



**HAL**  
open science

# Aspergillose aviaire : développement d'un modèle d'aspergillose chez la dinde (*Meleagris gallopavo*) et évaluation de l'efficacité de l'énilconazole

Elise Melloul

## ► To cite this version:

Elise Melloul. Aspergillose aviaire : développement d'un modèle d'aspergillose chez la dinde (*Meleagris gallopavo*) et évaluation de l'efficacité de l'énilconazole. Biologie animale. Université Paris-Est, 2015. Français. NNT : 2015PEST1183 . tel-01373927

**HAL Id: tel-01373927**

**<https://theses.hal.science/tel-01373927>**

Submitted on 29 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## Doctorat ParisTech

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité :

*présentée et soutenue publiquement par*

**Elise MELLOUL**

le 26 janvier 2015

## **Aspergillose aviaire : Développement d'un modèle d'aspergillose chez la dinde (*Meleagris gallopavo*) et évaluation de l'efficacité de l'énilconazole**

Directeur de thèse : **Pr Jacques GUILLOT**  
Co-encadrement de la thèse : **Dr Pascal ARNE**

### Jury

**M. Jean-Luc GUERIN**, Professeur, UMR INRA-ENVT 1225, ENVT  
**M. Jean MENOTTI**, MCU-PH, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Paris-Diderot  
**Mme. Françoise BOTTEREL**, Professeur, Equipe Dynamyc, Paris-Est Créteil  
**Mme. Christèle GOUDEAU**, Docteur vétérinaire, Elanco  
**M. Jacques CHANDENIER**, Professeur, Parasitologie, Faculté de Médecine de Tours  
**M. Pascal ARNE**, Maître de Conférences, Equipe Dynamyc, ENVA  
**M. Jacques GUILLOT**, Professeur, Equipe Dynamyc, ENVA

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Co-directeur  
Co-directeur

**Je dédicace cette thèse à Vincent**



## RESUME

*Aspergillus fumigatus* est un agent pathogène respiratoire majeur chez les oiseaux d'ornement comme de production. L'aspergillose qui peut être responsable de mortalités importantes et de chutes de performances est difficile à traiter. Nous avons développé un modèle d'aspergillose aiguë chez le dindonneau en inoculant différents lots d'oiseaux âgés de moins d'une semaine *via* une aérosolisation intratrachéale de doses croissantes de conidies ( $10^5$  à  $10^8$ /animal) en utilisant un MicroSprayer®. Le développement de la masse fongique a été évalué par qPCR, dosage du galactomannane (GM), culture fongique et évaluation histopathologique dans le but de comparer les résultats obtenus en fonction du nombre de conidies inoculées. Une mortalité significative a été observée dans les 4 jours suivant l'inoculation uniquement pour l'inoculum le plus concentré. Les résultats des différents marqueurs du développement du champignon (culture, qPCR et GM), sont très bien corrélés avec la dose de l'inoculum administrée. Les moyennes d'équivalents conidies/g de poumon obtenues par qPCR étaient  $1,3 \log_{10}$  plus importantes que les numérations obtenues par culture sur gélose. Ce nouveau modèle incluant une combinaison inédite de biomarqueurs chez la dinde a été utilisé pour évaluer l'efficacité de l'énilconazole, seule molécule utilisée en élevage avicole pour lutter contre l'aspergillose. Dans deux expérimentations distinctes, des dindonneaux infectés avec  $10^7$  (ExpB) ou  $10^8$  (ExpA) conidies d'*A. fumigatus* ont été traités par aérosolisation d'énilconazole à la dose de  $20 \text{ mg/m}^3$  une (ExpA) ou deux fois (ExpB) par jour pendant 3 jours consécutifs, ou par itraconazole (ExpB) par voie orale à la dose de  $10 \text{ mg/kg}$  pendant 7 jours. La mortalité des dindes infectées et traitées par l'itraconazole a été réduite à 0, contrairement aux dindes non-traitées ou traitées par l'énilconazole (40 % de mortalité). Aucun effet protecteur ni aucune différence au niveau de la masse fongique mesurée dans les poumons par numération sur géloses, dosage du GM ou qPCR n'ont été observés chez les dindonneaux traités par l'énilconazole à l'issue des deux expérimentations.

**Mots clés :** Dinde, aspergillose, modèle, *Aspergillus fumigatus*, énilconazole, qPCR, galactomannane



## ABSTRACT

*Aspergillus fumigatus* remains a major respiratory pathogen in both ornamental and poultry. Aspergillosis can be responsible for high mortality rates and induces significant economic losses, particularly in turkey production, and it is still difficult to treat. We developed a new model of acute aspergillosis in young turkeys by inoculating few-days-old turkeys via intratracheal aerosolization with increasing concentrations ( $10^5$  up to  $10^8$ ) of conidia using a MicroSprayer® device. The fungal burden was assessed and compared by real-time PCR, galactomannan (GM) dosage, fungal colony (CFU) counting and by histopathology. Early death occurred in the first 96 h post-inoculation only at the highest inoculum dose. We observed a correlation between inoculum size and results obtained by real-time PCR, GM dosage and CFU counting. The mean fungal burden detected by qPCR was 1.3  $\log_{10}$  units higher than the mean values obtained by CFU measurement. Furthermore, this new model, with its unique combination of markers, has been used to evaluate the efficacy of enilconazole. This is so far the only molecule used against aspergillosis in poultry farms. In two different experiments, turkeys were challenged with  $10^7$  (ExpB) or  $10^8$  (ExpA) conidia of *Aspergillus* and were treated by aerosolization of enilconazole at a dose of 20 mg/m<sup>3</sup>, once (ExpA) or twice a day (ExpB) for 3 days, or itraconazole (ExpB) *per os* at 10 mg/kg for 7 days. No mortality was observed in infected turkeys treated with itraconazole, unlike untreated birds or turkeys treated with enilconazole (40 % mortality). No protective effect and no difference in fungal burden in lungs were observed in turkeys treated with enilconazole at the end of the two experiments after measuring by culture, GM dosage and qPCR.

**Title:** Development of an acute aspergillosis model in turkeys (*Meleagris gallopavo*) and assessment of enilconazole efficacy

**Keywords:** Turkey, aspergillosis, model, *Aspergillus fumigatus*, enilconazole, qPCR, galactomannane



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Jacques Guillot et Pascal Arné, mes deux codirecteurs de thèse de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort, de m'avoir permis de réaliser cette thèse CIFRE en partenariat avec Elanco, branche santé animale de Lilly France, que je remercie pour le financement.

Merci à Jacques de m'avoir accueillie au sein de l'équipe Dynamyc, ainsi que pour son soutien tout au long de mes années de doctorat. Un grand merci à Pascal pour son encadrement, aussi bien lors de ces longues expérimentations animales, que dans la valorisation de mes travaux de thèse. Merci pour tous les enseignements que vous m'avez procurés. Merci de m'avoir permis de suivre la formation d'expérimentation animale ainsi que le cours « FEBS advanced practical course » axé sur les modèles d'infections fongiques à Jena.

Je remercie également les membres d'Elanco avec lesquels j'ai pu interagir, tout particulièrement Christèle Goudeau et Christophe Bostvironnois, mes deux interlocuteurs scientifiques qui ont toujours répondu à mes questions et dont les commentaires ont été bénéfiques à la mise en place des différentes expérimentations.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres du jury de ma thèse. Le Pr Jean-Luc Guérin et le Dr Jean Menotti pour avoir accepté d'être les rapporteurs, ainsi que le Pr Jacques Chandénier, le Pr Françoise Botterel et le Dr Christèle Goudeau qui me font également l'honneur de juger ce travail.

Merci à Nadia Haddad et à tous les membres de l'UMR BIPAR pour leur accueil chaleureux et leur aide à un moment ou un autre.

Merci à Gillian Barratt et Nathalie Cordonnier pour avoir participé aux comités de pilotage de la thèse. Merci également à Nathalie Cordonnier pour les analyses histologiques et son aide précieuse en anatomo-pathologie.

Je remercie sincèrement les membres du CRBM qui m'ont aidés dans la réalisation et le bon déroulement des protocoles expérimentaux, en particulier Francis Moreau, Thomas Lilin et Benoit Lécuelle qui ont toujours su faire face à nos demandes et aux divers imprévus.

Je remercie également le personnel de l'hôpital Henri Mondor, et tout particulièrement les technicien(ne)s du service parasitologie et bactériologie, pour leur disponibilité, leur aide et

leur efficacité lors des analyses biologiques.

Merci à Jacques Chandenier et Guillaume Desoubeaux pour leur aide et leur accueil chaleureux lors de ma venue à Tours et pour m'avoir formée à la technique d'inoculation *via* le MicroSprayer.

Merci à Simon Thierry et Dongying Wang pour leur aide, les conseils et le temps passé à m'apprendre la méthode de typage MLVA.

Et merci à tous ceux qui m'ont aidés à un moment ou un autre de ma thèse.

Last but not least...

Un grand merci à tous les membres de cette toute jeune équipe Dynamyc !

Merci à René Chermette pour son aide dans la rédaction, ses conseils, et sa bonne humeur, en particulier lors du congrès à Berlin... Merci à Françoise Botterel pour son aide et son écoute au quotidien, à Eric Dannaoui, Veronica Risco et Jean-Marc Costa pour les discussions et réponses apportées à mes divers questionnements. Merci également à Nabila et Manju, pour votre aide au laboratoire et votre bonne humeur.

Je tiens à remercier tous les actuels et anciens étudiants qui sont passés par Dynamyc : Emilie, Firas, Alice, Rémy, Freya, Yannick, Fang Fang, Charlotte et Bita. Je vous remercie pour votre soutien et pour l'ambiance si agréable au laboratoire comme au bureau.

Une pensée toute particulière pour Danièle Rivollet. Je ne saurais vous dire merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour votre aide, votre présence, votre constante bonne humeur... Mes trois années de thèse n'auraient pas été aussi agréables sans vous. Et comme vous aviez coutume de le dire : ce n'est pas la fin qui compte mais le voyage !

Un énorme merci à Leslie et Stéphanie avec qui j'ai passé de très bons moments, même avec 8 000 km de distance ! Merci pour les « brainstorming », l'ambiance toujours agréable, le soutien moral et surtout tous les fous rires. Cette dernière année de thèse a été plus facile en votre présence.

Pour finir, je remercie infiniment ma famille qui m'a toujours soutenue, ainsi qu'Alex sans qui je n'aurais jamais pu tenir jusqu'au bout. Merci à toi d'être toujours là pour moi...même quand je suis devenue franchement insupportable !

<b>TABLE DES MATIERES</b>
---------------------------

<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	<b>15</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>19</b>
<b>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>21</b>
<hr style="border: 1px solid black;"/>	
<b>CHAPITRE 1 : Les filières avicoles</b>	<b>23</b>
<b>I. Les élevages aviaires</b>	<b>25</b>
I. a. Domestication des oiseaux d'élevage	25
I. b. Organisation des élevages aviaires	26
I. c. Elevage de dindes	29
<b>II. La production de volaille mondiale et nationale</b>	<b>34</b>
II. a. Marché mondial	34
II. b. Marché européen	35
II. c. Marché français	35
<b>CHAPITRE 2 : Particularités anatomophysiologiques des oiseaux</b>	<b>39</b>
<b>I. Anatomie de l'appareil respiratoire</b>	<b>42</b>
I. a. Cavité nasale – larynx	42
I. b. Trachée – syrinx	42
I. c. Poumons	43
I. d. Sacs aériens	45
<b>II. Ventilation et échanges gazeux</b>	<b>46</b>
<b>III. Mécanismes de défenses</b>	<b>49</b>
<b>CHAPITRE 3 : <i>Aspergillus</i> et aspergillose</b>	<b>53</b>
<b>I. Le genre <i>Aspergillus</i></b>	<b>55</b>
I. a. Ecologie et taxinomie	55
I. b. Caractères morphologiques et reproduction	56
I. c. Identification des <i>Aspergillus</i>	59
<b>II. <i>Aspergillus fumigatus</i></b>	<b>60</b>
II. a. Ecologie	60

II. b. Aspects macroscopique et microscopique	60
II. c. Cycle biologique	61
II. d. Paroi fongique	62
II. e. Membrane plasmique	65
<b>III. Aspergillose</b>	<b>67</b>
III. a. Aspergilloses chez l'Homme	67
III. b. Aspergilloses chez les oiseaux	69
III. b. 1) Facteurs favorisants	70
III. b. 2) Signes cliniques	70
III. b. 3) Lésions macroscopiques	72
III. b. 4) Histopathologie	72
III. b. 5) Diagnostic	74
<b>CHAPITRE 4 : Les azolés</b>	<b>77</b>
<b>I. Historique des azolés antifongiques</b>	<b>79</b>
<b>II. Caractéristiques des azolés</b>	<b>80</b>
II. a. Structure chimique	80
II. b. Mode d'action	83
II. c. Spectres d'activité des azolés	84
<b>III. Pharmacocinétique</b>	<b>85</b>
<b>IV. Résistance aux azolés</b>	<b>91</b>
IV. a. Résistance microbiologique et clinique	91
IV. b. Mécanismes de résistance	91
IV. c. Résistance dans les élevages aviaires	93
<b>V. Utilisation des azolés chez les oiseaux</b>	<b>94</b>
<b>CHAPITRE 5 : Les modèles animaux d'aspergillose</b>	<b>99</b>
<b>I. Espèces utilisées</b>	<b>101</b>
I. a. Mammifères	101
I. b. Oiseaux	102
I. c. Autres animaux	102
<b>II. Statut immunitaire</b>	<b>104</b>
<b>III. Voie d'inoculation</b>	<b>106</b>
III. a. Modèles mammifères	106
III. b. Modèles aviaires	108
<b>IV. Inoculum et isolats</b>	<b>109</b>
<b>V. Paramètres de suivi</b>	<b>110</b>

V. a. Culture fongique	111
V. b. PCR quantitative (qPCR)	111
V. c. Galactomannane (GM) et 1, 3-β-D-glucane (BG)	112
V. d. Chitine	114
<b>OBJECTIFS</b>	<b>115</b>
<b>ETUDES EXPERIMENTALES</b>	<b>119</b>
<hr/>	
<b>CHAPITRE 1 : Développement d'un modèle d'aspergillose aiguë chez la dinde</b>	<b>121</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>123</b>
<b>II. Mise au point d'une infection expérimentale chez la dinde</b>	<b>125</b>
Article : Assessment of <i>Aspergillus fumigatus</i> burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys ( <i>Meleagris gallopavo</i> ) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture	127
<b>III. Conclusions</b>	<b>137</b>
<b>Chapitre 2 : Evaluation de l'efficacité de l'énilconazole</b>	<b>139</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>141</b>
<b>II. Matériels et Méthodes</b>	<b>143</b>
II. a. Souche d' <i>Aspergillus fumigatus</i> , culture mycologique et préparation de l'inoculum	143
II. b. Animaux et hébergement en animalerie	144
II. c. Inoculation	145
II. d. Traitements antifongiques	146
II. d. 1) Traitement par l'énilconazole	146
II. d. 2) Traitement par l'itraconazole	148
II. e. Protocole expérimental et lots	148
II. e. 1) ExpA	148
II. e. 2) ExpB	149
II. f. Suivi	150
II. g. Euthanasie	150
II. h. Autopsie et prélèvements	150
II. i. Evaluation de la biomasse fongique dans les poumons et dans les organes respiratoires	151
II. i. 1) Culture fongique	151
II. i. 2) PCR quantitative	152

II. i. 3) Dosage du galactomannane (GM)	153
II. j. Analyses statistiques	153
<b>III. Résultats</b>	<b>155</b>
III. a. Résultats de l'expérience ExpA	155
III. a. 1) Evolution du poids vif	155
III. a. 2) Signes cliniques et mortalité	156
III. a. 3) Charge fongique dans le parenchyme pulmonaire	159
III. b. Résultats de l'expérience ExpB	165
III. b. 1) Evolution du poids vif	165
III. b. 2) Signes cliniques	165
III. b. 3) Mortalité	167
III. b. 4) Charge fongique dans le parenchyme pulmonaire	168
<b>IV. Conclusions</b>	<b>175</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>193</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>199</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

A3	Animalerie de niveau de biosécurité 3
ABC	ATP-Binding Cassette
ABPA	Aspergillose BronchoPulmonaire Allergique
AI	Aspergillose invasive
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARP	Avian Respiratory Phagocytes
Aw	Activité de l'eau minimale
BALT	Bronchus-Associated Lymphoid Tissues
CBS	CentraalBureau voor Schimmelculture
CIMID	Comparative Immunology Microbiology & Infections Diseases
CMI	Concentration Minimum d'Inhibition
CMI90	Concentration Minimale qui inhibe 90 %
CRBM	Centre de Recherche BioMédicale
DL50	Dose Létale médiane
DO	Densité Optique
EC	Equivalents conidies
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENITA	École Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
FACW	Filière Avicole et Cunicole Wallonne
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FARM	Free Avian Respiratory Macrophages
GM	GalactoMannane
GMQ	Gain Moyen Quotidien
HES	Hématéine-Eosine-Safran
IgA	Immunoglobulines A
IgG	Immunoglobulines G
IgM	Immunoglobulines M
ITAVI	Institut Technique de l'AViculture et de l'élevage des petits animaux
ITS	Internal Transcribed Spacer
KOH	hydroxyde de potassium
LBA	Lavage broncho-alvéolaire

LCR	Liquide CéphaloRachidien
LP	Lignée pure
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissues
MANOVA	Multivariate analysis of variance
Mb	Millions de Base
MLVA	Mutiple Locus VNTR Analysis
MFS	Major Facilitator Superfamily
MT	Millions de Tonnes
NALT	Nasal-Associated Lymphoid Tissue
OAC	Oeufs A Couver
PAS	Periodic Acid–Schiff (Acide Périodique Schiff)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	Phosphate Buffer Saline + Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
pi	post-inoculation
PPA	Protéines de Phase Aiguë
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
qPCR	PCR quantitative
rpm	Round Per Minute (tour par minute)
SACMM IAAM	San Antonio Center for Medical Mycology, Invasive Aspergillosis Animal Models
TEC	Tonnes d'Equivalents Carcasses
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UE	Union Européenne
UFC	Unité Formant une Colonie (CFU en anglais)
UPEC	Université Paris-Est Créteil
USD	United States Dollar (Dollars américains)
USDA	United States Department of Agriculture

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

**Figure 1.** Chronologie de la domestication et localisation géographique des différents foyers de domestication des principales espèces d'oiseaux d'élevage (*adapté de Mignon-Grasteau et al., 2005*)

**Figure 2.** Organisation de la production de volailles de chair (*adapté de ENITA, 2002*)

**Figure 3.** Organisation pyramidale des étapes de sélection et multiplication (*source : FACW, n°42, 2012*)

**Figure 4.** Différentes souches de dindes d'élevage (*source : <http://www.aviagenturkeys.com>*)

**Figure 5.** La filière dinde en France en 2012 (*source : ITAVI, 2013*)

**Figure 6.** Evolution de la part des principaux acteurs dans les échanges mondiaux (*adapté de ITAVI, 2012 ; d'après FAO, Commission européenne, UBABEF et USDA*)

**Figure 7.** Evolution de la production de poulets et de dindes pour 9 pays de l'UE (*adapté de ITAVI, 2012 ; d'après SSP, statistiques nationales et Commission européenne*)

**Figure 8.** Production totale de volailles en France en 2012 (*d'après ITAVI, 2012*)

**Figure 9.** Répartition de la production de volailles en France (*source : ITAVI*)

**Figure 10.** Squelette d'un poulet (*Gallus gallus*) (*adapté de McCracken et Kainer, 1999*)

**Figure 11 :** Vue dorsale des poumons d'une autruche (A) (*adapté de Maina et Nathaniel, 2001*) et coupe longitudinale d'une bronche primaire observée en microscopie électronique à balayage (B) (*Kothlow et Kaspers, 2008*)

**Figure 12 :** Anatomie de l'appareil respiratoire des oiseaux (*adapté de Fedde, 1998*)

**Figure 13.** Pneumatisation de l'humérus (A) et de la colonne vertébrale (B) chez le poulet (*adapté de Wedel, 2009*)

**Figure 14.** Schéma du coelome d'un oiseau en coupe durant l'inspiration (1) et l'expiration (2) (*adapté de Klein et Owerkowicz, 2006*)

**Figure 15.** Circulation de l'air dans l'appareil respiratoire des oiseaux pendant l'inspiration (a) et pendant l'expiration (b) (*adapté de Reese et al., 2006*)

**Figure 16.** Coupe d'une parabronche (*d'après Davison et al., 2008*)

**Figure 17.** Morphologie des têtes aspergillaires unisériées (a) et bisériées (b) (*adapté de Ellis et al. 2007*)

**Figure 18.** Cycle de vie du champignon *Aspergillus nidulans* (*adapté de Lee et al., 2010*)

**Figure 19.** Aspects macroscopiques de colonies d'*Aspergillus fumigatus* (A : <http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/> ; B : Parasitologie, ENVA)

**Figure 20.** Aspect microscopique d'*Aspergillus fumigatus* (*Latgé et Steinbach, 2009*)

**Figure 21.** Cycle biologique haploïde (asexué) d'*A. fumigatus* (*Desoutter, 2008 ; d'après Latgé, 1999*)

**Figure 22.** *Neosartorya fumigata* sp. nov. (*d'après O'Gorman et al., 2009*)

**Figure 23.** Evolution de la structure de la paroi selon le stade de développement d'*A. fumigatus* (*adapté de Mouyna et Fontaine, 2009*)

**Figure 24.** Composition et structure de la paroi d'*A. fumigatus* (*d'après Gastebois, 2009*)

**Figure 25.** Vie intracellulaire d'une conidie d'*A. fumigatus* dans un phagocyte (*adapté de Amainandia et latgé, 2010*)

**Figure 26.** Voie de biosynthèse simplifiée de l'ergostérol chez *A. fumigatus* (*d'après Alcazar-Fuoli et al., 2008*)

**Figure 27.** Représentation des pathologies attribuées aux espèces *Aspergillus* en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte (*adaptée de Park & Mehrad, 2009*)

**Figure 28.** Coloration Hématéine-Eosine-Safran (HES) (A) et à l'acide périodique Schiff (PAS) (B) de coupes histologiques de poumons de dindonneaux

**Figure 29.** Coloration argentique d'une coupe histologique de poumon de dindonneau.

**Figure 30.** Historique de l'introduction des principaux azolés (*source : Infect. Med. 2003 Cligott Publishing, Division of SCP Communications*)

**Figure 31 :** Structure des hétérocycles imidazoles et triazoles

**Figure 32 :** Structures chimiques de certains azolés

**Figure 33.** Processus chimique de l'enzyme lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase (CYP51) (*d'après Lamb et al., 1999*)

**Figure 34.** Représentation des principales substitutions connues du gène *CYP51A* impliqués dans la résistance (R) aux azolés d'*A. fumigatus* (*d'après Frealle et al., ECCMID 2014*)

**Figure 35.** Relation entre dose de l'inoculum et traitement immunosuppresseur chez la souris pour déclencher une aspergillose expérimentale (*d'après Latgé, 1999*)

**Figure 36.** Dispositif d'aérosolisation intratrachéale en acier, le MicroSprayer® IA-1B-GP

**Figure 37.** Hébergement des dindonneaux dans des boxes de 2 m<sup>2</sup> (A) ou dans des enclos de 4,5 m<sup>2</sup> (B) et identification des oiseaux par des bagues alaires (C)

**Figure 38.** Inoculation par aérosolisation dans la trachée à l'aide d'un atomiseur, le MicroSprayer IA-1B®, après anesthésie du dindonneau

**Figure 39.** Nébulisation du traitement à l'aide d'un nébuliseur OMRON placé dans une chambre d'inhalation

**Figure 40.** Dispositif de nébulisation de l'énilconazole à l'aide d'un atomiseur ATOMIST placé dans la salle d'hébergement des dindonneaux

**Figure 41.** Chronogramme de l'expérimentation ExpA et définition des différents lots expérimentaux en fonction des séquences d'inoculations (10<sup>8</sup> conidies) et de traitements

**Figure 42.** Chronogramme de l'expérimentation ExpB et définition des différents lots expérimentaux en fonction des séquences d'inoculations (10<sup>7</sup> conidies) et de traitements

**Figure 43.** Ecouvillonnage au niveau de la trachée (A) et au niveau du sac aérien thoracique gauche (B)

**Figure 44.** Evolution du poids des dindonneaux au cours du temps en fonction du moment d'inoculation (10<sup>8</sup> conidies) par rapport au début du traitement (ExpA)

**Figure 45.** Apparition et évolution du nombre d'individus présentant des signes cliniques au cours du temps en fonction des lots et du moment de l'inoculation (10<sup>8</sup> conidies/oiseau) par rapport au traitement (G<sub>-24</sub>, G<sub>-48</sub> et G<sub>+7</sub>) au cours de ExpA

**Figure 46.** Courbes de survie des groupes non-infectés et infectés par *Aspergillus* ( $10^8$  conidies/oiseau) pour chacun des groupes d'inoculation ( $G_{-24}$ ,  $G_{-48}$  et  $G_{+7}$ ) au cours de ExpA

**Figure 47.** Variation du nombre d'UFC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés ( $10^8$  conidies/oiseau) traités ou non-traités par énilconazole au cours de ExpA

**Figure 48.** Variation du nombre d'EC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés traités ( $10^8$  conidies/oiseau) ou non-traités par énilconazole au cours de ExpA

**Figure 49.** Variation de l'index GM dans les poumons au cours du temps pour les lots infectés ( $10^8$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpA

**Figure 50.** Régression linéaire entre les résultats de culture fongique et les biomarqueurs qPCR et GM (ExpA)

**Figure 51.** Variation du poids moyen quotidien chez les dindonneaux après inoculation de  $10^7$  conidies d'*Aspergillus* (ExpB)

**Figure 52.** Apparition et évolution du nombre d'individus présentant des signes cliniques au cours du temps en fonction des lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non traités par énilconazole ou itraconazole au cours de ExpB

**Figure 53.** Evolution des scores calculés des signes cliniques des différents lots inoculés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités par énilconazole ou itraconazole au cours du temps au cours de ExpB

**Figure 54.** Courbes de survie des lots non-infectés et inoculés par aérosolisation intratrachéale d'*A. fumigatus* ( $10^7$  conidies/oiseau) en fonction du traitement administré (au cours de ExpB)

**Figure 55.** Représentation des moyennes des UFC/g de poumon quantifiés chez les dindonneaux des lots témoins et inoculés avec *Aspergillus* ( $10^7$  conidies/oiseau), traités ou non-traités au cours de ExpB

**Figure 56.** Variation du nombre d'UFC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpB

**Figure 57.** Représentation des moyennes des EC/g de poumon quantifiés chez les dindonneaux des lots témoins et inoculés avec *Aspergillus* ( $10^7$  conidies/oiseau), traités ou non-traités au cours de ExpB

**Figure 58.** Variation du nombre d'EC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpB

**Figure 59.** Représentation des moyennes de l'index galactomannane détecté dans les poumons des dindonneaux des lots témoins et inoculés avec *Aspergillus* ( $10^7$  conidies/oiseau), traités ou non-traités au cours de ExpB

**Figure 60.** Variation de l'index GM dans les poumons au cours du temps pour les lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpB

**Figure 61.** Régression linéaire entre les résultats de culture fongique et les biomarqueurs qPCR et GM (ExpB)

**Tableau 1.** Températures et aliments nécessaires aux différentes phases de croissance des dindes en élevage (source : Guérin, [www.avicampus.fr](http://www.avicampus.fr))

**Tableau 2.** Scores des signes cliniques utilisés dans ExpB pour évaluer la gravité des symptômes

**Tableau 3.** Résultats de la culture fongique et des biomarqueurs pour évaluer la charge fongique moyenne dans le poumon pour les différents lots de chaque groupe (cumul des résultats de  $G_{-48}$ ,  $G_{-24}$  et  $G_{+7}$ ) de ExpA après inoculation de  $10^8$  conidies par dindonneau



## AVANT-PROPOS

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures banales de l'environnement qui se propagent par l'intermédiaire de spores microscopiques ; elles peuvent infecter les mammifères (dont l'Homme) et les oiseaux, en général après inhalation de spores en suspension dans l'air. Chez l'individu immunocompétent, les défenses de l'organisme s'opposent en règle générale au développement du champignon dans l'organisme contaminé. En revanche, chez les individus immunodéprimés, l'inefficacité de la réponse cellulaire aboutit à une infection dont le site initial de développement est le plus souvent l'appareil respiratoire.

Les particularités anatomiques et physiologiques des oiseaux rendent ces animaux particulièrement réceptifs et sensibles aux aspergilloses, même chez les individus immunocompétents. L'infection aspergillaire demeure ainsi une dominante pathologique chez des espèces d'oiseaux sauvages en liberté (rapaces, oies et canards), en captivité (manchots...), ainsi que chez des espèces d'ornement (psittacidés) et d'élevage (dinde, caille et dans une moindre mesure, poulet). L'aspergillose est un problème majeur, dans les élevages avicoles de dindes en particulier, car elle touche les jeunes oiseaux sous sa forme aiguë avec des taux de mortalité parfois très élevés. L'apparition des symptômes est souvent brutale et la mortalité qui en découle est élevée, même après administration d'un traitement antifongique. Par ailleurs, la seule molécule antifongique utilisée de façon empirique dans les élevages aviaires, l'énilconazole (azolé vétérinaire), n'a pas d'autorisation de mise sur le marché pour l'emploi chez les oiseaux.

Les objectifs de notre projet consistaient dans un premier temps à développer un modèle d'aspergillose aiguë chez le jeune dindonneau (*Meleagris gallopavo*) par aérosolisation intratrachéale de conidies d'*Aspergillus fumigatus*. En parallèle, l'utilisation de biomarqueurs comme l'ADN fongique (par qPCR) et l'antigène galactomannane (par dosage ELISA) comme indicateurs pour quantifier la masse fongique au niveau des organes atteints ont été validés pour la première fois chez cette espèce en comparaison avec la méthode semi-quantitative de culture fongique (dénombrement des colonies fongiques = UFC). Le second objectif a été d'évaluer l'efficacité de la molécule énilconazole à l'aide des paramètres généraux de suivi de l'infection (poids, morbidité, mortalité et lésions), ainsi que des marqueurs utilisés pour quantifier la masse fongique (UFC, ADN fongique et antigène GM) dans le modèle d'infection expérimentale mis au point.



# **Analyse bibliographique**

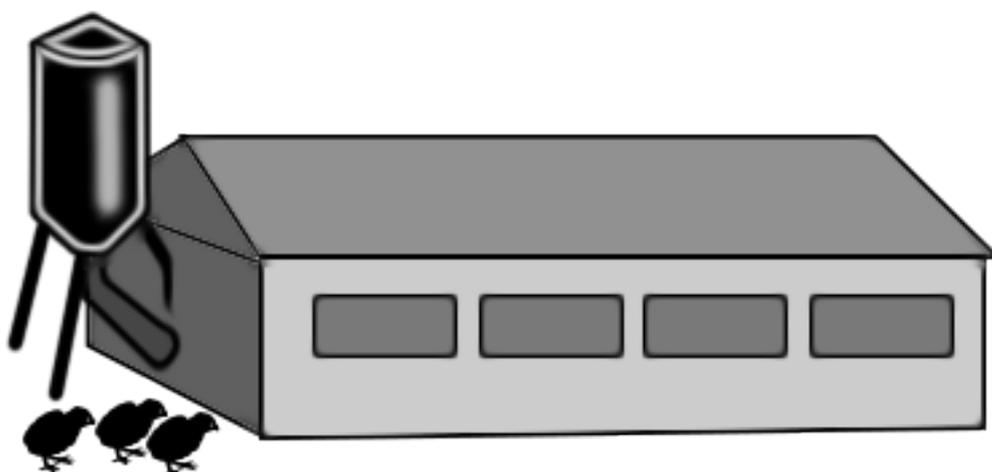


# Les filières avicoles

## Chapitre

---

# 1





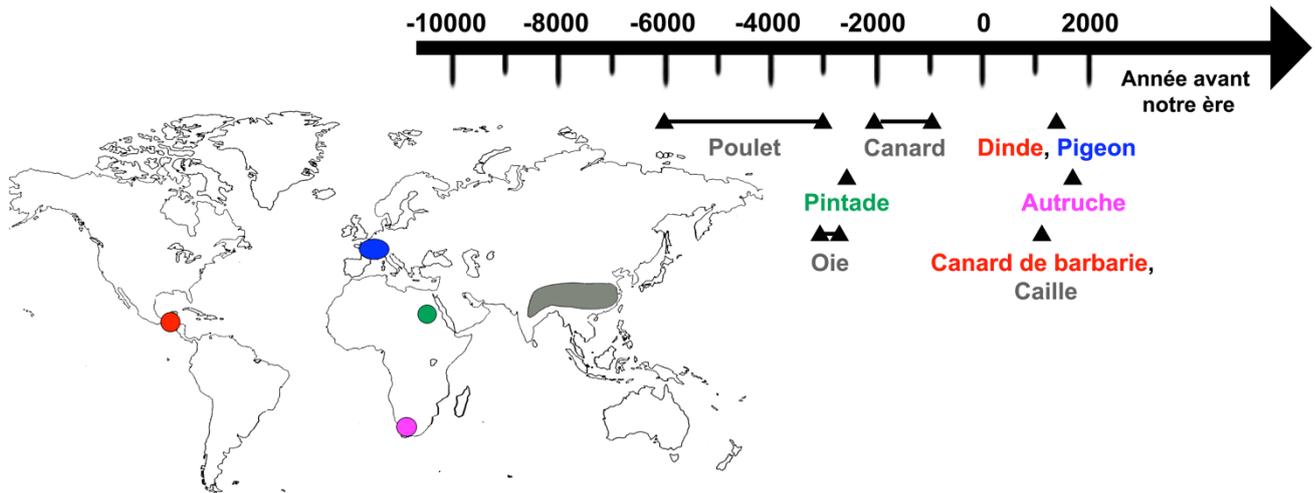
## I. Les élevages aviaires

---

### I. a. Domestication des oiseaux d'élevage

Le terme « domestication », dans la littérature scientifique comme technique, connaît de nombreuses acceptions mais est souvent défini comme « le processus par lequel une population animale s'adapte à l'homme et à un environnement de captivité, par des changements génétiques intervenant au cours des générations et des étapes de développement, renouvelées à chaque génération » (Price, 1984). Dans la législation française, les espèces domestiques sont définies comme ayant « fait l'objet d'une pression de sélection continue et constante, cette pression aboutissant à la formation d'un groupe d'animaux qui a acquis des caractères stables et génétiquement héréditaires » (Ministère de l'Environnement ; NP/94/6 du 28 octobre 1994). Contrairement à l'appriivoisement qui concerne un individu, la domestication est un processus dynamique qui s'exerce sur une espèce, sur plusieurs générations d'individus par le biais d'une sélection consciente ou inconsciente. La reproduction, les soins spécifiques et l'alimentation sont alors plus ou moins contrôlés par l'homme (Hale, 1969).

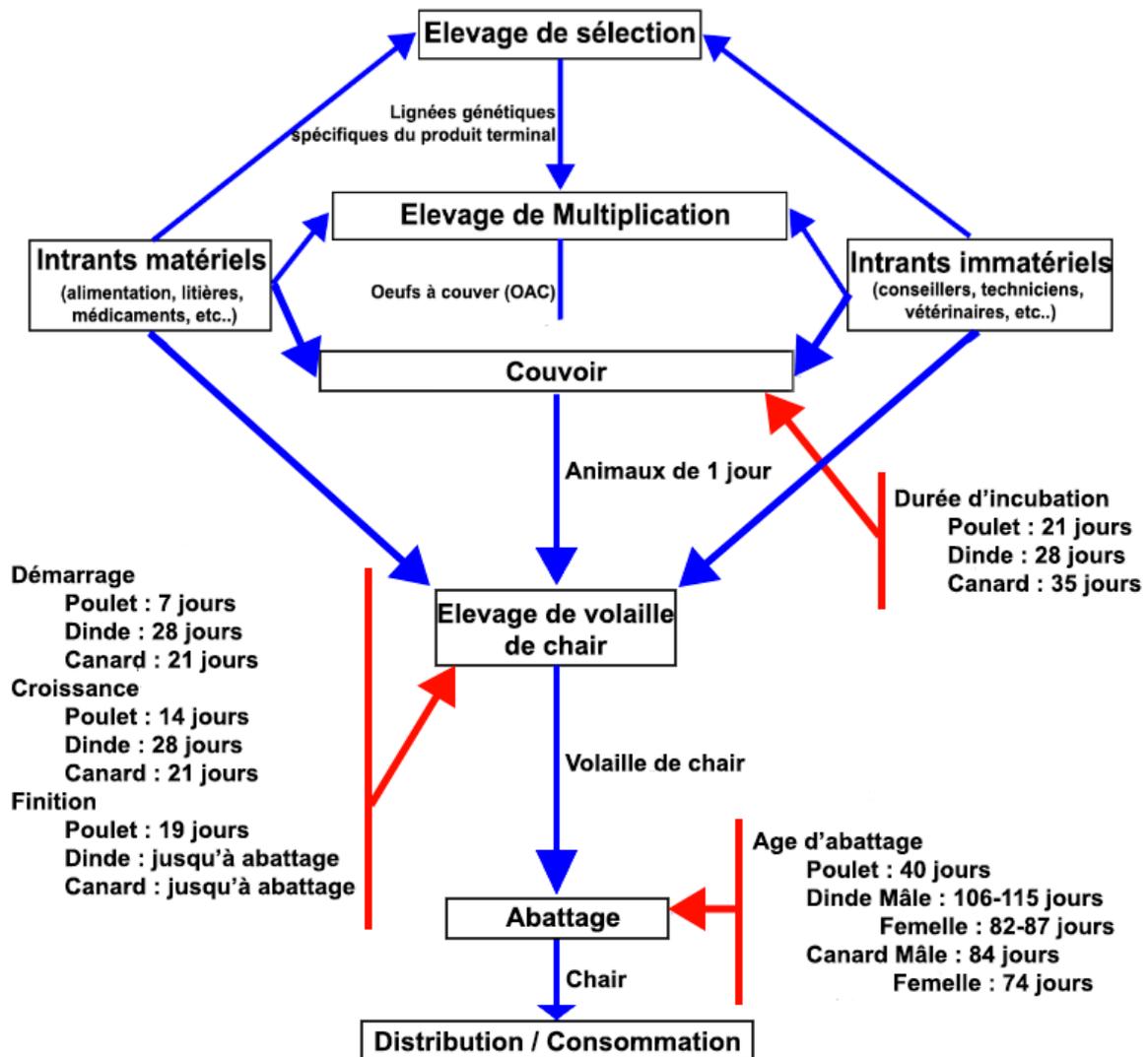
Finalement très peu d'espèces ont été domestiquées au cours de l'histoire. Concernant les oiseaux seulement dix espèces sur environ dix-mille l'ont été. Les plus anciennes preuves archéologiques connues à ce jour de la domestication du genre *Gallus* remontent à 8 000 ans en Chine. La domestication de la dinde (*Meleagris gallopavo*) est en revanche plus récente, puisqu'elle remonte au Moyen-Age et a probablement eu lieu au Mexique. Une dizaine d'espèces ont été domestiquées sur une période de temps très étendue et sur plusieurs continents avec des contributions variables : importance de l'Asie avec la domestication notamment du poulet, de l'oie, de la caille et du canard, et de l'Amérique avec la domestication notamment de la dinde (**figure 1**) (Mignon-Grasteau *et al.*, 2005). Elle était également utilisée comme volaille domestique par les communautés Amérindiennes dans ce qui est maintenant le sud-ouest des Etats-Unis d'Amérique. Les dindons ont été introduits en Europe dès le XVI<sup>ème</sup> siècle, suite à la colonisation européenne de l'Amérique centrale. Des élevages existent maintenant dans le monde entier. La tradition veut que le premier dindon mangé en France fût servi aux noces de Charles IX en 1570.



**Figure 1.** Chronologie de la domestication et localisation géographique des différents foyers de domestication des principales espèces d'oiseaux d'élevage  
(adapté de Mignon-Grasteau *et al.*, 2005)

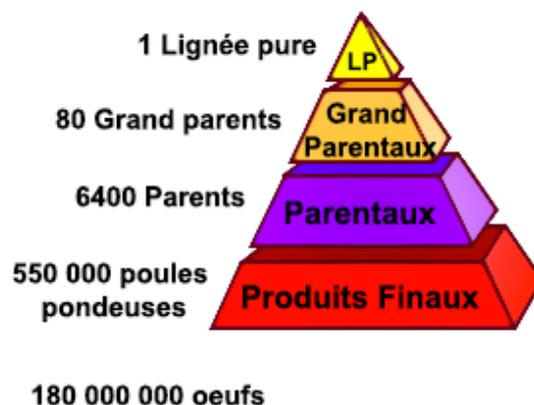
### I. b. Organisation des élevages aviaires (Thierry *et al.* 2010)

S'éloignant du modèle millénaire des basse-cours traditionnelles, la production moderne de volailles a connu au cours du XX<sup>ème</sup> siècle un essor considérable consécutif à des progrès techniques concernant de nombreux domaines (alimentation, génétique, reproduction, logement, état sanitaire) et une rationalisation des modalités d'élevages concomitante de l'organisation en filières. Une filière est un « système complexe, encadrant l'ensemble des acteurs impliqués dans la formation d'un produit final, destiné au consommateur. Elle s'étend de l'amont de la production jusqu'aux marchés de consommation finale » (Jez, 2009). Les filières « volailles » englobent de l'amont vers l'aval les fournisseurs d'intrants (aliments, litière, bâtiments, équipements..), les prestataires de service (conseillers techniques, vétérinaires..), les entreprises de sélection et de multiplication, les élevages de production, et en fonction des produits finis (œufs *versus* chair) des abattoirs, des ateliers de découpe et de transformation (produits élaborés), des casseries et enfin le secteur de la distribution (**figure 2**) (Jez, 2009).



**Figure 2.** Organisation de la production de volailles de chair  
(adapté d'ENITA, 2002)

Au sein de ces filières on peut distinguer deux grandes parties : l'élevage (reproduction) et la production (produits terminaux). L'organisation des filières avicoles est dite pyramidale avec une séparation entre des étages de sélection, de multiplication et de production, et une démultiplication des effectifs, associée à des croisements systématiques et successifs (**figure 3**). Les schémas de sélection et de multiplication avicoles font intervenir différents niveaux : les lignées, les grand-parentaux, les parentaux et les produits finaux (**figure 3**).



**Figure 3.** Organisation pyramidale des étapes de sélection et multiplication  
(source : FACW, n°42, 2012)

Au sommet de la pyramide se trouvent les sélectionneurs qui possèdent plusieurs lignées pures et des grand-parentaux dont le produit du croisement est commercialisé sous le terme de parentales. Ce sont eux qui génèrent le progrès génétique à partir de lignées spécialisées en fonction du produit terminal recherché, par exemple, des volailles destinées à la production de viande ou d'œufs de consommation. Ils fournissent les populations parentales aux multiplicateurs, ou accoueurs, qui vont être en charge de la diffusion du progrès génétique et de la multiplication des animaux. Les multiplicateurs vont réaliser des croisements pour obtenir les produits finaux et produire des œufs à couver (OAC) qui vont ensuite être envoyés en couvoirs (ENITA, 2002). Ces OAC sont alors stockés dans les couvoirs, puis mis en incubateurs pour une durée variable en fonction de l'espèce. Enfin, ils sont transférés dans des éclosiers. Les poussins d'un jour sont alors vaccinés (programme dépendant de l'espèce et de la demande des acheteurs), éventuellement sexés puis conditionnés en carton avant d'être livrés aux élevages de production, lesquels présentent des typologies très variées en fonction de l'espèce élevée, des produits terminaux (œufs/chair) et de l'adhésion éventuelle à un signe de qualité. Les volailles commerciales résultent donc de croisements faisant intervenir initialement au sommet de la pyramide trois ou quatre lignées différentes. La diffusion du progrès génétique est ainsi démultipliée à chaque étage de la pyramide. Les animaux issus de ces croisements présentent en général des performances sensiblement meilleures que celles de la moyenne de leurs géniteurs. Ceci est dû à l'effet d'hétérosis, appelé également « vigueur hybride » (**figure 3**).

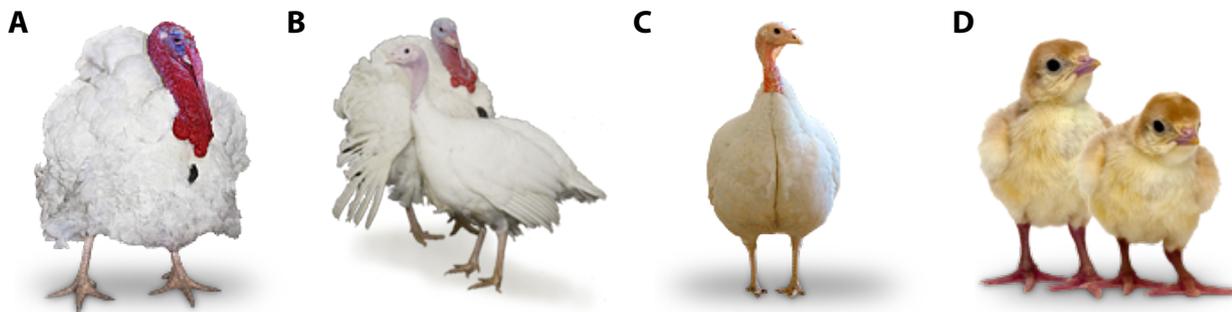
L'élevage peut s'effectuer en bâtiments sur caillebotis ou litière organique et être associé ou non à un parcours extérieur. En règle générale, les bâtiments sont remplis en une fois par un lot de poussins âgés d'un jour et également vidés le même jour. Cette conduite en bandes dite en « tout plein tout vide » permet d'avoir des lots d'animaux très homogènes et limite les risques sanitaires car les bâtiments sont systématiquement décontaminés (désinsectisation/nettoyage/désinfection/vide sanitaire) entre deux bandes successives. Il existe une forte segmentation de la production de volaille en fonction des signes de qualité (certification de conformité des produits, labels, Appellation d'Origine Contrôlée / Protégée, agriculture biologique, marques, etc.) qui détermine, selon le cas, des conditions d'élevage plus ou moins bien définies dans des cahiers des charges relatives aux types génétiques utilisés, à l'origine et à la nature des matières premières alimentaires aux surfaces allouées aux animaux, et à l'accès éventuel à des parcours extérieurs.

L'élevage des volailles de chair comprend trois phases successives durant lesquelles les paramètres zootechniques peuvent varier en fonction du stade physiologique (alimentation, surface par animal, accès à des parcours extérieurs, paramètres d'ambiance) : une phase de démarrage, une phase de croissance et une phase de finition. La phase de démarrage correspond à la période d'adaptation des poussins d'un jour qui représente le stade le plus fragile. Elle nécessite une température ambiante élevée (chauffages en ambiance et localisé), un éclairage contrôlé (photopériode importante) ainsi que des accès additionnels et facilités à l'alimentation et à l'eau pour stimuler une consommation précoce. Durant la phase de croissance, la température ambiante et l'éclairage vont progressivement diminuer et l'alimentation fournie sera modifiée (plus énergétique mais moins riche en protéines que l'aliment de démarrage) afin de contribuer à la forte croissance des oiseaux. La troisième et dernière période avant l'abattage, est la phase de finition, qui correspond à l'abaissement de la température ambiante et de la teneur énergétique des aliments. Des variations interspécifiques et intraspécifiques (selon le type génétique) des durées de chacune de ces phases existent (**figure 2**) (Guérin, [www.avicampus.fr](http://www.avicampus.fr)).

### I. c. Elevage de dindes

La dinde (*Meleagris gallopavo*) fait partie de l'ordre des Gallinacés et est le seul représentant de la sous-famille des Méléagridinés. C'est une volaille assez grosse et imposante (entre 5 et 12 kg en moyenne en fonction des races et des lignées), avec de longues pattes et une large poitrine. La tête est rouge, dépourvue de plumes et ornée d'excroissances de chair plus ou

moins longues et pendantes, au-dessus et/ou au-dessous du bec (goître). En principe, la qualité de la viande ne diffère pas entre les mâles et les femelles. Ils sont cependant élevés séparément et pendant des durées différentes. En général, les femelles sont abattues plus tôt et à un poids inférieur à celui des mâles. On compte plusieurs races de dindes domestiques, qui se différencient selon leur poids et selon la couleur de leur plumage, comme le dindon noir de Sologne, le dindon noir du Bourbonnais ou le bronzé d'Amérique. Les dindes produites majoritairement dans les élevages sont issues de lignées et de souches sélectionnées pour répondre à la demande de marchés différenciés (souches lourdes ou médium, dindes fermières ou traditionnelles) (**figure 4**). En 2012, la filière dinde en France comptait 11 couvoirs, 2 250 élevages et permettait la production d'environ 415 000 tonnes d'équivalents carcasses (TEC) (ITAVI, 2013) (**figure 5**).



Source : Aviagen turkeys ([www.aviagenturkeys.com](http://www.aviagenturkeys.com))

**Figure 4.** Différentes souches de dindes d'élevage (*source* : <http://www.aviagenturkeys.com>)

A et B = souche lourde ; C et D = souche médium

Les dindes atteignent leur maturité sexuelle à 28-29 semaines et sont mises à la reproduction dès la première année en élevage, contrairement aux dindes sauvages qui se reproduisent à l'âge de deux ans et pondent une vingtaine d'œufs. Dans les élevages, les œufs sont mis à incuber en moyenne 28 jours. Comme pour toutes les volailles, l'itinéraire technique de l'élevage de dindes pour la production de chair passe par trois étapes successives : démarrage, croissance et finition. La phase de démarrage dure 4 semaines. Les dindonneaux d'un jour qui arrivent dans l'élevage sont placés sur une litière de paille broyée et/ou de copeaux de bois. Deux types de chauffage sont utilisés dans les élevages afin de toujours maintenir une température adéquate pour les animaux : le chauffage d'ambiance et le chauffage local par rayonnement. Le chauffage localisé crée des zones de chaleur progressive, ce qui permet aux animaux de passer de l'une à l'autre et de trouver la zone optimale de confort thermique. Lors de la phase de démarrage, la température ambiante est maintenue à 34°C et la température localisée à 38-40°C jusqu'à leur troisième jour de vie. La température

localisée est ensuite progressivement diminuée jusqu'à atteindre 33°C pour les dindonneaux de 22 jours (**tableau 1**). Durant les premiers jours, l'hygrométrie doit être inférieure à 60 %. Une bonne ventilation est nécessaire pour le renouvellement de l'air afin d'assurer un apport régulier en dioxygène aux animaux, d'éliminer les poussières, les gaz nocifs produits au niveau de la litière (ammoniac) ou les oiseaux (dioxyde de carbone), et enfin essayer de réguler les conditions environnementales, c'est-à-dire la température ambiante et l'humidité relative. Le dindonneau présente une carcasse maigre, riche en protéine et en eau. Les besoins protéiques sont ainsi élevés. En revanche, ses besoins en énergie sont relativement plus faibles que chez le poulet (*Gallus gallus*), en particulier dans le jeune âge. La formulation de l'aliment de démarrage du dindonneau doit tout particulièrement tenir compte de besoins spécifiques en acides aminés et phosphore. Pendant les premiers jours, une photopériode longue et une intensité lumineuse élevée favorisent l'activité des oiseaux ainsi que la prise d'aliments. L'intensité de la lumière est diminuée à partir du 10<sup>ème</sup> jour.

**Tableau 1.** Températures et aliments nécessaires aux différentes phases de croissance des dindes en élevage  
(source : Guérin, [www.avicampus.fr](http://www.avicampus.fr))

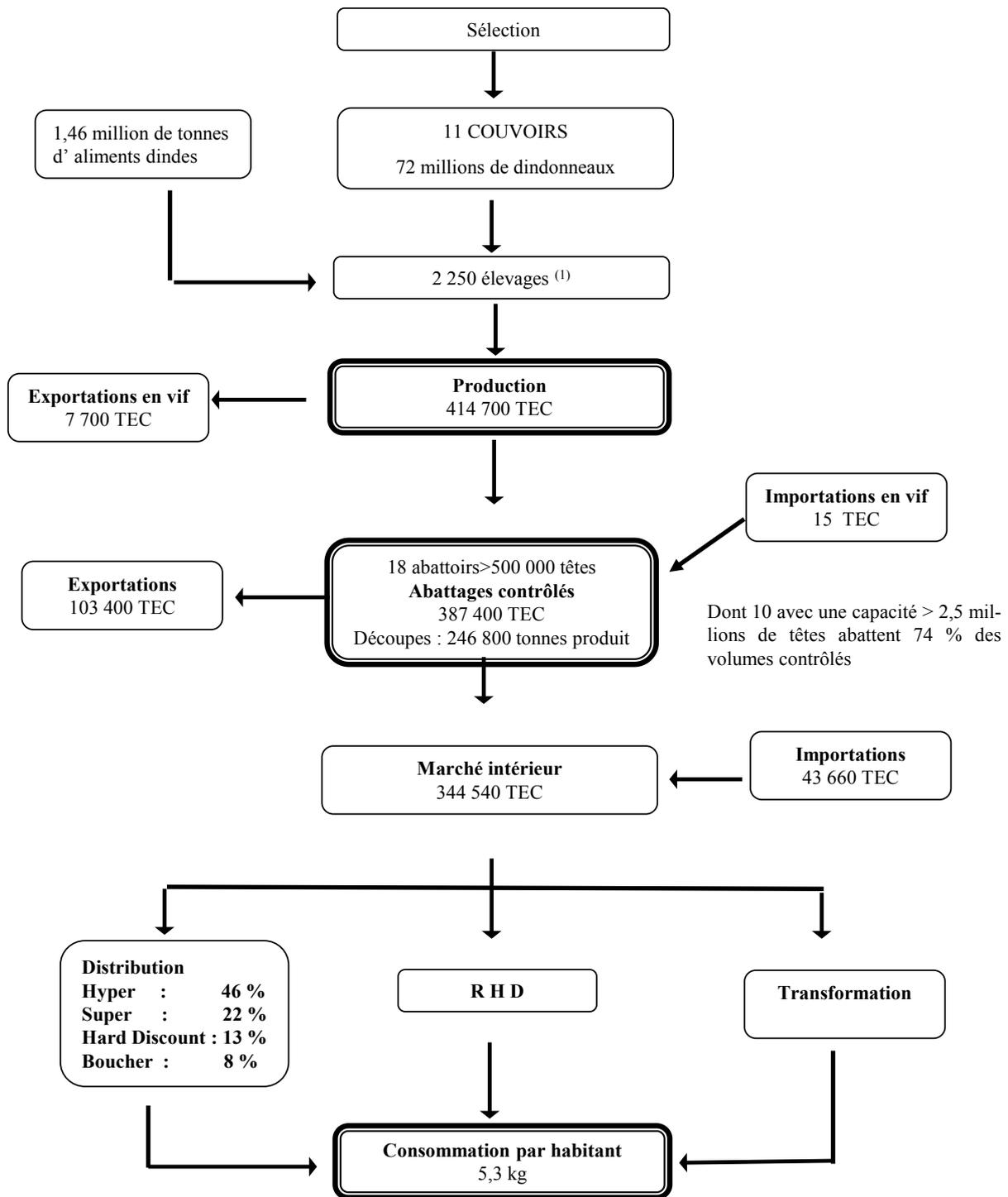
	Age	Chauffage localisé		Chauffage ambiance	Alimentation
		Sous radiant	Zone de vie		
<b>Phase de démarrage</b>	1-3 jours	38	28	34	Aliment de démarrage en miette
	4-7 jours	37	27	32-33	
	8-14 jours	36	25	31-32	
	15-21 jours	34	23	30-31	
	22-28 jours	33	22	29-30	
<b>Phase de croissance</b>	5 semaines	32	22	26-27	Aliment de croissance en granulé
	6 semaines	28-30	20	25-26	
	7-10 semaines		20-24	20-24	
	8-10 semaines		17-19	17-19	
<b>Phase de finition</b>	11-abattage		17-18	17-18	Aliment de finition en granulé

La phase de croissance s'étale de la 5<sup>ème</sup> à la 10/12<sup>ème</sup> semaine de vie environ. La température localisée doit être maintenue à 32°C la 5<sup>ème</sup> semaine, puis être diminuée progressivement jusqu'à être arrêtée. A la fin de la phase de croissance, une température ambiante de 19°C est suffisante (**tableau 1**). Les aliments de croissance plus riches en

énergie, notamment en matières grasses, permettent d'augmenter la vitesse de croissance. La lumière est progressivement augmentée à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine pour que la durée de jour soit plus importante que la durée de nuit. L'hygrométrie est stabilisée à 60-70 % durant toute la phase de croissance et de finition.

La phase de finition débute à la 11<sup>ème</sup> ou 13<sup>ème</sup> semaine et se poursuit jusqu'à l'abattage. Pendant cette phase, les animaux sont d'abord nourris avec des granulés puis avec des aliments de finition et de retrait. Quelques heures avant l'abattage, les oiseaux sont mis à jeun (Manuel commercial Nicholas, 2009 ; Guérin, [www.avicampus.fr](http://www.avicampus.fr)).

**LA FILIERE DINDE 2012**



(1) ITAVI d'après Agreste-RA 2010 élevages > 1 000 têtes

Elaboration ITAVI – mai 2013

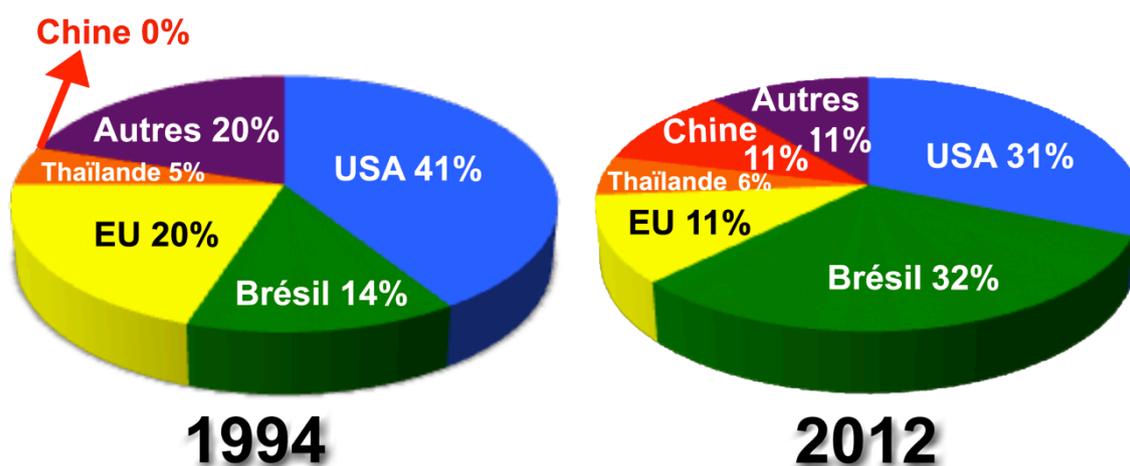
**Figure 5.** La filière dinde en France en 2012 (source : ITAVI, 2013)

## II. La production de volaille mondiale et nationale

### II. a. Marché mondial

Selon les estimations de la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), la production de volaille se situe au second rang avec 104,6 millions de tonnes (MT) en 2012, derrière la viande de porc (112,5 MT), mais largement devant la viande bovine (67,6 MT) (Itavi, 2013). La demande mondiale en viande de volaille est stimulée par les prix élevés des viandes concurrentes.

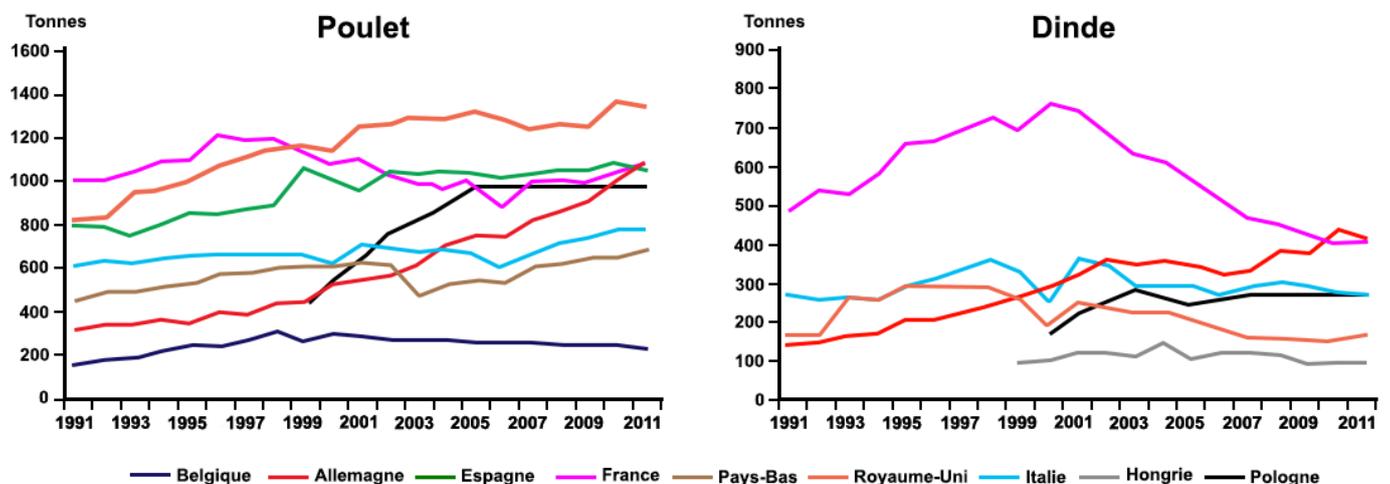
Les principaux producteurs de volailles sont les Etats-Unis d'Amérique, la Chine, le Brésil et l'Union Européenne (UE) (**figure 6**). Les Etats-Unis d'Amérique et le Brésil sont les premiers exportateurs mondiaux de volailles, représentant respectivement 31 % et 32 % des échanges internationaux en 2011. Cependant, en valeur, le Brésil est le leader incontesté avec des exportations de viande de volailles s'élevant à 8,2 milliards USD en 2011, contre 4,9 milliards USD pour les Etats-Unis d'Amérique. L'Union Européenne arrive loin derrière avec des exportations de viandes et préparations de volailles totalisant 2 milliards USD. La place de l'Union Européenne dans le commerce international de volailles est en nette diminution depuis 15 ans, passant de 20 % en volume en 1994 à 10 % en 2011 (**figure 6**) (Itavi, 2012).



**Figure 6.** Evolution de la part des principaux acteurs dans les échanges mondiaux (adapté de ITAVI, 2012 ; d'après FAO, Commission européenne, UBABEF et USDA)

## II. b. Marché européen

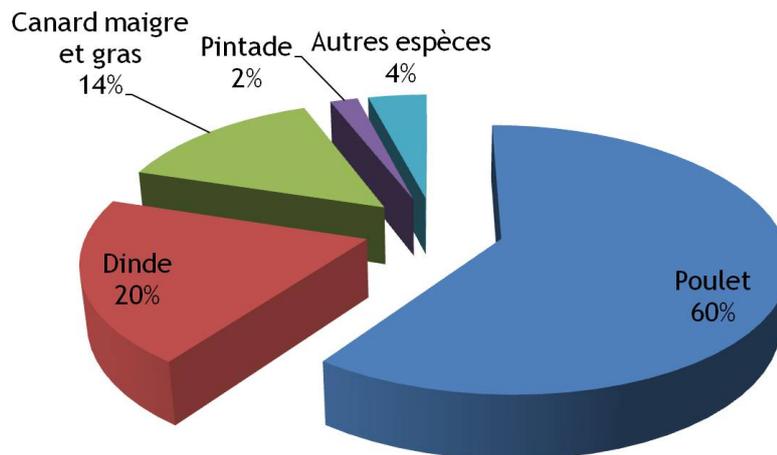
Les principaux producteurs de volailles en Europe sont la France, l'Allemagne, la Grande-Bretagne et l'Espagne. La production de poulets reste la plus importante et la plus dynamique, tandis que la production de dindes a tendance à diminuer. Depuis un pic de production en 2000, la production de dindes s'est effondrée et a été divisée par deux en 10 ans. En 2012, la France redevient le premier producteur européen de dindes, devant l'Allemagne (**figure 7**).



**Figure 7.** Evolution de la production de poulets et de dindes pour 9 pays de l'UE (adapté de ITAVI, 2012 ; d'après SSP, statistiques nationales et Commission européenne)

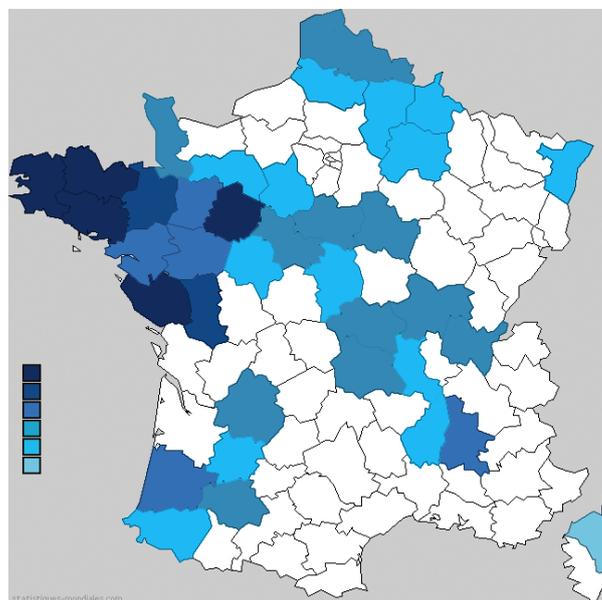
## II. c. Marché français

En 2009, la France compte plus de 21 000 élevages de plus de 500 volailles toutes espèces confondues. La partie abattage de la filière comprend à elle seule près de 190 entreprises de plus de 20 salariés et emploie près de 30 000 salariés (Fédération des Industries Avicoles, [www.fia.fr](http://www.fia.fr)). En France, trois espèces dominent la production de volailles de chair : le poulet (*Gallus gallus*), la dinde (*Meleagris gallopavo*) et le canard (filrière représentée par deux espèces *Anas platyrhynchos*, *Cairina moschata* et leurs hybrides) (**figure 8**).



