

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	5
INDEX DES FIGURES	7
INDEX DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION.....	11
 PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	 13
I. Les aspergilloses et les champignons du genre <i>Aspergillus</i>	13
A. Généralités sur les champignons du genre <i>Aspergillus</i>	13
1. Position dans la systématique	13
2. Caractères macroscopiques et microscopiques	16
3. Caractéristiques biologiques	17
4. Pouvoir pathogène.....	18
a. Toxines et structures antigéniques.....	18
b. Facteurs de virulence	19
B. Données épidémiologiques	20
1. Sources d'agent pathogène.....	20
2. Modes de contamination	20
3. Causes favorisantes	21
4. Facteurs de réceptivité et de sensibilité.....	22
C. Hôtes naturels et expérimentaux	23
1. Aspergilloses chez l'Homme	24
2. Aspergilloses animales	25
a. Aspergillose rhino-sinusale du chien	25
b. Aspergillose de la poche gutturale chez le cheval	27
c. Avortements chez les bovins	28
d. Aspergillose chez les oiseaux	28
3. Modèles expérimentaux d'aspergillose	29

II. Aspergillose aviaire.....	31
A. Importance de l'aspergillose aviaire en élevage	31
B. Epidémiologie	31
1. Sources	31
2. Modes d'infection	32
3. Particularités des oiseaux expliquant leur grande réceptivité et sensibilité	32
4. Réceptivité et sensibilité en fonction de l'espèce aviaire.....	33
C. Signes cliniques.....	34
1. Symptômes.....	34
2. Lésions	36
a. Aspect macroscopique.....	36
b. Aspect microscopique.....	37
D. Déterminisme de la localisation des lésions de l'appareil respiratoire	37
E. Diagnostic.....	40
1. Examen clinique.....	40
2. Analyse hématologique	41
3. Analyse biochimique.....	41
4. Analyse cytologique et histologique	42
5. Analyse sérologique	42
6. Culture et observation directe des têtes aspergillaires	43
7. Radiologie	43
8. Endoscopie	43
F. Moyens de lutte	44
1. Traitement	44
2. Prophylaxie en élevage	44

PARTIE EXPERIMENTALE

Etude des stades précoces du développement d' <i>A. fumigatus</i> chez le poussin.....	47
I. Contexte et objectifs scientifiques de l'étude.....	47

II. Matériels et méthodes.....	50
A. Animaux.....	50
B. <i>Inoculum</i>	50
C. Inoculation.....	51
D. Méthode d'imagerie	52
E. Marqueurs de l'infection	53
1. Morbidité et mortalité.....	53
2. Euthanasie et prélèvements sanguins	53
3. Autopsie et traitement des prélèvements.....	54
4. Dosage du galactomannane sérique par ELISA.....	55
F. Suivi <i>in situ</i> de l'infection au moyen de l'imagerie dynamique	56
G. Etude du développement d' <i>A. fumigatus</i> suite à une infection répétée ou une co-infection séquentielle	57
H. Analyses statistiques des résultats.....	58
III. Résultats	59
A. Suivi <i>in situ</i> de l'infection par <i>A. fumigatus</i> par imagerie dynamique.....	59
B. Etude du développement d' <i>A. fumigatus</i> suite à une infection répétée ou une co-infection séquentielle	65
1. Mortalité et morbidité.....	65
2. Autopsie et examen histo-pathologique	66
3. Cultures mycologiques.....	69
4. Dosage du galactomannane sérique	70
IV. Discussion	72
A. Intérêt du suivi <i>in situ</i> de l'infection par une souche d' <i>A. fumigatus</i> fluorescente ..	72
B. Infection répétée et co-infection séquentielle.....	76
CONCLUSION	83
BIBLIOGRAPHIE	85

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSA : agence française de sécurité sanitaire des aliments
BIPAR : biologie moléculaire et immunologie parasitaires et fongiques
CNRS : centre national de la recherche scientifique
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
ENVA : école nationale vétérinaire d'Alfort
EOPS : exempt d'organismes pathogènes spécifiques
FIV : *feline immunodeficiency virus*
GFP : *green fluorescent protein*
INRA : institut national de la recherche agronomique
ISA : intra sac aérien
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
PSM : poste de sécurité microbiologique
PVC : polychlorure de vinyle
SA : sac aérien
SATCG : sac aérien thoracique caudal gauche
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
UFC : unité formant colonie
UMR : unité mixte de recherche
WT : *wild type*

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : schéma d'une tête aspergillaire	14
Figure 2 : cycle de reproduction d' <i>A. fumigatus</i>	17
Figure 3 : anatomie de l'appareil respiratoire des oiseaux	38
Figure 4 : trajet de l'air dans l'appareil respiratoire des oiseaux en inspiration et en expiration.....	39
Figure 5 : évolution comparée de l'efficacité sur l'animal entier et dans le poumon isolé pour les poussins inoculés avec des conidies DsRed	59
Figure 6 : suivi de la fluorescence émise par les conidies DsRed au travers de l'animal entier et des poumons isolés en fonction du temps post-inoculation	60
Figure 7 : évolution du nombre d'ufc/g de poumon en fonction du temps post-inoculation ...	61
Figure 8 : correspondance individuelle entre l'efficacité du signal au niveau des poumons et la quantité de conidies viables dans les poumons en fonction du temps post-inoculation...	61
Figure 9 : correspondance individuelle entre le nombre d'ufc/g de poumon et la proportion de tissu pulmonaire lésé	62
Figure 10 : correspondance individuelle entre l'efficacité du signal enregistré au niveau des poumons et la proportion de tissu pulmonaire présentant des lésions.....	62
Figure 11 : comparaison entre la photo du poumon gauche isolé et l'image correspondante obtenue avec le système IVIS Spectrum	63
Figure 12 : suivi de la fluorescence émise par les microsphères au travers de l'animal entier et des poumons isolés en fonction du temps post-inoculation	64
Figure 13 : évolution comparée de l'efficacité sur l'animal entier et dans le poumon isolé pour chaque individu inoculé avec les microsphères	63
Figure 14 : évolution du poids moyen quotidien des animaux des 5 lots étudiés	66
Figure 15 : coupes histologiques colorées à l'hémalum éosine safran et à acide périodique de Schiff du poumon gauche prélevés à J1 et J4 post-inoculation.....	68
Figure 16 : lésions observées dans chaque lot au niveau des poumons et des sacs aériens en fonction du temps	68
Figure 17 : évolution au cours du temps des moyennes du nombre d'ufc/g de poumon pour les différents lots	70
Figure 18 : évolution de la concentration de galactomannane sérique au cours du temps pour les différents lots	71

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : tableau de reconnaissance des espèces d' <i>Aspergillus</i>	15
Tableau II : proportion d'individus inoculés présentant des lésions au niveau des sacs aériens et/ou des poumons.....	67
Tableau III : proportion d'individus inoculés présentant une culture positive de l'écouvillon de sac aérien ou du broyat de poumon	69

INTRODUCTION

L'aspergillose est une mycose aéroportée opportuniste non contagieuse due au développement, dans différents tissus et organes, de champignons filamenteux du genre *Aspergillus*.

Le genre *Aspergillus* compte de très nombreuses espèces différentes mais *A. fumigatus* est l'agent étiologique décrit dans 90% des cas d'aspergilloses cliniques chez l'Homme et l'animal (22).

Ces champignons sont omniprésents dans l'environnement et certaines conditions favorables peuvent les faire passer d'un mode de vie saprobie à un mode de vie parasite.

Les humains et potentiellement toutes les espèces animales peuvent être atteints d'aspergillose; les oiseaux apparaissent particulièrement prédisposés.

Les individus immunocompétents y sont peu sensibles. Toutefois, avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (atteints de SIDA ou de cancer donnant des neutropénies, ou ayant subi une greffe d'organe ou de moelle osseuse), l'espèce *A. fumigatus* est devenue une cause majeure de maladie nosocomiale (22).

Les oiseaux, quant à eux, sont particulièrement sensibles à cette affection qui représente une cause fréquente de morbidité et de mortalité chez de nombreuses espèces (12).

L'expression clinique de la maladie est polymorphe, bien que l'appareil respiratoire soit le site privilégié du développement des *Aspergillus*. L'apparition des symptômes est souvent tardive mais brutale.

Enfin, le diagnostic de certitude est difficile et le traitement, compliqué à mettre en œuvre, est souvent inefficace.

De ce fait, de nombreuses études sont menées pour mieux connaître la physiopathologie de l'aspergillose afin d'en améliorer la prévention, le diagnostic et le traitement aussi bien chez l'Homme que chez l'animal.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les aspergilloses et les champignons du genre *Aspergillus*

A. Généralités sur les champignons du genre *Aspergillus*

1. Position dans la systématique (6)

Les microorganismes du genre *Aspergillus* appartiennent au règne des Champignons ou *Fungi* qui sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires, de structure syncytiale, hétérotrophes, se nourrissant par absorption et présentant une reproduction sexuée et/ou asexuée.

Les *Aspergillus* appartiennent au groupe des Eumycota, qui produisent des filaments mycéliens et que l'on distingue des Myxomycota qui présentent des plasmodes.

Chez les Eumycota, on compte 5 embranchements qui ont un intérêt en médecine humaine ou vétérinaire.


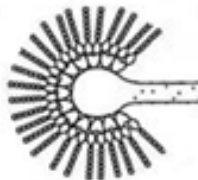
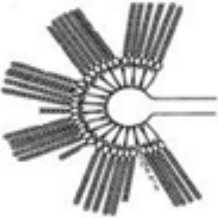
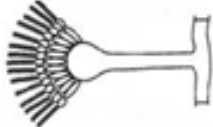
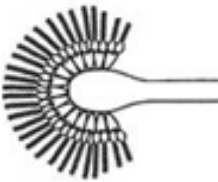
Les quatre premiers embranchements, à savoir les Mastigomycota, les Zygomycota, les Ascomycota et les Basidiomycota, se différencient par la morphologie de leur forme sexuée (téléomorphe).

Le cinquième embranchement, les Deuteromycota, aussi appelés champignons imparfaits se distinguent des autres par l'absence de forme sexuée décrite.

Les *Aspergillus* sont traditionnellement classés dans l'embranchement des Ascomycota qui regroupe des champignons qui présentent typiquement une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores et une reproduction asexuée au moyen de conidies.

Cependant, la reproduction sexuée n'est pas observée pour toutes les espèces du genre *Aspergillus*. Ainsi *A. fumigatus* ne se présente-t-il, en culture et dans les lésions, que sous une forme asexuée (anamorphe).

Tableau I : tableau de reconnaissance des espèces d'*Aspergillus*

	<i>A.fumigatus</i>	<i>A.flavus</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.nidulans</i>	<i>A.versicolor</i>
Aspect de la « tête aspergillaire »					
Aspect des colonies	Colonies extensives, à croissance rapide (atteignant 4 ± 1 cm en 7 j à 25-37°C), en gazon blanc puis vert ou gris bleuâtre et enfin brun sombre fuligineux avec des bords plutôt blanchâtres. Le dessous de la culture est de teinte foncée.	Colonies à croissance rapide (6 - 7 cm à 25°C en 10 jours) au départ blanche puis de couleur jaune verdâtre avec les bords blancs		Colonies à croissance lente (0,5 - 1 cm en 7 jours)	
Conidies	Vert sombre, échinulées et de 2,5 à 3 µm de diamètre	Vert clair, échinulées et de diamètre variable (3 à 6 µm, le plus souvent 3,5 à 4,5 µm)	Noires	Vert sombre	bleu verdâtre
Métule	0	±	+	+	+
Conidiophores	Lisses, de 300µm de long, 5-8 µm de diamètre vésicule de 20-30 µm de diamètre.	Pourvus d'échinulations, 100 µm de long	Lisses, très longs (1-3mm)	Lisses, bruns très courts (<130 µm)	lisse
Reproduction sexuée	0	0	0	Présente, avec cellules de Hülle en noisette entourant les cléistothèces	0

2. Caractères macroscopiques et microscopiques

Afin d'identifier une espèce d'*Aspergillus* il convient dans un premier temps d'observer l'aspect macroscopique de la culture sur boîte de Petri.

Les caractères macroscopiques à apprécier sont la taille, la texture et la couleur des colonies.

