

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2020

N° 65

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

CARTIER Noémie, née le 27/11/1994 à Poitiers (86), France

**Aspergillose au ZooParc de Beauval : incidence clinique chez les manchots de Humboldt
(*Spheniscus humboldti*) et étude de la contamination environnementale**

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 13 novembre 2020

JURY

PRÉSIDENT : Pr Lanotte Philippe, PU-PH de Bactériologie - Virologie, CHRU Tours

DIRECTEUR : Pr Desoubaux Guillaume, PU-PH de Parasitologie - Mycologie - Médecine tropicale, CHRU Tours

MEMBRES :

Dr Bailly Éric, PH de Parasitologie - Mycologie - Médecine tropicale, CHRU Tours

Dr Chesnay Adélaïde, AHU de Parasitologie - Mycologie - Médecine tropicale, CHRU Tours

Dr Leclerc Antoine, Vétérinaire à la clinique du ZooParc de Beauval, St-Aignan-sur-Cher

ANNEE : 2020 - 2021

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

16 PROFESSEURS

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAULT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

3 PROFESSEURS EMERITES

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

38 MAITRES DE CONFERENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

VANIER	Antoine	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
---------------	----------------	-----------------------------

1 DIRECTEUR DE RECHERCHE

CHALON	Sylvie	INSERM
---------------	---------------	--------

2 CHARGES DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRA
MOIRE	Nathalie	INRA

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
------------------------	--------------	---------

1 PAST

JOYEUX	VINCENT	Filière Pharmacie
---------------	----------------	-------------------

3 AHU

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 13/11/2020

L'étudiant

M^{me} CARTIER Noémie

Le Doyen de la Faculté

Professeur Véronique Maupoil

REMERCIEMENTS

Je commencerai par te remercier, Professeur Guillaume Desoubes, pour m'avoir encadrée dans ce travail de thèse. Merci pour ta disponibilité, ta réactivité et pour tous les conseils que tu as pu me prodiguer. Tu as contribué à la naissance et à la réussite de ce projet mais également largement à ma formation professionnelle en tant que future biologiste. C'est toujours un plaisir de travailler avec un esprit aussi brillant et j'espère que notre collaboration pourra perdurer.

Je remercie le Professeur Lanotte de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci également d'avoir participé à ma formation lors de mon tout premier semestre d'internat au sein du laboratoire de bactériologie de Bretonneau. Votre enseignement a contribué à mon engouement pour la microbiologie et à ma décision de me spécialiser dans le domaine des agents infectieux. Merci aux Docteurs Éric Bailly et Adélaïde Chesnay d'accepter de faire partie de ce jury. Vos compétences respectives en mycologie médicale m'ont aidée dans mon apprentissage de la discipline et dans l'écriture de cette thèse. Merci au Docteur Antoine Leclerc, vétérinaire au ZooParc de Beauval, d'avoir répondu à mes nombreuses questions. Je connais beaucoup mieux les manchots à présent ! Je suis heureuse de pouvoir te compter parmi les membres de ce jury et d'avoir pu bénéficier de ton expérience.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont permis la réalisation technique de ce projet : Ronan Le Sénéchal, Margaux Becerra, Brice Le Gallou et Estelle Perraud, ainsi que tous ceux qui y ont participé, de près ou de loin.

Je tenais à remercier mes amis pharmaciens qui m'ont accompagnée et soutenue pendant mes études : François, Victor, Damien et bien d'autres. J'ai adoré ces années passées à vos côtés. Je remercie tous mes co-internes pour les bons moments passés dans les différents laboratoires que j'ai eu l'occasion de visiter. Je vous souhaite bonne chance pour la suite.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a permis de devenir ce que je suis et qui m'a toujours encouragée à rechercher l'excellence. Je remercie Alexandre, mon fiancé et ami, pour m'avoir toujours soutenue, et parfois stimulée pendant les moments de relâchement ! J'ai beaucoup de chance de t'avoir.

TABLE DES MATIERES

RESUME	10
ABSTRACT	11
INTRODUCTION	12
<i>Aspergillus</i> et aspergillose	12
L'aspergillose aviaire.....	14
Facteurs de risque.....	14
Pathogénèse et clinique.....	15
Moyens diagnostiques	15
Prise en charge curative.....	16
L'aspergillose chez le manchot.....	18
Résistances acquises d' <i>Aspergillus fumigatus</i> aux antifongiques azolés.....	19
Rôle des antifongiques utilisés en thérapeutique	20
Rôle des antifongiques utilisés dans l'environnement.....	21
OBJECTIFS	25
MATERIELS & METHODES	26
Etude de l'incidence clinique de l'aspergillose chez les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval	26
Etude de la contamination environnementale dans les nids des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval	28
Prélèvements environnementaux dans les nids.....	28
Mesure du taux de prévalence de la contamination environnementale	30
Recherche de mutations de résistance aux antifongiques azolés	32
RESULTATS.....	34
Etude de l'incidence clinique de l'aspergillose chez les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval	34
Etude de la contamination environnementale dans les nids des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval	36
Mesure du taux de prévalence de la contamination environnementale	36
Recherche de mutations de résistance aux antifongiques azolés	39
DISCUSSION	40

CONCLUSION	43
BIBLIOGRAPHIE.....	44
ANNEXE 1.....	51
ANNEXE 2.....	52
ANNEXE 3.....	53
ANNEXE 4.....	54
ANNEXE 5.....	57

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Examen microscopique sur culture d' <i>Aspergillus</i> section <i>fumigati</i>	12
Figure 2. Morphologie du système respiratoire chez l'oiseau	14
Figure 3. Autopsie d'un cygne (<i>Cygnus olor</i>) souffrant d'aspergillose.....	15
Figure 4. Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>Aspergillus fumigatus</i>	19
Figure 5. Développement de résistances par <i>A. fumigatus</i> in vivo chez un patient soumis à un traitement antifongique azolé	21
Figure 6. Développement de résistances par <i>A. fumigatus</i> exposé aux antifongiques azolés dans l'environnement	22
Figure 7. Répartition mondiale de la résistance d' <i>A. fumigatus</i> aux antifongiques azolés médiée par les mutations TR34/L98H.....	23
Figure 8. Structure chimique des principaux antifongiques azolés d'intérêt	24
Figure 9. Manchots de Humboldt (<i>Spheniscus humboldti</i>), ZooParc de Beauval	25
Figure 10. Photographie satellite du ZooParc de Beauval	25
Figure 11. Mode opératoire pour la recherche d'aspergillose à partir d'une biopsie.....	27
Figure 12. Enclos des manchots de Humboldt au ZooParc de Beauval	28
Figure 13. Nids des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval	29
Figure 14. Session de prélèvements environnementaux d'avril 2018.....	29
Figure 15. Etat des lieux de la contamination fongique dans les nids	30
Figure 16. Extraction de l'ADN aspergillaire à partir d'une culture	31
Figure 17. Principales mutations du gène <i>cyp51A</i> responsables de résistance aux antifongiques azolés chez <i>A. fumigatus</i>	32
Figure 18. Emplacement schématique des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage du gène <i>cyp51A</i> et de son promoteur	33
Figure 19. Âge des manchots lors du décès	35
Figure 20. Examens positifs ayant permis de diagnostiquer une aspergillose sur les prélèvements autopsiques des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval	35
Figure 21. Décompte des colonies de champignons filamenteux présents dans les nids en fonction de la session de prélèvements.....	36
Figure 22. Espèces recensées dans les nids lors de la session de prélèvements d'avril 2018	37
Figure 23. Espèces recensées dans les nids lors de la session de prélèvements de décembre 2018.....	37
Figure 24. Espèces recensées dans les nids lors de la session de prélèvements de septembre 2019.....	38
Figure 25. Colonisation des nids par <i>A. section fumigati</i> en fonction de la saison	38
Tableau 1. CMI aux antifongiques mesurées par microdilution de la souche d' <i>A. fumigatus</i> mutée G138 et breakpoints cliniques correspondants publiés par l'EUCAST	39

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CHRU	Centre hospitalier régional universitaire
CMI	Concentration minimale inhibitrice
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IRM	Imagerie par résonance magnétique
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
TR	<i>Tandem repeat</i>
UFC	Unité formant colonie
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

RESUME

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux environnemental responsable de l'aspergillose, une infection opportuniste touchant aussi bien l'Homme que l'animal. Cette pathologie est particulièrement fréquente chez les manchots maintenus en captivité. Son traitement repose sur la prescription d'antifongiques azolés, mais la survenue de mutations dans le gène *cyp51A* codant la protéine cible peut conduire à des échecs thérapeutiques. Le lien entre l'apparition de résistances et l'utilisation d'antifongiques azolés dans l'agriculture est bien démontré par un phénomène de pression de sélection. Le ZooParc de Beauval est un grand parc animalier français qui héberge une colonie de plus de cent manchots de Humboldt (*Spheniscus humboldti*), dans un environnement rural, entouré de terres agricoles. La première partie de ce travail a cherché à déterminer l'incidence clinique de l'aspergillose au sein de la colonie de manchots, et à évaluer le niveau de contamination environnementale par *A. fumigatus* au moyen de trois séries de prélèvements dans leurs nids. La deuxième partie de ce travail a consisté à rechercher les mutations de résistance dans les souches d'*A. fumigatus* isolées au préalable dans l'enclos.

Notre étude retrouvait une part de mortalité imputable à l'aspergillose chez les manchots de 9,4% en 2018 et 33,3% en 2019. Cette mortalité concernait des manchots juvéniles dans respectivement 100% et 87,5% des cas. Les prélèvements environnementaux ont retrouvé une charge fongique globale dans les nids beaucoup plus importante en été. Parmi les espèces identifiées, on retrouvait celles d'*A. section fumigati* dans respectivement 67%, 75% et 100% des nids en avril 2018, décembre 2018 et septembre 2019. Les isolats d'*A. section fumigati* étaient tous des *A. fumigatus stricto sensu* excepté un isolat d'*A. nishimurae*. Il a été mis en évidence une mutation du gène *cyp51A* de type G138 dans un des isolats d'*A. fumigatus*. Cette souche présentait une CMI élevée à l'itraconazole et, dans une moindre mesure, au voriconazole.

L'aspergillose à *Aspergillus fumigatus* est une cause importante de mortalité chez les manchots du ZooParc de Beauval, à mettre en relation avec la contamination massive de leur environnement par *A. fumigatus*. Une réflexion quant à la configuration des nids et aux mesures d'hygiène appliquées est à mener pour tenter de diminuer la morbi-mortalité imputable à l'aspergillose, notamment chez les jeunes manchots. Malgré la localisation du ZooParc de Beauval dans un environnement rural, il ne semble pas y avoir d'impact des pratiques agricoles adjacentes sur la sélection de souches résistantes.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is an environmental mold responsible for aspergillosis, an opportunistic infection affecting both humans and animals. This pathology is particularly common in penguins bred in captivity. Its treatment is based on the prescription of azole antifungals. However, the occurrence of mutations in the *cyp51A* gene encoding the target protein can lead to treatment failures. The link between the emergence of resistance and the use of azole antifungals in agriculture is well demonstrated through a phenomenon of selection pressure. The *ZooParc de Beauval* is a large French animal park that hosts a colony of more than a hundred Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) located in the French countryside and surrounded by fields. The first part of this work investigated the clinical incidence of aspergillosis within the penguin colony and assessed the level of environmental contamination by *A. fumigatus* using three sets of samples from their nests. The second part of this work consisted in looking for resistance mutations in strains of *A. fumigatus* isolated beforehand in the enclosure.

Our study found respectively a 9.4% and a 3.3% proportion of mortality due to aspergillosis in penguins in 2018 and in 2019. This mortality concerned juvenile penguins in respectively 100% and 87.5% of cases. Environmental samples have found a greater overall fungal load in the nests in summer. Among the identified species, *A. section fumigati* species were respectively found in 67%, 75% and 100% of nests in April 2018, December 2018 and September 2019. *A. section fumigati* isolates were all *A. fumigatus stricto sensu* except one isolate which was *A. nishimurae*. A G138 mutation in the *cyp51A* gene was demonstrated in one of the *A. fumigatus* isolates. This strain showed an elevated MIC for itraconazole and, to a more limited extent, for voriconazole.

Aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus* is a major cause of death in penguins at *ZooParc de Beauval*, due to the massive contamination of their environment by *A. fumigatus*. The configuration of the nests and hygiene measures should be reconsidered to reduce the morbidity and mortality attributable to aspergillosis, especially in young penguins. Despite the location of the *ZooParc de Beauval* in a rural environment, adjacent agriculture does not seem to have any impact on selection of resistant strains.

INTRODUCTION

Aspergillus et aspergillose

Aspergillus est un champignon filamenteux saprophyte de répartition mondiale. Très répandu dans l'environnement, il est fréquemment isolé à partir du sol, de la matière végétale en décomposition, du compost, des copeaux de bois, du foin, etc... Le genre *Aspergillus* est constitué de plus de 300 espèces [1]. Parmi elles, seule une vingtaine est impliquée en pathologie humaine et animale, avec une large représentation de l'espèce *Aspergillus fumigatus* (Figure 1) [2]. Il n'est pas possible de distinguer les différentes espèces des complexes d'*Aspergillus* à partir des seules caractéristiques macroscopiques et microscopiques des champignons. Leur identification précise nécessite l'utilisation de techniques moléculaires.



Figure 1. Examen microscopique sur culture d'*Aspergillus* section *fumigati*, coloration au bleu de lactophénol, x400 (Laboratoire de parasitologie - mycologie, CHRU Tours)

L'aspergillose est une infection opportuniste acquise à la suite d'une exposition environnementale à *Aspergillus*. La contamination se fait le plus souvent par voie respiratoire, par inhalation de spores, et est responsable d'un large spectre d'entités cliniques allant de l'infection locale pulmonaire à des formes disséminées retrouvées classiquement chez les sujets immunodéprimés.

Chez les animaux, cette pathologie diffère de l'aspergillose humaine par deux aspects [3]. Le premier aspect est physiopathologique. Depuis les années 1980, l'apparition de phénomènes d'immunodépression chez l'Homme (immunodépression d'origine infectieuse avec la

découverte du VIH ou d'origine iatrogénique avec l'essor des thérapies immunosuppressives et anticancéreuses) a conduit à l'émergence d'infections opportunistes fongiques, dont fait partie l'aspergillose [4]. Une conséquence de cette profonde mutation épidémiologique fut l'augmentation de l'utilisation des antifongiques et l'apparition de nouvelles molécules. Au contraire, chez les animaux, l'épidémiologie de l'aspergillose est restée inchangée.

Le second aspect est l'intérêt économique ou conservatoire. Le coût a en effet un impact important sur les décisions de diagnostiquer et de traiter les infections fongiques chez l'animal. Dans ce contexte, la valeur économique et/ou sentimentale de l'animal dictera les actions à entreprendre en cas d'aspergillose. La nécessité de conservation pour certaines espèces animales, principalement dans le cadre des parcs zoologiques, pourra également jouer un rôle important dans la décision de traitement.

Finalement, plusieurs entités cliniques d'aspergillose sont maintenant bien définies en médecine vétérinaire. Certaines sont spécifiques d'espèces animales et dépendent bien souvent de leurs anatomies respectives. Parmi ces entités, on trouve l'aspergillose aviaire.

L'aspergillose aviaire

L'aspergillose aviaire touche les oiseaux sauvages de manière sporadique, mais plus fréquemment les oiseaux en captivité. L'espèce majoritairement impliquée est *A. fumigatus*, probablement en raison de la plus petite taille de ses spores par rapport à d'autres espèces d'*Aspergillus* et de sa capacité à croître à des températures élevées (la température corporelle chez les oiseaux pouvant dépasser 40°C).

Une particularité anatomique des oiseaux est la présence de sacs aériens [5]. Ces sacs sont des organes creux présents dans tout leur corps et dans leurs os (Figure 2). Ils permettent d'alimenter les poumons en oxygène, et participent à la thermorégulation et à l'allègement du squelette. Ils reçoivent ainsi en permanence de l'air chaud et humide contenant des concentrations élevées en oxygène et comportent peu de vaisseaux sanguins capables de transporter les cellules immunitaires. Ces conditions favorisent le développement de l'aspergillose aviaire.