**Figure 8.** Production totale de volailles en France en 2012 (d'après ITAVI, 2012)

L'aviculture en France représente 12 % de la production brute standard de l'agriculture nationale. Les 2/3 de cette production sont géographiquement concentrés dans 4 régions : Bretagne (33 %), Pays de Loire (21 %), Rhône-Alpes (6 %) et Aquitaine (7 %) (**figure 9**). Cette concentration géographique s'accompagne d'une concentration structurelle avec le développement d'élevages hébergeant des effectifs de plus en plus importants.



**Figure 9.** Répartition géographique de la production de volailles en France (source : ITAVI)

En 2013, la consommation de volailles par habitant s'élève à 26,1 kg/an pour l'ensemble des volailles dont 16,2 kg pour le poulet, 5,2 kg pour la dinde et 2,9 kg pour le canard. La dinde est donc la volaille la plus consommée après le poulet en France, et la 4<sup>ème</sup>

viande la plus consommée au total. La consommation de volailles est en hausse modeste de 1,6 % en 2013 avec une progression pour la dinde d'une part et plus encore pour le poulet qui enregistre une hausse de 3,2 % essentiellement due aux importations (42 % des poulets consommés en France sont importés). La consommation de canard est en repli de 8,1 %.

Cette bonne tenue de la consommation du poulet a été confirmée par l'analyse du Panel KANTAR. En 2012, les achats de viandes fraîches par les ménages se sont légèrement repliés en volume, notamment pour le bœuf (- 4 %) et le porc (- 0,2 %) dus à la hausse des prix. De même pour la volaille, qui enregistre une hausse des prix de 2,4 %, et un repli des achats de 0,5 %. En dépit d'une augmentation des prix de 2,0 %, les achats de poulets ont progressé de 2 %. Les achats de dinde sont en régression, tout comme les achats de canard et de pintade (Itavi, 2013).

**En dépit du fort déclin de la production dinde dans le monde et en France, ainsi que du repli des exportations, la dinde demeure néanmoins la 2<sup>ème</sup> volaille française.**

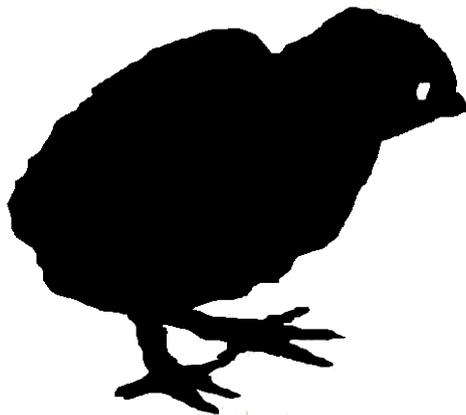


# Particularités anatomophysiologiques des oiseaux

## Chapitre

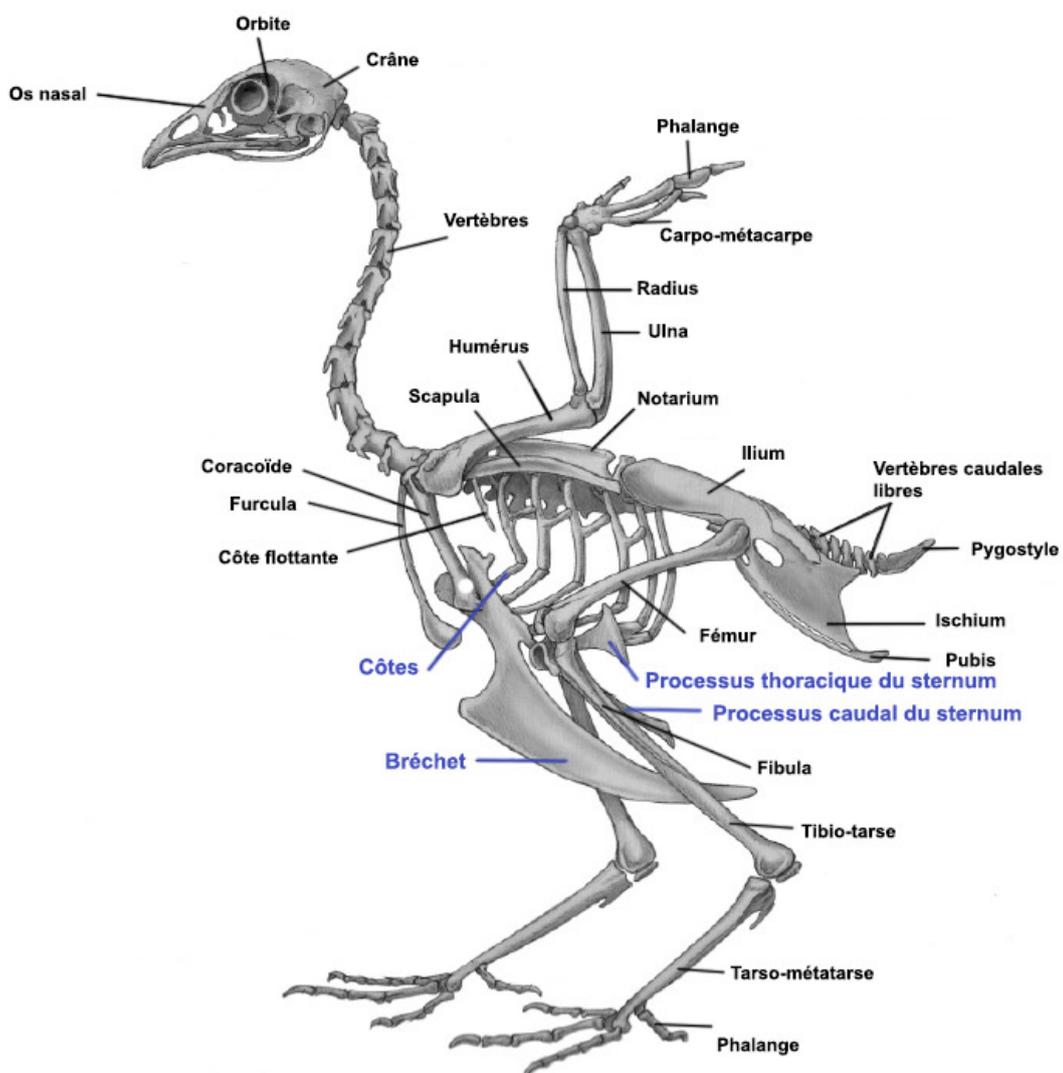
---

# 2





Les oiseaux sont des vertébrés tétrapodes dont le corps est recouvert de plumes et qui pondent des œufs. Près de 10 000 espèces d'oiseaux ont été décrites à ce jour, très différentes tant par leur écologie que par leur biologie. La classe des Oiseaux compte 27 ordres, dont le plus important est l'ordre des Passériformes (5 712 espèces) et le plus restreint celui des Struthioniformes (une seule espèce : l'autruche *Struthio camelus*) (King et McLelland, 1984 ; Livezey et Zusi, 2007).



**Figure 10.** Squelette d'un poulet (*Gallus gallus*) (adapté de McCracken et al., 1999)

En bleu sont indiquées les structures du sternum et des côtes

## I. Anatomie de l'appareil respiratoire

---

Le système respiratoire des oiseaux est radicalement différent de celui des mammifères. En effet en plus des poumons, les oiseaux possèdent des sacs aériens, qui n'ont pas de fonction directe dans les échanges gazeux *stricto sensu*, mais qui permettent la circulation de l'air dans le tractus respiratoire en maintenant un flux unidirectionnel et constant dans les poumons. De plus, le flux respiratoire est engendré non pas par la contraction du diaphragme dont les oiseaux sont dépourvus mais par les mouvements du sternum principalement (**figure 10**). En outre, le système tubulaire des parabronches, à la différence du système alvéolaire des mammifères, génère une surface d'échange plus importante de 20 % à poids vif équivalent à celle observée chez les mammifères de taille comparable (O'Malley, 2005). Toutes ces différences anatomiques et physiologiques assurent un important rendement des échanges gazeux. Ceux-ci sont ainsi dix fois plus élevés chez les oiseaux que chez les mammifères, ce qui explique que les oiseaux sont parfaitement adaptés à fournir un effort intense et soutenu associé au vol (Tell, 2005).

### I. a. Cavité nasale – larynx

Les cavités nasales sont en communication permanente avec la cavité buccale par la fente choanale. Chez les oiseaux, il existe un larynx supérieur et un larynx inférieur (un organe spécifique des oiseaux, la syrinx). Le larynx est l'homologue de celui des mammifères, mais il est rudimentaire et incapable de produire des sons. L'ouverture du larynx est située au niveau de la proéminence caudale de la langue. L'absence d'épiglotte permet de visualiser facilement la glotte à l'ouverture du bec (Frandsen *et al.*, 2009).

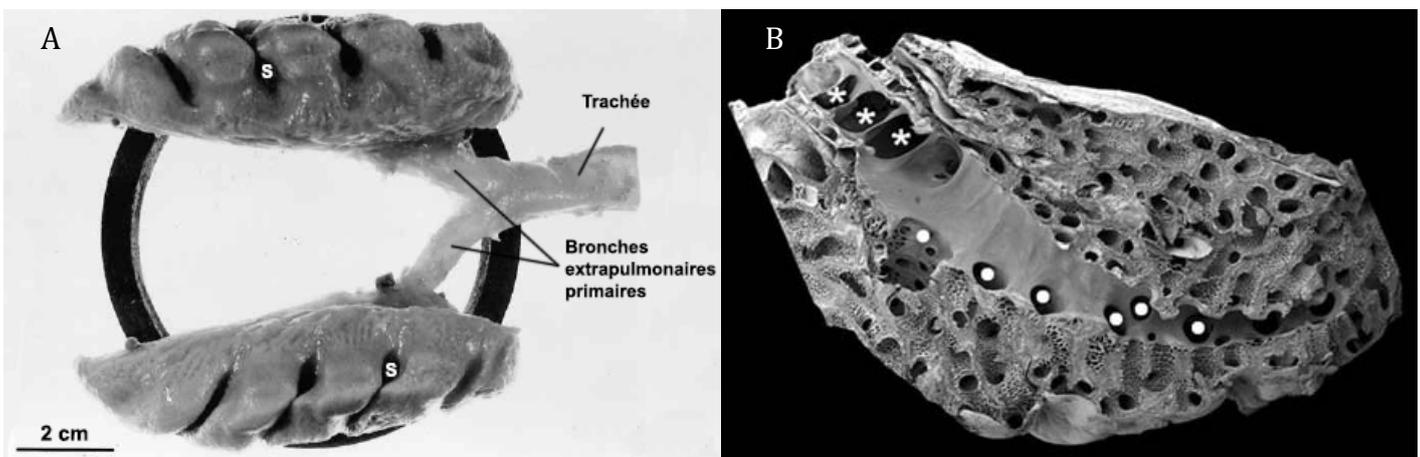
### I. b. Trachée – syrinx

La trachée est cylindrique et les cartilages trachéaux forment des anneaux complets contrairement à ceux des mammifères (anneaux en forme de 'C'). Ils s'ossifient vers l'âge d'un an chez la plupart des oiseaux et leur nombre dépend de la longueur du cou (entre 100 et 130 chez les volailles). La trachée se divise en deux bronches principales dans la cavité thoracique, près de la base du cœur (**figure 11**). Situé au point de jonction de la trachée avec les bronches, se localise la syrinx. C'est l'organe de la voix chez tous les oiseaux. L'extrémité inférieure de la trachée est quelquefois dilatée, en forme de bulle osseuse (tambour)

constituant un appareil résonateur chez certaines espèces comme le canard mâle (*Anas platyrhynchos*) ou les cygnes (*Cygnus* spp.) (Frandsen *et al.*, 2009).

### I. c. Poumons

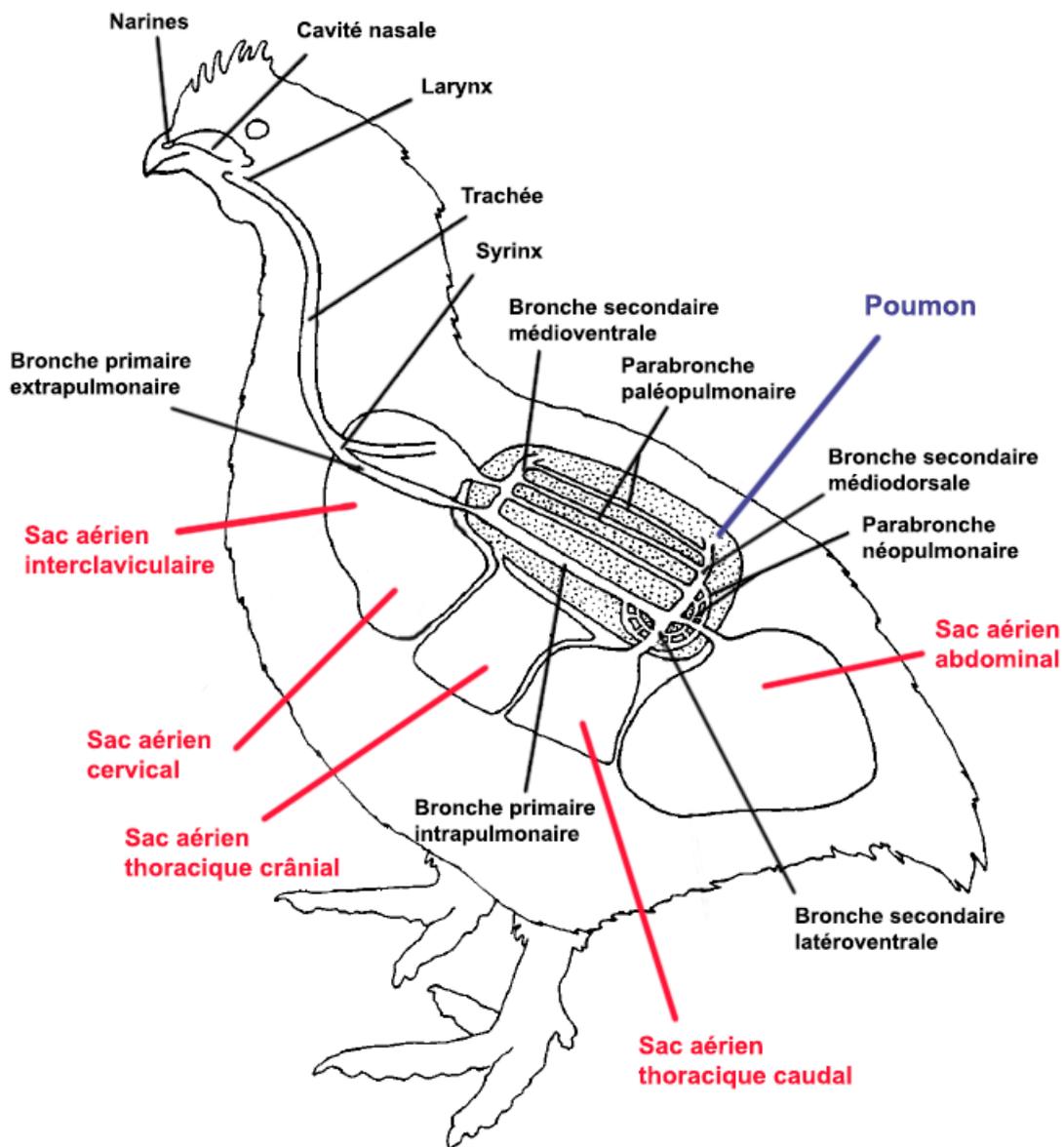
Les poumons des oiseaux sont non lobés, petits, rigides et peu extensibles. Leur taille varie peu au cours de l'inspiration et de l'expiration. Ils sont littéralement plaqués sur la partie dorsale de la paroi thoracique dans l'intervalle des côtes lesquelles impriment des sillons profonds sur leur bord postérieur (**figure 11a**). Chaque poumon reçoit une bronche pulmonaire primaire (ou mésobronche) qui le traverse jusqu'à son bord caudal et s'abouche dans le sac aérien abdominal. Les bronches primaires intrapulmonaires se subdivisent en quatre groupes de bronches secondaires (médioventrales, médiodorsales, latéroventrales et latérodorsales) qui vont relier entre elles les petites bronches appelées parabronches pulmonaires (**figures 11b et 12**). Leur longueur varie de 1 à 4 cm, leur diamètre de 1 à 2 mm. La paroi des parabronches est percée d'innombrables orifices qui conduisent à des chambres d'un diamètre de 0,1 mm. Ces chambres sont unies par un réseau de "capillaires aériens" de 3 à 20  $\mu\text{m}$ , entrelacés avec un réseau très dense de capillaires sanguins, l'ensemble constituant la surface d'échanges gazeux (Evans, 1966 ; King et Molony, 1971 ; Scheid et Piiper, 1972 ; Maina, 2005). L'air présent dans les capillaires aériens et le sang, dans les capillaires sanguins, circulent dans des sens opposés. Cette circulation à contre courant, qu'on retrouve aussi dans les branchies des poissons, améliore sensiblement l'extraction du dioxygène (Piiper et Scheid, 1992).



**Figure 11** : Vue dorsale des poumons d'une autruche (A) (*adapté de Maina et Nathaniel, 2001*) et coupe longitudinale d'une bronche primaire observée en microscopie électronique à balayage (B) (*Kothlow et Kaspers, 2008*)

S = sillons costaux. Les ouvertures sur les bronches secondaires médioventrales (\*) et médiodorsales (•) sont représentées

Il existe de grandes variations entre les espèces d'oiseaux dans la structure des poumons et plus spécifiquement dans la structure des parabronches. Chez la plupart des espèces, on retrouve deux jeux de parabronches : les parabronches paléopulmonaires et les bronches néopulmonaires. Cependant la région néopulmonaire est absente chez certains oiseaux (e.g. les Sphénisciformes) et peu développée chez d'autres (e.g. les cigognes (*Ciconia spp.*) et les Anatidés). Chez les Passériformes, les Colombiformes et les Galliformes, la région néopulmonaire est en revanche très développée (Maina, 2008 ; Frandson *et al.*, 2009) et représente 15 à 20 % de la surface d'échanges gazeux des poumons (Fedde, 1998). Le flux circulatoire dans les parabronches paléopulmonaires est unidirectionnel, alors qu'il est bidirectionnel dans les parabronches néopulmonaires qui sont reliées aux sacs aériens caudaux (**figure 12**) (Scheid et Piiper, 1989 ; Powell, 2014).

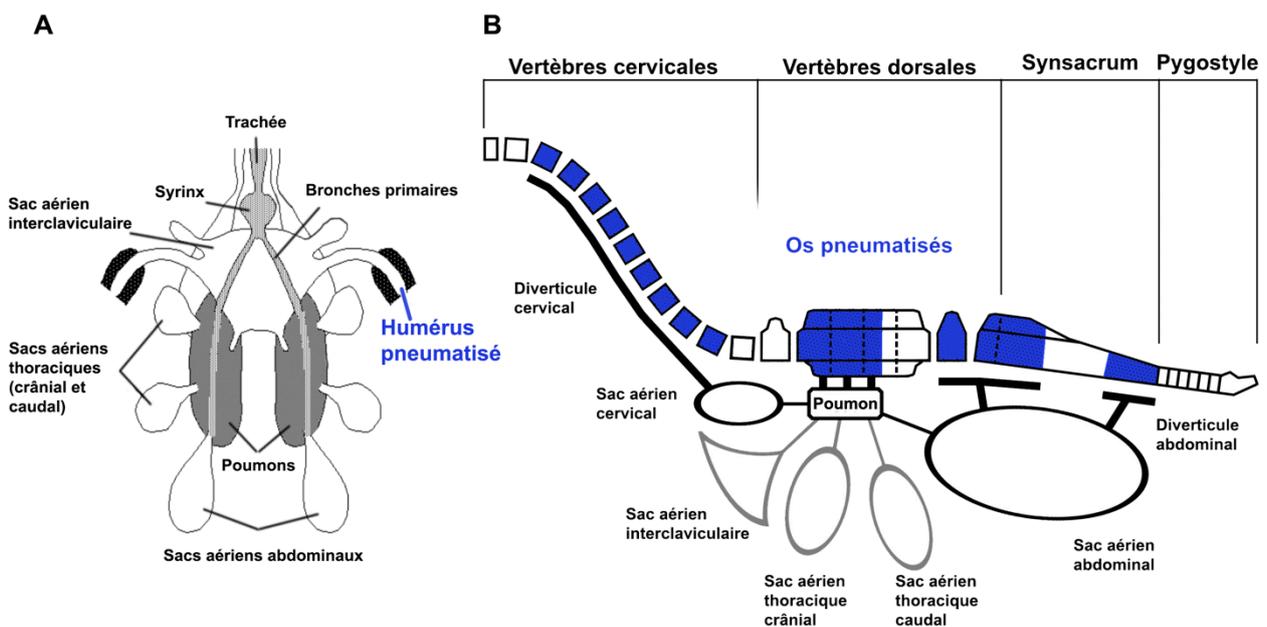


**Figure 12** : Anatomie de l'appareil respiratoire des oiseaux (*adapté de Fedde, 1998*)

### I. d. Sacs aériens

Les sacs aériens jouent un rôle majeur lors de la respiration, agissant à la manière d'un soufflet pour ventiler les poumons (Powell, 2000). Ils sont à l'origine d'un courant d'air continu à travers les capillaires aériens en phase inspiratoire comme en phase expiratoire. Ils jouent également un rôle dans la régulation de la température corporelle, protègent et isolent les organes abdominaux.

Les sacs aériens sont de fins sacs extensibles, transparents et remplis d'air, constitués d'un épithélium squameux (Frandsen *et al.*, 2009). Leur paroi est très mince, constituée principalement de fibres élastiques. Elle n'est que faiblement vascularisée et ne participe pas aux échanges gazeux (Fedde, 1998). Les sacs aériens représentent 80 % du volume respiratoire total et occupent un espace non négligeable dans la cavité abdominale (Lasiewsky, 1972 ; Maina et Africa, 2000). Chaque sac est connecté aux bronches pulmonaires secondaires par un *ostium*, qui se situe le long du bord latéroventral des poumons. Ils sont attachés à divers endroits aux organes contigus et certains ont des diverticules qui s'étendent jusqu'aux cavités médullaires de certains os. En effet, contrairement à ceux des mammifères qui sont remplis de moelle, chez les oiseaux certains os sont creux. Ce sont principalement les os proximaux (humérus et fémur) et les vertèbres, qui sont occupés par le prolongement des sacs aériens et nommés en conséquence « os pneumatisés » (Cubo et Casinos, 2000 ; Dyce *et al.*, 2002) (**figure 13**).



**Figure 13.** Pneumatization of the humerus (A) and of the vertebral column (B) in the chicken (*adapté de Wedel, 2009*)

Les vertèbres pneumatisées sont en bleues. La colonne vertébrale est pneumatisée par des diverticules des sacs aériens cervicaux, des poumons et des sacs aériens abdominaux.

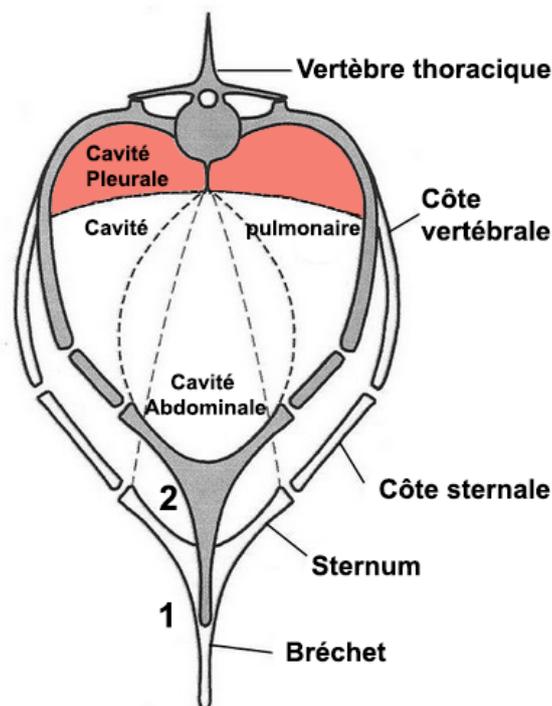
Le développement des sacs aériens à l'intérieur du squelette se déroule généralement après l'éclosion (Hogg, 1984), et varie beaucoup au sein du même ordre, entre les différents taxons d'oiseaux (O'Connor, 2004). La plupart des oiseaux domestiques possèdent 8 sacs aériens qui peuvent être divisés en sacs antérieurs (1 interclaviculaire, 1 cervical, et 2 thoraciques crâniens) et sacs postérieurs (2 thoraciques caudaux et 2 abdominaux) (**figure 12**). Chez certaines espèces, comme le poulet et le canard, le sac cervical est dédoublé, ce qui conduit à un total de 9 sacs aériens (Scheid et Piiper, 1989).

## II. Ventilation et échanges gazeux

---

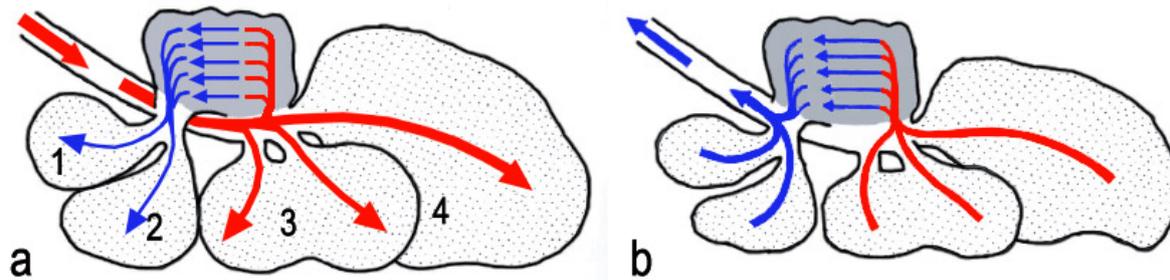
A la différence des mammifères, les poumons des oiseaux ne sont pas contenus dans une cage thoracique fermée par un diaphragme. Les échanges gazeux se font au niveau des poumons, mais les mouvements d'air au travers de ceux-ci sont dus à des différences de pression à différents niveaux de l'appareil respiratoire (Scheid et Piiper, 1972 ; McLelland et Molony, 1983 ; Brackenbury, 1987). Les mouvements d'air dans le tractus respiratoire (inspiration et expiration) nécessitent la contraction de muscles squelettiques. Comme les mammifères, on peut distinguer chez les oiseaux des muscles inspiratoires ou expiratoires. La contraction des premiers entraîne un mouvement crânien et ventral du sternum (vers le bas et l'avant) ainsi qu'un mouvement crânien (vers l'avant) des côtes et de la cage thoracique. Ces mouvements permettent l'élargissement de la cavité thoraco-abdominale où sont localisés les sacs aériens (**figure 14**). Il conduit à une diminution de la pression atmosphérique au niveau des sacs aériens antérieurs et postérieurs générant un gradient de pression à l'origine d'un mouvement d'air de l'extérieur vers les sacs aériens *via* la trachée et les voies respiratoires supérieures. L'air rentre alors par les narines, traverse successivement les cavités nasales, puis les choanes et la fente palatine avant de se diriger vers la glotte. Il emprunte ensuite la trachée puis les deux bronches primaires au niveau de la syrinx. La majorité de l'air inspiré passe ensuite directement dans les sacs aériens postérieurs (thoraciques caudaux et abdominaux). En parallèle, l'air que contenaient les poumons gagne les sacs aériens antérieurs (interclaviculaire, cervical et thoraciques crâniens). La contraction des muscles expiratoires entraîne un mouvement du sternum et des côtes dans la direction opposée réduisant ainsi la taille de la cavité thoraco-abdominale, ce qui accroît la pression dans les sacs aériens (**figure 14**). L'air est donc chassé des sacs postérieurs vers les poumons, puis il passe par les sacs

antérieurs et est évacué par la bronche secondaire médioventrale puis par la bronche primaire et enfin par la trachée (Scheid et Piiper, 1989 ; Maina et Africa, 2000 ; Frandson *et al.*, 2009). Il faut ainsi deux cycles respiratoires complets pour renouveler la totalité de l'air présent dans l'appareil respiratoire. Les flux d'air se dirigent vers les sacs aériens antérieurs et postérieurs durant l'inspiration et au dehors des sacs aériens pendant l'expiration. Cependant les flux d'air traversent également les poumons de la partie caudale à la partie crâniale via les parabronches (**figure 15**). La production d'un flux d'air unidirectionnel au niveau des poumons lors de l'inspiration et de l'expiration est une caractéristique unique et propre aux oiseaux qui conditionne en grande partie l'efficacité des échanges gazeux. Ce flux d'air unidirectionnel approvisionne en permanence les poumons avec un air riche en dioxygène puisqu'il n'y a pas de mélange avec l'air vicié, ce qui optimise encore les échanges gazeux (McLelland et Molony, 1983) (**figure 15**).



**Figure 14.** Schéma du cœlome d'un oiseau en coupe durant l'inspiration (1) et l'expiration (2) (*adapté de Klein et Owerkowicz, 2006*)

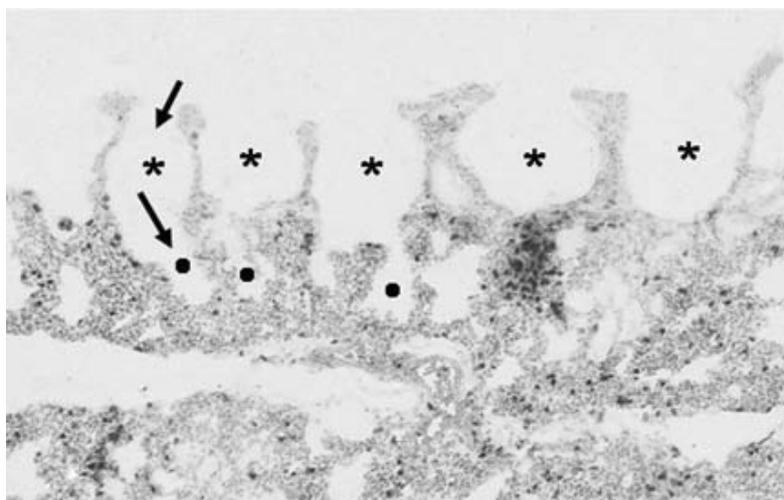
Les pointillés représentent la séparation entre la cavité subpulmonaire, où sont situés la plupart des sacs aériens, et la cavité abdominale. Le volume de la cavité pleurale (orange) change très peu durant les mouvements respiratoires, mais le volume de la cavité subpulmonaire est fortement agrandi durant l'inspiration.



**Figure 15.** Circulation de l'air dans l'appareil respiratoire des oiseaux pendant l'inspiration (a) et pendant l'expiration (b) (*adapté de Reese et al., 2006*)

1 = Sac aérien interclaviculaire, 2 = Sac aérien cervical, 3 = Sacs aériens thoraciques cranial et caudal, 4 = Sac aérien abdominal. Flèches en rouge pour l'air riche en O<sub>2</sub> et en bleu pour l'air riche en CO<sub>2</sub>.

Les échanges gazeux se font au niveau des parabronches, qui représentent l'unité fonctionnelle des échanges gazeux dans les poumons des oiseaux. Les parabronches sont organisées en séries parallèles, séparées les unes des autres par un tissu conjonctif qui contient de nombreux vaisseaux sanguins et des follicules lymphoïdes (Davison *et al.*, 2008). L'air inhalé circule dans la lumière des parabronches puis passe dans le parenchyme *via* successivement les *atria*, les *infundibula* et les réseaux de capillaires aériens (**figure 16**). Ces derniers sont entourés de capillaires sanguins qui vont permettre les échanges gazeux. La barrière de diffusion entre les capillaires aériens et sanguins est constituée principalement d'un endothélium, d'une lame basale, et d'un fin épithélium squameux. Cette barrière est 60 % plus fine chez les oiseaux que chez les mammifères (Maina, 2000 ; Maina, 2002). Ceci assure une grande efficacité dans le système d'échanges gazeux, mais prédispose également les oiseaux aux lésions pulmonaires dues notamment aux agents pathogènes (Maina, 2002).



**Figure 16.** Coupe d'une parabronche (*d'après Davison et al., 2008*)

Le flux d'air (représenté par une flèche) passe de l'*atrium* (\*) à l'*infundibulum* (•) jusqu'à la zone d'échange de gaz (marquage immunohistologique avec un anticorps monoclonal anti-CD4).

### III. Mécanismes de défenses

---

Le système respiratoire supérieur des oiseaux présente des mécanismes protecteurs vis-à-vis de l'inhalation des particules étrangères *sensu lato*. La première barrière physique est constituée par l'épithélium lui-même qui peut sécréter une couche de mucus recouvrant les cellules épithéliales ciliées de la muqueuse nasale, qui contient des structures lymphoïdes organisées appelées NALT (*Nasal-Associated Lymphoid Tissue*) (Bang et Bang, 1968 ; Ohshima et Hiramatsu, 2000). Les particules inhalées de gros diamètre ( $> 4 \mu\text{m}$ ) s'y trouvent piégées et sont ainsi redirigées vers le pharynx à la vitesse de 10 mm/min. Elles sont ensuite dégluties et éliminées dans les fientes (Hayter et Besch, 1974).

La trachée est également recouverte de cellules épithéliales ciliées qui contiennent des cellules caliciformes productrices de mucus (Duncker, 1974). Les cils vibratiles semblent acheminer la couche de mucus en direction de la cavité orale. Aucun tissu lymphoïde n'a été décrit au niveau de la trachée des oiseaux, cependant Gaunson *et al.* (2000 ; 2006) ont montré que la muqueuse trachéale réagissait fortement aux infections par une infiltration massive de lymphocytes suivi d'une prolifération lymphocytaire. Les bronches primaires et la partie proximale des bronches secondaires sont pourvues de cellules ciliées (McLelland et MacFarlane, 1986), alors qu'elles sont plus rares au niveau des sacs aériens (Crespo *et al.*, 1998). Ainsi, les particules de petites tailles transportées au-delà des muqueuses ciliées doivent être éliminées par un mécanisme de défense cellulaire.

Les défenses immunitaires du système respiratoire aviaire comprennent trois principales composantes : les tissus lymphoïdes associés aux bronches, le système immunitaire interstitiel et le système phagocytaire.

Les poumons des oiseaux présentent des structures lymphoïdes hautement organisées d'une part et des cellules lymphoïdes distribuées de façon diffuse d'autre part (Bienenstock *et al.*, 1973). Ces tissus lymphoïdes sont appelés BALT (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissues*) et font partie du groupe des MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissues*). Une des conséquences du flux respiratoire des oiseaux est que les particules étrangères inhalées se déposent en premier dans la région caudale des poumons (Dotterweich, 1930). Cette observation pourrait expliquer l'absence de BALT dans la partie crâniale des poumons et sa présence aux jonctions des bronches primaires et des bronches secondaires caudales chez certaines espèces comme le poulet (Fagerland et Arp, 1993b ; Kaiser, 2010). Les BALT sont également retrouvés au niveau des orifices des sacs aériens (Myers et Arp, 1987). Bien qu'ils soient complètement absents au niveau des jonctions entre les bronches primaires et les

bronches secondaires crânielles chez le poulet (Fagerland et Arp, 1993b), ils sont régulièrement retrouvés dans la partie crâniale des bronches primaires des dindes (Fagerland et Arp, 1990).

Le développement des BALT est influencé par l'âge et par le niveau de stimulation exercé par l'environnement dans lequel sont élevés les oiseaux (Jeurissen *et al.*, 1994). A l'éclosion, pratiquement aucun lymphocyte n'est retrouvé dans les bronches (Fagerland et Arp, 1990 ; 1993a-b). Seuls des lymphocytes T sont déjà présents dans des endroits prédéterminés chez les poussins et les dindonneaux de quelques jours, alors que les cellules B ne sont pas détectées avant la deuxième semaine. Les structures BALT organisées n'apparaissent qu'à partir de la troisième ou quatrième semaine de vie suivant l'éclosion (Fagerland et Arp, 1990 ; 1993a). Durant les semaines suivantes, un nombre croissant de leucocytes CD45+ s'accumulent et se développent dans les structures organisées au niveau des bronches, avec les lymphocytes T disposés au centre et les cellules B en périphérie (Fagerland et Arp, 1993b; Jeurissen *et al.*, 1994). Dans les 3 à 4 semaines suivantes, les nodules lymphoïdes se développent et des plasmocytes produisant des IgA, IgG et IgM sont aussi détectés à l'instar des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Fagerland et Arp, 1993a). Chez les oiseaux plus âgés, la structure est modifiée, puisque ce sont les cellules B qui sont situées au centre des nodules lymphoïdes et recouvertes par les lymphocytes T CD4+. Les BALT matures, qui apparaissent vers la sixième semaine de vie, sont recouvertes par une couche distincte de cellules épithéliales dans laquelle se trouve un grand nombre de lymphocytes (Bienenstock et Befus, 1984 ; Fagerland et Arp, 1993a), et qui est constituée de cellules ciliées et non-ciliées, mais dépourvue de cellules caliciformes. Ces agrégats lymphoïdes sont similaires aux plaques de Peyer et aux tissus lymphoïdes associés au tractus digestif.

En complément des structures BALT, des infiltrations diffuses de leucocytes dans le tissu interstitiel des poumons ont été décrites, constituant le système immunitaire interstitiel. Jeurissen *et al.* (1989) ont pu identifier des leucocytes localisés dans les tissus entourant les parabronches de poussins de 5 jours. Ces cellules sont principalement des monocytes, macrophages et lymphocytes.

La dernière composante du système immunitaire est le système phagocytaire des poumons et des sacs aériens des oiseaux. Dans les poumons des mammifères, les macrophages sont non seulement retrouvés dans les tissus, mais également au niveau de l'épithélium bordant les alvéoles. Ils constituent la première ligne de défense de la surface d'échanges gazeux (Brain, 1985 ; Bowden, 1987) et vont jouer un rôle important lors d'infection au niveau immunitaire (Davison *et al.*, 2008). Peu de données sont disponibles

quant à l'existence de cellules équivalentes chez les oiseaux. Dans la littérature, ces cellules sont identifiées comme « macrophages » ou « phagocytes respiratoires aviaires » (ARP, *Avian Respiratory Phagocytes*) ou encore comme « macrophages respiratoires aviaires libres » (FARM, *Free Avian Respiratory Macrophages*). Les macrophages sont absents de la surface des capillaires aériens mais sont présents au niveau de l'épithélium bordant les *atria* et les *infundibula* (Maina et Cowley, 1998 ; Maina, 2002). Les macrophages sont abondants dans le tissu conjonctif sous cet épithélium (Klika *et al.*, 1996 ; Maina et Cowley, 1998), ainsi que dans le *septum* interatrial (Reese *et al.*, 2006). Ceci indique que les cellules phagocytaires sont localisées au début de la zone stratégique d'échanges gazeux ce qui leur permet d'éliminer les particules inhalées avant qu'elles ne parviennent à traverser la barrière très fine et vulnérable des capillaires aériens. Les leucocytes sont présents à la surface des sacs aériens. Les hétérophiles composent la majorité de ces cellules, suivis par les macrophages, alors que les lymphocytes sont relativement rares (Crespo *et al.*, 1998). Comme dans le parenchyme pulmonaire, des phagocytes mononucléés peuvent être détectés dans le tissu conjonctif des sacs aériens (Klika *et al.*, 1996). En condition inflammatoire, les hétérophiles et les macrophages vont rapidement migrer au niveau de la surface respiratoire. Une variété de *stimuli* a déjà été utilisée pour caractériser ce processus. Ainsi l'inoculation intratrachéale de bactéries chez des poulets entraîne l'afflux de macrophages et augmente l'activité phagocytaire (Toth *et al.*, 1988a, b).

Plusieurs systèmes de prise en charge des particules étrangères sont ainsi mis en place au niveau de l'appareil respiratoire. Cependant, en dépit de ces différentes lignes de défense et du fait de la configuration anatomique de leur appareil respiratoire supérieur, les oiseaux semblent inhaler plus de particules en suspension dans l'air environnant que les mammifères. En effet, le système respiratoire des oiseaux permet une ventilation continue des poumons, avec comme conséquence une inhalation importante de particules étrangères. Or dans l'environnement des élevages avicoles, à cause en particulier du confinement des oiseaux, la poussière et les agents pathogènes sont omniprésents et peuvent engendrer un stress plus ou moins continu au niveau du système respiratoire (Villegas, 1998). Cela induit une grande sensibilité aux agents pathogènes à tropisme respiratoire.



# *Aspergillus* et aspergillose

## Chapitre

## Chapitre

# 3





## I. Le genre *Aspergillus*

---

### I. a. Ecologie et taxinomie

Le genre *Aspergillus* a été pour la première fois décrit en 1729 par Pier Antonio Micheli, un prêtre et biologiste italien. Micheli, observant les moisissures au microscope, leur trouve une ressemblance avec le goupillon (du verbe latin *aspergere* qui signifie « se disperser ») utilisé dans les églises pour asperger d'eau bénite objets ou personnes participant à une cérémonie religieuse.

La première espèce décrite fut *Aspergillus glaucus*, nommée par Link en 1809. Par la suite, de nombreuses espèces ont été décrites, notamment *A. fumigatus*, pour la première fois en 1863 par le docteur Georg W. Fresenius. Des cas d'infections humaines à *Aspergillus* au cours des années suivantes ont été recensés, la plupart dues à *A. fumigatus*. En 1926, Thom et Church ont publié le premier ouvrage sur le genre *Aspergillus*. En 1965, Raper et Fennell publient un autre ouvrage, « The Genus *Aspergillus* », qui restera la référence pendant plus de 40 ans.

Les champignons sont des organismes eucaryotes à structure syncytiale, dépourvus de chloroplastes, possédant de la chitine dans la paroi cellulaire et de l'ergostérol dans la membrane plasmique. Le genre *Aspergillus* a longtemps été classé dans le *phylum* des *Deuteromycota*, dans lequel sont regroupés les champignons qui n'ont pas de cycle de reproduction sexuée (Taylor *et al.*, 1999). Cependant, aujourd'hui, les analyses moléculaires et la découverte d'une forme sexuée chez plusieurs espèces ont permis de classer les *Aspergillus* dans le *phylum* des *Ascomycota*, qui regroupe des champignons à mycélium cloisonné présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores (Hibbett *et al.*, 2007). Au sein des *Ascomycota*, les champignons du genre *Aspergillus* sont inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, la classe des *Eurotiomycetes*, la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, et l'ordre des *Eurotiales*, qui est caractérisé par des asques contenus dans des ascocarpes de type cléistothèce ou plus rarement gymnothèce, et par une multiplication asexuée par phialides produisant des phialoconidies (Hibbett *et al.*, 2007 ; Bennett, 2010).

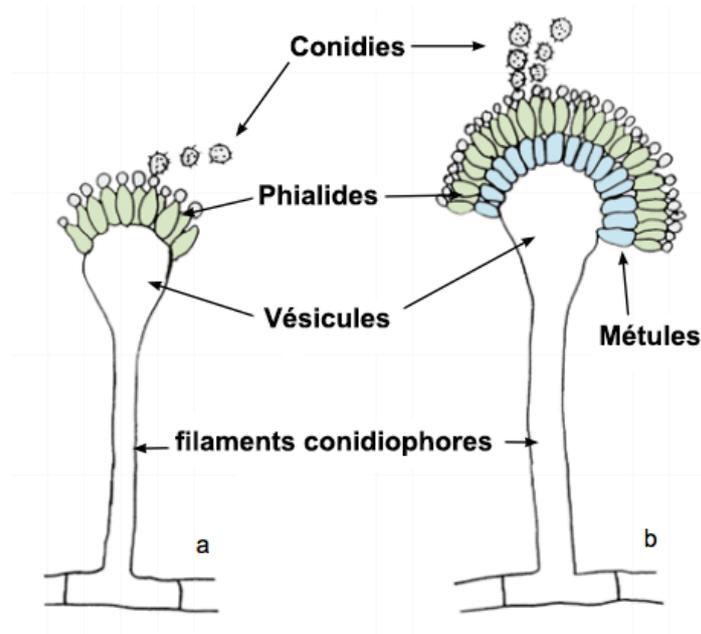
Plus de 250 espèces appartenant au genre *Aspergillus* ont été décrites et sont classées en 8 sous-genres dont les plus importants sont *Aspergillus*, *Circumdati*, *Candidi*, *Fumigati* et

*Nidulantes*. Chaque sous-genre est lui-même subdivisé en sous-groupes appelés « sections ». Les sections regroupent toutes les espèces qui sont semblables morphologiquement mais génétiquement distinctes. En effet, les critères d'identification utilisés pour identifier les espèces étaient jusqu'alors seulement morphologiques, mais l'utilisation récente d'outils de caractérisation moléculaire a permis de montrer que certains regroupements d'espèces (basés sur l'aspect phénotypique) n'avaient plus de fondement (Balajee *et al.*, 2006). Les principales sections sont réparties dans le sous-genre *Circumdati* (sections *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*), dans le sous-genre *Candidi* (section *Candidi*), dans le sous-genre *Fumigati* (sections *Fumigati* et *Clavati*) et dans le sous-genre *Nidulantes* (sections *Nidulantes*, *Usti* et *Versicolores*) (Peterson *et al.*, 2008).

La section *Fumigati* regroupe 33 espèces, dont 10 espèces anamorphes (pas de stade de reproduction sexuée connu) du genre *Aspergillus* et 23 espèces téléomorphes du genre *Neosartorya* (stade de reproduction sexuée connu). L'identification des espèces membres de la section *Fumigati* est basée sur la morphologie de la colonie et des structures conidiogènes, conidies, ascospores et ascocarpes. Cependant les caractéristiques morphologiques ne sont pas toujours suffisantes pour distinguer deux espèces. L'espèce principale appartenant au sous-genre et à la section *Fumigati* est *Aspergillus fumigatus*. Cependant il existe 4 autres espèces très proches : *A. fumigatiaffinis*, *A. novofumigatus*, *A. viridinutans* et *A. lentulus*. Ces espèces doivent être identifiées par des méthodes de biologie moléculaire. *Aspergillus lentulus* a notamment été identifié grâce à l'analyse de séquences partielles des gènes de la  $\beta$ -tubuline et de la calmoduline (Balajee *et al.*, 2005).

### **I. b. Caractères morphologiques et reproduction**

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, majoritairement haploïde, isolés communément à partir du sol, des débris végétaux ou de l'air. Ce sont des saprobiontes de l'environnement qui participent à la dégradation de la matière organique (Prescott *et al.*, 1993).



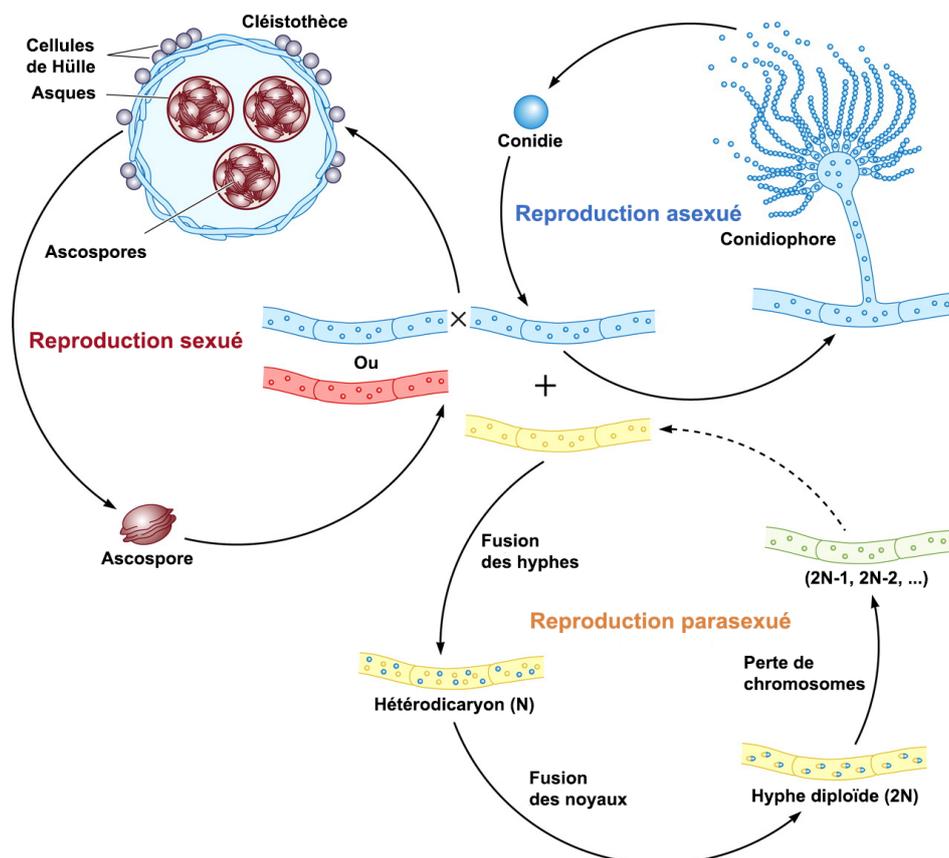
**Figure 17.** Morphologie des têtes aspergillaires unisériées (a) et bisériées (b)  
(adapté de Ellis et al. 2007)

Le genre *Aspergillus* est caractérisé morphologiquement par la présence de filaments conidiophores renflés à leur sommet par une vésicule partiellement couverte de phialides fixées ou non à des métules, et qui produisent des phialoconidies, le tout formant une entité spécifique appelée « tête aspergillaire » (**figure 17**) (Chermette et Bussiéras, 1993).

Dans l’environnement, la plupart des *Aspergillus* se multiplient presque exclusivement sur un mode asexué. Cependant, environ 70 espèces ont également un cycle de reproduction sexuée (Geiser *et al.*, 1996 ; Kwon-Chung et Sugui, 2009) (**figure 18**). Tous les *Aspergillus* produisent des conidies, qui sont des spores asexuées *via* un cycle de développement qui est divisé en deux étapes : croissance végétative et reproduction asexuée. La phase de croissance végétative commence par la germination d’une conidie puis est suivie de la formation du mycélium composé d’hyphes. Lorsque les conditions sont propices, certaines hyphes cessent leur croissance pour initier un développement asexué, qui consiste en la formation de têtes aspergillaires puis en la production de conidies (**figure 18**) (Ni et Yu, 2007).

Environ un tiers des espèces connues d’*Aspergillus*, y compris *A. fumigatus* et *A. nidulans*, peut se reproduire de façon sexuée. Le développement sexué débute par la formation d’un cléistothèce, dans lequel se forme un ascogone à deux noyaux résultant de la fusion de deux hyphes. Les noyaux des dicaryons vont fusionner puis une méiose suivie d’une mitose va permettre la formation de 8 ascospores contenues dans un asque. Chaque ascospore

donnera un nouveau mycélium haploïde. Un cléistothèce peut contenir plusieurs milliers d'ascospores (**figure 18**) (Sohn et Yoon, 2002). La plupart des espèces téléomorphes ont une reproduction sexuée qui se fait à partir d'un même mycélium (reproduction sexuée homothallique), mais elles sont également capables de se reproduire à partir de deux hyphes différentes (reproduction sexuée hétérothallique). Récemment, un cycle sexuel hétérothallique a pu être observé chez certaines espèces d'*Aspergillus* (dont *A. fumigatus*) connues jusque-là comme seulement asexuées. Comparée au développement asexué, la reproduction sexuée confère de nombreux avantages, comme la création de nouveaux génotypes pouvant s'avérer plus adaptés à un environnement potentiellement variable, l'élimination des mutations délétères du génome et le développement d'organes de fructification résistants aux conditions difficiles (Lee *et al.*, 2010).



**Figure 18.** Cycle de vie du champignon *Aspergillus nidulans* (adapté de Lee *et al.*, 2010)

L'espèce *A. nidulans* produit des conidies robustes durant le cycle asexué. Les conidies germent et forment des hyphes à partir desquels se développent les conidiophores qui produisent les conidies. Le champignon peut également se reproduire de façon sexuée, sous sa forme homothallique, et former ainsi des ascospores *via* la formation de cléistothèces. *A. nidulans* est capable de se reproduire de façon parasexuée, par fusion d'hétérohyphes en un hétérodictyone, qui donne alors une hyphe diploïde. Une perte aléatoire des chromosomes permet un retour de l'hyphe à son état haploïde.

En plus des cycles sexués et asexués, de nombreuses espèces peuvent avoir un cycle parasexué. Celui-ci commence par la formation d'un dicaryon résultant de la fusion d'hyphes puis des deux noyaux qui génèrent la formation d'une hyphe diploïde. Les cellules végétatives se divisent par mitose plutôt que par méiose, et le nombre de chromosomes haploïdes est restauré après perte aléatoire de la moitié des chromosomes (**figure 18**) (Pontecorvo, 1956). La reproduction parasexuée pourrait apporter un avantage évolutif en créant de la diversité génétique *de novo* plutôt que de mélanger des génomes différents provenant d'isolats divergents (Lee *et al.*, 2010).

### I. c. Identification des *Aspergillus*

L'identification des *Aspergillus* se fait dans un premier temps par la description morphologique des colonies sur gélose et des têtes aspergillaires sous microscope optique. Les espèces d'*Aspergillus* poussent sur une grande variété de milieux conventionnels utilisés en laboratoire, tel que le milieu de Sabouraud. Cependant les milieux les plus utilisés pour l'identification sont les milieux gélosés additionnés d'extraits de malt et le milieu Czapek contenant un ou plusieurs antibiotiques. L'optimum de température est 37°C, bien que la croissance puisse se faire entre 12 et 65°C (Kozakiewicz et Smith, 1994). Les têtes aspergillaires sont produites après 48 h de croissance et leur aspect morphologique permet d'identifier les différentes espèces en fonction de la taille, la forme et la couleur des têtes aspergillaires, la forme et la taille des vésicules, des phialides et des conidies. Chez les espèces pathogènes, les conidiophores ne sont pas branchés, généralement non septés, pas ou peu pigmentés et sont plus larges que les hyphes.

Malgré ces critères d'identification, certaines espèces sont trop similaires et ne peuvent pas être correctement identifiées. L'étude de Samson *et al.* (2007) a montré que les ascospores de plusieurs espèces appartenant à la section *Fumigati* étaient semblables au niveau de la forme et de la structure (microscopie électronique à balayage), les rendant impossible à différencier. L'utilisation d'outils moléculaires comme le séquençage partiel du gène de la calmoduline et de la  $\beta$ -tubuline sont indispensables pour la caractérisation de certaines espèces.

## II. *Aspergillus fumigatus*

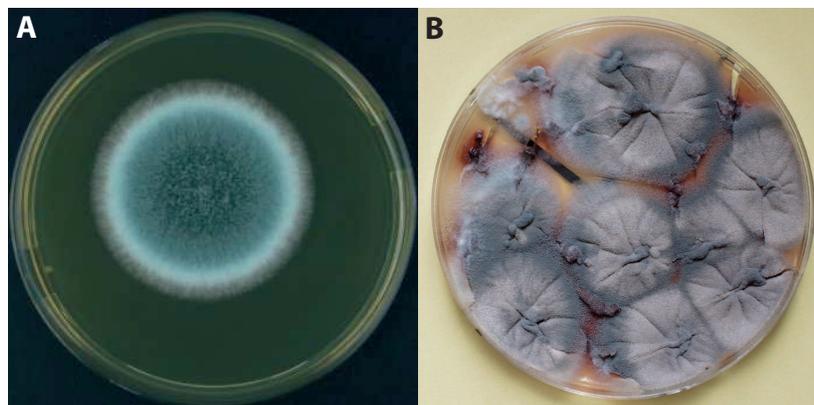
---

### II. a. Ecologie

*Aspergillus fumigatus* est un champignon présent dans tous les milieux, mais sa niche écologique primaire est le sol, au niveau de la végétation en décomposition, où il joue un rôle important dans la transformation des matières organiques. Il peut vivre en saprobiose en tirant partie de substances organiques mortes et n'a pas de besoins nutritionnels spécifiques. *Aspergillus fumigatus* est un champignon aérobie et thermophile qui peut se développer dans une gamme de températures allant de 12 à 65°C (optimum à 37°C) (Kozakiewicz et Smith, 1994). *Aspergillus fumigatus* peut se développer avec des valeurs de l'activité de l'eau minimale ( $A_w$ ) comprise entre 0,85-0,94, ce qui en fait un champignon hydrophile, ainsi qu'un xérophile marginal. Les conidies sont très résistantes et peuvent survivre à différents stress environnementaux, tels que la dessiccation, les températures extrêmes et les stress osmotiques et oxydatifs. Son génome, qui a été entièrement séquencé (<http://www.tigrblast.tigr.org>), est constitué de 9 926 gènes répartis sur huit chromosomes. La taille totale du génome est de 29,4 Mb (Nierman *et al.*, 2005).

### II. b. Aspects macroscopique et microscopique

Les colonies d'*A. fumigatus* ont un aspect velouté (ou floconneux), formant un gazon blanc (avant la sporulation), devenant vert-gris ou gris bleuâtre. A maturité, les colonies sont brun sombre comme de la fumée (d'où le nom *fumigatus* qui provient du verbe latin *fumigare* signifiant « faire de la fumée ») (**figure 19**) (Chermette et Bussieras, 1993 ; Euzéby, 2008).



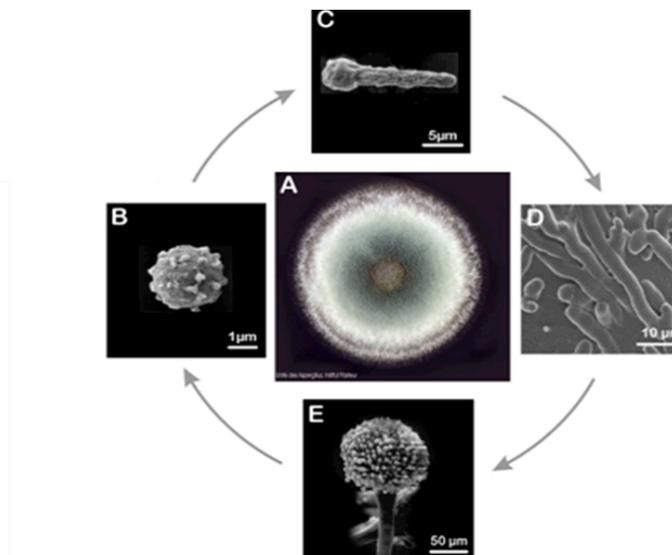
**Figure 19.** Aspects macroscopiques de colonies d'*Aspergillus fumigatus*  
(A : <http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/> ; B : *Parasitologie, ENVA*)

Les conidiophores mesurent en moyenne 300  $\mu\text{m}$  de long. Les vésicules sont claviformes, vertes dans leur partie supérieure, et font 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Elles portent à leur surface, sur la partie supérieure, les phialides généralement pigmentés en vert mesurant 6-8 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Les conidies sont vertes, à paroi rugueuse et mesurent entre 2,5 et 3  $\mu\text{m}$  de diamètre (**figure 20**).



**Figure 20.** Aspect microscopique d'*Aspergillus fumigatus* (Latgé et Steinbach, 2009)

## II. c. Cycle biologique

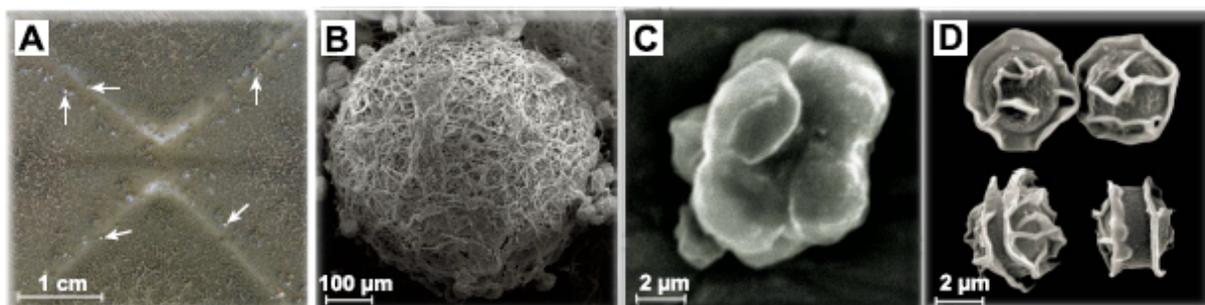


**Figure 21.** Cycle biologique haploïde (asexué) d'*A. fumigatus*  
(Desoutter, 2008 ; d'après Latgé, 1999)

(A) Colonie sur milieu gélosé Malt 2 %. Les photos de B à E de microscopie électronique à balayage représentent une conidie (B), une conidie germée (C), des hyphes (D) et un conidiophore produisant les conidies (E).

Le cycle biologique d'*A. fumigatus* est haploïde. Ce sont les conidies qui donnent au champignon sa couleur verte (**figure 21a**) due à la présence d'un pigment, la mélanine. Les conidies (**figure 21b**) germent et émettent un tube germinatif (**figure 21c**) lorsque le milieu est riche en nutriments. Le tube germinatif va s'allonger pour former un hyphe septé (8 µm de diamètre) qui va se ramifier et donner le mycélium (**figure 21d**). Lorsque le milieu est épuisé, des structures spécialisées produisant les conidies apparaissent (e.g. stade de résistance, dispersion) : ce sont les conidiophores (**figure 21e**). Chaque conidiophore va produire par l'intermédiaire de cellules conidiogènes (les phialides) une centaine de conidies hydrophobes facilement disséminées dans l'air une fois matures.

L'espèce *A. fumigatus* a longtemps été considérée comme asexuée, cependant il a été montré en 2009 que, sous certaines conditions, ce champignon possède un cycle de reproduction sexuée fonctionnel qui conduit à la production de cleistothèces et d'ascospores. L'espèce téléomorphe a été nommée *Neosartorya fumigata* (O'Gorman *et al.*, 2009) (**figure 22**).



**Figure 22.** *Neosartorya fumigata* sp. nov. (d'après O'Gorman *et al.*, 2009)

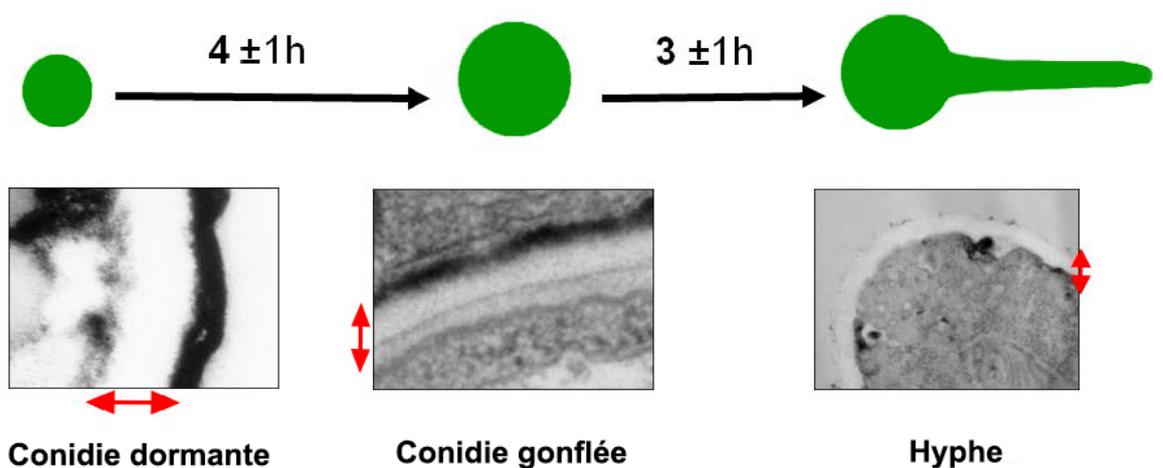
A : Cleistothèce (flèches) le long de l'intersection des deux types sexués de colonies. (B-D) Observations en microscopie électronique à balayage, B : Cleistothèce. C : Asques contenant 8 ascospores. D : Ascospores.

## II. d. Paroi fongique

La paroi cellulaire fongique est un constituant essentiel qui protège le champignon des agressions du milieu et qui régule les échanges entre la cellule fongique et l'environnement. Elle représente entre 20 à 30 % du poids sec de la cellule. C'est une structure à la fois rigide, conditionnant la forme du champignon, et dynamique. Sa composition et son organisation variant en fonction des changements de l'environnement (nutriments, toxines), ainsi qu'au cours de la morphogenèse du champignon (**figure 23**). Sans paroi ou avec une paroi altérée le

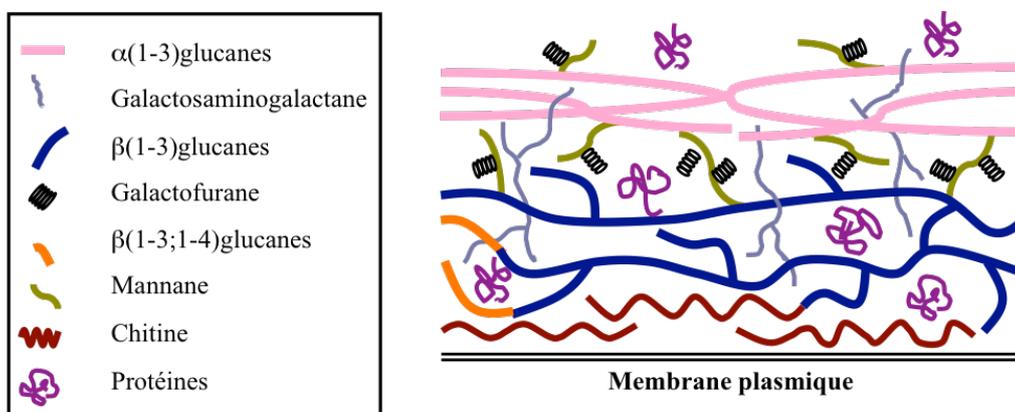
champignon meurt : elle constitue donc une cible privilégiée pour le développement d'antifongiques.

La paroi est constituée à 90 % de polysaccharides liés entre eux de façon covalente pour former un squelette rigide entouré de glycoprotéines (**figure 24**) (Fontaine *et al.*, 2000 ; Bernard et Latgé, 2001 ; Latgé et Calderone, 2006 ; Gastebois *et al.*, 2009). On distingue deux fractions de polysaccharides en fonction de leur solubilité dans la soude : la fraction alcali-soluble constituée d' $\alpha(1-3)$ glucanes, de galactomannanes et de glycoprotéines, et la fraction alcali-insoluble constituée de  $\beta(1-3)$ glucanes, de galactomannanes, de  $\beta(1-3, 1-4)$ glucanes et de chitine (**figure 24**) (Mouyna et Fontaine, 2009).