Les milieux de culture habituellement utilisés sont le milieu de Sabouraud-chloramphénicol (agar-agar 20 g, glucose anhydre pur 20 g, peptone 10 g, chloramphénicol pur 99% 0,5 g) ou le milieu malt-agar-chloramphénicol (malt extract 20 g, agar-agar 15 g, glucose anhydre pur 20 g, peptone 1 g, chloramphénicol pur 99% 0,5 g).

Les boîtes ensemencées sont incubées pendant 48 à 72 heures à 27-37°C avant observation (22, 17).

Par ailleurs, pour faire la diagnose de l'espèce, il est également indispensable de faire une observation microscopique d'un fragment de mycélium et d'observer les critères morphologiques relatifs aux «têtes aspergillaires» et aux conidiophores (tableau I).

La visualisation des *Aspergillus* est facilitée par une coloration au bleu de méthylène ou au bleu de lactophénol.

L'observation au microscope se fait aux grossissements x10 puis x40 (17).

Notons que l'utilisation de caractéristiques biochimiques n'est pas fréquente comme complément pour l'identification de l'espèce. La seule enzyme commune à toutes les souches d'*A. fumigatus* est la glutamate déshydrogénase (22,17).

Enfin, la localisation des *Aspergillus* sur des coupes histologiques peut se faire à l'aide de la coloration classique à l'hémalum éosine safran (HES).

Cependant, avec cette coloration qui est nécessaire pour identifier les modifications tissulaires, les éléments fongiques apparaissent transparents. Il est donc souhaitable de réaliser également une coloration spéciale mettant en évidence de manière spécifique les structures fongiques.

Il peut s'agir de l'acide périodique de Schiff (PAS) qui fait apparaître les éléments fongiques en rouge-rose ou la coloration argentique de Gomori-Grocott qui colore les éléments fongiques en noir.

3. Caractéristiques biologiques

Les champignons du genre *Aspergillus* vivent en saprobiose dans le sol, sur la matière organique en décomposition. Ils jouent un rôle important dans le cycle du carbone et de l'azote.

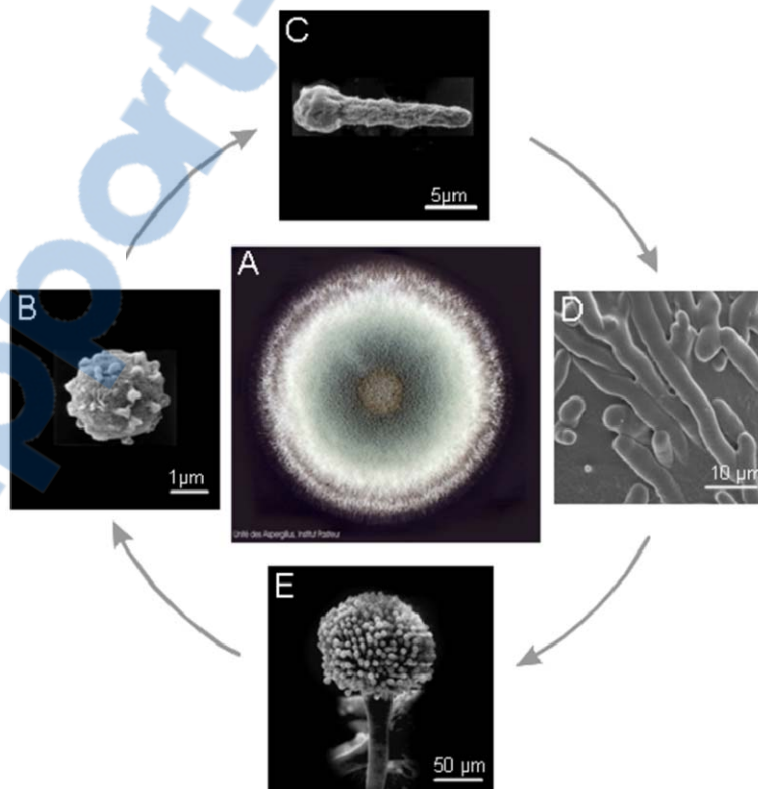
Ce sont des champignons thermophiles et aérobies qui apprécient néanmoins une certaine humidité ambiante.

Ainsi, *A. fumigatus* croît dans une large gamme de température (de 12 à 57°C avec un optimum autour de 38°C). Il peut survivre à des températures atteignant 70°C et à des taux d'humidité relative variant entre 11 et 96% (30).

Les *Aspergillus* se multiplient presque exclusivement sur un mode asexué.

Dans les conditions optimales de développement et de multiplication, les conidies germent (C) et le mycélium ainsi obtenu (D) se couvre de « têtes aspergillaires » (E) qui produisent des milliers de conidies microscopiques (B) (figure 2).

Figure 2 : cycle de reproduction d'*A. fumigatus* (d'après Latgé, 1999).



La conidiogénèse est de type blastique ce qui signifie que la conidie prend naissance à partir d'une cellule conidiogène qui se différencie en phialide. C'est à partir de celle-ci que sont produites des milliers de phialoconidies hydrophobes et très résistantes dans le milieu extérieur.

Les conidies sont libérées dans l'air et leur faible diamètre (2,5 à 3 µm pour *A. fumigatus*), favorise leur dissémination (22).

Notons que *A. nidulans* et *A. fisherianus* utilisent en plus un mode de reproduction sexuée par formation d'ascospores (17).

4. Pouvoir pathogène

Les *Aspergillus* étant des champignons naturellement présents dans l'environnement, on peut s'interroger sur l'origine de l'expression de leur pouvoir pathogène.

Comme pour d'autres agents pathogènes opportunistes, il est possible que les infections par des *Aspergillus* soient liées à l'expression de certains facteurs de virulence, au niveau d'exposition et aux facteurs de sensibilité de l'hôte potentiel.

a. Toxines et structures antigéniques

Les moisissures du genre *Aspergillus* sont capables de synthétiser des mycotoxines.

A. fumigatus synthétise la gliotoxine, qui est immunosuppressive et cytotoxique et le verruculogène qui provoque des modifications *in vitro* des cellules de l'épithélium respiratoire de l'Homme (16).

Les aflatoxines sont produites par *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. Ces métabolites secondaires sont hautement carcinogènes, mutagènes et tératogènes.

L'ochratoxine A, produite par *A. ochraceus*, *A. niger* et *A. carbonarius*, présente une toxicité rénale, une immunotoxicité et des propriétés mutagènes et tératogènes.

Les *Aspergillus* produisent également différentes molécules antigéniques.

Par exemple, le galactomannane est un composant majeur de la paroi d'*A. fumigatus*. C'est une molécule antigénique sécrétée durant la phase de croissance active du champignon qui est utilisée pour le diagnostic sérologique de l'aspergillose.

Cette molécule n'est cependant pas spécifique d'*Aspergillus*. Les *Penicillium* sont également capables de la synthétiser. On la trouve également dans la nourriture et les antibiotiques ce qui induit des problèmes de spécificité pour les kits de dosage de cet antigène (23).

b. Facteurs de virulence (22)

Des adhésines (récepteurs du complément ou de la *lamina propria*) et des hydrophobines à la surface des conidies favorisent les interactions entre les protéines et/ou les cellules de l'hôte et les conidies d'*Aspergillus*.

Les pigments (comme le dihydroxynaphthalène-mélanine) inhiberaient la phagocytose des conidies. Les souches dépigmentées ont un pouvoir pathogène moins important que les souches possédant des conidies vertes.

Diverses enzymes semblent également avoir un rôle dans la virulence. Par exemple les RNases tueraient les cellules défensives de l'hôte, la phospholipase entraînerait une destruction des cellules épithéliales et diverses protéases (élastinolytiques et collagénolytiques) favoriseraient la colonisation du tissu pulmonaire.

Cependant, la présence de ces différents facteurs ne semble pas essentielle à l'expression du pouvoir pathogène des *Aspergillus* et leur rôle précis dans l'établissement de la maladie demeure discuté.

Aucun métabolite absolument nécessaire au pouvoir pathogène des *Aspergillus* n'a pour le moment été identifié chez des isolats d'*A. fumigatus* provenant de lésions chez l'Homme ou chez l'animal.

La diversité génétique des souches circulant dans l'environnement est considérable et chacune de ces souches est capable de provoquer une aspergillose chez des hôtes qui peuvent être très différents.

Cela laisse supposer que l'apparition de l'aspergillose dépend davantage de la dose de conidies inhalées et/ou de la susceptibilité de l'hôte que de l'expression d'une ou plusieurs protéines aspergillaires spécifiques permettant de distinguer d'hypothétiques souches virulentes et non virulentes.

B. Données épidémiologiques

1. Sources d'agent pathogène

L'aspergillose est une mycose cosmopolite, plus fréquente encore dans les régions chaudes et humides.

Les *Aspergillus* se développent sur les débris organiques du sol, le compost, mais aussi sur les litières (paille de céréales, copeaux et sciure de bois), le foin, le maïs ou les céréales humides ou moisies.

Ainsi on en retrouve dans l'alimentation et la litière d'animaux réceptifs et sensibles tels que les bovins, les chevaux ou les oiseaux.

2. Modes de contamination

L'aspergillose n'est pas une maladie contagieuse, en effet les animaux infectés ne rejettent que très rarement des spores fongiques infectantes dans le milieu environnant.

Plusieurs voies de contaminations sont cependant possibles : respiratoire, digestive, cutanée, transplacentaire ou transcoquillière (6).

La contamination par voie respiratoire, par inhalation de conidies présentes dans l'air est la plus fréquente. Ces dernières sont facilement mises en suspension par les mouvements des animaux ou par les circuits de renouvellement de l'air et sont capables de pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire du fait de leur petite taille.

Les oiseaux, les bovins et les chevaux peuvent par exemple être contaminés par inhalation de conidies libérées d'une litière ou d'aliments contaminés. Il semble toutefois que le niveau de contamination des intrants doive être élevé pour provoquer une aspergillose clinique (5).

La contamination par voie digestive a été mise en évidence chez l'Homme et les bovins suite à l'ingestion d'aliments contaminés (6).

Une contamination par voie cutanée peut survenir chez les oiseaux par exemple lors de fracture ouverte des os longs pneumatisés ou de lésions de la cavité générale avec contamination secondaire des sacs aériens annexés aux poumons (6).

Si des conidies germent sur les œufs, des hyphes peuvent pénétrer par les pores de la coquille ou par d'éventuelles fissures (17,5).

Cependant, cette voie de contamination est de plus en plus rare du fait des progrès des mesures d'hygiène mises en œuvre dans les incubateurs et éclosiers industriels.

Enfin, chez les bovins les voies de contamination diathélique (par le canal du trayon) et transplacentaire sont rares mais possibles (6).

3. Causes favorisantes (6)

La probabilité de contamination est étroitement liée au taux de contamination de l'air ambiant.

Ainsi tout ce qui provoque une augmentation de la concentration de conidies peut favoriser l'apparition d'une aspergillose.

Certains facteurs environnementaux tels que la chaleur et l'humidité jouent un rôle très important. Dans ces conditions la sporulation est alors active et si elle est suivie d'une période sèche la contamination de l'air par des conidies par voie aérienne sera très importante.

Le mode de vie des animaux peut constituer un facteur favorisant. Par exemple des animaux élevés sur une litière végétale et nourri avec du fourrage et de l'ensilage seront plus exposés au risque de contamination.

Ce dernier augmente également lorsque les paramètres zootechniques d'élevage sont mal

contrôlés. Ainsi, on compte parmi les causes favorisantes, les mauvaises conditions d'hygiène, les problèmes de distribution et de stockage de la nourriture, une ventilation insuffisante et des températures trop importantes dans les bâtiments, des cages trop petites ou un chargement excessif en animaux qui brassent l'air et mettent en suspension les conidies.

Des particularités anatomiques propres à certaines espèces et/ou races animales sont également des facteurs de prédispositions. Ainsi, la complexité et la longueur des cavités nasales des chiens dolichocéphales, la poche gutturale des chevaux et les pré-estomacs des ruminants rendent ces animaux plus sensibles aux infections aspergillaires.

Enfin, les affections des cavités nasales et des sinus frontaux (tumeurs, infections bactériennes), les traumatismes (chocs, fractures, interventions chirurgicales), les affections intercurrentes à l'origine notamment de lésions pulmonaires (cavernes tuberculeuses chez les humains, strongyloses respiratoires des ruminants) sont des facteurs de prédisposition.

Il en est de même pour les corps étrangers présent dans le tube digestif ou la muqueuse nasales (herbes, épillets, ...) ou pour l'exposition à des aérosols toxiques ou irritant (ammoniac, excès de poussières) causant une altération des muqueuses du tractus respiratoire supérieur.