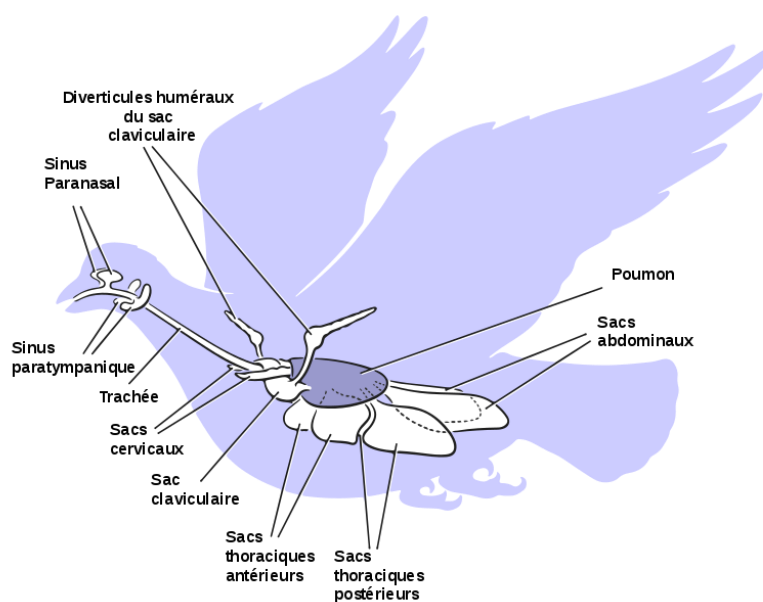


Figure 2. Morphologie du système respiratoire chez l'oiseau. On note la présence de sacs aériens dans tout le corps, en communication directe avec les poumons. D'après Sereno et al. [6].

Facteurs de risque

Il existe différents facteurs de risque d'aspergillose chez les oiseaux [7]. Une partie est liée à la concentration des spores dans l'environnement et est majoritairement corrélée au maintien en captivité : chaleur, humidité, mauvaise ventilation et mauvaise hygiène des lieux

de vie, stockage à long terme de la nourriture, etc... Une autre partie est liée à l'hôte et comprend notamment une nourriture inadéquate, une prise de médicaments, un stress lié à la captivité, un surpeuplement, des traumatismes...

Pathogénèse et clinique

Il existe deux formes principales d'aspergillose aviaire : l'une aiguë, l'autre chronique. La forme dépend de la quantité de spores inhalées et de certains facteurs dépendants de l'hôte, comme vus précédemment. Les spores inhalées colonisent les sacs aériens puis les poumons, conduisant à la formation de granulomes fongiques qui obstruent les bronches et la trachée, entraînant une détresse respiratoire puis la mort. La migration par voie hématogène est également possible.

L'infection est souvent cliniquement difficile à détecter. On peut noter dans un premier temps des difficultés respiratoires et des sibilances (respiration sifflante) liées à l'obstruction des voies respiratoires par les granulomes fongiques. Puis surviennent des signes généraux comme une léthargie, une anorexie, des diarrhées. Parfois, l'amaigrissement de l'oiseau est le seul symptôme décelable.

Moyens diagnostiques

Les moyens diagnostiques chez l'oiseau, et plus largement chez l'animal, sont limités, et le diagnostic est souvent posé en *post-mortem* avec la mise en évidence de lésions caractéristiques à l'autopsie (Figure 3).

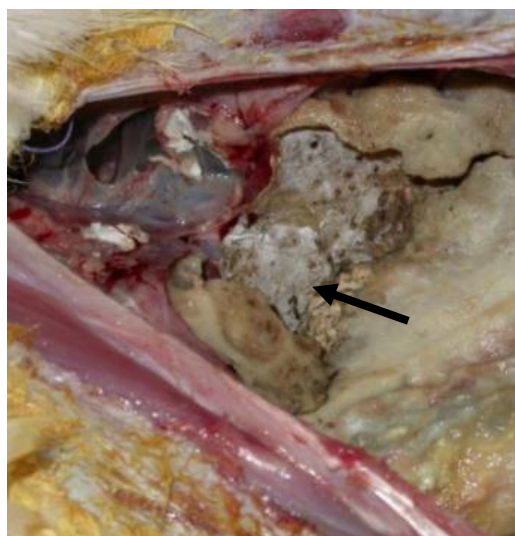


Figure 3. Autopsie d'un cygne (*Cygnus olor*) souffrant d'aspergillose. On observe un sac aérien rempli de matériel nécrotique caséux contenant des éléments fongiques. D'après Seyedmousavi et al. [8].

Il existe néanmoins quelques moyens de diagnostiquer plus précocement l'aspergillose aviaire [9]. La réalisation d'une numération sanguine et le dosage de certains marqueurs biochimiques peuvent mettre en évidence un processus infectieux, mais ne sont pas spécifiques de la pathologie. Les leucocytes sont généralement augmentés, et on peut observer une anémie non régénérative, principalement en cas d'aspergillose chronique. De façon non spécifique, l'analyse biochimique montre classiquement une hyperprotéinémie avec hypoalbuminémie et hypergammaglobulinémie, une augmentation des enzymes hépatiques liée aux toxines fongiques qui endommagent le foie ainsi qu'une hypoglycémie.

Il est possible de réaliser une sérologie ou une recherche d'antigènes aspergillaires qui peuvent permettre d'orienter le diagnostic. Il semble que la sérologie à elle seule ne soit pas appropriée pour détecter les cas cliniques d'aspergillose aviaire et que des résultats négatifs n'excluent pas cette maladie. Le fait qu'*Aspergillus* soit un organisme omniprésent explique la présence très fréquente d'anticorps anti-*Aspergillus* même chez des individus cliniquement sains [10]. La recherche d'antigènes aspergillaires de type galactomannane paraît intéressante chez certaines espèces d'oiseaux en combinaison avec d'autres outils diagnostiques, mais peut se révéler insuffisante pour d'autres genres aviaires [11], [12].

La radiographie ou l'imagerie par tomodensitométrie peuvent également être des moyens simples et non invasifs d'évoquer le diagnostic d'aspergillose. L'endoscopie permet de mettre en évidence des lésions fongiques et de réaliser concomitamment des biopsies du tractus respiratoire. Ces biopsies peuvent être mises en culture afin d'identifier l'espèce incriminée. *Aspergillus* étant un contaminant atmosphérique courant, une culture positive n'est pas un signe formel d'infection, particulièrement si l'échantillon provient d'un site non stérile. L'isolement du champignon *in vitro* sera néanmoins susceptible d'avoir une importance diagnostique et sera à confronter à l'ensemble des signes clinico-biologiques. La recherche d'ADN d'*Aspergillus* par PCR peut être réalisée dans les cas où la culture ne montre pas de résultat satisfaisant.

Prise en charge curative

La prise en charge de l'aspergillose aviaire est délicate et nécessite parfois des traitements longs, notamment dans les formes chroniques. Elle doit passer avant tout par la détection et l'élimination des facteurs favorisants [13]. L'ablation chirurgicale des granulomes fongiques associée à un traitement antifongique constitue une bonne approche et améliore les chances de guérison. La chirurgie est cependant risquée du fait de l'anesthésie et du risque de traumatisme, et on lui préfère donc généralement un traitement antifongique seul. Le traitement est donné par voie orale ou par nébulisation, la voie parentérale étant plus compliquée à aborder et réservée aux formes graves. Plusieurs molécules développées pour la médecine humaine ont été testées chez les oiseaux, notamment les azolés, l'amphotéricine B, ou la terbinafine. Le voriconazole, un azolé de nouvelle génération

souvent employé dans le traitement de l'aspergillose humaine, est également considéré comme un des traitements les plus efficaces de l'aspergillose aviaire [14]. Les recommandations de posologie sont maintenant bien définies pour certaines espèces animales.

L'aspergillose chez le manchot

Le manchot est un oiseau fréquemment touché par l'aspergillose, particulièrement lorsqu'il est maintenu en captivité. En 1977, Khan et al. rapportaient une épidémie d'aspergillose dans un groupe de huit manchots nouvellement arrivés dans un zoo de New Delhi [15]. Parmi les huit manchots importés, sept décédaient dans les quatre à dix-sept jours suivant leur arrivée. Trois des sept manchots montraient à l'autopsie des lésions typiques d'aspergillose. Les prélèvements environnementaux réalisés ne retrouvant pas d'*Aspergillus*, les auteurs concluaient alors à une contamination antérieure à leur arrivée et à une probable exacerbation de l'infection par le stress de la captivité et du changement d'environnement. D'autres études ont montré l'implication de l'aspergillose dans les décès survenant chez les manchots en captivité. En 2015, une étude menée sur six ans chez 327 manchots de Magellan du Centre de rétablissement des animaux marins de Rio Grande (Brésil) faisait état de 66 décès par aspergillose, soit 48,5% des décès totaux [16]. Il s'agissait pour 95,5% de jeunes manchots, et pour 75,8% de manchots transportés par avion depuis d'autres centres. *A. fumigatus* était l'espèce impliquée dans 98,5% des cas. Globalement, l'ensemble de ces données mettent en évidence des catégories de population particulièrement à risque de développer une aspergillose : les juvéniles, les manchots récemment importés et les manchots sujets à un stress physique ou environnemental.

Résistances acquises d'*Aspergillus fumigatus* aux antifongiques azolés

Les antifongiques azolés, tels que l'itraconazole, le voriconazole, l'isavuconazole ou le posaconazole, font partie des antifongiques utilisés en première intention dans le traitement et la prophylaxie de l'aspergillose [17]. *A. fumigatus* est naturellement sensible aux azolés, contrairement à certaines espèces cryptiques du complexe *fumigati* comme *A. lentulus* ou *A. pseudofischeri*, qui y sont intrinsèquement résistantes [18]. Cependant, les deux dernières décennies ont vu apparaître des résistances acquises aux azolés chez *A. fumigatus*. Les premiers isolats cliniques d'*A. fumigatus* résistants à l'itraconazole ont été mis en évidence en 1997 au Royaume-Uni et en Suède [19], [20]. Depuis, les études sur des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* se sont multipliées et ont retrouvé de plus en plus fréquemment des résistances acquises aux azolés. Une étude multicentrique menée sur des isolats cliniques entre 2009 et 2011 dans 19 pays (15 européens et 4 non européens) retrouvait ainsi une prévalence de résistance d'*A. fumigatus* aux azolés de 3,2% [21].

Les mécanismes de résistance acquise aux azolés sont multiples et certains restent encore méconnus, mais le mécanisme le plus couramment retrouvé est une modification de la cible. La protéine cible des antifongiques azolés, la lanostérol-14- α -déméthylase, est une enzyme clé dans la voie biosynthétique de l'ergostérol, le stérol prédominant dans les membranes cellulaires de la plupart des champignons (l'équivalent du cholestérol dans le règne animal) (Figure 4). Il a été démontré que des mutations dans le gène *cyp51A*, qui code pour cette protéine, peuvent provoquer une résistance.

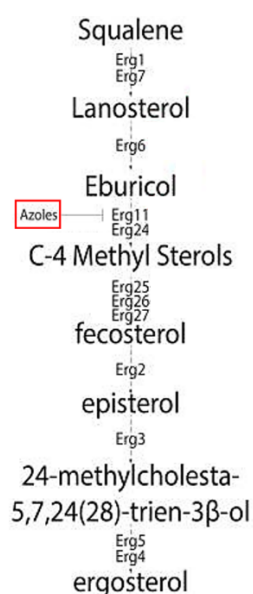


Figure 4. Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *Aspergillus fumigatus*. L'enzyme Erg11 (= lanostérol-14- α -déméthylase) est la protéine cible des antifongiques azolés. Adapté d'après Dhingra et Cramer [22].

Deux voies d'acquisition de résistances aux azolés sont décrites chez *A. fumigatus* [23] :

- L'exposition de souches *in vivo* à des thérapeutiques antifongiques données à long terme.
- L'exposition de souches environnementales aux antifongiques azolés, utilisés notamment dans l'agriculture.

Bien que ces deux voies aient des caractéristiques différentes, les prérequis à l'apparition de résistances sont les mêmes : un environnement favorable à la croissance fongique et la présence concomitante de composés azolés.

Rôle des antifongiques utilisés en thérapeutique

En médecine humaine, les antifongiques azolés sont largement utilisés dans le traitement et la prophylaxie de l'aspergillose et peuvent favoriser dans certains cas l'apparition de résistance. Le risque d'apparition de résistance aux azolés chez *A. fumigatus* dépend du mode de reproduction du champignon, et donc du type d'infection dont est atteint le patient [24]. Dans l'aspergillome par exemple, le champignon se multiplie dans une cavité pulmonaire par multiplication asexuée en sporulant. La génération de multiples spores unicellulaires favorise alors la présence d'une diversité génétique importante. Il suffira d'une mutation dans un noyau pour impacter le phénotype. Au contraire, dans l'aspergillose invasive, il n'y a pas de reproduction asexuée, le champignon croît par élongation du filament. Le filament contenant des milliers de noyaux, des mutations dans certains d'entre eux n'auront pas de retentissement sur le phénotype.

Dans ce contexte de résistances se développant *in vivo* chez le patient, les mécanismes impliqués sont en règle générale des mutations ponctuelles du gène *cyp51A* (Figure 5). Les mutations connues pour entraîner des résistances se situent par exemple aux positions G54, M220 et G138 [25]. Les acides aminés correspondant sont situés à proximité immédiate de l'ouverture de l'un ou l'autre des deux canaux d'accès au ligand de la protéine. Ces mutations ponctuelles induisent ainsi des modifications de ces canaux et empêchent la liaison de l'azolé à sa cible [26]. Beaucoup de ces mutations entraînent une résistance à plusieurs, sinon à tous les azolés anti-*Aspergillus*. On observe parfois diverses mutations se développant chez le même patient (Figure 5) [27].

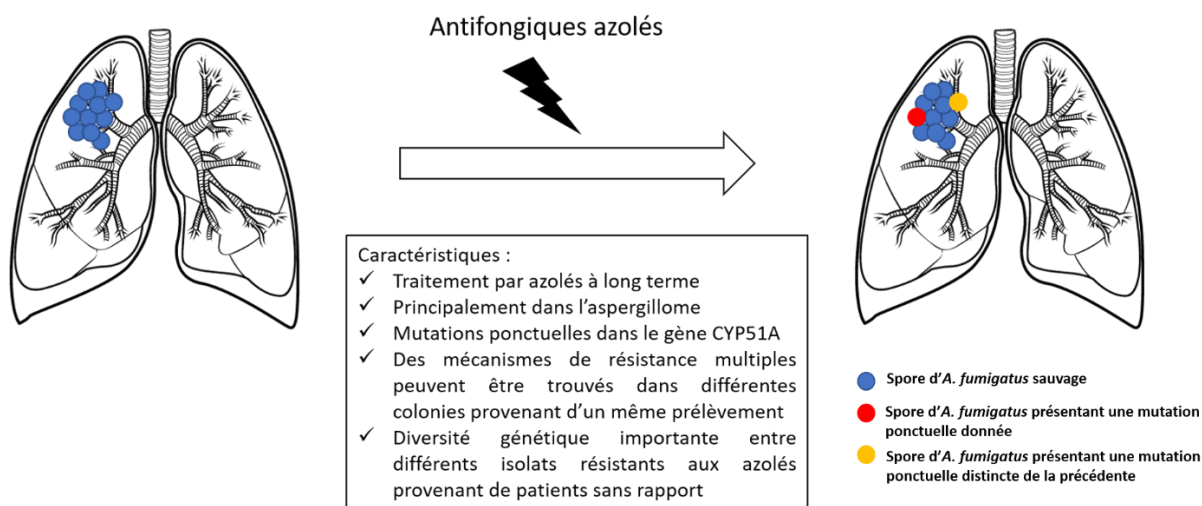


Figure 5. Développement de résistances par *A. fumigatus* in vivo chez un patient soumis à un traitement antifongique azolé. Ce processus est majoritairement observé chez des patients atteints d'aspergillome et traités au long court par antifongique azolé. Les mutations se développant dans ce contexte sont généralement des mutations ponctuelles du gène *cyp51A*. On peut observer plusieurs colonies issues d'un même prélèvement présentant des mutations de résistance différentes. Adapté d'après Meis et al. [28].

Rôle des antifongiques utilisés dans l'environnement

L'utilisation des antifongiques azolés dans l'environnement est large. Elle comprend la protection des plantes et des cultures, mais aussi la préservation de divers matériaux, comme le bois. En agriculture, de nombreux composés sont disponibles pour contrôler la propagation de pathogènes fongiques. Cependant, ce sont les antifongiques azolés qui sont le plus souvent employés, particulièrement en Europe et en Asie, du fait de leur haute efficacité et de leur large spectre d'action [29]. En Europe, 40% de tous les pesticides pulvérisés sur les cultures sont des antifongiques et plus d'un tiers de tous les antifongiques vendus sont des antifongiques azolés [30]. Bien que *A. fumigatus* ne soit pas un phytopathogène, il est très répandu dans l'environnement. L'utilisation régulière d'antifongiques azolés, capables de rester dans le sol pendant plusieurs mois, crée donc un environnement qui contribue à l'émergence de souches résistantes aux azolés.

L'isolement de souches d'*A. fumigatus* résistant aux azolés chez des patients n'ayant jamais reçu d'antifongiques laisse supposer que, dans ces cas précis, *A. fumigatus* peut acquérir des résistances dans l'environnement [31] (Figure 6). Les mutations les plus fréquemment rapportées, TR34/L98H et TR46/Y121F/T289A, combinent une ou plusieurs substitutions de codons dans le gène *cyp51A* avec une répétition en tandem de 34 (TR34/L98H) ou 46 paires de bases (TR46/Y121F/T289A) dans le promoteur du gène, conduisant à sa surexpression. Ce mécanisme de résistance est actuellement le plus étroitement associé à la voie environnementale de résistance [32].