**Figure 23.** Evolution de la structure de la paroi selon le stade de développement d'*A. fumigatus* (adapté de Mouyna et Fontaine, 2009)

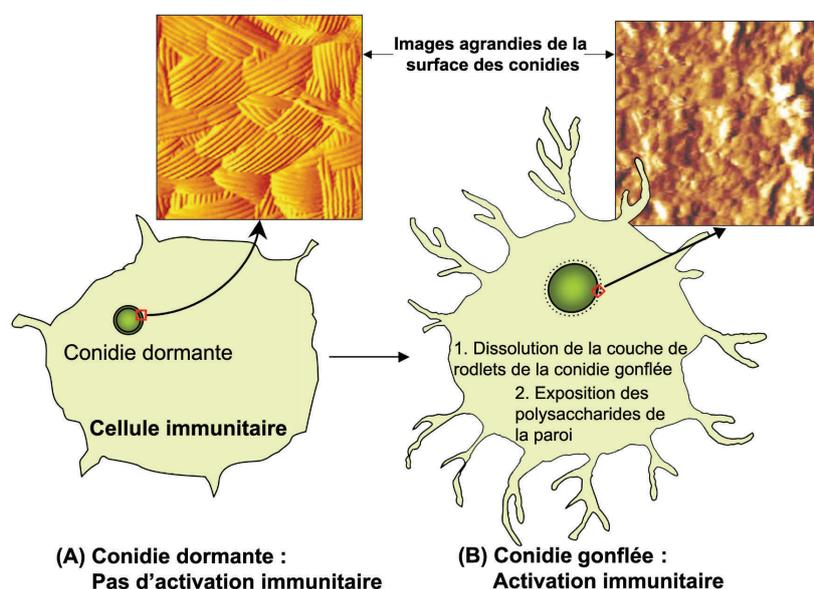
Les flèches rouges indiquent l'épaisseur la paroi



**Figure 24.** Composition et structure de la paroi d'*A. fumigatus* (d'après Gastebois, 2009)

Les  $\beta(1-3)$ glucanes qui sont les constituants majoritaires de cette paroi sont synthétisés au niveau de la membrane plasmique par le complexe glucane synthase (Beauvais *et al.*, 1993, 2001). Ils sont essentiels pour la survie du champignon ; en effet, la disruption du gène *FKSI* (codant la sous-unité catalytique de la glucane synthase) est létale pour *A. fumigatus* (Firon *et al.*, 2002). Les  $\beta(1-3)$ glucanes normalement synthétisés sont ensuite libérés sous forme de chaînes linéaires dans l'espace périplasmique où ils sont modifiés et liés avec d'autres chaînes de  $\beta(1-3)$ glucanes ou d'autres polysaccharides pour former le cœur tridimensionnel rigide de la paroi.

Une couche de mélanine entoure également la spore. Cette dernière limiterait l'action des métabolites libérés par les phagocytes. La pigmentation vert-sombre des conidies d'*A. fumigatus* semble donc leur conférer un effet protecteur (Bernard et Latgé, 2001 ; Bernard-Cardona, 2003). Les autres constituants importants de la paroi sont les hydrophobines, protéines amphipatiques de surface produites par les champignons sous forme soluble. Elles appartiennent à une famille de petites protéines retrouvées uniquement chez les champignons filamenteux (Wosten, 2001). La paroi cellulaire des conidies est recouverte par une couche de bâtonnets constitués d'hydrophobine RodA. Cette couche hydrophobe permet



**Figure 25.** Vie intracellulaire d'une conidie d'*A. fumigatus* dans un phagocyte

(adapté de Aimaniananda et Latgé, 2010)

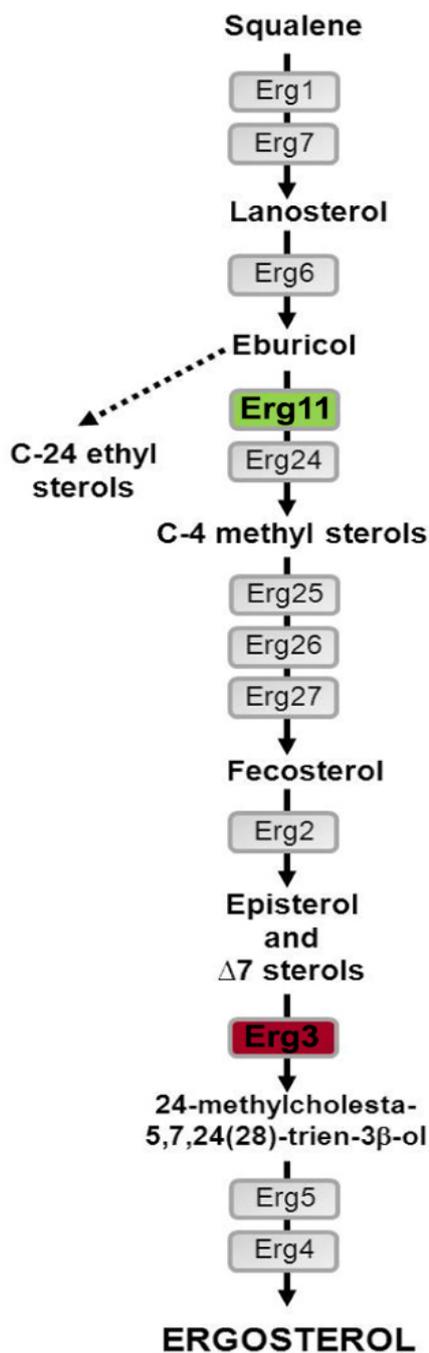
(A) Conidie dormante d'*A. fumigatus* phagocytée et non reconnue comme étrangère à cause de la couche d'hydrophobines à la surface. (B) Gonflement de la conidie dans le phagocyte, la couche d'hydrophobines est dégradée, et les antigènes sont ainsi exposés aux « *pattern recognition receptors* » induisant une réponse immunitaire.

la dispersion des spores dans l'air et masque des antigènes et allergènes fongiques rendant les spores non détectables par le système immunitaire (Paris *et al.*, 2003 ; Aïmanianda et Latgé, 2010). La couche d'hydrophobines se dissout chez les conidies gonflées et est totalement éliminée de la surface des conidies germées (**figure 25**) (Aïmanianda et Latgé, 2010).

## II. e. Membrane plasmique

Bien que la membrane plasmique des champignons soit similaire à celle des animaux, de nombreuses caractéristiques biochimiques lui sont spécifiques. En effet, alors que les cellules des mammifères utilisent le cholestérol dans leurs membranes, les champignons ont recours à un stérol distinct l'ergostérol (Benveniste, 2004). Pour ces raisons, les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol sont des cibles pour le développement de molécules antifongiques.

La synthèse de l'ergostérol comporte une série d'étapes impliquant environ 20 enzymes et inclut la synthèse de squalène à partir du mévalonate (Ferreira *et al.*, 2005 ; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). Cette voie de biosynthèse est bien connue chez *Saccharomyces cerevisiae*, qui sert de modèle d'étude pour les voies de synthèse des eucaryotes (Fryberg *et al.*, 1973). Chez les champignons, la biosynthèse de l'ergostérol semble être spécifique du genre (Nes *et al.*, 1989). Le lanostérol, premier stérol formé à partir du squalène représente un point d'embranchement de la voie de biosynthèse. La première voie possible à partir du lanostérol est la formation de zymostérol par des déméthylations successives qui conduit à la formation de fecostérol. La seconde voie permet la formation d'un stérol, l'éburicol, par méthylation du lanostérol, qui conduit également, par des déméthylations successives, à la formation de fecostérol. Les deux branches possibles pour la formation de fecostérol sont espèces-dépendantes. L'étude d'Alcazar-Fuoli *et al.* (2008) suggère que la voie utilisée chez *A. fumigatus* est celle faisant intervenir l'éburicol (**figure 26**). La seconde partie de la voie de biosynthèse de l'ergostérol consiste en une série d'étapes permettant la transformation du fecostérol en ergostérol (**figure 26**). Chez *A. fumigatus*, trois différentes branches possibles ont ainsi pu être décrites pour cette seconde partie. Seul élément commun aux trois branches, la formation d'épistérol à partir du fecostérol, qui est la seule réaction réversible de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, et qui est catalysée par l'action de l'enzyme C-8 stérol isomérase (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008 ; Alcazar-Fuoli et Mellado, 2013).



**Figure 26.** Voie de biosynthèse simplifiée de l'ergostérol chez *A. fumigatus*  
(d'après Alcazar-Fuoli et Mellado, 2013)

### III. Aspergillose

---

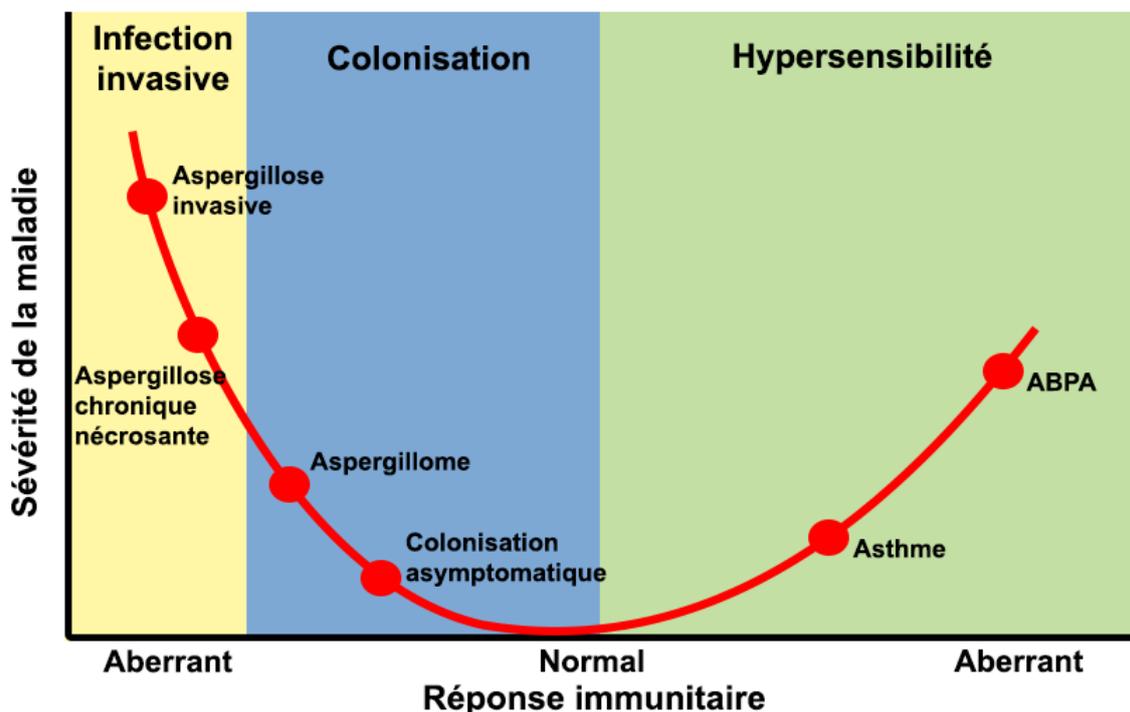
Du fait d'une capacité de sporulation abondante et de la diversité des substrats organiques pouvant être colonisés par le champignon, les conidies d'*A. fumigatus* qui constituent la forme infectante sont omniprésentes dans les environnements aériens (1 à 100 conidies/m<sup>3</sup>) et des centaines de conidies vont ainsi être inhalées chaque jour (Taylor, 2009). Leur petit diamètre (environ 3 µm) leur permet de pénétrer facilement les voies respiratoires des mammifères et des oiseaux générant dans certains cas un processus infectieux ou allergique.

L'aspergillose est une maladie non contagieuse qui touche aussi bien l'homme que les animaux vertébrés et invertébrés. Chez l'homme, si la candidose représente la première pathologie d'origine fongique, l'aspergillose est la première pathologie provoquée par un champignon filamenteux. Chez les animaux, l'aspergillose est une maladie qui demeure peu fréquente chez les mammifères, alors que chez les oiseaux cette affection est reconnue comme une cause majeure de mortalité (Guillot et Chermette, 2001).

#### III. a. Aspergilloses chez l'Homme

Chez l'homme, l'inhalation de conidies est généralement sans effet car les éléments fongiques sont efficacement éliminés par les défenses immunitaires innées. Cependant, avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (greffes d'organes et de cellules souches hématopoïétiques, traitements immunosuppresseurs, syndrome d'immunodéficience acquise), *A. fumigatus* est devenue l'espèce fongique la plus impliquée dans les pathologies fongiques associées à l'immunodépression (Latgé, 1999 ; Cornet *et al.*, 2002). Les aspergilloses se présentent sous différentes formes cliniques chez l'homme : de la simple manifestation allergique à l'aspergillose pulmonaire invasive qui demeure la principale et la plus redoutable des affections dues aux moisissures du genre *Aspergillus* en milieu hospitalier. La pathogénicité des espèces *Aspergillus* réside dans la nature de la réponse immune de l'hôte. Les diverses réponses immunitaires anormales de l'hôte vont ainsi entraîner le développement de différentes affections plus ou moins sévères (**figure 27**) (Park et Mehrad, 2009). L'espèce *A. fumigatus* est à l'origine de 90 % des aspergilloses observées chez l'Homme.

L'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) est décrite chez des patients atteints d'asthme ou de mucoviscidose. Elle se manifeste par un asthme bronchique avec des infiltrations pulmonaires transitoires qui peuvent conduire à une fibrose pulmonaire (Agarwal *et al.*, 2009). Il s'agit d'une réponse immunitaire locale à une colonisation aspergillaire trachéobronchique chronique (Greenberger et Patterson, 1987 ; Wardlaw et Geddes, 1992). Il existe d'autres formes de manifestations allergiques provoquées par *A. fumigatus* : l'asthme bronchique et l'alvéolite allergique extrinsèque (ou maladie du poumon de fermier).



**Figure 27.** Représentation des affections attribuées aux espèces du genre *Aspergillus* en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte (*adaptée de Park et Mehrad, 2009*)

L'aspergillome est une truffe de mycélium qui se développe dans des cavités pulmonaires préexistantes causées par une tuberculose, une sarcoïdose ou d'autres maladies pulmonaires. Le développement de l'infection est lent et la dissémination est exceptionnelle. Cependant, plusieurs complications peuvent survenir, notamment des hémoptysies récidivantes et parfois abondantes lorsque la truffe est proche des gros vaisseaux et en raison du caractère angioinvasif d'*A. fumigatus* (Israel *et al.*, 1982 ; Wollschlager et Khan, 1984 ; Latgé, 1999).

L'aspergillose invasive (AI) est une infection aiguë, avec envahissement mycélien vasculaire et tissulaire. Les patients à risque d'AI sont des patients fortement

immunodéprimés neutropéniques et/ou ayant eu un traitement par corticostéroïdes à fortes doses et pendant au moins 3 semaines. Cette pathologie touche essentiellement les patients d'hématologie ayant bénéficié d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou d'un traitement d'induction pour une leucémie aiguë (Zaas et Alexander, 2009). Le champignon se développe à la faveur d'une perturbation de l'immunité innée, notamment au niveau des défenses pulmonaires. En l'absence de macrophages alvéolaires et de polynucléaires neutrophiles, les filaments d'*A. fumigatus* peuvent se développer, diffuser dans le parenchyme pulmonaire et envahir les tissus. Cette affection est une des causes majeures de décès chez les patients immunodéprimés (Kontoyiannis *et al.*, 2010). Le taux de mortalité chez ces patients peut atteindre 80 % malgré la mise en place d'un traitement (Carle, 2003). Cette affection est difficile à diagnostiquer, notamment dans les stades précoces, du fait de signes cliniques non spécifiques et de marqueurs biocliniques peu sensibles (Verweij et Meis, 2000 ; Desoubeaux *et al.*, 2014).

### III. b. Aspergilloses chez les Oiseaux

La première description d'aspergillose chez les animaux a été faite par Mayer, en 1815, qui a observé l'infection dans les sacs aériens et les poumons d'un choucas des tours (*Corvus monedula*). En 1863, Frésenius décrit pour la première fois *A. fumigatus* dans le poumon d'une outarde barbue (*Otis tarda*). L'aspergillose aviaire est causée dans la majorité des cas (95 %) par l'espèce *A. fumigatus*, mais d'autres espèces sont également retrouvées, notamment *A. flavus*.

Toutes les espèces d'oiseaux, sauvages ou domestiques, jeunes ou âgés, immunocompétentes ou immunodéprimées, devraient *a priori* être considérées comme potentiellement réceptifs et sensibles aux infections à *Aspergillus* (Tell, 2005 ; Thomas *et al.*, 2007 ; Arné *et al.*, 2011 ; Olias *et al.*, 2011). Les infections aspergillaires ont été rapportées chez de nombreux oiseaux, tels que les poulets, les dindes, les canards, les oies, les autruches, les nandous, les pigeons, les cailles japonaises, les perroquets, les canaries, les manchots, les rapaces, et les passereaux entre autres (Converse, 2008 ; Arné *et al.*, 2011). Les aspergilloses sont des affections fréquentes et graves en élevage avicole, qui concernent toutes les espèces de volailles, mais plus particulièrement la Dinde. Dans les élevages de dindes, l'aspergillose est rendue responsable de 5 à 10 % de la mortalité chez les oiseaux les plus jeunes (Richard *et al.*, 1981).

### III. b. 1) Facteurs favorisants

Parmi les oiseaux, il existe des différences de sensibilité face à l'aspergillose. En effet certaines espèces comme la dinde, les Sphénisciformes, les Falconiformes et les Ansériformes semblent plus sensibles, bien que les raisons de cette sensibilité accrue ne soient pas connues. En plus de cette différence de sensibilité, différents facteurs vont prédisposer certains oiseaux à l'aspergillose, notamment les conditions environnementales et le statut immunitaire.

Ceci est particulièrement vrai dans les élevages aviaires où les mauvaises conditions d'hygiène, les défauts de ventilations, les problèmes de température ambiante et d'humidité relative (Pasanen *et al.*, 1991 ; Phalen, 2000 ; Tell, 2005), l'état des litières, la qualité du stockage et la distribution des aliments (Khosravi *et al.*, 2008), et l'exposition à des polluants atmosphériques, incluant des toxines bactériennes ou fongiques, peuvent grandement favoriser l'apparition d'aspergillose. La densité des oiseaux est un autre facteur de risque puisque les mouvements continuels des oiseaux vont disperser les conidies dans l'air (Arné *et al.*, 2011). Or dans les élevages aviaires, la concentration de moisissures du genre *Aspergillus* peut varier entre 10 et  $10^4$  UFC/m<sup>3</sup>, aussi bien en bâtiment poulet (Sauter *et al.*, 1981 ; Gigli *et al.*, 2005 ; Nieguitsila *et al.*, 2011 ) que dinde (Debey *et al.*, 1995 ; Lair-Fulleringer *et al.*, 2006). Les moisissures se développent particulièrement rapidement en condition de chaleur humide, tandis que les conidies se dispersent dans l'air sec principalement du fait de leur hydrophobicité et des flux d'air. Les animaux se contaminent alors directement par inhalation des conidies provenant de la litière ou des aliments contaminés. La quantité de conidies inhalées doit cependant être suffisamment élevée pour provoquer une aspergillose clinique (Richard *et al.*, 1981). La production avicole entraîne également un stress chez les oiseaux qui peut être un facteur prédisposant à l'aspergillose, de même que l'administration de corticostéroïdes (Tell, 2005 ; Verstappen et Dorrestein, 2005).

Pour l'aspergillose des œufs, la contamination transcoquillière peut se produire si des conidies germent sur les œufs et des hyphes pénètrent par les pores de la coquille ou par d'éventuelles fissures (Kunkle, 2003).

### III. b. 2) Signes cliniques

Les signes cliniques de l'aspergillose ne sont pas spécifiques et sont variés (e.g. léthargie, anorexie, plumage ébouriffé, troubles respiratoires) rendant le diagnostic clinique précoce délicat (Dahlhausen *et al.*, 2004). Il existe deux formes principales d'aspergillose chez

l'oiseau : la forme aiguë et la forme chronique. Dans les couvoirs, les moisissures *Aspergillus* peuvent pénétrer la coquille des œufs, et se développer au niveau de la chambre à air et des membranes coquillères, provoquant une aspergillose des œufs, qui conduit souvent à de la mortalité en coquille (Kunkle, 2003). Les oiseaux peuvent également être contaminés par les conidies d'*Aspergillus in ovo* ou autour de l'éclosion, conduisant au développement d'une aspergillose aiguë du jeune poussin. La prévalence de l'aspergillose des œufs diminue dans les pays industrialisés du fait de la mise en place de méthodes efficaces de décontamination des locaux et des œufs et de l'élimination systématique des œufs endommagés ou morts (Janssen Animal Health, 2006).

L'**aspergillose aiguë**, appelée aussi pneumonie des couveuses, touche donc principalement les jeunes oiseaux qui sont exposés à de fortes concentrations de conidies. La mortalité est très élevée (70 à 90 % des effectifs) survient très rapidement (entre 1 et 10 jours). Les oiseaux atteints se mettent en boule, sont ébouriffés, tête baissée, yeux clos et présentent des troubles respiratoires incluant dyspnée, toux sèche et cyanose (Pier et Richard, 1992 ; Kunkle et Rimler, 1996). Ils peuvent ne présenter qu'un seul de ces signes, voire mourir brutalement sans signe précurseur. L'aspergillose aiguë est responsable de pertes économiques importantes dues tout d'abord à la mortalité, mais également parce que l'indice de consommation et le gain moyen quotidien des oiseaux qui survivent à l'infection sont dégradés (Stuart, 1980 ; Kunkle et Rimler, 1996 ; Lupo *et al.*, 2010).

L'**aspergillose chronique** est une affection plus sporadique qui touche principalement les oiseaux âgés dont le système immunitaire peut être altéré ou qui sont soumis à des situations de stress chronique. L'inhalation de quantités modérées de conidies peut suffire à provoquer une aspergillose (Richard et Thurston, 1983 ; Vanderheyden, 1993). Les signes cliniques décrits lors de l'aspergillose chronique sont notamment les troubles respiratoires (e.g. la dyspnée), la déshydratation, l'amaigrissement voire la cachexie (Arné *et al.*, 2011), responsables de saisies des carcasses à l'abattoir (Kunkle, 2003).

En fin d'évolution de la forme aiguë et chronique, peuvent aussi apparaître des signes nerveux centraux (e.g. ataxie, torticolis, chute, opisthotonos, convulsions) (Veen, 1973) ou des troubles ophtalmiques (Dyar *et al.*, 1984).

En plus de ces expressions classiques de la maladie, il existe des formes localisées qui touchent les cavités nasales, la trachée ou la syrinx (Tsai *et al.*, 1992). Des manifestations digestives (diarrhée blanchâtre, vomissement, stase du jabot, polyurie-polydipsie, ascite), des

troubles nerveux isolés (convulsions, état sub-comateux, paralysies) oculaires ou cutanés sont aussi possibles.

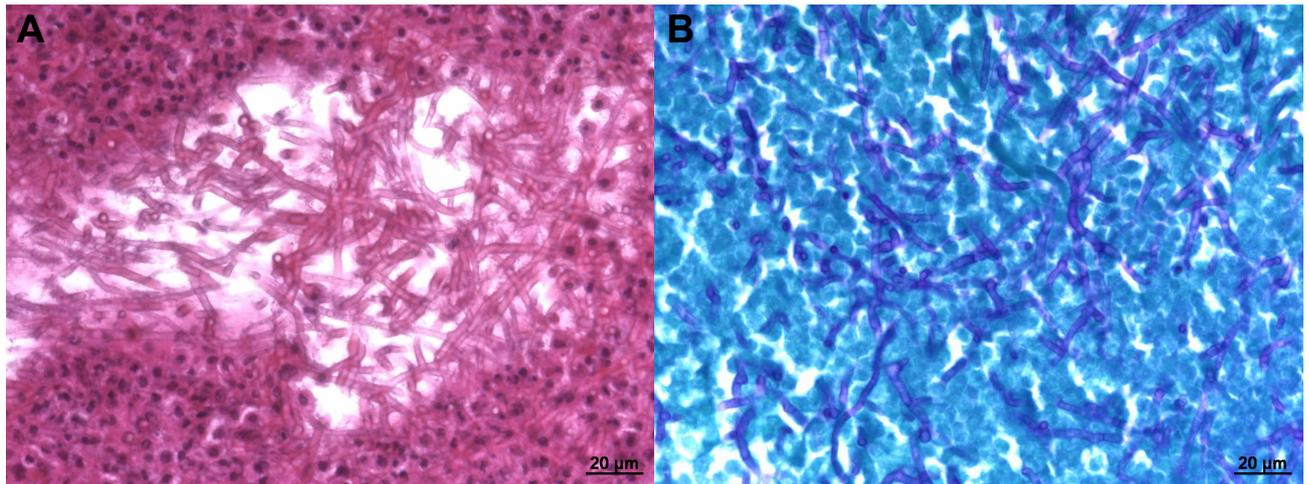
### III. b. 3) Lésions macroscopiques

Dans le cas d'une aspergillose aiguë naturelle, les lésions sont présentes au niveau du tractus respiratoire et plus particulièrement dans le tissu pulmonaire (Richard *et al.*, 1984 ; Julian et Goryo, 1990 ; Cacciuttolo *et al.*, 2009). Parfois l'atteinte d'autres organes est observée comme par exemple l'encéphale (Richard et Thurston, 1983). Lors d'aspergillose chronique, l'appareil respiratoire est presque toujours atteint, soit dans sa totalité soit partiellement. On observe très souvent une pneumonie et une aérosacculite siégeant surtout au niveau des sacs aériens thoraciques postérieurs et abdominaux. L'aspect des lésions est quasiment le même quel que soit l'organe atteint. Les premières lésions qui apparaissent sont de petits nodules blancs (<1 mm) qui se développent dans les tissus pulmonaires et sur les membranes des sacs aériens. Par la suite des granulomes blancs-crème, caséeux et friables, vont se développer. Dans les sacs aériens, les granulomes vont grossir et se modifier jusqu'à former des plaques qui vont avoir tendance à fusionner pour atteindre plusieurs centimètres. Les sacs aériens deviennent de plus en plus épais et opaques. Un « gazon mycélien » verdâtre constitué d'un enchevêtrement d'hyphes ayant sporulé peut être observé à l'intérieur des sacs aériens (Cacciuttolo *et al.*, 2009).

### III. b. 4) Histopathologie

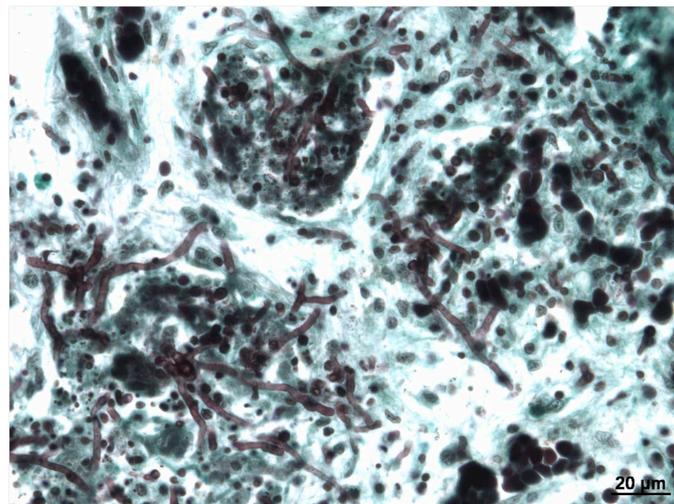
L'analyse histologique des granulomes met typiquement en évidence un centre nécrotique entouré par des macrophages, des granulocytes hétérophiles et des cellules géantes multinucléées. Lorsque les lames sont colorées avec des colorations spécifiques, on observe la présence d'hyphes et parfois de conidies dans la partie centrale des granulomes hétérophiliques. La localisation des *Aspergillus* sur des coupes histologiques peut se faire à l'aide de colorations, telles que la coloration à l'acide périodique Schiff (PAS) qui fait apparaître les éléments fongiques en rouge-rosé (**figure 28**), la coloration argentique de Gomori-Grocott qui colore les éléments fongiques en noir (**figure 29**), et la coloration HES (Hématéine-Eosine-Safran) qui permet d'apprécier en plus la réaction de l'hôte (**figure 28**). Les filaments aspergillaires, septés, ont un diamètre globalement constant et présentent des ramifications dichotomiques régulières. Des têtes aspergillaires sont parfois observées dans

certaines lésions. Des techniques d'immunohistochimie sont également utilisables, notamment chez la dinde (Jensen *et al.*, 1997), pour détecter, à l'aide d'anticorps spécifiques (e.g. anticorps dirigé contre l'antigène galactomannane), la présence d'*Aspergillus*. Les marquages fluorescents, notamment le blankophor qui est spécifique de la chitine des champignons, permettent également de visualiser les hyphes (Olias *et al.*, 2010).



**Figure 28.** Coloration Hématéine-Eosine-Safran (HES) (A) et à l'acide périodique Schiff (PAS) (B) de coupes histologiques de poumons de dindonneaux (cette étude)

Les filaments fongiques apparaissent en rose (A) ou en mauve (B)



**Figure 29.** Coloration argentique d'une coupe histologique de poumon de dindonneau (cette étude)

Les filaments fongiques apparaissent en brun sombre

### III. b. 5) Diagnostic

Le diagnostic de l'aspergillose, et en particulier de la forme chronique, est délicat et est très souvent *post-mortem*. Cependant les oiseaux de compagnie exotiques, à la différence des oiseaux d'élevage, bénéficient de nombreux examens possibles pour établir un diagnostic, incluant des analyses biochimiques et hématologiques, l'examen radiographique, ainsi que la possibilité de réaliser une laparoscopie ou une endoscopie (Jones et Orosz, 2000).

L'aspergillose peut être suspectée chez les oiseaux souffrant de troubles respiratoires et qui ne répondent pas à un traitement antibiotique. Les conditions de vie (environnement, hygiène de la cage, alimentation...), ainsi que l'historique de l'animal (provenance, capture) sont des facteurs importants qui peuvent donner des indications.

Pour les oiseaux de grandes valeurs, comme dans les parcs zoologiques, un examen radiologique peut être réalisé au niveau de la cavité coelomique, afin de rechercher les signes de l'aspergillose : une perte de définition du contour des sacs aériens ainsi qu'une asymétrie de ceux-ci, des opacités focales au niveau de l'appareil respiratoire (sacs aériens, poumons, syrinx, trachée...), une augmentation de l'épaisseur des sacs aériens, une ascite, une hépatomégalie, une néphromégalie. De même, l'endoscopie peut s'avérer très utile chez l'oiseau en état de supporter cet examen invasif, car elle permet de voir directement les sacs aériens, une partie des poumons, la trachée, la syrinx et le départ des bronches primaires. La visualisation des lésions complétée par un prélèvement du champignon ou une biopsie permet d'établir un diagnostic de certitude dans ce cas. Des examens répétés en cours de traitement fournissent l'occasion de suivre l'évolution de la maladie et d'évaluer les effets d'un traitement (Branson *et al.*, 1994).

Des tests sérologiques sont disponibles à l'heure actuelle pour la détection des *Aspergillus* : la détection d'anticorps anti-*Aspergillus* ou d'antigènes circulants. La détection d'anticorps peut se faire par différentes méthodes : hémagglutination indirecte, immunoprécipitation en milieu gélosé, immunoprécipitation sur bande d'acétate de cellulose, ELISA, immunofluorescence indirecte et fixation du complément. Ces tests ont été pour la plupart utilisés pour détecter précocement l'aspergillose chez les oiseaux (Peden et Rhoades, 1992). Dans le cas d'une aspergillose aiguë, la production d'anticorps se fait entre 10 et 14 jours après l'exposition aux antigènes (Brown et Redig, 1994 ; Cray *et al.*, 2009a). Cependant, à l'instar des patients humains, les animaux immunodéprimés présentent de

faibles titres en anticorps et peuvent conduire à des faux-négatifs (Redig, 1994). Chez les oiseaux, la détection d'antigènes circulants, principalement le galactomannane, dans le sérum est également une alternative intéressante (Beernaert *et al.*, 2010). Dans le cas d'une aspergillose chronique, le taux d'antigènes circulants peut être faible (Jones et Orosz, 2000). Cependant, un résultat négatif n'exclut pas totalement une aspergillose et un résultat positif doit être confirmé par d'autres examens (Peden et Rhoades, 1992 ; Brown et Redig, 1994 ; Redig, 1994 ; Arca-Ruibal *et al.*, 2006 ; Le Loc'h *et al.*, 2006 ; Cray *et al.*, 2009a). En effet, chez les oiseaux l'index galactomannane (GM) peut être retrouvé positif même chez les individus sains (index GM > 0,5). Il a ainsi pu être observé dans une étude réalisée sur des dindes d'élevages que l'index GM moyen mesuré chez les individus sains était de 3,9, tandis que chez les individus infectés avec *Aspergillus* l'index GM était de 5,9 (França *et al.*, 2012). De même, dans le modèle expérimental d'aspergillose chez la dinde de Le Loc'h *et al.* (2006), l'index GM mesuré chez les dindes saines non-infectées est toujours supérieur à 1,5. Ces valeurs hautement supérieures à la valeur seuil de non-aspergillose (index GM = 0,5) peuvent être dues à une forte charge d'*Aspergillus* dans l'environnement, principalement dans les conditions d'élevages aviaires (air, aliment, eau, litière). Une étude sur des dindes a montré un passage très rapide dans le sang (10 min) de conidies aspergillaires après contamination des oiseaux par aérosols (Richard et Thurston, 1983). Ceci expliquerait la présence dans le sang de galactomannane issu de spores fongiques inhalées ou ingérées quotidiennement dans l'environnement.

Aucun de ces tests sérologiques n'a été validé aujourd'hui chez les oiseaux d'élevages et ils ne sont donc pas utilisés dans les élevages aviaires pour diagnostiquer l'aspergillose aiguë (Cray *et al.*, 2009a, b).

Le diagnostic définitif nécessite donc la démonstration de la présence du champignon dans les lésions (Beernaert *et al.*, 2010) : isolement d'*A. fumigatus* par culture (sur milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol ou gentamicine dans le but de limiter le développement des bactéries présentes) ou détection de ce champignon après examen histologique (coloration HES, PAS, Gomori-Grocott) (Kunkle, 2003).

Cependant, de part le caractère ubiquitaire des *Aspergillus*, des conidies peuvent être retrouvées chez beaucoup d'oiseaux qui ne présentent aucun signe clinique ou lésion macroscopique (Cacciuttolo *et al.*, 2009). La présence du champignon doit donc être interprétée en fonction de la nature du prélèvement et des éléments fongiques observés, mais également en fonction du contexte clinique, radiologique (ou endoscopique) et biologique.

Les techniques mycologiques comprennent toujours au moins un examen microscopique direct des prélèvements et une mise en culture (Horvath et Dummer, 1996).

Dans les élevages aviaires, le diagnostic de l'aspergillose est souvent posé après un examen *post-mortem* approfondi de plusieurs animaux morts ou sacrifiés suivi le cas échéant par une culture mycologique.

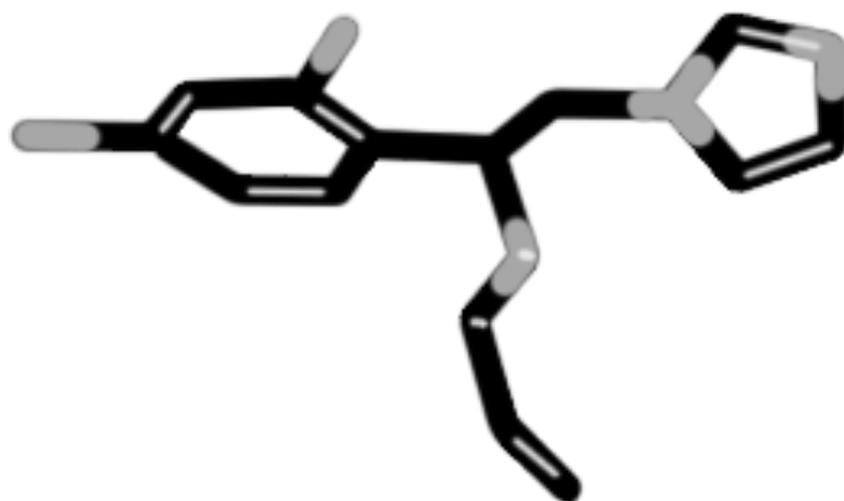
**Les moyens de lutte et de prévention seront abordés dans le chapitre sur les azolés.**

# Les azolés

## Chapitre

## Chapitre

# 4



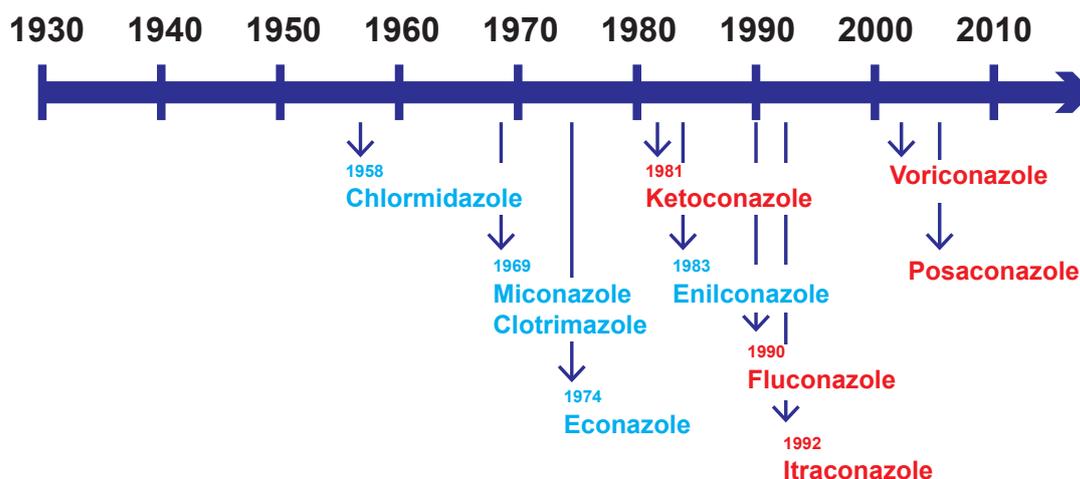


La voie de biosynthèse des stérols (ergostérol) est essentielle chez les champignons. C'est pourquoi de nombreux inhibiteurs de cette voie de biosynthèse ont été développés pour lutter contre des agents pathogènes responsables de mycoses humaines ou animales mais aussi de maladies cryptogamiques. Parmi ces composés, les inhibiteurs de la 14- $\alpha$ -déméthylase sont les plus nombreux. Il existe une autre classe de composés, les morpholines, qui inhibent la C8-isomérase (conversion du fécostérol en épistérol) et bloquent la C14-réductase (Mercer, 1991). Les allylamines quant à elles, ciblent la squalène-époxydase (Mercer, 1993). D'autres composés ont été développés, qui ne sont pas des inhibiteurs de la voie de biosynthèse de l'ergostérol : les polyènes et les échinocandines. Les premiers (avec comme chef de file l'amphotéricine B) vont se lier à l'ergostérol et entraîner une dépolarisation de la membrane et la formation de pores membranaires qui augmentent la perméabilité de cette barrière vitale. Les échinocandines sont des inhibiteurs de la 1-3- $\beta$ -glucane-synthase et bloquent la synthèse de la paroi fongique.

## I. Historique des azolés antifongiques

---

La première activité antifongique d'un azolé a été décrite en 1944 par Woolley (Woolley, 1944), mais c'est avec l'introduction du chlormidazole (**figure 30**) en 1958 que les chercheurs ont commencé à s'intéresser à cette propriété des composés azolés (Maertens, 2004). A la fin des années 1960, trois nouveaux composés topiques ont été développés, l'un par la société Bayer (Allemagne), le clotrimazole, et les deux autres par la société Janssen Pharmaceutica (Belgique) : le miconazole et l'éconazole (Fromtling, 1988). Le kétoconazole administrable par voie orale a été le premier azolé utilisé comme antifongique systémique (Kauffman et Carver, 1997), et il faudra attendre une dizaine d'années pour que le fluconazole et l'itraconazole soient également disponibles pour le traitement des infections fongiques systémiques. Une autre molécule azolée, l'énilconazole, a été développée en 1983 pour le traitement topique des dermatophytoses animales et le contrôle de la contamination fongique dans les couvoirs et éclosiers (Van Cutsem *et al.*, 1985). Le parconazole est une autre molécule d'usage exclusivement vétérinaire. Elle est administrée par voie orale et est commercialisée en France depuis 1991. Le voriconazole est une molécule proche du fluconazole, capable d'agir sur un spectre plus large, puisque *in vitro*, ce principe actif a une action sur des espèces appartenant à différents groupes de champignons pathogènes, excepté les mucorales (Sabo et Abdel-Rahman, 2000).



**Figure 30.** Historique de l'introduction des principaux azolés

(source : *Infect. Med.* 2003 Cliggett Publishing, Division of SCP Communications)

Les molécules en bleu sont des imidazolés, et en rouge des triazolés

Les azolés peuvent être classés en deux grands groupes, les imidazolés et les triazolés. Parmi les **imidazolés** on retrouve le clotrimazole, le miconazole, l'éconazole, le parconazole, le kétoconazole et l'énilconazole, alors que les **triazolés** regroupent, entre autres, le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole et le posaconazole. A l'exception du kétoconazole, de l'énilconazole et du parconazole, l'utilisation des imidazolés est restreinte aux traitements des mycoses superficielles par application topique. Les triazolés sont plus fréquemment utilisés pour le traitement des mycoses systémiques.

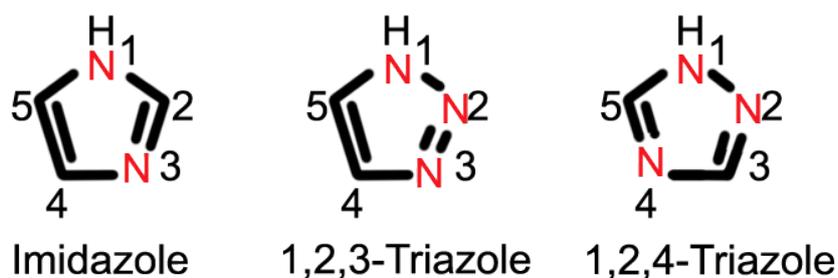
Dans ce chapitre seront détaillées quelques unes des molécules azolées les plus utilisées en médecine vétérinaire : le parconazole, le kétoconazole, le fluconazole, le voriconazole, et les deux molécules testées dans notre étude, l'itraconazole et l'énilconazole.

## II. Caractéristiques des azolés

### II. a. Structure chimique

Les azolés sont des molécules synthétiques généralement lipophiles, composés d'un groupement imidazole ou triazole, lié à un atome de carbone asymétrique. Les azoles (ou

pyrroles) sont une classe de composés organiques à hétérocycle insaturé de cinq atomes, possédant un atome d'azote et quatre atomes de carbone. Parmi ces azoles (**figure 31**), on retrouve la sous-famille des polyazoles qui comprennent notamment les imidazoles, dont l'hétérocycle est composé de 3 atomes de carbone et 2 atomes d'azote (en position 1 et 3), et les triazoles, dont l'hétérocycle est composé de 2 atomes de carbone et 3 atomes d'azote (en position 1, 2 et 3 ou 1, 2 et 4) (Saag et Dismukes, 1988). La structure imidazolée est présente dans l'histamine, l'histidine et les acides nucléiques. L'incorporation d'un groupement imidazole améliore la solubilité et la biodisponibilité des molécules (Shalini *et al.*, 2010). La biodisponibilité des azolés est donc en règle générale élevée. Cependant ces composés azolés sont sujets à une variabilité individuelle nécessitant de recourir, lorsque cela est possible, à des dosages sériques chez l'homme (Hincky-Vitrat, 2011).



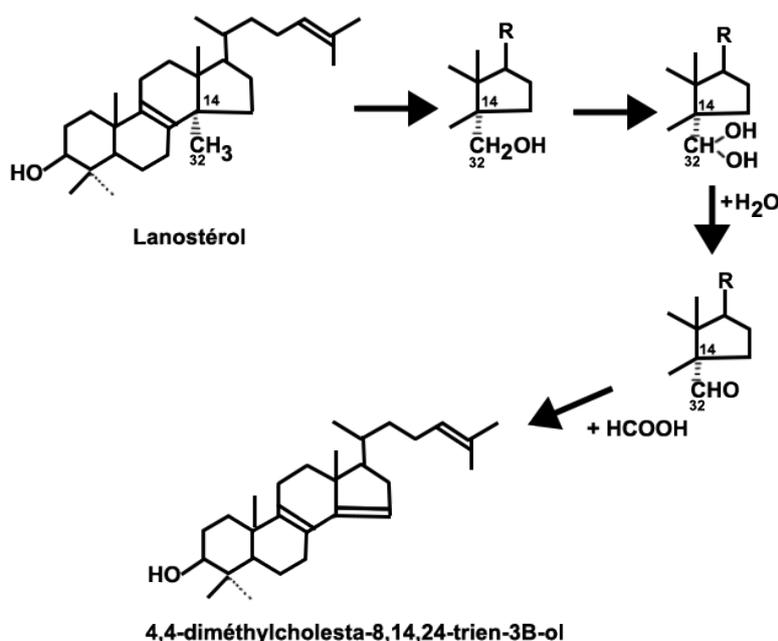
**Figure 31** : Structure des hétérocycles imidazoles et triazoles

Le parconazole, le kétoconazole et l'énilconazole sont des imidazoles contenant donc un hétérocycle composé de deux atomes d'azote, tandis que le fluconazole, le voriconazole et l'itraconazole sont des triazolés contenant un hétérocycle composé de 3 atomes d'azote (**figure 32**).



## II. b. Mode d'action

Les azolés agissent comme des inhibiteurs du cytochrome P-450, de l'enzyme lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase (CYP51), qui est une enzyme essentielle dans la voie de biosynthèse des stérols chez les eucaryotes. Les cytochromes P-450 sont des hémoprotéines et sont généralement des oxydases. Il existe des centaines de cytochromes différents, répartis en familles, sous-familles et isoenzymes. Les cytochromes P-450 sont présents chez tous les eucaryotes. Chaque type de cytochrome P-450 a une fonction différente. CYP51 est un membre de la superfamille du cytochrome P-450 qui catalyse une réaction d'oxydation du groupement 14 $\alpha$ -méthyl du lanostérol dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (**figure 33**). L'activité de l'enzyme 14- $\alpha$ -déméthylase est inhibée en présence de ces molécules azolés, ce qui altère la biosynthèse de l'ergostérol chez les champignons. Un des atomes d'azote de l'hétérocycle (N-3 chez les imidazolés ou N-4 chez les triazolés) se lie à l'atome de fer de l'hème situé dans le site actif de l'enzyme du cytochrome P450, inhibant ainsi l'activation de ce cytochrome (Yoshida et Aoyama, 1987 ; Ballard *et al.*, 1990) et donc l'activité enzymatique. La sélectivité et l'affinité de la molécule antifongique pour le cytochrome P-450 est déterminée par l'azote N-1 qui se lie à l'apoprotéine de l'enzyme (Vanden-Bossche *et al.*, 1988 ; 1989). L'inhibition de la 14- $\alpha$ -déméthylase conduit à la fois à une accumulation de stérols méthylés toxiques (Marichal *et al.*, 1999), ainsi qu'à la diminution de la quantité



**Figure 33.** Processus chimique de l'enzyme lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase (CYP51)

(d'après Lamb *et al.*, 1999)

La réaction consiste en 3 mono-oxygénations successives catalysées par CYP51

d'ergostérol dans la membrane augmentant ainsi la perméabilité de celle-ci. La croissance du champignon s'en trouve donc inhibée.

Les antifongiques azolés peuvent également inhiber de nombreux cytochromes P-450 présents chez les mammifères qui sont impliqués notamment dans la synthèse d'hormones ou le métabolisme des xénobiotiques. C'est pourquoi la prise de molécules azolées entraîne un risque important d'interaction médicamenteuse. L'avantage des triazolés par rapport aux imidazolés est leur plus grande affinité pour les cytochromes P-450 des champignons (plutôt que pour ceux des mammifères et des oiseaux).

### II. c. Spectres d'activité des azolés (Vanden Bossche *et al.*, 2003)

Le **parconazole** est un imidazole à large spectre utilisé uniquement en médecine vétérinaire. Il a une bonne activité *in vitro* contre les levures comme celles du genre *Candida* (inhibition totale à 10-100 mg/L) et contre les dermatophytes (inhibition totale à 1-10 mg/L). Cependant, le parconazole est moins actif vis-à-vis de certains champignons, tels que *Aspergillus* spp. (à l'exception d'*A. nidulans*), *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. (Desplenter et van Cutsem, 1980).

Le **kétoconazole** a une très bonne activité *in vitro* vis-à-vis des dermatophytes, dont *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton verrucosum* (Fernandez-Torres *et al.*, 2001) avec des concentrations minimales d'inhibition (CMI) respectives de 0,08 ; 0,12, 0,23 ; 0,46 et 0,5 mg/L. Le kétoconazole a également une bonne activité vis-à-vis d'*A. fumigatus* (CMI de 2-4 mg/L) et d'*A. flavus* (CMI de 0,5-16 mg/L) (Espinel-Ingroff *et al.*, 1995) ainsi que vis-à-vis de *Candida* spp. (CMI de 0,09 à 50 mg/L) (Morace *et al.*, 1995).

Le **fluconazole** a une très bonne efficacité en clinique contre les infections systémiques à levures et les infections superficielles, cependant l'activité *in vitro* contre de nombreux agents pathogènes est modérée (Troke, 1993). Si l'activité mesurée *in vitro* sur *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp. est assez bonne. Le fluconazole n'est pas actif *in vitro* vis-à-vis de champignons filamenteux comme *Aspergillus* spp. (CMI de 64 mg/L) (Espinel-Ingroff *et al.*, 1995).

Le **voriconazole** a une bonne activité *in vitro* vis-à-vis de *Candida* spp. (CMI < 2 mg/L) et *Aspergillus* spp. (CMI de 0,25-0,5 mg/L), mais n'a pas d'activité vis-à-vis des mucorales (CMI de 8-128 mg/L) (Sabatelli *et al.*, 2006 ; Davis *et al.*, 2009).

L'**itraconazole** a une activité *in vitro* contre *Candida* spp. (CMI comprises entre 0,03 et 16 mg/L), *C. neoformans* (CMI de 0,03-0,125 mg/L) et *Aspergillus* spp. (CMI comprises entre 0,33 et 0,93 mg/L) (Redig et Duke, 1988 ; Arthington-Skaggs *et al.*, 2000 ; Moore *et al.*, 2000 ; Orosz, 2003). L'itraconazole présente une excellente activité vis-à-vis des dermatophytes *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. simii* et *T. verrucosum* (CMI respectives de 0,03 ; 0,08 ; 0,04 ; 0,17 ; 0,09 ; 0,12 et 0,01 mg/L) (Fernandez-Torres *et al.*, 2001).

L'**énilconazole** est un antifongique à large spectre appartenant à la famille des imidazoles ; il est actif *in vitro* vis-à-vis de la plupart des dermatophytes (Desplenter, 1989 ; White-Wheithers et Medleau, 1995 ; Hnilica *et al.*, 2000), vis-à-vis des levures *Malassezia* (Carlotti, 2001) mais également vis-à-vis d'*Aspergillus* spp. (Lanthier et Chalifoux, 1991 ; Oosterhout et Venker-van Haagen, 1991 ; Sharp *et al.*, 1993 ; McCullough *et al.*, 1998). La croissance d'*A. fumigatus* sur le milieu de Sabouraud est inhibée par des concentrations variant de 0,1 à 1 mg/L (Van Cutsem et Janssen, 1988). L'activité antifongique *in vivo* est forte pour les dermatophytes mais faible pour les levures du genre *Candida* (Thienpont *et al.*, 1981 ; Vanden Bossche *et al.*, 2003).

### III. Pharmacocinétique

---

La pharmacocinétique des molécules dépend de leur absorption, distribution, métabolisation et élimination dans l'organisme. Tous ces paramètres dépendent des propriétés physico-chimiques du principe actif et de la forme galénique.

L'antifongique est présent sous deux formes dans la circulation sanguine : une libre et une liée (principalement aux protéines plasmatiques). Seule la forme libre est active, le taux de fixation protéique variant en fonction de la molécule et de l'espèce animale. La forme libre pénètre rapidement dans les organes cibles, mais elle est aussi très vite dégradée et éliminée alors que, liée aux protéines, la molécule n'est ni dégradée ni éliminée mais simplement mobilisée à mesure que la concentration sanguine de la forme libre diminue. Les molécules

antifongiques peuvent donc selon le cas avoir une distribution importante avec une diffusion tissulaire et une métabolisation importante, ou une distribution restreinte avec une concentration dans le sang élevée (Adamczyk, 2011).

Les concentrations plasmatiques des dérivés azolés sont détectables plusieurs heures après leur administration. La plupart d'entre eux diffusent aisément dans l'urine, la salive, le sébum, le cérumen, le liquide articulaire. Des études indiquent que certains (comme le fluconazole) peuvent également atteindre le liquide céphalorachidien (LCR). L'élimination de ces molécules est bi-phasique : elles sont métabolisées par le foie dans un premier temps, puis les métabolites sont éliminés par le rein dans un second temps (Sharma et Bhatia, 2011).

### ***Parconazole***

Le parconazole administré par voie orale est très faiblement résorbé. La majeure partie de la dose administrée reste donc dans la lumière intestinale. La très faible fraction franchissant la barrière digestive est essentiellement retrouvée au niveau du foie (où elle est métabolisée), du rein et de la peau. Après l'administration d'une dose unique par voie orale de 13 mg/kg de parconazole chez la pintade, le taux dans le sang atteint 2,28 µg/mL après 2 h (Levron *et al.*, 1985). La concentration décroît de façon exponentielle jusqu'à 10 h après administration. La demi-vie dans le sang du parconazole est estimée à 74 min, tandis que la demi-vie de ces métabolites est estimée à 108 min. Le parconazole est bio-transformé de façon intensive et l'excrétion de la forme inchangée représente seulement 0,6 % des résidus totaux. L'accumulation de la molécule dans les tissus est très faible, en effet les concentrations retrouvées dans les tissus, après administration d'une dose de 13 mg/kg chez la pintade, sont de 50 µg/kg et ne sont plus détectables après 48 h (Levron *et al.*, 1985). Le parconazole a une faible toxicité, la DL50 (dose létale médiane) varie entre 200 et 550 mg/kg entre les espèces.

### ***Kétoconazole***

Après administration orale, le kétoconazole est métabolisé dans le foie et converti en plusieurs métabolites. Son absorption dans le tractus gastro-intestinal est plus rapide chez les rongeurs que chez le chien. Après l'administration d'une dose de 10 mg/kg chez le lapin, le cobaye, le chien et le rat, les pics plasmatiques s'élèvent respectivement à 1,0 ; 3,7 ; 8,9 ; 16,5 µg/mL (Heel, 1982). Après déméthylation et glucurono-conjugaison, il y a formation de métabolites inactifs qui sont essentiellement éliminés par voie biliaire (20 % sous forme inchangée). Chez le chien, 13 % de la dose administrée est excrétée dans les urines, et seulement 2 à 4 % est éliminée sous forme inchangée et active dans les urines (Plumb, 2004). Le faible pouvoir de

glucurono-conjugaison du chat rend l'élimination du kétoconazole plus lente dans cette espèce chez qui les effets secondaires sont plus fréquents (Adamczyk, 2011).

Peu d'études pharmacocinétiques ont été réalisées chez les oiseaux. Chez le pigeon (*Columba livia*) et les cacatoès (Cacatuidés), le pic de concentration varie entre 0,5 et 5 h, tandis que la demi-vie d'élimination est de 2-2,8 h chez le pigeon et de 3,8 h chez les cacatoès (Kollias *et al.*, 1986). L'acidité de l'estomac joue un rôle important dans la dissolution et l'absorption du kétoconazole.

### ***Fluconazole***

Le fluconazole est hautement soluble dans l'eau, se lie peu aux protéines, et est bien absorbé par le tractus gastro-intestinal. Sa biodisponibilité absolue est de 90 % ; il pénètre dans tous les tissus corporels ainsi que dans le LCR. La demi-vie d'élimination est d'environ 30 h et l'élimination est principalement rénale. Le fluconazole est peu métabolisé et est excrété sous une forme inchangée par les reins.

Il existe assez peu d'études sur la pharmacocinétique du fluconazole chez les oiseaux. En 2011, une étude a été réalisée sur les calopsittes (*Nymphicus hollandicus*) (Ratzlaff *et al.*, 2011). Deux traitements ont été testés : une administration unique par voie orale à 10 mg/kg et une administration dans l'eau de boisson à 100 mg/kg pendant 8 jours. Les résultats de cette étude ont montré que la demi-vie d'élimination du fluconazole était d'environ 19 h, la concentration plasmatique maximum était de 4,94 µg/mL, et que le temps pour atteindre ce pic était de 3,42 h. Des posologies de 5 mg/kg toutes les 24 h, ou 10 mg/kg toutes les 48 h par voie orale, ou encore 100 mg/kg dans l'eau de boisson semblent permettre de maintenir la concentration plasmatique au dessus de la concentration minimale qui inhibe 90 % des souches de *Candida albicans* (CMI90) (Ratzlaff *et al.*, 2011 ; Guzman, 2014). Chez le perroquet gris du Gabon (*Psittacus erithacus timneh*), l'administration de fluconazole à 10 ou 20 mg/kg entraîne des pics de concentration plasmatique de 7,45 et 18,59 µg/mL et des demi-vies d'élimination de 9,22 h et 10,19 h, respectivement (Flammer et Papich, 2006).

### ***Voriconazole***

Le voriconazole peut être administré par voie orale ou intraveineuse. Chez l'homme, l'absorption est rapide, les concentrations plasmatiques maximales étant obtenues après une à 2 h, et la biodisponibilité est de plus de 90 %. La distribution est importante dans les tissus et la liaison aux protéines plasmatiques est de 58 % environ. Le voriconazole est métabolisé dans le foie, par les isoenzymes CYP2C19, CYP2C9 et CYP3A4 du P450. Le métabolite

principal du voriconazole est le N-oxide, qui ne contribue pas à l'efficacité globale de la molécule. La variabilité interindividuelle du profil pharmacocinétique est très importante. L'élimination se fait après métabolisation hépatique et moins de 2 % de la dose administrée sont excrétés sous forme inchangée dans les urines. La demi-vie d'élimination terminale du voriconazole est d'environ 6 h pour une dose de 200 mg. Chez la plupart des espèces d'oiseaux, le voriconazole a une cinétique non linéaire, par saturation du métabolisme, et dépendante de la dose administrée. Le voriconazole est en effet métabolisé de façon importante par le foie, ce qui sature le complexe enzymatique lorsque les concentrations plasmatiques sont trop hautes. L'élimination de la molécule est linéaire jusqu'à la saturation.

Chez certaines espèces, le voriconazole induit ses propres enzymes métaboliques après l'administration de doses répétées, c'est pourquoi il est nécessaire, pour chaque espèce, de tester un traitement avec une dose unique puis avec des doses répétées. La demi-vie du voriconazole est très courte : 1-1,6 h chez le perroquet gris du Gabon (*Psittacus erithacus*) (Flammer *et al.*, 2008) et 0,7-1,25 h chez l'amazone Hispaniola (*Amazona ventralis*) (Guzman *et al.*, 2010). Lorsque les doses sont augmentées, les taux plasmatiques augmentent rapidement de manière non proportionnelle. Un traitement à la dose de 12-18 mg/kg toutes les 8-12 h par voie orale est recommandé pour atteindre des concentrations plasmatiques supérieures à 0,4 µg/mL. Chez le pigeon, la biodisponibilité du voriconazole est de 43,7 %, la pharmacocinétique est non-linéaire dans les traitements avec une dose unique ; l'administration de doses répétées permet également l'induction d'enzymes métaboliques chez cette espèce. Dans l'étude de Beernaert *et al.*, le traitement recommandé pour les pigeons est une dose de voriconazole à 10 mg/kg toutes les 12 h ou 20 mg/kg toutes les 24 h par voie orale (Beernaert *et al.*, 2009a, b). D'autres études pharmacocinétiques ont été réalisées, notamment chez le canard colvert (*Anas platyrhynchos*) et la caille japonaise (*Coturnix japonica*), et donnent des résultats qui varient (Tell *et al.*, 2010 ; Kline *et al.*, 2011). Il est donc indispensable d'étudier la pharmacocinétique du voriconazole en fonction des espèces (Guzman, 2014).

### ***Itraconazole***

Dans le foie, le cytochrome P450 3A4 est l'enzyme qui va convertir l'itraconazole en de nombreux métabolites dont l'hydroxy-itraconazole, le kéto-itraconazole et le N-desalkyl-itraconazole. Le métabolite principal qui est actif, est l'hydroxy-itraconazole dont les taux plasmatiques sont deux fois plus élevés que l'itraconazole chez l'homme et le chien. En revanche l'hydroxy-itraconazole n'a pas été retrouvé chez le chat ou le cheval (Davis *et al.*,

2009). Chez l'homme, la demi-vie d'élimination terminale de l'itraconazole est d'environ 17 h après une administration unique. La molécule est rapidement résorbée, cependant la biodisponibilité orale varie en fonction des patients et de la galénique de la molécule. Chez le chien, la biodisponibilité de l'itraconazole est complète lorsque le médicament est distribué avec le repas alors qu'elle peut être inférieure à 50 % lorsqu'il est donné en dehors des repas (Plumb, 2004). La majeure partie de l'itraconazole est liée aux protéines plasmatiques, principalement l'albumine, seul 0,2 % restant libre. Cette molécule présente une large pénétration tissulaire et va être excrétée sous forme de métabolites inactifs dans les urines et les fèces.

La pharmacocinétique de l'itraconazole a été évaluée chez de nombreux oiseaux et varie de façon significative selon les espèces. Chez le manchot de Humboldt (*Spheniscus humboldti*), un traitement par voie orale (Sporanox ND) à la dose de 7 mg/kg, toutes les 12 h, conduit à une concentration plasmatique d'itraconazole et d'hydroxy-itraconazole combinés de 1 µg/mL pendant 8 h (Bunting *et al.*, 2009). L'itraconazole a une cinétique non linéaire par saturation du métabolisme. La demi-vie d'élimination de ces deux molécules dans le sang est de 9 et 11 h, respectivement. Dans cette étude, les taux d'itraconazole observés étaient faibles, mais ne fluctuaient pas beaucoup au cours du temps. La concentration maximale était de  $0,262 \pm 0,147$  µg/mL et la concentration minimale de  $0,104 \pm 0,080$  µg/mL. La posologie efficace de l'itraconazole pour une administration *per os* est estimée à 8,5 mg/kg toutes les 12 h, ou 20 mg/kg toutes les 24 h, pour atteindre des taux plasmatiques thérapeutiques chez cette espèce de manchot (Bunting *et al.*, 2009 ; Guzman, 2014). Chez la buse à queue rousse (*Buteo jamaicensis*), un traitement par 5 et 10 mg/kg de principe actif a été testé pendant 15 jours. La dose la plus élevée administrée toutes les 24 h permettait de maintenir des taux plasmatiques d'itraconazole et d'hydroxy-itraconazole thérapeutiques pendant deux semaines (Jones *et al.*, 2000).

### ***Enilconazole***

La pharmacocinétique de l'énilconazole a été étudiée chez différentes espèces (rat, souris, lapin, chien, chat, cheval, bovin, poulet). L'administration par voie orale d'énilconazole marqué radioactivement démontre une rapide absorption de la molécule. Après application topique, l'absorption est par contre limitée. Après administration orale de 2,5 ; 10 ou 40 mg/kg chez le rat, les taux plasmatiques sont respectivement de 0,25 %, 3 % ou 16,7 %. Chez le rat, la demi-vie dans le plasma de l'énilconazole est de 4-5 h. Après administration par voie intraveineuse à la dose de 4 mg/kg chez la vache, la demi-vie terminale de la molécule est de

11 h. Le pic de concentration dans le sang est obtenu, après administration par voie topique et orale à la dose de 4 mg/kg chez la vache, à 1 h (0,017-0,048 µg/mL) et décroît ensuite rapidement. Lorsque le produit est appliqué sous forme de spray sur la peau à la dose de 4 mg/kg, les pics de concentrations varient entre 0,023 et 0,104 µg/mL chez le chat et ne sont plus détectables après 24 h. La demi-vie d'élimination terminale de la molécule est alors de 8 h.

L'énilconazole est fortement métabolisé, en plus de 35 métabolites, et l'élimination de la molécule se fait principalement par les reins. Une faible proportion (moins de 10 %) est excrétée sous forme inchangée. Le taux de métabolisation de l'énilconazole dans le foie varie en fonction de l'espèce ; il est notamment plus élevé chez le poulet que chez le chien, mais moins élevé que chez le rat. L'énilconazole a une faible toxicité, même après inhalation ou administration intra-péritonéale. La DL50 chez la souris est d'environ 400-600 mg/kg après administration orale, et de 4 000 mg/kg pour une application cutanée. L'énilconazole a une faible pression de vapeur, mais s'évapore facilement dans des environnements clos en une phase gazeuse, qui possède des propriétés antifongiques (Van Gestel *et al.*, 1981; Van Gestel, 1986).

Très peu d'études pharmacocinétiques ont été réalisées chez les oiseaux. La biotransformation de l'énilconazole dans l'organisme des poussins est rapide après administration orale. La demi-vie d'élimination de l'énilconazole est très courte (1 h). Des poulets ont été traités avec de l'énilconazole radiomarqué à raison de 2,5 mg deux fois par jour pendant 5 jours consécutifs. Après 6 h, aucun résidu n'est retrouvé dans les muscles, les concentrations respectives dans le foie et le rein sont de 7,6 et 1,5 µg-eq/g (Van Leemput *et al.*, 1984). Une étude de résidus a été réalisée sur des poussins exposés pendant 8 h à une fumée de Clinafarm® à la dose de 25 g d'énilconazole dans 33 m<sup>3</sup> (Van Leemput *et al.*, 1990). La quantité d'énilconazole retrouvée chez un poussin était de 4 mg, concentrés surtout dans les plumes et la peau. Aucun résidu n'a été retrouvé dans les reins, le foie, et les muscles (limite de quantification 0,01 µg/g). Une autre étude de résidus a été réalisée sur des dindes exposées à une brumisation d'Imavéral® 2 fois par jour pendant 3 jours à la dose 20 mg/m<sup>3</sup> (Meissonnier *et al.* : compte-rendu Janssen). Les concentrations de résidus d'énilconazole sont très faibles, même après 6 brumisations, au niveau de la peau (entre 0,12 et 2,33 mg/kg) et ne sont pas détectables au niveau des organes internes (foie, rein, muscle).