En effet, les lésions occasionnées risquent d'être secondairement colonisées par les conidies d'*Aspergillus*.

4. Facteurs de réceptivité et de sensibilité

La réceptivité et la sensibilité de l'hôte dépendent de différents facteurs.

Il existe des différences de sensibilité interspécifiques. Ainsi, les oiseaux sont les animaux les plus sensibles mais il n'est pas rare de rencontrer des cas d'aspergillose chez l'Homme, les chiens, les bovins et les chevaux. La sensibilité des autres espèces est bien moins marquée.

Chez les oiseaux, la caille est plus sensible que la dinde elle-même plus sensible que les poulets (12).

L'espèce influe également sur la fréquence et l'aspect des formes cliniques. Ainsi, l'aspergillose rhino-sinusale est plus fréquente chez le chien que chez le chat chez qui la prévalence de l'aspergillose pulmonaire est plus élevée.

Il existe des plus des différences de sensibilité et de réceptivité intraspécifiques.

Les chiens dolichocéphales sont plus réceptifs que les chiens brachycéphales. Les bergers allemands semblent prédisposés aux aspergilloses disséminées dues à *A. terreus*.

Ghori et Edgar (1973) montrent que la sensibilité à l'aspergillose est plus marquée chez les jeunes oiseaux (dindes, cailles et poulets) pendant les 3 jours qui suivent l'éclosion.

Chez les gallinacés, les jeunes semblent développer plutôt une aspergillose aiguë alors que les animaux plus âgés (reproducteurs notamment) développent plutôt une forme chronique de la maladie.

L'aspergillose est une maladie opportuniste qui se développe chez des individus immunodéprimés.

Chez l'Homme, l'aspergillose est d'ailleurs la deuxième cause de la maladie nosocomiale d'origine fongique (après les candidoses).

Chez les oiseaux, des traumatismes ou des maladies chroniques ou intercurrentes (mycoplasmoses, tuberculose, chlamydophilose) jouent un rôle important dans le développement de la maladie en provoquant une altération de la réponse immunitaire.

Le stress, induit par exemple par la capture, les manipulations, le climat ou les conditions d'entretien, est également un facteur de prédisposition semble-t-il déterminant chez les oiseaux (23).

La maladie peut également se déclencher lors de contamination massive si les défenses immunitaires sont débordées.

Enfin, l'utilisation prolongée de thérapeutiques locales ou générales telles qu'une antibiothérapie ou une corticothérapie augmentent la sensibilité aux *Aspergillus*.

C. Hôtes naturels et expérimentaux

Parmi les espèces domestiques affectées, on compte les oiseaux, les ruminants, le cheval, le chien, le chat, le porc, le lapin et les rongeurs et parmi les animaux sauvages en captivité, de nombreuses espèces aviaires mais aussi le bison, l'élan, les singes et certains mammifères marins.

Enfin, l'aspergillose est également décrite chez les abeilles et les coraux (6).

Les formes cliniques et les localisations varient en fonction de l'hôte.

On observe ainsi des formes localisées à l'appareil respiratoire (atteintes des cavités nasales et des sinus, de la poche gutturale, de l'arbre broncho-alvéolaire), à l'appareil uro-génital (avortements) et aux mamelles, au tube digestif, aux yeux (kératomycoses, aspergilloses oculaires profondes), ou à la peau (otites aspergillaires, aspergilloses cutanées diffuses).

Il existe aussi des formes disséminées.

1. Aspergilloses chez l'Homme (22)

L'aspergillose n'est pas une zoonose mais il s'agit d'une maladie commune à l'Homme et à l'animal.

Un Homme inhale plusieurs centaines de conidies par jour (la concentration moyenne dans l'air est de 1 à 20 conidies par m³). Cette inhalation par des individus immunocompétents n'a souvent aucun effet car les conidies sont efficacement éliminées par ses défenses immunitaires innées.

Ainsi, il y a quelques années, *A. fumigatus* était considéré comme un agent faiblement pathogène responsable de simples pneumonies allergiques telles que la « maladie du poumon du fermier » ou l'asthme.

Ces maladies se déclaraient chez des individus fortement exposés pendant un court laps de temps ou exposés de manières répétées à des conidies ou des antigènes d'*Aspergillus*.

Dans ces formes allergiques de la maladie, il n'y a pas de croissance du mycélium et si le malade se soustrait à la source de conidies la guérison est généralement spontanée.

Cependant avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (syndrome d'immunodéficience acquise, greffes d'organes et de moelle osseuse, cancer donnant des neutropénies), *A. fumigatus* est devenu l'espèce la plus répandue et la plus pathogène parmi celles qui produisent des conidies aéroportées.

Bien que *A. fumigatus* soit l'agent le plus commun (environ 90% des infections humaines) d'autres *Aspergillus* peuvent être impliqués (*A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, et *A. clavatus*).

Lorsque le mycélium parvient à se développer dans l'organisme, cela peut provoquer trois types de manifestations cliniques distinctes : les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques, les aspergillomes et l'aspergillose pulmonaire aiguë.

Les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques vont du simple asthme bronchique à la destruction du poumon et touchent les patients atteints d'asthme et de mucoviscidose.

Les aspergillomes sont des masses de filaments inclus dans une matrice protéique qui apparaissent chez 10-15% des patients présentant des cavités préexistantes dans les poumons (patients traités pour une tuberculose ou des sarcoïdes).

Enfin, la forme la plus grave est l'aspergillose invasive pulmonaire (AIP). C'est une cause majeure de décès dans les centres de traitement des leucémies et dans les unités de transplantations d'organes. Cette affection touche 5 à 25 % des patients atteints de leucémie aiguë, 5 à 10 % des patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse et 19 à 26 % des personnes ayant subi une transplantation cœur-poumons.

L'aspergillose invasive est difficile à mettre en évidence surtout en début d'évolution.

En effet, les symptômes sont peu spécifiques : hyperthermie, toux, douleur thoracique, perte de poids, dyspnée.

Les examens complémentaires de choix sont la radiographie du thorax, la mise en culture et l'examen microscopique des prélèvements respiratoires et la détection d'antigènes aspergillaires.

L'efficacité des traitements de l'aspergillose reste encore relativement faible (le taux de mortalité de l'infection varie de 70 à 100%) ceci malgré des avancées permanentes (44).

2. Aspergilloses animales (6)

L'aspergillose est une maladie qui atteint peu les mammifères même si le nombre d'animaux immunodéprimés augmente également du fait des greffes rénales, du développement de la chimiothérapie et de l'existence d'infections immunosuppressives. Toutefois, les chiens, les chevaux et les vaches y sont sensibles.

Chez les oiseaux, l'aspergillose est une cause majeure de mortalité.

a. Aspergillose rhino-sinusale du chien

Cette affection touche les cavités nasales et/ou les sinus, principalement les sinus frontaux.

Elle représente 12 à 34 % des maladies rhino-sinusales chroniques du chien et concerne surtout les chiens dolichocéphales, jeunes et actifs.

Les tumeurs, les infections bactériennes, les corps étrangers, les traumatismes des cavités nasales et des sinus sont des facteurs aggravants.

Les symptômes observés sont des ronflements, de l'épistaxis, un jetage mucopurulent uni ou bilatéral, une ulcération de l'angle externe des narines à la jonction cutanéomuqueuse, une truffe parfois hyperkératosique et craquelée, une adénite satellitaire.

L'état général de l'animal reste bon. Toutefois, si aucun traitement n'est entrepris une forme invasive se développe. Il y a alors lyse de l'os frontal, déformation faciale plus ou moins douloureuse et passage du champignon dans les yeux (uvéite, panophtalmie) et le cerveau. On observe alors une diminution de l'état général parfois fatale.

Outre cette forme rhino-sinusale d'aspergillose, les chiens peuvent également être atteints d'aspergillose pulmonaire, forme classique bien que rarissime dans l'espèce féline.

Par ailleurs, de très rares cas d'aspergilloses disséminées dues à *A. terreus* ont été rapportés chez le Berger Allemand avec paralysie de l'arrière train, douleurs vertébrales et boiteries. Il n'y a aucun cas décrit en France à ce jour.

Le diagnostic de l'aspergillose rhino-sinusale du chien est souvent difficile et repose en premier lieu sur des signes épidémiologiques et cliniques : espèce prédisposée, caractère chronique de l'infection et inefficacité des antibiotiques antibactériens, aspect et abondance du jetage, épistaxis et ulcération des narines.

Le diagnostic de laboratoire se fait par analyses sérologiques (mise en évidence d'anticorps par électrosynérèse), histologiques, cytologiques, et/ou cultures mycologiques (à partir d'un prélèvement réalisé sous rhinoscopie).

Enfin, l'imagerie médicale est fréquemment utilisée. La rhinoscopie permet de visualiser le feutrage mycélien, la radiographie permet de mettre en évidence une destruction intra-nasale et la tomographie donne des images plus précises et un bilan d'extension.

Pour diagnostiquer définitivement une aspergillose rhino-sinusale, deux voire trois des critères suivants doivent être positifs : radiologie, mise-en-évidence du feutrage mycélien *in situ*, examen mycologique, sérologie.

Le traitement de choix est la balnéation des cavités nasales et des sinus frontaux par un dérivé azolé pendant une heure (énilconazole 10mg/kg ou clotrinazole 1g/animal). Le taux de

réussite de ce traitement local est de 80% mais un renouvellement est parfois nécessaire 3 à 4 semaines après en cas de rechute.

En cas d'aspergillose invasive, le traitement local doit être complété d'un traitement antifongique systémique.

b. Aspergillose de la poche gutturale chez le cheval

Cette affection, qui implique surtout *A. nidulans* et *A. fumigatus*, s'acquiert par contamination oropharyngée pendant l'expiration et la déglutition.

Elle se manifeste par des ronflements, un jetage mucopurulent, de l'épistaxis unilatéral et intermittent non déclenché par l'effort et une douleur à la palpation parotidienne.

Il y a atteinte possible des artères, notamment de l'artère carotide, des veines et des nerfs qui traversent la poche d'où des hémorragies et des troubles neurologiques (dysphagie, paralysie laryngée, syndrome de Horner).

Notons que, dans de rares cas, les chevaux peuvent également être atteints d'aspergillose pulmonaire.

Les conditions environnementales qui favorisent la germination des conidies (humidité, mauvaise ventilation et température élevée dans le box) et les traumatismes des tissus mous sont des facteurs de prédisposition.

Le diagnostic se fait grâce à des examens de laboratoire (histologie, cytologie, culture mycologique) et à l'imagerie médicale (endoscopie, radiologie). Par ailleurs, l'angiographie peut être utile pour repérer les artères lésées.

Dans le cas particulier de l'aspergillose de la poche gutturale des équidés, le traitement est avant tout chirurgical. En effet, seule la chirurgie est en mesure d'arrêter puis de prévenir durablement les graves hémorragies dues aux lésions artérielles. Le principe est de ligaturer la (ou les) artère(s) dont la paroi est fragilisée par le développement de la plaque fongique. Le traitement chirurgical est suffisant pour assurer la guérison des animaux avec régression spontanée et rapide (en quelques semaines) des lésions fongiques. La ligature (permanente ou temporaire) de l'artère carotide commune peut être réalisée en urgence (pour juguler une hémorragie) ou sur des animaux de faible valeur économique. Lorsque le compartiment

médial est atteint, la ligature de l'artère carotide interne est nécessaire.

c. Avortements chez les bovins

Chez les bovins, l'aspergillose provoque des avortements sporadiques au cours du deuxième ou du dernier tiers de gestation. Cette affection ne compromet pas la fertilité de la vache et que le *fœtus* n'est pas systématiquement atteint.

Les cas d'aspergilloses chez les bovins s'observent surtout en hiver quand les animaux sont dans les bâtiments et si l'ensilage est contaminé. En effet, la contamination se fait surtout par ingestion.

On décrit également des cas d'aspergillose pulmonaire, des mammites aspergillaires et des formes disséminées (notamment chez le veau).

d. Aspergillose chez les oiseaux

L'aspergillose pulmonaire des oiseaux est aussi appelée aspergillose broncho-pulmonaire, pneumomycose aspergillaire, ou bronchomycose.

La voie de contamination est aérienne et l'appareil respiratoire profond est le site de développement privilégié du champignon.

Les aspergilloses aviaires sont majoritairement dues à *A. fumigatus*. L'espèce *A. flavus* est la deuxième cause d'aspergillose aviaire.