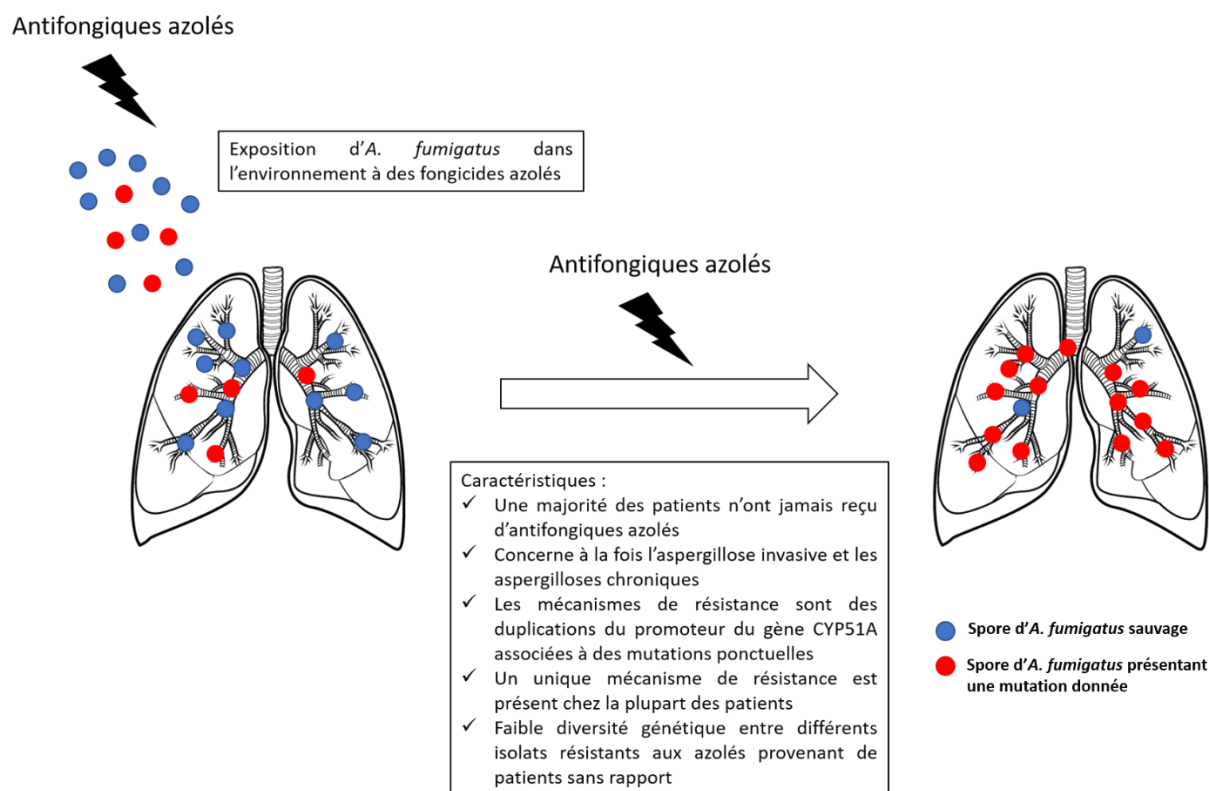


Figure 6. Développement de résistances par *A. fumigatus* exposé aux antifongiques azolés dans l'environnement. Les mutations de résistance sont retrouvées majoritairement chez des patients naïfs d'azolés et sont caractérisées par l'association de mutations ponctuelles du gène *cyp51A* et de duplications en tandem du promoteur du gène. La diversité génétique est faible entre des patients sans rapport, la mutation TR34/L98H prédominant largement. Adapté d'après Meis et al. [28].

Le nombre de souches porteuses de ces mutations comportant un *tandem repeat* est en augmentation depuis 20 ans. Depuis la découverte des premiers isolats résistants aux azolés porteurs de la mutation TR34/L98H en Italie et aux Pays-Bas en 1998 [33], [34], des résultats similaires ont été rapportés dans de nombreux pays du monde et sur tous les continents (Figure 7). Des isolats cliniques et/ou environnementaux d'*A. fumigatus* porteur de la mutation TR34/L98H ont ainsi été recensés en Europe (Italie [33], Pays-Bas [34], Norvège [34], Autriche [21], Royaume-Uni [35], Pologne [36], Belgique [37], Danemark [38], Allemagne [39], Portugal [40], Roumanie [41], Espagne [42], France [43], Irlande [44]), en Asie (Turquie [45], Chine [46], Inde [47], Taïwan [48], Iran [49], Koweït [50], Japon [51], Pakistan [52], Thaïlande [53], Corée [54]), en Océanie (Australie [55]), en Amérique (Mexique [56], Brésil [57], Colombie [58], Argentine [59], Etats-Unis [60], Pérou [61]) et en Afrique (Tanzanie [62], Kenya [63]). La découverte plus récente de la mutation TR46/Y121F/T289A confirme l'émergence rapide de souches résistantes aux azolés avec des mutations complexes.

Le géotypage de souches d'*A. fumigatus* épidémiologiquement et géographiquement non apparentées montre une moindre diversité génétique parmi les isolats hébergeant

TR34/L98H et TR46/Y121F/T289A par rapport aux isolats sauvages, ce qui suggère que chaque mutation pourrait provenir d'un ancêtre commun [64], [65]. Ces études indiquent que ces mutations de résistance peuvent migrer rapidement.

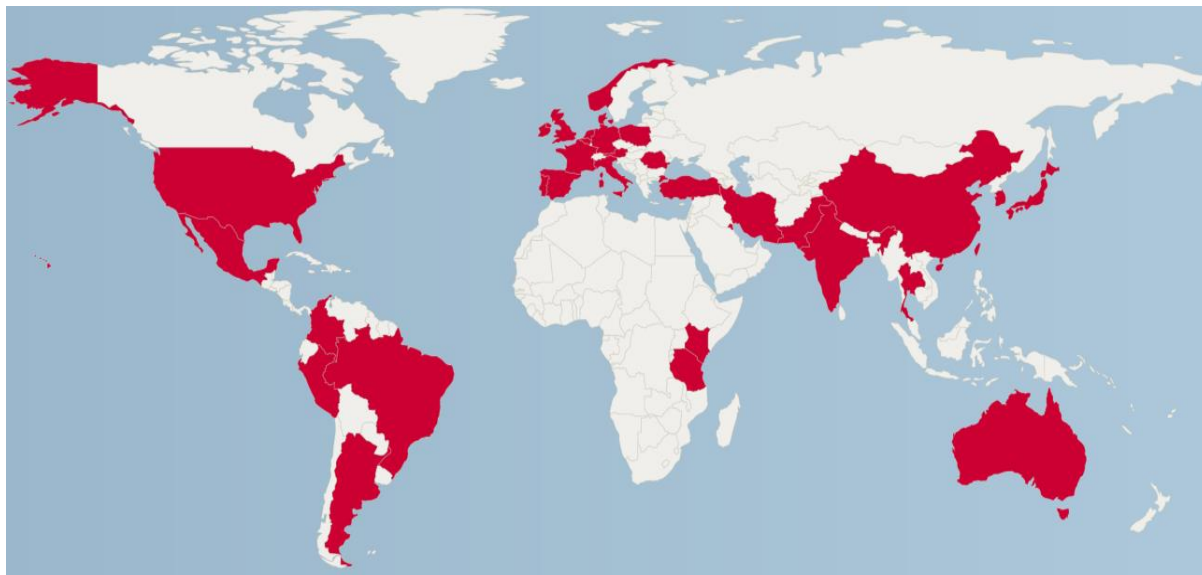


Figure 7. Répartition mondiale de la résistance d'*A. fumigatus* aux antifongiques azolés médiée par les mutations TR34/L98H. Les pays en rouge sont les pays ayant rapporté des isolats cliniques et/ou environnementaux possédant cette mutation [21], [33]–[63]. Adapté d'après Resendiz Sharpe et al. [66].

Cinq molécules azolées largement utilisées en agriculture (propiconazole, tébuconazole, difénoconazole, époxiconazole et bromuconazole) sont particulièrement impliquées dans le développement de souches résistantes aux azolés. Ces cinq inhibiteurs de la 14- α -déméthylase présentent des caractéristiques moléculaires très similaires à celles des antifongiques azolés médicaux, entraînant un haut niveau de résistance croisée et impliquant particulièrement la mutation TR34/L98H (Figure 8) [67]. Enfin, la coïncidence entre l'autorisation d'utilisation de ces inhibiteurs de la 14- α -déméthylase et la première détection de la mutation TR34/L98H conforte l'hypothèse de résistances médiées par l'exposition environnementale [67].

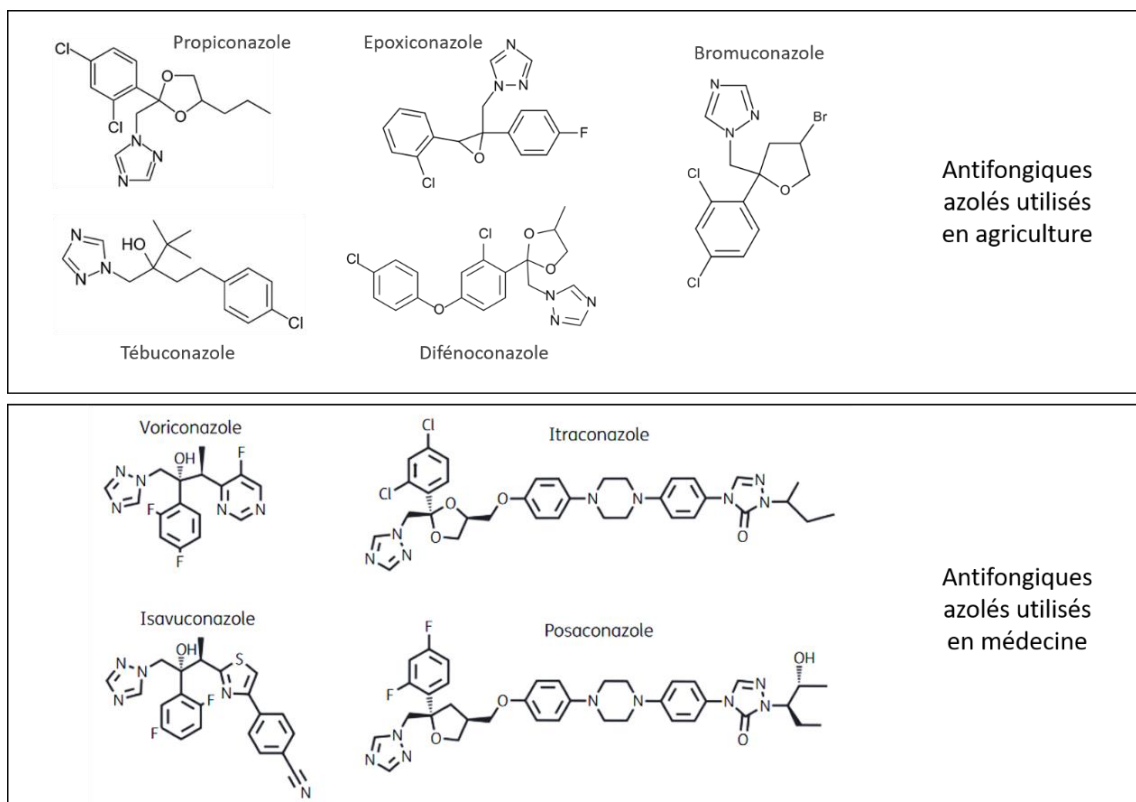


Figure 8. Structure chimique des principaux antifongiques azolés d'intérêt. Adapté d'après Rybak et al. [68].

OBJECTIFS

L'aspergillose est une problématique importante au ZooParc de Beauval. Les oiseaux pensionnaires du parc, et particulièrement les manchots de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) (Figure 9), sont suspectés d'être régulièrement touchés par cette infection. C'est dans ce contexte qu'une étude collaborative a démarré en 2018 en partenariat avec le service de parasitologie - mycologie du CHRU de Tours. Son but était d'étudier l'incidence de l'aspergillose dans la colonie de manchots au moyen de prélèvements autopsiques et d'évaluer le niveau de contamination fongique dans leur environnement au moyen de prélèvements de surface itératifs dans leurs nids.



Figure 9. Manchots de Humboldt (*Spheniscus humboldti*), ZooParc de Beauval. Photographie personnelle.

Par ailleurs, étant donné que le ZooParc de Beauval est situé en milieu rural (Figure 10) et est entouré de terres agricoles qui pourraient favoriser la sélection de souches résistantes, les mutations de résistance aux azolés ont été systématiquement recherchées dans les isolats environnementaux d'*Aspergillus fumigatus*.



Figure 10. Photographie satellite du ZooParc de Beauval à Saint-Aignan (41110), France. Latitude 47.247597, longitude 1.353355. Le zoo est situé dans une zone rurale et est entouré de terres agricoles.

MATERIELS & METHODES

Etude de l'incidence clinique de l'aspergillose chez les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval

En cas de décès, les animaux du ZooParc de Beauval sont systématiquement autopsiés. Dans le cadre de ce projet se déroulant sur les années 2018 et 2019, des prélèvements étaient réalisés lors de l'autopsie des manchots suspects d'aspergillose. Les lésions présentes au niveau des poumons et/ou des sacs aériens étaient biopsiées.

Les prélèvements étaient ensuite acheminés à +4°C au laboratoire de parasitologie - mycologie du CHRU de Tours. Des appositions de la biopsie étaient réalisées sur lame, fixées au méthanol puis imprégnées au calcofluor pour un examen direct. La lame était examinée au microscope à fluorescence à la recherche de filaments mycéliens de type aspergillaire (longueur d'onde d'excitation 330-380 nm, longueur d'onde d'émission 500 nm) (Figure 11). Un examen direct positif suffisait à poser le diagnostic d'aspergillose.

En parallèle de l'examen direct, des fractions du prélèvement étaient cultivées sur deux tubes Sabouraud additionnés de chloramphénicol incubés l'un à 30°C et l'autre à 35°C pendant une semaine. En cas de pousse d'un champignon filamenteux, une observation microscopique était réalisée à partir de la colonie par technique du drapeau avec coloration au bleu de lactophénol (Figure 11). L'espèce présente en culture était alors phénotypiquement identifiée selon ses caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

Enfin, une extraction d'ADN était réalisée à partir de la biopsie (extraction manuelle sur colonne QIAamp DNA Mini-Kit® de QIAGEN après digestion de la biopsie dans un tampon de lyse). L'extrait était amplifié par une PCR quantitative en temps réelle qui ciblait l'ARNr 28S spécifique d'*A. fumigatus* (Annexe 1). Ce protocole étant réalisé sur des prélèvements issus de sites normalement stériles, une PCR positive conduisait au diagnostic d'aspergillose, même en cas d'examen direct et de culture négatifs.

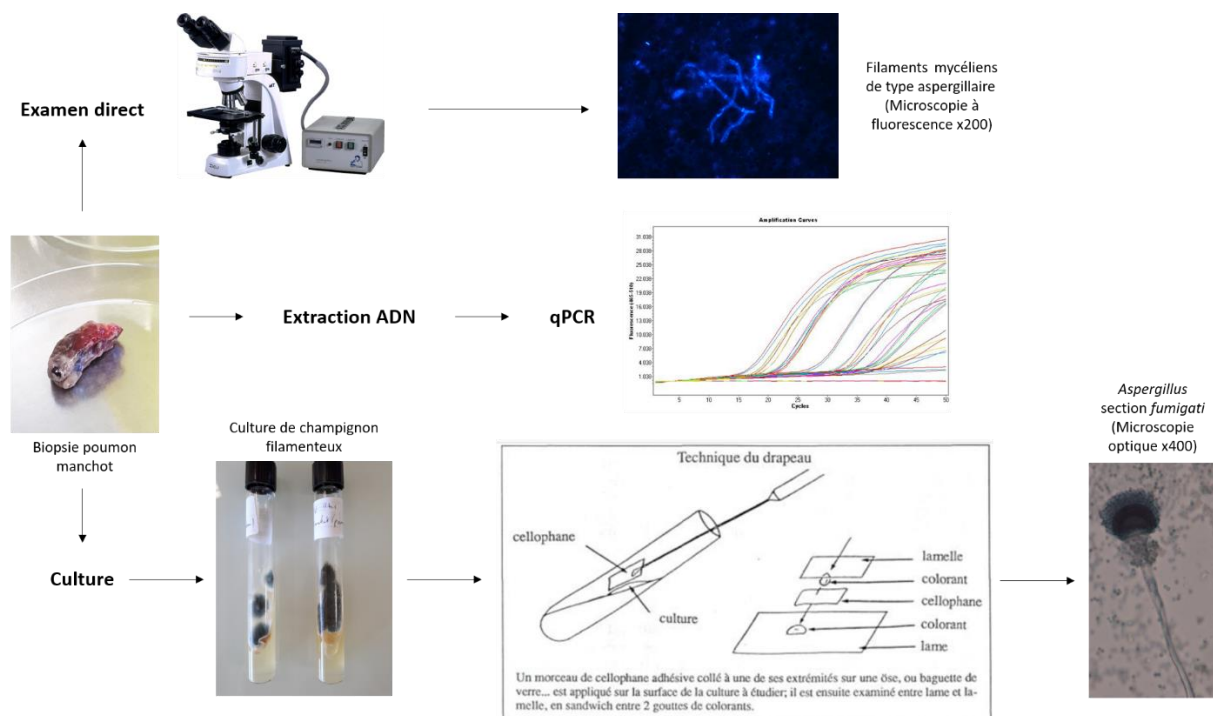


Figure 11. Mode opératoire pour la recherche d'aspergillose à partir d'une biopsie. La biopsie est apposée sur lame de verre, fixée au méthanol puis colorée au Calcofluor. L'examen direct à la recherche de filaments mycéliens est ensuite réalisé par microscopie à fluorescence. La culture consiste à ensemencer la biopsie sur deux tubes Sabouraud + Chloramphénicol incubés à 30°C et 35°C pendant une semaine. Si la culture est positive, un examen direct est réalisé sur les colonies par technique du drapeau avec coloration au bleu de lactophénol. La lame est observée au microscope optique et permet l'identification du champignon selon ses caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Enfin, une qPCR en temps réel à la recherche d'*A. fumigatus* est réalisée après extraction manuelle de l'ADN sur colonne.