## IV. Résistance aux azolés

---

### IV. a. Résistance microbiologique et clinique

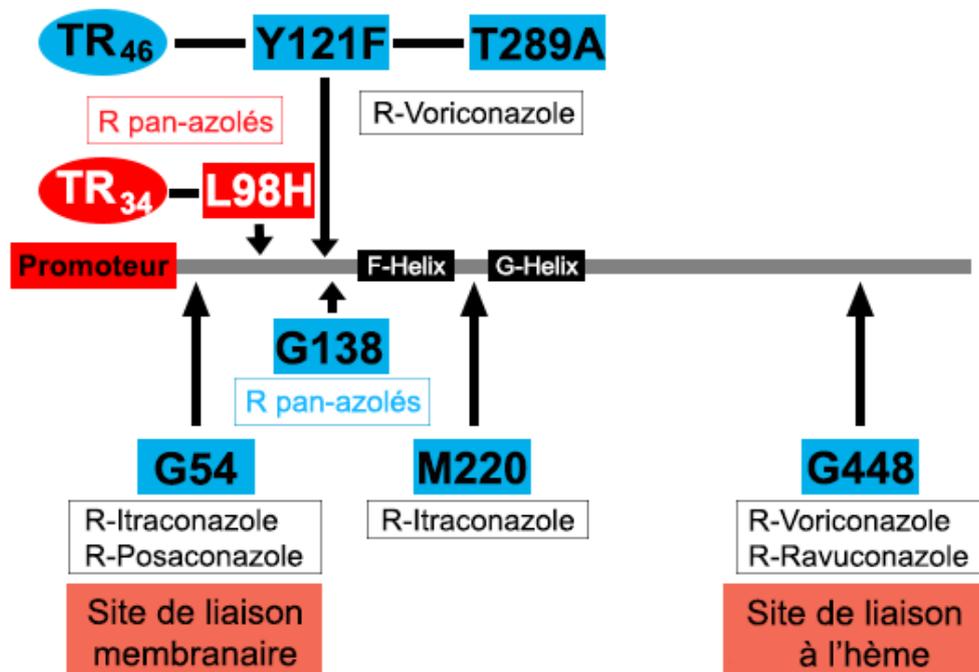
La résistance aux azolés chez les espèces d'*Aspergillus* peut être intrinsèque ou acquise. Certaines espèces, comme *A. lentulus* et *Neosartorya pseudofischerii*, sont intrinsèquement résistantes aux azolés (Howard, 2014). Or ces espèces sont morphologiquement identiques à *A. fumigatus*, qui lui est intrinsèquement sensible à tous les azolés, excepté le fluconazole. Les résistances observées chez *A. fumigatus* sont donc des résistances acquises, qui font suite à une modification génétique (Stensvold *et al.*, 2012).

Une souche devient résistante lorsque, appartenant à une espèce naturellement sensible à un antifongique, elle est apte à tolérer des concentrations de cet antifongique nettement plus élevées que celles qui inhibent la croissance *in vitro* de la majorité des souches dites sensibles de la même espèce. La résistance acquise, au sens microbiologique, se traduit par une augmentation des CMI. Au sens clinique, la résistance acquise se traduit par un échec thérapeutique lors d'un traitement dans les conditions usuelles. Cependant une faible augmentation des CMI n'entraîne pas obligatoirement un échec thérapeutique et, de même, l'échec thérapeutique peut avoir d'autres causes que l'acquisition d'un mécanisme de résistance par la souche responsable de l'infection (Adamczyk, 2011). Récemment, des seuils de sensibilité ont été définis pour les azolés, pour plusieurs espèces d'*Aspergillus*, ce qui permet une interprétation des valeurs de CMI ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

### IV. b. Mécanismes de résistance

De nombreuses mutations ont été décrites chez *A. fumigatus*. Ces mutations peuvent provenir de la pression de sélection exercée chez les patients recevant un traitement de longue durée avec des azolés, ou de l'environnement du fait de l'utilisation importante de fongicides en agriculture. Les résistances chez *A. fumigatus* sont le plus souvent dues à des mutations au niveau du gène *CYP51A*, cependant d'autres mécanismes de résistance sont suggérés, incluant la surexpression de l'enzyme cible et la surexpression des pompes à efflux (Kanafani et Perfect, 2008 ; Stensvold *et al.*, 2012 ; Arendrup, 2014).

Les mutations du gène *CYP51A* entraînent une modification de la séquence en acides aminés de la lanosterol 14- $\alpha$  déméthylase provoquant une altération de sa liaison avec l'antifongique azolé. Les résistances aux azolés d'isolats d'*A. fumigatus* retrouvés chez des patients ayant eu un traitement prolongé avec des azolés sont dues à des mutations au niveau des codons G54, G138, G448, Y431 et M220. Pour les isolats d'*A. fumigatus* retrouvés chez des patients n'ayant eu aucun traitement avec des azolés, la résistance est due à différents mécanismes : (i) une répétition en tandem de 34 pb (TR<sub>34</sub>) au niveau de la région promotrice du gène *CYP51A* couplée à une substitution L98H dans le gène, (ii) une répétition en tandem de 46 pb (TR<sub>46</sub>) couplée aux substitutions Y121F et T289A dans le gène *CYP51A*, (iii) une substitution G432S dans le gène *CYP51A* (**figure 34**) (Kanafani et Perfect, 2008 ; Stensvold *et al.*, 2012 ; Arendrup, 2014). La mutation TR<sub>34</sub>/L98H a été retrouvée dans des isolats résistants aux azolés d'origine environnementale dans de nombreux pays d'Europe, tels que le Danemark, les Pays-Bas (Snelders *et al.*, 2008 ; Mortensen *et al.*, 2010), l'Italie (Prigitano *et al.*, 2014), l'Allemagne et la Belgique, mais aussi en dehors de l'Europe, comme en Inde (Chowdbary *et al.*, 2012), en Iran (Badali *et al.*, 2013) et en Chine notamment (Lockhart *et al.*, 2011). En revanche ces mutations sont beaucoup plus rares aux Etats-Unis (Reiss *et al.*, 2014). Cela démontre que les isolats résistants retrouvés chez les patients peuvent résulter de mutations acquises directement de l'environnement (Snelders *et al.*, 2009).



**Figure 34.** Représentation des principales substitutions connues du gène *CYP51A* impliqués dans la résistance (R) aux azolés d'*A. fumigatus* (d'après Frealle *et al.*, ECCMID 2014)

**La surexpression des pompes à efflux**, qui sont des transporteurs présents au niveau des membranes plasmiques, entraîne une diminution de la concentration intracellulaire d'antifongiques. Chez les champignons, deux familles de pompes sont impliquées dans la résistance aux antifongiques azolés : les pompes de type ABC (*ATP-Binding Cassette*), utilisant l'ATP comme source d'énergie pour le transfert, et les MFS (*Major Facilitator Superfamily*) qui utilisent un gradient de protons comme source d'énergie. Il semble que les protéines ABC soient capables de prendre en charge tous les azolés, alors que les MFS seraient plus spécifiques du fluconazole. Ce mécanisme, largement décrit chez les levures (e.g. *Candida* spp.) est plus rare chez *Aspergillus* (Slaven *et al.*, 2002 ; Nascimento *et al.*, 2003 ; Paul *et al.*, 2013).

**La surproduction de l'enzyme cible** équivaut à la multiplication du nombre de copies de la lanosterol 14- $\alpha$ -déméthylase (= *CYP51*), due à la surexpression du gène *ERG11*. Il y a augmentation de la transcription du gène *ERG11* grâce à la surexpression des ARN messagers. Ainsi, les azolés ne sont plus en concentration suffisante pour inhiber la conversion du lanostérol en stérols 14- $\alpha$ -déméthylés.

Récemment de nouveaux mécanismes de résistance, qui ne sont pas liés au gène *CYP51*, ont été découverts chez *A. fumigatus*, comme des mutations dans des facteurs de transcription (Camps *et al.*, 2012).

#### IV. c. Résistance dans les élevages aviaires

Quelques études sur la résistance aux azolés d'*A. fumigatus* ont été réalisées dans les élevages aviaires. Une étude réalisée en Belgique à partir d'oiseaux sauvages et domestiques souffrant d'aspergillose a permis la mise en évidence de 4 souches résistantes à l'itraconazole et au voriconazole sur 59 isolats testés (Beernaert *et al.*, 2009c). Récemment, Wang *et al.* (2014) ont montré que 100 % des isolats d'*A. fumigatus* issus d'écouvillons pharyngés d'oiseaux d'élevages français et chinois (n = 175) étaient sensibles à l'itraconazole, au voriconazole et au posaconazole (Wang *et al.*, 2014). Bien que certaines substitutions aient été détectées dans le gène *CYP51A*, aucune mutation n'a été détectée au niveau des « hot spot » de mutations reliés à la résistance aux azolés. Une autre étude réalisée en Pologne a permis d'évaluer la susceptibilité de 85 isolats d'*A. fumigatus* provenant d'oies (cavité orale d'oies saines, n = 63 ; poumons d'oies atteintes d'aspergillose, n = 14) et de leur environnement (eau, n = 8)

(Ziółkowska *et al.*, 2014). Les CMI déterminées dans cette étude pour l'itraconazole varient entre 0,5 et 8 µg/mL, alors que pour le voriconazole les CMI sont comprises entre 0,125 et 1 µg/mL et pour l'énilconazole entre 0,25 et 2 µg/mL. Toutes les souches isolées dans l'étude sont donc sensibles à l'énilconazole et au voriconazole, alors que 14 % d'entre elles sont résistantes à l'itraconazole (35 % des souches isolées des poumons, et 13 % des souches isolées de la cavité orale). Une autre étude réalisée sur des prélèvements pharyngés d'oiseaux d'élevages français et chinois (n = 175) n'a pas permis la mise en évidence de souches résistantes d'*A. fumigatus* (Wang *et al.*, 2014).

## V. Utilisation des azolés chez les oiseaux

---

En pratique, il n'existe aucune molécule antifongique avec une autorisation de mise sur le marché (AMM) qui soit utilisable par voie parentérale chez l'animal, les voies d'administration les plus utilisées étant la voie cutanée et la voie orale. En France, la seule molécule antifongique disposant d'une AMM pour les volailles destinées à la consommation humaine est le parconazole, qui est utilisé pour le traitement de la candidose digestive chez la pintade. Pour le traitement de l'aspergillose dans les élevages aviaires, aucune molécule disposant d'une AMM n'est disponible, malgré l'importance de cette affection qui peut être responsable d'un fort taux de mortalité. La gestion d'un épisode d'aspergillose dans un élevage avicole fait donc appel principalement à des mesures hygiéniques, dont le but est de combattre les facteurs propices au développement des champignons (retrait de la litière et désinfection, favoriser la ventilation des bâtiments, nettoyage et désinfection des lieux, du matériel d'incubation et d'éclosion, des récipients d'eau et de nourriture), ainsi qu'à l'emploi de certaines solutions comme le thiabendazole ou l'énilconazole, qui permettant de diminuer respectivement la morbidité et la mortalité dans les bandes atteintes d'aspergillose (Saif *et al.*, 2008). Pour les espèces d'oiseaux d'ornement, les méthodes diagnostiques et thérapeutiques sont bien différentes des volailles. Les mesures d'hygiène (nettoyage et désinfection) prises pour les volailles sont applicables pour les oiseaux d'ornement, cependant, en cas de suspicion clinique, l'usage de différents azolés est possible.

### ***Parconazole***

Le parconazole dispose d'une AMM pour le traitement et la prévention des candidoses dues à *C. albicans* chez la pintade. La molécule est administrée par voie orale (dans les aliments). Pour un traitement préventif, la dose recommandée est de 6 mg/kg par jour pendant 30 jours, alors que pour un traitement curatif, elle est de 12 mg/kg par jour pendant 10 jours puis de 6 mg/kg par jour pendant 10 jours (Levron *et al.*, 1985).

### ***Kétoconazole***

Le kétoconazole dispose d'une AMM pour le chien (Kétofungol®). Il est utilisé par voie orale à la dose de 10 mg/kg/j pour le traitement des dermatophytoses (De Keyser et Van den Brande, 1983; Angarano et Scott, 1987). Le kétoconazole est utilisé hors AMM chez les oiseaux pour traiter les infections fongiques. Lors de candidose, le kétoconazole peut être employé par voie orale à la dose de 20-30 mg/kg toutes les 12 h chez les Psittacidés notamment, ou 15 mg/kg toutes les 12 h chez les rapaces. En cas d'aspergillose, le kétoconazole peut être utilisé à la dose de 15 mg/kg toutes les 12 h par voie orale.

### ***Fluconazole***

Le fluconazole n'a pas d'AMM vétérinaire en France, cependant il a été utilisé pour traiter notamment la candidose chez les oiseaux. Chez le perroquet gris du Gabon, l'amazone aourou (*Amazona amazonica*), et le cacatoès de Goffin (*Cacatua goffiniana*), une dose de 10 ou 20 mg/kg/j, ou toutes les 48 h, par voie orale, a été employée avec succès (Flammer, 1996 ; Flammer et Papich, 2006). Chez la Calopsitte (*Nymphicus hollandicus*), une dose de 5-10 mg/kg toutes les 48 h par voie orale a été utilisée (Ratzlaff *et al.*, 2011). Chez les passereaux, une dose de 2-5 mg/kg/j est employée (Dorrestein, 2000), tandis que chez les rapaces, la dose utilisée est de 5-15 mg/kg toutes les 12 h (Huckabee, 2000). L'aspergillose peut être dans certains cas traitée avec une dose de fluconazole, notamment chez le perroquet gris du Gabon, à la dose de 15 mg/kg toutes les 12 h par voie orale (Pericard, 2005).

### ***Voriconazole***

Le voriconazole n'a pas d'AMM vétérinaire, mais peut être employé pour traiter notamment les cas sévères de candidose ou l'aspergillose chez les oiseaux à la dose de 12-18 mg/kg toutes les 12 h par voie orale chez les Psittacidés et 12,5 mg/kg toutes les 12 h pendant 4 jours suivi d'une dose à 12,5 mg/kg toutes les 24 h chez les rapaces comme *Falco rusticolus*, *Falco biarmicus*, *Falco cherrug*, *Falco peregrinus* (Di SommaMed *et al.*, 2007). Une étude réalisée

chez le pigeon a montré qu'un traitement à la dose de 10 mg/kg toutes les 12 h permettait de réduire efficacement les signes cliniques et d'éliminer *A. fumigatus* des pigeons expérimentalement infectés (Beernaert *et al.*, 2009b).

### ***Itraconazole***

L'itraconazole dispose d'une AMM pour le traitement des dermatophytoses dues à *Microsporum canis* chez le chat (Itrafungol®). Il est utilisé à la posologie de 5 mg/kg/j pendant 3 périodes de 7 jours consécutifs (avec une semaine d'arrêt entre chaque période de traitement). Bien que ne disposant pas d'une AMM pour les oiseaux, l'itraconazole est également utilisé chez les oiseaux, notamment dans les cas de candidose et d'aspergillose. C'est pratiquement la seule molécule pour les espèces de petite taille. Elle a cependant une toxicité élevée pour le perroquet gris du Gabon et les posologies doivent donc être diminuées (Giguère, 2006). Lors de candidose, l'itraconazole est employé à la dose de 10 mg/kg toutes les 24 h pendant 14 jours, excepté pour les gris du Gabon, qui sont traités avec une dose maximale de 5 mg/kg par jour. L'itraconazole est la molécule la plus utilisée par les vétérinaires français pour le traitement de l'aspergillose, étant donné sa disponibilité, son administration par voie orale et des effets secondaires limités. Un traitement par voie orale à 5-10 mg/kg toutes les 12 ou 24 h peut être réalisé chez les passereaux, les rapaces, et les Psittacidés (à l'exception du perroquet gris du Gabon).

### ***Enilconazole***

L'énilconazole dispose d'une AMM pour le traitement topique des dermatophytoses chez le chien, le chat, les bovins et le cheval. Il est disponible sous forme d'une solution concentrée à 10 % (Imavéral®) qui doit être diluée 50 fois dans de l'eau avant application cutanée. L'énilconazole peut également être utilisé chez le chien pour irriguer les cavités nasales et les sinus frontaux dans le cas d'aspergillose naso-sinusale.

L'énilconazole est aussi un désinfectant qui est utilisé dans les élevages notamment pour décontaminer l'environnement. L'énilconazole en tant que désinfectant est produit sous différentes formulations, telles qu'une formulation en fumée ou en solution (gamme Clinafarm®). Le générateur de fumée Clinafarm®, qui contient 5 g d'énilconazole et peut traiter un volume de 25 m<sup>3</sup>, soit 200 mg/m<sup>3</sup>, ainsi que la solution de Clinafarm® (15 % d'énilconazole, à diluer avant de nébuliser) sont utilisés pour la décontamination de l'environnement, notamment dans les élevages avicoles (Braem, 1986). Il a été montré que ces formulations d'énilconazole étaient très efficaces contre les conidies d'*Aspergillus*

(Desplenter, 1988 ; Van Cutsem *et al.*, 1988). Ces formulations semblent également efficaces pour lutter contre l'aspergillose chez des oiseaux infectés expérimentalement. Dans l'étude de Van Cutsem (1983), la fumigation de 1 g d'énilconazole, correspondant à une dose de 208 mg/m<sup>3</sup> (Clinafarm®), chez des poulets infectés expérimentalement avec *A. fumigatus*, a permis de réduire fortement la mortalité des oiseaux par rapport aux individus non-traités (jusqu'à 7 fois plus importante chez les individus traités, en fonction de la dose de l'inoculum). Une étude a également été réalisée chez la dinde (Perelman *et al.*, 1992), dans laquelle des dindonneaux de 10 jours, infectés avec 10<sup>6</sup> spores d'*A. flavus*, ont été traités par nébulisation d'énilconazole (Clinafarm®). Les résultats ont mis en évidence une réduction des lésions au niveau des poumons et des sacs aériens.

Dans le cadre du dispositif réglementaire de la cascade (prescription hors AMM, article L. 5143-4 CSP) et en raison de l'absence de traitement spécifique, l'Imavéral® peut être prescrit par un vétérinaire pour traiter l'aspergillose aviaire. Les protocoles employés généralement dans les élevages de façon empirique, sont des nébulisations répétées (3 ou 6), sur 3 jours, d'Imavéral® à la dose de 20 mg/m<sup>3</sup> ou 80 mg/m<sup>2</sup>. L'emploi de l'énilconazole est rapporté comme permettant de diminuer respectivement la morbidité et la mortalité dans les bandes atteintes d'aspergillose (Saif *et al.*, 2008).

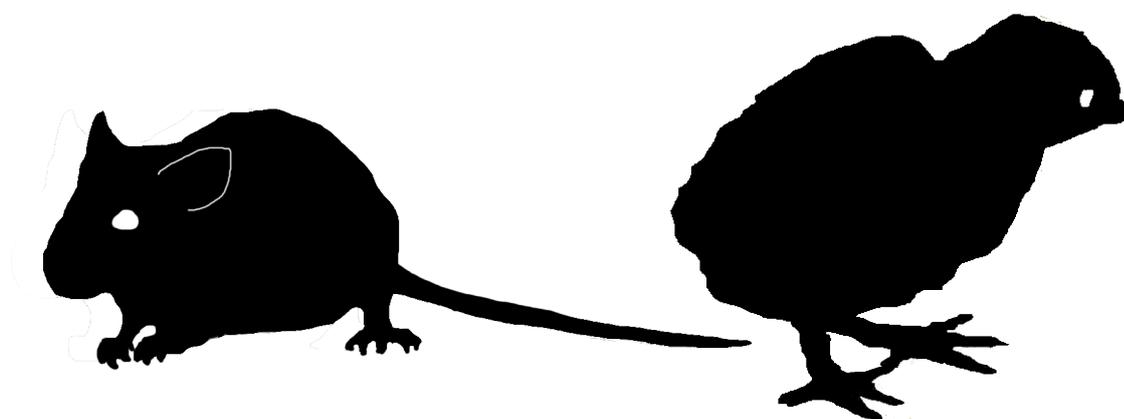


# Les modèles animaux d'aspergillose

## Chapitre

---

# 5





Le recours à des modèles animaux pertinents pour reproduire une infection expérimentale permet de mieux comprendre les modalités de contamination ou de transmission, les phases d'initiation et de développement de la maladie (pathogénie), les caractéristiques propres à l'agent pathogène (virulence) et à la réponse (immunités innée et acquise) de l'hôte importantes à considérer ainsi que d'évaluer les traitements thérapeutiques et les outils de diagnostics. De nombreux modèles animaux ont été développés pour étudier l'aspergillose. Les espèces utilisées classiquement en laboratoire (lapin, rat, souris et cochon d'Inde) servent de modèles pour l'étude de l'aspergillose humaine. Pour les vétérinaires, l'aspergillose est une maladie très importante chez les oiseaux, lesquels possèdent des caractéristiques anatomiques et physiologiques très différentes des mammifères, justifiant le développement de modèles spécifiques d'infection par *Aspergillus* chez différentes espèces aviaires.

## I. Espèces utilisées

---

### I. a. Mammifères

Différentes espèces animales sont utilisées en routine comme modèle d'infection par *Aspergillus*, à savoir la souris (*Mus musculus*), le rat gris (*Rattus norvegicus*), le lapin de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) et le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*). L'utilisation très majoritaire de la souris s'explique par de nombreux avantages associés. En premier lieu, la petite taille de l'animal permet de tester un grand nombre d'animaux au cours d'une expérimentation, et d'obtenir une puissance statistique satisfaisante. D'autre part, le modèle murin permet l'accès à de nombreuses lignées génétiquement modifiées, ainsi qu'à de nombreux réactifs immunologiques. Enfin, les souris sont faciles à manipuler et leur coût d'achat comme d'entretien demeurent faibles (Clemons et Stevens, 2005 ; 2006).

Les études qui requièrent des volumes sanguins importants et/ou des prélèvements répétés (sang, liquide céphalorachidien) imposent de recourir à des espèces de plus gros gabarit à l'instar du rat, du cochon d'Inde, ou du lapin. Les lagomorphes sont particulièrement intéressants lorsqu'il est nécessaire de procéder à des examens par imagerie (CT-scan) afin d'étudier la progression de la pathologie (Walsch, 1995). Cependant le coût et la disponibilité limitée de souches hybrides de lapins peuvent en limiter l'emploi (Capilla *et al.*, 2007). Les lapins sont utilisés dans des modèles d'infection oculaire, systémique et pulmonaire. Les

cochons d'Inde sont souvent utilisés pour l'évaluation de molécules thérapeutiques, comme le voriconazole, dans le cas d'aspergillose invasive. En effet, contrairement aux autres rongeurs chez qui le voriconazole va être rapidement éliminé, le temps de demi-vie de la molécule chez le cochon d'inde est plus longue, comme chez l'Homme (Kirkpatrick *et al.*, 2000).

### I. b. Oiseaux

L'avantage de développer des modèles aviaires d'aspergillose est de pouvoir étudier la pathogénie ou d'évaluer des traitements thérapeutiques directement sur l'espèce cible. Des modèles d'aspergillose aviaire ont été développés chez la poule (*Gallus gallus*) (O'meara et Chute, 1959 ; Klimes *et al.*, 1964 ; Taylor et Burroughs, 1973 ; Van Cutsem, 1983 ; Julian et Goryo, 1990 ; Suleiman *et al.*, 2012 ; Thierry *et al.*, 2013), la dinde (*Meleagris gallopavo*) (Richard *et al.*, 1981 ; Richard et Thurston, 1983 ; Perelman *et al.*, 1992 ; Kunkle et Rimler, 1996 ; Kunkle et Sacco, 1998 ; Kunkle *et al.*, 1999 ; Le Loc'h *et al.*, 2006 ; Femenia *et al.*, 2007 ; Melloul *et al.*, 2014), la caille japonaise (*Coturnix japonica*) (Chaudhary et Sadana, 1988 ; *et al.*, 2004 ; Tell *et al.*, 2010 ; Rundfeldt *et al.*, 2013 ; Goetting *et al.*, 2013), et plus rarement le pigeon biset (*Columba livia*) (Beernaert *et al.*, 2008), l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) (Atasever et Gümüşsoy, 2004) et le canard (*Anas sp.*) (Graczyk *et al.*, 1998).

La sensibilité à l'administration expérimentale d'*Aspergillus* peut varier selon les espèces d'oiseaux mais aussi entre les différentes souches ou lignées d'une même espèce hôte (Ghori et Edgar, 1979 ; Thierry *et al.*, 2013). Des études montrent que la caille japonaise serait la plus sensible, suivie par la dinde, la pintade, et le poulet (Ghori et Edgar, 1973 ; Ghori et Edgar, 1979 ; Chaudhary *et al.*, 1983).

### I. c. Autres animaux

Les comités d'éthiques pour l'expérimentation animale imposent des restrictions sur l'utilisation des animaux de laboratoire, en particulier les vertébrés, qui nécessitent donc une réduction du nombre d'animaux utilisés, ou le développement de modèles *in vitro* ou de modèles alternatifs, tels que les modèles invertébrés. L'un des avantages des invertébrés est le moindre coût (à l'achat, et pour l'équipement nécessaire) par rapport aux modèles mammifères, et la possibilité d'utiliser un plus grand nombre d'individus pour les expérimentations.

Dans le cadre d'études sur les infections fongiques, des modèles alternatifs ont été développés chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), ou chez des invertébrés, tels que les nématodes (*Caenorhabditis elegans*), les drosophiles (*Drosophila melanogaster*) ou les lépidoptères (*Galleria mellonella*). Concernant l'aspergillose expérimentale, les espèces testées incluent la fausse teigne de la cire (*Galleria mellonella*) (Reeves *et al.*, 2004 ; Jackson *et al.*, 2009 ; Cheema et Christians, 2011 ; ; Gomez-Lopez *et al.*, 2014), la drosophile (Lionakis et Kontoyiannis, 2010 ; 2012), ainsi que les œufs embryonnés d'espèces aviaires (O'Meara et Chute, 1959 ; Huhtanen et Pensack, 1967 ; Williams *et al.*, 2000 ; Jacobsen *et al.*, 2010).

La réponse immunitaire innée chez les mammifères joue un rôle majeur dans la défense de l'hôte contre les champignons pathogènes. Or des composants de la réponse immune innée conservés chez les mammifères sont déjà bien présents chez les insectes (Hoffmann *et al.*, 1999) ; il en résulte que, l'analyse de la réponse immunitaire des invertébrés confrontés à une infection fongique peut aider à la compréhension des processus de défenses mis en jeu également chez les vertébrés supérieurs (Hoffmann *et al.*, 1999). De la même façon, la réponse immunitaire des oiseaux face à une infection par *Aspergillus* est similaire à la réponse des mammifères, de part le rôle des macrophages et des hétérophiles (qui sont similaires aux neutrophiles) et la production d'anticorps spécifiques (Lehmann, 1985 ; Martinez-Quesada *et al.*, 1993). Or le système phagocytaire de la réponse immunitaire des oiseaux se développe précocement au cours de l'ontogenèse. En effet, les macrophages et les hétérophiles sont présents au 10<sup>ème</sup> jour de développement de l'embryon. Il est donc intéressant et possible d'utiliser les œufs embryonnés comme modèle alternatif pour étudier la pathogénicité de pathogènes fongiques comme l'aspergillose (Jacobsen *et al.*, 2012). Ces modèles alternatifs permettent également l'étude de la virulence des souches de champignons pathogènes tels que *Candida* (Brennan *et al.*, 2002) ou *Aspergillus* (Jacobsen *et al.*, 2010 ; 2012 ; Gomez-Lopez *et al.*, 2014) dans le cadre de procédures de criblage des isolats notamment. La limite principale de ces modèles est leur physiologie très simplifiée comparée à celle des humains.

La différence de température corporelle entre les mammifères (37°C) d'une part, la drosophile ou *Galleria* (25°C) d'autre part, affecte de multiples caractéristiques fongiques, telles que la croissance du champignon et la production de toxines. Le recours aux insectes ne peut donc pas servir à évaluer la physiopathologie des infections. Une étude réalisée sur *Galleria* a par exemple montré que l'inoculation de conidies d'*A. fumigatus* mutantes pour le gène de la mélanine (*PKS*) entraînait une hypervirulence (Jackson *et al.*, 2009) chez la larve

de fausse teigne, alors que chez les mammifères, cette souche mutante est connue pour être hypovirulente (Langfelder *et al.*, 1998).

## II. Statut immunitaire

---

Pour les modèles mammifères, l'aspergillose expérimentale ne se développe que chez des individus préalablement immunodéprimés. En effet, chez les souris immunocompétentes, un inoculum de  $10^8$  conidies d'*Aspergillus* administré par voie intranasale peut être éliminée de l'organisme, sans induire de pathologie (Latgé, 1999). Seule l'injection par voie intraveineuse d'un inoculum d'*Aspergillus* peut induire une aspergillose disséminée (reins et cerveau principalement touchés) chez des souris adultes en l'absence de traitement immunosuppresseur. Dans ces modèles, la dose de l'inoculum nécessaire est dépendante notamment des souches de souris et d'*Aspergillus* utilisées, et varie entre  $2.10^6$  et  $5.10^7$  conidies / souris (Dannaoui *et al.*, 1999 ; Takemoto *et al.*, 2004). L'injection par voie intracrânienne d'environ  $10^7$  UFC d'*A. fumigatus* chez des rats nouveaux nés peut également entraîner une aspergillose cérébrale en l'absence de traitement immunosuppresseur (Zimmerli *et al.*, 2007).

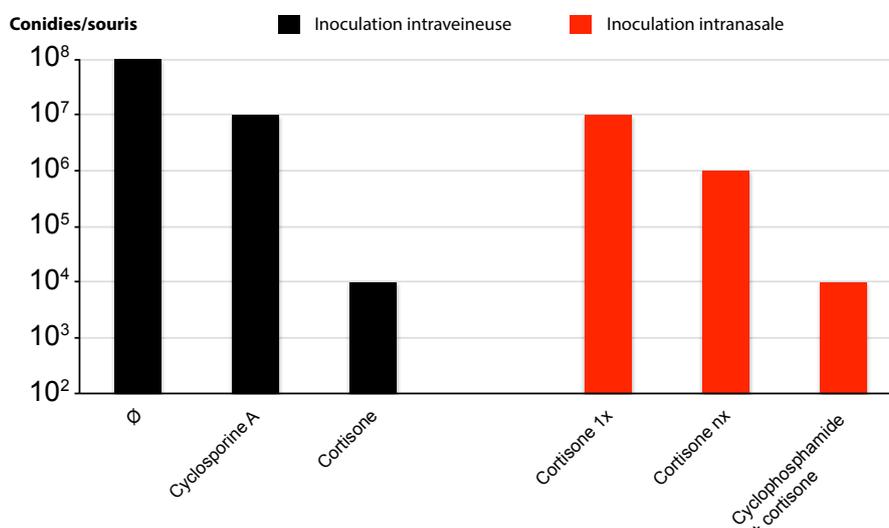
Différentes méthodes permettent d'obtenir une immunosuppression chez les animaux, les plus fréquentes impliquant l'utilisation isolée ou en cocktail de molécules cytotoxiques, de stéroïdes, d'hormones ou encore d'animaux knock-out. Les traitements immunosuppresseurs augmentent la sensibilité des animaux aux infections, cependant en fonction des molécules la réponse à l'infection peut varier. L'aspergillose humaine se développe chez des individus immunosupprimés avec ou sans neutropénie, ce qui justifie le développement de deux types principaux de modèles d'immunosuppression chez l'animal pour l'étude de l'aspergillose : le modèle neutropénique et le modèle non-neutropénique. L'administration de molécules cytotoxiques associées ou non à des stéroïdes permet d'induire une neutropénie (diminution importante des leucocytes polynucléaires), alors que l'utilisation de glucocorticostéroïdes entraîne une immunosuppression sans neutropénie (augmentation des neutrophiles circulants, et diminution des lymphocytes et monocytes).

Dans les modèles neutropéniques murins, l'emploi de la cortisone associé au cyclophosphamide est le plus fréquent car leur utilisation est facile. En complément, la mortalité qui en résulte est élevée et à la fois très répétable et reproductible. Des protocoles

standardisés pour le développement de modèles neutropéniques chez la souris, le rat, ou le cochon d'Inde sont disponibles sur le site du SACMM IAAM (San Antonio Center for Medical Mycology, Invasive Aspergillosis Animal Models) (<http://www.sacmm.org/iamm.html>). Dans ces protocoles, la dose d'immunosuppresseurs utilisée pour les souris est de 250 mg/kg de cortisone à J-2 et J+3 et 250 mg/kg de cyclophosphamide à J-2 réduit à 200 mg/kg à J+3. Dans les modèles non-neutropéniques, ce sont les corticostéroïdes qui sont très souvent employés, comme la cortisone (Duong *et al.*, 1998). La cortisone peut par exemple être administrée à la dose de 10 mg par souris à J-2, J0, J2 et J4 par voie intra-péritonéale (Jaton-Ogay *et al.*, 1994 ; Balloy *et al.*, 2005). D'autres modèles non-neutropéniques utilisent la méthylprednisolone, associée ou non à de la cyclosporine A (Berenguer *et al.*, 1995). Cette dernière molécule est un polypeptide cyclique d'origine fongique qui a un effet inhibiteur sur la réponse T lymphocytaire.

Les réponses de l'organisme consécutives à l'infection par *Aspergillus* dans les deux modèles d'immunosuppression sont très différentes (Berenguer *et al.*, 1995 ; Balloy *et al.*, 2005). En effet, dans les modèles neutropéniques, la mortalité peut être retardée par rapport aux modèles non-neutropéniques, l'infection se développe plus rapidement, le taux de GM dans les poumons est plus fort et le taux de GM dans le sang est quant à lui plus faible (Chiang *et al.*, 2008 ; Spikes *et al.*, 2008).

La dose de l'inoculum nécessaire pour induire une aspergillose chez les animaux immunosupprimés varie en fonction du traitement employé. Chez les modèles murins d'aspergillose par voie intranasale, l'utilisation de cortisone et de cyclophosphamide permet de réduire la dose de l'inoculum à  $10^4$  conidies injectées, contre  $10^7$  pour les animaux immunosupprimés uniquement avec de la cortisone (**figure 35**) (Latgé, 1999).



**Figure 35.** Relation entre dose de l'inoculum et traitement immunosuppresseur chez la souris pour déclencher une aspergillose expérimentale (d'après Latgé, 1999)

Les oiseaux sont spontanément sensibles à l'aspergillose, c'est pourquoi dans beaucoup de modèles d'aspergillose aviaire, le traitement immunosuppresseur n'est pas nécessaire. Cela dit, certains auteurs ont mis en place un traitement immunosuppresseur, avec la dexaméthasone, dans le but d'augmenter la sensibilité de certains oiseaux, afin de réduire la taille des lots expérimentaux. Un stress chronique chez la poule pondeuse génère une immunosuppression caractérisée notamment par une augmentation du *ratio* hétérophiles / lymphocytes (El-Iethy *et al.*, 2003). L'administration orale de dexaméthasone aux doses de 1,25 et 2,5 mg/kg chez la caille (Aengwanick et Chinrasri, 2003), ou l'injection intramusculaire de dexaméthasone à la dose de 2 mg/kg chez la dinde (3 injections), induisent une augmentation du *ratio* hétérophiles / lymphocytes avec un retour complet à la normale quelques jours après l'arrêt du traitement (Huff *et al.*, 1998). L'emploi de la dexaméthasone dans les modèles d'aspergillose aviaire a été testée chez le pigeon (3 injections à 2 mg/kg) (Beernaert *et al.*, 2008), le poulet (4 injections à 5 mg/kg) (Thierry *et al.*, 2013) et la dinde (3 injections à 2 mg/kg) (Le Loc'h *et al.*, 2006).

### III. Voie d'inoculation

---

#### III. a. Modèles mammifères

Dans les modèles mammifères d'aspergillose pulmonaire invasive, les voies d'inoculation sont aérienne, intranasale ou intratrachéale, ce qui mime les conditions naturelles d'infection à *Aspergillus* et permet un développement de la maladie semblable à ce qui est observé chez l'Homme. Des procédures d'administration spécifiques sont employées pour reproduire des formes d'aspergillose localisées.

Dans les modèles d'inhalation, l'inoculation peut se faire à l'aide de spores sèches (Ford et Friedman, 1967 ; Sandhu *et al.*, 1970 ; Merkow *et al.*, 1971 ; Ahmad *et al.*, 2014) ou humides (Patera *et al.*, 2004 ; Sheppard *et al.*, 2004 ; Steinbach *et al.*, 2004 ; Sheppard *et al.*, 2006 ; Leleu *et al.*, 2013a, b). L'utilisation de spores sèches permet de se rapprocher de ce qui se passe lors d'une infection naturelle mais rend le contrôle de la dose d'inoculum distribuée et inhalée difficile à obtenir. *A contrario*, l'utilisation d'une suspension de spores, dispersées

au moyen d'un nébuliseur, facilite la procédure d'inoculation tout en rendant possible le contrôle de la quantité de spores libérées.

Chez les modèles murins, le mode d'inoculation le plus utilisé est la voie intranasale (Eisenstein *et al.*, 1990 ; Smith *et al.*, 1994 ; Lewis *et al.*, 2007 ; Galiger *et al.*, 2013), qui peut se faire par inhalation ou par instillation. Cette voie d'administration a pourtant comme inconvénient majeur l'impossibilité de connaître le nombre exact de conidies inoculées, ce qui est susceptible d'entraîner une certaine variabilité dans le taux d'infection.

Un modèle d'inoculation par aérosolisation intratrachéale a récemment été développé chez le rat (Chandenier *et al.*, 2009 ; Desoubeaux et Chandenier, 2012). Ce modèle a l'avantage de permettre la délivrance d'un aérosol directement dans la trachée des individus, ce qui permet de connaître précisément la dose de l'inoculum administré.

L'inoculation par voie intraveineuse peut être réalisée chez des animaux immunocompétents ou immunodéprimés, comme la souris (Mavridou *et al.*, 2010 ; Olson *et al.*, 2010 ; Seyedmousavi *et al.*, 2013) et le lapin (Weiner et Coats-Stephen, 1979 ; Andrews et Weiner, 1981) afin d'obtenir un modèle d'infection systémique. L'immunosuppression préalable des animaux peut induire dans ce cas le développement d'une aspergillose pulmonaire secondaire à l'infection systémique. Cette voie d'inoculation permet une meilleure standardisation de la procédure d'inoculation par rapport aux voies « naturelles ». Le modèle d'aspergillose ainsi obtenu est plus reproductible et facile à mettre en place (Paulussen *et al.*, 2014). Il peut être utilisé dans l'évaluation *in vivo* de molécules antifongiques vis-à-vis des formes invasives ou systémiques d'aspergillose (Mirkov *et al.*, 2012 ; Kirkpatrick *et al.*, 2013). Cependant, les modalités d'infection et les organes affectés (reins et cerveau) diffèrent de ce qui est observé en clinique chez l'Homme (Jensen, 1994 ; Latgé, 1999).

Des modèles d'ABPA ont également été développés chez la souris (Kurup *et al.*, 1996 ; 2002 ; Grunig *et al.*, 1997) après sensibilisation de l'hôte avec des antigènes aspergillaires injectés par voie intranasale.

*Aspergillus* est responsable également d'infections extra-pulmonaires, la plus commune touchant le système nerveux central. Un modèle souris ainsi qu'un modèle rat ont été développés afin de reproduire une infection localisée à ce niveau (Chiller *et al.*, 2002 ; Zimmerli *et al.*, 2007). Dans le modèle souris, l'inoculation de conidies d'*Aspergillus* se fait par voie intracérébrale, chez des animaux pancytopéniques (immunodéprimés avec la cyclophosphamide), tandis que dans le modèle rat l'injection se fait par voie intra-cisternale chez des animaux jeunes et non-immunodéprimés.

Des modèles de réactivation de l'infection ont été développés chez le rat (Niki *et al.*, 1991) et la souris (Nawada *et al.*, 1996). Dans ces derniers modèles, des souris immunocompétentes inoculées avec *Aspergillus* sont immunodéprimés 10 jours (Leleu *et al.*, 2013b) ou 14 jours (Nawada *et al.*, 1996) post-inoculation et développent une aspergillose invasive consécutive à une infection non-invasive par *Aspergillus*.

Chez le lapin, un modèle de kératite aspergillaire a été développé par injection dans la cornée de conidies d'*Aspergillus* chez des animaux immunocompétents (O'Day, 1990). Ce modèle a servi principalement à des études thérapeutiques, pour tester des molécules comme le fluconazole et le kétoconazole (Komadina *et al.*, 1985 ; O'Day *et al.*, 1992 ; Avunduk *et al.*, 2003).

Il existe un modèle d'endocardite aspergillaire développé chez le cochon d'Inde immunocompétent (Martin *et al.*, 1997). L'infection se fait par cathétérisme de la veine fémorale et inoculation de  $10^4$  conidies d'*Aspergillus*.

### III. b. Modèles aviaires

Dans les modèles aviaires d'aspergillose, les voies d'administration employées sont les inoculations par voie aérienne (O'meara et Chute, 1959 ; Klimes *et al.*, 1964 ; Taylor et Burroughs, 1973 ; Richard *et al.*, 1981 ; Richard et Thurston, 1983 ; Van Cutsem, 1983 ; Thierry *et al.*, 2013), intratrachéale (Chaudhary et Sadana, 1988 ; Atasever et Gümüşsoy, 2004 ; Beernaert *et al.*, 2008 ; Goetting *et al.*, 2013), intrapulmonaire et intra-sacculaires (Perelman *et al.*, 1992 ; Kunkle et Rimler, 1996 ; Kunkle et Sacco, 1998 ; Kunkle *et al.*, 1999 ; Le Loc'h *et al.*, 2006 ; Féménia *et al.*, 2007 ; Mazzola-Rossi, 2007 ; Beernaert *et al.*, 2008). Toutes ces voies d'administration permettent d'induire une infection respiratoire primaire.

L'infection expérimentale par voie aérienne peut être réalisée, comme chez les mammifères, à partir de spores sèches ou en suspension. Pour obtenir un aérosol de spores sèches, un courant d'air est créé à la surface d'une culture fongique sporulée, tandis que pour obtenir un aérosol de spores humides, un nébuliseur va transformer une solution contenant des spores en un nuage de très fines gouttelettes. Une étude a comparé le pouvoir infectieux d'un aérosol constitué de spores sèches et d'un aérosol constitué de gouttelettes contenant des spores humides chez le poulet et a conclu que l'inoculation de spores sèches favorisait l'infection des oiseaux (Klimes *et al.*, 1964). L'inoculation par inhalation de spores sèches ou humides permet de mimer les conditions naturelles d'infection. En revanche, les injections par

voie intrapulmonaire et intra-sac-aérien court-circuitent les voies respiratoires supérieures et leurs mécanismes de défenses associés, ce qui peut induire une modification des premières étapes de l'aspergillose aiguë chez l'oiseau. L'inoculation par voie intratrachéale, bien qu'elle n'inclue pas les cavités nasales notamment, se rapproche des conditions de contamination naturelles, tout en offrant la possibilité de contrôler la dose inoculée. Un nouveau modèle d'infection a été développé chez la caille japonaise par aérosolisation intratrachéale (Goetting *et al.*, 2013) d'une suspension d'*Aspergillus fumigatus*. Ce modèle utilise le même système d'atomiseur que celui déjà utilisé dans le modèle rat (Chandenier *et al.*, 2009), un MicroSprayer®, qui va créer un aérosol de fines gouttelettes (**figure 36**).



**Figure 36.** Dispositif d'aérosolisation intratrachéale en acier, le MicroSprayer® IA-1B-GP

Après pression sur le piston de la seringue, un nuage de gouttelettes est libéré

La réponse immunitaire des animaux a pu être étudiée en les immunisant avec une suspension d'antigènes du champignon injectée par voie intraveineuse (Kunkle *et al.*, 1999) ou intramusculaire (Graczyk *et al.*, 1998).

#### IV. Inoculum et isolats

---

Différentes espèces d'*Aspergillus* ont été utilisées pour le développement de modèle d'aspergillose chez les mammifères et les oiseaux : la plus fréquemment est *A. fumigatus*, devant *A. flavus*, *A. nidulans*, et *A. terreus*. De nombreux modèles d'infection par *A. flavus* ont été développés, notamment chez les mammifères (Eisenstein *et al.*, 1990 ; Chakrabarti *et al.*, 1997 ; Kaliyamurthy *et al.*, 2003 ; Anand *et al.*, 2013), chez la drosophile (Ramirez-Camejo *et al.*, 2014), et chez l'oiseau (Taylor et Burroughs, 1973 ; Richard *et al.*, 1981). Des

études réalisées dans des modèles murins ont montré que *A. flavus* est plus virulente que pratiquement toutes les autres espèces d'*Aspergillus* (Ford et Friedman, 1967). Deux études plus récentes ont également montré qu'un inoculum d'*A. flavus* 100 fois moins concentré que *A. fumigatus* était suffisant pour induire une infection chez la souris immunodéprimée comme immunocompétente (Mosquera *et al.*, 2001 ; Kamai *et al.*, 2002). Des modèles d'aspergilloses chez la souris et sur œufs embryonnés ont été développés en inoculant des spores d'*A. terreus*. La dose nécessaire pour l'obtention d'une mortalité de 100 % est alors 100 à 1000 fois plus importante qu'avec des conidies d'*A. fumigatus* (Slesiona *et al.*, 2012).

Différentes souches d'*A. fumigatus* peuvent également être utilisées afin de tester les éventuelles différences de virulence entre les souches. Certaines études suggèrent l'existence de différences, se manifestant en particulier par une diminution de la virulence des isolats environnementales par rapport aux isolats cliniques chez la souris (Mondon *et al.*, 1996 ; Aufauvre-Brown *et al.*, 1998) ou la dinde (Peden et Rhoades, 1992). Au contraire, l'étude de Olias *et al.* (2011) n'a pas permis de montrer de différences de virulence entre des souches environnementales et cliniques issues d'oiseaux atteints d'aspergillose. Ceci est en accord avec le postulat que la plupart des souches environnementales ont le potentiel d'induire une pathologie fongique chez les hôtes sensibles (Tekaiia et Latgé, 2005).

La dose de l'inoculum choisie est directement liée au taux de mortalité recherché. Elle varie en fonction de l'espèce d'*Aspergillus* utilisée, ainsi qu'en fonction de l'espèce animale testée (Corbel et Eades, 1977 ; Dixon *et al.*, 1989).

## V. Paramètres de suivi

---

Le paramètre le plus immédiat reflétant le développement effectif d'une infection aiguë est la mortalité. Cependant les comités d'éthiques n'autorisent pas l'utilisation de cet indicateur comme critère principal de suivi. Ils recommandent notamment d'euthanasier les animaux moribonds par compassion, plutôt que de les laisser mourir. Afin de déterminer des critères objectifs pour l'euthanasie, les animaux doivent être pesés et les signes cliniques et les comportements doivent être suivis quotidiennement.

D'autres paramètres sont donc utilisés afin de suivre l'évolution de l'infection. L'évaluation fine de la masse fongique dans les organes est le principal paramètre mycologique. Elle va permettre une réduction du nombre d'animaux utilisés par rapport aux

études de survie seules. Différentes méthodes de mesure du développement du champignon dans les tissus cibles existent et le choix de la méthode est primordial : méthodes de culture fongique, de biologie moléculaire (PCR quantitative), chimique (chitine), immunologiques (1, 3- $\beta$ -D-glucanes, galactomannane, marqueurs de l'inflammation) et histologiques. Certaines méthodes seront décrites ci-dessous.

### V. a. Culture fongique

La détermination du nombre d'unité formant des colonies (UFC) par gramme de tissu est une méthode simple, très souvent employée, mais qui reste semi-quantitative. Le principe de cette méthode consiste à broyer les organes étudiés (poumons, reins, foie, cerveau...), puis à faire des dilutions sérielles qui seront ensuite étalées sur une gélose avant incubation à 37°C. Cette technique présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, d'obtenir une croissance rapide d'*Aspergillus*. Seuls les éléments fongiques viables sont détectés. Une limite importante de l'interprétation de ce paramètre est de savoir dans quelle mesure le nombre d'UFC représente la masse fongique viable. Contrairement aux conidies qui sont des cellules uniques, les hyphes sont multicellulaires et plurinucléés. L'homogénéisation des échantillons va fragmenter les hyphes en éléments de tailles aléatoires, ainsi un fragment composé de plusieurs cellules pourra former une seule unité (UFC) (Clemons et Stevens, 2009). L'étude de Manavathu *et al.* (1998) a montré que le nombre d'UFC obtenu à partir d'une culture liquide d'*A. fumigatus* n'augmentait pas au cours du temps malgré un développement important de la masse fongique (hyphes). Le dénombrement des UFC dans les organes cibles ne reflète donc pas forcément le nombre exact de cellules viables du champignon présentent dans le tissu (Latgé, 1999).

### V. b. PCR quantitative (qPCR)

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence une amplification mesurée tout au long de la réaction. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN présent au départ dans l'échantillon. Il existe différentes méthodes de détection de la fluorescence basées sur les agents intercalants d'une part et les sondes d'autre part. Parmi les méthodes de détection disponibles, la plus souvent

utilisée, notamment pour la quantification de la masse fongique, est la qPCR en chimie TaqMan, avec une sonde d'hydrolyse.

Les cibles couramment sélectionnées pour la détection et la quantification de la masse fongique présente dans les tissus par qPCR sont le gène simple-copie *FKS* (Vallor *et al.*, 2008), et les gènes multi-copie 18S (Bowman *et al.*, 2001) ou 28S (Challier *et al.*, 2004). Les résultats sont exprimés en 'équivalents conidies' ou 'équivalents cellules'. La majorité des études qui ont utilisées la qPCR comme méthode de quantification de la masse fongique montrent une augmentation de la sensibilité comparée à la culture semi-quantitative (UFC) (Bowman *et al.*, 2001 ; O'Sullivan *et al.*, 2003 ; MacCallum *et al.*, 2005 ; Francesconi *et al.*, 2006 ; Gomez-Lopez *et al.*, 2006 ; Sheppard *et al.*, 2006 ; Vallor *et al.*, 2008 ; Petraitis *et al.*, 2009). Dans l'étude de Bowman *et al.* (2001) réalisée chez la souris, les résultats qPCR montrent une diminution de 4  $\log_{10}$ , contre une diminution de seulement 1  $\log_{10}$  par le dénombrement des UFC. De la même façon, une étude réalisée chez la souris pour tester l'efficacité de la caspofungine a montré que les résultats de qPCR étaient toujours plus importants que ceux de la culture fongique dans les reins (MacCallum *et al.*, 2005). Cependant, malgré des différences significatives de la masse fongique entre les animaux traités et non-traités, les résultats de PCR réduisaient l'effet des antifongiques. Dans l'étude chez le cochon d'Inde de Vallor *et al.* (2008), la qPCR permet la détection très précoce de la masse fongique dans les poumons et une augmentation de cette masse tout au long de l'infection, contrairement à la culture fongique ou le galactomannane.

La qPCR permet donc de détecter une augmentation progressive de la masse fongique sous forme de conidies ou d'hyphes au cours de l'infection. La méthode est rapide, reproductible, très spécifique, sensible et présente l'avantage de permettre le multiplexage. Les principaux inconvénients sont les étapes d'extractions nécessaires à la PCR, le coût, et les faux négatifs possibles (dus à une mauvaise hybridation de la sonde) ; de plus la qPCR ne permet pas de différencier les éléments viables et non-viables et peut donc induire une surestimation de la masse fongique (Clemons et Stevens, 2009).

L'utilisation de la qPCR pour la recherche spécifique d'*A. fumigatus* n'a encore jamais été réalisée chez les oiseaux.

### **V. c. Galactomannane (GM) et 1, 3- $\beta$ -D-glucane (BG)**

Un test commercial (Platelia Aspergillus, Biorad<sup>®</sup>) permet la détection chez l'homme par une technique ELISA d'un composant pariétal du champignon, le galactomannane, dans différents

échantillons cliniques, dont en particulier le sérum et les lavages broncho-alvéolaire (LBA). Ce test est surtout utilisé comme test de criblage chez les patients présentant un risque élevé d'aspergillose invasive. Il existe un certain nombre de causes pour expliquer des résultats faussement positifs (notamment la contamination de certains antibiotiques de la famille des bétalactames) et aussi des faux négatifs. Les données actuelles disponibles suggèrent que le suivi de l'évolution dynamique des taux est plus utile au diagnostic qu'une valeur seuil (cut-off). La diminution du taux de galactomannane circulant paraît associée à un bon pronostic, contrairement à sa persistance ou son augmentation sous traitement (Sulahian *et al.*, 2001 ;Bille, 2005).

Chez les oiseaux, l'antigénémie pourrait être négative dans certains cas à cause de la demi-vie courte du galactomannane ou varier suivant l'organe atteint. Inversement, il semblerait qu'une faible antigénémie soit commune chez des oiseaux sains (Ivey, 2000 ; Jones et Orosz, 2000). Les kits commerciaux ont été testés sur de nombreuses espèces aviaires et ont permis de valider en partie la détection de ce biomarqueur dans le sérum en conditions contrôlées (Cray *et al.*, 2009a) ou dans des élevages de dindes comme de poulets (França *et al.*, 2012). Ces tests ont également été utilisés dans de nombreux modèles expérimentaux de mammifères (Seyedmousavi *et al.*, 2011 ; Lengerova *et al.*, 2012) ou oiseaux, comme la dinde (Le Loc'h *et al.*, 2006).

La détection de galactomannane reflète l'augmentation active des hyphes dans les tissus. Cependant, si cette méthode permet de calculer un index GM, un seuil limite reste à définir pour les différentes espèces et les différents organes testés. De plus, les résultats semblent plus variables que ceux obtenus avec la PCR ou les UFC, et les faux positifs ne sont pas rares, en particulier chez les oiseaux (França *et al.*, 2012). En effet dans cette dernière étude, l'index GM observé chez des poulets ou des dindes non-infectés pouvait atteindre en moyenne 2 ou 4 (valeur seuil chez l'Homme de 0,5). Ceci est probablement dû à la présence importante dans les élevages aviaires de galactomannane provenant des champignons présents dans l'environnement et les poussières (Arné *et al.*, 2011).

Les 1, 3- $\beta$ -D-glucanes, composants spécifiques de la paroi des champignons, sont également utilisés comme outil diagnostique en clinique (Hoenigl *et al.*, 2014), ainsi que pour la détection d'*Aspergillus* dans certains modèles animaux, comme chez le cochon d'Inde (Lengerova *et al.*, 2012) ou le rat (Ahmad *et al.*, 2014). Ce biomarqueur est toutefois moins sensible et spécifique que le galactomannane.

### V. d. Chitine

**La chitine** est un composant de la paroi des champignons qui n'est pas présent chez les mammifères. La méthode employée pour quantifier la chitine dans un prélèvement nécessite plusieurs étapes d'extraction à base d'hydroxyde de potassium (KOH). La détection se fait ensuite par mesure colorimétrique d'un dérivé aldéhyde du chitosane, qui est un polyside composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine. La limite inférieure du test est d'environ 1 µg de glucosamine (Lehmann et White, 1975). Les résultats sont exprimés en µg de chitine par gramme de tissu. Les avantages de cette méthode sont la spécificité, puisque la chitine n'est pas présente chez les mammifères, et le peu d'équipement qu'elle requiert. De plus, la mesure de la chitine permet de voir une augmentation de la charge fongique dans les 7 jours après infection. Les inconvénients sont, d'une part, le temps de réalisation qui est long et, d'autre part, le fait que cette méthode ne permette de quantifier que les hyphes et non les conidies.

D'autres paramètres peuvent aider au suivi de l'infection, comme l'histologie qui permet de visualiser le champignon et les cellules de la réponse immunitaire, ou, plus récemment, les marqueurs de l'inflammation (Gonzales *et al.*, 2010 ; Sheahan *et al.*, 2010 ; Goetting *et al.*, 2013). Dans l'étude de Goetting *et al.* (2013), réalisée chez des cailles japonaises expérimentalement infectées avec *Aspergillus*, la détection de certains marqueurs inflammatoires, comme les protéines de phase aiguë (PPA), a permis de montrer une relation positive avec la sévérité de la maladie, ainsi qu'avec les résultats de culture fongique (UFC). Ces résultats sont différents de ceux observés chez les mammifères (Gonzales *et al.*, 2010 ; Sheahan *et al.*, 2010), car la réponse inflammatoire chez les oiseaux est différente de celle observée chez les mammifères (Gruys *et al.*, 2005).

# Objectifs de la thèse



## OBJECTIFS

Les particularités anatomiques et physiologiques des oiseaux rendent ces animaux particulièrement réceptifs et sensibles à l'infection par *Aspergillus fumigatus*. Dans les élevages avicoles, et tout particulièrement dans les élevages de dindes, l'infection peut être responsable d'un fort taux de morbidité et de mortalité, entraînant des pertes économiques importantes. Par ailleurs, l'énilconazole, la seule molécule antifongique utilisée dans les élevages avicoles lorsque des cas d'aspergillose sont signalés, n'a pas d'autorisation de mise sur le marché pour les oiseaux pour cette indication.

L'objectif général du travail de thèse a consisté à évaluer l'efficacité de l'énilconazole administré par voie aérienne vis-à-vis de l'infection par *A. fumigatus* chez des oiseaux. Pour cela, le premier objectif a été de mettre au point un modèle expérimental d'aspergillose aiguë chez le dindonneau. Un modèle d'inoculation par aérosolisation intratrachéale d'une suspension de conidies d'*Aspergillus fumigatus* a été développé sur des dindonneaux de moins d'une semaine. Le deuxième objectif a été l'évaluation et la validation de deux biomarqueurs (ADN et antigène fongique) pour le suivi du développement du champignon filamenteux dans l'organisme par la quantification de la charge fongique au niveau des poumons. La quantité d'ADN fongique a été évalué par PCR en temps réel à partir de cibles simple-copie (gène FKS) et multi-copies (gène du 28S), tandis que la présence du galactomannane, antigène pariétal d'*Aspergillus* a été évalué par un test ELISA. Le troisième objectif a été l'évaluation de l'efficacité de l'énilconazole en utilisant le modèle et les marqueurs préalablement définis. Pour cela, le traitement a tout d'abord été testé de façon contrôlée, par nébulisation (à l'aide d'un nébuliseur médical) de l'azolé sur les dindonneaux placés dans une chambre d'inhalation. Puis dans une seconde expérimentation, les oiseaux ont été traités directement sur leur lieu d'hébergement à l'aide d'un atomiseur semblable à ceux utilisés en dans les élevages avicoles. Dans cette dernière expérimentation, un lot d'oiseaux a été traité par itraconazole, dont l'efficacité a déjà été prouvée chez d'autres espèces aviaires à titre de comparaison avec l'énilconazole.



# **Etudes**

# **Expérimentales**

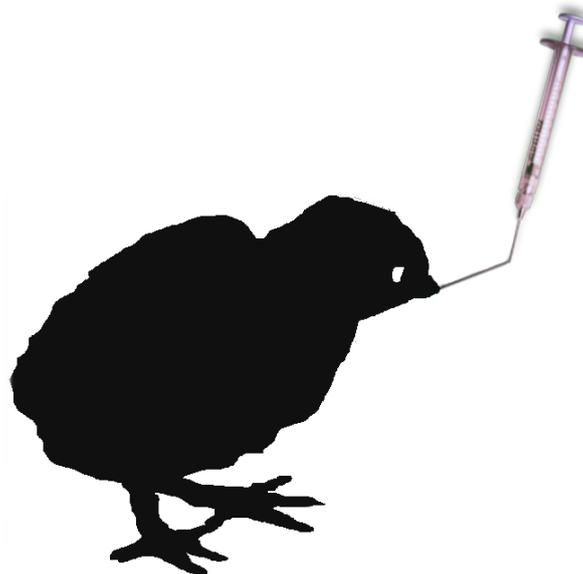


# Développement d'un modèle d'aspergillose aiguë chez la dinde

## Chapitre

---

# 1





## I. Introduction

---

L'aspergillose est une infection majeure chez les oiseaux, et tout particulièrement chez la dinde. Différents modèles expérimentaux d'aspergillose ont été développés chez plusieurs espèces dont la caille du Japon (*Coturnix japonica*), le poulet (*Gallus gallus*), le pigeon biset (*Columba livia*), l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) et la dinde (*Meleagris gallopavo*). Les modèles déjà développés chez la dinde varient par leur voie d'inoculation : intra-sacculaire, intrapulmonaire ou par inhalation d'un aérosol généré à partir de colonies d'*Aspergillus*. Les injections intra-sacculaires ou intrapulmonaires ne reproduisent pas la voie de contamination naturelle puisque dans ces conditions les conidies ne traversent pas le tractus respiratoire supérieur. Le modèle d'infection par inhalation de conidies sous la forme d'une poudre sèche mime les conditions naturelles d'introduction du champignon dans l'organisme. Cependant ce modèle est particulièrement difficile à standardiser, principalement parce que la quantité de conidies inhalées par les individus ne peut être précisément mesurée. L'inoculation par nébulisation d'une suspension de conidies en phase aqueuse a également été testée chez d'autres espèces que la dinde, mais le même problème de standardisation peut générer une variabilité excessive de la réponse des individus inoculés. Un nouveau modèle d'infection, qui permet l'aérosolisation par voie intratrachéale d'une quantité précise de conidies, a été développé chez le rat (*Ratus norvegicus*) par l'équipe de Jacques Chandenier au Centre Hospitalier Universitaire de Tours (37) (Chandenier *et al.*, 2009). Cette méthode d'inoculation permet de se rapprocher des conditions de contamination naturelle, tout en contrôlant la dose infectante délivrée. De plus, contrairement aux mammifères, l'absence d'épiglotte chez les oiseaux facilite l'inoculation. Dans cette étude, nous nous proposons donc d'utiliser une inoculation par aérosolisation intratrachéale afin de développer un nouveau modèle d'aspergillose aiguë chez la dinde.

En plus de l'analyse de la survie des animaux, le suivi de l'infection a été réalisé par mise en culture, examen anatomo-pathologique et quantification de la masse fongique dans les poumons. Pour cela, deux méthodes de quantification (détection de biomarqueurs) de la masse fongique pulmonaire ont été adaptées et évaluées chez la dinde. Le premier biomarqueur évalué a été l'ADN fongique, par une méthode de PCR quantitative. La qPCR n'avait encore jamais été utilisée pour la détection d'*A. fumigatus* chez les oiseaux. Le second biomarqueur sélectionné et quantifié par ELISA est un antigène majeur de la paroi fongique,

le galactomannane. Ces deux biomarqueurs sont dosés en routine dans le sérum des patients humains à risque ou pour suivre l'évolution de l'aspergillose invasive chez les malades placés sous traitement. Dans le cadre d'infections expérimentales, ils peuvent permettre une évaluation plus précise de la masse fongique dans les organes cibles des mammifères de laboratoire.

## II. Mise au point d'une infection expérimentale chez la dinde

---

### Article

Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys (*Meleagris gallopavo*) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture

Publié le 18 août 2014 dans CIMID





Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cimid](http://www.elsevier.com/locate/cimid)

### Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys (*Meleagris gallopavo*) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture



Elise Melloul<sup>a,e</sup>, Simon Thierry<sup>a</sup>, Benoit Durand<sup>b</sup>, Nathalie Cordonnier<sup>c</sup>, Guillaume Desoubieux<sup>d</sup>, Jacques Chandénier<sup>d</sup>, Christophe Bostvironnois<sup>e</sup>, Françoise Botterel<sup>a</sup>, René Chermette<sup>a</sup>, Jacques Guillot<sup>a</sup>, Pascal Arné<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Research group ENVA, UPEC Dynamyc, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UPE, Maisons-Alfort, France

<sup>b</sup> Epidemiology, ANSES, LSA, Maisons-Alfort, France

<sup>c</sup> Pathology Department, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

<sup>d</sup> Parasitology-Mycology-Tropical Medicine, CHRU, Université François-Rabelais, CEPR INSERM U1100/EA6305, Tours, France

<sup>e</sup> Lilly France, Elanco, Neuilly-sur-Seine, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 19 May 2014

Received in revised form 4 July 2014

Accepted 30 July 2014

##### Keywords:

Turkey

Lung

Aspergillosis

*Aspergillus fumigatus*

Model

Real-time PCR

Galactomannan

Culture

#### ABSTRACT

*Aspergillus fumigatus* remains a major respiratory pathogen in birds and treatment is still difficult. We challenged different groups of few-day-old turkeys via intratracheal aerosolisation with increasing concentrations ( $10^5$  up to  $10^8$ ) of conidia using a MicroSprayer® device. The fungal burden was assessed by real-time PCR, galactomannan dosage, CFU counting and histopathological evaluation in order to provide a comparison of these results within each inoculum groups. Significant mortality, occurring in the first 96 h after inoculation, was only observed at the highest inoculum dose. Culture counts, GM index and qPCR results on the one hand and inoculum size on the other hand appeared to be clearly correlated. The mean fungal burden detected by qPCR was  $1.3 \log_{10}$  units higher than the mean values obtained by CFU measurement. The new model and the markers will be used to evaluate the efficacy of antifungal treatments that could be used in poultry farms.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Aspergillosis is the most severe fungal disease in birds involving thermophilic mold species that belong to the genus *Aspergillus*, among which *Aspergillus fumigatus* is by far the most prevalent causative agent. In poultry production and more specifically in fast-growing or breeding

flocks of turkeys, this opportunistic infection, which is responsible for high rates of morbidity and mortality, poor performance and carcass condemnation, causes severe economic losses. Generally confined to the lower respiratory tract in acute cases affecting young birds, lesions may extend to many other organs via secondary haematogenous dissemination or contiguous infection. The small diameter of conidia allow them, once inhaled, to be deposited directly deep within the respiratory system particularly in the posterior air sacs. Therefore, primary colonization occurs in an environment which is optimal for germination and mycelium growth of *Aspergillus* molds. Considering

\* Corresponding author at: 7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France. Tel.: +33 1 43 96 70 73.  
E-mail address: [parne@vet-alfort.fr](mailto:parne@vet-alfort.fr) (P. Arné).

the physiological specific aspects of the respiratory tract of birds and the lack of efficient treatments for declared aspergillosis, the development of avian models is absolutely necessary to acquire comprehensive knowledge of the physiopathology of the disease [1,2]. Numerous vertebrate models of this disease have been successively developed to study various aspects of fungal development in the host, the subsequent immune response and to test antifungal drug efficacy. In contrast to rodent and rabbit models, immune modulation is not a necessary prerequisite in avian challenge models [1]. Aspergillosis is readily induced in healthy birds by inhalation of aerosolized conidia in turkeys [3] or chickens [4], intravenous challenge in turkeys [5], intratracheal route in starlings [6], Japanese quails [7–9], rock pigeons and gyr-falcon hybrids [10] or by transcutaneous inoculation into air sacs in turkeys [11] or racing pigeons [12]. Besides mortality or clinical signs, the monitoring of host–pathogen interactions following an experimental challenge in birds relies on the presence of gross lesions and histopathological lesions [13] in addition to either the detection of markers of the fungal extension [1] or the quantification of the inflammatory response [7]. For many years, non-culture-based methods either used alone or in combination have been developed to target *Aspergillus* DNA by real-time PCR or cell-wall antigens in different tissues or fluids to establish a rapid diagnosis of invasive aspergillosis in humans [14] or to monitor experimental disease in several rodent models [15–19]. The measurement of galactomannan or 1,3- $\beta$ -D-glucans has also been tested in different bird species suffering aspergillosis [20], in turkeys following experimental infection [21] and recently on cases affecting commercial broiler chickens and turkeys [22].