Les signes cliniques sont bien souvent non spécifiques (léthargie, inappétence, anorexie) ou peuvent être liés plus directement à l'atteinte de l'appareil respiratoire (dyspnée, rhinite, modification de la voix).

Les organes cibles sont principalement les poumons et les sacs aériens.

Le diagnostic se fait au moyen d'analyses hématologiques, cytologiques, histologiques, par cultures mycologiques, et par l'imagerie médicale (radiologie et tomographie).

3. Modèles expérimentaux d'aspergillose

Les modèles animaux sont utilisés pour étudier différents aspects de la pathogénie des maladies (physiopathologie de la maladie et réponse immunitaire innée et acquise de l'hôte), pour valider de nouveaux tests de dépistage et pour évaluer l'efficacité de protocoles prophylactiques ou thérapeutiques (31).

L'objectif ultime de ces études étant de diminuer l'incidence des maladies en améliorant la prévention, le diagnostic et le traitement de celles-ci.

Le modèle choisi doit recréer le plus fidèlement possible la maladie. Il doit être reproductible et établi selon un protocole standardisé et économique. Il doit garantir l'obtention d'un certain nombre de paramètres quantifiables (7).

Plusieurs modèles animaux d'aspergillose ont été développés ces dernières années du fait de l'augmentation de l'incidence de cette infection opportuniste chez les patients immunodéprimés.

Le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) et le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) ont notamment été utilisés mais le rat gris (*Rattus norvegicus*) et la souris (*Mus musculus*) sont les modèles les plus utilisés pour étudier l'aspergillose pulmonaire invasive de l'Homme.

Il n'y a aucun modèle d'aspergillose invasive universellement reconnu. Les modèles varient en fonction de l'animal (l'espèce, le poids, l'âge, le sexe, le statut immunitaire) et les protocoles d'inoculations (différentes voies et différentes concentrations de conidies infectantes).

Les voies d'inoculation les plus fréquemment utilisées sont les voies intranasale et intratrachéale. Mais c'est avec les modèles obtenus par inhalation que les lésions induites sur les souris ressemblent le plus à ce qui est observé lors d'autopsie de patients morts d'aspergillose invasive.

Les mammifères doivent souvent être immunodéprimés (par injection de corticoïdes par exemple) avant le début des expérimentations.

Les oiseaux présentent des caractéristiques anatomiques et physiologiques uniques qui obligent à mettre en place des modèles aviaires.

Ces modèles sont de plus en plus nombreux du fait de l'impact économique de l'aspergillose

aviaire en élevage et de l'importance du cheptel de dindes en France.

Comme pour les mammifères, les modèles utilisés ont été développés à chaque fois pour une seule étude si bien que les résultats des différentes manipulations expérimentales ne peuvent être que difficilement comparés.

La poule (*Gallus gallus*) (29, 38), la caille (*Coturnix chinensis*), la dinde (*Meleagris gallopavo*) (18, 19, 20, 32, 34, 35) et plus rarement le pigeon (*Columba livia*) (42), le canard (*Anas* sp.) (13) et l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) (2) ont été utilisés.

Les *inocula* habituellement utilisés varient de 10^7 à 10^8 conidies par kilogramme de poids vif (14, 18, 20).

Les différentes voies d'inoculations testées chez les oiseaux sont la voie aérienne (génération d'un aérosol) (29, 34, 35, 38) la voie intra-trachéale (13), la voie intra-sac aérien (18, 19, 20, 24, 26) et la voie intraveineuse (2, 19).

Le principal inconvénient des modèles *in vivo* est la réponse très variable d'un animal à l'autre pour une même dose d'où la nécessité d'utiliser un grand nombre d'animaux ou des lignées génétiquement caractérisées.

II. Aspergillose aviaire

A. Importance de l'aspergillose aviaire en élevage

L'aspergillose est une affection fréquente et grave en élevage de volailles, elle demeure une cause majeure de morbidité et de mortalité chez de nombreuses espèces d'oiseaux (1, 21).

Les pertes économiques qui en découlent sont importantes et dans les élevages de dindes, l'aspergillose est rendue responsable de 5 à 10% de la mortalité chez les oiseaux les plus jeunes (34).

Il n'existe pas de traitement pour les oiseaux d'élevage ; il s'en suit une forte mortalité et les survivants feront le plus souvent l'objet de saisies totales ou partielles à l'abattoir (non valeurs économiques, lésions sérofibrineuses de l'appareil respiratoire).

B. Epidémiologie

Parmi les espèces responsables d'aspergillose chez les oiseaux, la plus communément isolée est *A. fumigatus*. Plus rarement, *A. flavus* et *A. niger* peuvent être en cause. Enfin Jones et Orosz (15) mentionnent *A. nidulans* et *A. terreus*.

1. Sources

En élevage, les conidies d'*Aspergillus* peuvent provenir de litières moisies (paille de céréales, copeaux), ou d'aliments mal conservés (maïs, blé).

Jusqu'à 4.10^6 conidies d'*A. fumigatus* par gramme de paille moisie ont pu être dénombrées dans des élevages de dindes atteintes d'aspergillose.

Une diminution de la poussière dans le logement des volailles et une amélioration de la ventilation permet de réduire de 75 % l'incidence des maladies fongiques (5).

2. Modes d'infection

L'infection se fait principalement par inhalation, mais les spores peuvent également être ingérées.

Un passage par la coquille des oeufs (par les pores et les éventuelles fissures) est également décrit.

3. Particularités des oiseaux expliquant leur grande réceptivité et sensibilité

La réceptivité particulière aux aspergilloses peut s'expliquer par les caractéristiques anatomiques et physiologiques de l'appareil respiratoire des oiseaux (39).

En effet, ils ne possèdent pas d'épiglotte qui limite l'entrée des particules dans l'appareil respiratoire inférieur des mammifères.

Ils ne possèdent pas non plus de diaphragme qui autorise un fort réflexe de toux et disposent d'un plus faible nombre de cellules ciliées qui constituent l'escalator mucociliaire. Pour ces raisons les oiseaux évacuent moins efficacement les particules inhalées que les mammifères.

Par ailleurs, les défenses immunitaires innées (macrophages résidents) susceptibles de protéger le tractus respiratoire des oiseaux sont moins présentes que dans les alvéoles des poumons de mammifères.

De plus, la faculté de voler, implique que les oiseaux ont des besoins en dioxygène très importants. De ce fait, on enregistre une efficacité des échanges gazeux au niveau du parenchyme pulmonaire des oiseaux dix fois supérieure à celle constatée chez les mammifères (28, 39). En effet, les capillaires aériens des oiseaux sont plus fins et plus nombreux que les alvéoles des mammifères car le poumon des oiseaux est fixé au squelette, il y a donc moins de tissus interstitiels pour le maintenir. De même, comme les poumons ne jouent pas de rôle direct dans la ventilation du tractus respiratoire, cela augmente de 20 % sa surface d'échange par rapport aux mammifères (à poids vif équivalent).

Enfin, dans les poumons des oiseaux, les échanges d'O₂ et de CO₂ entre l'air et le sang sont optimisés. L'air présent dans les parabronches et le sang des capillaires circulent en sens

opposé. Ce système d'échange à contre-courant très efficace dans la mesure où un gradient de pression en O₂ et en CO₂ est maintenu en permanence.

L'ensemble de ces particularités induisent une grande efficacité de l'appareil respiratoire et donc une plus grande sensibilité vis-à-vis de l'inhalation d'agents toxiques ou infectieux.

Enfin, la présence de sacs aériens en connexion avec les poumons, permettant la circulation de l'air dans le tractus respiratoire, et la température corporelle élevée (38-45°C selon les espèces) créent un micro-environnement bien oxygéné et chaud favorable à la germination des conidies. De plus, les oiseaux sont particulièrement sensible à la gliotoxine qui provoque chez eux une nécrose des tissus ce qui libère localement des substrats nutritifs favorisant le développement du champignon (39).

4. Réceptivité et sensibilité en fonction de l'espèce aviaire

Toutes les espèces d'oiseaux peuvent *a priori* développer une aspergillose mais il existe une réceptivité et une sensibilité variable en fonction des espèces (11).

Parmi les oiseaux sauvages et de compagnies, certaines familles sont plus particulièrement touchées: les Accipitridés (aigles, buses), les Alcidés (guillemots, pingouins), les Anatidés (canards, cygnes, oies), les Psittacidés (perroquets, perruches), les Sphéniscidés (manchots), les Sturnidés (étourneaux, mainates) (6, 15, 32).

La sensibilité peut même varier au sein d'une espèce par exemple entre différentes lignées génétiques de poulets (26).

En captivité, les oiseaux sauvages développent davantage l'aspergillose que lorsqu'ils évoluent en liberté puisqu'ils sont stressés hors de leur environnement naturel (dans un milieu confiné avec une litière et une alimentation qui n'est pas toujours adaptée). C'est le cas par exemple, des manchots captifs, des Psittacidés dans les pays froids et des autruches en élevage. Les rapaces quant à eux sont chroniquement stressés en captivité.

C. Signes cliniques

1. Symptômes

L'aspergillose est une maladie polymorphe mais le plus souvent à localisation respiratoire. Les symptômes sont variables suivant l'âge auquel survient l'infection (6).

Les œufs atteints renferment un mycélium présentant de nombreuses « têtes aspergillaires » surtout au niveau de la chambre à air et des membranes coquillères, plus rarement sur le vitellus et l'embryon. Des plages brunes sont observables lors du mirage de l'œuf.

Il peut en découler une mortalité en coquille ou une aspergillose du jeune poussin appelée « pneumonie des couveuses » dès les premières heures de vie suite à une infection *in ovo* ou plus souvent à partir des conidies massivement dispersées en poussières noirâtres au moment de l'éclosion. Les symptômes sont multiples et traduisent une septicémie.

La prévalence de l'aspergillose des œufs diminue dans les pays industrialisés puisque les œufs endommagés sont systématiquement éliminés.

L'aspergillose peut apparaître lorsque les conditions d'hygiène et d'élevage sont mauvaises causant ainsi l'inhalation d'une grande quantité de spores qui dépasse les capacités de réponse du système immunitaire qui est encore faible chez les jeunes poussins.

Les jeunes oiseaux présentent surtout une forme aiguë d'aspergillose. Celle-ci est également décrite chez les adultes d'espèces sauvages et chez le dindon reproducteur (animal de grande taille, avec une forte exigence respiratoire et qui s'épuise lors des collectes de sperme pour insémination artificielle).

Cette forme de la maladie se présente sous l'aspect de troubles respiratoires principalement : dyspnée (bec entrouvert, « bâillements », cou tendu) et efforts respiratoires accrus. Des signes généraux sont toujours associés : un abattement, une perte de poids, une anorexie, un état fébrile. Les oiseaux sont « en boule », ébouriffés (érection du duvet), tête basse, et yeux clos. Des manifestations digestives (diarrhée blanchâtre, vomissement, stase du jabot, polyurie-polydipsie, ascite) et des troubles nerveux (convulsion, état sub-comateux) ou oculaires sont aussi possibles.

L'oiseau peut ne présenter qu'un seul de ces signes voire mourir brutalement sans signe

précurseur.

La mortalité est très élevée (70 à 90 % des effectifs) et rapide (24-48 heures) et le développement des survivants est hétérogène aboutissant généralement à des non-valeurs économiques.

Cette forme d'aspergillose, souvent d'aspect épizootique a de graves conséquences économiques.

Notons que chez les poussins un peu plus âgés (à 2-3 semaines), les signes respiratoires et digestifs sont un peu atténués. Des troubles ostéo-articulaires (déformations, boiteries) peuvent éventuellement apparaître. La mort survient généralement en 1 à 2 semaines.

Les adultes sont plutôt atteints par une forme chronique d'aspergillose. La maladie a une allure sporadique.

Elle se développe suite à l'exposition à une source de spores aspergillaires chez des oiseaux dont le système immunitaire est déprimé et qui ne peut donc pas contenir l'infection (35).

Les principales manifestations cliniques sont des troubles respiratoires associés à un amaigrissement qui provoque une saisie quasi-automatique des carcasses à l'abattoir.

La mort est possible, en l'absence de traitement elle survient en quelques semaines à quelques mois. L'expression clinique est toutefois très variable d'une espèce à l'autre et d'un individu à l'autre.

Il existe des formes focales qui touchent les cavités nasales, la trachée ou la syrinx, et des formes généralisées qui touchent les poumons et les sacs aériens avec une extension des lésions aux autres organes.