Etude de la contamination environnementale dans les nids des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval

Prélèvements environnementaux dans les nids

Afin d'étudier la prévalence d'*Aspergillus fumigatus* et d'autres espèces fongiques dans l'environnement des manchots, trois sessions de prélèvements environnementaux ont été réalisées en avril 2018, décembre 2018 et septembre 2019. Ces trois sessions ont été réparties sur les années 2018 et 2019 de manière à pouvoir estimer les éventuels impacts des variations saisonnières.

Les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval sont hébergés dans un enclos contenant un bassin, une plage et une partie arborée où sont localisés les nids (Figure 12). Les manchots nichent dans des nids fixes enterrés (Figure 13). Des nids aériens mobiles, variables dans leur existence et leur localisation d'une session à l'autre, sont également à leur disposition mais n'ont pas été pris en compte dans notre étude pour pouvoir garder une comparabilité des différentes sessions de prélèvements.

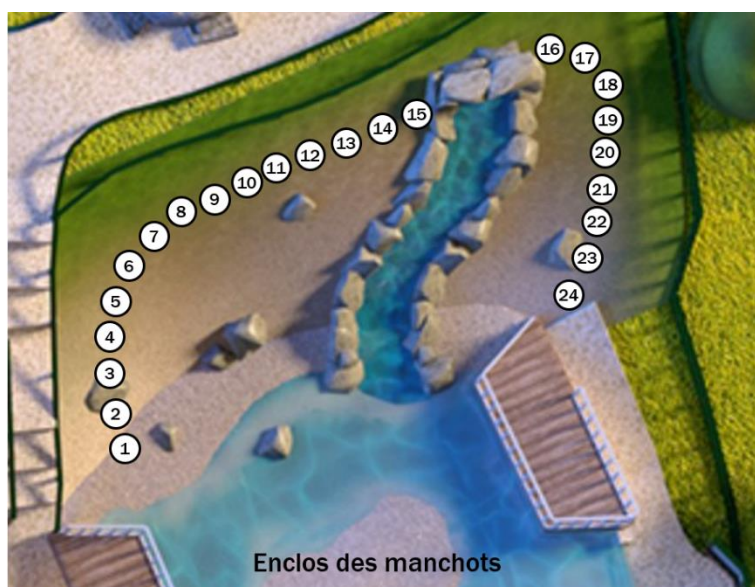


Figure 12. Enclos des manchots de Humboldt au ZooParc de Beauval. L'enclos est composé d'un bassin, d'une plage et d'une partie arborée où sont localisés les nids. L'enclos comprend 24 nids enterrés dont les localisations approximatives sont indiquées sur ce schéma. Le nombre de nids aériens est variable, ils ne sont donc pas représentés.



Figure 13. Nids des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval.

Les prélèvements environnementaux ont été réalisés dans les 24 nids enterrés. Pour chaque nid, deux écouvillonnages de la paroi du nid et deux écouvillonnages du sol étaient effectués sur des écouvillons secs préalablement humidifiés dans 1,5 mL d'eau physiologique, soit 96 prélèvements par session (Figure 14).



Figure 14. Session de prélèvements environnementaux d'avril 2018.

Mesure du taux de prévalence de la contamination environnementale

Analyse phénotypique

Les prélèvements environnementaux étaient acheminés à température ambiante au laboratoire de parasitologie - mycologie du CHRU de Tours pour ensemencement le jour même. Après remise en suspension par agitation au Vortex® de l'écouvillon, 1 mL de milieu liquide était prélevé et ensemencé au râteau sur gélose à l'extrait de malt. Les géloses étaient incubées à 35°C pendant 72 heures. Au bout de ces 72 heures, un décompte des colonies présentes en culture était réalisé. Chaque type de colonie était identifié au moins au genre fongique au moyen d'un examen macroscopique et microscopique (test au drapeau avec coloration au bleu de lactophénol et observation en microscopie optique) (Figure 15).



Figure 15. Etat des lieux de la contamination fongique dans les nids. Les prélèvements environnementaux (deux écouvillonnages de paroi et deux écouvillonnages de sol pour chaque nid) sont ensemencés sur gélose au malt. Après 72h d'incubation à 35°C, les colonies sont dénombrées et chaque espèce est identifiée par examen macroscopique et microscopique.

Tests statistiques

La charge fongique globale était mesurée pour chaque session de prélèvements en UFC/nid. Le test statistique utilisé pour comparer la charge fongique moyenne entre les différentes sessions de prélèvement était un test non paramétrique de Wilcoxon pour séries appariées. Le seuil de significativité retenu était $p < 0,05$.

Identification moléculaire

Pour une détermination précise de l'espèce, tous les isolats d'*Aspergillus* section *fumigati* étaient identifiés moléculairement par séquençage du gène codant pour la β -tubuline [69].

Les isolats environnementaux précédemment identifiés comme *Aspergillus* section *fumigati* étaient isolés sur gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol puis ré-incubés à 35°C pendant 48 heures. A l'issue de ces 48 heures, le matériel fongique présent en culture était prélevé, et l'ADN en était extrait au moyen d'une cryolyse avec microbilles de verre (Cryolys® Precellys) suivie d'une extraction sur colonne (QIAamp DNA Mini-Kit® de QIAGEN)

(Figure 16). Le succès de l'extraction était contrôlé par dosage de l'ADN par spectrophotométrie au NanoDrop® (ThermoFisher).

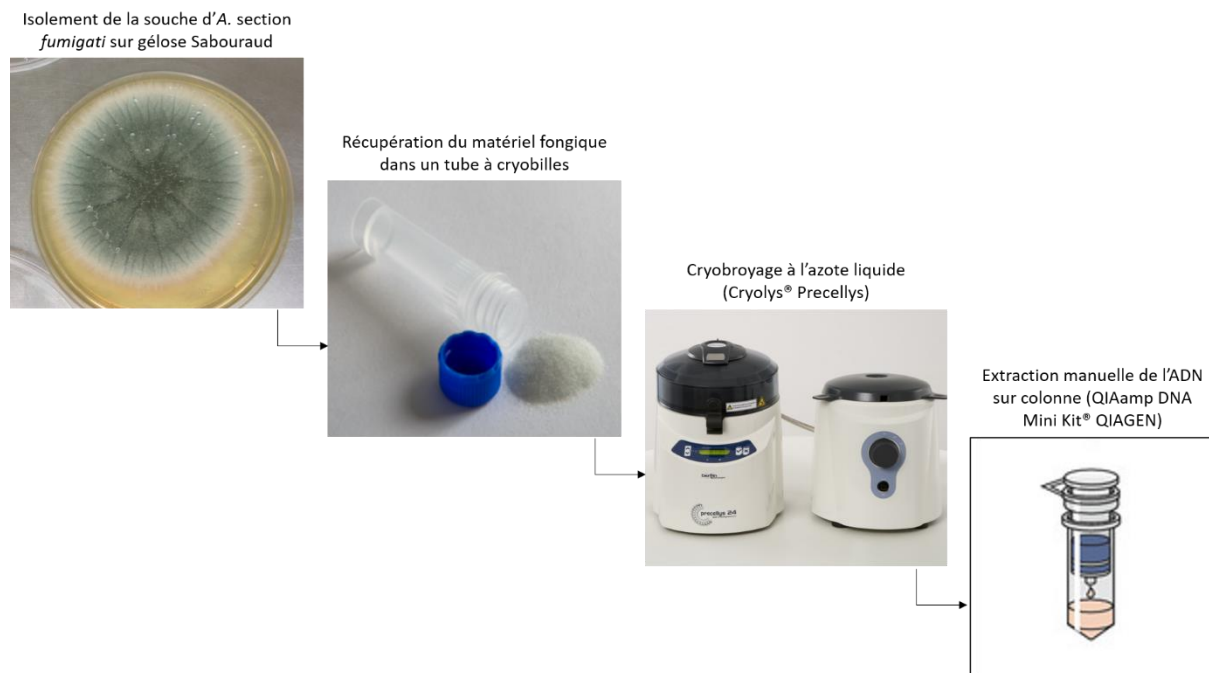


Figure 16. Extraction de l'ADN aspergillaire à partir d'une culture. Le matériel fongique est récupéré dans un tube à cryobilles puis broyé par cryolyse à l'azote liquide sur le Cryolys® de Precellys. L'ADN est ensuite extrait manuellement sur colonne (QIAamp DNA Mini-Kit® de QIAGEN).

Une fois l'ADN extrait, le gène codant pour la β -tubuline était amplifié par PCR conventionnelle en utilisant les amorces β -tub1 et β -tub2 (Annexe 2) [70]. La pureté des amplicons était vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Enfin, le gène était séquencé par la méthode de Sanger. Les séquences obtenues étaient alignées sur le logiciel Codon Code Aligner® puis comparées à des séquences de référence par l'outil BLAST® du NCBI.

Recherche de mutations de résistance aux antifongiques azolés

Les mutations de résistance aux antifongiques azolés ont été recherchées dans les isolats environnementaux d'*A. fumigatus* précédemment identifiés. Pour cela, on procédait à un séquençage du gène *cyp51A* qui code pour la protéine cible des antifongiques azolés et qui contient les mutations de résistance les plus fréquemment décrites (Figure 17) [25], [31].

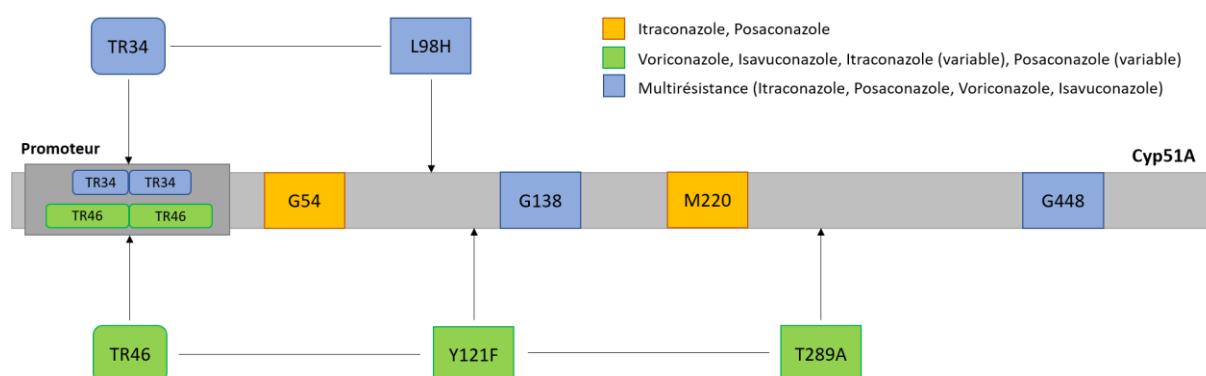


Figure 17. Principales mutations du gène *cyp51A* responsables de résistance aux antifongiques azolés chez *A. fumigatus* [28]. Adapté d'après Guegan et al. [71].

Une PCR conventionnelle était réalisée à partir des ADN précédemment extraits des isolats environnementaux d'*A. fumigatus*. Un premier couple d'amorce AFTR-F et AFTR-R était utilisé pour amplifier une portion de 234 paires de bases dans le promoteur du gène *cyp51A* (Figure 18) [72]. Ces amorces encadraient la position des éventuels *tandem repeat* (TR34 et TR46). Deux autres couples d'amorces CYP51AF-F1/CYP51AF-R1 et CYP51AF-F2/CYP51AF-R2 étaient utilisés pour amplifier la partie codante du gène *cyp51A* et permettaient par la suite de détecter d'éventuelles mutations ponctuelles (Figure 18) (Annexe 3) [73]. La pureté des amplicons était vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Enfin, le gène était séquencé par la méthode de Sanger. Les amplicons de la partie codante du gène *cyp51A* obtenus précédemment étaient trop longs pour être séquencés correctement. On ajoutait donc, au cours de la PCR précédant le séquençage, un couple d'amorces supplémentaire pour chacun des deux fragments du gène. Pour le premier fragment du gène, on ajoutait au couple CYP51AF-F1/CYP51AF-R1 les amorces AF766F et AF855R. Pour le deuxième fragment du gène, on ajoutait au couple CYP51AF-F2/CYP51AF-R2 les amorces AF1426F et AF1709R (Figure 18) [74]. Les séquences obtenues étaient alignées sur le logiciel Codon Code Aligner® puis comparées à la séquence de référence (gène *cyp51A* d'une souche sauvage d'*A. fumigatus*, GenBank AF338659) par l'outil BLAST®. Les duplications dans le promoteur étaient recherchées directement sur la séquence nucléotidique du gène tandis que les

mutations ponctuelles responsables de résistance aux azolés étaient recherchées sur la séquence protéique de manière à mesurer leur impact sur la conformation de l'enzyme lanostérol-14- α -déméthylase (Annexe 4).

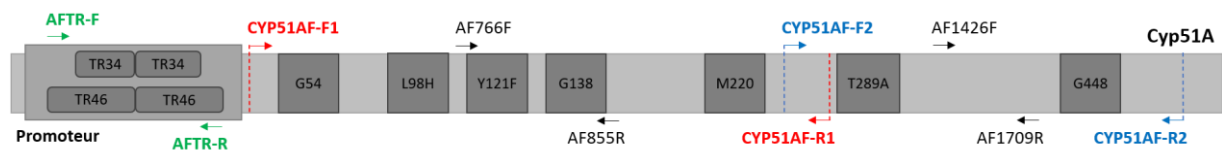


Figure 18. Emplacement schématique des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage du gène *cyp51A* et de son promoteur [72]–[74].

Toute identification d'une mutation de résistance sur le gène *cyp51A* était suivie par une étude phénotypique de la résistance aux azolés sur la souche concernée. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) aux azolés étaient déterminées par microdilution (Micronaut® Biocentric) et comparées aux breakpoints cliniques publiés par l'EUCAST [75].

RESULTATS

Etude de l'incidence clinique de l'aspergillose chez les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval

Cinquante-trois décès ont été comptabilisés chez les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval en 2018, et 48 décès en 2019. La population moyenne était de 113 manchots en 2018 et 118 manchots en 2019. Le taux de mortalité brut toutes causes confondues s'élevait donc à 46,9% (53/113) en 2018 et à 40,7% (48/118) en 2019. La moyenne d'âge lors du décès était de 19 jours en 2018 et de 200 jours en 2019, la médiane d'âge de 12 jours en 2018 et de 17 jours en 2019 (Figure 19).

Douze prélèvements autopsiques ont été reçus au laboratoire de parasitologie - mycologie du CHRU de Tours en 2018 et 35 en 2019. Le diagnostic d'aspergillose a été retenu pour 41,7% d'entre eux (5/12) en 2018 et 45,7% (16/35) en 2019 (Annexe 5). La mortalité proportionnelle imputable à l'aspergillose était donc de 9,4% (5/53) en 2018 et 33,3% (16/48) en 2019. La moyenne d'âge lors du décès chez les manchots atteints d'aspergillose était de 78 jours en 2018 et 538 jours en 2019, la médiane d'âge de 41 jours en 2018 et de 19 jours en 2019 (Figure 19). Au total, 100% (5/5) des manchots atteints d'aspergillose décédés en 2018 étaient des manchots juvéniles (moins de 2 ans) et 87,5% (14/16) en 2019. Sur les 93 naissances survenues en 2018, 4,3% (4/93) des poussins décédaient d'aspergillose dans les 6 mois. Sur les 55 naissances survenues en 2019, 21,8% (12/55) décédaient d'aspergillose dans les 6 mois.