Our goal was to validate an accurate model of acute aspergillosis in intratracheally-challenged turkeys. Non-culture-based methods and quantitative culture were compared to assess the fungal burden in lungs. In further investigations this original model may be used to test antifungal treatments in poultry.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *A. fumigatus* strain, mycological cultures and preparation of the inoculum

*A. fumigatus* strain CBS 144.89 was used for all experiments. This strain was initially isolated from a human patient with invasive aspergillosis in France and obtained from the Centraalbureau voor Schimmelcultuur (CBS), Utrecht, The Netherlands. All mycological cultures were performed on malt agar plates supplemented with chloramphenicol (50 mg/L) and incubated at 37 °C for 10 days depending on the fungal growth and species. To prepare the inoculum, the strain was grown for 10 days at 37 °C. Conidia were subsequently harvested by flooding the plates with sterile phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% (vol/vol) Tween 20 (PBST). The conidia were concentrated by centrifugation (at 3500  $\times$  g for 30 min) and counted using a Malassez counting chamber.

### 2.2. Animals and housing conditions

Conventional male turkeys (Hybrid Diamond White Medium strain, Le Sayec, Caudan, France) of 1-day-old with an average weight of 65–70 g were used. Groups of approximately 20 birds were housed in cages (minimum 2 m<sup>2</sup>) on wood chips litter, in the biosafety 3 level sector of the animal facility of the veterinary college of Alfort, France. Animals had permanent access to fresh commercial poultry starter (Versele-Laga, Belgium) and water. Photoperiod (16 h per day) and ambient temperature (25 °C) were regulated. Two infrared lamps provided additional heat throughout the experiment.

### 2.3. Environmental contamination assessment

The fungal contamination of the environment was assessed before and during the experiment by regular sampling of conidia by sedimentation on two opened plates placed in each cage for 30 min. In parallel, 1 g of litter and feedstuff were sampled and mixed in 45 mL PBST from which 100  $\mu$ L was seeded on malt + chloramphenicol agar plates.

### 2.4. Sprayer system and intratracheal challenge

Two sets of experimental infections were conducted under the same conditions. For the first experiment (set A), 36 seven-day-old turkeys were inoculated (day 0) with different concentrations of *A. fumigatus* (12 birds per inoculum): 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> or 10<sup>7</sup> conidia per bird (groups named Inoc5, Inoc6 and Inoc7, respectively). Nine turkeys were inoculated with PBST as negative control. In the second experiment (set B), 12 five-day-old turkeys were inoculated with 10<sup>8</sup> conidia (Inoc8) and 7 turkeys were inoculated with PBST. Two birds of each group were euthanized immediately after inoculation in order to check the contamination level of lungs.

Turkeys were anesthetized by inhalation of 5% isoflurane (Aerrane; Baxter, Maurepas, France) in oxygen and inoculated with 100  $\mu$ L of *A. fumigatus* suspension (or PBST) using a stainless steel 19 gauge aerosolizer (Microsprayer IA-1B<sup>®</sup>, Penn Century, Philadelphia, PA, USA) connected to a 1 mL syringe (Medallion<sup>®</sup>, Merit Medical, The Netherlands) inserted into the trachea under visual control. No intra-operative deaths or delayed recovery (less than 2 min after inoculation) were observed. Birds were monitored at least twice daily and every sign of morbidity or mortalities were recorded. Turkeys were euthanized with T-61<sup>®</sup> (Intervet, The Netherlands).

All animal research procedures were approved by the regional ethics committee for animal experimentation at the veterinary college of Alfort (no. 00830.02, Ethics committee of Anses/ENVA/UPEC).

### 2.5. Sample collection

Targeted organs of the respiratory tract from all dead and euthanized animals were removed aseptically under a laminar flow hood. The trachea and left thoracic air sac were sampled with a sterile swab. The left lungs were

collected for histology and the right lungs were used for fungal culture, real time PCR and galactomannan dosage.

## 2.6. Histological evaluation

Tissues collected for histology were immediately fixed in 10% neutral buffered formalin and dehydrated. Paraffin wax-embedded specimens were sectioned at 4  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Periodic acid Schiff (PAS) and Grocott-Gomori methenamine-silver stains (MS) were used to help the visualization of *Aspergillus*-like hyphae in lesions. A blind reading of 1 up to 10 slides *per* selected turkey of each group was conducted to evaluate the intensity of microscopic lesions.

## 2.7. Fungal culture of respiratory organs

The right lungs were weighed and ground with a tissue homogenizer (Bio-Gen PRO200 Homogenizer, Pro Scientific, Oxford, CT, USA) in 6 mL of PBS containing 0.01% (vol/vol) Tween 20. An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of the primary lung homogenates were immediately used for fungal culture, the rest was frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

Dilutions of primary lung homogenates and swabs of trachea and air sac were seeded on malt chloramphenicol agar plates and incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The count of *A. fumigatus* colonies (CFU) were assessed 1 and 2 days after plate inoculation.

## 2.8. Assessment of conidial equivalent by real time PCR

The primary lung homogenates were subjected to a secondary homogenization step. An aliquot of 500  $\mu\text{L}$  of lung homogenate was transferred to a sterile 2 mL screw-cap centrifuge tube containing 0.5 mm-diameter glass beads (Biospec, Bartlesville, USA) and placed in a MagNa Lysor homogenizer (Roche, Meylan, France) for 3 bursts of 30 s at 3500 rpm with incubation on ice between bursts. The secondary lung homogenate was collected by centrifugation at  $800 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$  and 100  $\mu\text{L}$  of this homogenate was directly used for DNA extraction with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's directions. Fungal DNA and secondary homogenate were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Real-time TaqMan PCR quantified the amount of *A. fumigatus* cell nuclei by targeting the single-copy *FKS* gene and the multi-copy gene encoding the 28S rRNA. The sequences of the *FKS* primers were previously reported [23]: sense amplification primer, AFKS1 (5'-GCC TGG TAG TGA AGC TGA GCG T-3'), antisense amplification primer, AFKS2 (5'-CGG TGA ATG TAG GCA TGT TGT CC-3') and the hybridization *FKS* probe (5'-6-FAM-TCA CTC TCT ACC CCC ATG CCC GAG CC-BHQ1-3'). The 28S primers were reported by Challier et al. [24]: 28S-466 (5'-CTC GGA ATG TAT CAC CTC TCG G-3') and 28S-533 (5'-TCC TCG GTC CAG GCA GG-3') and the hybridization 28S probe (5'-6-FAM-TGT CTT ATA GCC GAG GGT GCA ATG CG-TAMRA-3').

A standard curve was established with DNA samples extracted from lungs of uninfected turkeys (qPCR and semi-quantitative culture negative for *Aspergillus*) inoculated with different doses of *A. fumigatus* conidia (from  $10^2$  to

$10^8$  conidia) and allowed us to quantify the *Aspergillus* DNA in the organs by calculating conidial equivalents (CE) [15]. DNA samples were analyzed in duplicate by using the LightCycler<sup>®</sup> 480 detection system (Roche, Meylan, France). The reaction mixture consisted in 5  $\mu\text{L}$  of DNA, 900 or 500 nM sense and antisense primers from *FKS* or 28S targets, 200 nM *FKS* probe or 250 nM 28S probe and LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master 2 $\times$  (Roche, Meylan, France). All assays were run under the following conditions:  $50^\circ\text{C}$  for 2 min,  $95^\circ\text{C}$  for 10 min, then 50 cycles of 15 s at  $95^\circ\text{C}$  and 1 min at  $65^\circ\text{C}$  or  $60^\circ\text{C}$  respectively for *FKS* or 28S primers.

## 2.9. Galactomannan (GM) quantity assessment

An aliquot of 500  $\mu\text{L}$  of primary lung homogenates were centrifuged at  $2300 \times g$  for 5 min and the supernatant was placed into a fresh tube. Lung supernatants (300  $\mu\text{L}$ ) were used for GM determination with the Platelia GM-EIA kits (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) according to the manufacturer's directions. The minimum and maximum thresholds of DO detected by the ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) ranged between 0 and 3 Abs. A 1:100 dilution of lung homogenates was realized for all groups and a 1:1000 dilution for the Inoc8 group in order to avoid the saturation of the signal detected in some crude lung homogenates.

## 2.10. Genotyping of *A. fumigatus* isolates

A subset of strains recovered either from the environment or from internal organs was collected and genotyped by Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA) [25].

## 2.11. Statistical analyses

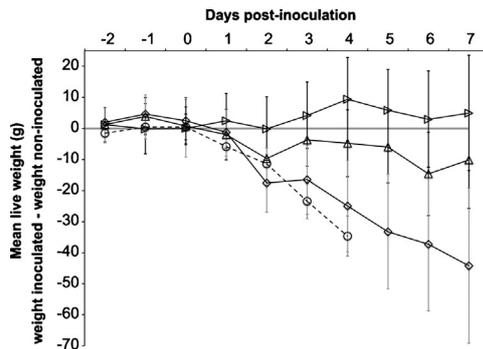
Statistical analyses were performed with the JMP 10.0 software. A log rank *t* test has been used to analyze the survival of birds and to evaluate the effect of the inoculum dose on mortality. Linear regressions were realized between the different biomarkers ( $\log_{10}$  CFU/g of lung,  $\log_{10}$  CE/g of lung and the GM index) in order to measure the possible relationship between them. Then Spearman's rank correlations were performed for multiple comparisons and to evaluate the relationship between the different biomarkers and the inoculum doses.

Data from continuous variables are presented as means  $\pm$  standard errors of the mean.

## 3. Results

### 3.1. Body weight, clinical signs and mortality

A dose dependent response was observed concerning weight gain evolution when inoculated turkeys were compared to non-challenged birds in both sets. If birds from Inoc5 and Inoc6 were not affected by *Aspergillus* challenge, growth average of birds exposed to higher concentrations (Inoc7 and Inoc8) decreased significantly as soon as 2 days post-inoculation (Fig. 1).

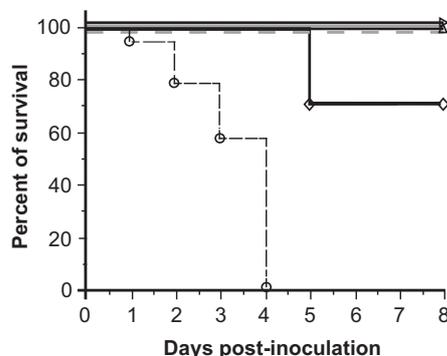


**Fig. 1.** Mean weight variations of inoculated birds (black line) compared to non-challenged turkeys (gray line) from set A (solid line) or B (dashed line). Inoculum of  $10^5$  (▷),  $10^6$  (△),  $10^7$  (◇) or  $10^8$  (○) *Aspergillus fumigatus* conidia. Error bars indicate standard deviations.

No clinical signs or mortality were observed in non-challenged turkeys and Inoc5. The clinical signs observed in turkeys of Inoc6, Inoc7 and Inoc8 included lethargy, ruffled feathers, progressive weight loss and respiratory distress such as open-mouthed breathing leading to lateral recumbency in severe cases. Two birds out of 9 in Inoc6 exhibited clinical signs 6 days after inoculation, but did not die before the end of the experiment. Eight turkeys out of 10 in Inoc7 presented clinical signs, which appeared between 3 and 6 days after inoculation and 3 animals died on day 5. In set B, an acute respiratory distress was registered between 1 and 3 days post-inoculation of *A. fumigatus* in all turkeys of Inoc8 ( $n = 10$ ), and they died 24–48 h later (Fig. 2). The survival curves of Inoc7 and Inoc8 differed significantly from the other groups and between them (log-rank  $t$  test,  $p < 0.0001$ ).

### 3.2. Macroscopic and microscopic lesions

No macroscopic lesions were observed on non-challenged and Inoc5 birds. An increasing proportion of turkeys from Inoc6 (5/10), Inoc7 (8/10) and Inoc8 (10/10) exhibited few nodules on thoracic air sacs and a densification of variable proportions of the pulmonary parenchyma. Histological lesions associated with *Aspergillus* development were confirmed in lungs of Inoc6, Inoc7 and Inoc8



**Fig. 2.** Survival time of non-challenged (gray line) and inoculated (black line) turkeys from set A (solid line) and B (dashed line). Inoculum of  $10^5$  (▷),  $10^6$  (△),  $10^7$  (◇) or  $10^8$  (○) *Aspergillus fumigatus* conidia.

**Table 1**

Fungal burdens in lungs of inoculated turkeys measured by CFU and real time PCR (28S) assays.

Groups	Mean $\log_{10}$ CFU/g of lung	Mean $\log_{10}$ CE <sub>28S</sub> /g of lung
Inoc5	BLD <sup>a</sup>	BLD
Inoc6	$2.84 \pm 0.30$ (5/9) <sup>b</sup>	$5.32 \pm 0.13$ (3/9)
Inoc7	$4.34 \pm 0.29$ (7/10)	$5.73 \pm 0.14$ (7/10)
Inoc8	$5.60 \pm 0.12$ (10/10)	$7.17 \pm 0.11$ (10/10)

<sup>a</sup> BLD: below level of detection.

<sup>b</sup> Mean  $\pm$  standard error (no. of positive values/total no. of birds tested).

turkeys but were absent in Inoc5 or non-challenged birds. These lesions were mostly represented by multifocal either isolated or coalescing granulomas with necrotic centers and occurrence of multinucleated giant cells (Fig. 3). Percentages of altered parenchyma varying from 30 to 80% have been estimated on lung preparations from different birds belonging to Inoc7 and Inoc8. However, the hyphae burden seemed to be more important in the latter group.

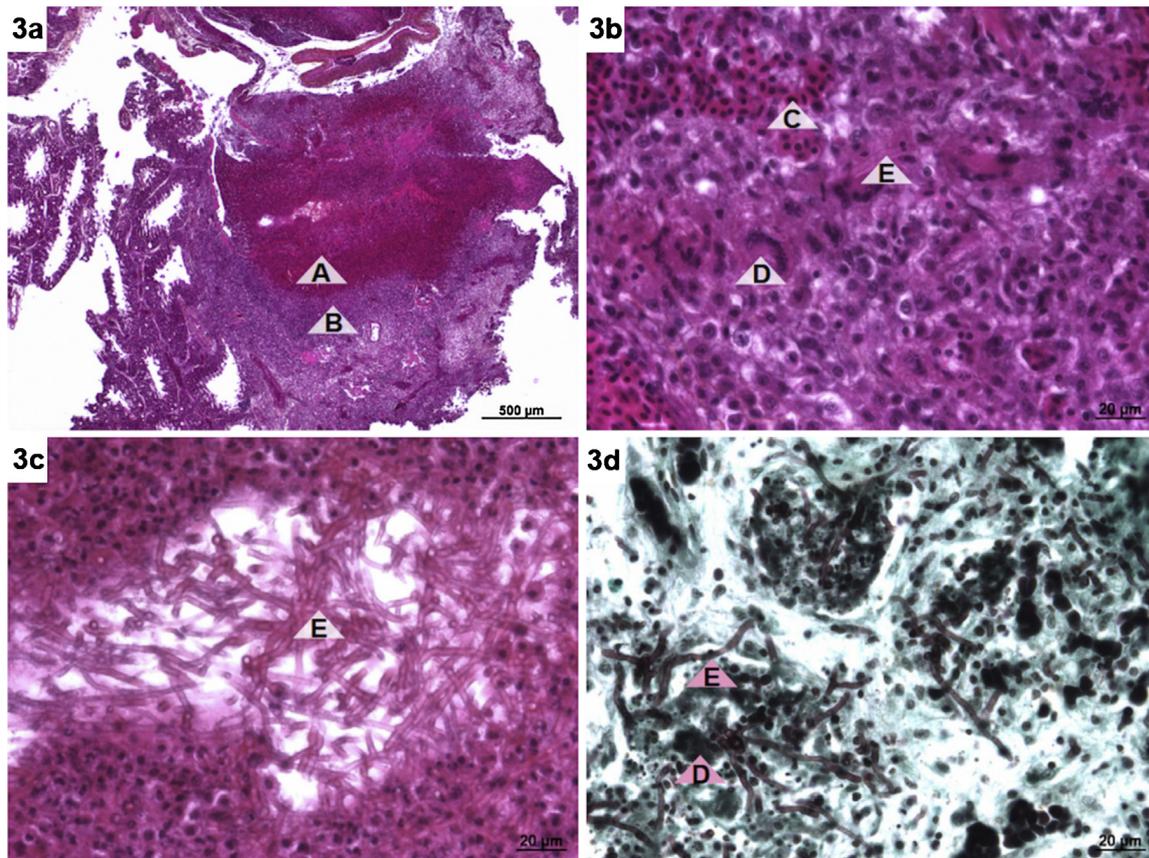
### 3.3. Fungal cultures from trachea, air sacs and lungs

The lower limit of the assay is approximately 300 CFU/g of lung (10 CFU/plate). All non-challenged turkeys exhibited negative cultures. Semi-quantitative enumerations from trachea and air sacs showed variable levels of contamination immediately after inoculation in all challenged groups. However, no *Aspergillus* could be recovered from both organs of all birds of Inoc5, Inoc6 and Inoc7 that were euthanized between 5 and 8 days post challenge. For Inoc8, a high level of contamination ( $>100$  CFU/plate) was still present in air sacs till day 4, but not in trachea even in turkeys which died spontaneously 2 days after inoculation.

Positive counts ranging from 3.28 up to 9.75  $\log_{10}$  CFU/g have been registered on lungs of all turkeys sacrificed immediately after the inoculation. In the remaining birds, the proportion of positive samples and the mean of  $\log_{10}$  CFU/g of lung established on those samples increased with the inoculum size (Table 1). The mean of  $\log_{10}$  CFU/g of lung for the 13 turkeys (Inoc7 and Inoc8) that died spontaneously between 2 and 5 days pi was  $5.47 \pm 0.41$ .

### 3.4. Assessment of conidial equivalent by real time PCR

The sensitivity of real time PCR on 28S target was higher than on *FKS* gene with limits of detection varying from 5 CE (corresponding to  $10^3$  CE/g of lung) to 250 CE per reaction ( $5 \times 10^4$  CE/g of lung) respectively. Immediately after experimental infection, qPCR signals remained undetectable for the 2 birds of Inoc5, one turkey of Inoc6 but were highly positive for the others (Inoc7 and 8). At day 8, no amplification at all was detected with both targets for Inoc5 and only 3/9 samples from Inoc6 were detected with the 28S target. The numbers of CE/g of lung detected with the *FKS* target and 28S target were positively correlated ( $\log_{10}$  CE<sub>FKS</sub>/g of lung =  $-2.92 + 1.34 \times \log_{10}$  CE<sub>28S</sub>/g of lung) when assessed on the 17 DNA samples (7/10 Inoc7 and 10/10 Inoc8) exhibiting amplification with both DNA targets (data not shown). Similarly to fungal enumerations both proportions of positive amplifications and means of



**Fig. 3.** Histological sections of lungs from 2 turkeys (Inoc8). (a) (HES stain): voluminous granuloma with a necrotic center. (b, c) (HES stain) and (d) (MS stain): detailed of a granuloma. A: necrosis; B: granuloma; C: red blood cells in capillary; D: giant cells with multiple nuclei; E: *Aspergillus* hyphae.

$\log_{10}$  CE<sub>285</sub>/g of lung in positive results appeared to be correlated to the inoculum size (Table 1).

### 3.5. Galactomannan (GM) quantity assessment

GM index obtained on crude lung homogenates presented huge variations from 0.5 to 6 (signal saturation) in all groups including non-challenged birds. GM index repartition after 1:100 dilution (Fig. 4) was quite similar in control, Inoc5 and Inoc6 birds ( $p=0.0084$ ). The highest variation of GM index values was observed in Inoc7 (mean GM index =  $3.99 \pm 0.90$ ). All turkeys that died spontaneously (including all Inoc8) exhibited an index higher than 5. Interestingly, the GM index of all birds immediately euthanized after inoculation were lower than 0.35.

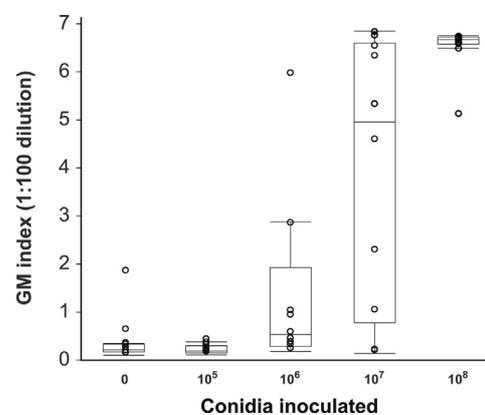
### 3.6. Correlation between the different markers

CE<sub>285</sub> and CFU titers in the lung were strongly correlated ( $p < 0.0001$ ) when the data of all groups were included (Fig. 5) but not in each group considered separately. Both values increased significantly with inoculum size ( $p < 0.0001$ ). As featured by the regression line, the sensitivity threshold of CE values was almost 10 fold higher than CFU counts in lung samples ( $\log_{10}$  CE<sub>285</sub>/g of lung =  $1.30 \times \log_{10}$  CFU/g of lung). Birds which died quickly had consistently more CFU and CE in lungs than the other

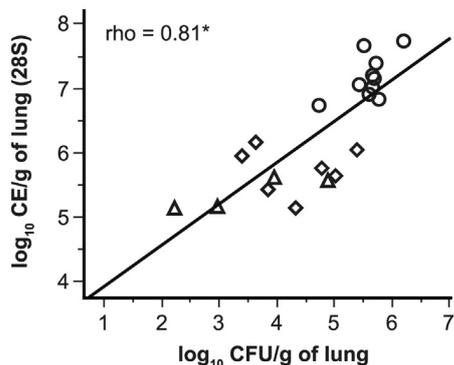
birds. GM index applied to diluted lung homogenates (1:1000) of Inoc8 was significantly correlated to  $\log_{10}$  CE/g (Fig. 6a,  $p=0.0172$ ) but not with  $\log_{10}$  CFU/g (Fig. 6b,  $p=0.526$ ).

### 3.7. Environmental contamination

Negligible levels of contamination by molds (*Aspergillus* spp. and Mucorales) were detected in the litter or in the



**Fig. 4.** Comparison of mean galactomannan index (1:100 dilution) in lung samples from non challenged and inoculated groups.



**Fig. 5.** Relationship between CFU and CE ( $\log_{10}$  CE<sub>28S</sub>/g of lung =  $1.30 \times \log_{10}$  CFU/g of lung) as shown by linear regression. Turkeys inoculated with  $10^5$  (>),  $10^6$  ( $\Delta$ ),  $10^7$  ( $\diamond$ ) or  $10^8$  ( $\circ$ ) conidia. \*Significant correlation ( $p < 0.0001$ ) between results by the Spearman rank correlation,  $n = 21$ .

room's atmosphere prior to the installation of the birds or after inoculation (controls at day 1 and day 8). Feedstuffs remained consistently culture-negative.

### 3.8. Molecular typing of *A. fumigatus*

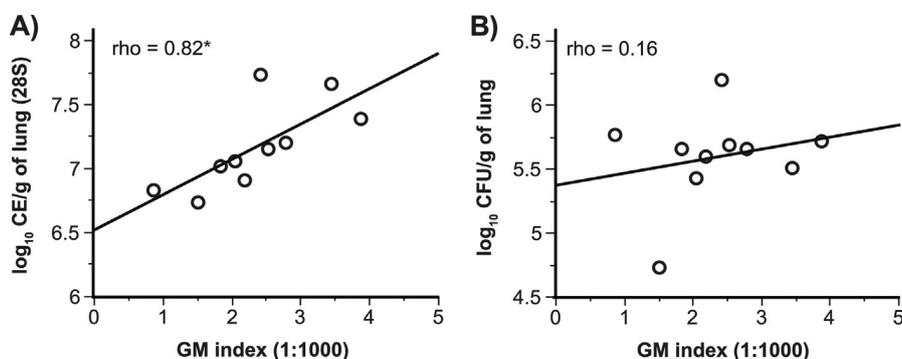
Six *A. fumigatus* isolates collected from the animals presented the same MLVA genotype as that of the reference strain (CBS 144.89) used for the experimental infection.

## 4. Discussion

### 4.1. Experimental model

Many models of avian aspergillosis have already been published testing various bird species, age at inoculation, challenge routes and even the *Aspergillus* species [1]. Both field data [2] and experimental results [26] clearly demonstrate a higher susceptibility of turkeys and quails to *A. fumigatus* infection when compared to chickens, but also intraspecific differences in host responses [4,27] highlighting the necessity to establish models on relevant species or lineages reared for meat or egg production. Different routes of *Aspergillus* inoculation have been tested in turkeys including intrapulmonary [28], intra-air-sac administration [11,21] and finally aerosolization in confined plastic

chambers [3]. With the exception of the latter method, which is difficult to standardize [4], the intratracheal inoculation, which has not been yet tested in turkeys, is the closest to the natural way of infection and only bypasses the upper airways and their putative defenses [1]. We propose herein a relevant model of acute aspergillosis in one-week-old turkeys following intratracheal nebulization of *A. fumigatus* conidia with a MicroSprayer® aerosolizer. The CBS 144.89 strain, administered in this model was isolated from a human case of invasive aspergillosis and has already been used to induce experimental disease in turkeys [11,21] or broiler chickens [4]. Microsatellite [29] or MLVA [25] typing of either clinical or environmental isolates of *A. fumigatus* did not demonstrate any specific association between the observed genotypes and the origin (host, environment versus clinical case). Therefore, we assume [1] that every *A. fumigatus* strain may have the potential to cause disease in susceptible vertebrates. However, in a *Gal-leria mellonella* larvae model, clinical isolates appeared to be more pathogenic than environment ones [30] underlying the need for further investigations in vertebrate models by testing *Aspergillus* genotypes from different origins. The use of Microsprayer® has already been validated in immunosuppressed 6–8 weeks-old Sprague-Dawley rats [16] and immunocompetent Japanese quail [7] to administer precisely calibrated inoculum of *A. fumigatus* in the respiratory tract. The evaluation of the impact of four different inoculum concentrations ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  conidia *per* turkey) allowed us to record mortality following a dose response with values of 0, 0, 30 and 100% respectively. Global parameters such as the evolution of body-weight, the occurrence and severity of clinical signs and the chronology of deaths appeared strictly in concordance with the concentration of conidia administered. Lower mortality rates (respectively 16, 55 and 20%) have been observed in turkeys treated with  $10^8$  conidia in the air sac [21] or submitted to dry aerosol delivering doses of  $5 \times 10^9$  spores *per* animal [3] or in quails receiving  $1.5 \times 10^6$  [9] conidia intratracheally. A similar protocol ( $2 \times 10^7$  conidia administered intratracheally) applied to quails resulted in 55% [31] and 100% mortality [8]. As mentioned by Goetting et al. [7] who compared two modalities of inoculation, the nebulization by Microsprayer® should not be considered to be strictly equivalent to a “classical” intratracheal inoculation using an intravenous catheter



**Fig. 6.** Relationship between GM index and CE (A) or CFU (B) per g of lung from turkeys inoculated with  $10^8$  conidia. \*Significant correlation ( $p = 0.0038$ ) between galactomannan index and CE by the Spearman rank correlation test,  $n = 10$ .

after removing the stylet. Higher mortality (88% versus 33%) has indeed been observed after nebulization compared to the “classical” method after the same inoculum size ( $4.7 \times 10^7$  spores). This could be attributed to differences in dispersion parameters (velocity, droplet size) through the respiratory tract. Similarly to [7], the macroscopic lesions registered in our model were strictly limited to the respiratory apparatus and particularly marked in lungs but much more rarely on caudal air sacs. Extensive parenchyma necrotic damage consecutive with the presence of multifocal typical granulomas [11,13] were seen in the present experiment in all birds of Inoc8 but also in some animals belonging to Inoc7, which have been euthanized at the end of our experiment. We cannot therefore exclude the possibility of delayed mortality (up to 50%) in the latter group if the experiment took place over a longer post-inoculation period [3].

#### 4.2. Biomarker evaluation

The relevance of three putative biomarkers (CFU, galactomannan and real-time PCR) has been concomitantly assessed on lung homogenates for the first time in turkeys. In contrast with already published models in the immunosuppressed rat [15] or Guinea pig [17,18], our primary purpose was not to study the kinetics of fungal development in several target organs but to compare the effect of variable inoculum sizes on these parameters and, in addition, we tried to establish potential correlations to characterize fungal burden states in the lung since it was the sole organ to present extensive macroscopic lesions in our model.

Semi-quantitative culture-based methods used to evaluate the *Aspergillus* load in organs are easy to perform but only detect viable organisms. Furthermore, temporal studies in rodents suggest that these tools may not be accurate when monitoring the development of multicellular filamentous fungi particularly in parenchyma submitted to mechanical homogenization [32] leading to possible underestimation [33,34]. Except for some air sacs samples obtained from turkeys, which died in the first four days following inoculation, no fungus could be detected on the trachea or air sac swabs. This may be explained by fungal clearance, or low sensitivity of the method used on these organs. Although not strictly comparable because the interval post-inoculation differed between dead and euthanized birds, the mean lung numerations, the proportion and the homogeneity of positive results seemed clearly to increase with the inoculum dose. All dead animals presented at least  $5 \times 10^5$  spores/g of lung tissue that was estimated by Richard et al. [3] as the dose necessary to kill about 50% of 3-week-old turkeys exposed to an aerosol of *Aspergillus* conidia. This concentration appeared to be a clear threshold in younger birds unable to mount an effective innate response [4,11,13] in the critical phase of the first days following experimental infection. The detection of viable *Aspergillus* was possible in a high proportion of apparently healthy turkeys, which were euthanized at the end of the experiment, but may persist to least 8 weeks post-exposure [3]. However, fungal load in surviving birds as assessed by

culture seemed to decrease post-inoculation as in other avian [4,9] or mammal models [18,19].

The enzyme immune assay of galactomannan, a specific cell-wall component of fungi is relatively easy to perform and is likely to reflect the progressive increase in mycelium load by tip extension of hyphae [33]. The availability of commercial tests has allowed this polysaccharide component to be measured as a valuable biomarker in the sera of different bird species suffering from aspergillosis [20]. It has been used in field studies on commercial broiler chickens and turkeys [22], but also in mammals [16,34] and turkeys [21] experimental models. As a potential diagnosis tool, contrasting results have been obtained due to variable sensitivity or specificity depending on the species tested. Additional difficulties exist in the definition of an appropriate cut-off value and the stage of the disease [20] but also to the ubiquitous presence of galactomannan in the poultry environment leading to false positives [1]. This last point may partially explain the positive GM values obtained from crude lung homogenates of control birds housed in a clean but not sterile environment. This necessitates work on dilutions to evaluate this parameter. The GM index on 1:100 dilutions were very low in turkeys submitted to the two lowest doses as for non-exposed birds but were much more variable in Inoc7. This may reflect individual differences in host-response efficiency. The high GM index systematically seen in turkeys, which died spontaneously in contrast to almost undetectable values in birds euthanized immediately after receiving variable doses of non-germinated conidia, is consistent with the relationship between the index value and the progression of the fungal disease [17,33]. Furthermore, GM index correlated with the extent of infection as demonstrated by histopathological examination [18].

A real-time quantitative PCR assay has been developed recently in rodent models to measure the fungal load and its progression in different organs in order to evaluate the efficacy of antifungal therapy [15,17–19]. This molecular tool allows the detection of both conidia and hyphae and can be very sensitive and specific but like the GM enzyme immunoassay, it does not indicate viability of the fungus [33]. Gene targets included a monocopy gene like *FKS1* [18] or multicopy genes, in particular the ribosomal DNA genes [15] and internal transcribed spacer. The choice of multicopy genes alone or in the frame of a nested PCR [17] to improve sensitivity may not be ideal for standardization of the method [34]. To our knowledge, qPCR in avian lungs was evaluated for the first time in this study. The real-time PCR signal from a sample of infected tissue was compared with a standard curve composed of conidia added to naive pulmonary parenchyma and we chose to express the fungal biomass in terms of CE [15]. The performances of the monocopy *FKS* gene and the multicopy 28SrDNA amplification in turkey lungs proved to be equivalent although the sensitivity of the latter PCR was logically about  $1 \log_{10}$  CE/g lower. Mathematical extrapolation predicted that the detection limit of this assay was approximately  $10^3$  CE/g of lung, which is quite similar to  $2 \times 10^3$  CE/g (18S) estimated in an haematogenous mouse model of aspergillosis [15], but could further be improved with a nested qPCR [17]. As demonstrated by results on

ethanized birds just after inoculation, the qPCR seemed to be less sensitive than CFU numerations, which may be explained by a low efficiency of extraction of conidia from tissue samples [19,32]. Although no signal could be amplified in Inoc5 and there was no sign of illness, both the proportion of positive samples and mean log<sub>10</sub> CE/g tended to increase with the dose used. Finally, the onset of induced mortality coincided clearly with a peak in fungal burden in Inoc8 as observed in a mouse model [15].

A strong correlation between qPCR results and culture numerations was seen when positive data from all groups were included and the molecular method demonstrated a higher sensitivity. This relationship appears to be stronger when tissues contain hyphae rather than conidia [32]. When data from Inoc8 were compared with similar mammal models [15,18], GM index and qPCR appeared to be more closely correlated with the rise of infection in comparison with CFU values which may partially be explained by the fact that the culture-numerations stagnates or decreases with time [19].

## 5. Conclusion

We have developed a repeatable and standardized model of acute and fatal primary pulmonary pneumonia in the young, immunocompetent turkey. The aerosolizer device used in this experiment allows to deliver precisely a controlled inoculum in the trachea and may be applicable to chemotherapy trials [7]. Housing birds in groups in a controlled environment enables field conditions of production to be mimicked and to evaluate the treatment of aspergillosis by nebulized molecules such as azole compounds [2]. Besides survival, still considered the most reliable measure to assess antifungal therapy, the combination of additional markers of fungal development and dissemination in target organs but also in blood may contribute to a more precocious and more precise detection of treatment efficiency in birds submitted to lethal or sub-lethal challenges but also to the refinement and the reduction objectives of in vivo experimental research [33,34].

## Acknowledgements

EM received a Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) (grant no. 2011/0323) from the Elanco Lilly France. We thank Professor Andrew Ponter for English language revision.

## References

- Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, et al. *Aspergillus fumigatus* in poultry. *Int J Microbiol* 2011;74635:6. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/746356>.
- Kunkle RA. Aspergillosis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, et al., editors. *Diseases of poultry*. 11th ed. Ames, IA, USA: Iowa State University Press; 2003. p. 883–95.
- Richard JL, Cutlip RC, Thurston JR, Songer J. Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxinogenic and nonaflatoxinogenic strains of *Aspergillus flavus*. *Avian Dis* 1981;25(1):53–67.
- Thierry S, Durand B, Melloul E, Tafani J, Ying D, Deville M, et al. Assessment of *Aspergillus fumigatus* pathogenicity in aerosol-challenged chickens (*Gallus gallus*) belonging to two lineages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2013;36(4):379–85.
- Kunkle RA, Rimler RB, Steadham EM. Absence of protection against challenge with *Aspergillus fumigatus* by adoptive transfer of splenocytes from convalescent turkeys. *Avian Dis* 1999;43(4):678–84.
- Atasever A, Gumussoy KS. Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2004;51(1):19–22.
- Goetting V, Lee K, Woods L, Clemons KV, Stevens D, Tell L. Inflammatory marker profiles in an avian experimental model of aspergillosis. *Med Mycol* 2013;51(7):696–703.
- Gümüşsoy KS, Uyanik F, Atasever A, Cam Y. Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in quails and results of treatment with itraconazole. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004;51(1):34–8.
- Tell LA, Clemons KV, Kline Y, Woods L, Kass PH, Martinez M, et al. Efficacy of voriconazole in Japanese quail (*Coturnix japonica*) experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2010;48(2):234–44.
- Van Waeyenberghe L, Fischer D, Coenye T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F, et al. Susceptibility of adult pigeons and hybrid falcons to experimental aspergillosis. *Avian Pathol* 2012;41(6):536–7.
- Féménia F, Fontaine JJ, Lair-Fulleriger S, Berkova N, Huet D, Towanou N, et al. Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathol* 2007;36(3):213–9.
- Beernaert LA, Pasmans F, Haesebrouck F, Martel A. Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathol* 2008;37(5):545–9.
- Kunkle RA, Rimler RB. Pathology of acute aspergillosis in turkeys. *Avian Dis* 1996;40(4):875–86.
- Patterson TF. Clinical utility and development of biomarkers in invasive aspergillosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2011;122:174–83.
- Bowman JC, Abruzzo GK, Anderson JW, Flattery AM, Gill CJ, Pikounis VB, et al. Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(12):3474–81.
- Chandenier J, Bernard S, Montharu J, Bailly E, Fetissov F, de Monte M, et al. The utility of a nebulized intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 2009;52(3):239–45.
- Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, Hrnčirova K, Pospisilova S, Mayer J, et al. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)-β-D-glucan detection. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):602–8.
- Vallor AC, Kirkpatrick WR, Najvar LK, Bocanegra R, Kinney MC, Fothergill AW, et al. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(7):2593–8.
- Zhao Y, Park S, Warn P, Shrief R, Harrison E, Perlin D. Detection of *Aspergillus fumigatus* in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1378–83.
- Cray C, Watson T, Rodriguez M, Arheart KL. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. *J Zoo Wildl Med* 2009;40(1):64–70.
- Le Loc'h G, Arné P, Bourgerol C, Risi E, Pericard J, Quinton J, et al. Detection of circulating serum galactomannan for the diagnosis of avian aspergillosis. 16th Congr Int Soc Hum Anim Mycol 2006.
- França M, Cray C, Shivaprasad HL. Serologic testing for aspergillosis in commercial broiler chickens and turkeys. *Avian Dis* 2012;56(1):160–4.
- Costa C, Vidaud D, Olivi M, Bart-Delabesse E, Vidaud M, Bretagne S. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J Microbiol Methods* 2001;44:263–9.
- Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(2):844–6.
- Thierry S, Wang D, Arné P, Deville M, De Bruin B, Nieguitsila A, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiol* 2010;10(315):1–8. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-315>.
- Ghori HM, Edgar SA. Comparative susceptibility of chickens, turkeys and Coturnix quail to aspergillosis. *Poult Sci* 1973;52(6):2311–5.
- Kunkle RA, Sacco RE. Susceptibility of convalescent turkeys to pulmonary aspergillosis. *Avian Dis* 1998;42(4):787–90.

- [28] Perelman B, Smith B, Bronstein D, Gur-Lavie A, Kuttin ES. Use of azole compounds for the treatment of experimental aspergillosis in turkeys. *Avian Pathol* 1992;21(4):591–9.
- [29] Van Waeyenberghe L, Pasmans F, Beernaert LA, Haesebrouck F, Verammen F, Verstappen F, et al. Microsatellite typing of avian clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathol* 2011;40(1):73–7.
- [30] Alshareef F, Robson GD. Genetic and virulence variation in an environmental population of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 2014;160(4):742–51.
- [31] Chaudhary SK, Sadana JR. Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Clinical signs and haematological changes. *Mycopathologia* 1988;102(3):179–84.
- [32] Sheppard DC, Marr KA, Fredricks DN, Chiang LY, Doedt T, Filler SG. Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(4):376–80.
- [33] Clemons KV, Stevens DA. Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load. *Med Mycol* 2009;47(Suppl. 1):S132–7.
- [34] Seyedmousavi S, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Assessment of efficacy of antifungals in experimental models of invasive aspergillosis in an era of emerging resistance: the value of real-time quantitative PCR. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11(5):486–93.



### III. Conclusions sur le développement du modèle expérimental

---

Nous avons développé un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez le dindonneau immunocompétent, à l'aide d'un dispositif d'aérosolisation intratrachéale, le Microsprayer IA-1B®. Ce dispositif permet de délivrer un inoculum calibré directement dans la trachée des oiseaux. L'administration de différentes doses d'inoculum ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  conidies) nous a permis d'enregistrer des taux de mortalité de 0, 0, 30 et 100 % respectivement chez des dindonneaux mâles âgés d'une semaine. Les paramètres généraux du suivi de l'infection, tels que l'évolution du poids, l'apparition et l'évolution des signes cliniques et la mortalité sont bien corrélés à la dose de l'inoculum. Des lésions macroscopiques typiques de l'aspergillose (granulomes) ont été observées au niveau des poumons et des sacs aériens caudaux des dindonneaux du lot inoculé avec  $10^8$  conidies, ainsi que chez certains oiseaux du lot inoculé avec  $10^7$  conidies. La présence de telles lésions dans le lot Inoc7 suggère que la mortalité aurait pu être retardée, après les 8 jours post-inoculation, si l'expérience avait été poursuivie.

La pertinence de l'utilisation de deux biomarqueurs (ADN fongique et galactomannane) a été évaluée pour la première fois, en comparaison avec la culture fongique (UFC), sur des homogénats de poumons de dindes. A l'exception des échantillons de sacs aériens obtenus à partir des dindes qui sont mortes dans les quatre premiers jours suivants l'inoculation, aucun champignon n'a été détecté dans les prélèvements de la trachée ou des sacs aériens, ce qui peut être expliqué par l'élimination du champignon. Le nombre d'UFC moyen détecté dans les poumons semble clairement augmenter avec la dose d'inoculum. De plus, tous les animaux morts spontanément présentaient au moins  $5.10^5$  UFC/g de poumon, ce qui correspond au seuil établi par Richard *et al.* (1981) comme étant la dose nécessaire pour tuer environ 50 % des dindes âgées de 3 semaines exposées à une aérolisation de conidies d'*Aspergillus*.

Les index GM détectés dans les homogénats de poumons pures sont tous positifs, même chez les individus témoins non inoculés avec *Aspergillus*. Une dilution 1:100 a permis la détection d'index GM très bas chez les oiseaux des lots Inoc5, Inoc6 et chez les témoins. A l'inverse, les index GM sont très élevés pour le lot Inoc8 et variables pour les oiseaux du lot Inoc7.

La détection de l'ADN fongique dans les poumons par qPCR n'avait jamais été réalisée chez les oiseaux. L'amplification des cibles simple-copie *FKS* et multi-copies

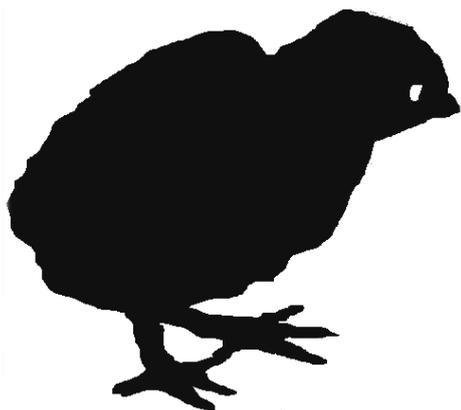
28SrDNA d'*A. fumigatus* dans les poumons se sont montrées équivalentes, bien que la sensibilité de la PCR 28S soit environ  $1\log_{10}$  de EC/g supérieure. Les moyennes d'EC/g de poumon ont tendance à augmenter avec la dose de l'inoculum.

Notre modèle d'infection pulmonaire aiguë et fatale chez le dindonneau immunocompétent est répétable et standardisé. De plus, l'absence d'épiglotte chez l'oiseau facilite d'un point de vue technique l'inoculation. L'hébergement des oiseaux en groupe, dans un environnement contrôlé, permet de reproduire les conditions de terrain et d'évaluer les traitements antifongiques par nébulisation de molécules, telles que les composés azolés, dans des conditions proches des élevages aviaires. En dehors de la survie, qui est considérée comme le paramètre de référence pour évaluer les traitements thérapeutiques, la combinaison de marqueurs supplémentaires permettant la quantification de la masse fongique dans les organes cibles pourrait contribuer à une évaluation plus précoce et plus précise de l'effet d'une molécule à visée thérapeutique.

# Evaluation de l'efficacité de l'énilconazole

## Chapitre

# 2





## I. Introduction

---

Aucune spécialité disposant d'une AMM n'est actuellement disponible pour le contrôle de l'aspergillose dans les élevages avicoles. Ces derniers doivent maîtriser le risque aspergillaire en appliquant des mesures préventives visant à réduire le développement du champignon dans l'environnement des animaux (ventilation adéquate des locaux, entretien des litières et qualité du stockage, décontaminations régulières). Des désinfectants à base d'énilconazole sont employés pour décontaminer l'environnement (gamme Clinafarm®) en l'absence des animaux. Par ailleurs, une formulation à base d'énilconazole (Imavéral®) et disposant d'une AMM pour le traitement topique des dermatophytoses (du chien, du chat, des bovins et du cheval), est également employée de façon empirique en présence des oiseaux pour réduire la morbidité et la mortalité lorsque une aspergillose sévère est déclarée dans un élevage avicole. Le produit est alors dilué dans de l'eau puis aérosolisé dans le bâtiment, à l'aide d'un nébuliseur qui va créer un brouillard de gouttelettes fines au niveau des oiseaux. Le traitement est généralement appliqué une à deux fois par jour, pendant trois jours consécutifs, à la dose de 20 mg d'énilconazole / m<sup>3</sup>. L'efficacité de la molécule dans ces conditions d'utilisation n'a jamais été évaluée. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes fixés comme objectif d'évaluer l'efficacité de l'énilconazole chez des dindonneaux expérimentalement infectés par *A. fumigatus*. Deux expérimentations successives ont été nécessaires pour atteindre cet objectif.

Lors de la première expérimentation, l'administration du principe actif a été réalisée en conditions de confinement : les dindonneaux ont été placés dans une chambre d'inhalation. La dose testée était de 20 mg/m<sup>3</sup> administrée une fois par jour pendant trois jours consécutifs. Lors de la seconde expérimentation, le traitement a été réalisé directement dans la salle d'hébergement des oiseaux à l'aide d'un atomiseur comme ceux utilisés dans les élevages avicoles. La technique employée se rapproche alors des conditions d'utilisation de l'énilconazole en élevage, et permet d'intégrer l'effet potentiel de l'énilconazole sur la réduction du niveau d'exposition au champignon par destruction de celui-ci dans l'environnement. La dose reçue par les oiseaux dans cette expérimentation a été doublée par rapport à la première expérimentation : 20 mg/m<sup>3</sup> deux fois par jour pendant trois jours consécutifs.

Lorsque la nébulisation d'énilconazole est mise en place pour juguler un épisode d'aspergillose, l'ensemble des animaux est traité en même temps mais il est possible que tous

les oiseaux ne soient pas au même stade de développement de l'infection (niveau d'exposition ou moment de la contamination différents). Afin de tester l'efficacité de l'énilconazole sur une population hétérogène (quant au développement de l'infection fongique), nous avons procédé, dans la première expérimentation, à des inoculations expérimentales séquentielles (inoculés soit 48 h soit 24 h avant le début du traitement ou 7 h après la première administration d'énilconazole) sur des lots de dindonneaux qui ont par contre tous été traités les mêmes jours par l'antifongique.

Les pesées régulières, l'observation du comportement et des signes cliniques ont permis le suivi de l'infection, complété par la culture fongique à partir des poumons et la quantification de la masse fongique à l'aide des biomarqueurs validés dans la première partie de notre étude, c'est à dire l'utilisation de la PCR en temps réel (basée sur l'amplification de la cible 28S) pour la détection d'ADN fongique, et le test ELISA pour la détection et la quantification du galactomannane dans le parenchyme pulmonaire.

## II. Matériels et méthodes

---

Toutes les expérimentations animales réalisées au cours de la thèse ont été approuvées par le comité d'éthique de l'ANSES / ENVA / UPEC (n°09/07/13-5B).

Deux expérimentations successives ont été réalisées pour évaluer l'efficacité de l'énilconazole sur notre modèle d'aspergillose aiguë du dindonneau. Le traitement énilconazole a été réalisé par nébulisation dans une chambre d'inhalation dans la première expérimentation (ExpA) et directement dans la salle d'hébergement des oiseaux pour la seconde expérimentation (ExpB). Dans ExpA, seuls les oiseaux ont été nébulisés, tandis que dans ExpB, les oiseaux ainsi que leur environnement (litière, sol, murs) ont été traités.

### II. a. Souche d'*Aspergillus fumigatus*, culture mycologique et préparation de l'inoculum

La souche d'*Aspergillus fumigatus* CBS 144.89 a été utilisée pour toutes les expérimentations. Cette souche a été initialement isolée en France chez un patient humain souffrant d'une aspergillose invasive et obtenue auprès du Centraalbureau voor Schimmelculture (CBS), Utrecht, Pays Bas.

Toutes les cultures mycologiques ont été réalisées sur des boîtes de Petri contenant un milieu malt agar (Merck, Darmstadt, Germany) additionné de chloramphénicol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à la concentration finale de 0,5 g/L et incubées à 37°C jusqu'à 10 jours consécutifs.

Pour préparer l'inoculum, la souche CBS 144.89 a été mise en culture pendant 10 jours à 37°C. Les conidies ont été récupérées par lavages des boîtes de Petri avec du tampon phosphate salin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (PBS) contenant 0,01 % (vol/vol) de Tween 20 (PBST). La suspension de conidies est ensuite centrifugée à 3500 g pendant 30 minutes afin de concentrer les spores, lesquelles sont ensuite diluées dans du PBST puis comptées à l'aide d'une cellule de Malassez afin d'ajuster la concentration de la suspension finale.

## II. b. Animaux et hébergement en animalerie

Un contrôle qualité a été effectué à l'arrivée des dindonneaux afin de vérifier leur état sanitaire (examen des pattes, des yeux, des narines, de l'ombilic, évaluation de la tonicité et de l'activité générale). Des dindonneaux mâles (Hybrid diamond white medium) conventionnels âgés d'un jour et pesant en moyenne entre 65 à 70 g ont été utilisés (Le Sayec, Caudan, France). Les oiseaux ont été confinés dans une animalerie de niveau de sécurité A3 du CRBM (Centre de Recherche BioMédicale), sur le site de l'ENVA (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort). Les différents groupes de dindonneaux ont été hébergés dans des boxes de 2 m<sup>2</sup> (ExpA = environ 20 oiseaux par boxes) ou dans des salles (zones de 4,5 m<sup>2</sup> délimitées par des gardes) (ExpB= environ 40 oiseaux par salle) sur une litière de copeaux de bois (Copo-Box®, Sicsa, France) (**figure 37**). Eau fraîche potable et aliments de démarrage pour volaille (Versele-Laga, Belgique) étaient fournis à volonté.



**Figure 37.** Hébergement des dindonneaux dans des boxes de 2 m<sup>2</sup> (A) ou dans des enclos de 4,5 m<sup>2</sup> (B) et identification des oiseaux par des bagues alaires (C)

Durant les deux premiers jours d'adaptation des dindonneaux, la lumière artificielle (néons) est restée allumée en continue afin de promouvoir l'activité des oiseaux et un accès

facilité à l'eau et à l'aliment. Par la suite, la photopériode (06:00-22:00) et la température ambiante (19-21°C) ont été fixées et contrôlées pour la durée de l'expérimentation. Des lampes infrarouges (2 à 4 ampoules de 250 W), situées à 70 cm au dessus du sol, ont été systématiquement placées dans les boxes afin de fournir une source de chaleur localisée. Chaque oiseau a été identifié individuellement à l'aide de bagues alaires en aluminium (Ferme de Manon, France) (**figure 37**).

### II. c. Inoculation

Dans les deux expérimentations, les oiseaux ont tout d'abord été anesthésiés par inhalation d'isoflurane à 5 % (Aerrane, Baxter) dans une chambre d'inhalation. Puis les dindonneaux ont été inoculés, sous contrôle visuel, par aérosolisation intratrachéale de 100 µL d'une suspension d'*A. fumigatus* concentrée à 10<sup>8</sup> ou 10<sup>9</sup> conidies/mL, respectivement pour ExpB et ExpA, à l'aide d'un MicroSprayer® (Microsprayer IA-1B®, Penn Century, Philadelphia, PA, USA) (**figure 38**). Les animaux témoins ont reçu un volume identique de PBST dans les mêmes conditions expérimentales.



**Figure 38.** Inoculation par aérosolisation dans la trachée à l'aide d'un atomiseur, le MicroSprayer IA-1B®, après anesthésie du dindonneau

## II. d. Traitements antifongiques

### II. d. 1) Traitement par l'énilconazole

**ExpA :** Les animaux ont été placés dans une chambre d'inhalation de 0,05 m<sup>3</sup> (boîte en plastique) dans laquelle est fixé l'embout d'un nébuliseur médical (Nébuliseur OMRON C28, OMRON, France) qui permet de délivrer des gouttelettes de 0,3 à 0,5 µm de diamètre (**figure 39**). Un volume de 5 mL d'une solution d'imavéral® (Imavéral®, Lilly France) diluée 500 fois dans de l'eau minérale (Cristaline®) à température ambiante (soit 1 mg d'énilconazole *in toto*) a été nébulisé pendant 15 min dans la chambre d'inhalation, en présence des dindonneaux, ce qui correspond à une concentration finale délivrée de 20 mg/m<sup>3</sup>. Le traitement a été administré à heure fixe une fois par jour pendant 3 jours consécutifs. Les animaux témoins (non-traités) ont été placés dans une seconde chambre d'inhalation (0,05 m<sup>3</sup>) installée dans une salle différente, et ont été nébulisés dans les mêmes conditions avec 5 mL d'eau minérale, à température ambiante, pendant 15 min à l'aide d'un second nébuliseur (Nébuliseur OMRON C29, OMRON, France).



**Figure 39.** Nébulisation du traitement à l'aide d'un nébuliseur OMRON placé dans une chambre d'inhalation

**ExpB :** Les individus traités et non-traités ont été maintenus dans deux salles séparées de 18 m<sup>2</sup> (volume de 45 m<sup>3</sup>), dans lesquelles une zone de 4,5 m<sup>2</sup> (volume de 10 m<sup>3</sup>) a été délimitée

pour l'hébergement des dindonneaux. Les animaux ont été traités directement dans la salle où ils étaient hébergés à l'aide d'un atomiseur (Atomiseur ATOMIST 1026 BP) placé de manière à distribuer de façon homogène la molécule antifongique sur l'ensemble du périmètre délimité pour les oiseaux. Cet atomiseur à froid de solutions en bases aqueuse ou huileuse peut être utilisé notamment en élevage ou dans un contexte hospitalier. La pulvérisation génère la formation d'un brouillard humide composé de gouttelettes fines de 15 à 40 micromètres. Lors du traitement antifongique, les abreuvoirs et les mangeoires ont été retirés de la salle avant le traitement (**figure 40**). La dose d'énilconazole employée a été fixée à 20 mg/m<sup>3</sup>, ce qui correspond à l'aérosolisation d'un volume de 2 L d'une solution d'imavéral® diluée 450 fois dans de l'eau minérale (Cristaline®), à température ambiante, en 15 minutes (soit 220 mg d'énilconazole *in toto*). Le traitement a été réalisé deux fois par jour (09:00 et 19:00) pendant 3 jours consécutifs. Les animaux témoins (non-traités) ont subi simultanément une aérosolisation de 2 L d'eau minérale à l'aide d'un second atomiseur ATOMIST, dans les mêmes conditions que les animaux traités. La ventilation des salles a été stoppée juste avant la mise en route des atomiseurs, pour une durée de 30 min au total, soit durant toute la durée de l'aérosolisation (15 min maximum), puis après l'arrêt des atomiseurs (15 min minimum).



**Figure 40.** Dispositif de nébulisation de l'énilconazole à l'aide d'un atomiseur ATOMIST placé dans la salle d'hébergement des dindonneaux

## II. d. 2) Traitement par l'itraconazole

Dans ExpB, un lot distinct de dindonneaux a été traité avec de l'itraconazole par voie orale (Itrafungol®, Lilly France) à la dose de 10 mg/kg, une fois par jour, pendant 7 jours consécutifs (Gümüşsoy *et al.*, 2004). Des individus témoins ont reçu, dans les mêmes conditions, une administration *per os* d'un volume identique d'eau minérale (Cristaline®).

## II. e. Protocole expérimental et lots

### II. e. 1) ExpA

Tous les lots de cette expérimentation ont été traités (énilconazole *versus* eau) simultanément sur 3 jours consécutifs (T0, T1 et T2). Par contre, le moment de l'inoculation des conidies d'*A. fumigatus* (*versus* PBST) par rapport au démarrage du traitement antifongique a différé en fonction des groupes d'oiseaux selon la séquence chronologique suivante : 48 h, 24 h avant le premier traitement (T0), et 7 h après T0 (**figure 41**). Soixante-douze dindonneaux ont été répartis en 4 lots, dont 2 inoculés avec le champignon :

- 1 lot (**Af/énilconazole**, n = 24) inoculé avec  $10^8$  conidies d'*A. fumigatus* puis traité avec de l'énilconazole.
- 1 lot (**Af/H<sub>2</sub>O**, n = 27) inoculé avec  $10^8$  conidies d'*A. fumigatus* puis traité avec de l'eau (témoin du traitement).
- 1 lot (**PBST/énilconazole**, n = 6) inoculé avec du PBST (contrôle négatif) puis traité avec de l'énilconazole.
- 1 lot (**PBST/H<sub>2</sub>O**, n = 6) inoculé avec du PBST (contrôle négatif) puis traité avec de l'eau.

Chacun des 4 lots a été divisé en 3 groupes d'oiseaux inoculés 48 h ou 24 h avant T0, ou bien 7 h après T0 (G<sub>-48</sub>, G<sub>-24</sub> et G<sub>+7</sub>) (**figure 41**).

EXP A

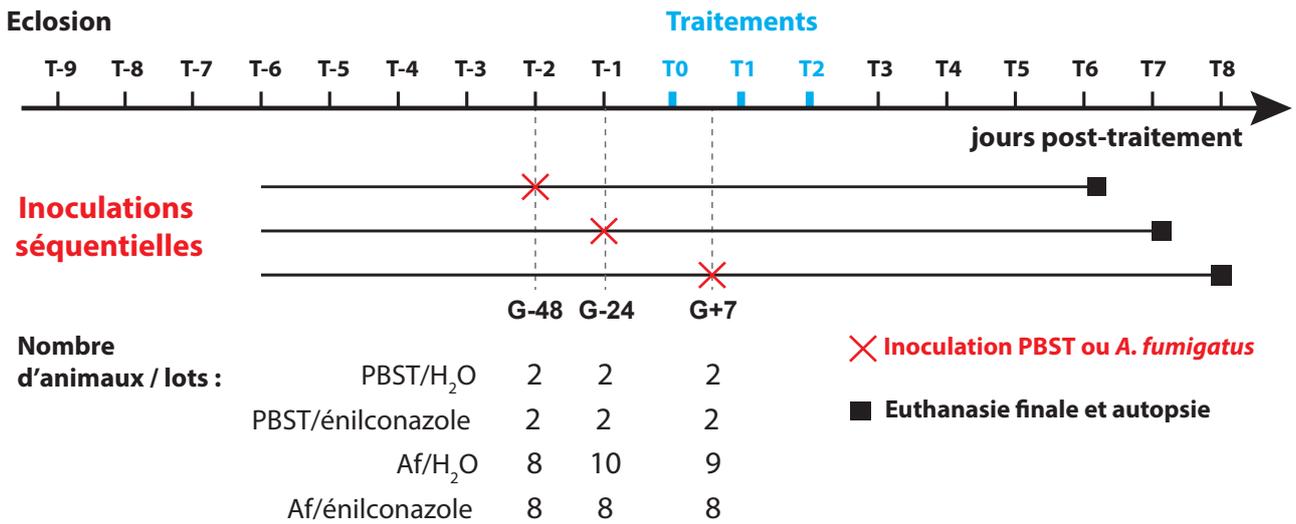


Figure 41. Chronogramme de l'expérience ExpA et définition des différents lots expérimentaux en fonction des séquences d'inoculations (10<sup>8</sup> conidies) et de traitements

II. e. 2) ExpB

Tous les dindonneaux ont été inoculés au même temps (J0) puis ont commencé à être traités 24 h après (J1, J2 et J3) (figure 42). Quatre-vingt-quatre dindonneaux ont été répartis en 6 lots : 3 lots inoculés avec un inoculum de 10<sup>7</sup> conidies d'*A. fumigatus* puis traités avec de l'eau (Af/H<sub>2</sub>O, n = 21), de l'énilconazole (Af/énilconazole, n = 21) ou de l'itraconazole (Af/itraconazole, n = 21) et 3 lots témoins inoculés avec du PBST puis traités avec de l'eau (PBST/H<sub>2</sub>O, n=7), de l'énilconazole (PBST/énilconazole, n = 7) ou de l'itraconazole (PBST/itraconazole, n = 7) (figure 42).

EXP B

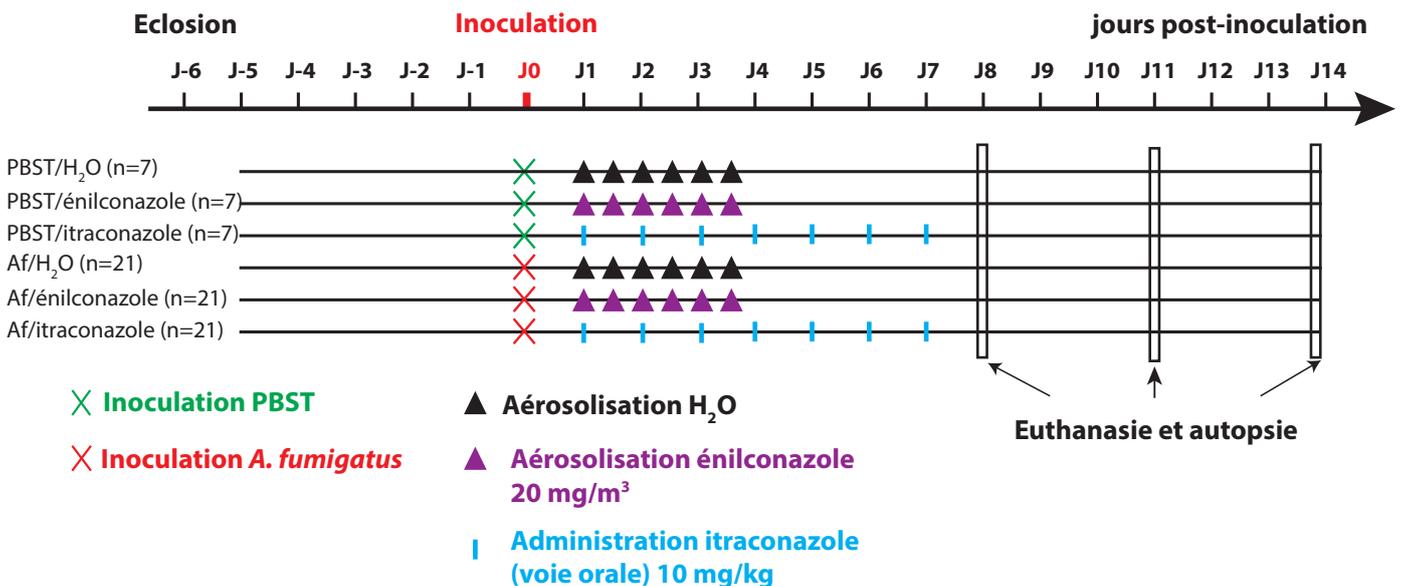


Figure 42. Chronogramme de l'expérience ExpB et définition des différents lots expérimentaux en fonction des séquences d'inoculations (10<sup>7</sup> conidies) et de traitements

## II. f. Suivi

Les dindonneaux ont été pesés tous les jours à partir de leur arrivée sur le site et les signes cliniques ont été enregistrés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation. Les signes cliniques recherchés étaient une dégradation du Gain Moyen Quotidien (GMQ), des difficultés respiratoires (dyspnée d'effort plus ou moins importante suite à une stimulation, ou dyspnée continue) et/ou de locomotion associées ou non à des postures anormales (ailes tombantes, plumages ébouriffés, mouvements de tête anormaux). Un système de scores a été mis au point au cours de la seconde expérimentation (ExpB) (**tableau 2**).