Les signes respiratoires, fréquents et divers apparaissent souvent tardivement et sont parfois absents.

On peut observer une dyspnée se manifestant par une respiration bec ouvert, des battements rythmiques de la queue, une augmentation de l'amplitude des mouvements du bréchet ou des ailes tombantes et écartées du corps, un jetage oculo-nasal, une hémoptysie, de la toux, une modification des bruits respiratoires (grincement, sifflement), une modification voire une disparition de la voix, une intolérance à l'effort, une cyanose (23).

Les signes généraux associés incluent anorexie avec perte de poids, léthargie, dépression, cachexie et anémie.

Des signes digestifs sont observés régulièrement avec vomissements ou régurgitations,

diarrhée, ascite et hépatomégalie. Enfin, la biliverdinurie est un symptôme rénal très fréquent ainsi que la polyurie-polydipsie.

Occasionnellement, l'aspergillose peut se manifester par des parésies, paralysie ou boiteries unilatérales ou bilatérales survenant suite à des compressions du plexus lombo-sacré par des granulomes aspergillaires.

En fin d'évolution peuvent aussi apparaître des signes nerveux centraux : ataxie, torticolis, chutes des perchoirs, opisthotonos, convulsions, ...

En fonction de la localisation des lésions occasionnées par le champignon, des formes rares peuvent se traduire par, des conjonctivites, des kératites, des uvéites, des ostéomyélites, et des dermatites aspergillaires.

2. Lésions

a. Aspect macroscopique

Lors d'aspergillose chronique, l'appareil respiratoire est presque toujours atteint, soit dans sa totalité soit partiellement.

On observe très souvent une pneumonie et une aérosacculite surtout des sacs aériens thoraciques postérieurs et abdominaux.

D'autres organes peuvent être atteints comme le tube digestif, le foie, les reins, le système nerveux, les yeux, le squelette ou la cavité générale.

L'aspect des lésions est quasiment le même quel que soit l'organe atteint.

Il s'agit généralement de granulomes ou de plaques mycosiques de couleur blanc-crème, caséux et friables, à centre parfois nécrotique et non encapsulé avec éventuellement un « gazon mycélien » verdâtre constitué d'un enchevêtrement d'hyphes ayant sporulé.

Lorsque les muqueuses sont atteintes, on observe un épaissement inflammatoire de celles-ci associé à un exsudat séro-fibrineux verdâtre (18, 10, 26).

Les lésions les plus fréquentes, définies par l'étude de 45 oiseaux sont par ordre décroissant : pneumonie granulomateuse (66%), aérosacculite (53%), bronchopneumonie (37%), mycétomes trachéobronchiques (20%), nécrose aigüe et thrombose (17%) (3).

b. Aspect microscopique

L'examen microscopique des granulomes montre en général un centre nécrotique entouré par des macrophages, des granulocytes hétérophiles et des cellules géantes multinucléées. Lorsque les lames sont colorées avec des colorations spéciales on observe la présence d'hyphes et de conidies dans la partie centrale des granulomes hétérophiliques. Ces éléments fongiques sont plus ou moins dégradés en fonction du stade de développement de l'infection (18, 10, 26).

Microscopiquement, l'épaississement des muqueuses est expliqué par un œdème, une congestion et d'un infiltrat constitué des mêmes cellules inflammatoires et d'éléments fongiques.

D. Déterminisme de la localisation des lésions de l'appareil respiratoire

La connaissance de l'organisation de l'appareil respiratoire des oiseaux et de leur physiologie respiratoire permet de comprendre la répartition des lésions dans l'appareil respiratoire (28, 39).

Les poumons des oiseaux sont plus petits proportionnellement que ceux des mammifères, ils sont rigides et ne changent pas de volume lors du cycle respiratoire.

Ainsi, ce sont les sacs aériens qui assurent 80 % de la ventilation ; ils jouent le rôle de soufflet et créent un flux d'air unidirectionnel à travers les parabronches du parenchyme pulmonaire.

Les sacs aériens sont connectés aux bronches secondaires. À l'intérieur des poumons, ces dernières se divisent en une multitude de petits conduits parallèles entre eux, les parabronches paléopulmonaires. Celles-ci présentent des invaginations, les atria qui forment un labyrinthe de microscopiques capillaires aériens (8 à 13 μm de diamètre), en étroite continuité avec de fins capillaires sanguins : ils constituent la surface d'échange respiratoire.

Au moment de l'inspiration, l'air entre par les narines et passe par les choanes et la fente

palatine avant d'aller vers la glotte. L'air suit la trachée puis pénètre dans les deux bronches primaires au niveau de la syrinx. La majorité de l'air inspiré (figure 4) passe ensuite directement dans les sacs pulmonaires postérieurs (thoracique caudaux et abdominaux). Par ailleurs, l'air que contenait les poumons passe dans les sacs aériens antérieurs (l'interclaviculaire, les cervicaux et les thoraciques craniaux).

A l'expiration l'air pénètre dans les deux poumons chacun en continuité avec un sac postérieur. La majeure partie de l'air passe alors par les parabronches. Par ailleurs, l'air est chassé des sacs antérieurs et est évacué en passant par la bronche secondaire médioventrale puis par la bronche primaire et enfin se dirige vers la trachée.

Il faut ainsi deux cycles respiratoires complets pour renouveler la totalité de l'air présent dans l'appareil respiratoire.

Figure 3 : anatomie de l'appareil respiratoire des oiseaux (modifié d'après Fedde, 1998).

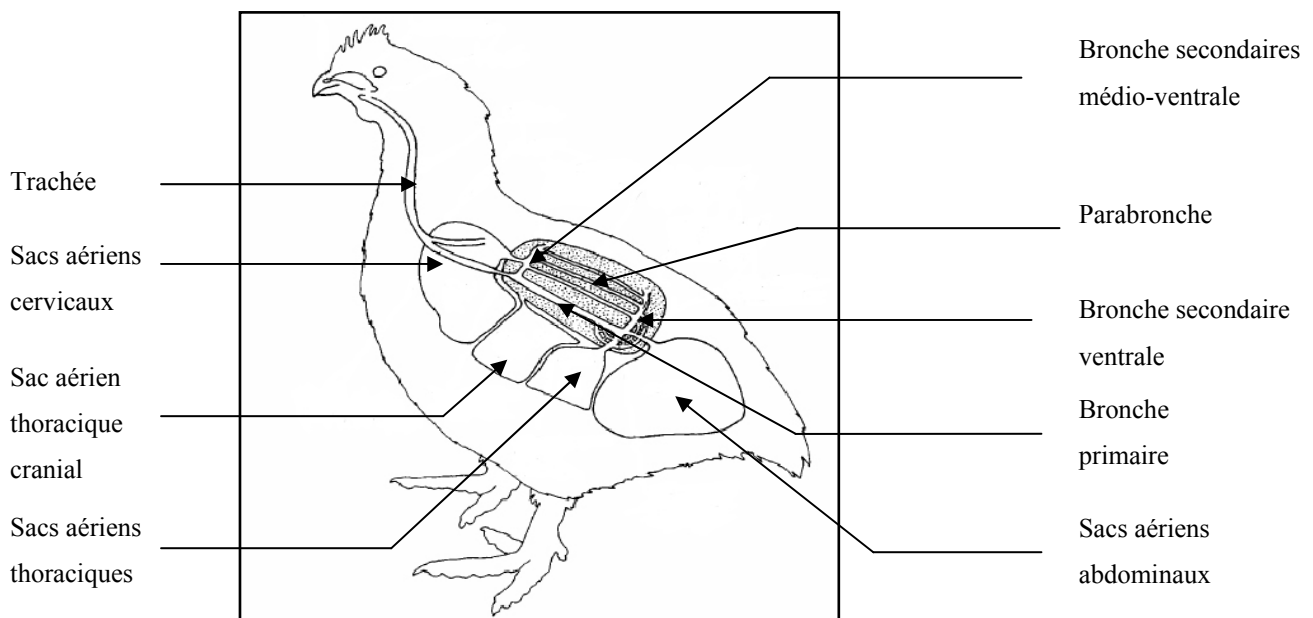
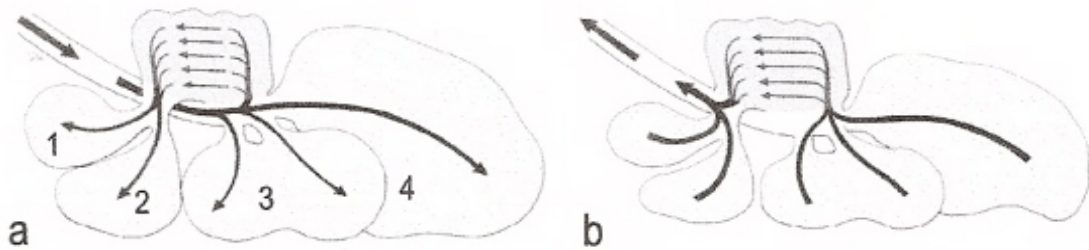


Figure 4 : trajet de l'air dans l'appareil respiratoire des oiseaux en inspiration (a) et en expiration (b)
(Reese *et al.* 2006).



1 : Sac aérien interclaviculaire 2 : Sac aérien cervicaux 3 : Sacs aériens thoraciques cranial et caudal 4 : Sac aérien abdominal

Ces mouvements d'air sont dus aux différences de pression dans l'appareil respiratoire. Pendant l'inspiration, sous l'action des muscles inspiratoires, il y a une augmentation du volume des sacs antérieurs et postérieurs car le sternum s'avance et s'abaisse et que les vertèbres se décalent crânialement d'où une diminution de pression qui entraîne une entrée d'air dans les sacs.

Au contraire, pendant l'expiration les cavités thoracique et abdominale reprennent leur taille initiale d'où une augmentation de la pression de l'air dans les sacs. L'air est donc chassé des sacs postérieurs vers les poumons et des sacs antérieurs vers la trachée.

Le flux de l'air est unidirectionnel que ce soit pendant l'inspiration ou l'expiration. Ainsi l'air qui arrive au niveau des poumons pendant l'intégralité du cycle respiratoire est riche en O_2 , il n'y a pas de mélange avec l'air vicié.

Le système respiratoire supérieur est bien conçu pour chauffer, humidifier et filtrer l'air inspiré. Il possède des mécanismes protecteurs contre l'inhalation de particules étrangères.

La première barrière est constituée par la couche de mucus qui recouvre les cellules épithéliales ciliées de la muqueuse nasale. Les particules inhalées de gros diamètres ($4\ \mu m$) peuvent s'y trouver piégées et sont ainsi dirigées vers le pharynx à la vitesse de 10 mm/min. Elles sont ensuite dégluties et éliminées dans les fèces.

La trachée, les bronches primaires et les racines des bronches secondaires sont également couvertes de cellules épithéliales ciliées. Les cils semblent diriger la couche de mucus en direction de la bouche. Les conidies d'*A. fumigatus* qui ne mesurent que 2,5 à 3 microns

parviennent aux sacs aériens postérieurs en échappant dans une large proportion à cette barrière physique.

Toutefois il est possible de provoquer l'afflux des macrophages dans les parabronches par injection de substances étrangères. Ainsi, les petites particules qui entrent dans les parabronches semblent être phagocytées par les cellules épithéliales. Ces particules peuvent ensuite passer dans le milieu interstitiel et être transportées par des macrophages interstitiels dans le reste de l'organisme.

Ainsi les sacs postérieurs sont plus sensibles aux infections respiratoires que les sacs antérieurs car, l'air dont le trajet est unidirectionnel, passe toujours préalablement par les parabronches où une première filtration peut avoir lieu avant d'atteindre les sacs antérieurs.

L'aspergillose est également favorisée par le fait que l'air qui arrive aux sacs aériens caudaux est riche en O₂, réchauffé et humidifié.

E. Diagnostic

Le diagnostic de l'aspergillose peut s'avérer difficile. Ce diagnostic résulte d'informations recueillies au cours de l'examen clinique, des analyses biochimiques, hématologiques et microbiologiques et de l'imagerie médicale (radiographie, endoscopie et laparoscopie) (15, 23).

1. Examen clinique

Il est toujours difficile (voire impossible) de diagnostiquer avec certitude une aspergillose chez un oiseau uniquement à partir des signes cliniques observés. En effet la variété et le peu de spécificité des signes cliniques ne peuvent conduire qu'à une suspicion. Dans de rares cas, certains signes comme une modification de voix (atteinte de la syrinx) seront cependant très évocateurs.