Le diagnostic d'aspergillose a été posé sur un examen direct positif et une culture positive (+/- PCR positive) dans 38,1% des cas (8/21). Dans 33,3% des cas, seule la PCR était positive (7/21). Les autres cas présentaient un examen direct positif et une PCR positive (2/21) ou bien une culture et une PCR positives (2/21) ou encore une culture positive isolement sans possibilité de réaliser la PCR (2/21) (Figure 20).

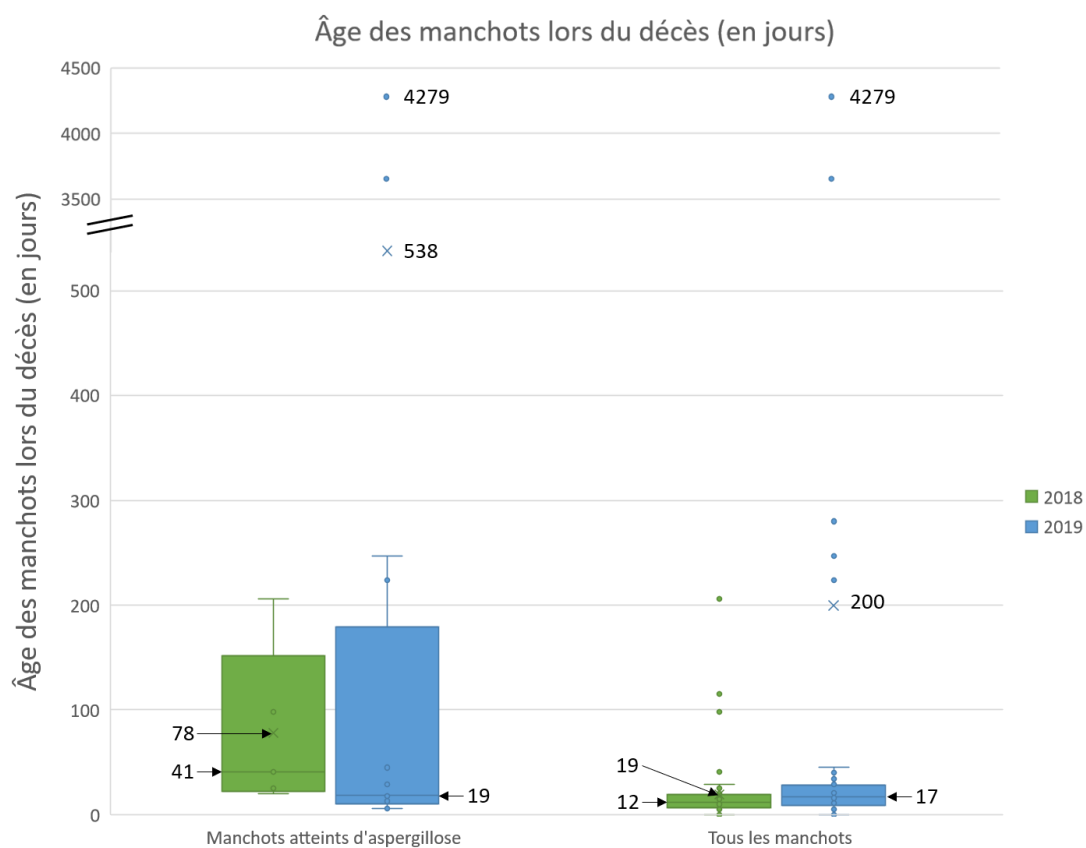


Figure 19. Âge des manchots lors du décès : en 2018 et 2019 pour les manchots atteints d'aspergillose et en 2018 et 2019 chez l'ensemble des manchots.

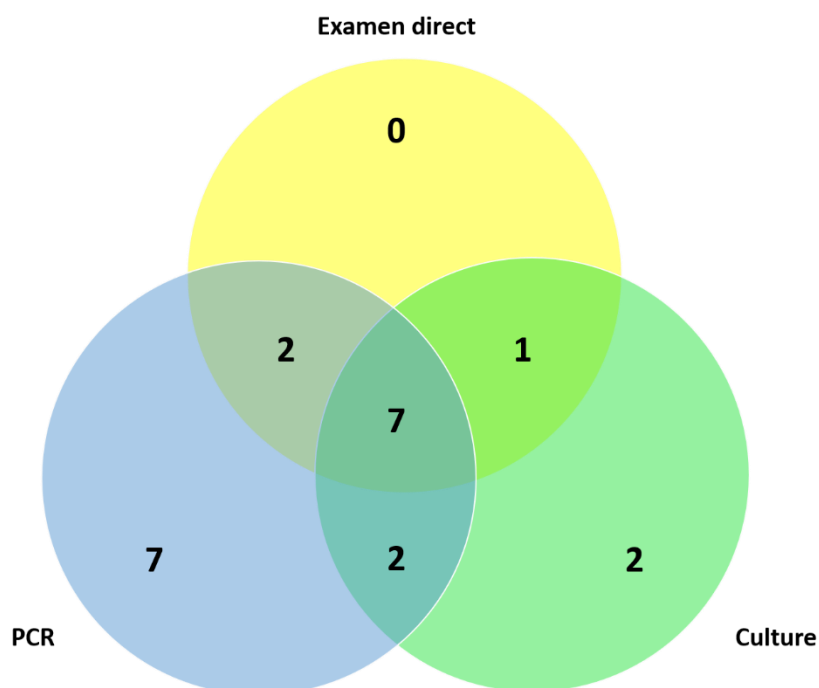


Figure 20. Examens positifs ayant permis de diagnostiquer une aspergillose sur les prélèvements autopsiques des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval.

Etude de la contamination environnementale dans les nids des manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval

Mesure du taux de prévalence de la contamination environnementale

Analyse phénotypique

La culture des prélèvements environnementaux a permis de dénombrer une moyenne de 3,8 UFC de champignons filamenteux/nid pour avril 2018, 2,6 UFC/nid pour décembre 2018 et 48,1 UFC/nid pour septembre 2019 (Figure 21). La charge fongique dans les nids était donc significativement plus importante en septembre qu'en avril ou en décembre ($p < 0,001$). Il n'y avait pas de différence significative entre les mois d'avril et de décembre ($p = 0,721$).

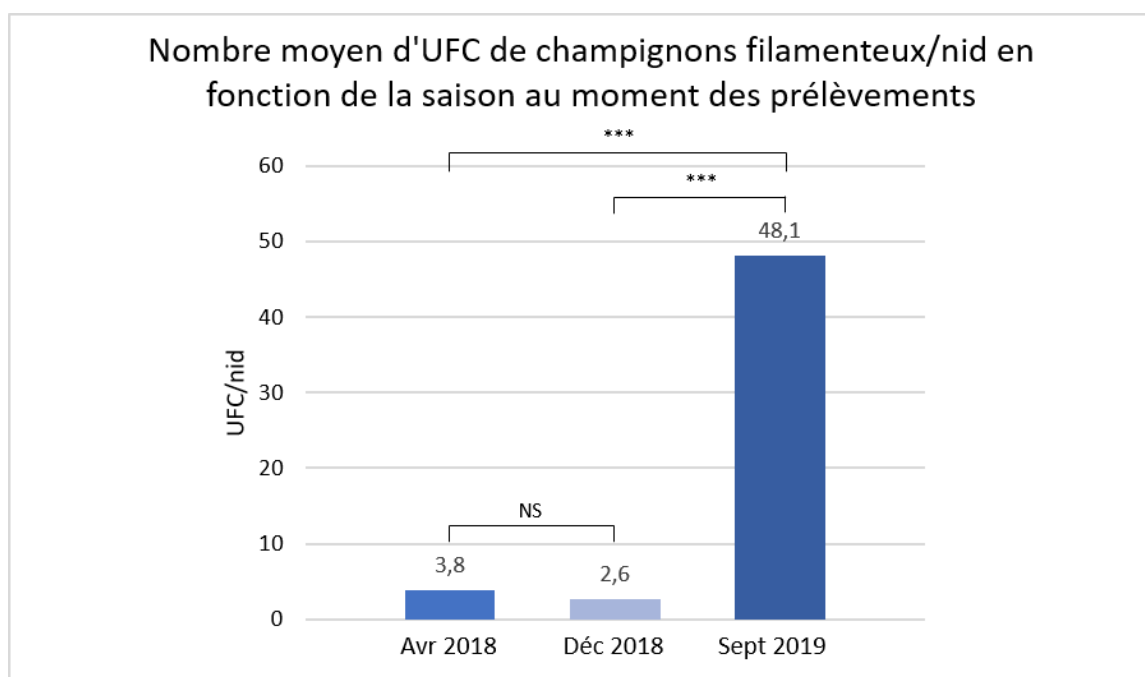


Figure 21. Décompte des colonies de champignons filamenteux présents dans les nids en fonction de la session de prélèvements. Test de Wilcoxon pour séries appariées : NS non significatif, *** $p < 0,001$.

Soixante-dix-neuf pour cent des nids (19/24) étaient colonisés par au moins une espèce de champignon filamenteux en avril 2018, 100% (24/24) en décembre 2018 et 100% (22/22) en septembre 2019. Les espèces majoritairement représentées étaient celles appartenant aux genres ou sections *A. section fumigati* et *Penicillium sp* en avril 2018, *Trichoderma sp* et *A. section fumigati* en décembre 2018, *A. section fumigati* et *A. section nigri* en septembre 2019. *A. section fumigati* était présent dans 67% des nids (16/24) en avril 2018, 75% (18/24) en décembre 2018 et 100% (22/22) en septembre 2019 (Figures 22-25).

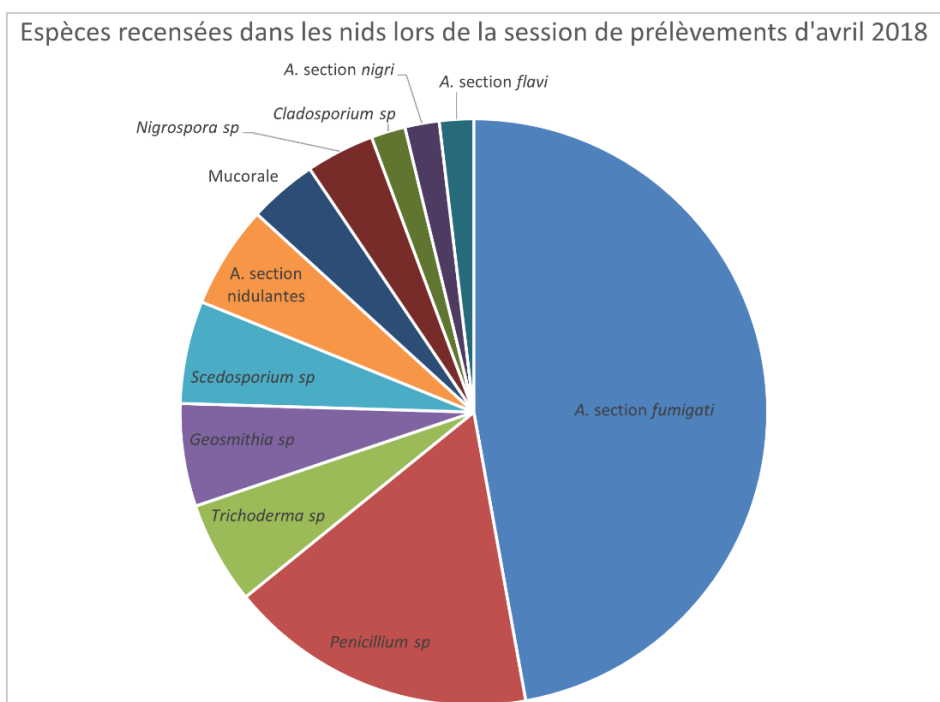


Figure 22. Espèces recensées dans les nids lors de la session de prélèvements d'avril 2018 (en nombre d'isolats de l'espèce/nombre d'isolats totaux dénombrés). *A. section fumigati* 47,2% (25/53), *Penicillium sp* 17,0% (9/53), *Trichoderma sp* 5,7% (3/53), *Geosmithia sp* 5,7% (3/53), *Scedosporium sp* 5,7% (3/53), *A. section nidulantes* 5,7% (3/53), Mucorale 3,8% (2/53), *Nigrospora sp* 3,8% (2/53), *Cladosporium sp* 1,9% (1/53), *A. section nigri* 1,9% (1/53), *A. section flavi* 1,9% (1/53).

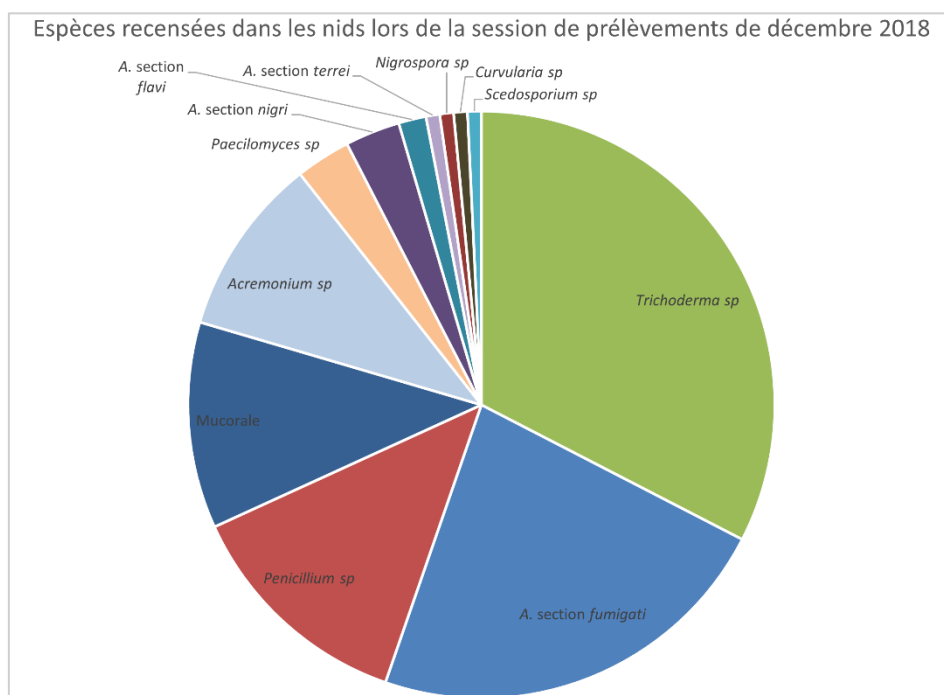


Figure 23. Espèces recensées dans les nids lors de la session de prélèvements de décembre 2018 (en nombre d'isolats de l'espèce/nombre d'isolats totaux dénombrés). *Trichoderma sp* 32,6% (43/132), *A. section fumigati* 22,7% (30/132), *Penicillium sp* 12,9% (17/132), Mucorale 11,4% (15/132), *Acremonium sp* 9,8% (13/132), *Paecilomyces sp* 3,0% (4/132), *A. section nigri* 3,0% (4/132), *A. section flavi* 1,5% (2/132), *A. section terreii* 0,8% (1/132), *Nigrospora sp* 0,8% (1/132), *Curvularia sp* 0,8% (1/132), *Scedosporium sp* 0,8% (1/132).

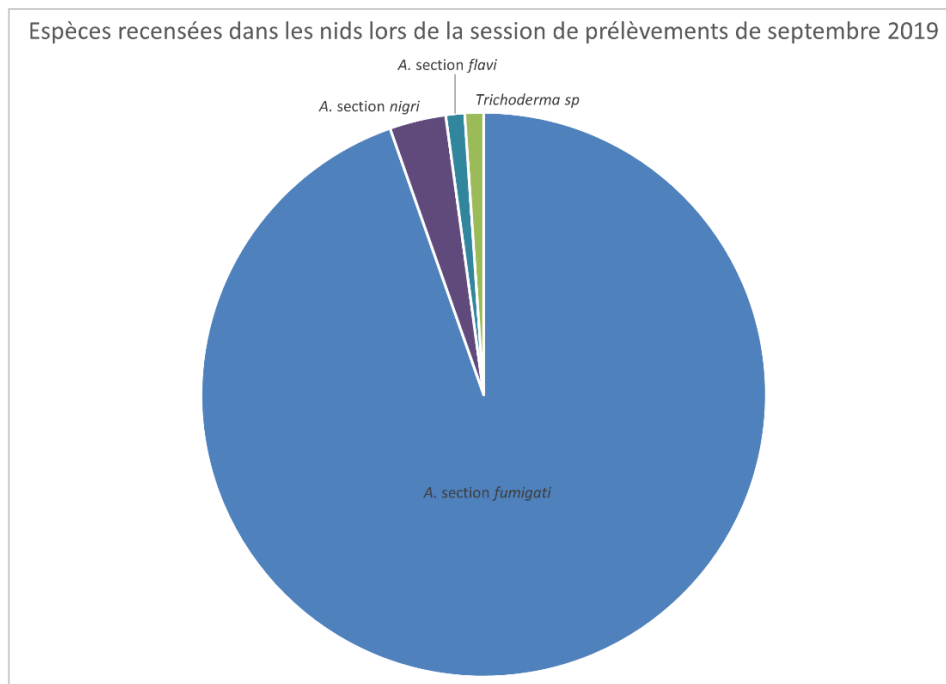


Figure 24. Espèces recensées dans les nids lors de la session de prélèvements de septembre 2019 (en nombre d'isolats de l'espèce/nombre d'isolats totaux dénombrés). *A. section fumigati* 94,6% (88/93), *A. section nigri* 3,2% (3/93), *A. section flavi* 1,1% (1/93), *Trichoderma sp* 1,1% (1/93).