**Tableau 2.** Scores des signes cliniques utilisés dans exp B pour évaluer la gravité des signes cliniques

Signes cliniques \ Scoring	0	1	2	3
Gain de poids par rapport à la veille	↗	↘ 0-5%	↘ 5-10%	↘ >10%
Difficultés respiratoires	normal	Dyspnée d'effort +	Dyspnée d'effort ++	Dyspnée continue +++
Locomotion et comportement	normal	Locomotion normale mais mouvements de tête	Locomotion réduite et/ou mouvements de tête	Locomotion nulle, l'animal ne se lève plus

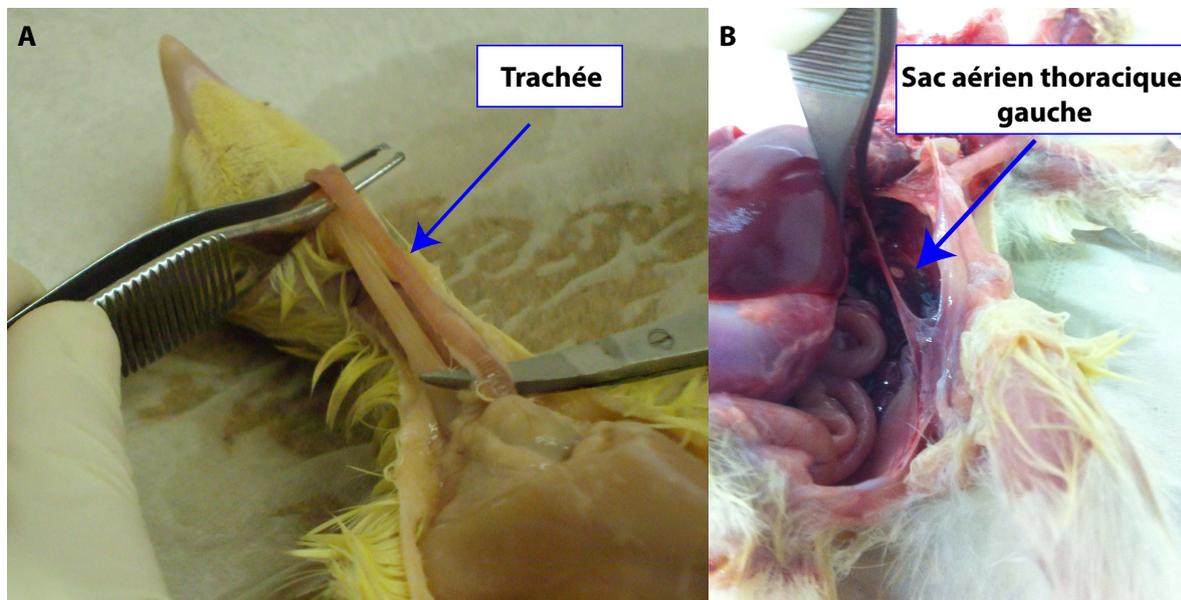
## II. g. Euthanasie

Tous les animaux qui ont survécu ont été euthanasiés à la fin de l'expérimentation par injection intraveineuse de T61®. Les animaux présentant des signes cliniques sévères d'aspergillose (dyspnée continue, locomotion nulle), ou présentant un score des signes cliniques supérieur ou égal à 4 (ExpB), ont été euthanasiés par compassion.

## II. h. Autopsie et prélèvements

Sur chacun des animaux morts spontanément ou euthanasiés, une autopsie a été pratiquée dans des conditions stériles, sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) équipé d'un flux laminaire. Des écouvillonnages de la trachée, incisée sur toute la longueur, et du sac aérien thoracique gauche ont systématiquement été réalisés à l'aide d'écouvillons stériles

(figure 43). Les poumons gauche et droit ont été prélevés puis sectionnés chacun en deux moitiés dont une pour la recherche de biomarqueurs aspergillaire (dosage du galactomannane et PCR quantitative du gène 28S d'*A. fumigatus*) et la culture fongique et l'autre conservée dans une solution de formaldéhyde.



**Figure 43.** Ecouvillonnage au niveau de la trachée (A) et au niveau du sac aérien thoracique gauche (B)

## II. i. Evaluation de la biomasse fongique dans les poumons et dans les organes respiratoires

### II. i. 1) Culture fongique

Les moitiés des poumons (droit et gauche) ont été pesées et broyées à l'aide d'un homogénéiseur de tissu (Bio-Gen PRO200 Homogenizer, Pro Scientific, Oxford CT, Etats-Unis) dans 5 mL de PBS contenant 0,01 % (vol/vol) de Tween 20. Un volume de 500  $\mu$ L de l'homogénat primaire de poumon a été immédiatement utilisé pour la réalisation de dilutions décimales sérielles (1/10, 1/100 et 1/1000) servant à la culture fongique. Le reste de l'homogénat primaire a été congelé, sous forme d'aliquots, conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour le dosage ultérieur du galactomannane et la réalisation de la PCR quantitative (qPCR).

Les écouvillons de la trachée et des sacs aériens, ainsi que 100  $\mu$ L d'homogénat primaire de poumon (pur et dilué à 1/10, 1/100 et 1/1000) ont été déposés, ou frottés dans le cas des écouvillons, sur boîte de Petri malt agar + chloramphénicol pour la culture fongique et

mis à incuber à 37°C. Les colonies d'*A. fumigatus* (UFC) ont ensuite été comptées à 24 h et 48 h d'incubation.

### II. i. 2) PCR quantitative

Une seconde étape d'homogénéisation a été réalisée sur les homogénats primaires de poumons. Un volume de 500 µL d'homogénat de poumon (décongelé à température ambiante) a été transféré dans des tubes à vis de 2 mL contenant des billes en verre stériles de 0,5 mm de diamètre (Biospec, Bartlesville, Etats-Unis), puis les tubes ont été placés dans un homogénéiseur MagNa Lyser (Roche, Meylan, France) pour 3 séries d'agitation de 30 s à 3500 rpm, séparées par une incubation dans de la glace pilée. Les homogénats secondaires ont été récupérés par centrifugation à 800 g pendant 5 min à 4°C. Un volume de 100 µL de cet homogénat secondaire a été utilisé pour l'extraction d'ADN, le reste étant congelé à -20°C. L'extraction d'ADN a été réalisée à partir du kit d'extraction QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtabœuf, France), en suivant les recommandations du fournisseur, avec un volume final d'élution de 100 µL. Les ADN obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

La quantification de l'ADN d'*A. fumigatus* a été obtenue à l'aide d'une PCR quantitative en chimie TaqMan ciblant le gène multi-copie de l'ARN ribosomal 28S. Les séquences des amorces utilisées ont été décrites par Challier *et al.* (2004) : amorce sens 28S-466 (5'-CTC GGA ATG TAT CAC CTC TCG G-3'), amorce anti-sens 28S-533 (5'-TCC TCG GTC CAG GCA GG-3') et la sonde d'hybridation 28S (5'-6-FAM-TGT CTT ATA GCC GAG GGT GCA ATG CG- TAMRA-3'). Chaque mélange réactionnel consistait en 5 µL d'ADN à tester, 12,5 µL de LightCycler® 480 Probes Master 2x (Roche, Meylan, France), 0,5 µL de chaque amorce (500 nM final pour chaque amorce), 0,5 µL de sonde (250 nM final), et 6 µL d'eau stérile. Le protocole d'amplification était le suivant : 50°C pendant 2 min, puis 95°C pendant 10 min, suivi de 50 cycles comprenant une étape à 95°C pendant 15 s et une étape à 60°C pendant 60 s. Tous les échantillons d'ADN ont été analysés deux fois avec l'appareil LightCycler® 480 detection system (Roche, Meylan, France).

Une gamme étalon a été réalisée à partir d'ADN extraits de poumons de dindonneaux non-infectés inoculés avec des doses croissantes contrôlées de conidies d'*A. fumigatus* (de 10<sup>2</sup> à 10<sup>8</sup> conidies) afin d'évaluer la quantité d'ADN d'*Aspergillus* dans les poumons par le calcul d'« équivalent conidie » (EC) (Bowman *et al.*, 2001).

### II. i. 3) Dosage du galactomannane (GM)

Pour le dosage du galactomannane, 500  $\mu\text{L}$  d'homogénat primaire de poumon ont été centrifugés à 2 300 g pendant 5 min puis le surnageant a été récupéré et transféré dans un nouveau tube. Un volume de 500  $\mu\text{L}$  de surnageant de poumon a été utilisé pour la réalisation d'un prétraitement dans 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'EDTA, à la chaleur (6 min à 120 °C). Ce prétraitement permet de dissocier les complexes immuns et de précipiter les protéines susceptibles d'interférer avec le test. Par la suite, 300  $\mu\text{L}$  de l'échantillon prétraité a ensuite été utilisé pour le dosage du galactomannane avec le kit Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories), selon les recommandations du fournisseur.

Le seuil minimum et maximum de la densité optique (DO) détectée par le lecteur ELISA (Biorad PR1300) varie entre 0 and 3 Abs. Une dilution 1/1000 (ExpA) ou 1/2000 (expB) des surnageants de poumons a été réalisée pour tous les lots, afin d'éviter les problèmes de saturation du signal détecté dans les homogénats de poumons de dindonneaux purs. L'index GM a été calculé en divisant la DO de l'échantillon par la DO moyenne obtenue pour la valeur seuil (sérum de contrôle pour valeur seuil fourni dans le kit). L'index GM, mesuré dans les prélèvements humains (sérum et LBA), est considéré comme positif lorsque sa valeur est supérieure à 0,5. La valeur seuil de détection est 0,2.

### II. j. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel JMP 10.0. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ . Un test du log-rang a été utilisé pour l'analyse de la survie des oiseaux (test Kaplan-Meier). Les moyennes des paramètres UFC, EC et index GM, ainsi que l'erreur standard de ces moyennes ont été calculées pour chacun des lots (moyenne  $\pm$  erreur standard). Dans le calcul des moyennes et les tests statistiques, une valeur seuil de détection a été attribuée aux individus pour lesquels aucune détection n'a été possible par culture fongique ou qPCR. Des analyses de variances multivariées (MANOVA) ont été réalisées pour comparer les données de poids, ainsi que les scores des signes cliniques au cours du temps. Un test non-paramétrique d'analyse de variance univariée, le test de Wilcoxon, a été utilisé pour comparer les différents paramètres de suivi en fonction des lots et des groupes (inoculation, traitement). Des corrélations de Spearman et des régressions (linéaires et multiples) ont également été réalisées pour effectuer des comparaisons multiples

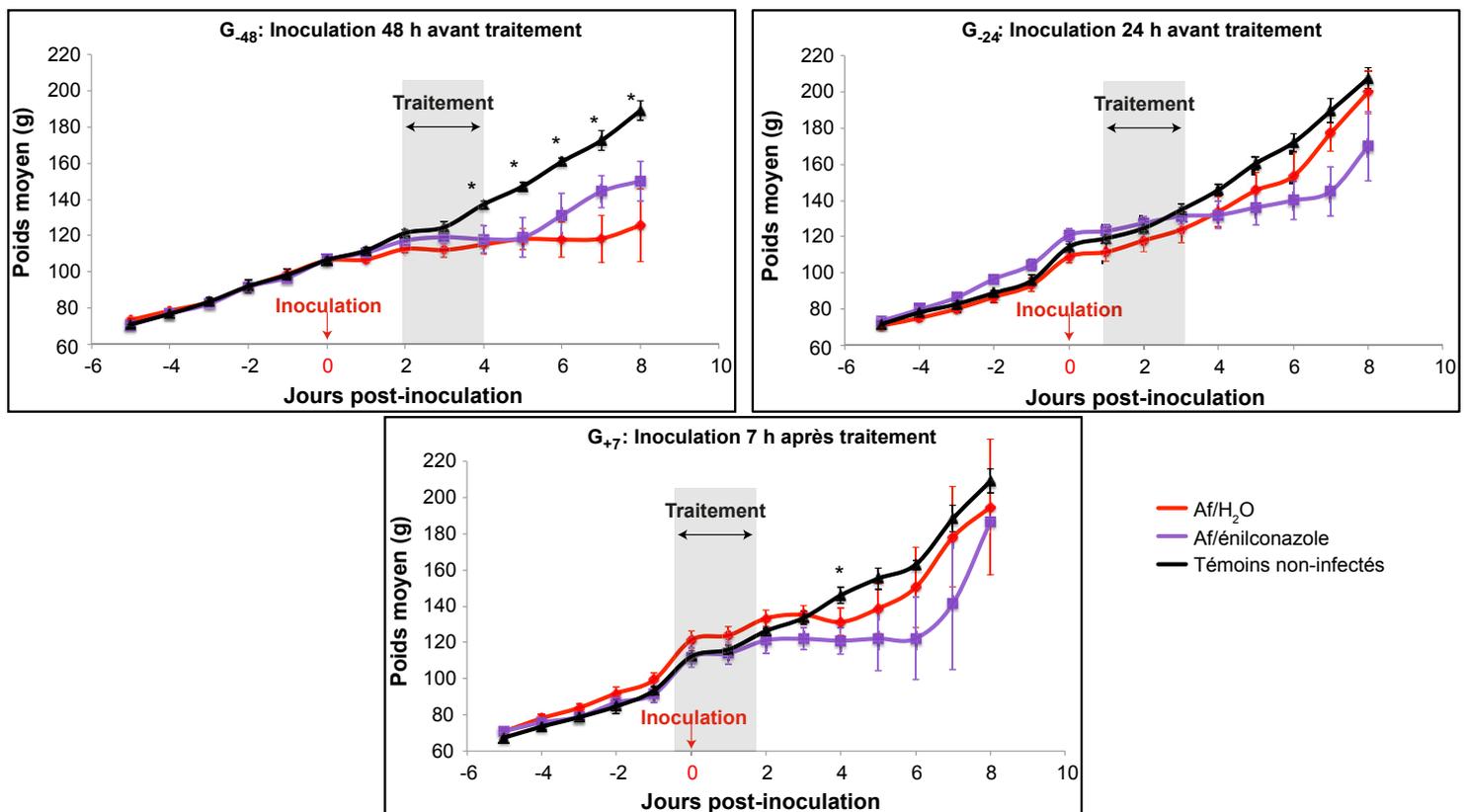
intra-lots et inter-lots entre les résultats de culture fongique ( $\log_{10}$  UFC/g de poumon) et les biomarqueurs ( $\log_{10}$  EC/g de poumon et index GM).

### III. Résultats

#### III. a. Résultats de l'expérience ExpA

##### III. a. 1) Evolution du poids vif

Les courbes de poids moyen de chacun des lots subissent une légère inflexion juste après inoculation (J0), quelque soit le groupe d'inoculation (G<sub>-48</sub>, G<sub>-24</sub> ou G<sub>+7</sub>). Puis après inoculation, la croissance des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole présentent une légère diminution par rapport à la courbe de poids des lots témoins non-infectés (lots PBST/H<sub>2</sub>O et PBST/énilconazole regroupés). La même tendance est observée indépendamment du délai entre inoculation et traitement (48 h ou 24 h avant, ou 7 h après l'initiation du traitement). Entre J4 et J8 post-inoculation (pi), le poids moyen des lots infectés (Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole) du groupe G<sub>-48</sub> s'avère significativement plus faible que celui des témoins non-infectés (manova, respectivement p = 0,0123 et p = 0,0376) (**figure 44**).



**Figure 44.** Evolution du poids des dindonneaux au cours du temps en fonction du moment d'inoculation ( $10^8$  conidies) par rapport au début du traitement (ExpA)

\* différence significative entre lots témoins et lots inoculés avec *Aspergillus*

### III. a. 2) Signes cliniques et mortalité

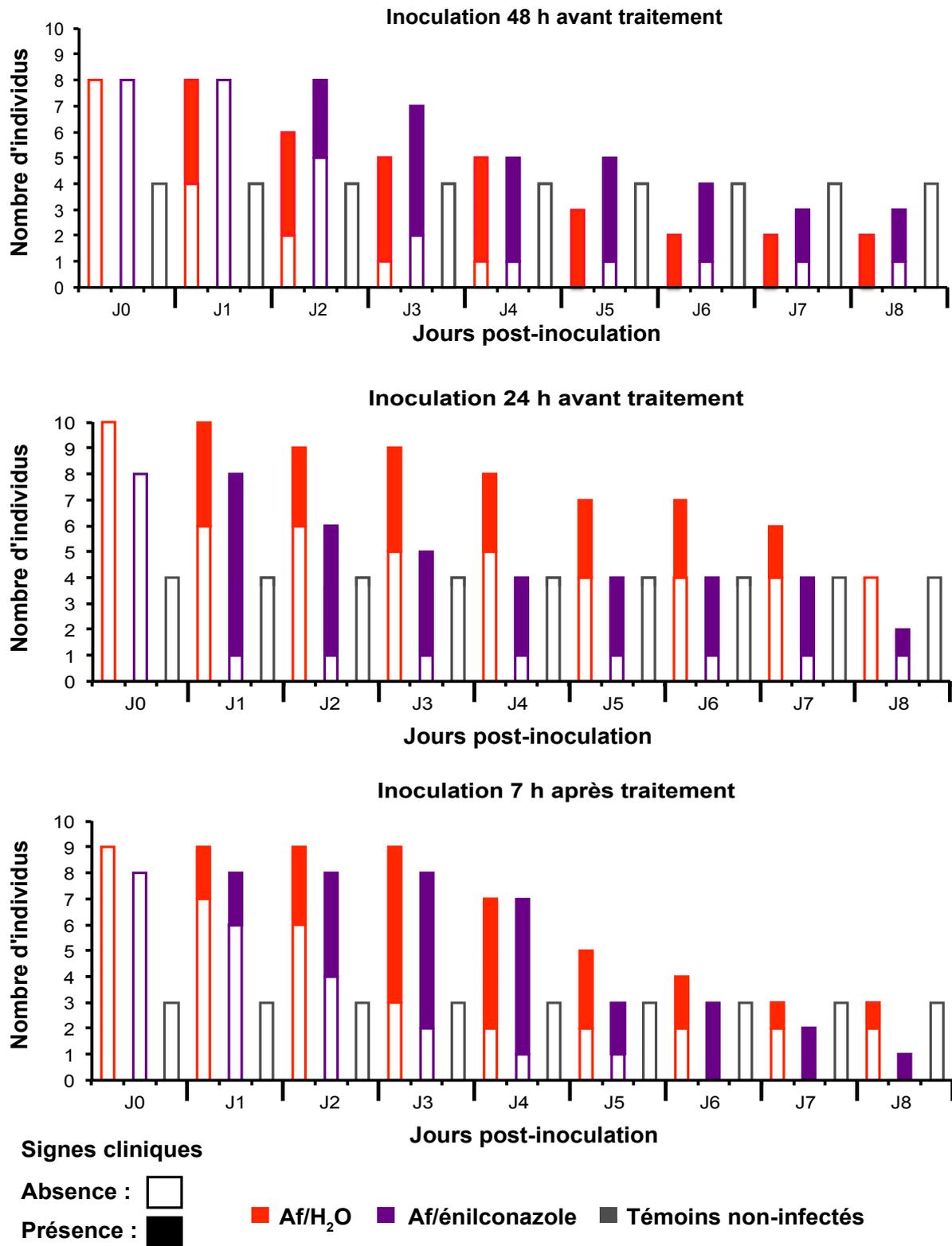
Aucun signe clinique ni mortalité n'ont été observés chez les individus témoins non-infectés. Pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole, les premiers signes cliniques (dyspnée, perte de poids, postures anormales et problèmes de locomotion) sont apparus 24 h ou 48 h après l'inoculation de spores d'*A. fumigatus*, et ce dans les trois groupes inoculés séquentiellement (**figure 45**).

Le positionnement du traitement par rapport à l'inoculation (48 h, 24 h avant T0 ou 7 h après) n'a pas eu d'effet sur le délai d'apparition des signes cliniques au cours du temps dans les différents groupes (manova,  $p = 0,0861$ ). Le nombre cumulé d'individus présentant des signes cliniques augmente rapidement après inoculation. La moitié des individus a des signes cliniques dans les 24 à 48 h pi pour les dindonneaux inoculés avant traitement (G<sub>-48</sub> et G<sub>-24</sub>), et 48 à 72 h pi pour les dindonneaux infectés 7 h après le début du traitement. Les pourcentages d'individus ayant présentés des signes cliniques au cours de l'expérimentation dans les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (moyenne sur les 3 groupes G<sub>-48</sub>, G<sub>-24</sub> et G<sub>+7</sub>) sont respectivement de 82 % et 87 %. A la fin de l'expérimentation (à J8), les pourcentages d'individus présentant toujours des signes cliniques pour chacun des groupes d'inoculation (G<sub>-48</sub>, G<sub>-24</sub> et G<sub>+7</sub>) sont respectivement de 0, 40 et 22 % pour le lot Af/H<sub>2</sub>O et de 12,5, 12,5 et 0 % pour le lot Af/énilconazole.

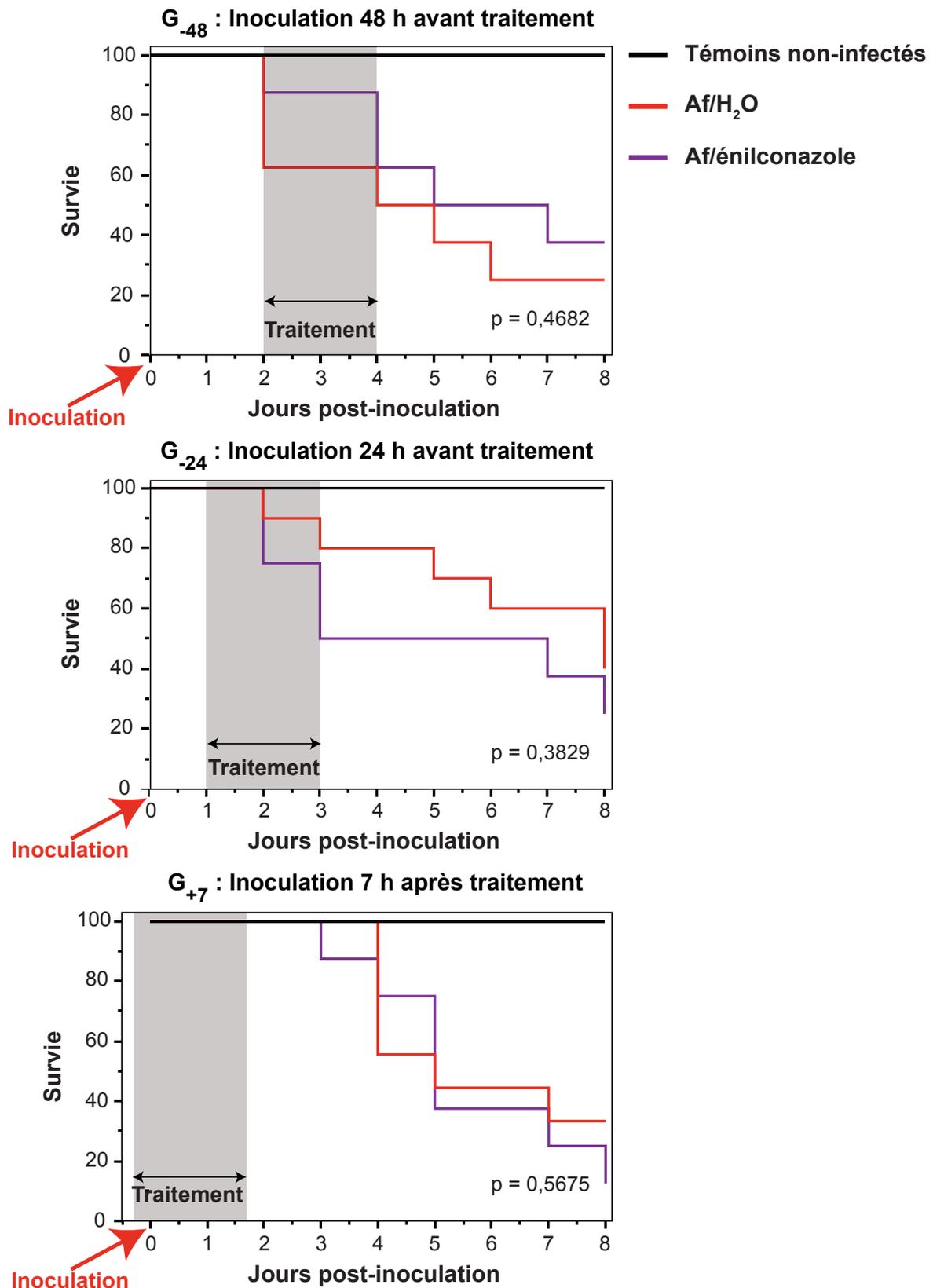
La comparaison du taux de mortalité entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative sur ce critère lorsque chaque groupe était examiné séparément (Kaplan-Meier, G<sub>-48</sub> :  $p = 0,3128$  ; G<sub>-24</sub> :  $p = 0,3895$  ; G<sub>+7</sub> :  $p = 0,8826$ ). De même, aucune différence de mortalité entre les différentes séquences d'inoculation (G<sub>-48</sub>, G<sub>-24</sub> et G<sub>+7</sub>) n'a été mise en évidence pour Af/H<sub>2</sub>O d'une part (Kaplan-Meier,  $p = 0,7697$ ) et Af/énilconazole d'autre part (Kaplan-Meier,  $p = 0,3475$ ).

Les premiers morts ont été enregistrés 48 h après inoculation (J2) pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole des groupes inoculés avant traitement (G<sub>-48</sub> et G<sub>-24</sub>). Tous les individus morts spontanément présentaient des signes cliniques, à l'exception de deux dindonneaux du lot Af/énilconazole morts à J2 sans prodromes. Pour le groupe inoculé 7 h après le début du traitement (G<sub>+7</sub>), la survenue de la mortalité a été légèrement différée soit 4 jours pi dans le lot Af/H<sub>2</sub>O et 3 jours pi dans le groupe Af/énilconazole (**figure 46**). Le taux de mortalité

cumulé 8 jours après l'inoculation expérimentale est de 60-70 % pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole des groupes G<sub>-48</sub> et G<sub>-24</sub>, et de 70-85 % pour le groupe G<sub>+7</sub> (figure 46).



**Figure 45.** Apparition et évolution du nombre d'individus présentant des signes cliniques au cours du temps en fonction des lots et du moment de l'inoculation ( $10^8$  conidies/oiseau) par rapport au traitement (G<sub>-24</sub>, G<sub>-48</sub> et G<sub>+7</sub>) au cours de ExpA



**Figure 46.** Courbes de survie des groupes non-infectés et infectés par *Aspergillus* ( $10^8$  conidies/oiseau) pour chacun des groupes d'inoculation (G<sub>-24</sub>, G<sub>-48</sub> et G<sub>+7</sub>) au cours de ExpA

### III. a. 3) Charge fongique dans le parenchyme pulmonaire

Des moyennes ont été calculées pour chacun des paramètres de suivi du développement du champignon dans l'organisme (UFC, EC et index GM), afin de comparer de façon globale la masse fongique moyenne détectée pour chacun des lots (comparaison entre lots infectés et non-infectés ou traités et non-traités). Ces moyennes sont le résultat d'un cumul de données provenant d'individus morts spontanément ou euthanasiés à des temps différents après l'inoculation.

**Tableau 3.** Résultats de la culture fongique et des biomarqueurs pour évaluer la charge fongique moyenne dans le poumon pour les différents lots de chaque groupe (cumul des résultats de G<sub>-48</sub>, G<sub>-24</sub> et G<sub>+7</sub>) de ExpA après inoculation de 10<sup>8</sup> conidies par dindonneau

Temps d'inoculation	Groupes	Log <sub>10</sub> UFC/g de poumon	Log <sub>10</sub> EC/g de poumon	Index GM
48 h avant T0 <sup>1</sup>	Af/H <sub>2</sub> O	5,08 ± 0,29 <sup>3a</sup>	6,19 ± 0,32 <sup>a</sup>	4,60 ± 0,73 <sup>a</sup>
	Af/énilconazole	5,15 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,28 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,67 ± 0,61 <sup>a</sup>
	Témoins non-infectés	2,52 ± 0,04 <sup>4b</sup>	ND <sup>2</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>b</sup>
24 h avant T0	Af/H <sub>2</sub> O	4,04 ± 0,59 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,46 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,80 <sup>a</sup>
	Af/énilconazole	4,85 ± 0,47 <sup>a</sup>	6,09 ± 0,42 <sup>a</sup>	4,66 ± 0,68 <sup>a</sup>
	Témoins non-infectés	2,52 ± 0,04 <sup>4b</sup>	ND	0,28 ± 0,01 <sup>b</sup>
7 h après T0	Af/H <sub>2</sub> O	4,39 ± 0,61 <sup>a</sup>	5,47 ± 0,35 <sup>a</sup>	5,81 ± 0,95 <sup>a</sup>
	Af/énilconazole	5,23 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,28 ± 0,30 <sup>a</sup>	5,75 ± 0,62 <sup>a</sup>
	Témoins non-infectés	2,52 ± 0,04 <sup>4b</sup>	ND	0,33 ± 0,03 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> T0 = début du traitement

<sup>2</sup> ND = non détecté  
(en dessous du seuil de détection)

<sup>3</sup> Moyenne ± erreur standard

<sup>4</sup> Valeurs des témoins fixées à la valeur du seuil de détection

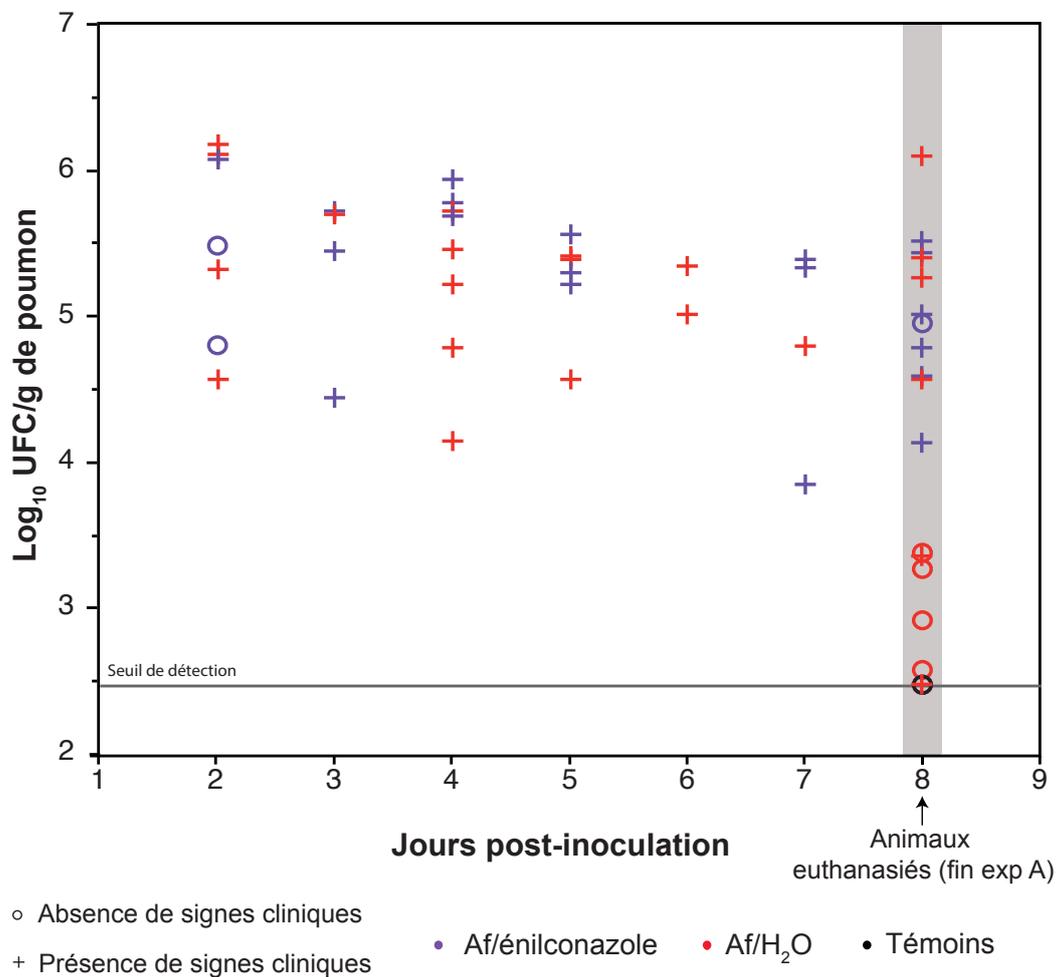
Les moyennes présentant des lettres distinctes en exposant sont significativement différentes (p < 0,05)

#### Culture fongique

Aucune colonie n'a été détectée chez les individus témoins non-infectés des 3 groupes, au seuil de détection de 3.10<sup>2</sup> UFC/g de poumon. Des charges fongiques moyennes de 3.10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> UFC/g de poumon ont été isolées dans les poumons des dindonneaux des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole pour les 3 groupes inoculés (**tableau 3**).

Les moyennes d'UFC/g de poumon des oiseaux infectés expérimentalement sont significativement supérieures à celles des témoins en tenant compte du seuil de détection (Wilcoxon,  $p$  values  $< 0,05$ ). Par contre aucune différence intragroupes et intergroupes entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole n'a pu être mise en évidence (Wilcoxon, intragroupe : G<sub>48</sub>,  $p = 0,9164$  ; G<sub>24</sub>,  $p = 0,3284$  ; G<sub>+7</sub>,  $p = 0,2482$  ; intergroupe : Af/H<sub>2</sub>O,  $p = 0,3770$  ; Af/énilconazole,  $p = 0,8521$ ).

Les inoculations séquentielles n'ayant pas d'effet sur le nombre d'UFC/g de poumon dans les groupes infectés, une moyenne par lot des 3 groupes a été réalisée afin de comparer la charge fongique estimée par numération des UFC/g de poumon retrouvées en fonction du délai observé entre inoculation et mort des dindonneaux (**figure 47**).



**Figure 47.** Variation du nombre d'UFC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés ( $10^8$  conidies/oiseau) traités ou non-traités par énilconazole au cours de ExpA

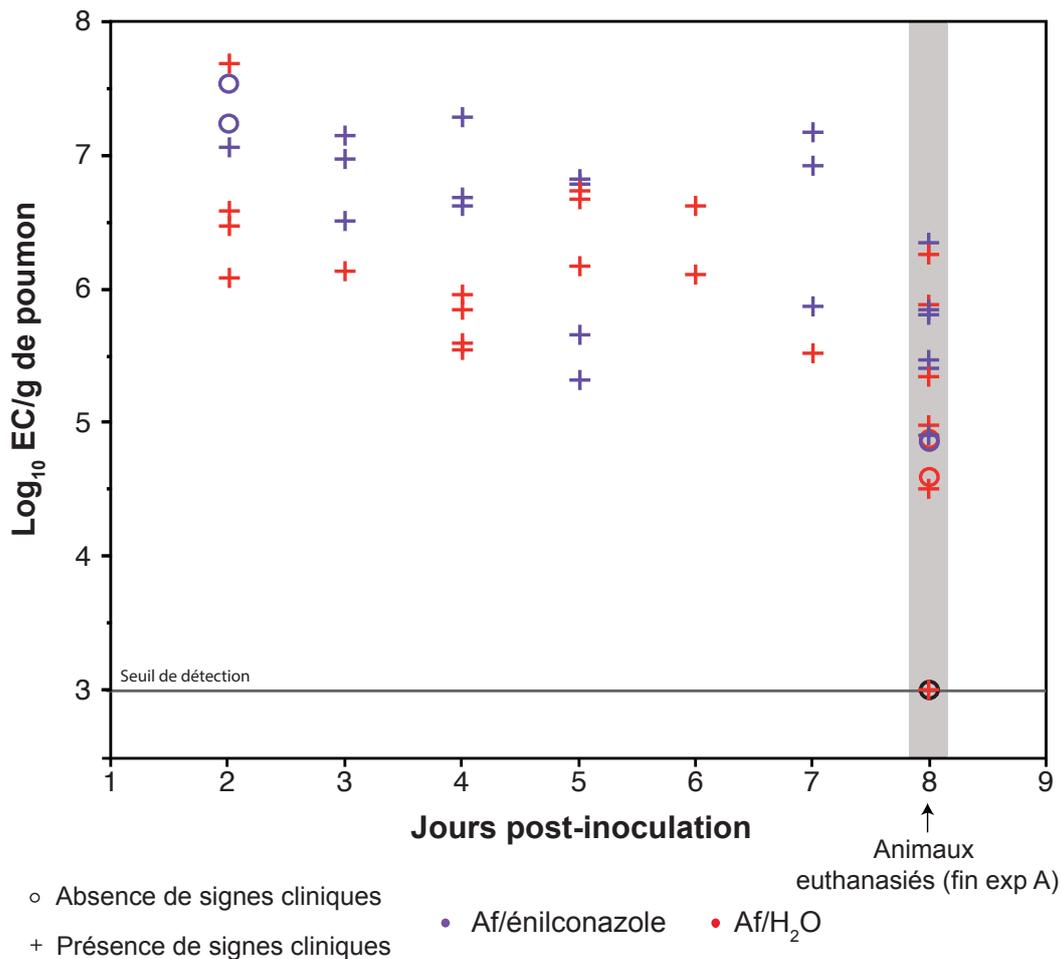
Les individus présentant des signes cliniques sont représentés par des croix, et les animaux euthanasiés en fin d'expérimentation sont distingués (rectangle grisé) des animaux morts spontanément

Les moyennes d'UFC/g de poumon au cours du temps ne diffèrent pas significativement entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (régression multiple,  $p = 0,1459$ ). Chez les animaux morts spontanément durant l'expérimentation, le nombre d'UFC dans les poumons reste stable au cours du temps, que ce soit pour le lot traité ou non-traité (régression linéaire, respectivement  $p = 0,1464$  et  $p = 0,1146$ ). A J8, tous les animaux ont été euthanasiés. Le nombre d'UFC détectées dans les poumons (**figure 47**) des individus qui présentaient des signes cliniques ne diffère pas de la moyenne enregistrée chez les dindonneaux morts spontanément (Wilcoxon,  $p = 0,2157$ ) mais est statistiquement plus élevé que chez les individus ne présentant aucun signe clinique à J8 (Wilcoxon,  $p = 0,0004$ ).

### PCR quantitative

Aucun signal qPCR n'a été détecté chez les individus témoins non-infectés (seuil de détection évalué à  $10^3$  EC/g de poumon). Les moyennes d'EC détectées dans les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole des 3 groupes (G<sub>-48</sub>, G<sub>-24</sub> et G<sub>+7</sub>) sont comprises entre  $5.10^5$  et  $3.10^6$  EC/g de poumon (**tableau 3**). Les moyennes des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole ne sont pas significativement différentes quel que soit le temps séparant inoculation expérimentale et initiation du traitement (Wilcoxon, Af/H<sub>2</sub>O :  $p = 0,4813$  ; Af/énilconazole :  $p = 0,7806$ ). De même, pour chacun des groupes, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (Wilcoxon, G<sub>-48</sub> :  $p = 0,8748$  ; G<sub>-24</sub> :  $p = 0,0845$  ; G<sub>+7</sub> :  $p = 0,1722$ ).

Une moyenne des 3 groupes d'inoculations séquentielles a été réalisée afin de comparer la quantité moyenne d'EC/g de poumon retrouvée en fonction de l'intervalle de temps entre infection expérimentale et mort des dindonneaux (**figure 48**). Chez les animaux morts spontanément, la quantité d'EC/g de poumon diminue significativement au cours du temps pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (régression linéaire, respectivement  $p = 0,0136$  et  $p = 0,0381$ ), sans pour autant que les valeurs inter-lots ne diffèrent significativement au cours du temps (régression multiple,  $p = 0,6138$ ). La moyenne d'EC/g de poumon chez les animaux euthanasiés à J8 présentant des signes cliniques semble plus importante que la moyenne obtenue chez ceux ne présentant aucun signe clinique, bien que cela ne soit pas significatif (Wilcoxon,  $p = 0,0874$ ).



**Figure 48.** Variation du nombre d'EC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés traités ( $10^8$  conidies/oiseau) ou non-traités par énilconazole au cours de ExpA

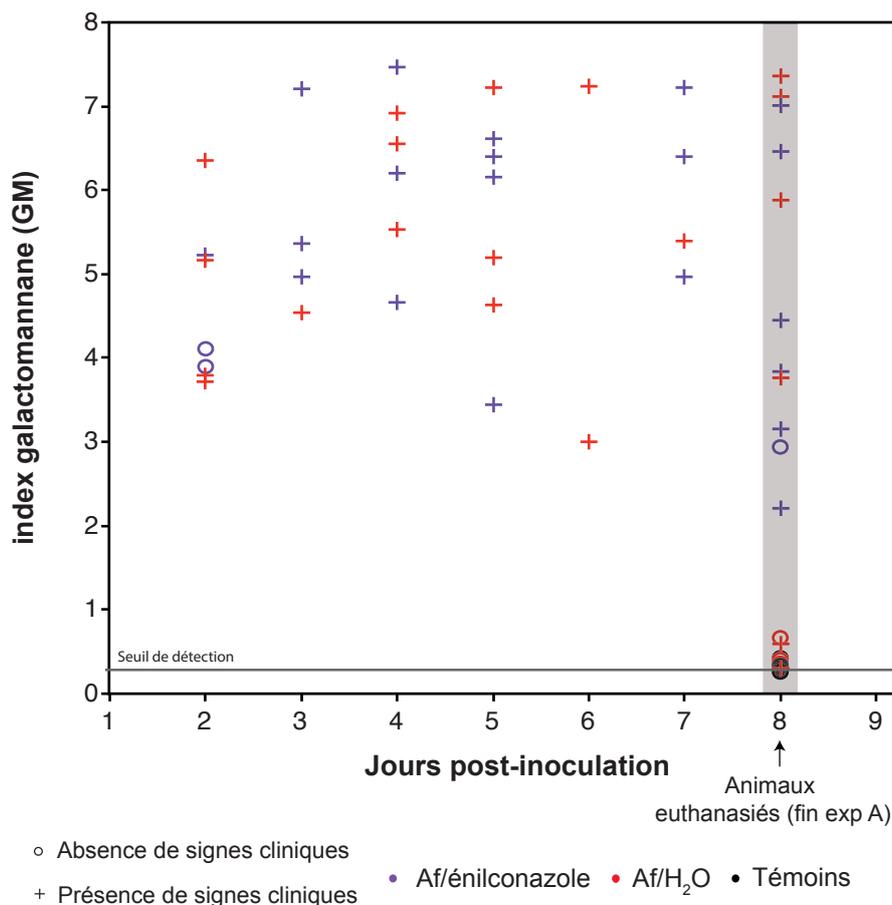
Les individus présentant des signes cliniques sont représentés par des croix, et les animaux euthanasiés en fin d'expérimentation sont distingués (rectangle grisé) des animaux morts spontanément

### Galactomannane

Le galactomannane détecté dans les prélèvements de poumons a permis le calcul d'un index GM. Cet index a été retrouvé positif et saturant, même chez certains individus non inoculés ; c'est pourquoi des dilutions ont été effectuées pour pouvoir comparer des résultats ELISA exploitables. A partir de dilutions au 1/1000 des homogénats pulmonaires, des moyennes d'index GM comprises entre 3 et 5,5 ont été mesurées pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole, contre 0,3 pour les témoins, quel que soit le groupe d'inoculation (**tableau 3**). Pour chacun des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole considérés séparément, les moyennes ne diffèrent pas significativement entre groupes d'inoculation (Wilcoxon, Af/H<sub>2</sub>O :  $p = 0,0817$  ;

Af/énilconazole :  $p = 0,3439$ ). De même, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole, indépendamment du temps d'inoculation (Wilcoxon,  $G_{-48}$  :  $p = 1,0000$  ;  $G_{-24}$  :  $p = 0,1974$  ;  $G_{+7}$  :  $p = 0,7285$ ).

Une moyenne des résultats cumulés des 3 groupes d'inoculations séquentielles a été réalisée afin de comparer l'index GM moyen retrouvé dans les poumons au cours du temps pour les deux lots infectés avec *A. fumigatus*. Chez les oiseaux morts spontanément, on observe une grande variabilité de l'index GM à chaque temps (**figure 49**). En moyenne cependant, cet index ne varie pas significativement au cours du temps, que ce soit dans le lot Af/H<sub>2</sub>O (régression linéaire,  $p = 0,0811$ ) ou le lot Af/énilconazole (régression linéaire,  $p = 0,5174$ ). De plus, aucune différence significative en fonction du temps n'a pu être mise en évidence entre les deux lots (régression multiple,  $p = 0,3411$ ). Les animaux euthanasiés à J8 présentent également des taux de GM très variable. Cependant, la moyenne de l'index GM des oiseaux présentant des signes cliniques est significativement plus importante que celle des oiseaux n'exprimant aucun symptôme (Wilcoxon,  $p = 0,0018$ ).

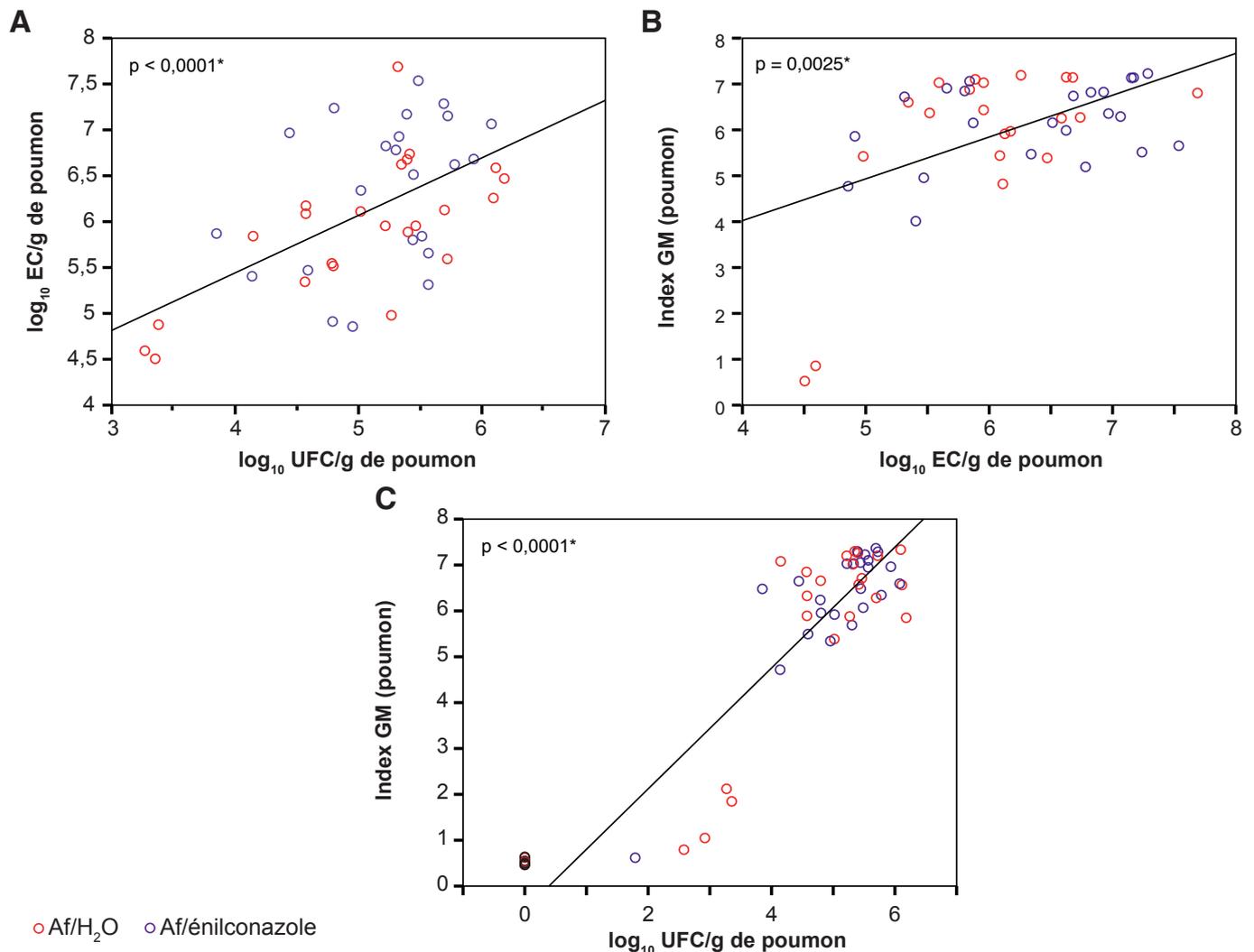


**Figure 49.** Variation de l'index GM dans les poumons au cours du temps pour les lots infectés ( $10^8$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpA

Les individus présentant des signes cliniques sont représentés par des croix, et les animaux euthanasiés en fin d'expérimentation sont distingués (rectangle grisé) des animaux morts spontanément

## Corrélations

Les valeurs des deux biomarqueurs sélectionnés pour cette étude (ADN fongique et galactomannane) sont corrélées avec celles de la culture fongique. Le nombre d'UFC/g de poumon augmente ainsi corrélativement au nombre d'EC/g de poumon d'une part (corrélations de Spearman,  $\rho = 0,4545$  et  $p = 0,0015$ ) et à l'index GM d'autre part (corrélations de Spearman,  $\rho = 0,7816$  et  $p < 0,0001$ ). La quantité d'équivalents conidies détectés par qPCR dans les poumons des dindonneaux est en moyenne 15 fois plus importante que le nombre d'UFC/g de poumon dénombré. L'index GM est mieux corrélé aux résultats de culture fongique que le nombre d'EC/g de poumon. Les résultats des deux biomarqueurs sont également corrélés positivement entre eux, bien que moins nettement (corrélations de Spearman,  $\rho = 0,3338$  et  $p = 0,0268$ ) (**figure 50**).

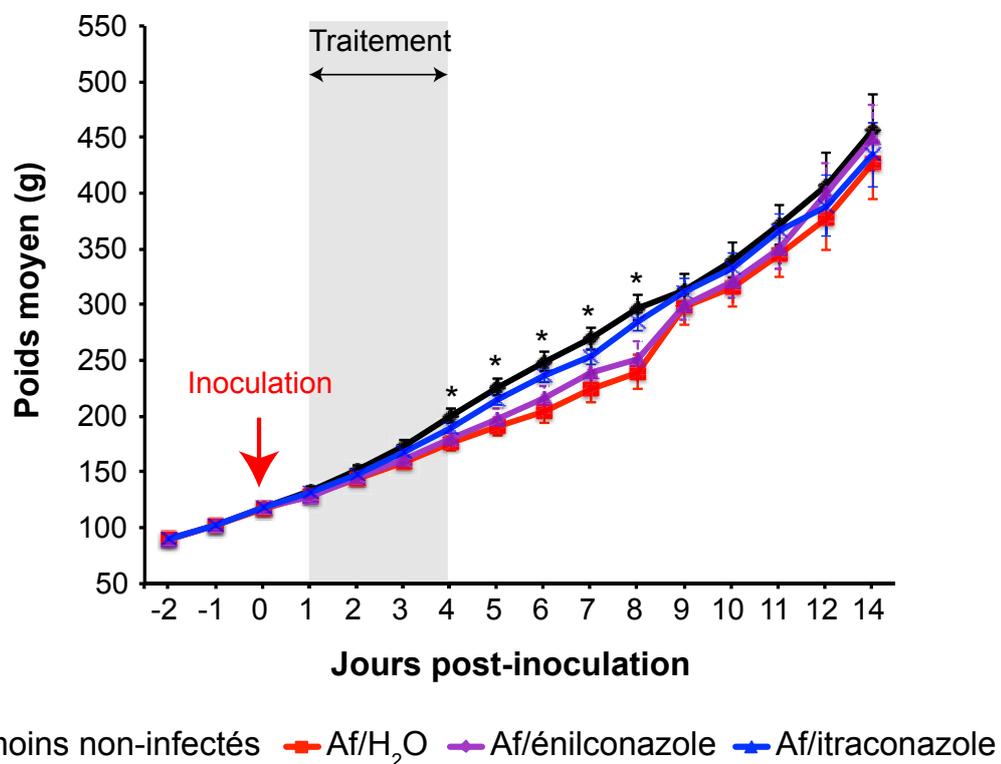


**Figure 50.** Régression linéaire entre les résultats de culture fongique et les biomarqueurs qPCR et GM (ExpA)

### III. b. Résultats de l'expérience ExpB

#### III. b. 1) Evolution du poids vif

Les courbes de poids montrent une croissance légèrement plus faible des dindonneaux des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole au cours du temps par rapport à la courbe de poids des lots Af/itraconazole et témoins non-infectés (lots PBST/H<sub>2</sub>O, PBST/énilconazole et PBST/itraconazole regroupés) (**figure 51**).

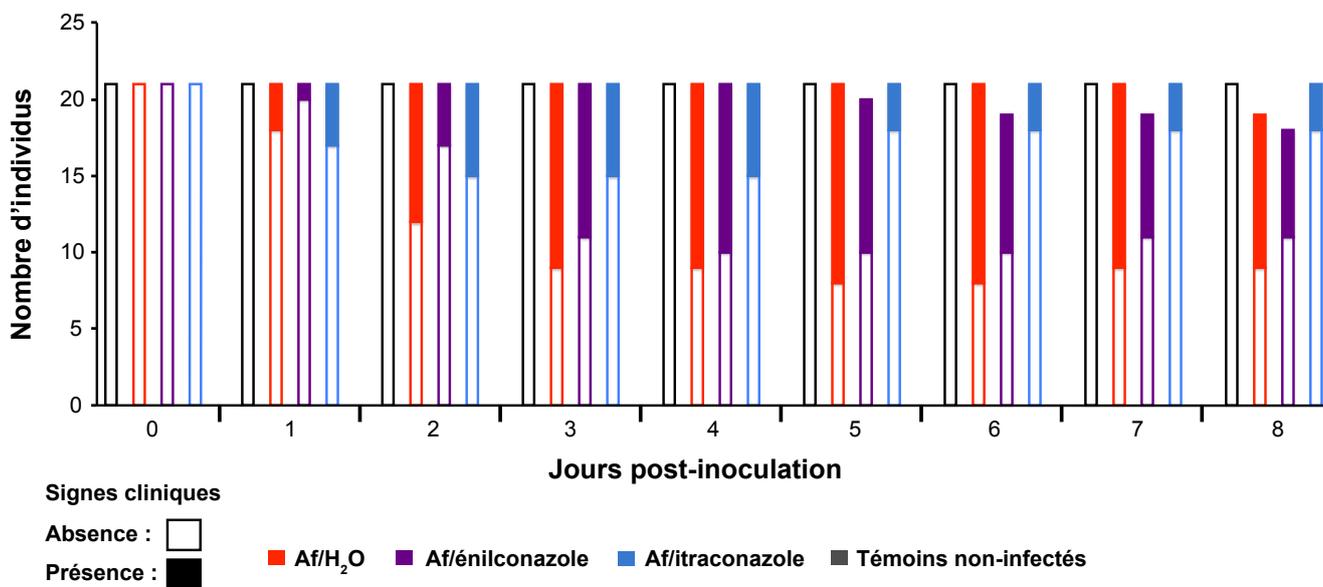


**Figure 51.** Variation du poids moyen quotidien chez les dindonneaux après inoculation de  $10^7$  conidies d'*Aspergillus* (ExpB)

Aucune différence significative de poids n'est observée entre les lots inoculés avec *Aspergillus* et les témoins non-infectés (manova, poids :  $p = 0,8556$ ), excepté entre J4 et J8 où le poids moyen des dindonneaux des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole est significativement plus faible que celui des lots témoins non-infectés et du lot Af/itraconazole (manova,  $p = 0,0177$ ) (**figure 51**).

### III. b. 2) Signes cliniques

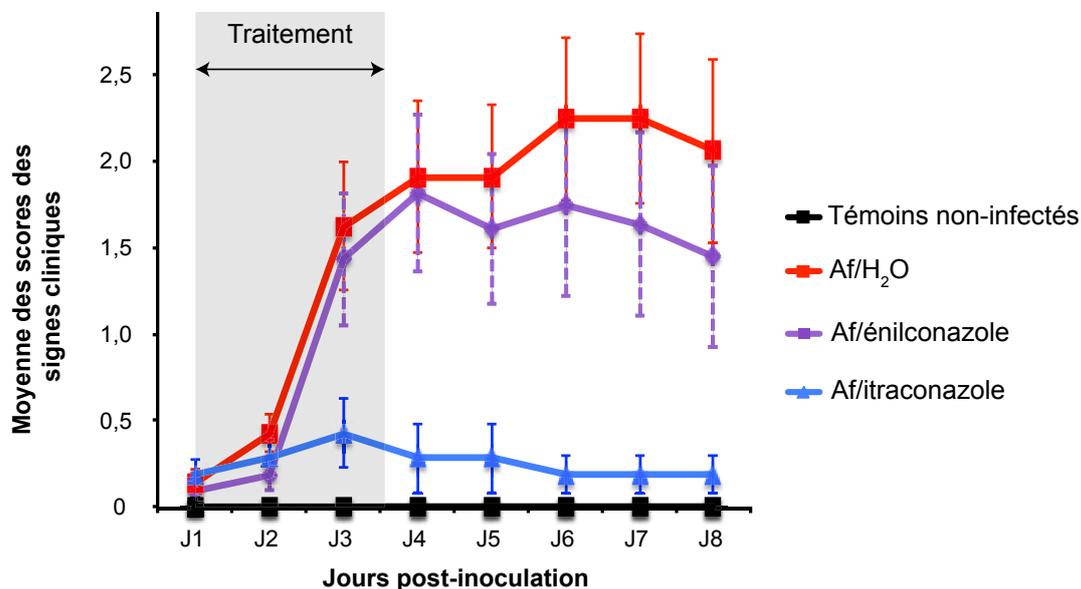
Aucun individu témoin non-infecté n'a présenté de signe clinique durant l'expérimentation. Les premiers signes cliniques observés chez les dindonneaux inoculés avec  $10^7$  conidies d'*Aspergillus fumigatus*, principalement des dyspnées à l'effort, sont apparus 24 h après inoculation. La morbidité chez certains dindonneaux du lot Af/itraconazole a été transitoire. En effet, 38 % des individus ont présenté des signes cliniques au cours de l'expérimentation, mais seulement 14 % présentaient toujours des signes cliniques au moment de leur euthanasie. Le nombre d'individus présentant des signes cliniques a augmenté progressivement jusqu'à J4, pour atteindre ensuite un plateau (entre J4 et J8) et rester stable dans les 3 lots inoculés avec *Aspergillus*. La morbidité cumulée dans les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole est respectivement de 62 % et 57 % (figure 52).



**Figure 52.** Apparition et évolution du nombre d'individus présentant des signes cliniques au cours du temps en fonction des lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non traités par énilconazole ou itraconazole au cours de ExpB

Le pourcentage d'animaux présentant des signes cliniques est équivalent dans les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (manova,  $p = 0,4882$ ) mais est significativement supérieur à celui constaté dans le lot Af/itraconazole dans lequel une faible proportion de dindonneaux sont tombés malades ou manifestaient des signes cliniques en fin d'expérimentation à J8 (figure 52).

La gravité des signes cliniques observée a été évaluée à l'aide d'un score clinique. L'évolution de ce paramètre montre une augmentation rapide entre J1 et J4 à la fois de la proportion d'individus affectés et de la gravité des signes cliniques (dyspnée sévère, apathie, perte de poids). La moyenne des scores cliniques évolue peu globalement entre J4 et J8 pour les 3 lots inoculés avec *Aspergillus*, avec des scores moyens de 2, 1,5 et 0,25 pour les individus des lots Af/H<sub>2</sub>O, Af/énilconazole et Af/itraconazole respectivement (**figure 53**). Les scores moyens obtenus pour les individus du lot Af/itraconazole à chaque temps sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (manova,  $p = 0,0074$ ).

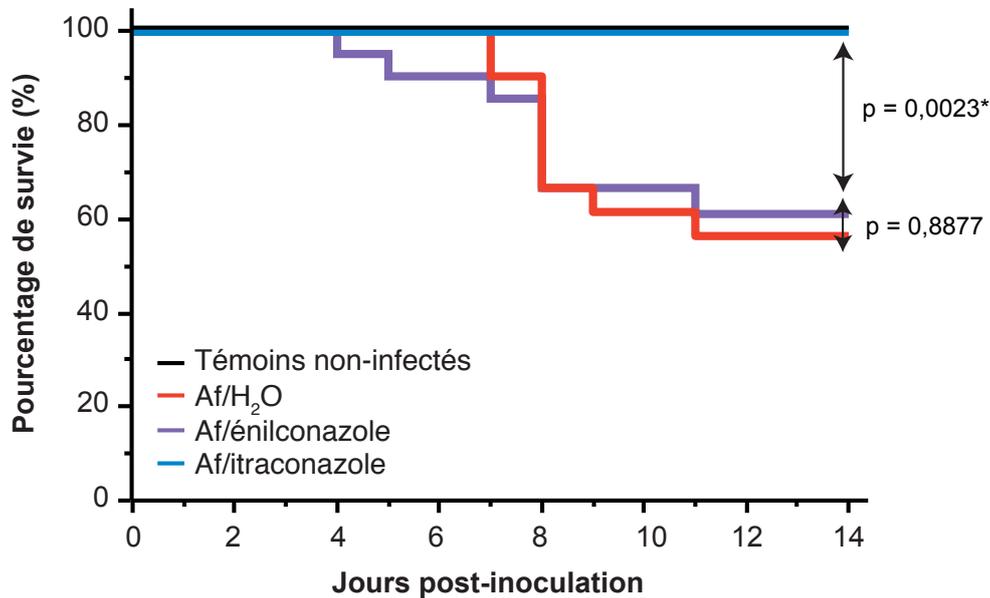


**Figure 53.** Evolution des scores calculés des signes cliniques des différents lots inoculés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités par énilconazole ou itraconazole au cours du temps au cours de ExpB

### III. b. 3) Mortalité

Aucun animal des lots témoins non-infectés n'est mort spontanément durant l'expérimentation. De même, aucune mortalité n'a été observée pour les individus du lot Af/itraconazole, tandis qu'on a enregistré un taux de mortalité cumulée (incluant les euthanasies compassionnelles lorsque le score clinique était supérieur ou égal à la valeur de 4) équivalent pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole d'environ 40-45 % (Kaplan-Meier,  $p =$

0,8877) (**figure 54**). Les premiers morts sont constatés à J4 pour le lot Af/énilconazole et à J7 pour Af/H<sub>2</sub>O, avec un pic de mortalité situé entre J7 et J11 pour les deux lots considérés.



**Figure 54.** Courbes de survie des lots non-infectés et inoculés par aérosolisation intratrachéale d'*A. fumigatus* ( $10^7$  conidies/oiseau) en fonction du traitement administré (au cours de ExpB)

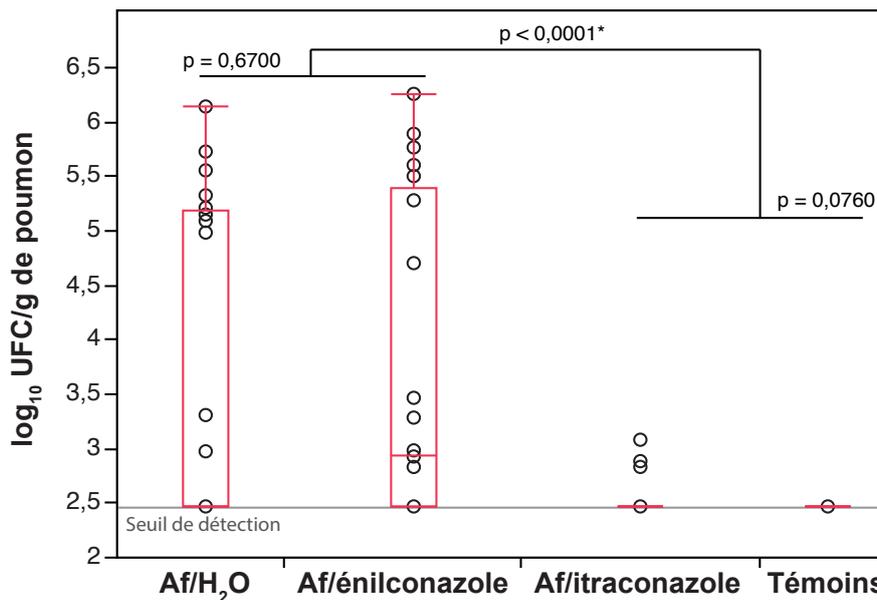
### III. b. 4) Charge fongique dans le parenchyme pulmonaire

Comme pour ExpA, des moyennes ont été calculées pour chacun des paramètres de suivi du développement du champignon dans l'hôte (UFC, EC et index GM), dans le but de comparer de façon globale la masse fongique moyenne détectée pour chacun des lots (comparaison entre lots infectés et non-infectés ou traités et non-traités). Ces moyennes sont le résultat d'un cumul de données provenant d'individus morts spontanément ou euthanasiés à des temps différents après l'inoculation.