On peut soupçonner une aspergillose clinique lorsque le contexte épidémiologique (anamnèse) est évocateur. Par exemple, des conditions environnementales favorisant chez une espèce sensible qui a subi un stress ou qui est sous traitement aux corticoïdes.

Un oiseau dont l'état de santé se détériore malgré la mise en place d'une antibiothérapie peut

également être suspecté d'aspergillose.

Dans les cas où le patient présente des signes cliniques très peu spécifiques comme un amaigrissement, un abattement et même dans certains cas en l'absence de symptômes il faut quand même suspecter une aspergillose si l'environnement et l'historique du cas sont très en faveur de cette hypothèse diagnostique.

2. Analyse hématologique

Lors d'aspergillose on peut observer une leucocytose importante (supérieure à 20.000 cellules/ μ L) due à une granulocytose hétérophilique, ceci de manière précoce c'est-à-dire avant l'apparition de tout signe clinique.

Il est également possible de constater une monocytose, une lymphopénie, et une anémie non régénérative (moins de 20 000 globules rouges/ μ L) en cas d'aspergillose chronique, et une modification de la morphologie des hématocytes dans les formes sévères.

3. Analyse biochimique

L'intérêt de cet examen complémentaire est de mettre en évidence une hyperprotéïnémie que l'on observe en cas d'aspergillose chronique surtout. C'est la sollicitation du système immunitaire qui provoque une augmentation des globulines sériques à l'origine de l'hyperprotéïnémie.

Notons également que les sacs aériens étant proches de nombreux organes et notamment du foie, l'élévation de paramètres tels que l'ASAT (aspartate aminotransférase) et les acides biliaires peuvent indiquer un dysfonctionnement hépatique du fait de l'aspergillose.

De même, l'élévation du taux de créatine kinase peut être observée suite à la fonte musculaire lors d'atteinte chronique.

4. Analyse cytologique et histologique

Il est possible de pratiquer une analyse cytologique sur des d'échantillons obtenus à partir de l'appareil respiratoire (lavage des sacs aériens et trachéaux, ponction sinusale).

Cet examen peut donner un diagnostic définitif si beaucoup d'hétérophiles, de macrophages et de cellules géantes multi-nucléées sont associés à des éléments fongiques.

En histologie, les colorations spéciales (PAS, Grocott) permettent de mettre en évidence les éléments fongiques. La présence d'hyphes apporte une preuve de la mycose (à partir d'une biopsie par endoscopie).

5. Analyse sérologique

Il existe différentes méthodes sérologiques utilisés pour le diagnostic de l'aspergillose aviaire mais dont les résultats sont à interpréter parallèlement à la clinique et aux autres tests diagnostics.

Il est possible de détecter les anticorps et/ou les antigènes sériques.

De nombreuses techniques de détection des anticorps anti-*Aspergillus* ont été testées chez les oiseaux. Les deux techniques les plus utilisées sont l'immunodiffusion double d'Ouchterlony et l'électrosynérèse qui sont des techniques simples, peu coûteuses, et dont la sensibilité et la spécificité sont satisfaisantes. Les techniques ELISA sont également utilisées car elles sont plus sensibles et permettent la détection de faibles taux d'anticorps et ceci de manière plus précoce.

Il n'existe pas actuellement de sérologies antigènes développées et utilisées spécifiquement pour les oiseaux et les seules études réalisées concernent des tests employés habituellement en médecine humaine pour le diagnostic de l'API.

Par exemple, il est possible de faire un dosage du galactomannane sérique par ELISA Platelia® *Aspergillus* pour le diagnostic de la maladie chez les oiseaux. Suivant les études, la sensibilité du test chez l'homme varie de 29 à 100 % selon la forme de la maladie étudiée : la sensibilité du test dépasse 90 % quand il est utilisé chez des patients immunodéprimés alors qu'elle reste médiocre lorsque sont étudiées des aspergilloses chroniques granulomateuses (23).

6. Culture et observation directe des têtes aspergillaires

Il est également intéressant de faire une culture mycologique sur milieu de Sabouraud complémenté en chloramphénicol à partir d'un prélèvement (écouvillonnage profond de la trachée ou biopsie). On incube la gélose à 37°C pendant 48 heures.

Pour avoir un diagnostic de l'espèce fongique, il faut procéder à une observation directe du champignon en ajoutant du bleu de lactophénol.

Notons que si un *Aspergillus* pousse; cela ne suffit pas pour affirmer que l'animal est atteint d'aspergillose car les *Aspergillus* sont omniprésents dans l'environnement.

7. Radiologie

C'est un outil utile pour le diagnostic de l'aspergillose et pour le suivi de la maladie ou de la réponse au traitement mis en place. Cependant, il y a peu de signes radiographiques dans les stades précoces donc quand ils sont présents, le pronostic est souvent mauvais.

Ces signes radiographiques peuvent être : une mauvaise définition ou une asymétrie des sacs aériens, une légère opacité focale de la trachée, de l'oropharynx, des sinus, de la syrinx, des poumons, des sacs aériens, une hépatomégalie et une néphromégalie.

8. Endoscopie

Si des lésions typiques d'aspergillose sont observées cela permet de poser un diagnostic de certitude. Lors de cet examen, il est également possible de réaliser des biopsies. En cours de traitement, il permet de juger de l'évolution de la maladie.

De nombreux auteurs considèrent cet examen complémentaire comme indispensable et à pratiquer systématiquement lors de suspicion d'aspergillose.

En pratique, peu de vétérinaires disposent de l'équipement adéquat et il est parfois difficile d'anesthésier un oiseau qui souffre de troubles respiratoires.

F. Moyens de lutte

1. Traitement

Le traitement de l'aspergillose aviaire est souvent très difficile (voire impossible), compte tenu du délai nécessaire pour le diagnostic, du faible nombre d'antifongiques disponibles pour les oiseaux et de leur efficacité limitée sur les formes évoluées de la maladie (23, 39).

Pour des oiseaux de volière, de parcs zoologiques ou de centres de sauvegarde, le traitement est difficile mais envisageable (25).

Des essais thérapeutiques ont combiné l'administration d'antifongiques systémiques (itraconazole, terbinafine, fluconazole, voire voriconazole...) et d'aérosols (amphotéricine B, énilconazole, clotrimazole).

En élevage, le traitement des oiseaux infectés semble illusoire et seule une prévention sanitaire est envisageable.

Au cours d'un épisode d'aspergillose sévère en élevage, la réduction de la quantité de spores par désinfection des litières au sulfate de cuivre a entraîné une diminution de la mortalité (8). L'iodure de potassium à 2 % dans l'eau de boisson pendant 10 jours est un traitement ancien potentiellement toxique mais peu coûteux et donc parfois utile sur des bandes nombreuses. (6).

En France, un traitement par nébulisation d'une solution d'énilconazole est parfois pratiqué dans des élevages de dindes. Ce traitement semble bien toléré mais n'a pas fait l'objet d'une validation complète.

2. Prophylaxie en élevage (17)

La majeure partie des mesures prophylactiques repose sur la prévention sanitaire qui consiste à diminuer la pression parasitaire et à réduire au maximum les risques d'exposition des oiseaux.

Lors d'aspergillose clinique, il faut éliminer les malades, la litière et les aliments moisiss et détruire les cadavres.

Des mesures d'hygiène doivent être prises à toutes les étapes de l'élevage, depuis le stade « œuf » dans les bâtiments de reproduction et dans les couvoirs (avec une importance particulière pendant les périodes d'incubation et d'éclosion) jusqu'à l'arrivée des poussins dans les bâtiments d'élevage.

Il faut nettoyer et désinfecter les bâtiments et le matériel d'élevage entre chaque bande. Le nettoyage doit être réalisé avec de l'eau sous pression pour éliminer la poussière. Cette eau doit être très chaude ou froide car des températures entre 30 et 45°C favorisent le développement de moisissures. La désinfection peut se faire avec du formol gazeux, du sulfate de cuivre, du thiabendazole en fumigène (Fungitec® ou Mycofax®), ou de l'énilconazole en fumigène (Clinafarm®), deux antifongiques actifs vis-à-vis des conidies aspergillaires.

Notons qu'une désinfection mal conduite est pire que de ne rien faire du tout car les matières organiques résiduelles neutralisent le désinfectant et l'humidité persistante permet la multiplication bactérienne, le développement des moisissures et d'autres parasites.

Il faut suffisamment de pondoirs pour minimiser la ponte au sol et le cas échéant ne pas mélanger les œufs pondus au sol et dans les nids. Il faut nettoyer et désinfecter les nids, rechercher systématiquement toute moisissure au couvoir et éliminer les œufs fêlés (6, 17).

L'utilisation d'aliments et/ou de litières moisies doit être proscrite. Lorsque cela est possible, il est conseillé de déplacer régulièrement les distributeurs de nourriture et les abreuvoirs car les champignons poussent facilement autour de ces dispositifs. Si ce n'est pas possible, il est conseillé de désinfecter le sol autour des distributeurs de nourriture et des abreuvoirs, de traiter les zones humides en apportant de la litière fraîche (17).

Dyar *et al.* (1984) montrent que le traitement par le sulfate de cuivre et la nystatine diminue la quantité de champignons dans la litière et la mortalité des dindes due à l'aspergillose. Par ailleurs, il a été montré que le traitement par du thiabendazole d'une litière de copeaux de chêne vert a permis de diminuer la quantité de spores présentes et de diminuer les lésions pulmonaires d'aspergillose chez les dindes élevées sur cette litière. Il est également possible d'assécher les litières avec l'épandage de 20 g/m² de superphosphate par jour.

Par ailleurs, il faut aérer les locaux pour diminuer la concentration de conidies dans l'air. L'hygrométrie relative des locaux doit être inférieure à 70 %.

Des appareils de prélèvements d'air sont utilisés pour contrôler la qualité de l'air en matière

de contamination fongique.

Il est également très important de réduire les facteurs de stress des oiseaux car le stress est une cause majeure de prédisposition à l'aspergillose.

Il est possible de faire des contrôles sérologiques anticorps par ELISA et de faire un traitement prophylactique médical si le seuil de positivité du test est dépassé (23).

Le traitement prophylactique utilise soit de la 5-fluorocytosine (50-60 mg/kg 2 fois par jour pendant deux semaines) ou de l'itraconazole (10 mg/kg par jour pendant 10 jours).

Ce traitement peut également être utilisé chez des animaux blessés, victimes de marées noires ou ayant subi un stress important, chez les jeunes oiseaux et chez les oiseaux sauvages en captivité (32).

La vaccination pourrait être efficace pour réduire l'aspergillose chez des espèces sensibles telles que les manchots en captivité et les oiseaux marins.

Enfin, des essais de vaccination de dindons à partir d'injections sous-cutanées de suspensions de conidies en germination mais inactivées par le formol ont donné quelques résultats.

PARTIE EXPERIMENTALE

Etude des stades précoces du développement d'*A. fumigatus* chez le poussin.

I. Contexte et objectifs scientifiques de l'étude

Différents modèles d'aspergillose aviaire ont déjà été utilisés au cours d'études ayant pour objectif de développer ou de perfectionner les méthodes de diagnostic, de traitement ou de vaccination.

Ces modèles varient en fonction de l'espèce utilisée, du mode d'inoculation et de la concentration de l'*inoculum* (voir I.C.3).

Ces études ont montré que la sensibilité de l'hôte, comme le niveau d'exposition, jouent un rôle important dans le développement de l'infection.

Par contre, jusqu'à présent, aucun facteur de virulence déterminant (qui permettrait de distinguer des souches virulentes et avirulentes) n'a été mis en évidence chez des isolats d'*A. fumigatus* provenant de cas cliniques d'aspergillose, chez l'Homme comme chez les oiseaux (22).

D'autres travaux réalisés au sein de l'équipe 892 de l'UMR BIPAR ces dernières années ont permis de définir des biomarqueurs de l'infection chez la dinde (24). Ils ont également montré que des lignées de poulets pouvaient présenter une sensibilité différente vis-à-vis de l'aspergillose (26).

Cependant, les premières étapes du développement d'*A. fumigatus* demeurent largement méconnues, bien que déterminantes dans le développement ultérieur de l'infection.

Que deviennent les conidies inoculées dans un sac aérien ? Comment et dans quel délai l'agent pathogène atteint-il d'autres organes ?