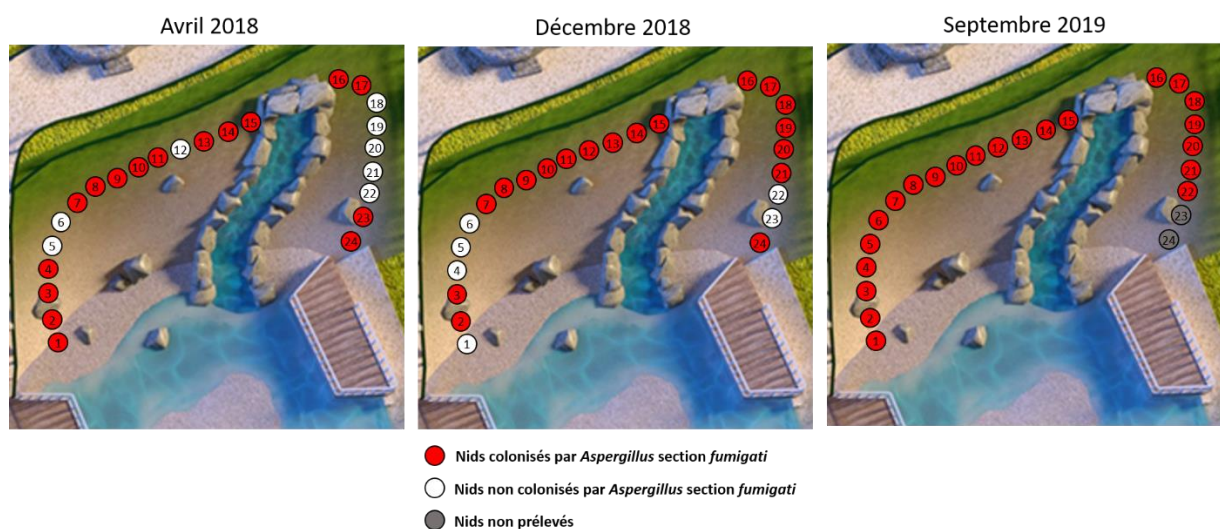


Figure 25. Colonisation des nids par *A. section fumigati* selon la saison au moment des prélèvements. On observait une colonisation de 67% des nids en avril 2018, 75% en décembre 2018 et 100% en septembre 2019.

Identification moléculaire

Le séquençage du gène codant la β -tubuline dans les isolats d'*A. section fumigati* précédemment recensés a permis d'identifier respectivement 100% (25/25), 97% (29/30) et 100% (88/88) d'*A. fumigatus stricto sensu* en avril 2018, décembre 2018 et septembre 2019. Sur la session de décembre 2018, l'espèce cryptique *Aspergillus nishimurae* a été identifiée dans un des prélèvements réalisés dans le nid 18.

Recherche de mutations de résistance aux antifongiques azolés

Le séquençage du gène *cyp51A* n'a pas permis de mettre en évidence de mutations de résistance aux antifongiques azolés parmi les isolats d'*A. fumigatus* sur les sessions d'avril 2018 et septembre 2019. Une mutation de résistance a été identifiée sur la session de décembre 2018 et concernait une souche d'*A. fumigatus* retrouvée dans le nid 13 et mutée G138. La détermination des CMI aux azolés a montré une valeur élevée à l'itraconazole et modérée au voriconazole (Tableau 1).

Tableau 1. CMI aux antifongiques mesurées par microdilution de la souche d'*A. fumigatus* mutée G138 et breakpoints cliniques correspondants publiés par l'EUCAST [75]. IE « insufficient evidence ».

Antifongique	CMI (en µg/mL)	Breakpoint clinique EUCAST	
		S ≤	R >
Amphotéricine B	0,25	1	1
Voriconazole	0,25	1	1
Itraconazole	>4	1	1
Posaconazole	0,0625	0,125	0,25
Micafungine	0,0019	IE	IE
Anidulafungine	0,016	IE	IE
Caspofungine	0,016	IE	IE

DISCUSSION

L'aspergillose est connue pour être une cause importante de morbidité et de mortalité chez les manchots maintenus en captivité [15], [16]. Notre étude retrouvait une part de mortalité imputable à l'aspergillose chez les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval de 9,4% en 2018 et 33,3% en 2019. *A. fumigatus* était responsable dans presque 100% des cas. Les jeunes manchots sont décrits comme une population particulièrement à risque de développer une aspergillose [16]. Dans le parc, celle-ci touchait en effet des manchots juvéniles dans 100% des cas en 2018 et 87,5% en 2019. La mortalité liée à l'aspergillose concernait 4,3% des manchots de moins de 6 mois en 2018 et 21,8% en 2019. Ces chiffres sont en accord avec les résultats de Flach et al. qui rapportaient une mortalité moyenne de 14% des manchots papous (*Pygoscelis papua*) récemment éclos (Zoo d'Edimbourg, 1964-1988) [76]. Ce pourcentage variait cependant de 0 à plus de 50% selon les années, suggérant une évolution sous forme épidémique.

Les caractéristiques anatomiques du manchot, et plus généralement des oiseaux, en font une espèce particulièrement à risque d'aspergillose. Les sacs aériens sont propices à la croissance de champignons (notamment *A. fumigatus*, capable de se développer à 40°C contrairement aux autres espèces d'*Aspergillus*) et favorisent la dissémination systémique des spores par communication avec les poumons. Cependant, l'incidence quasi nulle de l'aspergillose dans les populations sauvages pose la question de l'implication d'autres facteurs, et notamment de facteurs liés à la captivité [77]. Ces facteurs, déjà en partie identifiés, comme le stress ou une mauvaise hygiène de l'environnement, pourraient être des clés pour une meilleure prise en charge de l'aspergillose chez les manchots [7]. La taille de la colonie pourrait également jouer un rôle dans l'incidence de l'aspergillose. Silva Filho et al., dans une étude sur six ans recensant l'aspergillose dans une colonie captive de manchots de Magellan (*Spheniscus magellanicus*), décomptaient plus de 65% de leurs cas sur l'année où la densité de population était la plus importante [16]. Les explications possibles à cette incidence plus élevée pouvaient être l'accumulation de matières organiques (plumes, déjections) empêchant une bonne ventilation et une bonne désinfection ou encore le besoin de plus de personnel pour soigner les animaux et donc une augmentation du stress. Cette corrélation n'était cependant pas retrouvée dans la publication de Flach et al. [76]. Les manchots du ZooParc de Beauval vivent exclusivement en extérieur, l'hygiène du milieu est plus difficile à maîtriser. Il pourrait cependant être intéressant de repenser la configuration des nids. Les manchots de Humboldt du ZooParc nichent dans des nids en bois enterrés dont l'ouverture est par conséquent réduite et donc défavorable à une bonne ventilation. À l'état sauvage, ils nichent souvent dans des cavités rocheuses ou même à l'air libre sur des tas de guanos.

La charge fongique globale mesurée dans les nids des manchots était significativement beaucoup plus élevée en septembre qu'en avril ou en décembre. Par ailleurs, *A. fumigatus* représentait 95% des espèces identifiées dans les prélèvements du mois de septembre contre seulement 47% en avril et 22% en décembre. Ces résultats sont appuyés par Rivas et al. qui ont mesuré la charge fongique dans l'enclos de manchots africains (*Spheniscus demersus*) par prélèvements d'air par impaction [78]. Les auteurs retrouvaient ainsi une charge fongique globale qui augmentait avec la température et l'humidité, donc plus élevée en été. Les mêmes résultats étaient retrouvés avec le genre *Aspergillus sp* seul. Par ailleurs, la charge fongique globale était plus importante en extérieur qu'en intérieur. Les nids des manchots du ZooParc de Beauval étaient globalement moins occupés lors de la session de prélèvement de septembre 2019. En effet, la période des naissances avait pris fin et les poussins avaient quitté les nids. On ne pourra donc pas statuer sur une éventuelle surmortalité liée à cette colonisation estivale importante des nids par *A. fumigatus*.

Parmi toutes les souches d'*A. section fumigati* isolées dans les nids, une seule s'est avérée être une espèce cryptique distincte d'*A. fumigatus stricto sensu* (*A. nishimurae*). *A. fumigatus* est donc non seulement l'espèce en cause dans la majorité des cas d'aspergillose aviaire mais est également présent de façon prédominante dans l'environnement par rapport aux autres espèces cryptiques de la section *fumigati*. Sabino et al. identifiaient de même 100% d'*A. fumigatus* parmi des échantillons cliniques issus de diverses espèces d'oiseaux atteints d'aspergillose [79]. Les échantillons collectés dans leur environnement en Californie retrouvaient des isolats fongiques provenant en large majorité de la section *fumigati*, parmi lesquels 100% d'*A. fumigatus stricto sensu*.

Etant donné l'emplacement du ZooParc de Beauval dans une zone rurale, nous aurions pu nous attendre à la mise en évidence de mutations de résistance aux antifongiques azolés médiées par l'exposition environnementale (TR34/L98H et TR46/Y121F/T289A). Ce n'est cependant pas le cas puisqu'aucune mutation de ce genre n'a été retrouvée. Seule une mutation ponctuelle de type G138 a pu être identifiée chez une souche d'*A. fumigatus* isolée en décembre 2018. Cette mutation est décrite comme entraînant une multirésistance aux azolés [25]. Les tests phénotypiques sur la souche ont retrouvé une résistance à l'itraconazole et dans une moindre mesure au voriconazole. La dispersion mondiale et rapide des mécanismes de résistance avec *tandem repeat* étant une source d'inquiétude pour l'avenir de la prise en charge de l'aspergillose en médecine humaine, cette prévalence nulle ici constitue une bonne nouvelle, mais requiert néanmoins une surveillance prolongée. Il est aussi à noter que les prélèvements ont été faits dans une zone géographique restreinte et ne peuvent donc pas refléter l'épidémiologie nationale ou même régionale. De nombreux isolats d'*A. fumigatus* porteurs de TR34/L98H ou TR46/Y121F/T289A ont déjà été mis en évidence en France, et leur présence sur notre territoire n'est donc plus à remettre en cause. Une étude menée sur des isolats cliniques dans deux hôpitaux universitaires parisiens en 2014 retrouvait par exemple une prévalence de souches d'*A. fumigatus* résistantes aux

azolés de 1,8%, toutes porteuses de la mutation TR34/L98H [80]. Une autre étude menée en 2019 sur 85 prélèvements environnementaux à l'hôpital universitaire de Besançon retrouvait 90 isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés, également tous porteurs de la mutation TR34/L98H [81]. Il est à noter que 59 de ces isolats ont été obtenus à partir de pots de tulipes importés des Pays-Bas. Par ailleurs, la recherche de résistances aux azolés s'étant faite, dans notre étude, sur le plan génotypique uniquement, il n'est pas à exclure que d'autres mécanismes de résistance moins fréquents et moins bien décrits aient été présents parmi les souches isolées.

CONCLUSION

L'aspergillose à *Aspergillus fumigatus* est une cause importante de mortalité chez les manchots de Humboldt du ZooParc de Beauval, responsable de respectivement 9,4% et 33,3% des décès en 2018 et 2019. Cette incidence importante est à mettre en relation avec la contamination de leur environnement par *A. fumigatus*, espèce fongique retrouvée massivement dans les prélèvements environnementaux effectués, particulièrement en été. Une réflexion quant à la configuration de l'enclos et des nids et quant aux mesures d'hygiène appliquées est à mener pour tenter de faire reculer cette pathologie et de diminuer la morbi-mortalité qui lui est imputable, notamment chez les jeunes manchots.

La recherche génotypique de résistance aux azolés dans les isolats environnementaux d'*A. fumigatus* révèle une prévalence étonnamment basse de mutations dans le gène *cyp51A*. Une mutation G138 a pu être mise en évidence chez une souche d'*A. fumigatus*, lui conférant une résistance à l'itraconazole et, dans une moindre mesure, au voriconazole. Malgré la localisation du ZooParc de Beauval dans un environnement rural, il ne semble pas y avoir d'impact des pratiques agricoles adjacentes sur la sélection de souches résistantes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. A. Samson *et al.*, "Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*," *Studies in Mycology*, vol. 78, pp. 141–173, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- [2] J. I. Pitt, "The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health," *Medical Mycology*, vol. 32, no. s1, pp. 17–32, Jan. 1994, doi: 10.1080/02681219480000701.
- [3] D. Elad and E. Segal, "Diagnostic Aspects of Veterinary and Human Aspergillosis," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, Jun. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01303.
- [4] D. A. Enoch, H. Yang, S. H. Aliyu, and C. Micallef, "The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections," in *Human Fungal Pathogen Identification*, vol. 1508, T. Lion, Ed. New York, NY: Springer New York, 2017, pp. 17–65.
- [5] J. Maina, "Functional morphology of the avian respiratory system, the lung–air sac system: efficiency built on complexity," *Ostrich*, vol. 79, no. 2, pp. 117–132, Oct. 2008, doi: 10.2989/OSTRICH.2008.79.2.1.575.
- [6] P. C. Sereno, R. N. Martinez, J. A. Wilson, D. J. Varricchio, O. A. Alcober, and H. C. E. Larsson, "Evidence for Avian Intrathoracic Air Sacs in a New Predatory Dinosaur from Argentina," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 9, p. e3303, Sep. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003303.
- [7] L. A. Beernaert, F. Pasmans, L. Van Waeyenberghe, F. Haesebrouck, and A. Martel, "*Aspergillus* infections in birds: a review," *Avian Pathology*, vol. 39, no. 5, pp. 325–331, Oct. 2010, doi: 10.1080/03079457.2010.506210.
- [8] S. Seyedmousavi *et al.*, "*Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease," *Medical Mycology*, vol. 53, no. 8, pp. 765–797, Nov. 2015, doi: 10.1093/mmy/myv067.
- [9] D. Fischer and M. Lierz, "Diagnostic Procedures and Available Techniques for the Diagnosis of Aspergillosis in Birds," *Journal of Exotic Pet Medicine*, vol. 24, no. 3, pp. 283–295, Jul. 2015, doi: 10.1053/j.jepm.2015.06.016.
- [10] C. Cray, T. Watson, and K. L. Arheart, "Serosurvey and Diagnostic Application of Antibody Titers to *Aspergillus* in Avian Species," *Avian Diseases*, vol. 53, no. 4, pp. 491–494, Dec. 2009, doi: 10.1637/8673-030209-Reg.1.
- [11] C. Cray *et al.*, "Galactomannan Assay and Plasma Protein Electrophoresis Findings in Psittacine Birds With Aspergillosis," *Journal of Avian Medicine and Surgery*, vol. 23, no. 2, pp. 125–135, Jun. 2009, doi: 10.1647/2007-041.1.
- [12] C. Cray, T. Watson, M. Rodriguez, and K. L. Arheart, "Application of Galactomannan Analysis and Protein Electrophoresis in the Diagnosis of Aspergillosis in Avian Species," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 40, no. 1, pp. 64–70, Mar. 2009, doi: 10.1638/2007-0138.1.
- [13] M.-E. Krautwald-Junghanns, S. Vorbrüggen, and J. Böhme, "Aspergillosis in Birds: An Overview of Treatment Options and Regimens," *Journal of Exotic Pet Medicine*, vol. 24, no. 3, pp. 296–307, Jul. 2015, doi: 10.1053/j.jepm.2015.06.012.
- [14] A. Di Somma, T. Bailey, C. Silvanose, and C. Garcia-Martinez, "The Use of Voriconazole for the Treatment of Aspergillosis in Falcons (*Falco* Species)," *Journal of Avian Medicine and Surgery*, vol. 21, no. 4, pp. 307–316, Dec. 2007, doi: 10.1647/1082-6742(2007)21[307:TUOVFT]2.0.CO;2.

