsi, l'apparition d'une lignée recombinée hypervirulente. C'est cette lignée qui est présente dans tous les sites où des mortalités sont observées à ce jour dans le monde, incluant les lacs pyrénéens.

Ce scénario devrait être conforté par l'accumulation de données sur la virulence des lignées, leur diversité et leur ancienneté (analyses des collections muséologiques).

Pour la France, la grenouille taureau, acclimatée en Gironde et en Loir-et-Cher, est porteuse de *Bd* avec une prévalence importante.

Le xénope lisse, acclimaté dans

le Centre-Ouest, présente une très faible prévalence. Dans ces régions de France, il n'y a actuellement pas d'observation de mortalité massive attribuable à la chytridiomycose. Pour les lacs pyrénéens, il faut élucider comment la lignée virulente a pu infester les amphibiens de ces sites reculés d'altitude. Quant au reste de notre territoire, il existe sûrement une ou plusieurs autres lignées pour lesquelles les défenses



Photo Matthew Fisher

des amphibiens ont coévolué et qui ne provoqueraient pas ou peu de mortalité.

Des moyens de lutte ?

Le risque associé à *Bd* dépend d'interactions complexes entre la virulence du champignon, la composition de la communauté d'amphibiens, la susceptibilité relative des espèces et les conditions environnementales. La prévention de l'apparition de lignées virulentes formées par recombinaison nécessite évidemment des mesures de contrôle du commerce mondial des amphibiens. La limitation de la propagation de ces lignées à l'échelle régionale inclut la découverte de l'origine de l'introduction de cette lignée et des mesures pour diminuer la prévalence du champignon pathogène dans les populations infestées. Des idées sont testées dans ce sens : utilisation des

Mortalité de jeunes Alytes obstetricans à la métamorphose dans les Pyrénées en 2011.



Photo Kriton Kunz

bactéries de l'épiderme et des substances antifongiques sécrétées par les amphibiens, élévation de la température, produits antifongiques pour diminuer

Un xénope lisse (Xenopus laevis).

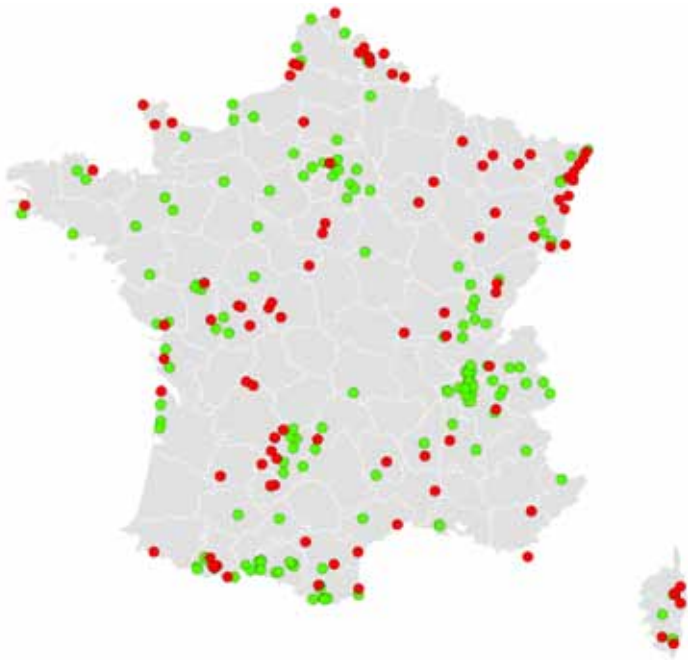


Illustration Claude Miaud

Répartition de Bd en France.

Point rouge :
population de 30 individus ou plus ayant au moins un individu Bd+.

Point vert :
population de 30 individus ou plus n'ayant aucun individu Bd+.

la charge de zoospores principalement chez les têtards afin de limiter leur rôle de réservoir. Dans des pays où Bd conduisait des espèces à l'extinction, des programmes d'élevage en captivité sont en cours. L'espoir est que ces mesures à portée locale évitent la disparition d'espèces et les aident à développer des résistances naturelles.

Le message final de cet article est que la chytridiomycose n'est certainement qu'un exemple des nombreuses maladies émergentes de la faune sauvage à venir. Des mortalités d'amphibiens associées aux Ranavirus sont maintenant

observées en France. Comme souvent, prévenir est mieux que guérir et la prévention commence par la surveillance. Vous pouvez ainsi participer en faisant connaître le site www.alerte-amphibien.fr et en y déclarant vos observations d'amphibiens « malades ».

L'ensemble des personnes impliquées dans la découverte ou la gestion de la nature doit tenir compte de la dimension épidémiologique par l'application de bonnes pratiques d'hygiène sur le terrain et par la prise en compte de ce risque dans les plans de gestion et autres actions réglementaires.

C. M.

Remerciements :

Mes remerciements sincères aux collègues et amis du programme RACE, M. Auliya, J. Bosch, M. Fisher, T. Garner, D. Schmeller et B. Schmidt pour le partage d'informations non publiées. Les milliers de qPCR de l'étude en France sont réalisées par Nadine Curt-Grand-Gaudin (LECA, Université de Savoie). Le programme de surveillance des maladies des amphibiens a été initié par T. Dejean dans le cadre de sa thèse de doctorat avec le soutien du Parc naturel régional du Périgord-Limousin. Enfin, un grand merci à l'ensemble des participants à l'échantillonnage des amphibiens au cours de ces dernières années, sans qui une étude épidémiologique à cette échelle n'aurait jamais pu être envisagée.

Pour en savoir plus

Berger L., Hyatt A.D., Speare R. & Longcore J.E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 51-63.

Daszak P., Cunningham A.A. & Hyatt A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science*, 287: 443-449.

Dejean T., Miaud C. & Ouellet M. 2010. La chytridiomycose : une maladie émergente des amphibiens. *Bulletin de la Société herpétologique de France*, 134: 27-46.

Farrer R.A., Weinert L.A., Bielby J. et al. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 18732-18736.

Garner T.W.J., Perkins M.W., Govindarajulu P. et al. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2: 455-459.

Johnson M. L. & Speare R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65: 181-186.

Martel A., Spitzen-van der Sluijs A., Blooi M. et al. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *PNAS* September, 3, doi: 10.1073/pnas.1307356110.

Schloegel L.M., Toledo L.F., Longcore J.E., Greenspan S.E., Vieira C.A., Lee M., Zhao S., Wangen C., Ferreira C.M., Hipolito M., Davies A.J., Cuomo C.A., Daszak P. & James T.Y. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21: 5162-5177.

Tobler U., Borgula A. & Schmidt B.R. 2012. Populations of a susceptible amphibian species can grow despite the presence of a pathogenic chytrid fungus. *Plos One*, 7: e34667.