Les biomarqueurs de l'infection évoluent-ils différemment lorsque l'animal reçoit une ou plusieurs doses de conidies infectantes ?

Si un animal reçoit un *inoculum* à deux reprises, les biomarqueurs de l'infection évoluent-ils différemment selon que l'animal reçoit des souches génétiquement identiques ou pas (infection répétée / co-infection séquentielle) ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé un modèle d'infection expérimentale chez le poulet.

Le choix de cette espèce animale réside dans le fait qu'il existe des poulets de statut microbiologique EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiques), des lignées génétiques diversifiées et plus d'outils moléculaires applicables à cette espèce (kits ELISA, anticorps monoclonaux...) que chez la dinde.

Par ailleurs, les poulets ont une vitesse de croissance compatible avec l'hébergement et l'entretien prolongé d'un plus grand nombre d'animaux que les dindes par ailleurs plus difficiles à obtenir.

En élevage, les animaux sont exposés de manière répétée à des aérosols polymicrobiens, variables aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif. On a donc cherché au cours de cette étude à mettre en place un protocole permettant de reproduire au mieux l'infection telle qu'elle se produit en élevage.

D'autre part, nous avons utilisé des souches d'*A. fumigatus* génétiquement modifiées pour exprimer intrinsèquement une fluorescence verte ou rouge.

L'imagerie dynamique qui fait référence à un éventail de technologies clefs utilisant les propriétés de la lumière (particulièrement la fluorescence et la bioluminescence) occupe une place centrale dans la recherche actuelle. Elle est de plus en plus utilisée pour comprendre les processus biologiques au niveau des cellules ou des tissus et leur modification au cours de l'infection.

Ces souches fluorescentes sont donc des outils très intéressants pour le suivi *in situ* de l'infection.

Ainsi, deux axes de recherche pour l'étude des stades précoces de l'aspergillose ont été définis :

- la description du développement d'*A. fumigatus* chez des poussins suite à des inoculations répétées d'une même souche sauvage et suite à une coinfection séquentielle par une souche sauvage et une souche exprimant la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*);
- le suivi de l'infection *in situ* au moyen d'une technique d'imagerie dynamique sur des poussins inoculés avec des conidies émettant une fluorescence rouge.

II. Matériels et méthodes

L'ensemble des protocoles utilisés pour cette étude a fait l'objet d'un examen et d'une validation par le comité d'éthique de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA).

A. Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des poulets de race Leghorn blanche de lignée PA12, EOPS.

L'éclosion a lieu au centre INRA de Tours (plateforme d'infectiologie expérimentale) et les poussins sont livrés à un jour d'âge à l'ENVA.

Ils sont hébergés dans des cages en PVC (à couvercle filtrant), placés sur litière stérile et sous lampe infra-rouge chauffante dans un local chauffé.

Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne ; ils sont nourris et abreuvés *ad libitum*.

B. Inoculum

Pour cette étude, trois souches d'*A. fumigatus* ont été utilisées :

- une souche de référence CBS 144-89 initialement isolée à partir d'un patient atteint d'aspergillose pulmonaire invasive,
- deux souches fluorescentes génétiquement modifiées.

La première souche fluorescente nous a été fournie par Margo Moore (Simon Fraser University, Burnaby, Canada). Cette souche a été construite à partir de la souche ATCC 1373 et exprime la protéine GFP (43).

La seconde nous a été fournie par Alexandra Vallon (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israël). Cette souche a été construite à partir de la souche CBS 144-89 et exprime la protéine DsRed (41).

Les suspensions de conidies sont préparées à partir de culture sur milieu malt-agar-

chloramphénicol (malt extract 20 g, agar-agar 15 g, glucose anhydre pur 20 g, peptone 1 g, chloramphénicol pur 99% 0,5 g, eau distillée qsp 1 litre) pendant 7 jours à 37°C.

Les conidies sont récoltées en immergeant les cultures dans du PBS tween 20 stérile (0,05%), puis collectées par centrifugation 7 minutes à 4°C à 1000 g.

Un comptage des conidies avec une cellule de Malassez permet d'ajuster la concentration finale de la suspension à 10^8 ou 10^9 conidies/mL.

Par ailleurs, une suspension de microsphères de polystyrène fluorescentes rouges de 3,4 μm de diamètre (Merck) a également été utilisée.

La suspension mère commerciale (100 mg/10 mL d'eau) est ajustée de manière à obtenir une concentration finale égale à 10^9 microsphères/mL.

C. Inoculation

Les inoculations des jeunes poussins se font par voie ISA (au niveau du sac aérien postérieur gauche) en se basant sur le modèle mis au point et validé chez les dindes par Le Loc'h (24).

Ce modèle, reproduisant une aspergillose aiguë (18) est basé sur le fait que la majeure partie de l'air inhalé passe directement des narines aux sacs aériens postérieurs en passant par les bronches primaires puis par les bronches secondaires ventrales. Ensuite, l'air passe par les parabronches où s'effectuent les échanges gazeux, puis dans les sacs aériens antérieurs, pour être finalement exhalé (figure 3). Il y a seulement 20% de l'air inhalée qui passe directement dans les poumons.

Ainsi, en inoculant la suspension de conidies dans le sac aérien postérieur on reproduit assez bien une des phases précoces de la contamination naturelle.

La voie ISA permet donc d'administrer de manière reproductible une quantité contrôlée de conidies dans un site de développement classique de l'infection aspergillaire.

L'inoculation des conidies par aérosol, qui se rapproche de la voie de contamination « naturelle », est difficile à mettre en place car la quantité de conidies effectivement inhalées est délicate à contrôler et la génération de l'aérosol infectieux nécessite de disposer d'une chambre d'inoculation adaptée.

Le site d'inoculation est tout d'abord désinfecté à l'alcool à 70°, puis à la polyvidone iodée (Bétadine solution®). L'injection est réalisée à l'aide d'une aiguille (0,5 x 1,6 mm) montée sur une seringue de 1 mL dans le sac aérien thoracique caudal gauche (SATCG).

Le volume injecté est de 100µL. Les animaux témoins négatifs ont reçus 100 µL de PBS tween 20.

D. Méthode d'imagerie

L'analyse de la fluorescence *in situ* a été réalisée au service d'imagerie des rongeurs transgéniques du CNRS d'Orléans au moyen d'un appareil IVIS Spectrum (Zénogène Caliper).

Les animaux examinés étaient morts et entièrement plumés du côté traité pour limiter le phénomène d'autofluorescence des plumes.

Les oiseaux ont été autopsiés sur place et leurs poumons gauches ont été passés en lecture directe.

Le principe de la fluorescence repose sur l'absorption d'une radiation lumineuse de longueur d'onde donnée et la réémission d'une radiation de longueur d'onde plus élevée.

Trois phases se succèdent :

- absorption de l'énergie lumineuse par les atomes du fluorochrome (ici la protéine DsRed et un composé anthracène contenu dans les microsphères fluorescentes),
- relaxation (qui s'accompagne d'une perte d'énergie),
- émission d'une onde lumineuse de longueur d'onde plus élevée.

La protéine DsRed se caractérise par une excitation maximale à 557 nm et une émission maximale à 583 nm (elle produit une fluorescence orangée).

Les microsphères rouges présentent une excitation maximale à 420 nm et une émission maximale à 656 nm.

L'intensité de la fluorescence émise est exprimée en efficacité totale dont l'unité est le cm². L'efficacité est le rapport entre la lumière émise (en photon/s) et la lumière d'excitation (photon/s/cm⁻²).

E. Marqueurs de l'infection

1. Morbidité et mortalité

Dès réception des animaux et jusqu'à la fin de la manipulation, on observe à distance chaque jour, l'activité générale du lot (nourrissage, toilettage, vocalises, repos), le niveau de consommation de nourriture et d'eau (évaluation des restes), et l'état général des oiseaux examinés globalement et individuellement.

On note d'éventuels signes cliniques tels qu'abattement, dyspnée, plumage ébouriffé, posture anormale.

Pendant la durée totale de leur séjour, les oiseaux sont pesés individuellement et quotidiennement (à heure fixe) avec une balance Sartorius U3600S (0,1 g de précision).

Cette pesée permet notamment de constituer des lots homogènes (moyenne, écart-type) avant inoculation.

2. Euthanasie et prélèvements sanguins

Les animaux qui sont traités en imagerie sont euthanasiés avec 100 µL de T61[®] (embutramide 20 g, iodure de mébézonium 5 g, chlorhydrate de tétracaïne 0,5 g, excipient qsp 100 ml) par voie intra-veineuse.

Les animaux pour lesquels on souhaite récupérer du sang ou faire une étude histopathologique des poumons sont euthanasiés par injection dans le muscle pectoral de 100 µL de kétamine (Imalgène 1000[®]; 1000 mg/10 mL), puis saignés par section des veines jugulaires et des carotides.

Le sang ainsi prélevé sur tube sec est placé à température ambiante pendant 1h30, puis les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 1000 g à 20°C. Le sérum est conservé à -80°C.

3. Autopsie et traitement des prélèvements

Au cours de l'autopsie réalisée sous PSM, la nature, la localisation et l'extension des lésions sont enregistrées.

Le SATCG (lieu d'inoculation) est ouvert et sa surface interne est écouvillonnée. Un fragment de membrane est prélevé pour analyse histologique.

Le poumon gauche est extrait, sectionné en deux parties dans le sens caudo-crânial destinées respectivement à une culture mycologique et à un examen histologique.

- Histologie

Chaque prélèvement est d'abord fixé dans une solution de formaldéhyde à 10% pendant 48 heures puis conservé dans l'alcool à 70°.

Les prélèvements sont ensuite inclus dans la paraffine et des coupes de 4 µm d'épaisseur sont réalisées.

Toutes les coupes sont colorées à l'HES (hémalun éosine safran) et certaines d'entre elles sont colorées à l'acide périodique Schiff (PAS).

Les lames qui correspondent à des animaux inoculés avec des conidies GFP subissent en plus un immunomarquage par des anticorps anti-GFP polyclonaux de lapin (Abcam GFP antibody ab6556).

- Culture mycologique

Chaque écouvillon, frotté sur les parois internes du SATCG, est aussitôtensemencé par striation d'une boîte de Petri contenant un milieu malt-agar-chloramphénicol.

Par ailleurs, le fragment de poumon gauche prélevé dans un tube sec stérile est pesé puis broyé au potter dans une solution de PBS tween 20 (0,05%) stérile. Pour chaque prélèvement, le nombre de conidies viables (ufc/g de poumon) est évalué après dilutions décimales successives du broyat et ensemencement sur géloses malt-agar-chloramphénicol.

Les boîtes de Petri sont placées à 37°C. Les colonies d'*A. fumigatus* sont comptées à l'issue de 48 h d'incubation et un nombre d'ufc/g de poumon est calculé le cas échéant. Les boîtes « négatives » (sans aucune colonie fongique après 48h d'incubation) sont conservées à l'étuve une semaine afin de confirmer l'absence du champignon.

4. Dosage du galactomannane sérique par ELISA

A partir du sérum prélevé on réalise un dosage du galactomannane sérique. La technique utilisée est un dosage immuno-enzymatique sur phase solide (ELISA sandwich direct) permettant la détection semi-quantitative du galactomannane circulant dans le sérum. L'anticorps utilisé, l'EBA-2, est une immunoglobuline monoclonale qui reconnaît les chaînes $\beta(1-5)$ galactofuranes du galactomannane

Ce test, développé pour le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire chez l'homme, a un seuil de positivité fixé à 1 ng/mL de sérum testé.

Les sérums, conservés à -80°C, sont décongelés le jour de la réalisation du dosage.

Toutes les solutions utilisées sont celles fournies avec le kit Platelia® *Aspergillus* (Laboratoire BIO-RAD) et le dosage est effectué en suivant les instructions fournies dans la notice du kit (4).

Quatre sérums témoins sont fournis : un sérum contrôle négatif R3, deux sérums seuils R4 (1 ng/mL de galactomannane) et un sérum contrôle positif R5 (10 ng/mL de galactomannane).

La notice du kit recommande de traiter 300 μ L de sérum pour prélever après traitement 50 μ L de surnageant pour la réaction sérologique. Lors d'une étude préliminaire (23) il a été montré que 100 μ L de sérum suffisait pour obtenir 50 μ L de surnageant après traitement. La quantité de la solution de traitement a donc été réduite proportionnellement (33 μ L au lieu de 100 μ L) pour conserver une concentration identique en antigènes.