- [15] Z. U. Khan, M. Pal, D. K. Paliwal, and V. N. Damodaran, "Aspergillosis in imported penguins," *Medical Mycology*, vol. 15, no. 1, pp. 43–45, Jan. 1977, doi: 10.1080/00362177785190081.
- [16] R. P. da Silva Filho *et al.*, "INCIDENCE DENSITY, PROPORTIONATE MORTALITY, AND RISK FACTORS OF ASPERGILLOSIS IN MAGELLANIC PENGUINS IN A REHABILITATION CENTER FROM BRAZIL," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 46, no. 4, pp. 667–674, Dec. 2015, doi: 10.1638/2013-0092.1.
- [17] T. F. Patterson *et al.*, "Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 63, no. 4, pp. e1–e60, Aug. 2016, doi: 10.1093/cid/ciw326.
- [18] L. Alcazar-Fuoli, E. Mellado, A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella, and J. L. Rodriguez-Tudela, "Aspergillus Section Fumigati: Antifungal Susceptibility Patterns and Sequence-Based Identification," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, no. 4, pp. 1244–1251, Apr. 2008, doi: 10.1128/AAC.00942-07.
- [19] D. W. Denning *et al.*, "Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, no. 6, pp. 1364–1368, Jun. 1997, doi: 10.1128/AAC.41.6.1364.
- [20] E. Chryssanthou, "In Vitro Susceptibility of Respiratory Isolates of *Aspergillus* species to Itraconazole and Amphotericin B. Acquired Resistance to Itraconazole," *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, vol. 29, no. 5, pp. 509–512, Jan. 1997, doi: 10.3109/00365549709011864.
- [21] J. W. M. van der Linden *et al.*, "Prospective Multicenter International Surveillance of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 21, no. 6, pp. 1041–1044, Jun. 2015, doi: 10.3201/eid2106.140717.
- [22] S. Dhingra and R. A. Cramer, "Regulation of Sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Opportunities for Therapeutic Development," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, Feb. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00092.
- [23] A. Jeanvoine, S. Rocchi, A. P. Bellanger, G. Reboux, and L. Millon, "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment?," *Médecine et Maladies Infectieuses*, vol. 50, no. 5, pp. 389–395, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.medmal.2019.07.014.
- [24] P. E. Verweij, E. Snelders, G. H. Kema, E. Mellado, and W. J. Melchers, "Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use?," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 9, no. 12, pp. 789–795, Dec. 2009, doi: 10.1016/S1473-3099(09)70265-8.
- [25] A. Chowdhary, C. Sharma, F. Hagen, and J. F. Meis, "Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms," *Future Microbiology*, vol. 9, no. 5, pp. 697–711, May 2014, doi: 10.2217/fmb.14.27.
- [26] E. Snelders, A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, P. E. Verweij, and W. J. G. Melchers, "Azole Resistance Profile of Amino Acid Changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A Based on Protein Homology Modeling," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, no. 6, pp. 2425–2430, Jun. 2010, doi: 10.1128/AAC.01599-09.
- [27] S. M. T. Camps *et al.*, "Rapid Induction of Multiple Resistance Mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy: a Case Study and Review of the Literature," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 1, pp. 10–16, Jan. 2012, doi: 10.1128/AAC.05088-11.

- [28] J. F. Meis, A. Chowdhary, J. L. Rhodes, M. C. Fisher, and P. E. Verweij, "Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 371, no. 1709, p. 20150460, Dec. 2016, doi: 10.1098/rstb.2015.0460.
- [29] C. L. Price, J. E. Parker, A. G. Warrilow, D. E. Kelly, and S. L. Kelly, "Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens: Mode of action and resistance mechanisms to azole fungicides," *Pest Management Science*, vol. 71, no. 8, pp. 1054–1058, Aug. 2015, doi: 10.1002/ps.4029.
- [30] A. Chowdhary, S. Kathuria, J. Xu, and J. F. Meis, "Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health," *PLoS Pathogens*, vol. 9, no. 10, p. e1003633, Oct. 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003633.
- [31] P. E. Verweij, E. Mellado, and W. J. G. Melchers, "Multiple-Triazole–Resistant Aspergillosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 356, no. 14, pp. 1481–1483, Apr. 2007, doi: 10.1056/NEJMc061720.
- [32] P. E. Verweij, A. Chowdhary, W. J. G. Melchers, and J. F. Meis, "Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles?," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 62, no. 3, pp. 362–368, Feb. 2016, doi: 10.1093/cid/civ885.
- [33] C. Lazzarini, M. C. Esposto, A. Prigitano, M. Cogliati, G. De Lorenzis, and A. M. Tortorano, "Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates from an Italian Culture Collection," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 60, no. 1, pp. 682–685, Jan. 2016, doi: 10.1128/AAC.02234-15.
- [34] E. Snelders *et al.*, "Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism," *PLoS Medicine*, vol. 5, no. 11, p. e219, Nov. 2008, doi: 10.1371/journal.pmed.0050219.
- [35] S. J. Howard *et al.*, "Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure¹," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 7, pp. 1068–1076, Jul. 2009, doi: 10.3201/eid1507.090043.
- [36] U. Nawrot *et al.*, "Detection of Polish clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles," *Medical Mycology*, vol. 56, no. 1, pp. 121–124, Jan. 2018, doi: 10.1093/mmy/myx012.
- [37] E. Vermeulen *et al.*, "Nationwide Surveillance of Azole Resistance in *Aspergillus* Diseases," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 59, no. 8, pp. 4569–4576, Aug. 2015, doi: 10.1128/AAC.00233-15.
- [38] K. M. T. Astvad *et al.*, "First Detection of TR₄₆/Y121F/T289A and TR₃₄/L98H Alterations in *Aspergillus fumigatus* Isolates from Azole-Naive Patients in Denmark despite Negative Findings in the Environment," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 58, no. 9, pp. 5096–5101, Sep. 2014, doi: 10.1128/AAC.02855-14.
- [39] P.-M. Rath, D. Buchheidt, B. Spiess, E. Arfanis, J. Buer, and J. Steinmann, "First Reported Case of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Due to the TR/L98H Mutation in Germany," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 11, pp. 6060–6061, Nov. 2012, doi: 10.1128/AAC.01017-12.
- [40] E. Pinto *et al.*, "Aspergillus Species and Antifungals Susceptibility in Clinical Setting in the North of Portugal: Cryptic Species and Emerging Azoles Resistance in *A. fumigatus*," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01656.

- [41] C. Sharma, F. Hagen, R. Moroti, J. F. Meis, and A. Chowdhary, "Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired?," *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 3, no. 2, pp. 69–74, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.jgar.2015.01.005.
- [42] A. Alastruey-Izquierdo *et al.*, "Molecular Identification and Susceptibility Testing of Molds Isolated in a Prospective Surveillance of Triazole Resistance in Spain (FILPOP2 Study)," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 62, no. 9, Jun. 2018, doi: 10.1128/AAC.00358-18.
- [43] S. Rocchi *et al.*, "Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Isolate with the TR34/L98H Mutation in Both a Fungicide-Sprayed Field and the Lung of a Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipient with Invasive Aspergillosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, no. 5, pp. 1724–1726, May 2014, doi: 10.1128/JCM.03182-13.
- [44] K. Dunne, F. Hagen, N. Pomeroy, J. F. Meis, and T. R. Rogers, "Intercountry Transfer of Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* on Plant Bulbs," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 65, no. 1, pp. 147–149, Jul. 2017, doi: 10.1093/cid/cix257.
- [45] G. E. Özmerdiven *et al.*, "First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey," *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 21, no. 8, pp. 581–586, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.jiac.2015.04.012.
- [46] S. R. Lockhart, J. P. Frade, K. A. Etienne, M. A. Pfaller, D. J. Diekema, and S. A. Balajee, "Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates from the ARTEMIS Global Surveillance Study Is Primarily Due to the TR/L98H Mutation in the *cyp51A* Gene," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 9, pp. 4465–4468, Sep. 2011, doi: 10.1128/AAC.00185-11.
- [47] A. Chowdhary, C. Sharma, S. Kathuria, F. Hagen, and J. F. Meis, "Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia," *Frontiers in Microbiology*, vol. 06, May 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00428.
- [48] C.-J. Wu *et al.*, "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates carrying TR₃₄/L98H mutations in Taiwan," *Mycoses*, vol. 58, no. 9, pp. 544–549, Sep. 2015, doi: 10.1111/myc.12354.
- [49] H. Badali *et al.*, "Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR₃₄/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran," *Mycoses*, vol. 56, no. 6, pp. 659–663, Nov. 2013, doi: 10.1111/myc.12089.
- [50] S. Ahmad, Z. Khan, F. Hagen, and J. F. Meis, "Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait," *Environmental Research*, vol. 133, pp. 20–26, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.envres.2014.05.009.
- [51] T. Toyotome *et al.*, "First clinical isolation report of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR₃₄/L98H-type mutation in Japan," *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 23, no. 8, pp. 579–581, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.jiac.2016.12.004.
- [52] Perveen I., Sehar S., Naz I., and Ahmed S., "Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in Pakistan," *7th Advances Against Aspergillosis conference*, [Online]. Available: <https://www.aspergillus.org.uk/content/prospective-evaluation-azole-resistance-aspergillus-fumigatus-clinical-isolates-pakistan>.
- [53] M. Tangwattanachuleeporn *et al.*, "Prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of Thailand," *Medical Mycology*, p. myw090, Sep. 2016, doi: 10.1093/mmy/myw090.

- [54] H.-J. Lee, S.-Y. Cho, D.-G. Lee, C. Park, H.-S. Chun, and Y.-J. Park, "TR34/L98H Mutation in CYP51A Gene in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates During Posaconazole Prophylaxis: First Case in Korea," *Mycopathologia*, vol. 183, no. 4, pp. 731–736, Aug. 2018, doi: 10.1007/s11046-018-0271-8.
- [55] S. E. Kidd, E. Goeman, J. F. Meis, M. A. Slavin, and P. E. Verweij, "Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia," *Mycoses*, vol. 58, no. 6, pp. 350–355, Jun. 2015, doi: 10.1111/myc.12324.
- [56] M. F. Gonzalez-Lara *et al.*, "Azole resistance and cyp51A mutation screening in *Aspergillus fumigatus* in Mexico," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 74, no. 7, pp. 2047–2050, Jul. 2019, doi: 10.1093/jac/dkz121.
- [57] L. Pontes *et al.*, "*Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Carrying CYP51A with TR34/L98H/S297T/F495I Substitutions Detected after Four-Year Retrospective Azole Resistance Screening in Brazil," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 64, no. 3, Dec. 2019, doi: 10.1128/AAC.02059-19.
- [58] P. Le Pape, R.-A. Lavergne, F. Morio, and C. Alvarez-Moreno, "Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* , Colombia, 2015," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 22, no. 1, pp. 156–157, Jan. 2016, doi: 10.3201/eid2201.150978.
- [59] T. Brito Devoto, K. Hermida-Alva, G. Posse, J. L. Finkelievich, G. García-Effrón, and M. L. Cuestas, "High prevalence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus sensu stricto* in an Argentinean cohort of patients with cystic fibrosis," *Mycoses*, vol. 63, no. 9, pp. 937–941, Sep. 2020, doi: 10.1111/myc.13139.
- [60] N. P. Wiederhold *et al.*, "First Detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 Mutations in *Aspergillus fumigatus* Isolates in the United States," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 54, no. 1, pp. 168–171, Jan. 2016, doi: 10.1128/JCM.02478-15.
- [61] B. Bustamante, L. R. Illescas, A. Posadas, and P. E. Campos, "Azole resistance among clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* in Lima-Peru," *Medical Mycology*, vol. 58, no. 1, pp. 54–60, Jan. 2020, doi: 10.1093/mmy/myz032.
- [62] A. Chowdhary *et al.*, "Multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment in Tanzania," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 69, no. 11, pp. 2979–2983, Nov. 2014, doi: 10.1093/jac/dku259.
- [63] E. K. Kemoi, A. Nyerere, and C. C. Bii, "Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* from Fungicide-Experienced Soils in Naivasha Subcounty and Nairobi County, Kenya," *International Journal of Microbiology*, vol. 2018, pp. 1–6, Jun. 2018, doi: 10.1155/2018/7147938.
- [64] S. M. T. Camps *et al.*, "Molecular Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* Isolates Harboring the TR34/L98H Azole Resistance Mechanism," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 8, pp. 2674–2680, Aug. 2012, doi: 10.1128/JCM.00335-12.
- [65] Y. Tsuchido, M. Tanaka, S. Nakano, M. Yamamoto, Y. Matsumura, and M. Nagao, "Prospective multicenter surveillance of clinically isolated *Aspergillus* species revealed azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates with TR34/L98H mutation in the Kyoto and Shiga regions of Japan," *Medical Mycology*, vol. 57, no. 8, pp. 997–1003, Nov. 2019, doi: 10.1093/mmy/myz003.
- [66] A. Resendiz Sharpe *et al.*, "Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*," *Medical Mycology*, vol. 56, no. suppl_1, pp. S83–S92, Apr. 2018, doi: 10.1093/mmy/myx144.

- [67] E. Snelders *et al.*, "Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, p. e31801, Mar. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031801.
- [68] J. M. Rybak, J. R. Fortwendel, and P. D. Rogers, "Emerging threat of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 74, no. 4, pp. 835–842, Apr. 2019, doi: 10.1093/jac/dky517.
- [69] S. A. Balajee *et al.*, "Aspergillus species identification in the clinical setting," *Studies in Mycology*, vol. 59, pp. 39–46, 2007, doi: 10.3114/sim.2007.59.05.
- [70] N. L. Glass and G. C. Donaldson, "Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 61, no. 4, pp. 1323–1330, 1995, doi: 10.1128/AEM.61.4.1323-1330.1995.
- [71] H. Guegan and J.-P. Gangneux, "Résistance aux azolés chez *Aspergillus*," *Journal des Anti-infectieux*, vol. 19, no. 3–4, pp. 110–118, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.antinf.2017.10.001.
- [72] F. Morio *et al.*, "High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 8, pp. 1870–1873, Aug. 2012, doi: 10.1093/jac/dks160.
- [73] R.-A. Lavergne *et al.*, "First Description of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Due to TR₄₆/Y121F/T289A Mutation in France," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 59, no. 7, pp. 4331–4335, Jul. 2015, doi: 10.1128/AAC.00127-15.
- [74] A. Alanio *et al.*, "Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, no. 2, pp. 371–374, Feb. 2011, doi: 10.1093/jac/dkq450.
- [75] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, "Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents." Feb. 2020, [Online]. Available: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204_updatd_links_200924.pdf.
- [76] E. J. Flach, M. F. Stevenson, and G. M. Henderson, "Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964 to 1988," *The Veterinary Record*, vol. 126, no. 4, pp. 81–85, Jan. 1990.
- [77] K. M. Smith *et al.*, "Health Evaluation of Free-Ranging Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru," *Avian Diseases*, vol. 52, no. 1, pp. 130–135, Mar. 2008, doi: 10.1637/8265-071007-Reg.
- [78] A. E. Rivas, M. J. Dykstra, K. Kranz, and E. Bronson, "ENVIRONMENTAL FUNGAL LOADS IN AN INDOOR–OUTDOOR AFRICAN PENGUIN (*SPHENISCUS DEMERSUS*) EXHIBIT," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 49, no. 3, pp. 542–555, Sep. 2018, doi: 10.1638/2017-0119.1.
- [79] R. Sabino *et al.*, "Molecular identification of clinical and environmental avian *Aspergillus* isolates," *Archives of Microbiology*, vol. 201, no. 2, pp. 253–257, Mar. 2019, doi: 10.1007/s00203-019-01618-y.
- [80] F. Choukri *et al.*, "Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in France: Table 1.," *Medical Mycology*, vol. 53, no. 6, pp. 593–596, Aug. 2015, doi: 10.1093/mmy/myv029.

- [81] C. Godeau *et al.*, “Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the hospital: Surveillance from flower beds to corridors,” *American Journal of Infection Control*, vol. 48, no. 6, pp. 702–704, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.ajic.2019.10.003.
- [82] S. Challier, S. Boyer, E. Abachin, and P. Berche, “Development of a Serum-Based Taqman Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 2, pp. 844–846, Feb. 2004, doi: 10.1128/JCM.42.2.844-846.2004.

ANNEXE 1

PCR quantitative en temps réel pour la détection d'ADN d'*Aspergillus fumigatus*.

Amorces (d'après Challier et al. [82])

28S 466 : 5'- CTC GGA ATG TAT CAC CTC TCG G -3'

28S 533 : 5'- TCC TCG GTC CAG GCA GG -3'

Sonde TaqMan 28S : 5'-6-carboxyfluorescéine- TGT CTT ATA GCC GAG GGT GCA ATG CG -3'-
6-carboxy-tétraméthylrhodamine

Programme LightCycler® 96 (Roche)

Décontamination	1 cycle	50°C	2 min
Dénaturation initiale	1 cycle	95°C	10 min
Dénaturation	50 cycles	95°C	15 sec
Elongation		60°C	1 min

ANNEXE 2

Amplification du gène de la β -tubuline pour l'identification des espèces d'*Aspergillus*.