#### Culture

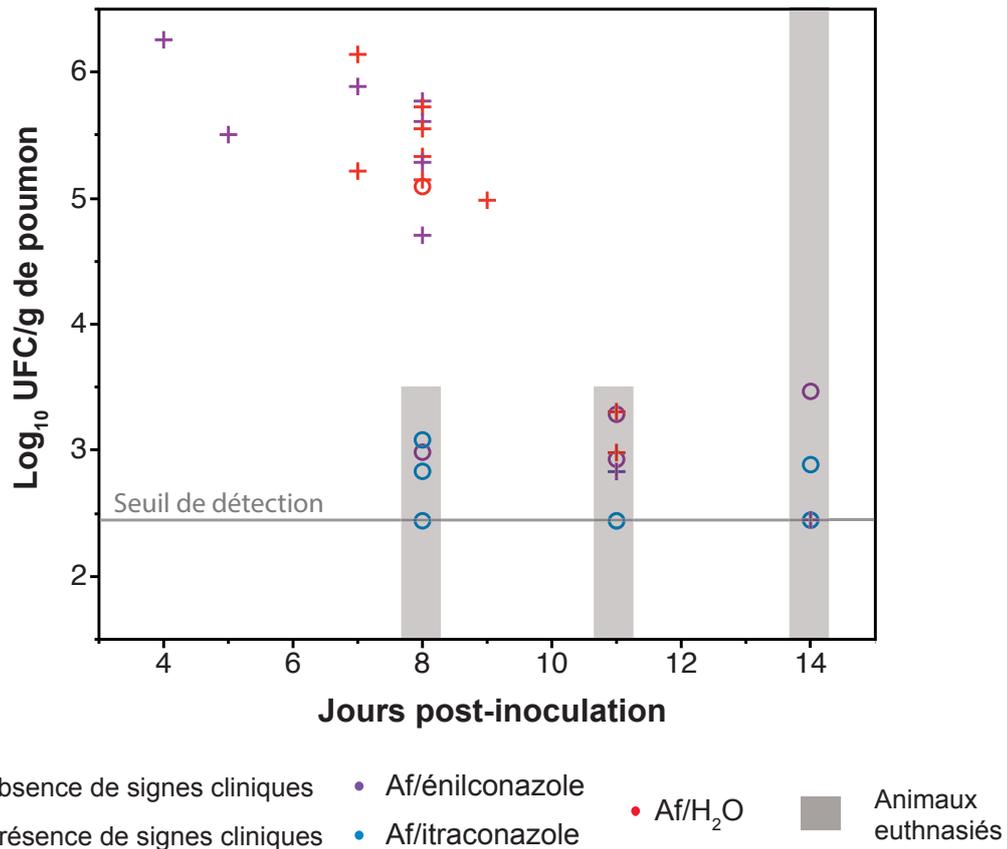
Aucune colonie d'*A. fumigatus* n'a été retrouvée au niveau des poumons chez les individus témoins non-infectés (seuil de détection de  $3 \cdot 10^2$  UFC/g de poumon). Les moyennes des UFC retrouvés par gramme de poumon pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole ne sont pas significativement différentes (Wilcoxon,  $p = 0,6030$ ) et sont d'environ  $4,5 \cdot 10^4$  UFC ( $\log_{10}$

UFC/g de poumon =  $3,65 \pm 0,30$ ) (**figure 55**). En revanche, la moyenne de  $3.10^2$  UFC/g de poumon pour le lot Af/itraconazole ( $\log_{10}$  UFC/g de poumon =  $2,53 \pm 0,04$ ) est significativement plus faible que celle des deux autres lots inoculés avec *Aspergillus* (Wilcoxon,  $p < 0,0001$ ) (**figure 55**). La charge fongique du lot Af/itraconazole évaluée par numération des colonies sur gélose, ne diffère pas statistiquement de celles des animaux témoins au seuil de détection estimé (Wilcoxon,  $p = 0,0760$ ).



**Figure 55.** Représentation des moyennes des UFC/g de poumon quantifiés chez les dindonneaux des lots témoins et inoculés avec *Aspergillus* ( $10^7$  conidies/oiseau), traités ou non-traités au cours de ExpB

Aucune différence significative entre moyennes des UFC/g de poumon n'est observée entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole en fonction du temps (régression multiple,  $p = 0,2149$ ) (**figure 56**). Ce paramètre isolé chez les oiseaux présentant des signes cliniques diminue significativement au cours du temps dans les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (régression linéaire,  $p < 0,0001$  et  $p = 0,0002$ ) (**figure 56**). Par contre, chez les individus euthanasiés au cours de la deuxième moitié de l'expérimentation (à J8, J11 ou J14), les numérations fongiques dans le parenchyme pulmonaire ne varient pas au cours du temps dans les 3 lots inoculés avec *Aspergillus* (régression linéaire, Af/H<sub>2</sub>O :  $p = 0,0789$  ; Af/énilconazole :  $p = 0,7289$  ; Af/itraconazole :  $p = 0,4130$ ). Aucune différence significative n'est observée entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole au cours du temps (régression multiple,  $p = 0,2149$ ) (**figure 56**).

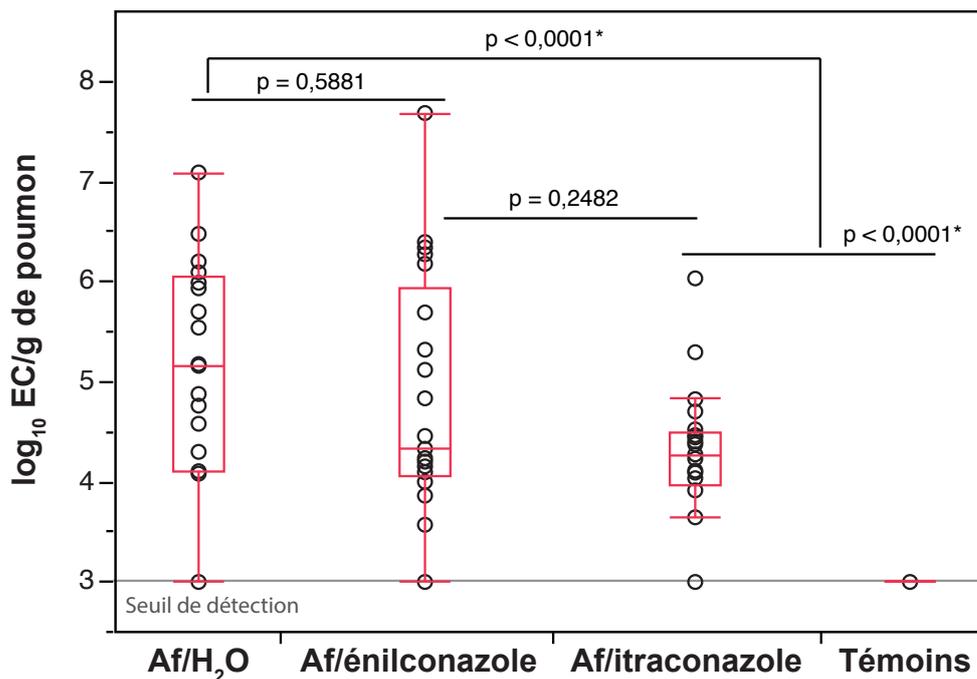


**Figure 56.** Variation du nombre d'UFC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpB

Les individus présentant des signes cliniques sont représentés par des croix, et les animaux euthanasiés sont distingués (rectangle grisé) des animaux morts spontanément

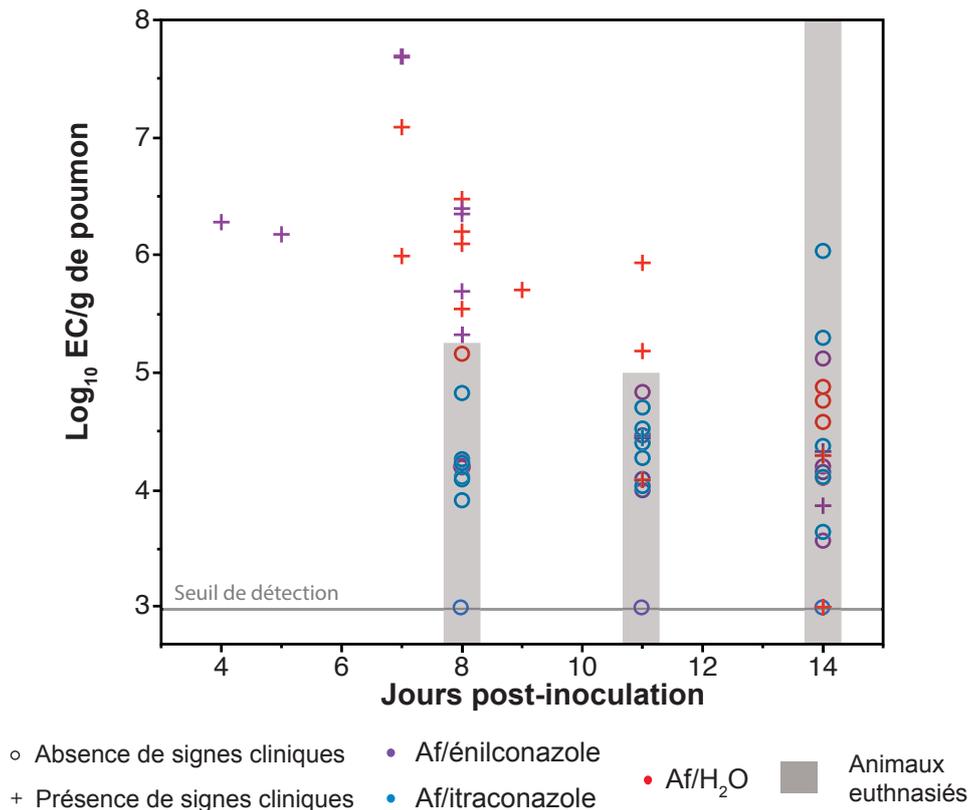
### PCR quantitative

Aucun signal qPCR n'a été détecté chez les individus témoins non-infectés (seuil de détection de  $10^3$  EC/g de poumon). Les moyennes d'EC/g de poumon obtenues pour les lots inoculés avec *Aspergillus* diffèrent significativement entre elles (Wilcoxon,  $p = 0,0120$ ). En effet, la moyenne d'EC/g de poumon du lot Af/H<sub>2</sub>O est plus importante que celle du lot Af/itraconazole (Wilcoxon,  $p = 0,0012$ ), mais est équivalente au lot Af/énilconazole (Wilcoxon,  $p = 0,1781$ ). Les valeurs de ce paramètre pour le lot Af/énilconazole ne sont pas significativement différentes de celles du lot Af/itraconazole (Wilcoxon,  $p = 0,2482$ ) (**figure 57**).



**Figure 57.** Représentation des moyennes des EC/g de poumon quantifiés chez les dindonneaux des lots témoins et inoculés avec *Aspergillus* ( $10^7$  conidies/oiseau), traités ou non-traités au cours de ExpB

Les moyennes d'EC/g de poumon des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole sont corrélées négativement avec le délai séparant inoculation et mort (spontanée ou euthanasie compassionnelle) des dindonneaux (corrélations de Spearman, Af/H<sub>2</sub>O : rho = -0,8059 et p < 0,0001 ; Af/énilconazole : rho = -0,7041 et p = 0,0008). A l'inverse, les moyennes du lot Af/itraconazole ne varient pas significativement chez les dindonneaux euthanasiés séquentiellement entre J8 et J14 (corrélations de Spearman, rho = 0,2457 et p = 0,3258) (**figure 58**). Les moyennes d'EC/g de poumon au cours du temps ne sont pas statistiquement différentes entre Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (régression multiple, p = 0,8949). Les individus des lots traités avec l'énilconazole présentant des signes cliniques ont un nombre d'EC/g de poumon supérieur aux oiseaux qui ne présentent pas de signes cliniques (Wilcoxon, Af/énilconazole : p = 0,0025, Af/H<sub>2</sub>O : p = 0,0080).



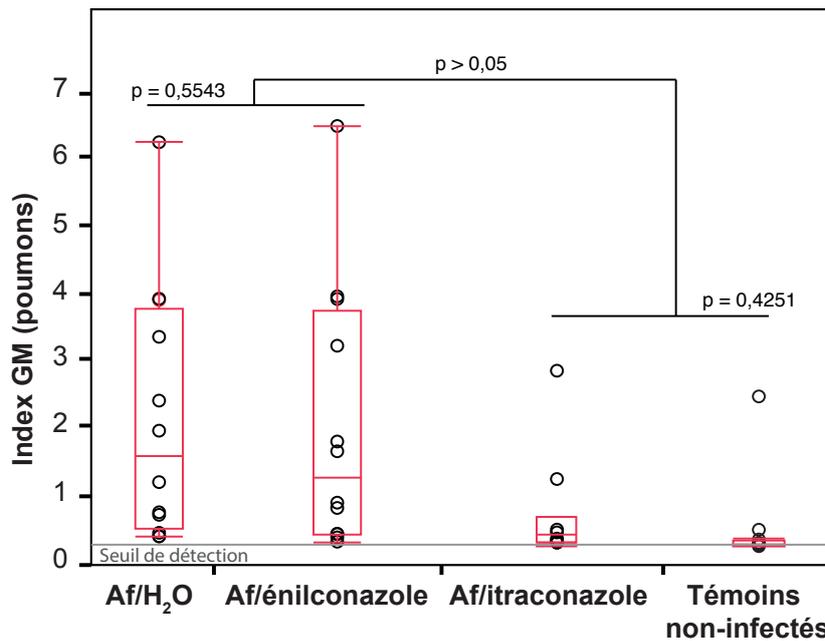
**Figure 58.** Variation du nombre d'EC/g de poumon au cours du temps pour les lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpB

Les individus présentant des signes cliniques sont représentés par des croix, et les animaux euthanasiés sont distingués (rectangle grisé) des animaux morts spontanément

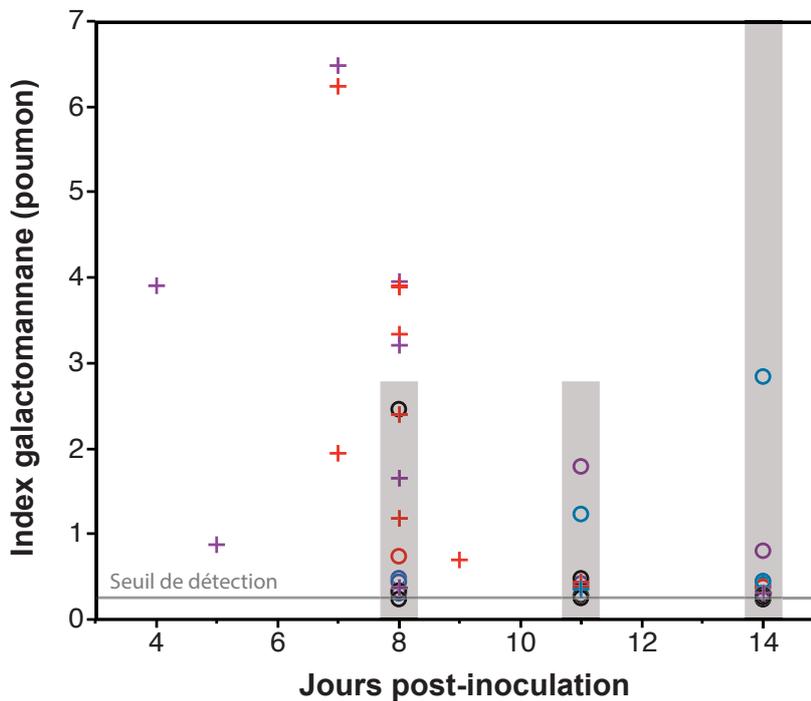
### Galactomannane

Les homogénats de poumons des dindonneaux dilués au 1/2000 ont permis la détection d'un taux de galactomannane élevé chez les individus des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole. L'index galactomannane moyen calculé pour ces lots est respectivement de  $1,3 \pm 0,37$  et  $1,2 \pm 0,37$ , alors qu'il est inférieur à 0,5 pour les lots Af/itraconazole et les témoins non-infectés (**figure 59**). Les moyennes des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole ne diffèrent pas entre elles (Wilcoxon,  $p = 0,5543$ ). L'index GM des lots témoins et Af/itraconazole est plus faible que celui des lots inoculés Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole, bien que cela ne soit pas significatif (Wilcoxon,  $p > 0,2996$ ). Aucune différence au niveau des index GM n'est observée en fonction du temps entre les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (régression multiple,  $p = 0,7843$ ). L'index GM détecté dans les poumons des oiseaux diminue entre J7 et J14 de façon significative dans les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole (régression linéaire, respectivement :  $p = 0,0332$  et  $p =$

0,0339), contrairement à l'index GM du lot Af/itraconazole (régression linéaire,  $p = 0,5163$ ) (figure 60).



**Figure 59.** Représentation des moyennes de l'index galactomannane détecté dans les poumons des dindonneaux des lots témoins et inoculés avec *Aspergillus* ( $10^7$  conidies/oiseau), traités ou non-traités au cours de ExpB



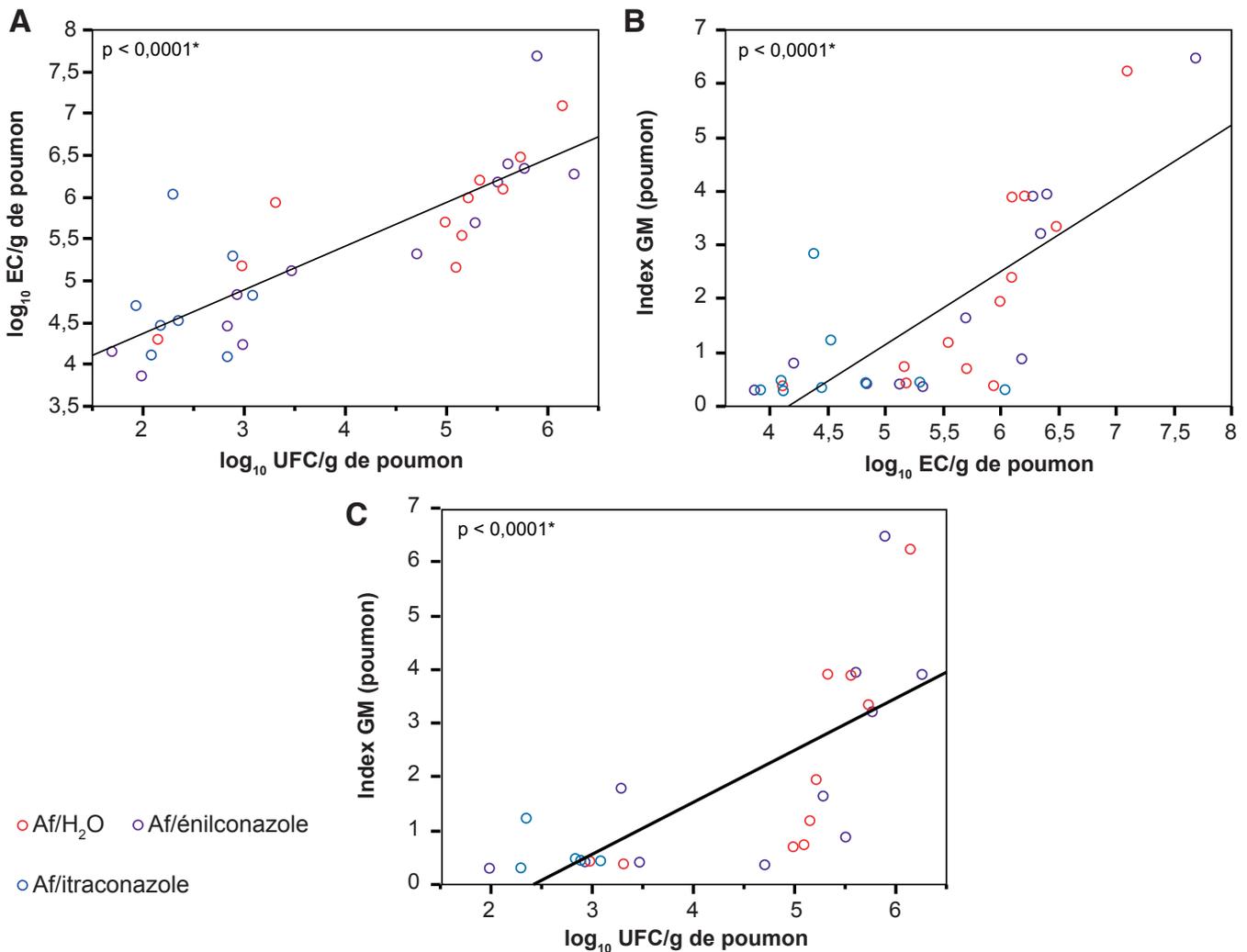
- Absence de signes cliniques
- Af/énilconazole
- Af/H<sub>2</sub>O
- Animaux euthanasiés
- + Présence de signes cliniques
- Af/itraconazole
- Témoins

**Figure 60.** Variation de l'index GM dans les poumons au cours du temps pour les lots infectés ( $10^7$  conidies/oiseau) traités ou non-traités au cours de ExpB

Les individus présentant des signes cliniques sont représentés par des croix, et les animaux euthanasiés sont distingués (rectangle grisé) des animaux morts spontanément

## Corrélations

Les deux biomarqueurs sont très bien corrélés entre eux, ainsi qu'avec les résultats de culture fongique. En effet, le nombre d'UFC/g de poumon augmente significativement avec le nombre d'EC/g de poumon (corrélations de Spearman,  $\rho = 0,8746$  et  $p < 0,0001$ ). La quantité d'équivalents conidies détectés par qPCR dans les poumons des dindonneaux est en moyenne 20 fois plus importante que le nombre d'UFC/g de poumon dénombrées. Une relation similaire existe entre index GM et nombre d'UFC/g de poumon (corrélations de Spearman,  $\rho = 0,8161$  et  $p < 0,0001$ ) d'une part et entre index GM et nombre d'EC/g de poumon (corrélations de Spearman,  $\rho = 0,7405$  et  $p < 0,0001$ ) d'autre part. L'index GM est davantage corrélé aux résultats de culture fongique (UFC) que le nombre d'EC/g de poumon (figure 61).



**Figure 61.** Régression linéaire entre les résultats de culture fongique et les biomarqueurs qPCR et GM (ExpB)

#### IV. Conclusions sur le l'efficacité du traitement énilconazole

---

Dans la première expérimentation (ExpA), les dindonneaux âgés de moins d'une semaine ont été inoculés à différents temps (48 ou 24 h avant l'initiation du traitement ou 7 h après) par voie intratrachéale avec  $10^8$  conidies, puis traités les mêmes jours avec l'énilconazole (T0, T1 et T2). Mises à part une diminution plus marquée de la croissance chez les dindonneaux inoculés 48 h avant le traitement, et une mortalité différée pour les dindonneaux inoculés 7 h après le traitement, l'administration de l'antifongique n'a eu aucun effet significatif sur les signes cliniques et la mortalité des dindonneaux infectés expérimentalement jusqu'à deux jours avant ou 7 heures après la première nébulisation d'énilconazole. Les premiers signes cliniques sont apparus dans les différents lots 24 ou 48 h après inoculation des conidies aspergillaires, et ont touché en moyenne 82 % des individus du lot Af/H<sub>2</sub>O et 87 % des individus du lot Af/énilconazole. La mortalité a débuté dès le deuxième jour pi et les taux de mortalité moyens en cumulant les données (G<sub>.48</sub>, G<sub>.24</sub> et G<sub>+7</sub>) pour les lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole ont atteint respectivement les valeurs de 70 et 75 % à J8.

Le traitement par énilconazole a été administré par nébulisation du produit dilué sur les oiseaux confinés dans une chambre d'inhalation à la dose de 20 mg/m<sup>3</sup> une fois par jour, pendant 3 jours consécutifs. En dehors de l'absence d'effet notable associé à l'utilisation de l'azolé sur la mortalité ou la croissance, la quantification de la masse fongique dans le parenchyme pulmonaire (nombre d'UFC, d'EC et l'index GM) n'a pas permis de discriminer les lots de dindonneaux infectés ayant été traités par l'énilconazole ou par nébulisation du placebo.

Dans la seconde expérimentation (ExpB), différents paramètres du modèle ont été modifiés par rapport à ExpA. Tout d'abord, la dose d'inoculum d'*Aspergillus* a été réduite à  $10^7$  conidies. Tous les animaux ont été inoculés le même jour (J0), et le traitement a été initié 24 h après. L'énilconazole a été administré par nébulisation directe sur les oiseaux et leur environnement dans leur lieu d'hébergement à la dose de 20 mg/m<sup>3</sup> matin et soir, pendant 3 jours consécutifs. De plus, un lot témoin « positif » de traitement a été ajouté : il est constitué de dindonneaux infectés expérimentalement puis traités par itraconazole à la dose de 10 mg/kg *per os*.

Les paramètres généraux comme le gain moyen quotidien, la morbidité et la mortalité, ainsi que la quantification de la masse fongique (culture et galactomannane), à l'exception des

résultats de qPCR, des individus inoculés avec *Aspergillus* et traités avec l'itraconazole sont comparables à ceux des témoins non-infectés. Seuls 14 % des individus de ce lot présentent des signes cliniques à la fin de l'expérimentation, avec un faible score clinique, et la mortalité est nulle. En revanche, les résultats des lots Af/H<sub>2</sub>O et Af/énilconazole diffèrent significativement des lots Af/itraconazole et témoins avec une diminution transitoire de la vitesse de croissance, une morbidité affectant la moitié des dindonneaux avec des scores cliniques élevés et une mortalité cumulée de 40 %. Aucun effet protecteur du traitement énilconazole, contrairement à l'administration d'itraconazole, n'a été observé sur ces indicateurs. De même, la quantification de la masse fongique dans le parenchyme pulmonaire (nombre d'UFC, d'EC et l'index GM) n'a pas permis de voir un quelconque effet du traitement énilconazole sur les oiseaux inoculés avec *Aspergillus*.

# Discussion



Plusieurs modèles d'aspergillose ont déjà été publiés chez différentes espèces d'oiseaux. Ils se distinguent sur plusieurs paramètres, comme l'âge et la voie d'inoculation, ou encore l'espèce ou la souche d'*Aspergillus* inoculée (Arné *et al.*, 2011). Les données empiriques (Kunkle, 2003), aussi bien qu'expérimentales (Ghori et Edgar, 1973), montrent clairement une sensibilité supérieure des cailles (*Coturnix japonica*) et des dindes (*Meleagris gallopavo*) aux infections par *A. fumigatus* comparée à celle du poulet (*Gallus gallus*). On observe aussi des variations intra-espèces dans la réponse de l'hôte (Kunkle et Sacco, 1998 ; Thierry *et al.*, 2013). Il en résulte qu'il est nécessaire d'établir des modèles d'infection pertinents pour les espèces ou les lignées élevées pour la production de viande ou d'œufs ou pour les espèces d'ornement ou de volière.

Plusieurs voies d'inoculation du champignon ont été testées chez les dindes : par injection intrapulmonaire (Perelman *et al.*, 1992) ou intrasacculaire (Le Loc'h *et al.*, 2006 ; Féménia *et al.*, 2007) ou par aérosolisation dans des chambres d'inhalations (Richard *et al.*, 1981). A l'exception de cette dernière voie qui est délicate à standardiser (Thierry *et al.*, 2013), l'inoculation par voie intratrachéale, qui n'avait pas encore été testée chez les dindes avant ce travail, est la procédure qui se rapproche le plus des conditions « naturelles » d'infection car elle ne court-circuite que les voies aériennes supérieures (cavité nasale, larynx et partie supérieure de la trachée) et leurs défenses potentielles (Arné *et al.*, 2011). Nous proposons ici un modèle original d'aspergillose aiguë, chez le dindonneau âgé d'une semaine, soumis à l'aérosolisation intra-trachéale de conidies d'*A. fumigatus*, au moyen d'un MicroSprayer®. L'utilisation du MicroSprayer® a été validée chez des rats Sprague-Dawley de 6 à 8 semaines (Chandenier *et al.*, 2009), immunodéprimés, ainsi que chez des cailles japonaises immunocompétentes (Goetting *et al.*, 2013). Dans ces conditions, le MicroSprayer® permet d'administrer des inocula précisément calibrés directement dans le tractus respiratoire.

### **Reproduction d'une aspergillose aiguë**

L'inoculation de  $10^7$  ou  $10^8$  conidies d'*A. fumigatus* dans la trachée des dindonneaux a induit un taux important de morbidité, une mortalité en pic, ainsi que le développement de lésions macroscopiques et microscopiques, caractéristiques de l'aspergillose aiguë et localisées au niveau du tractus respiratoire. Les dindonneaux inoculés avec une forte dose de conidies ont exprimé des signes cliniques classiques de l'aspergillose respiratoire naturelle, tels que

dyspnée, halètements, respiration sifflante, associés à une perte de poids et une apathie (Dyar *et al.*, 1984 ; Planel *et al.*, 2001 ; Akan *et al.*, 2002). Comme lors d'épisodes d'aspergillose aiguë dans les élevages avicoles, un pic de mortalité très précoce des dindonneaux a été observé (Dyar *et al.*, 1984 ; Perelman et Kuttin, 1992).

Les lésions macroscopiques relevées dans notre modèle sont strictement limitées à l'appareil respiratoire. Les lésions les plus sévères se sont développées dans le parenchyme pulmonaire et dans une moindre mesure dans les sacs aériens caudaux, à l'instar de ce qui déjà été observé dans d'autres modèles aviaires (Julian et Goryo, 1990 ; Goetting *et al.*, 2013). Cette localisation typique lors d'aspergillose aiguë spontanée (Okoye *et al.*, 1989 ; Planel *et al.*, 2001 ; Cacciuttolo *et al.*, 2009 ; Singh *et al.*, 2009) ou expérimentale (Richard *et al.*, 1984 ; Perelman *et al.*, 1992) peut être complétée par des lésions affectant d'autres organes tels que le foie, l'œil ou le cerveau (Akan *et al.*, 2002).

L'analyse histopathologique a mis en évidence des lésions nécrotiques étendues au niveau du parenchyme pulmonaire ainsi que la présence de granulomes multifocaux chez les dindonneaux des lots inoculés avec  $10^8$  ou  $10^7$  conidies tout à fait similaires à celles observées à partir de tissus prélevés sur le terrain (Cacciuttolo *et al.*, 2009) ou dans les modèles d'aspergillose expérimentale (Féménia *et al.*, 2007 ; Kunkle et Rimler, 1996).

### **Reproduction du modèle et effet de la dose d'inoculum**

Lors de la mise au point de notre modèle (ExpM), l'évaluation de l'impact de quatre concentrations différentes ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  conidies administrées par dindonneau), nous a permis de mettre en évidence une mortalité dose-dépendante, avec des valeurs de 0 %, 0 %, 30 % et 100 % respectivement. Nous avons pu évaluer l'effet de la dose de l'inoculum d'une part et la reproductibilité de notre modèle au cours des deux essais thérapeutiques (ExpA et ExpB) en analysant les différents paramètres généraux de suivi de l'infection (morbidité, mortalité, lésions macroscopiques et microscopiques).

En comparant les résultats des différentes expérimentations, nous avons vérifié que les dindonneaux inoculés avec  $10^7$  ou  $10^8$  conidies par voie intratrachéale présentaient toujours les mêmes signes cliniques, évocateurs d'une atteinte respiratoire, à savoir principalement une dyspnée. La localisation, la sévérité et l'aspect des lésions macroscopiques (granulomes sur

les sacs aériens et densification des poumons) et microscopiques (lésions nécrotiques et granulomes multifocaux) se sont avérées très similaires chez les oiseaux exposés aux mêmes concentrations de conidies.

D'une expérimentation à l'autre, la chronologie d'apparition des signes cliniques et de la mortalité dans le temps s'est avérée reproductible chez les animaux ayant reçu  $10^7$  conidies (ExpM et ExpB) d'une part ou  $10^8$  conidies (ExpM et ExpA) d'autre part. Cependant le moment d'apparition de la morbidité (3-6 jours pi) et de la mortalité (4-8 jours pi) pour les lots exposés à la concentration la plus faible est survenu plus tardivement que pour les animaux ayant reçu la plus forte concentration (respectivement 1-3 jours pi et 2-4 jours pi). Enfin la mortalité a été plus faible pour la dose  $10^7$  (entre 30 et 45 %) que pour la dose  $10^8$  (entre 70 et 100 %).

Un taux de mortalité plus faible (25 et 37 % respectivement) a été observé chez le Pigeon (*Columba livia*) inoculé avec  $2.10^7$  conidies par voie intratrachéale « classique » (Beernaert *et al.*, 2008) et chez le Poulet inoculé par nébulisation de  $10^9$  conidies/mL (Thierry *et al.*, 2013). L'administration de  $4,7.10^7$  conidies *via* un MicroSprayer® à des cailles japonaises (Goetting *et al.*, 2013) provoque une forte mortalité (88 %). Ces données sont en faveur d'une plus grande sensibilité de la dinde et de la caille à l'infection expérimentale par *Aspergillus* (Ghori et Edgar, 1973).

Des différences de mortalité ont également été constatées en fonction de l'âge des animaux inoculés au sein de la même espèce. Dans les modèles d'aspergillose chez la Dinde de 3 ou 5 semaines (Richard *et al.*, 1981 ; Le Loc'h *et al.*, 2006) inoculée par injection intrasacculaire de  $10^8$  conidies dans le sac aérien (Le Loc'h *et al.*, 2006) ou soumises à un aérosol délivrant des doses de  $5.10^9$  conidies par animal (Richard *et al.*, 1981), les taux de mortalité étaient plus faibles (respectivement 16 et 55 %) que dans notre étude. Nos résultats confirment la sensibilité accrue des dindonneaux âgés de moins de trois semaines à l'aspergillose aiguë (Guérin *et al.*, 2012)

### **Evaluation des biomarqueurs**

L'utilisation de trois biomarqueurs putatifs (UFC, galactomannane et PCR en temps réel) a été évaluée de façon concomitante, sur des homogénats de poumons, pour la première fois

chez la Dinde. Contrairement aux modèles rats (Bowman *et al.*, 2001) ou cobayes (Vallor *et al.*, 2008 ; Lengerova *et al.*, 2012) déjà publiés, notre objectif n'était pas l'étude de la cinétique du développement fongique dans plusieurs organes cibles, mais plutôt l'évaluation de l'effet dose de l'inoculum sur ces paramètres. En parallèle, nous avons tenté d'établir des corrélations entre ces paramètres pour caractériser au mieux la masse fongique dans le poumon, seul organe à présenter des lésions macroscopiques extensives dans notre modèle. Dans les modèles mammifères, les marqueurs PCR et GM ont été évalués et comparés à la culture fongique semi-quantitative. Contrairement à notre étude, les modèles mammifères ont utilisé des animaux qui ont subi un traitement immunosuppresseur avec de la cyclophosphamide et de la cortisone (Vallor *et al.*, 2008 ; Lengerova *et al.*, 2012) ou bien des souris transgéniques déficientes en facteur C5 du complément (Bowman *et al.*, 2001).

La culture fongique, est une méthode semi-quantitative souvent utilisée pour évaluer la charge d'*Aspergillus* dans les organes. C'est le premier paramètre utilisé pour quantifier la masse fongique au niveau des organes cibles tels que les reins, le foie, les poumons et le cerveau. Elle a l'avantage d'être facile à mettre en place, mais ne détecte que les cellules viables. De plus, des études cinétiques réalisées chez les rongeurs, suggèrent que les numérations sur gélose ne seraient pas aussi performantes pour suivre le développement d'organismes pluricellulaires tels que les champignons filamenteux dans un parenchyme lorsque celui-ci est soumis à un traitement d'homogénéisation mécanique (Sheppard *et al.*, 2006). En effet, l'homogénéisation pourrait induire une possible sous-estimation de la masse fongique par destruction de cellules (Clemons et Stevens, 2009 ; Seyedmousavi *et al.*, 2011). Le dénombrement des UFC ne reflèterait donc pas avec précision le nombre de cellules viables des champignons filamenteux comme *A. fumigatus* (Latgé, 1999).

A l'exception de certains échantillons de sacs aériens obtenus à partir de dindes qui sont mortes spontanément avant 4 (ExpM) ou 8 (ExpA et ExpB) jours pi, aucun champignon n'a été détecté dans les prélèvements de la trachée ou des sacs aériens. Ceci pourrait être expliqué par l'élimination du champignon par l'organisme, ou une faible sensibilité de la méthode utilisée pour mettre en évidence *A. fumigatus* à partir de ces organes. Bien que les résultats ne soient pas strictement comparables (car l'intervalle post-inoculation diffère entre les oiseaux morts spontanément et les oiseaux euthanasiés), le nombre d'UFC moyen dans les poumons, la proportion et l'homogénéité des résultats positifs, semblent clairement augmenter avec la concentration de l'inoculum.

La détection d'*A. fumigatus* par mise en culture a été possible chez un grand nombre de dindes inoculées mais apparemment en bonne santé qui ont été euthanasiées jusqu'à 8 semaines après exposition au champignon (Richard *et al.*, 1981), et 8 ou 14 jours pi dans nos 3 expérimentations soulignant une persistance possible dans l'organisme à moyen voire long terme. Les moyennes des UFC/g de poumon étaient identiques chez les dindonneaux infectés avec  $10^7$  conidies ( $4.10^4$  conidies ExpM et ExpB) mais plus variables pour l'inoculum le plus élevé ( $4.10^5$  UFC pour ExpM et  $4.10^4$  UFC pour ExpA).

La masse fongique des poumons de dindonneaux survivants, mesurée par culture sur gélose, diminue au cours du temps dans les expériences ExpM (Inoc7) et ExpB (lot non-traité), tout comme chez la caille inoculée par voie intratrachéale avec  $5.10^6$  conidies (Tell *et al.*, 2010) ou le poulet inoculé par aérosolisation d'une suspension à  $10^9$  conidies (Thierry *et al.*, 2013). Chez les oiseaux morts spontanément dans ExpM (Inoc8), ExpA et ExpB (lots non-traités), les nombres d'UFC détectées dans les poumons sont équivalents même quand la concentration de l'inoculum ou le délai de survenue de la mort pi diffèrent. Ces résultats sont concordants avec ceux observés chez le cochon d'Inde immunodéprimé et nébulisé avec  $10^8$  conidies d'*A. fumigatus* chez lequel le nombre d'UFC/g de poumon diminue entre J3 et J7 pi (Vallor *et al.*, 2008). De façon générale, la masse fongique telle qu'évaluée chez les dindonneaux par culture sur gélose semble diminuer globalement après l'inoculation traduisant une réponse de l'organisme hôte vis-à-vis de l'agression, puis se stabiliser ou diminuer légèrement avec le temps, à l'instar de ce que l'on constate dans d'autres modèles aviaires (Richard *et al.*, 1984 ; Tell *et al.*, 2010 ; Thierry *et al.*, 2013) ou mammifères (Vallor *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Lengerova *et al.*, 2012 ; Bowman *et al.*, 2001).

Les résultats des cultures fongiques sont très bien corrélés aux paramètres cliniques (signes respiratoires et mortalité spontanée). En effet, tous les oiseaux morts spontanément au cours des 3 expérimentations présentaient des numérations moyennes supérieures à  $10^4$  UFC/g de poumon et allant jusqu'à  $5.10^4$  UFC/g et avaient présenté des signes cliniques. A l'inverse, les individus avec des valeurs inférieures à  $10^3$  UFC/g de poumon ne présentaient généralement pas de signes cliniques et la mortalité pour ces individus était nulle. Dans l'étude de Richard *et al.* (1981) la dose nécessaire pour tuer environ 50 % des dindes âgées de 3 semaines exposées à un aérosol de conidies d'*A. fumigatus* a été évaluée à  $5.10^5$  UFC/g de poumon. Contrairement à cette étude, la concentration minimale établie dans notre modèle

pour tuer 80 à 100 % des dindonneaux âgés d'une semaine infectés avec  $10^7$  ou  $10^8$  conidies était de  $10^4$  UFC/g de poumon. Ce seuil plus bas peut notamment s'expliquer par l'âge des dindonneaux que nous avons utilisés. Dans notre étude, cette concentration de  $10^4$  UFC/g de poumon apparaît donc comme un seuil chez les jeunes oiseaux incapables d'opposer une réponse immunitaire innée adaptée (Kunkle et Rimler, 1996 ; Féménia *et al.*, 2007 ; Thierry *et al.*, 2013) dans la phase critique du premier jour suivant l'infection expérimentale.

Le dosage du galactomannane (GM), un composant spécifique de la paroi du champignon, est utilisé en routine pour aider au diagnostic de l'aspergillose chez l'homme à partir de prélèvements de sérum ou de lavage broncho-alvéolaire. Le dosage GM par un test ELISA est relativement facile à mettre en œuvre, et est susceptible de refléter l'augmentation progressive de la masse fongique, due à l'extension apicale des hyphes (Clemons et Stevens, 2009). L'existence de kits commerciaux disponibles ont permis d'évaluer l'intérêt du dosage de ce polysaccharide dans le sérum de différentes espèces d'oiseaux souffrant d'aspergillose (Cray *et al.*, 2009a). Il a été testé également dans le cadre d'études de terrain, sur des poulets de chairs et des dindes (França *et al.*, 2012), ainsi que dans des modèles expérimentaux sur mammifères (Sheppard *et al.*, 2006 ; Vallor *et al.*, 2008 ; Chandenier *et al.*, 2009 ; Seyedmousavi *et al.*, 2011) et dindes (Le Loc'h *et al.*, 2006). Dans cette dernière étude, le dosage du GM au cours du temps dans le sérum de dindes immunodéprimées et inoculées avec  $10^8$  conidies d'*A. fumigatus* dans un sac aérien a permis de clairement discriminer les lots infectés et non-infectés entre 1 et 6 jours pi avec une cinétique caractérisée par un pic précoce (24 h pi) de GM suivi d'une diminution régulière de la concentration sérique (Le Loc'h *et al.*, 2006).

En tant qu'outil diagnostique, des résultats contradictoires ont été obtenus. Les valeurs de l'index GM peuvent en effet varier en fonction de l'espèce testée, ainsi que du stade de l'infection, d'où la difficulté notamment de définir une valeur seuil (cut-off) pour les différents ordres d'oiseaux (Cray *et al.*, 2009a). De même la sensibilité de la méthode peut entraîner de nombreux faux positifs dans le dosage GM des sérums d'oiseaux (Le Loc'h *et al.*, 2006). Les faux positifs s'expliquent en partie par le fait que du galactomannane naturel d'origine alimentaire peut être régulièrement trouvé dans les bâtiments d'élevage (Arné *et al.*, 2011). Dans l'étude de Le Loc'h *et al.* (2006) les dindes témoins non-infectées présentaient des index GM élevés (entre 1,5 et 3), souvent supérieurs au seuil de positivité retenu pour le sérum humain. De même dans l'étude terrain de França *et al.* (2012) les dindes témoins (sans lésions d'aspergillose) présentaient un index GM moyen de 3,9 dans le sérum. Cette

exposition possible à une contamination par l'environnement pourrait expliquer en partie les valeurs de GM positives obtenues à partir d'homogénats non dilués de certains poumons (par définition directement en contact avec l'air ambiant) de nos oiseaux témoins (non-infectés) hébergés dans un environnement propre mais non stérile.

Pour quantifier le GM, nous avons donc dû procéder à des dilutions des homogénats de poumons afin de réduire les valeurs des oiseaux témoins (« faux-positifs »). Les index de GM obtenus dans notre étude à partir de dilutions variant entre 1:100 à 1:2000 sont toujours très faibles et proches de la valeur seuil de détection chez les dindonneaux soumis aux deux doses les plus faibles (Inoc5 et Inoc6), ainsi que chez ceux non exposés à *A. fumigatus*. Tous les résultats GM de notre étude (ExpM, ExpA et ExpB) ont permis de discriminer les lots infectés des lots témoins. Les index GM des dindonneaux morts spontanément étaient toujours supérieurs à ceux des témoins non-infectés, avec une majorité des index GM supérieur à 3. Les valeurs de cet index obtenues chez tous les oiseaux morts spontanément, comparées à celles quasiment nulles mesurées chez les individus euthanasiés tout de suite après inoculation de doses variables de conidies non germées (ExpM), sont cohérentes avec la relation que l'on peut établir entre valeur de l'index et progression de l'infection (Sheppard *et al.*, 2006 ; Clemons et Stevens, 2009 ; Lengerova *et al.*, 2012). La détection du GM rend donc compte du développement actif des hyphes fongiques mais pas de la présence des seules conidies. En revanche, les index GM mesurés chez les dindonneaux inoculés avec  $10^7$  ou  $10^8$  conidies sont très variables au sein des lots, ce qui pourrait être le reflet d'une différence individuelle dans l'efficacité de la réponse de l'hôte. La masse fongique mesurée par l'index GM ne semble pas augmenter ou diminuer au cours du temps chez les dindonneaux survivants ou morts spontanément dans ExpM, ExpA et ExpB, contrairement à ce qui a été montré dans les modèles mammifères (Sheppard *et al.*, 2006 ; Vallor *et al.*, 2008). Dans ces études, les index GM détectés dans les poumons de souris (Sheppard *et al.*, 2006) ou de cochon d'Inde (Vallor *et al.*, 2008) infectés par *A. fumigatus* augmentaient au cours du temps et reflétaient la progression de l'infection. Cependant il est probable que la variabilité du taux de galactomannane détecté dans chacun des lots de notre étude ne nous permette pas de distinguer une augmentation ou une diminution du marqueur dans les poumons infectés au cours du temps. Enfin, il serait utile de connaître le temps de demi-vie de ce polysaccharide chez la dinde de manière à savoir dans quelle mesure des index positifs témoignent de la viabilité du champignon ou pourraient être obtenus après neutralisation de l'agent pathogène par l'hôte.

Des analyses histologiques au niveau des poumons des dindonneaux de ExpA et ExpB nous permettraient d'évaluer les corrélations entre les index GM détectés dans le parenchyme et les lésions microscopiques. Vallor *et al.* (2008) ont ainsi pu mettre en évidence chez le cochon d'Inde une relation positive entre les résultats du dosage pulmonaire du GM et l'extension des lésions dans cet organe (Vallor *et al.*, 2008).

Une méthode de PCR quantitative en temps réel a été récemment développée dans un modèle murin pour mesurer la charge fongique et suivre sa progression dans différents organes, dans le but d'évaluer l'efficacité des thérapies antifongiques (Bowman *et al.*, 2001 ; Vallor *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Lengerova *et al.*, 2012). Cet outil moléculaire permet à la fois de détecter les conidies et les hyphes. Il peut être très sensible et spécifique, mais tout comme le dosage du GM, il ne permet pas de distinguer formellement champignon mort ou vivant (Clemons et Stevens, 2009). Les gènes cibles incluent un gène simple copie *FKS1* (Vallor *et al.*, 2008) ou des gènes multicopies, en particulier des gènes de l'ADN ribosomal et des ITS (*Internal Transcribed Spacer*). La stratégie consistant à cibler des gènes multicopies amplifiés spécifiquement ou dans le cadre d'une PCR nichée (Lengerova *et al.*, 2012) améliore la sensibilité de la méthode mais peut en rendre la standardisation délicate en raison du nombre variable de copies dans le génome (Seyedmousavi *et al.*, 2011). Pour autant que l'on sache, la détection d'*A. fumigatus* par qPCR a été testée ici pour la première fois dans les poumons d'oiseaux. Le signal de la qPCR des tissus infectés a été comparé à une gamme réalisée à partir de poumons sains directement inoculés par des concentrations calibrées de conidies. Nous avons choisi d'exprimer la masse fongique en unité EC (équivalent conidie)/g de tissu (Bowman *et al.*, 2001). La cible *FKS* a été choisie d'après l'étude de Vallor *et al.* (2008) qui ont obtenu une bonne sensibilité pour la quantification d'*A. fumigatus* dans les poumons de cochon d'Inde. Les résultats de qPCR avec les amorces amplifiant *FKS* (ExpM) nous ont conduit à tester une autre cible afin d'abaisser le seuil de détection en choisissant le gène multicopies 28SrDNA (100 copies) (Challier *et al.*, 2004). Cette PCR est utilisée en routine à l'hôpital Henri Mondor de Créteil (94) pour la détection de l'aspergillose. En toute logique, le niveau de détection du champignon filamenteux par qPCR 28S était d'environ 1 log<sub>10</sub>EC/g de poumon plus faible que celui obtenu avec le gène monocopie. La limite de détection approximative était de 10<sup>3</sup> EC/g de poumon, ce qui est très proche des 2.10<sup>3</sup> EC/g (cible 18S) estimés dans le sang de souris infectées expérimentalement (Bowman *et al.*, 2001). L'utilisation d'une PCR nichée comme dans l'étude de Lengerova *et al.* (2012) pourrait réduire encore le seuil de détection.

Les mesures réalisées sur les oiseaux euthanasiés juste après l'inoculation, semblent montrer que la qPCR est moins sensible que le dénombrement des UFC ; cette différence pourrait être expliquée par une plus faible efficacité de l'extraction de l'ADN des conidies à partir de tissus (Zhao *et al.*, 2010 ; Sheppard *et al.*, 2006). La proportion des échantillons positifs par qPCR et les moyennes de  $\log_{10}CE/g$  ont augmenté avec la concentration de conidies pour les inocula ayant provoqué morbidité et mortalité. La survenue de la mortalité coïncidait clairement avec les valeurs les plus élevées de qPCR chez les dindonneaux infectés avec  $10^7$  ou  $10^8$  conidies, comme cela a été observé dans un modèle souris (Bowman *et al.*, 2001).

Une forte corrélation entre les résultats de la qPCR et la numération par culture a pu être observée, la première technique s'avérant nettement plus sensible à l'exception des oiseaux euthanasiés juste après inoculation. Cette corrélation est d'autant plus forte en présence d'hyphes dans le parenchyme et non de conidies (Sheppard *et al.*, 2006). Quand les données d'Inoc8 (ExpM) sont comparées avec celles de modèles mammifères équivalents (Bowman *et al.*, 2001 ; Vallor *et al.*, 2008), les index de GM et la qPCR semblent plus corrélés avec les pics de l'infection par rapport aux valeurs des UFC, ce qui pourrait être partiellement expliqué par le fait que la numération par culture fongique stagne ou décroît avec le temps (Zhao *et al.*, 2010). Cependant, dans ExpA et ExpB, la qPCR et le GM semblent moins bien corrélés entre eux qu'avec les valeurs d'UFC. Ceci peut s'expliquer en partie par la trop grande variabilité des index GM obtenus pour chacun des lots.

La combinaison des différents marqueurs (UFC, EC et index GM) fournit des données complémentaires sur le développement du champignon dans les tissus. Pour les essais thérapeutiques, le suivi seul de la mortalité ne permet pas de visualiser tous les effets potentiels de la molécule. Dans ce cas, la combinaison des marqueurs permettra de discriminer plus précisément les lots non-traités et traités et d'observer des effets même en cas de faible mortalité.

### **Effet des traitements**

La molécule énilconazole est un azolé qui a une action prouvée *in vitro* et *in vivo* contre les *Aspergillus* (Thienpont *et al.*, 1981 ; Desplenter, 1979 ; Van Cutsem *et al.*, 1988). Plusieurs études ont également montré son efficacité en tant que désinfectant de l'environnement

(Desplenter, 1979 ; Desplenter et Marsboom, 1980 ; Braem, 1986), mais aussi en tant que traitement dans un modèle expérimental d'aspergillose chez le poulet (Van Cutsem, 1983). Cependant cette molécule ne dispose pas d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des oiseaux. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer l'efficacité de l'énilconazole dans notre modèle dinde d'aspergillose aiguë, en réalisant deux expérimentations distinctes (ExpA et ExpB).

Dans la première (ExpA), les dindonneaux d'une semaine ont été inoculés avec  $10^8$  conidies, dose qui induisait 100 % de mortalité dans notre modèle, puis traités avec l'énilconazole en condition confinée. L'efficacité de l'énilconazole a été évaluée en traitant concomitamment 3 lots d'oiseaux n'étant pas au même stade de l'infection expérimentale. Les dindonneaux inoculés 48 h avant traitement, en référence à ExpM, correspondaient à des individus présentant déjà des signes cliniques manifestes, ainsi que des lésions macroscopiques et microscopiques (début de mortalité). Les animaux inoculés 24 h avant l'initiation du traitement, étaient en tout début d'infection (pas de signes cliniques nets mais présence de lésions microscopiques). Nous avons également voulu étudier l'effet prophylactique de l'azolé en infectant le troisième lot 7 heures après la première nébulisation d'énilconazole. L'emploi dans les élevages avicoles de ce principe actif par nébulisation à la dose de 20 mg/kg, une fois par jour, pendant 3 jours consécutifs (Guérin *et al.*, 2012) nous a poussé à reproduire ce premier protocole thérapeutique au cours de cette expérimentation. Les animaux ont été traités en enceinte confinée, dans une chambre d'inhalation, où seuls les oiseaux ont reçu l'énilconazole par nébulisation, à l'aide d'un nébuliseur médical. Les paramètres généraux, ainsi que les indicateurs utilisés pour la quantification de la masse fongique pulmonaire ont été évalués tout au long de l'expérimentation.

La séquence d'inoculation par rapport au début du traitement n'a pas eu d'effet sur l'apparition et la gravité des signes cliniques, ainsi que sur la mortalité. En complément, l'analyse des biomarqueurs (culture fongique, qPCR et du dosage GM) n'a pas permis de discriminer les lots traités et non-traités. L'énilconazole, dans ces conditions d'utilisation, n'a eu aucun effet curatif ou prophylactique sur les dindonneaux infectés, même lorsque le traitement a précédé l'inoculation du champignon.

Plusieurs modifications du protocole ont été opérées entre ExpA et ExpB. Afin d'écartier l'hypothèse selon laquelle l'inoculum utilisé serait trop important pour espérer

obtenir un quelconque effet thérapeutique, la dose d'*Aspergillus* administrée a été réduite à  $10^7$  conidies/animal. D'après nos précédents résultats, nous savions qu'un tel inoculum induisait une mortalité plus faible et surtout plus tardive qu'avec une concentration dix fois supérieure, avec l'apparition de signes cliniques 3 à 6 jours pi et un début de mortalité 5 jours pi. Cependant la masse fongique détectée dans les poumons de ces individus était suffisamment importante pour être mesurée par qPCR et GM. Les lésions pulmonaires enregistrées au niveau des poumons de certains individus survivants du lot Inoc7 laissaient par ailleurs suggérer une mortalité accrue si l'expérience avait été allongée. C'est pourquoi nous avons décidé de suivre les dindonneaux dans ExpB jusqu'à 14 jours après l'inoculation au lieu de 8 jours. Les résultats de mortalité obtenus pour ExpB valident cette hypothèse puisque la mortalité se poursuit jusqu'à J11 pour les lots traités et non-traités et atteint en moyenne 40-45 %, contre 30 % à J8 pour Inoc7.

De plus, un second lot traité avec un autre antifongique a été ajouté afin de savoir s'il était possible de traiter les dindonneaux infectés avec une autre molécule antifongique (témoin de traitement). La molécule choisie a été l'itraconazole utilisée avec succès dans des cas d'aspergillose chez les oiseaux infectés naturellement (Forbes *et al.*, 1992 ; Shannon, 1992 ; Bunting *et al.*, 2009) ou expérimentalement (Gümüşsoy *et al.*, 2004). Nous avons choisi un protocole thérapeutique identique à celui publié par Gümüşsoy *et al.* (2004) chez la caille inoculée par voie intratrachéale avec  $5.10^5$  conidies d'*A. fumigatus*, à savoir 10 mg d'itraconazole/kg *per os* pendant 7 jours après infection. Les résultats de ExpB ont permis de montrer que le traitement par l'itraconazole induisait une réduction significative des signes cliniques et un effet thérapeutique net, puisque 14 jours après inoculation aucune mortalité n'avait été constatée. Gümüşsoy *et al.* (2004) avaient noté une diminution de la mortalité de 68 % chez les cailles infectées et traitées avec l'itraconazole. Cependant le taux de mortalité observé chez les individus non-traités dans ce modèle caille était de 100 % en 11 jours, contre 40 % en 14 jours dans notre étude.

Le dernier paramètre modifié dans ExpB a concerné le nombre total de nébulisations de l'antifongique et les conditions d'administration. En effet, les dindonneaux ont été traités 6 fois au total par l'énilconazole directement dans leur boîte d'hébergement (sur litière) avec un appareil identique à ceux utilisés en élevage, ceci afin de se rapprocher des conditions de traitement dans les élevages, et de tester un éventuel effet protecteur lié à la rémanence de la

molécule dans l'environnement. Les résultats de morbidité et de mortalité n'ont pas permis de mettre en évidence des différences entre les lots non-traités et traités par l'énilconazole.

Les résultats de culture, qPCR et dosage GM ont mis en évidence une diminution de la masse fongique au niveau des poumons des dindonneaux traités par l'itraconazole par rapport aux témoins, en revanche, aucune différence n'a pu être montrée entre les lots non-traités et traités par l'énilconazole. La quantité moyenne d'UFC/g du lot traité par itraconazole était inférieure à  $10^3$  correspondant à des oiseaux n'exprimant pas de signes cliniques (ExpM). De même, la moyenne des index GM est proche du seuil de détection. Les résultats PCR montrent une diminution de la masse fongique des individus traités par itraconazole, avec un nombre d'EC/g de poumon inférieur à  $10^5$ , sauf pour deux individus, ce qui est très parfaitement corrélé avec l'absence de signes cliniques et de mortalité. De la même façon, le nombre d'EC/g de poumon détecté pour les lots non-traités et traités par l'énilconazole est corrélé positivement avec la morbidité et la mortalité. Les individus morts spontanément et ayant présenté des signes cliniques ont une valeurs d'EC dans le poumon toujours supérieure à  $10^5$  EC/g de poumon.

On peut cependant noter que la diminution de la masse fongique dans les poumons du lot traité par itraconazole (par rapport aux lots non-traités ou traités par énilconazole) est moins visible par la méthode qPCR que par la culture et le dosage GM. Ceci peut s'expliquer par le fait que la qPCR permet la détection de cellules viables et non-viables. La grande sensibilité de cette technique pourrait conduire à sous-estimer l'effet thérapeutique des molécules antifongiques (MacCallum *et al.*, 2005).

Aucun effet protecteur de l'énilconazole n'a pu être observé dans notre étude, aux doses de  $20 \text{ mg/m}^3$  appliquées une ou deux fois par jour pendant 3 jours consécutifs, contrairement à certaines études de terrain (Redmann et Schildger, 1989) et expérimentales réalisées sur des oiseaux infectés par *Aspergillus* qui avaient montré un effet de cette molécule (Van Cutsem, 1983 ; Perelman *et al.*, 1992). Cependant les formulations et les doses employées dans ces études différaient de nos protocoles. Dans l'étude de Van Cutsem (1983), les dindonneaux infectés par aérosolisation de conidies d'*A. fumigatus* ont été simultanément traités par fumigation d'énilconazole pendant 30 minutes à la dose de  $208 \text{ mg/m}^3$  (fumigène Clinafarm®). Le traitement a induit une diminution du taux de mortalité d'environ 40 à 50 % par rapport aux lots non-traités. La molécule administrée une seule fois à la dose employée

s'est avérée plus efficace que dans nos essais thérapeutiques. Dans ExpB, 120 mg/m<sup>3</sup> d'énilconazole au total (6 aérosolisations) ont été aérosolisés dans l'environnement, contre 208 mg/m<sup>3</sup> en une fois pour Van Cutsem (1983). L'étude terrain de Redmann et Schildger (1989) a montré une efficacité de l'énilconazole à la dose de 150 mg/m<sup>2</sup> (solution Clinafarm®) sur un élevage de poulets atteints d'aspergillose, avec une diminution de la mortalité dès le deuxième jour après le traitement. Dans cette étude l'administration de la molécule s'est faite en une seule aérosolisation, comme dans nos essais, mais à une dose plus importante que les 20 mg/m<sup>3</sup> utilisés.



# **Conclusion**

## **Et**

# **perspectives**



Nous avons développé un nouveau modèle standardisé et répétable d'aspergillose aiguë chez le dindonneau par aérosolisation intratrachéale de conidies d'*A. fumigatus*. L'inoculation de  $10^7$  ou  $10^8$  conidies *via* le MicroSprayer® induit le développement rapide de signes cliniques typiques de l'aspergillose respiratoire tels que dyspnée, halètements, respiration sifflante, associés à une perte de poids et une apathie, ainsi qu'une mortalité plus ou moins précoce et importante en fonction de la dose. La taille de l'inoculum a un effet sur la chronologie de la morbidité et de la mortalité, ainsi l'inoculation de  $10^7$  conidies induit une morbidité et une mortalité plus tardive (4-8 jours pi) que pour une dose de  $10^8$  conidies (2-4 jours pi).

Les indicateurs de la masse fongique (UFC, GM et qPCR) ont permis pour chaque expérience la discrimination des lots infectés par rapport aux lots témoins non-infectés. La culture fongique, qui ne détecte que les cellules viables, s'est révélée moins sensible que les méthodes qPCR et dosage GM, qui détectent des molécules provenant de cellules viables ou non. De plus les indicateurs sont corrélés positivement entre eux, ainsi qu'avec l'apparition des signes cliniques et qu'avec la mortalité. Les UFC, les EC et dans une moindre mesure les index GM, en parallèle des signes cliniques nous permettent d'évaluer le stade ou la gravité de l'infection.

En l'absence d'euthanasies séquentielles dans notre étude, il n'est pas possible d'évaluer la cinétique de l'infection, cependant les résultats de qPCR et UFC suggèrent une masse fongique plus faible dans les poumons des dindonneaux morts plus tardivement après inoculation.

L'effet de l'énilconazole a été testé dans deux situations différentes, avec un traitement en condition confinée et une dose minimale (3 nébulisations), ou un traitement plus large directement dans les boxes d'hébergement avec une dose doublée (6 aérosolisations). Dans la première expérience, les dindonneaux ont été inoculés avec  $10^8$  conidies, tandis que dans la seconde, la dose employée était de  $10^7$  conidies. Quelle que soit la dose de conidies inoculées et le nombre d'aérosolisations du traitement administré, aucun effet protecteur de l'énilconazole n'a pu être observé. En revanche, le traitement par l'itraconazole, à la dose de 10 mg/kg pendant 7 jours, également testé dans la seconde expérience a permis la guérison des oiseaux infectés. Ces résultats indiquent l'efficacité de l'itraconazole chez les dindes dans le cas d'aspergillose expérimentale.

L'absence d'efficacité de la molécule énilconazole sur la mortalité ou le développement de la masse fongique au niveau des poumons dans notre étude peut s'expliquer par une dose employée insuffisante. En effet les 20 mg/m<sup>3</sup> semblent être une dose assez faible par rapport aux doses d'itraconazole ou d'énilconazole rapportées dans d'autres études thérapeutiques (Van Cutsem, 1983 ; Redmann et Schildger, 1989 ; Perelman *et al.*, 1992) qui sont 2 à 10 fois plus concentrées. Il serait donc intéressant de réaliser une autre expérimentation avec des doses d'énilconazole croissantes, en conservant le modèle expérimental d'aspergillose aiguë avec une inoculation de 10<sup>7</sup> conidies et l'utilisation d'un « gold standard » comme l'itraconazole.

De même, on peut se demander si la molécule aérosolisée par le nébuliseur ou l'atomiseur pénètre bien dans le tractus respiratoire. Pour répondre à cette question, la recherche de résidus pourrait être réalisée en particulier à partir des poumons. Une étude de Janssen Santé Animale (Meissonnier *et al.* : compte-rendu Janssen) a été réalisée pour la recherche de résidus d'énilconazole de dindes préalablement traitées par brumisation (à l'aide d'un moteur thermique) avec une solution diluée d'Imavéral® 2 fois par jour pendant 3 jours à la dose de 20 mg/m<sup>3</sup>. Des quantités très faibles d'énilconazole ont été retrouvées au niveau de la peau 12 h après l'arrêt des traitements, tandis que le foie, les reins et les muscles étaient exempts de résidus. Cependant aucune analyse n'a été réalisée sur les poumons. C'est pourquoi nous souhaiterions réaliser une étude complémentaire pour la recherche de résidus d'énilconazole dans les poumons des dindonneaux infectés expérimentalement dans notre modèle d'aspergillose et traités selon le même protocole que ExpB (20 mg/m<sup>3</sup>, 2 fois par jour, pendant 3 jours).

Des analyses histologiques ont été prévues, à l'heure actuelle non encore réalisées, pour évaluer les lésions chez les individus non-traités ou traités par l'itraconazole ou l'énilconazole. En effet, malgré l'absence de mortalité dans le lot traité par l'itraconazole, des quantités importantes d'EC/g de poumon sont toujours détectées. Il aurait été intéressant de savoir si ces individus présentaient toujours des lésions. De même, pour évaluer correctement l'effet de l'énilconazole, des analyses histopathologiques auraient été nécessaires, comme dans l'étude de Perelman *et al.* (1992). Dans cette étude, des dindes ont été infectées expérimentalement avec 10<sup>6</sup> conidies d'*A. flavus* inoculées par voie intrapulmonaire puis traitées 3 jours pi avec de l'énilconazole par aérosolisation d'une solution à 5 % de Clinafarm® (5 mg/kg). Les lésions macroscopiques et microscopiques observées chez les

individus traités étaient fortement réduites par rapport aux témoins non-traités (Perelman *et al.*, 1992).

L'absence d'efficacité de l'énilconazole sur la mortalité ou le développement de la masse fongique au niveau des poumons dans notre étude semble en contradiction avec les observations de terrain qui indiquent un effet de la nébulisation d'énilconazole sur le déroulement des épisodes d'aspergillose en élevage avicole. Cet effet favorable doit être confirmé mais il pourrait être en relation avec la réduction de la masse fongique dans l'environnement et donc du risque de contamination ou de recontamination des oiseaux (plutôt que d'un effet antifongique direct sur les oiseaux eux-mêmes). Les conditions de ExpB (20 mg d'énilconazole/m<sup>3</sup>, 2 fois par jour, pendant 3 jours, directement dans les locaux d'hébergement) sont plus proches de celles des élevages aviaires mais on peut considérer que le niveau de contamination de l'environnement dans les conditions expérimentales (locaux du CRBM à l'EnvA) était bien inférieur à ce qui doit être observé dans les élevages confrontés à un épisode d'aspergillose. Pour confirmer l'intérêt de la nébulisation d'énilconazole, un essai thérapeutique en élevage avicole semble indispensable. Ce type d'essai avait été programmé au début de la réalisation de notre thèse d'Université. Cependant, les premières étapes (mise au point du modèle avec validation de plusieurs marqueurs et essais thérapeutiques dans les conditions expérimentales) ont représenté une quantité importante de travail et l'essai en élevage n'a pas pu être mis en place dans le temps imparti. La réalisation d'un essai thérapeutique en élevage avicole impose qu'un élevage infecté soit très rapidement détecté (dès les premiers cas d'aspergillose survenus) puis fasse l'objet d'un suivi clinique et mycologique (avec des prélèvements sur les animaux mais aussi dans l'environnement). Le niveau de contamination des animaux et de l'environnement devra être évalué avant et après les phases de nébulisation d'énilconazole.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamczyk, E.** *Les antifongiques en médecine vétérinaire*. Thèse, Université Claude-Bernard, Lyon I (2011)
- Aengwanich, W. & Chinrasri, O.** Effect of dexamethasone on differential white blood cell counts and heterophil/lymphocyte ratio in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **25**, 183–189 (2003)
- Agarwal, R., Singh, N. & Gupta, D.** Pulmonary hypertension as a presenting manifestation of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.* **51**, 37–40 (2009)
- Ahmad, S., Al-Shaikh, A.A. & Khan, Z.** Development of a novel inhalational model of invasive pulmonary aspergillosis in rats and comparative evaluation of three biomarkers for its diagnosis. *PLoS one* **9**, e100524 (2014)
- Aimanianda, V. & Latgé, J.P.** Fungal hydrophobins forms a stealth preventing immune recognition of airborne conidia. *Virulence* **1**, 185–187 (2010)
- Akan, M., Haziroğlu, R., İlhan, Z., Sareyyüpoğlu, B. & Tunca, R.** A case of aspergillosis in a broiler breeder flock. *Avian Dis.* **46**, 497–501 (2002)
- Alcazar-Fuoli, L. & Mellado, E.** Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Front. Microbiol.* **3**, 439 (2013)
- Alcazar-Fuoli, L. et al.** Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* **73**, 339–347 (2008)
- Alshareef, F. & Robson, G.D.** Genetic and virulence variation in an environmental population of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **160**, 742–751 (2014)
- Anand, R., Shankar, J., Singh, A.P. & Tiwary, B.N.** Cytokine milieu in renal cavities of immunocompetent mice in response to intravenous challenge of *Aspergillus flavus* leading to aspergillosis. *Cytokine* **61**, 63–70 (2013)
- Andrews, C.P. & Weiner, M.H.** Immunodiagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in rabbits. Fungal antigen detected by radioimmunoassay in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* **124**, 60–64 (1981)
- Angarano, D. & Scott, D.** Use of ketoconazole in treatment of dermatophytosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 1433–1434 (1987)
- Arca-Ruibal, B. et al.** Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *Vet. Rec.* **158**, 442–444 (2006)
- Arendrup, M.C.** Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 42–48 (2014)
- Arné, P. et al.** *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *Int. J. Microbiol.* (2011)
- Arthington-Skaggs, B.A., Motley, M., Warnock, D.W. & Morrison, C.J.** Comparative evaluation of PASCO and national committee for clinical laboratory standards M27A broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2254–2260 (2000)

- Atasever, A. & Gümüşsoy, K.S.** Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **51**, 19–22 (2004)
- Aufauvre-Brown, A., Brown, J.S. & Holden, D.W.** Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 778–780 (1998)
- Avunduk, A.M., Beuerman, R.W., Warnel, E.D., Kaufman, H.E. & Greer, D.** Comparison of efficacy of topical and oral fluconazole treatment in experimental *Aspergillus keratitis*. *Curr. Eye Res.* **26**, 113–117 (2003)
- Badali, H. et al.** Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. *Mycoses* **56**, 659–663 (2013)
- Balajee, S.A., Gribskov, J.L., Hanley, E., Nickle, D. & Marr, K.A.** *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* **4**, 625–632 (2005)
- Balajee, S.A., Nickle, D., Varga, J. & Marr, K.A.** Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* **5**, 1705–1712 (2006)
- Ballard, S.A., Kelly, S.L., Ellis, S.W. & Trole, P.F.** Interaction of microsomal cytochrome P-450 isolated from *Aspergillus fumigatus* with fluconazole and itraconazole. *J. Med. Vet. Mycol.* **28**, 327–334 (1990)
- Balloy, V., Huerre, M., Latgé, J.P. & Chignard, M.** Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* **73**, 494–503 (2005)
- Bang, B.G. & Bang, F.B.** Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens. *Am. J. Pathol.* **53**, 735–751 (1968)
- Beauvais, A., Drake, R., Ng, K., Diaquin, M. & Latgé, J.P.** Characterization of the 1,3-beta-glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 3071–3078 (1993)
- Beauvais, A. et al.** Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J. Bacteriol.* **183**, 2273–2279 (2001)
- Beernaert, L.A., Pasmans, F., Haesebrouck, F. & Martel, A.** Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathol.* **37**, 545–549 (2008)
- Beernaert, L.A. et al.** Designing voriconazole treatment for racing pigeons: balancing between hepatic enzyme auto induction and toxicity. *Med. Mycol.* **47**, 276–285 (2009a)
- Beernaert, L.A. et al.** Designing a treatment protocol with voriconazole to eliminate *Aspergillus fumigatus* from experimentally inoculated pigeons. *Vet. Microbiol.* **139**, 393–397 (2009b)
- Beernaert, L.A. et al.** Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both itraconazole and voriconazole. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **53**, 2199–2201 (2009c)
- Beernaert, L.A., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F. & Martel, A.** *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathol.* **39**, 325–331 (2010)
- Bennett, J.** *An Overview of the Genus Aspergillus*. in *Aspergillus Molecular Biology and Genomics* (eds Machida, M. & Gomi, K.) 1–17 (Horizon Scientific Press, 2010)

- Benveniste P.** Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 429–457 (2004)
- Berenguer, J. et al.** Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 1079–1086 (1995)
- Bernard-Cardona, M.** *Protéines et paroi chez Aspergillus fumigatus*. Doctoral dissertation, INAPG, AgroParisTech (2003)
- Bernard, M. & Latgé, J.-P.** *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* **39**, 9–17 (2001)
- Bienenstock, J., Johnston, N. & Perey, D.Y.** Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab. Invest.* **28**, 686–692 (1973)
- Bienenstock, J. & Befus, D.** Gut- and bronchus-associated lymphoid tissue. *Am. J. Anat.* **170**, 437–445 (1984)
- Bille, J.** Diagnosis of invasive fungal infections. *Rev. Med. Suisse* **1**, 904–906 (2005)
- Bowden, D.H.** Macrophages, dust, and pulmonary diseases. *Exp. Lung. Res.* **12**, 89–107 (1987)
- Bowman, J.C. et al.** Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3474–3481 (2001)
- Brackenbury, J.H.** *Ventilation of the lung-air sac system*. in *Bird Respiration* Vol. 1 (ed. Sellar, T.J.) 39–69 (CRC Press, Boca Raton, Fla, 1987)
- Braem, G.** The efficacy of enilconazole for the disinfection of hatcheries contaminated with *Aspergillus fumigatus*. *Isr. J. Vet. Med.* **42**, 108–113 (1986)
- Brain, J.D.** *Macrophages in the respiratory tract*. in *Handbook of Physiology, Circulation and Nonrespiratory Functions* Vol. 1 (eds Fishman, A.P. & Fisher, A.B.) 447–471 (American Physiological Society, Bethesda, MD, 1985)
- Branson, W.R., Harrison, G.J. & Harrison, L.R.** (eds) *Avian medicine: principles and application*. (Wingers Publishing, Inc., 1994)
- Brennan, M., Thomas, D.Y., Whiteway, M., Kavanagh, K.** Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **34**, 153–157 (2002)
- Brown, P.A. & Redig, P.T.** *Aspergillus ELISA: a tool for detection and management*. in *Proc. Annu. Conf. Assoc. Avian Vet.* 295–300 (1994, December)
- Bunting, E.M. et al.** Evaluation of oral itraconazole administration in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *J. Zoo Wildl. Med.* **40**, 508–518 (2009)
- Cacciuttolo, E., Rossi, G., Nardoni, S., Legrottaglie, R. & Mani, P.** Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. *Vet. Res. Commun.* **33**, 521–527 (2009)
- Camps, S.M. et al.** Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 10–16 (2012)

- Capilla, J., Clemons, K.V. & Stevens, D.A.** Animals models: an important tool in mycology. *Med. Mycol.* **45**, 657–684 (2007)
- Carle, S.** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel* **36**, 29–41 (2003)
- Carlotti, D.** *Malassezia dermatitis in the dog.* in *Proc. 26th World Congress WSAVA*. 279–281 (Vancouver, Canada, 2001)
- Chakrabarti, A., Jatana, M. & Sharma, S.C.** Rabbit as an animal model of paranasal sinus mycoses. *Med. Mycol.* **35**, 295–297 (1997)
- Challier, S., Boyer, S., Abachin, E. & Berche, P.** Development of a serum-based taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 844–846 (2004)
- Chandenier, J. et al.** The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* **52**, 239–245 (2009)
- Chaudhary, S.K. & Sadana, J.R.** Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Clinical signs and haematological changes. *Mycopathologia* **102**, 179–184 (1998)
- Chaudhary, B. & Singh, B.** Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* in chicks, guinea fowl, rabbits and mice/Pathogenität von *Aspergillus fumigatus* bei hühnern, perlhühnern, kaninchen und mäusen. *Mycoses* **26**, 421–429 (1983)
- Cheema, M.S. & Christians, J.K.** Virulence in an insect model differs between mating types in *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **49**, 202–207 (2011)
- Chermette, R. & Bussieras, J.** *Abrégé de Parasitologie vétérinaire, Fascicule V: Mycologie vétérinaire.* (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, 1993)
- Chiang, L.Y., Sheppard, D.C., Gravelat, F.N., Patterson, T.F. & Filler, S.G.** *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infect. Immun.* **76**, 3429–3438 (2008)
- Chiller, T.M. et al.** Development of a murine model of cerebral aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **186**, 574–577 (2002)
- Chowdhary, A. et al.** Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the cyp51A gene in India. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 362–366 (2012)
- Clemons, K.V. & Stevens, D.A.** The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Med. Mycol.* **43**, S101–S110 (2005)
- Clemons, K.V. & Stevens, D.A.** Animal models of *Aspergillus* infection in preclinical trials, diagnostics and pharmacodynamics: What can we learn from them? *Med. Mycol.* **44**, S119–S126 (2006)
- Clemons, K.V. & Stevens, D.A.** Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load. *Med. Mycol.* **47**, S132–S137 (2009)
- Converse, K.A.** *Aspergillosis.* in *Infectious diseases of wild birds* (eds Thomas, N.J., Hunter, D.B. & Atkinson, C.T) 360–374 (John Wiley & Sons, 2008)
- Corbel, M.J. & Eades, S.M.** Examination of the effect of age and acquired immunity on the susceptibility of mice to infection with *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* **60**, 79–85 (1977)

- Cornet, M., Fleury, L., Maslo, C., Bernard, J.F. & Brucker, G.** Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *J. Hosp. Infect.* **51**, 288–296 (2002)
- Costa, C. et al.** Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J. Microbiol. Methods* **44**, 263–269 (2001)
- Cray, C., Watson, T. & Arheart, K.L.** Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. *Avian Dis.* **63**, 491–494 (2009a)
- Cray, C., Watson, T., Rodriguez, M. & Arheart, K.L.** Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. *J. Zoo Wildl. Med.* **40**, 64–70 (2009b)
- Crespo, R., Yamashiro, S. & Hunter, D.B.** Development of the thoracic air sacs of turkeys with age and rearing conditions. *Avian Dis.* **42**, 35–44 (1998)
- Cubo, J. & Casinos, A.** Incidence and mechanical significance of pneumatization in the long bones of birds. *Zool. J. Linn. Soc.* **130**, 499–510 (2000)
- Dahlhausen, B., Abbott, R. & VanOverloop, P.** Rapid detection of pathogenic *Aspergillus* species in avian samples by real-time PCR assay: a preliminary report. in *Proc. Annu. Conf. Assoc. Avian Vet.* (ed. Bergman, E.) 37 (New Orleans, LA, USA, 2004)
- Dannaoui, E. et al.** Invasive aspergillosis associated with prolonged leukopenia in a murine model. *J. Mycol. Med* **9**, 221–225 (1999)
- Davis, J.L., Papich, M.G. & Heit, M.C.** Antifungal and antiviral drugs. in *Veterinary pharmacology & therapeutics* 9th edn (eds Riviere, J.E. & Papich, M.G.) 1013–1049 (Wiley-Blackwell, Ames, 2009)
- Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A. & Kaiser, P.** (eds). *Avian immunology*. (Academic Press, 2008)
- Debey, M.C. et al.** Effect of environmental variables in turkey confinement houses on airborne *Aspergillus* and mycoflora composition. *Poult. Sci.* **74**, 463–471 (1995)
- De Keyser, H. & Van den Brande, M.** Ketoconazole in the treatment of dermatomycosis in cats and dogs. *Vet. Quart.* **5**, 142–144 (1983)
- Desoubeaux, G. & Chandener, J.** A nebulized intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Methods Mol. Biol.* **845**, 511–518 (2012)
- Desoubeaux, G., Bailly, E. & Chandener, J.** Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. *Medecine et maladies infectieuses* **44**, 89–101 (2014)
- Desoutter, A.** *Intérêt des modèles expérimentaux d'aspergillose ; étude particulière des stades précoces de l'infection chez les poussins (Gallus gallus)*. Thèse Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort (2008)
- Desplenter, L.** New possibilities in the treatment of dermatomycoses and of *Aspergillus fumigatus*. *Proc. 1st Eur. Congr. Vet. Pharmacol. Toxicol., Zeist Sept.* **25–28**, 266–274 (1979)
- Desplenter, L.** Aspergillosis in animal health: environmental control. in *Aspergillus and Aspergillosis*. (eds Vanden Bossche, H. Mackenzie, D.W.R. & Cauwenbergh, G.) 289–297 (Plenum Press, New York, 1988)

- Desplenter, L.** Dermatophytosis in small animals: topical treatment and environmental control with enilconazole. *Tijdschr Diergeneeskd* **114**, 33S–34S (1989)
- Desplenter, L. & Marsboom, R.** Enilconazole, a new antimycotic drug in veterinary medicine. *3rd Congr. Argentino de ciencias Vet.* Nov. 2–5 (1980)
- Desplenter, L. & Van Cutsem, J.** *In vitro* antifungal activity of parconazole (R39500). in *Preclinical Research Report. Janssen Research Products Information Service* (ed. Cauwenbergh, G.) 289–297 (Plenum Press, New York, 1980)
- Di Somma, A., Bailey, T., Silvanose, C. & Garcia-Martinez, C.** The use of voriconazole for the treatment of aspergillosis in falcons (*Falco species*). *J. Avian Med. Surgery* **21**, 307–316 (2007)
- Dixon, D.M., Polak, A. & Walsh, T.J.** Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect. Immun.* **57**, 1452–1456 (1989)
- Dorrestein, G.M.** *Quick reference for drug dosing.* in *Avian Medicine* (eds Tully, T.N., Lawton, M.P.C. & Dorrestein, G.M.) 386–390 (Butterworth Heinemann, Oxford, United Kingdom, 2000)
- Dotterweich, H.** Versuche über den Weg der Atemluft in der Vogellunge. *Zeitschrift vergleichenden Physiol.* **11**, 271–284 (1930)
- Duncker, H.R.** Structure of the avian respiratory tract. *Respir. Physiol.* **22**, 1–19 (1974)
- Duong, M. et al.** Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* **178**, 1472–1482 (1998)
- Dyar, P.M., Fletcher, O.J. & Page, R.K.** Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. *Avian Dis.* **28**, 250–255 (1984)
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.** *Avian anatomy.* in *Textbook of veterinary anatomy 3rd edn* (eds Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.) (WB Saunders, Philadelphia, 2002)
- Eisenstein, D.J., Biddinger, P.W. & Rhodes, J.C.** Experimental murine invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **93**, 510–515 (1990)
- El-Lethey, H., Huber-Eicher, B. & Jungi, T.W.** Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **95**, 91–101 (2003)
- Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R. & Bartley, R.** *Descriptions of medical fungi.* 2<sup>nd</sup> edn (Nexus Print Solutions, Adelaide, 2007)
- ENITA.** *Productions animals.* 3ème Ed (HORS SOL, Bordeaux, 2002)
- Espinel-Ingroff, A. et al.** Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrobial. Agents Chemother.* **39**, 314–319 (1995)
- Euzéby, J.** *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire.* (Tec & Doc, Paris, 2008)
- Evans, H.E.** *Anatomy of the budgie and other birds.* in *Diseases of cage and aviary birds* third edn (eds Roskopf, W. & Woerpel, R.) 79–163 (Williams & Wilkins, Baltimore, 1966)

- Fagerland, J.A. & Arp, L.H.** A morphologic study of bronchus-associated lymphoid tissue in turkeys. *Am. J. Anat.* **189**, 24–34 (1990)
- Fagerland, J.A. & Arp, L.H.** Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: age-related differences. *Reg. Immunol.* **5**, 28–36 (1993a)
- Fagerland, J.A. & Arp, L.H.** Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens. *Avian Dis.* **37**, 10–18 (1993b)
- Fedde, M.R.** Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poult. Sci.* **77**, 1130–1138 (1998)
- Féménia, F. et al.** Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathol.* **36**, 213–219 (2007)
- Fernández-Torres, B. et al.** In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **45**, 2524–2528 (2001)
- Ferreira, M.D.S. et al.** The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **43**, S313–S319 (2005)
- Firon, A. et al.** Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA. *Genetics* **161**, 1077–1087 (2002)
- Flammer, K.** Fluconazole in psittacine birds. in *Proc. Annu. Conf. Assoc. Avian Vet.* 203–204 (1996)
- Flammer, K. & Papich, M.** Pharmacokinetics of fluconazole after oral administration of single and multiple doses in African grey parrots. *Am. J. Vet. Res.* **67**, 417–422 (2006)
- Flammer, K. et al.** Pharmacokinetics of voriconazole after oral administration of single and multiple doses in African grey parrots (*Psittacus erithacus timneh*). *Am. J. Vet. Res.* **69**, 114–121 (2008)
- Fontaine, T. et al.** Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 27594–27607 (2000)
- Forbes, N.A., Simpson, G.N. & Goudswaard, M.F.** Diagnosis of avian aspergillosis and treatment with itraconazole. *Vet. Rec.* **130**, 519–520 (1992)
- Ford, S. & Friedman, L.** Experimental study of the pathogenicity of aspergilli for mice. *J. Bacteriol.* **94**, 928–933 (1967)
- Francesconi, A. et al.** Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2475–2480 (2006)
- França, M., Cray, C. & Shivaprasad, H.L.** Serologic testing for aspergillosis in commercial broiler chickens and turkeys. *Avian Dis.* **56**, 160–164 (2012)
- Frandsen, R.D., Wilke, W.L. & Fails, A.D.** (eds) *Anatomy and physiology of farm animals* seventh edn (John Wiley & Sons, 2009)

- Frealle, E. et al.** Circulation of moulds between clinical and environmental reservoirs in a COPD patient population: emergence of *Aspergillus fumigatus* azole-resistance in the north of France. (ECCMID, 2014)
- Fresenius, G.** *Beiträge zur Mykologie.* 81–82 (1863)
- Fromtling R.** Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 187–217 (1988)
- Fryberg, M., Oehlschlager, A.C. & Unrau, A.M.** Biosynthesis of ergosterol in yeast. Evidence for multiple pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5747–5757 (1973)
- Galiger, C. et al.** Assessment of Efficacy of Antifungals against *Aspergillus fumigatus*: Value of Real-Time Bioluminescence Imaging. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3046–3059 (2013)
- Gastebois, A.** *Protéines ancrées à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un Glycosylphosphatidylinositol (GPI) et modification des  $\beta(1-3)$ glucanes chez *Aspergillus fumigatus*.* Université Paris VI Pierre et Marie Curie (2009)
- Gastebois, A. et al.** Characterization of a new  $\beta(1-3)$ glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **285**, 2386–2396 (2009b)
- Gaunson, J.E., Philip, C.J., Whithear, K.G. & Browning, G.F.** Lymphocytic infiltration in the chicken trachea in response to *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Microbiology* **146**, 1223–1229 (2000)
- Gaunson, J.E., Philip, C.J., Whithear, K.G. & Browning, G.F.** The cellular immune response in the tracheal mucosa to *Mycoplasma gallisepticum* in vaccinated and unvaccinated chickens in the acute and chronic stages of disease. *Vaccine* **24**, 2627–2633 (2006)
- Geiser, D.M., Timberlake, W.E. & Arnold, M.L.** Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 809–817 (1996)
- Ghori, H.M. & Edgar, S.A.** Comparative susceptibility of chickens, turkeys and *Coturnix* quail to aspergillosis. *Poult. Sci.* **52**, 2311–2315 (1973)
- Ghori, H.M. & Edgar, S.A.** Comparative susceptibility and effect of mild *Aspergillus fumigatus* infection on three strains of chickens. *Poult. Sci.* **58**, 14–17 (1979)
- Gigli, A.C.S. et al.** Diagnosis and evaluation of fungi presence in the air of two different ventilation systems for broiler houses. *Rev. Bras. Ciênc. Avic.* **7**, 205–208 (2005)
- Giguère, S.** Antifungal chemotherapy. in *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* 4th edn (eds Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D. & Dowling, P.M.) 301–322 (Blackwell publishing, Ames, 2006)
- Goetting, V. et al.** Inflammatory marker profiles in an avian experimental model of aspergillosis. *Med. Mycol.* **51**, 696–703 (2013)
- Gomez-Lopez, A. et al.** Detection of fungal DNA by real-time polymerase chain reaction: evaluation of 2 methodologies in experimental pulmonary aspergillosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**, 387–393 (2006)
- Gomez-Lopez, A. et al.** An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: The role of azole resistance. *Med. Mycol.* **52**, 311–319 (2014)

- Gonzales, D.A. et al.** Protein expression profiles distinguish between experimental invasive pulmonary aspergillosis and *Pseudomonas pneumonia*. *Proteomics* **10**, 4270–4280 (2010)
- Graczyk, T.K., Cranfield, M.R. & Klein, P.N.** Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive aspergillosis. *Mycopathologia* **140**, 121–127 (1998)
- Greenberger, P.A. & Patterson, R.** Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Model of bronchopulmonary disease with defined serologic, radiologic, pathologic and clinical findings from asthma to fatal destructive lung disease. *Chest* **91**, 165S–171S (1987)
- Grunig, G. et al.** Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Exp. Med.* **185**, 1089–1099 (1997)
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A. & Koopmans, S.J.** Review: Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **6**, 1045–1056 (2005)
- Guérin, J. L.** [www.avicampus.fr](http://www.avicampus.fr).
- Guérin, J.L., Balloy, D., Villate, D.F.H.** (eds) *Maladies des volailles* 3<sup>ème</sup> edn (France Agricole, 2012)
- Guillot, J. & Chermette, R.** Aspergillosis in birds. *Rev. Prat.* **51**, 704–707 (2001)
- Gümüşsoy, K.S., Uyanik, F., Atasever, A. & Cam, Y.** Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in quails and results of treatment with itraconazole. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **51**, 34–38 (2004)
- Guzman, DS-M.** Advances in Avian Clinical Therapeutics. *J. Exot. Pet Med.* **23**, 6–20 (2014)
- Guzman, DS-M et al.** Pharmacokinetics of voriconazole after oral administration of single and multiple doses in Hispaniolan Amazon parrots (*Amazona ventralis*). *Am. J. Vet. Res.* **71**, 460–467 (2010)
- Hale, E.B.** *Domestication and the evolution of behavior.* in *The Behaviour of Domestic Animals* 2<sup>nd</sup> edn (ed. Hafez, E.S.E.) 22–42 (Bailliere, Tindall and Cassell, London, 1969)
- Hayter, R.B. & Besch, E.L.** Airborne-particle deposition in the respiratory tract of chickens. *Poult. Sci.* **53**, 1507–1511 (1974)
- Heel, R.C.** *Ketoconazole: pharmacological profile.* in *Ketoconazole in the Management of Fungal Disease.* (eds Drouhet, E., Hay, R.J., Jones, H.E. & Restrepo, A.) 55–77 (ADIS Press, New York 1982)
- Hibbett, D.S. et al.** A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111**, 509–47 (2007)
- Hincky-Vitrat, V.** *Les antifongiques systémiques. Clinique maladies infectieuses.* CHU Grenoble (2011)
- Hnilica, K., Medleau, L. & Cornelius, L.** Evaluation of the toxicity of topical enilconazole in cats. *4th World Congress of Veterinary Dermatology*, 42 (San Francisco, USA, 2000)

- Hoeningl, M. et al.** Performance of Galactomannan, Beta-d-Glucan, *Aspergillus* Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2039–2045 (2014)
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. & Ezekowitz, R.A.B.** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313–1318 (1999)
- Hogg, D.A.** The development of pneumatization in the postcranial skeleton of the domestic fowl. *J. Anat.* **139**, 105–113 (1984)
- Horvath, J.A. & Dummer, S.** The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Med.* **100**, 171–178 (1996)
- Howard, S.J.** Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia* **178**, 435–439 (2014)
- Huckabee, J.R.** Raptor therapeutics. *Vet. Clin. North Am. Exotic Anim. Pract.* **3**, 91–116 (2000)
- Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M. & Rath, N.C.** The effects of dexamethasone immunosuppression on turkey osteomyelitis complex in an experimental *Escherichia coli* respiratory infection. *Poult. Sci.* **77**, 654–661 (1998)
- Huhtanen, C.N. & Pensack, J.M.** Effect of antifungal compounds on aspergillosis in hatching chick embryos. *Appl. Microbiol.* **15**, 102–109 (1967)
- Israel, H.L., Lenchner, G.S. & Atkinson, G.W.** Sarcoidosis and aspergilloma. The role of surgery. *Chest* **82**, 430–432 (1982)
- ITAVI.** *Vers une gestion efficace des litières, de l’approvisionnement aux techniques d’élevage avicole* (2012)
- ITAVI.** *Situation de la production et des marchés avicole* (2013)
- Ivey, E.S.** Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. *J. Avian Med. Surg.* **14**, 103–106 (2000)
- Jackson, J.C., Higgins, L.A. & Lin, X.** Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One* **4**, e4224 (2009)
- Jacobsen, I.D. et al.** Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect. Immun.* **78**, 2995–3006 (2010)
- Jacobsen, I.D., Große, K. & Hube, B.** Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. in *Host-Fungus Interactions* (eds Brand, A.C. & MacCallum, D.M.) 487–496 (Humana Press, 2012)
- Janssen\_Animal\_Health.** *Aspergillus* prevention in hatcheries (2006)
- Jaton-Ogay, K. et al.** Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **14**, 917–928 (1994)
- Jensen, H.E.** *Animal model in mycology.* in *Handbook of laboratory animal science* Vol. 2 (eds Svendsen, P. & Hau, J.) 169–197 (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1994) VERIF

- Jensen, H.E., Christensen, J.P., Bisgaard, M. & Nielsen, O.L.** Immunohistochemistry for the diagnosis of aspergillosis in turkey poult. *Avian Pathol.* **26**, 5–18 (1997)
- Jeurissen, S.H., Janse, E.M., Koch G. & De Boer, G.F.** Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell Tissue Res.* **258**, 119–124 (1989)
- Jeurissen, S.H., Vervelde, L. & Janse, E.M.** Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. *Poult. Sci. Rev.* **5**, 183–207 (1994)
- Jez, C., Beaumont, C., Magdelaine, P. & Paillard, S.** *La filière avicole française à l'horizon 2025, rapport du groupe de travail de la prospective avicole.* INRA-ITAVI (2009)
- Jones, M.P. & Orosz, S.E.** The diagnosis of aspergillosis in birds. *Sem. Avian Exotic Pet Med.* **9**, 52–58 (2000)
- Jones, M.P., Orosz, S.E., Cox, S.K. & Frazier, D.L.** Pharmacokinetic disposition of itraconazole in red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*). *J. Avian Med. Surg.* **14**, 15–22 (2000)
- Julian, R.J. & Goryo, M.** Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. *Avian Pathol.* **19**, 643–654 (1990)
- Kaiser, P.** Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.* **39**, 309–324 (2010)
- Kaliamurthy, J., Geraldine, P. & Thomas, P.A.** Disseminated aspergillosis due to *Aspergillus flavus* in an experimental model: efficacy of azole therapy. *Mycoses* **46**, 174–182 (2003)
- Kamai, Y. et al.** In vitro and in vivo activities of CS-758 (R-120758), a new triazole antifungal agent. *Antimicrob. Agents Chemother* **46**, 367–370 (2002)
- Kanafani, Z.A. & Perfect, J.R.** Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 120–128 (2008)
- Kauffman, C. & Carver, P.** Antifungal agents in the 1990s. Current status and future developments. *Drugs* **53**, 539–549 (1997)
- Khosravi, A.R. et al.** Outbreak of severe disseminated aspergillosis in a flock of ostrich (*Struthio camelus*). *Mycoses* **51**, 557–559 (2008)
- King, A.S. & McLelland, J.** (eds) *Birds, their structure and function* 2<sup>nd</sup> edn (Bailliere Tindall, 1 St. Annes Road, 1984)
- King, A.S. & Molony, V.** *The anatomy of respiration.* in *Physiology and biochemistry of the domestic fowl* Vol. 1 (eds Bell, D.J. & Freeman, B.M.) 93–169 (Academic Press, London, 1971)
- Kirkpatrick, W.R., McAtee, R.K., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G. & Patterson, T.F.** Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of disseminated invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2865–2868 (2000)
- Kirkpatrick, W.R., Wiederhold, N.P., Najvar, L.K. & Patterson, T.F.** Animal Models In Mycology: What Have We Learned Over The Past 30 Years. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **7**, 68–78 (2013)
- Klein, W. & Owerkowicz, T.** Function of intracoelomic septa in lung ventilation of amniotes: lessons from lizards. *Physiol. Biochem. Zool.* **79**, 1019–1032 (2006)

- Klika, E., Scheuermann, D.W., De Groodt-Lasseel, M.H., Bazantova, I. & Switka, A.** Pulmonary macrophages in birds (barn owl, *Tyto tyto alba*), domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*), quail (*Coturnix coturnix*), and pigeons (*Columbia livia*). *Anat. Rec.* **246**, 87–97 (1996)
- Klimes, B., Novak, Z. & Severa, K.** Therapy of Aspergillosis of Chickens with Fungicidin. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* **11**, 151–160 (1964)
- Kline, Y., Clemons, K.V., Woods, L., Stevens, D.A. & Tell, L.A.** Pharmacokinetics of voriconazole in adult mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Med. Mycol.* **49**, 500–512 (2011)
- Kollias, G.V., Palgut, J. & Ross, J.** *The use of ketoconazole in birds: preliminary pharmacokinetics and clinical applications.* in *Proc. Annu. Meet. Assoc. Avian Vet.* 103–104 (Miami, USA, 1986)
- Komadina, T.G. et al.** Treatment of *Aspergillus fumigatus* keratitis in rabbits with oral and topical ketoconazole. *Am. J. Ophthalmol.* **99**, 476–479 (1985)
- Kontoyiannis, D.P. et al.** Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 1091–1100 (2010)
- Kothlow, S. & Kaspers, B.** *The avian respiratory immune system.* in *Avian immunology* (eds Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A. & Kaiser, P.) 273–288 (Academic Press, 2008)
- Kozakiewicz, K. & Smith, D.** *Physiology of Aspergillus.* in *Aspergillus biotechnology handbooks* Vol. 7 (ed. J.E. Smith) 23–41 (Plenum Press, New York, 1994)
- Kunkle, R.A. & Rimler, R.B.** Pathology of acute aspergillosis in turkeys. *Avian Dis.* **40**, 875–886 (1996)
- Kunkle, R.A.** *Aspergillosis.* in *Diseases of Poultry* 11<sup>th</sup> Edn (eds Saif, Y.M. et al.) 883–895 (Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 2003)
- Kunkle, R.A. & Rimler, R.B.** Pathology of acute aspergillosis in turkeys. *Avian Dis.* **40**, 875–886 (1996)
- Kunkle, R.A. & Sacco, R.E.** Susceptibility of convalescent turkeys to pulmonary aspergillosis. *Avian Dis.* **42**, 787–790 (1998)
- Kunkle, R.A., Rimler, R.B. & Steadham, E.M.** Absence of protection against challenge with *Aspergillus fumigatus* by adoptive transfer of splenocytes from convalescent turkeys. *Avian Dis.* **43**, 678–684 (1999)
- Kurup, V.P. & Grunig, G.** Animal models of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycopathologia* **153**, 165–177 (2002)
- Kurup, V.P. et al.** *Aspergillus fumigatus* peptides differentially express Th1 and Th2 cytokines. *Peptides* **17**, 183–190 (1996)
- Kwon-Chung, K.J. & Sugui, J.A.** Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious? *Trends microbiol.* **17**, 481–487 (2009)
- Lair-Fuller, S. et al.** Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poult. Sci.* **85**, 1875–1880 (2006)

- Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Kaderbhai, M.A. & Kelly, S.L.** Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome *b<sub>5</sub>*/NADH cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett.* **462**, 283–288 (1999)
- Langfelder, K. et al.** Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med. Microbiol. Immunol.* **187**, 79–89 (1998)
- Lanthier, T. & Chalifoux, A.** Enilconazole as an adjunct to the treatment of four cases of canine nasal aspergillosis. *Can. Vet. J.* **32**, 110–112 (1991)
- Lasiewski, R.C.** *Respiratory function of birds.* in *Avian biology* Vol. 2 (eds Farner, D.S. & King, J.R.) 288–335 (New-York, 1972)
- Latgé, J.P.** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310–350 (1999)
- Latgé, J.P. & Steinbach, W.J.** (eds) *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis.* 549–558 (ASM press, Washington DC, 2009)
- Latgé, J.P. & Calderone, R.** *The fungal cell wall.* in *The Mycota, Growth, Differentiation and Sexuality* Vol. 1 2<sup>nd</sup> edn (eds Kües, U. & Fischer, R.) 73–104 (Springer Berlin Heidelberg, 2006)
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C. & Heitman, J.** The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 298–340 (2010)
- Lehmann, P.F.** Immunology of fungal infections in animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **10**, 33–69 (1985)
- Lehmann, P.F. & White, L.O.** Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect. Immun.* **12**, 987–992 (1975)
- Leleu, C. et al.** Bayesian development of a dose-response model for *Aspergillus fumigatus* and invasive Aspergillosis. *Risk Anal.* **33**, 1441–1453 (2013a)
- Leleu, C. et al.** Efficacy of liposomal amphotericin B for prophylaxis of acute or reactivation models of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* **56**, 241–249 (2013b)
- Le Loc'h, G. et al.** Detection of circulating serum galactomannan for the diagnosis of avian aspergillosis. *16th Congress Intl. Soc. Hum. Anim. Mycol.* (2006)
- Lengerova, M. et al.** Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)- $\beta$ -D-glucan detection. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 602–608 (2012)
- Levron, J.C., Stephan, P. & Razanamiraka, G.** Pharmacokinetic study of parconazole, antifungal drug, in guinea fowl. *Third EAVPT Congress, Ghent, session 9, 120* (1985)
- Lewis, R.E. et al.** Comparative analysis of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B kinetics of lung accumulation and fungal clearance in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1253–1258 (2007)
- Link, H.F.** Observationes in ordines plantarum naturales. *Ges. Naturf. Freunde z. Berlin. Magazin* **3**, 1–42 (1809)

- Lionakis, M.S. & Kontoyiannis, D.P.** The growing promise of Toll deficient *Drosophila melanogaster* as a model for studying *Aspergillus* pathogenesis and treatment. *Virulence* **1**, 488–499 (2010)
- Lionakis, M.S. & Kontoyiannis, D.P.** *Drosophila melanogaster* as a model organism for invasive aspergillosis. *Methods Mol. Biol.* **845**, 455–468 (2012)
- Livezey, B.C. & Zusi, R.L.** Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zool. J. Linn. Soc.* **149**, 1–95 (2007)
- Lockhart, S.R. et al.** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the cyp51A gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4465–4468 (2011)
- Lupo, C. et al.** Risk and indicators of condemnation of male turkey broilers in western France, February–July 2006. *Prev. Vet. Med.* **94**, 240–250 (2010)
- MacCallum, D.M., Whyte, J.A. & Odds, F.C.** Efficacy of caspofungin and voriconazole combinations in experimental aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3697–3701 (2005)
- Maertens, J.A.** History of the development of azole derivatives. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 1–10 (2004)
- Maina, J.N.** Comparative respiratory morphology: Themes and principles in the design and construction of the gas exchangers. *Anat. Rec.* **261**, 25–44 (2000)
- Maina, J.N.** Some recent advances on the study and understanding of the functional design of the avian lung: morphological and morphometric perspectives. *Biol. Rev.* **77**, 97–152 (2002)
- Maina, J.N.** (ed.) *The lung-air sac system of birds: development, structure, and function.* (Springer, 2005)
- Maina, J.N.** Functional morphology of the avian respiratory system, the lung-air system: efficiency built on complexity. *Ostrich* **79**, 117–132 (2008)
- Maina, J.N. & Cowley, H.M.** Ultrastructural characterization of the pulmonary cellular defenses in the lung of a bird, the rock dove, *Columba livia*. in *Proc. R. Soc. Lond. B.* **265**, 1567–1572 (1998)
- Maina, J.N. & Africa, M.** Inspiratory aerodynamic valving in the avian lung: functional morphology of the extrapulmonary primary bronchus. *J. Exp. Biol.* **203**, 2865–2876 (2000)
- Maina, J.N. & Nathaniel, C.** A qualitative and quantitative study of the lung of an Ostrich, *Struthio camelus*. *J. Exp. Biol.* **204**, 2313–2330 (2001)
- Manavathu, E.K., Alangaden, G.J. & Chandrasekar, P.H.** In-vitro isolation and antifungal susceptibility of amphotericin B-resistant mutants of *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 615–619 (1998)
- Marichal, P. et al.** Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145**, 2701–2713 (1999)
- Martin, M.V., Yates, J. & Hitchcock, C.A.** Comparison of voriconazole (UK-109,496) and itraconazole in prevention and treatment of *Aspergillus fumigatus* endocarditis in guinea pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 13–16 (1997)

- Martinez-Quesada, J., Nieto-Cadenazzi, A. & Torres-Rodriguez, J.M.** Humoral immunoresponse of pigeons to *Aspergillus fumigatus* antigens. *Mycopathologia* **124**, 131–137 (1993)
- Mavridou, E., Bruggemann, R.J., Melchers, W.J., Verweij, P.E. & Mouton, J.W.** Impact of cyp51A mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4758–4764 (2010)
- Mayer, A.C.** *Deutsch Arch. Physiol.* **1**, 310 (1815)
- Mazzola-Rossi, E.** *Etude de la sensibilité de 5 lignées de poulets (Gallus gallus) vis-à-vis de l'infection expérimentale par Aspergillus fumigatus.* Master 2, Université Paris VI Pierre et Marie Curie (2007)
- McCracken, T.O., Kainer, R.A. & Spurgeon, T.S.** (eds) *Spurgeon's Color Atlas of Large Animal Anatomy: the essentials* (Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999)
- McCullough, S., Mckiernan, B.C. & Grodsky, B.** Endoscopically placed tubes for administration of enilconazole for treatment of nasal aspergillosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **212**, 67–69 (1998)
- McLelland, J. & Molony, V.** *Respiration.* in *Physiology and biochemistry of the domestic fowl* Vol. 4 (ed. Freeman, B.M.) 63–85 (Academic Press, London, 1983)
- McLelland, J. & Macfarlane, C.J.** Solitary granular endocrine cells and neuroepithelial bodies in the lungs of the ringed turtle dove (*Streptopelia risoria*). *J. Anat.* **147**, 83–93 (1986)
- Meissonnier, E., Giard, L., Goudeau, C. & Ginet, J.** *Evaluation des résidus d'énilconazole chez les dindes après brumisation d'une solution diluée d'imavéral.* Compte rendu de l'étude Enil-09-FR-01. Janssen Santé Animale
- Melloul, E. et al.** Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys (*Meleagris gallopavo*) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 271–279 (2014)
- Mercer, E.I.** Morpholine antifungals and their mode of action. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 788–793 (1991)
- Mercer, E.I.** Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications. *Prog. Lipid Res.* **32**, 357–416 (1993)
- Merkow, L.P., Epstein, S.M., Sidransky, H., Verney, E. & Pardo, M.** The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis. An ultrastructural study of alveolar macrophages after phagocytosis of *A. flavus* spores in vivo. *Am. J. Pathol.* **62**, 57–68 (1971)
- Micheli, P.A.** *Nova Plantarum Genera.* (Florentiae, 1729)
- Mignon-Grasteau, S. et al.** Genetics of adaptation and domestication in livestock. *Livestock Prod. Sci.* **93**, 3–14 (2005)
- Mirkov, I., Stosic-Grujicic, S. & Kataranovski, M.** Host immune defense against *Aspergillus fumigatus*: insight from experimental systemic (disseminated) infection. *Immunol. Res.* **52**, 120–126 (2012)
- Mondon, P., De Champs, C., Donadille, A., Ambroise-Thomas, P. & Grillot, R.** Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* **45**, 186–191 (1996)

- Moore, C.B., Sayers, N., Mosquera, J., Slaven, J. & Denning, D.W.** Antifungal Drug Resistance in *Aspergillus*. *J. Infect.* **41**, 203–220 (2000)
- Morace, G., Sanguinetti, M., Posteraro, B. & Pagano, L.** In vitro susceptibility of *Candida* species isolated from patients with haematological malignancies. *Mycoses* **38**, 59–67 (1995)
- Mortensen, K.L. et al.** Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4545–4549 (2010)
- Mosquera, J. et al.** Susceptibility testing of *Aspergillus flavus*: inoculum dependence with itraconazole and lack of correlation between susceptibility to amphotericin B in vitro and outcome in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1456–1462 (2001)
- Mouyna, I. & Fontaine, T.** *Cell wall of Aspergillus fumigatus: a Dynamic Structure.* in *Aspergillus fumigatus and aspergillosis* (eds Latgé, J.P. & Steinbach, W.J.) 169–183 (ASM press, Washington DC, 2009)
- Myers, R.K. & Arp, L.H.** Pulmonary clearance and lesions of lung and air sac in passively immunized and unimmunized turkeys following exposure to aerosolized *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **31**, 622–628 (1987)
- Nascimento, A.M. et al.** Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1719–1726 (2003)
- Nawada, R. et al.** Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1433–1439 (1996)
- Nes, W. D., Xu, S. & Haddon, W.F.** Evidence for similarities and differences in the biosynthesis of fungal sterols. *Steroids* **53**, 533–558 (1989)
- Ni, M. & Yu, J.H.** A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **2**, e970 (2007)
- Nicholas commercial manual.** *Guide d'élevage dinde de chair, Aviagen Turkeys.* (2009)
- Nieguitsila, A. et al.** Relative efficiencies of two air sampling methods and three culture conditions for the assessment of airborne culturable fungi in a poultry farmhouse in France. *Environ. Res.* **111**, 248–253 (2011)
- Nierman, W.C. et al.** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151–1156 (2005)
- Niki, Y. et al.** Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1317–1322 (1991)
- O'Connor, P.M.** Pulmonary pneumaticity in the postcranial skeleton of extant Aves: a case study examining Anseriformes. *J. Morphol.* **261**, 141–161 (2004)
- O'Day, D.M.** Orally administered antifungal therapy for experimental keratomycosis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **88**, 685–725 (1990)
- O'Day, D.M., Head, W.S., Robinson, R.D., Williams, T.E. & Wolff, R.** Ocular pharmacokinetics of saperconazole in rabbits: a potential agent against keratomycoses. *Arch. Ophthalmol.* **110**, 550–554 (1992)

- O'Gorman, C.M., Fuller, H.T. & Dyer, P.S.** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**, 471–474 (2009)
- Ohshima, K. & Hiramatsu, K.** Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chicken. *Histol. Histopathol.* **15**, 713–720 (2000)
- Okoye, J.O.A., Gugnani, H.C. & Okeke, C.N.** Pulmonary infections due to *Aspergillus flavus* in turkey poults and goslings. *Mycoses* **32**, 336–339 (1989)
- Olias, P., Jacobsen, I.D. & Gruber, A.D.** Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing. *Med. Mycol.* **49**, 56–61 (2010)
- Olias, P. et al.** Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks and their environment. *Vet. Microbiol.* **148**, 348–355 (2011)
- Olson, J.A. et al.** Liposomal amphotericin B and echinocandins as monotherapy or sequential or concomitant therapy in murine disseminated and pulmonary *Aspergillus fumigatus* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3884–3894 (2010)
- O'Malley, B.** (ed.) *Clinical anatomy and physiology of exotic species: Structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians.* (Edinburg, UK : Elsevier Saunders, 2005)
- O'Meara, D.C. & Chute, H.L.** Aspergillosis experimentally produced in hatching chicks. *Avian Dis.* **3**, 404–406 (1959)
- Oosterhout, I. & Venker-van Haagen, A.** Aspergillosis: report on diagnosis and treatment. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde* **116**, 37S–38S (1991)
- Orosz, S.E.** Antifungal drug therapy in avian species. *Vet. Clin. North Am. Exotic Anim. Pract.* **6**, 337–350 (2003)
- O'Sullivan, C.E. et al.** Development and validation of a quantitative real-time PCR assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5676–5682 (2003)
- Paris, S. et al.** Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1581–1588 (2003)
- Park, S.J. & Mehrad, B.** Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 535–551 (2009)
- Pasanen, A.L., Kalliokoski, P., Pasanen, P., Jantunen, M.J. & Nevalainen, A.** Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. *Environ. Int.* **17**, 225–228 (1991)
- Patera, A.C. et al.** Effect of granulocyte colony-stimulating factor combination therapy on efficacy of posaconazole (SCH56592) in an inhalation model of murine pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3154–3158 (2004)
- Patterson, T.F.** Clinical utility and development of biomarkers in invasive aspergillosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **122**, 174–183 (2011)
- Paul, S., Diekema, D. & Moye-Rowley, W.S.** Contributions of *Aspergillus fumigatus* ATP-binding cassette transporter proteins to drug resistance and virulence. *Eukaryotic cell* **12**, 1619–1628 (2013)

- Paulussen, C., Boulet, G.A., Cos, P., Delputte, P. & Maes, L.J.** Animal models of invasive aspergillosis for drug discovery. *Drug Discov. Today* **19**, 1380–1386 (2014)
- Peden, W.M. & Rhoades, K.R.** Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. *Avian Dis.* **36**, 537–542 (1992)
- Perelman, B. & Kuttin, E.S.** Aspergillosis in ostriches. *Avian Pathol.* **21**, 159–163 (1992)
- Perelman, B., Smith, B., Bronstein, D., Gur-Lavie, A. & Kuttin, E.S.** Use of azole compounds for the treatment of experimental aspergillosis in turkeys. *Avian Pathol.* **21**, 591–599 (1992)
- Pericard, J.M.** *Clinical assessment on the use of fluconazole per os in 24 African grey parrots (Psittacus erithacus): acceptance, side effects and efficiency.* in *Proceedings of the 8th European Conference of the Association of Avian Veterinarians, 6th Scientific ECAMS Meeting of the European College of Avian Medicine and Surgery* (eds Bailey, T., Chitty, J., Harcourt-Brown, N. & Samour, J.) 222 (Arles, France 2005)
- Peterson, S.W.** Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* **100**, 205–226 (2008)
- Petratis, V. et al.** Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: in vitro and in vivo correlations of the concentration-and dose-dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2382–2391 (2009)
- Phalen, D.N.** Respiratory medicine of cage and aviary birds. *Vet. Clin. North Am. Exotic Anim. Pract.* **3**, 423–452 (2000)
- Pham, C.D., Reiss, E., Hagen, F., Meis, J.F. & Lockhart, S.R.** Passive Surveillance for Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1498 (2014)
- Pier, A.C. & Richard, J.L.** Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by aspergilli. *Biotechnology* **23**, 233–248 (1992)
- Piiper, J. & Scheid, P.** Gas exchange in Vertebrates through lungs, gills, and skin. *News Physiol. Sci.* **7**, 199–203 (1992)
- Planel, R., Herault, L., Gavaret, T. & Plassiart, G.** Granulomes d'origine mycosique sur des canes Pékin futures reproductrices. *Bull. GTV* **10**, 247–249 (2001)
- Plumb, D.C.** (ed.) *Plumb's veterinary drug handbook*. 6<sup>th</sup> edn (Blackwell Publishing, Ames, 2008)
- Pontecorvo, G.** The parasexual cycle in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **10**, 393–400 (1956)
- Powell, F.L.** *Respiration.* in *Avian physiology* fifth edn (ed. Causey Whittow, G.) 233–264 (Academic Press, New York, 2000)
- Powell, F.L.** *Respiration* in *Sturkie's Avian Physiology* xème Edn (ed. Scanes, C.G.) 301–330 (Elsevier, 2014)
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A.** (eds) *Microbiology*, second edn (Dubuque, Iowa, William C. Brown, 1993)
- Price, E.O.** Behavioral aspects of animal domestication. *Q. Rev. Biol.* **59**, 1–32 (1984)

- Prigitano, A. et al.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of northern Italy, May 2011 to June 2012. *Eurosurveillance* **19**, 1–7 (2014)
- Ramírez-Camejo, L.A., Torres-Ocampo, A.P., Agosto-Rivera, J.L. & Bayman, P.** An opportunistic human pathogen on the fly: Strains of *Aspergillus flavus* vary in virulence in *Drosophila melanogaster*. *Med. Mycol.* **myt008** (2014)
- Raper, K.B. & Fennell, D.I.** *Aspergillus fumigatus* group. in *The Genus Aspergillus* (eds Raper, K.B. & Fennell, D.I.) 238–268 (Baltimore: William and Wilkins, 1965)
- Ratzlaff, K., Papich, M.G. & Flammer, K.** Plasma concentrations of fluconazole after a single oral dose and administration in drinking water in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *J. Av. Med. Surg.* **25**, 23–31 (2011)
- Redig, P.T.** *Diagnosis of avian aspergillosis.* in *Main Conference Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (ed. Kornelsen, M.J.) (Reno, NV, USA, 1994)
- Redig, P.T. & Duke, G.E.** Comparative pharmacokinetics of antifungal drugs in domestic turkeys, red-tailed hawks, broad-winged hawks, and great horned owls. *Avian Dis.* **29**, 649–661 (1988)
- Redmann, T. & Schildger, B.** Therapeutic use of enilconazole in broiler chicks with aspergillosis. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **96**, 12–17 (1989)
- Reeves, E.P., Messina, C.G., Doyle, S. & Kavanagh, K.** Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* **158**, 73–79 (2004)
- Reese, S., Dalamani, G. & Kaspers, B.** The avian lung-associated immune system: a review. *Vet. Res.* **37**, 311–324 (2006)
- Richard, J.L. & Thurston, J.R.** Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poults following aerosol exposure. *Avian Dis.* **27**, 1025–1033 (1983)
- Richard, J.L., Cutlip, R.C., Thurston, J.R. & Songer, J.** Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Avian Dis.* **25**, 53–67 (1981)
- Richard, J.L., Thurston, J.R., Peden, W.M. & Pinello, C.** Recent studies on aspergillosis in turkey poults. *Mycopathologia* **87**, 3–11 (1984)
- Rundfeldt, C. et al.** A model for treating avian aspergillosis: serum and lung tissue kinetics for Japanese quail (*Coturnix japonica*) following single and multiple aerosol exposures of a nanoparticulate itraconazole suspension. *Med. Mycol.* **51**, 800–810 (2013)
- Saag, M.S. & Dismukes, W.E.** Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1–8 (1998)
- Sabatelli, F. et al.** In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2009–2015 (2006)
- Sabo, J.A. & Abdel-Rahman, S.M.** Voriconazole: a new triazole antifungal. *Ann. Pharmacother.* **34**, 1032–1043 (2000)
- Saif, Y.M. et al.** (eds.) *Diseases of poultry*. 12th edn, (Blackwell Publishing, Ames, 2008)

- Samson, R.A., Hong, S., Peterson, S.W., Frisvad, J.C. & Varga, J.** Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud. Mycol.* **59**, 147–203 (2007)
- Sandhu, D.K., Sandhu, R.S., Damodaran, V.N. & Randhawa, H.S.** The effect of cortisone on bronchopulmonary aspergillosis in mice exposed to spores of various *Aspergillus* species. *Sabouraudia* **8**, 32–38 (1970)
- Sauter, E.A. et al.** The airborne microflora of poultry houses. *Poult. Sci.* **60**, 569–74 (1981)
- Scheid, P. & Piiper, J.** Cross current gas exchange in avian lungs: Effect of reversed parabronchial air flow in ducks. *Resp. physiol.* **16**, 304–312 (1972)
- Scheid, P. & Piiper, J.** *Respiratory mechanics and air flow in birds*. in *Form and function in birds* (eds King, A.S. & McLelland, J.) 369–392 (Academic Press, London, 1989)
- Seyedmousavi, S., Melchers, W.J., Verweij, P.E. & Mouton, J.W.** Assessment of efficacy of antifungals in experimental models of invasive aspergillosis in an era of emerging resistance: the value of real-time quantitative PCR. *Curr. Opin. Pharmacol.* **11**, 486–493 (2011)
- Seyedmousavi, S., Melchers, W.J., Mouton, J.W. & Verweij, P.E.** Pharmacodynamics and dose-response relationships of liposomal amphotericin B against different azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1866–1871 (2013)
- Shalini, K., Sharma, P.K. & Kumar, N.** Imidazole and its biological activities: A review. *Chem. Sin.* **1**, 36–47 (2010)
- Shannon, D.** Treatment with itraconazole of penguins suffering from aspergillosis. *Vet. Rec.* **130**, 479–479 (1992)
- Sharma, V. & Bhatia, R.** Triazoles in antifungal therapy: a review. *Int. J. Res. Pharm. Biomed.* **2**, 417–27 (2011)
- Sharp, N., Sullivan, M., Harvey, C. & Webb, T.** Treatment of canine nasal aspergillosis with enilconazole. *J. Vet. Intern. Med.* **7**, 40–43 (1993)
- Sheahan, D. et al.** Acute phase protein concentrations in dogs with nasal disease. *Vet. Rec.* **167**, 895–899 (2010)
- Sheppard, D.C. et al.** Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1908–1911 (2004)
- Sheppard, D.C. et al.** Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 376–380 (2006)
- Singh, S., Borah, M.K., Sharma, D.K., Joshi, G.D. & Gogoi, R.** Aspergillosis in turkey poults. *Indian J. Vet. Pathol.* **33**, 220–221 (2009)
- Slaven, J.W. et al.** Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet. Biol.* **36**, 199–206 (2002)
- Slesiona, S., Ibrahim-Granet, O., Olias, P., Brock, M. & Jacobsen, I.D.** Murine infection models for *Aspergillus terreus* pulmonary aspergillosis reveal long-term persistence of conidia and liver degeneration. *J. Infect. Dis.* **205**, 1268–1277 (2012)

- Smith, J.M., Tang, C.M., Van Noorden, S. & Holden, D.W.** Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restriction and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* **62**, 5247–5254 (1994)
- Snelders, E. et al.** Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* **5**, e219 (2008)
- Snelders, E. et al.** Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4053–4057 (2009)
- Sohn, K.T. & Yoon, K.S.** Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* **30**, 117–127 (2002)
- Spikes, S. et al.** Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J. Infect. Dis.* **197**, 479–486 (2008)
- Steinbach W.J. et al.** Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 192–198 (2004)
- Stensvold, C.R., Jørgensen, L.N. & Arendrup, M.C.** Azole-resistant invasive aspergillosis: relationship to agriculture. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **6**, 178–191 (2012)
- Stuart, C.** Common conditions resulting in poultry carcass condemnation. *In Practice* **2**, 14–21 (1980)
- Sulahian, A. et al.** Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* **91**, 311–318 (2001)
- Suleiman, M.M., Duncan, N., Eloff, J.N. & Naidoo, V.** A controlled study to determine the efficacy of *Loxostylis alata* (Anacardiaceae) in the treatment of aspergillus in a chicken (*Gallus domesticus*) model in comparison to ketoconazole. *BMC Vet. Res.* **8**, 210 (2012)
- Takemoto, K. et al.** Comparative studies on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of disseminated aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 311–317 (2004)
- Taylor, D.R.** Risk assessment in asthma and COPD: a potential role for biomarkers? *Thorax* **64**, 261–264 (2009)
- Taylor, J.J. & Burroughs, E.J.** Experimental avian aspergillosis. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **51**, 131–141 (1973)
- Taylor, J., Jacobson, D. & Fisher, M.** The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**, 197–246 (1999)
- Tekaia, F. & Latgé, J.P.** *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 385–392 (2005)
- Tell, L.A.** Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med. Mycol.* **43**, S71–S73 (2005)
- Tell, L.A. et al.** Efficacy of voriconazole in Japanese quail (*Coturnix japonica*) experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **48**, 234–244 (2010)

- Thienpont, D., Van Cutsem, J., Van Cauteren, H. & Marsboom, R.** The biological and toxicological properties of imazalil. *Arzeimittel-Forschung* **31**, 309–315 (1981)
- Thierry, S. et al.** Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. *BMC microbiology* **10**, 315 (2010)
- Thierry, S. et al.** Assessment of *Aspergillus fumigatus* pathogenicity in aerosol-challenged chickens (*Gallus gallus*) belonging to two lineages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **36**, 379–385 (2013)
- Thom, C. & Church, M.B.** The *aspergilli*. *The Aspergilli* (1926)
- Thomas, N.J., Hunter, D.B. & Atkinson, C.T.** (eds) Infectious diseases of wild birds. (Wiley-blackwell, 2007)
- Toth, T.E., Pyle, R.H., Caceci, T., Siegel, P.B. & Ochs, D.** Cellular defense of the avian respiratory system: influx and nonopsonic phagocytosis by respiratory phagocytes activated by *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* **56**, 1171–1179 (1988a)
- Toth, T.E., Veit, H., Gross, W.B. & Siegel, P.B.** Cellular defense of the avian respiratory system: protection against *Escherichia coli* airsacculitis by *Pasteurella multocida*-activated respiratory phagocytes. *Avian Dis.* **32**, 681–687 (1988b)
- Troke, P.** *In vitro* and experimental *in vivo* activities of fluconazole against some fungi causing cutaneous mycoses. in *Cutaneous Antifungal Agents* (eds Rippon, J.W. & Fromtling, R.A.) 199–214 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1993)
- Tsai, S.S., Park, J.H., Hirai, K. & Itakura, C.** Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathol.* **21**, 699–709 (1992)
- Vallor, A.C. et al.** Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2593–2598 (2008)
- Van Cutsem, J.** Antifungal activity of enilconazole on experimental aspergillosis in chickens. *Avian Dis.* **27**, 36–42 (1983)
- Van Cutsem, J. & Janssen, P.A.J.** *In vitro* and *in vivo* models to study the activity of antifungals against *Aspergillus*. in *Aspergillus and Aspergillosis* (eds Vanden Bossche, H., Mackenzie, D.W.R. & Cauwenbergh, G.) 215–227 (Springer, New York, 1988)
- Van Cutsem, J., Van Gerven, F., Geerts, H. & Rochette, F.** Treatment with enilconazole spray of dermatophytosis in rabbit farms. *Mycosen* **28**, 400–407 (1985)
- Van Cutsem, J., Van Gerven, F. & Janssen, P.A.J.** *In vitro* activity of enilconazole against *Aspergillus spp.* and its fungicidal efficacy in a smoke generator against *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* **31**, 143–147 (1988)
- Vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., Geerts, H. & Janssen, P.A.J.** Mode of action studies. Basis for the search of new antifungal drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **544**, 191–207 (1988)
- Vanden Bossche, H. et al.** Biochemical approaches to selective antifungal activity. Focus on azole antifungals. *Mycoses* **32**, 35–52 (1989)
- Vanden Bossche, H., Engelen, M. & Rochette, F.** Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **26**, 5–29 (2003)

- Vanderheyden, N.** *Aspergillosis in psittacine chicks.* in *Proc. Assoc. Avian Vet.* 1–6 (1993)
- Van Gestel, J.** *The vapour phase activity of antifungal compounds: a neglected or a negligible phenomenon?* in *In Vitro and in Vivo Evaluation of Antifungal Agents* (eds Iwata, K. & Vanden Bossche, H.) 207–218 (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1986)
- Van Gestel, J., Van Cutsem, J. & Thienpont, D.** Vapour phase activity of imazalil. *Chemotherapy* **27**, 270–276 (1981)
- Van Leemput, L. et al.** Excretion, metabolism and tissue depletion of <sup>14</sup>C-enilconazole after repates oral dosing in broiler chickens. Janssen preclinical Research Report on R23979/V5388 (1984)
- Van Leemput L., et al.** Enilconazole: kinetics of residue in broilers after fumigation with the Clinafarm smoke generator. Internal report, Janssen research (1990)
- Van Waeyenberghe, L. et al.** Microsatellite typing of avian clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathol.* **40**, 73–77 (2011)
- Van Waeyenberghe, L. et al.** Susceptibility of adult pigeons and hybrid falcons to experimental aspergillosis. *Avian Pathol.* **41**, 536–537 (2012)
- Veen, P.J.** Torticollis and disease of the respiratory tract, caused by *Aspergillus fumigatus* in fowl. *Netherlands J. Vet. Sci.* **5**, 132–133 (1973)
- Verstappen, F.A.L.M. & Dorrestein, G.M.** Aspergillosis in Amazon parrots after corticosteroid therapy for smoke-inhalation injury. *J. Avian Med. Surg.* **19**, 138–141 (2005)
- Verweij, P.E. & Meis, J.F.** Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **2**, 80–87 (2000)
- Villegas, P.** Viral diseases of the respiratory system. *Poult. Sci.* **77**, 1143–1145 (1998)
- Walsh, T.J. et al.** Therapeutic monitoring of experimental invasive pulmonary aspergillosis by ultrafast computerized tomography, a novel, noninvasive method for measuring responses to antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1065–1069 (1995)
- Wang, D.Y. et al.** Mutations in the Cyp51A gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* isolated from avian farms in France and China. *Poult. Sci.* **93**, 12–15 (2014)
- Wardlaw, A. & Geddes, D.M.** Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review. *J. R. Soc. Med.* **85**, 747–751 (1992)
- Wedel, M.J.** Evidence for bird-like air sacs in saurischian dinosaurs. *J. Exp. Zool.* **311**, 611–628 (2009)
- Weiner, M.H. & Coats-Stephen, M.** Immunodiagnosis of systemic aspergillosis. I. Antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental infection. *J. Lab. Clin. Med.* **93**, 111–119 (1979)
- White-Wheeters, N. & Medleau, L.** Evaluation of topical therapies for the treatment of dermatophyte-infected hairs from dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **31**, 250–253 (1995)
- Williams, C.J., Murray, D.L. & Brake, J.** Development of a model to study *Aspergillus fumigatus* proliferation on the air cell membrane of *in ovo* injected broiler eggs. *Poult. Sci.* **79**, 1536–1542 (2000)

- Woolley, D.W.** Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J. Biol. Chem.* **152**, 225–232 (1944)
- Wollschlager, C. & Khan, F.** Aspergillomas complicating sarcoidosis. A prospective study in 100 patients. *Chest* **86**, 585–588 (1984)
- Wosten, H.A.** Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 625–646 (2001)
- Yoshida, Y. & Aoyama, Y.** Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-45014DM purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 229–235 (1987)
- Zaas, A.K. & Alexander, B.D.** *Invasive Pulmonary Aspergillosis*. in *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis* (eds Latgé, J.P. & Steinbach, W.J.) 293–301 (ASM press, Washington DC, 2009)
- Zhao, Y. et al.** Detection of *Aspergillus fumigatus* in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1378–1383 (2010)
- Zimmerli, S., Knecht, U. & Leib, S.L.** A model of cerebral aspergillosis in non-immunosuppressed nursing rats. *Acta Neuropathol.* **114**, 411–418 (2007)
- Ziółkowska, G., Tokarzewski, S. & Nowakiewicz, A.** Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland. *Poult. Sci.* **93**, 1106–1112 (2014)

## Résumé

---

*Aspergillus fumigatus* est un agent pathogène respiratoire majeur chez les oiseaux d'ornement comme de production. L'aspergillose qui peut être responsable de mortalités importantes et de chutes de performances est difficile à traiter. Nous avons développé un modèle d'aspergillose aiguë chez le dindonneau en inoculant différents lots d'oiseaux âgés de moins d'une semaine *via* une aérosolisation intratrachéale de doses croissantes de conidies ( $10^5$  à  $10^8$ /animal) en utilisant un MicroSprayer®. Le développement de la masse fongique a été évalué par qPCR, dosage du galactomannane (GM), culture fongique et évaluation histopathologique dans le but de comparer les résultats obtenus en fonction du nombre de conidies inoculées. Une mortalité significative a été observée dans les 4 jours suivant l'inoculation uniquement pour l'inoculum le plus concentré. Les résultats des différents marqueurs du développement du champignon (culture, qPCR et GM), sont très bien corrélés avec la dose de l'inoculum administrée. Les moyennes d'équivalents conidies/g de poumon obtenues par qPCR étaient 1,3  $\log_{10}$  plus importantes que les numérations obtenues par culture sur gélose. Ce nouveau modèle incluant une combinaison inédite de biomarqueurs chez la dinde a été utilisé pour évaluer l'efficacité de l'énilconazole, seule molécule utilisée en élevage avicole pour lutter contre l'aspergillose. Dans deux expérimentations distinctes, des dindonneaux infectés avec  $10^7$  (ExpB) ou  $10^8$  (ExpA) conidies d'*A. fumigatus* ont été traités par aérosolisation d'énilconazole à la dose de 20 mg/m<sup>3</sup> une (ExpA) ou deux fois (ExpB) par jour pendant 3 jours consécutifs, ou par itraconazole (ExpB) par voie orale à la dose de 10 mg/kg pendant 7 jours. La mortalité des dindes infectées et traitées par l'itraconazole a été réduite à 0, contrairement aux dindes non-traitées ou traitées par l'énilconazole (40 % de mortalité). Aucun effet protecteur ni aucune différence au niveau de la masse fongique mesurée dans les poumons par numération sur géloses, dosage du GM ou qPCR n'ont été observés chez les dindonneaux traités par l'énilconazole à l'issue des deux expérimentations.

## Abstract

---

*Aspergillus fumigatus* remains a major respiratory pathogen in both ornamental and poultry. Aspergillosis can be responsible for high mortality rates and induces significant economic losses, particularly in turkey production, and it is still difficult to treat. We developed a new model of acute aspergillosis in young turkeys by inoculating few-days-old turkeys via intratracheal aerosolization with increasing concentrations ( $10^5$  up to  $10^8$ ) of conidia using a MicroSprayer® device. The fungal burden was assessed and compared by real-time PCR, galactomannan (GM) dosage, fungal colony (CFU) counting and by histopathology. Early death occurred in the first 96 h post-inoculation only at the highest inoculum dose. We observed a correlation between inoculum size and results obtained by real-time PCR, GM dosage and CFU counting. The mean fungal burden detected by qPCR was 1.3  $\log_{10}$  units higher than the mean values obtained by CFU measurement. Furthermore, this new model, with its unique combination of markers, has been used to evaluate the efficacy of enilconazole. This is so far the only molecule used against aspergillosis in poultry farms. In two different experiments, turkeys were challenged with  $10^7$  (ExpB) or  $10^8$  (ExpA) conidia of *Aspergillus* and were treated by aerosolization of enilconazole at a dose of 20 mg/m<sup>3</sup>, once (ExpA) or twice a day (ExpB) for 3 days, or itraconazole (ExpB) *per os* at 10 mg/kg for 7 days. No mortality was observed in infected turkeys treated with itraconazole, unlike untreated birds or turkeys treated with enilconazole (40 % mortality). No protective effect and no difference in fungal burden in lungs were observed in turkeys treated with enilconazole at the end of the two experiments after measuring by culture, GM dosage and qPCR.