Amorces (d'après Glass et al. [70])

β -tub1 : 5'- GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC -3'

β -tub2 : 5'- ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC -3'

Programme thermocycleur

Dénaturation initiale	1 cycle	94°C	3 min
Dénaturation	35 cycles	94°C	30 sec
Hybridation		50°C	30 sec
Elongation		72°C	45 sec
Elongation finale	1 cycle	72°C	15 min

ANNEXE 3

Amplification du gène *cyp51A* pour la recherche de mutations de résistance aux antifongiques azolés chez *A. fumigatus*.

Amorces (d'après Morio et al. [72] et Lavergne et al. [73]) :

Amorce	Séquence	Taille du fragment
AFTR-F	5'- TAA TCG CAG CAC CAC TTC AG -3'	234 paires de bases (en l'absence de <i>tandem repeat</i>)
AFTR-R	5'- GCC TAG GAC AAG GAC GAA TG -3'	
CYP51AF-F1	5'- CAT TTC CCT CAT CAC TGC AA -3'	991 paires de bases
CYP51AF-R1	5'- CAT CAT GTG CGC AAT CTC TT -3'	
CYP51AF-F2	5'- AGA AGC GAG ATG CTG CTC AT -3'	890 paires de bases
CYP51AF-R2	5'- CCT TTG AAG TCC TCG ATG GT -3'	

Programme thermocycleur

Dénaturation initiale	1 cycle	95°C	7 min
Dénaturation	35 cycles	95°C	30 sec
Hybridation		55°C	30 sec
Elongation		72°C	1 min
Elongation finale	1 cycle	72°C	10 min

ANNEXE 4

Séquençage du gène *cyp51A* pour la recherche de mutations de résistance aux antifongiques azolés chez *A. fumigatus*.

Amorces (d'après Morio et al. [72], Lavergne et al. [73] et Alanio et al. [74])

Fragment d'ADN séquencé	Amorce	Séquence
Promoteur du gène <i>cyp51A</i>	AFTR-F	5'- TAA TCG CAG CAC CAC TTC AG -3'
	AFTR-R	5'- GCC TAG GAC AAG GAC GAA TG -3'
Premier fragment de la partie codante du gène <i>cyp51A</i>	CYP51AF-F1	5'- CAT TTC CCT CAT CAC TGC AA -3'
	AF766F	5'- TTC GGA TCG GAC GTG GTG TA -3'
	AF855R	5'- TAA CGC AGA CTG AGT CAA GC -3'
	CYP51AF-R1	5'- CAT CAT GTG CGC AAT CTC TT -3'
Second fragment de la partie codante du gène <i>cyp51A</i>	CYP51AF-F2	5'- AGA AGC GAG ATG CTG CTC AT -3'
	AF1426F	5'- AGT CTT CCT CCG CTC CAG TA -3'
	AF1709R	5'- ACA ACC TCG TCG TTC TCC TG -3'
	CYP51AF-R2	5'- CCT TTG AAG TCC TCG ATG GT -3'

Séquence nucléique de la région du promoteur du gène *cyp51A* d'*A. fumigatus* amplifiée par les amorces AFTR-F et AFTR-R

La taille attendue de la région amplifiée est de 234 paires de bases, en l'absence de *tandem repeat*. La séquence soulignée de 34 paires de bases est retrouvée dupliquée dans les mutations de type TR34/L98H.

TAATCGCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAGTTGCCTA
ATTACTAAGGTGTAGTTCCAGCATAACCATAACCCCTAACTCATACTACGGTAGGTAGATCTACTTACCTATGAAC
CTATATTGGTAGGTAGGTGAATATAAAATACAGCATGGAACATGTTTTTCATTAGCTGGTCTCTCATTCGTCCTT
GTCCTAGGC

Séquence nucléique de référence du gène *cyp51A* d'*A. fumigatus* (GenBank AF338659)

CATTTCCCTCATCACTGCAACTCTAATCCTCGGGCTCACCCCTCCCTGTGTCTCCTCGAA

1 ATGGTGCCGATGCTATGGCTTACGGCCTACATGGCCGTTGCGGTGCTGACGGCAATCTTG 60

61 CTCAATGTTGTTTATCAATTATTCTTTTCGGCTTTGGAACCGAACAGAACCGCCAATGGTC 120

121 TTTCAATTGGGTCCCATTTCTGGGTAGTACCATCAGTTACGGGATTGATCCCTACAAGTTC 180

181 TTCTTTGCGTGCAGAGAAAAGGCAAGTCTCAAGATTGTAGTTTGACATTCATTCTCTGGGC 240
 241 GCATTGCTGAGTATTGCTTTCTTAACCGGCAGTATGGCGATATCTTCACTTTTATACTGT 300
 301 TGGGTCAAAAACACAGTCTACCTGGGCGTTCAGGGGAACGAGTTTATTCTCAACGGCA 360
 361 AGCTCAAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCATTGACGACCCCCGTTTTCGGAT 420
 421 CGGACGTGGTGTA TGATTGTCCCAATTCCAAGCTGATGGAGCAGAAAAAGTTCATCAAGT 480
 481 ACGGCTTGACTCAGTCTGCGTTAGAGTCTCATGTGCCACTTATTGAGAAGGAGGTTTTGG 540
 541 ACTATCTGCGCGATTACCGAACTTTCAAGGCTCGTCCGGCCGGATGGACATCTCTGCGG 600
 601 CAATGGCTGAGATTACCATTTTTTACCGCTGCTCGAGCCCTCCAAGGCCAGGAAGTTCGTT 660
 661 CCAAACCTCACGGCTGAGTTCGCTGACCTCTATCATGACCTGGACAAGGGCTTTACTCCCA 720
 721 TCAATTTTATGCTACCGTGGGCCCCATTGCCGCATAACAAGAAGCGAGATGCTGCTCATG 780
 781 CGCGCATGAGGTCAATCTACGTTGACATCATCAATCAGCGCCGTCTTGACGGTGACAAGG 840
 841 ACTCTCAGAAATCAGACATGATATGGAACCTGATGAACTGCACATACAAAAACGGCCAGC 900
 901 AAGTGCCTGATAAAGAGATTGCGCACATGATGATAACCCTGTTGATGGCTGGTCAGCATT 960
 961 CGTCTTCGTCCATCAGCGCCTGGATTATGCTGAGACTGGCCTCACAGCCAAAAGTCCTCG 1020
 1021 AAGAGCTGTATCAGGAACAGCTGGCCAATCTTGCCCCGCCGGGCCAGACGGCAGTCTTC 1080
 1081 CTCCGCTCCAGTACAAGGATCTTGACAACTTCCCTTCCATCAACATGTTATTTCGTGAAA 1140
 1141 CCTTACGGATTCACTCCTCTATTCACTCTATCATGCGCAAGGTGAAAAGCCCCCTGCCCCG 1200
 1201 TTCCCGGGACCCCTTACATGATTCCCTCCCGGTGCGGTGCTCCTTGCTTACCTGGAGTGA 1260
 1261 CAGCCCTCAGCGACGAACACTTCCCCAATGCTGGGTGCTGGGATCCCCATCGCTGGGAGA 1320
 1321 ACCAGGCTACTAAGGAGCAGGAGAACGACGAGGTTGTGCGACTACGGTTACGGCGCCGTCT 1380
 1381 CCAAGGGCACGTCAAGTCCCTATCTTCCGTTTGGTGCTGGCCGACACCGCTGTATCGGCG 1440
 1441 AGAAATTCGCTTATGTCAACCTTGGTGTGATTCTGGCGACCATTGTGCGCCACCTGCGAC 1500
 1501 TTTTCAACGTGGATGGAAAGAAAGGAGTCCCTGAACTGACTATTTCATCCCTCTTTTCGG 1560
 1561 GCCCCATGAAGCCAAGCATCATCGGCTGGGAGAAGCGGTGAAAAACACATCCAAGTGA 1619
 GACTGTTGTAACCATCGAGGACTTCAAAGGATTTGGTGTGATCGGAATAGGTGT

Séquence protéique de référence du gène *cyp51A* d'*A. fumigatus* (GenBank AF338659)

MVPMLWLTAYMAVAVLTAILLNVVYQLFFRLWNRTEPPMVFWVPFLGSTISY**G**IDPYKFFACREKYGDIFTFI
LLGQKTTVYLGVGNEFILNGK**L**KDVNAEEVYSPLTTPVFGSDVV**Y**DCPNSKLMEQKKFIKY**G**LTQSALESHVPL
IEKEVLDYLRDSPNFQSSGRMDISAAMAEITIFTAARALQGQEVRSKLTAEFADLYHDLDKGFTPIN**F**MLPWAP
LPHNKKRDAAHARMRSIYVDIINQRRLDGDKDSQKSDMIWNLNMCTYKNGQQVPDKEIAHMMI**T**LLMAGQHSSSS
ISAWIMLRLASQPKVLEELYQEQLANLGPAGPDGSLPPLQYKDLDKLPFHQHVIRETLRIHSSIHSIMRKVKSP
PVPGTPYMIPPGRVLLASPGVTALSDEHFPNAGCWDPHRWENQATKEQENDEVVDYGYGAVSKGTSSPYLPF**G**AG
RHRCIGEKFAYVNLGVILATIVRHLRLFNVDGKKGVPETDYSSLFSGPMKPSIIGWEKRSKNTSK

G54 - TR34/**L98H** - TR46/**Y121F/T289A** - **G138** - **M220** - **G448**

ANNEXE 5

Résultats des examens réalisés sur les prélèvements autopsiques des manchots de Humboldt et conclusion sur le diagnostic d'aspergillose. Un seul prélèvement est analysé par manchot.

(QI = quantité insuffisante pour réaliser la qPCR ; CHFILN = champignon filamenteux non identifiable)

Date du décès	Âge lors du décès (en jours)	Examen direct	Culture	qPCR <i>A. fumigatus</i>	Diagnostic d'aspergillose retenu
25/04/18	20	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i> + <i>Rhizopus sp</i>	Positive	OUI
16/05/18	41	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i>	Positive	OUI
06/07/18	7	Négatif	Bactéries	Echec extraction	NON
09/07/18	13	Négatif	Bactéries	Négative	NON
04/10/18	98	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i>	Positive	OUI
03/11/18	206	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i>	Positive	OUI
01/12/18	6	Négatif	Négative	QI	NON
05/12/18	22	Négatif	Négative	QI	NON
05/12/18	22	Négatif	Négative	QI	NON
15/12/18	25	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i>	Positive	OUI
16/12/18	24	Négatif	Négative	Négative	NON
21/12/18	13	Négatif	Bactéries	Echec extraction	NON
03/02/19	224	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i>	Positive	OUI
29/03/19	13	Négatif	Levures	Positive	OUI
08/04/19	3654	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i>	Positive	OUI
12/04/19	9	Négatif	Levures	Négative	NON
16/04/19	9	Négatif	Levures	Positive	OUI
19/04/19	9	Négatif	Négative	QI	NON
26/04/19	7	Négatif	Négative	Echec extraction	NON

26/04/19	1	Négatif	Bactéries	Echec extraction	NON
27/04/19	5	Levures	Levures + bactéries	Echec extraction	NON
29/04/19	0	Négatif	Levures	Négative	NON
01/05/19	6	Négatif	Bactéries	Positive	OUI
01/05/19	29	Filaments mycéliens	<i>A. section terreii</i>	Positive	OUI
03/05/19	14	Négatif	Levures	Positive	OUI
06/05/19	13	Négatif	Négative	Négative	NON
06/05/19	18	Négatif	Bactéries	Positive	OUI
07/05/19	18	Négatif	Négative	Négative	NON
08/05/19	20	Négatif	Bactéries	Positive	OUI
14/05/19	24	Négatif	Bactéries	Négative	NON
20/05/19	25	Négatif	Levures + bactéries + CHFILN	Négative	NON
22/05/19	20	Négatif	Levures + bactéries	QI	NON
23/05/19	21	Négatif	Négative	QI	NON
26/05/19	34	Négatif	Bactéries	QI	NON
30/05/19	19	Négatif	<i>A. section fumigati</i>	QI	OUI
10/06/19	45	Filaments mycéliens	<i>A. section fumigati</i>	QI	OUI
16/07/19	6	Négatif	Négative	Positive	OUI
22/07/19	7	Négatif	<i>A. section fumigati</i> + levures	Positive	OUI
26/07/19	247	Négatif	<i>A. section fumigati</i> + <i>Rasamsonia aspergillaceae</i> + <i>Penicillium sp</i>	QI	OUI
08/11/19	12	Négatif	Bactéries	Négative	NON
15/11/19	11	Négatif	Levures	QI	NON
18/11/19	20	Négatif	Négative	Négative	NON
20/11/19	19	Négatif	<i>A. section fumigati</i>	Négative	NON
20/11/19	4279	Négatif	<i>A. section fumigati</i>	Positive	OUI
20/11/19	16	Filaments mycéliens	<i>Penicillium sp</i> + Mucorale + levures	Positive	OUI
26/11/19	32	Négatif	Levures	Négative	NON
28/12/19	228	Négatif	Bactéries	QI	NON

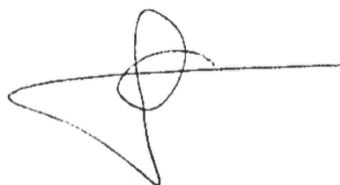
ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e)

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature : *Noémie Cartier*



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21709665

N° Thèse : 65

Nom et Prénom : CARTIER Noémie

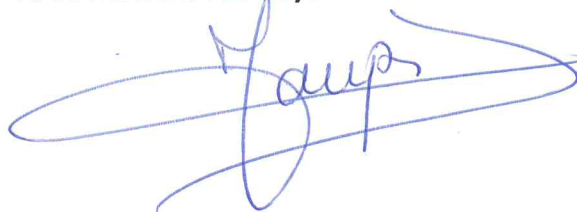
Sujet : Aspergillose au ZooParc de Beauval : incidence clinique chez les manchots de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) et étude de la contamination environnementale

Tours, le 13/11/2020

Le(s) Directeur(s) de Thèse :


Pr Guillaume DESOUBEAUX
PU-PH

Vu et Transmis : Le Doyen



NOM, PRÉNOM de l'étudiant **CARTIER Noémie**

N° 65

TITRE DE LA THÈSE

Aspergillose au ZooParc de Beauval : incidence clinique chez les manchots de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) et étude de la contamination environnementale

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux environnemental responsable de l'aspergillose, une infection opportuniste touchant aussi bien l'Homme que l'animal. Cette pathologie est particulièrement fréquente chez les manchots maintenus en captivité. Son traitement repose sur la prescription d'antifongiques azolés, mais la survenue de mutations dans le gène *cyp51A* codant la protéine cible peut conduire à des échecs thérapeutiques. Le lien entre l'apparition de résistances et l'utilisation d'antifongiques azolés dans l'agriculture est bien démontré par un phénomène de pression de sélection. Le ZooParc de Beauval est un grand parc animalier français qui héberge une colonie de plus de cent manchots de Humboldt (*Spheniscus humboldti*), dans un environnement rural, entouré de terres agricoles. La première partie de ce travail a cherché à déterminer l'incidence clinique de l'aspergillose au sein de la colonie de manchots, et à évaluer le niveau de contamination environnementale par *A. fumigatus* au moyen de trois séries de prélèvements dans leurs nids. La deuxième partie de ce travail a consisté à rechercher les mutations de résistance dans les souches d'*A. fumigatus* isolées au préalable dans l'enclos.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is an environmental mold responsible for aspergillosis, an opportunistic infection affecting both humans and animals. This pathology is particularly common in penguins bred in captivity. Its treatment is based on the prescription of azole antifungals. However, the occurrence of mutations in the *cyp51A* gene encoding the target protein can lead to treatment failures. The link between the emergence of resistance and the use of azole antifungals in agriculture is well demonstrated through a phenomenon of selection pressure. The ZooParc de Beauval is a large French animal park that hosts a colony of more than a hundred Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) located in the French countryside and surrounded by fields. The first part of this work investigated the clinical incidence of aspergillosis within the penguin colony and assessed the level of environmental contamination by *A. fumigatus* using three sets of samples from their nests. The second part of this work consisted in looking for resistance mutations in strains of *A. fumigatus* isolated beforehand in the enclosure.

MOTS-CLÉS : *Aspergillus*, *Aspergillus fumigatus*, aspergillose, manchots de Humboldt, *Spheniscus humboldti*, ZooParc de Beauval, résistance aux antifongiques azolés, mutations du gène *cyp51A*

JURY

PRÉSIDENT : **Pr Lanotte Philippe**, PU-PH de Bactériologie - Virologie, CHRU Tours

DIRECTEUR : **Pr Desoubaux Guillaume**, PU-PH de Parasitologie - Mycologie - Médecine tropicale, CHRU Tours

MEMBRES :

Dr Bailly Éric, PH de Parasitologie - Mycologie - Médecine tropicale, CHRU Tours

Dr Chesnay Adélaïde, AHU de Parasitologie - Mycologie - Médecine tropicale, CHRU Tours

Dr Leclerc Antoine, Vétérinaire à la clinique du ZooParc de Beauval, St-Aignan-sur-Cher

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 13 novembre 2020, Faculté de pharmacie de Tours, Salle des Actes