La lecture est effectuée par un spectrophotomètre (ThermoLabsystem®) à la longueur d'onde de 450 nm. Pour chaque cupule, une densité optique (DO) est obtenue. Après détermination d'une valeur seuil (VS) correspondant à la moyenne des DO des cupules contenant le sérum seuil (R4), un index (I) est calculé pour chaque sérum testé comme suit : $I = DO_{\text{échantillon}} / VS$

Pour valider l'essai, différents critères doivent être respectés : $0,3 \leq VS \leq 0,8$; $I(R5) > 2,0$; $I(R3) < 0,5$.

F. Suivi *in situ* de l'infection au moyen de l'imagerie dynamique

Le but de cette expérimentation est de suivre la localisation et le développement de conidies d'*A. fumigatus* fluorescentes dans l'appareil respiratoire de poussins préalablement inoculés.

Un test de faisabilité a montré que les conidies exprimant la DsRed permettaient d'obtenir des images d'assez bonne qualité. Au contraire, la longueur d'onde (504 nm) émise par la souche exprimant la GFP s'est révélée trop faible pour traverser les tissus.

On a choisi d'inoculer une dose 10 fois supérieure à la dose habituellement inoculée afin d'optimiser la qualité des résultats d'imagerie dynamique.

Une étude préliminaire sur 10 poussins a permis de s'assurer que cette concentration de conidies provoquait une aspergillose clinique chez tous les animaux mais sans entraîner leur mort.

La suspension de microsphères rouges a servi de témoin positif pour cette étude de suivi *in situ* de l'infection. En effet, ces microsphères, qui ont également été éprouvées lors du test de faisabilité, ont donné des images d'excellente qualité.

Dix-huit animaux ont été inoculés avec 10^8 conidies DsRed tandis que 13 animaux ont été inoculés avec 10^8 microsphères fluorescentes rouges.

Le centre d'imagerie du CNRS ne possédant pas l'autorisation d'expérimenter sur des poussins, il n'a pas été possible d'examiner des animaux vivants. Une cinétique d'inoculation a donc été réalisée et le jour de l'examen, nous avons pu disposer d'oiseaux qui avaient été inoculés depuis 87 heures, 63 heures, 39 heures, 15 heures, 3 heures et moins de 5 minutes avant euthanasie.

Les animaux ont été euthanasiés (par injection de T61[®]), plumés puis fixés avec de l'adhésif noir sur des planches recouvertes d'aluminium. Ils ont ensuite été placés dans une glacière pour le transport, sous froid positif, jusqu'au centre d'imagerie d'Orléans.

Au centre d'imagerie les poussins ont été examinés à la caméra fluorescente puis une autopsie

a été réalisée. A cette occasion la nature et l'étendue des lésions est notée, un écouvillonnage du SATCG est réalisé et les poumons gauches sont prélevés. Ceux-ci sont ensuite imagés et pour les animaux ayant reçu les conidies ils sont broyés pour être mis en culture.

Une quantification de la fluorescence a été faite pour chaque signal fluorescent détecté au niveau de l'animal entier ou du poumon isolé.

G. Etude du développement d'*A. fumigatus* suite à une infection répétée ou une co-infection séquentielle.

Tous les poussins ont reçu deux injections à 3 jours d'intervalle (J0 et J3). Cinq lots homogènes de poussins ont été constitués :

- Lot PBS+PBS (n = 15) : deux injections de PBS tween 20 à J0 et J3 ;
- Lot WT+PBS (n = 20) : 10^7 conidies de la souche CBS144-89 (J0) et PBS Tween 20 (J3) ;
- Lot GFP+PBS (n = 20) : 10^7 conidies de la souche GFP (J0) et PBS Tween 20 (J3) ;
- Lot WT+GFP (n = 20) : 10^7 conidies de la souche CBS144-89 (J0) et 10^7 conidies de la souche GFP (J3) ;
- Lot WT+WT (n = 20) : 10^7 conidies de la souche CBS144-89 à J0 et J3.

Les animaux sont ensuite sacrifiés à J1, J3, J4, J6, J9 et J12 à hauteur de 2 ou 3 poussins par jour pour le lot PBS+PBS et de 3 ou 4 animaux pour les autres lots.

Chacun des animaux de l'expérimentation a fait l'objet d'une pesée quotidienne, d'une autopsie, de prélèvements pour cultures mycologiques et analyses histologiques des poumons et du SATCG et d'un dosage de galactomannane sérique.

H. Analyses statistiques des résultats

Pour l'étude du suivi *in situ* de l'infection, les relations entre le nombre d'ucf/g de poumon et l'efficacité de la fluorescence, d'une part, et l'intensité des lésions pulmonaires, d'autre part, ont été analysées grâce à un modèle linéaire mixte. Il en est de même pour la relation entre l'intensité des lésions pulmonaires et l'efficacité au niveau des poumons.

Pour l'étude de co-infection, les variations des marqueurs de l'infection (nombre d'ufc/g de poumon, score lésionnel en histologie et dosage de galactomannane) en fonction des différents lots et du jour ont été étudiées par analyse de variance.

III. Résultats

A. Suivi *in situ* de l'infection par *A. fumigatus* par imagerie dynamique

La figure 6 montre qu'à H0 et H3, le signal fluorescent des conidies DsRed est faible à la fois sur l'animal entier et sur les poumons isolés. A H15, un signal fluorescent apparaît plus nettement sur les animaux au niveau du point d'inoculation et au niveau de la région caudale des poumons. A H39, les signaux fluorescents sont intenses sur les trois poussins. A H63, la fluorescence diminue mais elle reste stable jusqu'à H87.

Les signaux que l'on observe se situent au niveau du point d'inoculation, ils sont bien délimités avec peu de phénomènes d'auto fluorescence associés.

La figure 5 met en évidence le fait que pour chaque animal, l'intensité du signal est moins importante sur les poumons que sur l'animal entier. Notons que pour un animal à H63 et pour les deux animaux à H87, cette différence est particulièrement marquée.

Figure 5 : évolution comparée de l'efficacité sur l'animal entier et dans le poumon isolé pour chacun des poussins inoculé avec conidies DsRed (3 poussins par temps sauf à H87 avec 2 animaux).

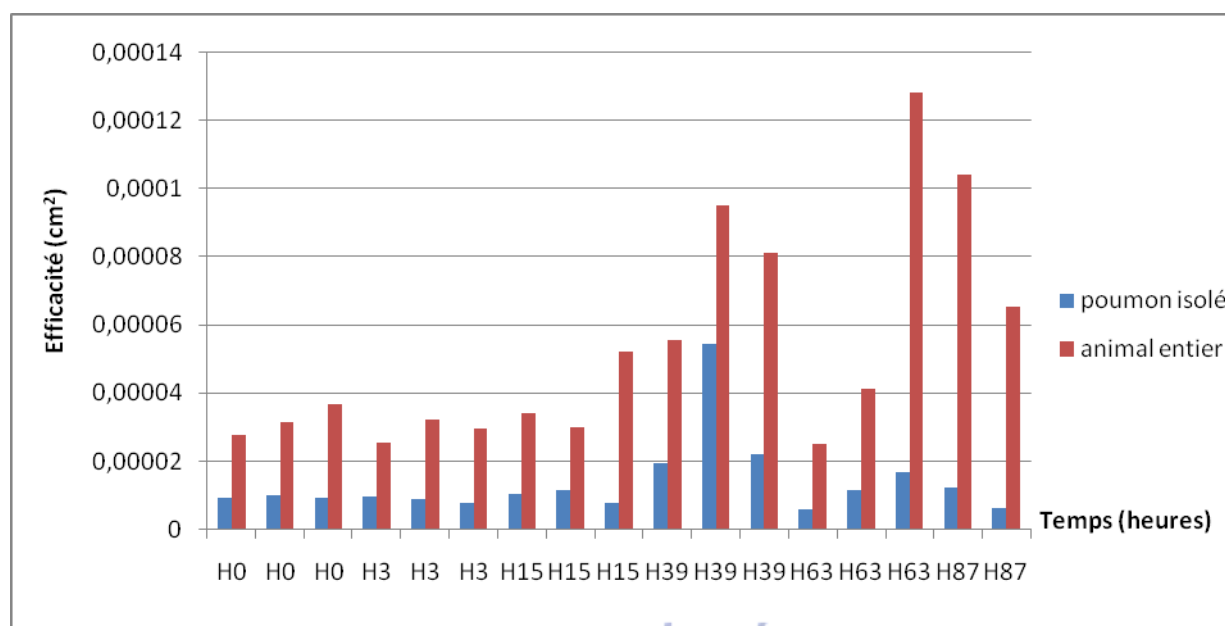
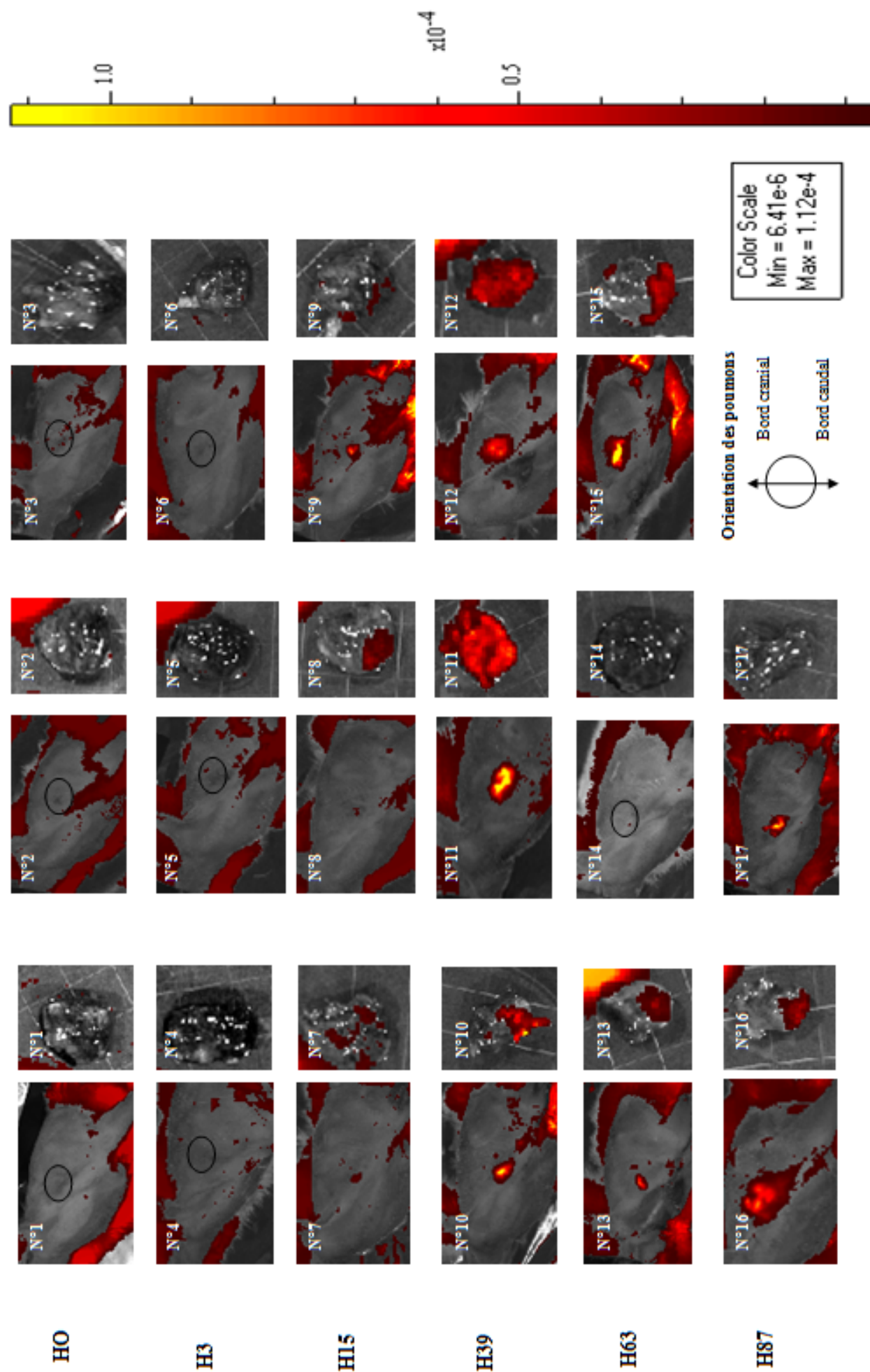
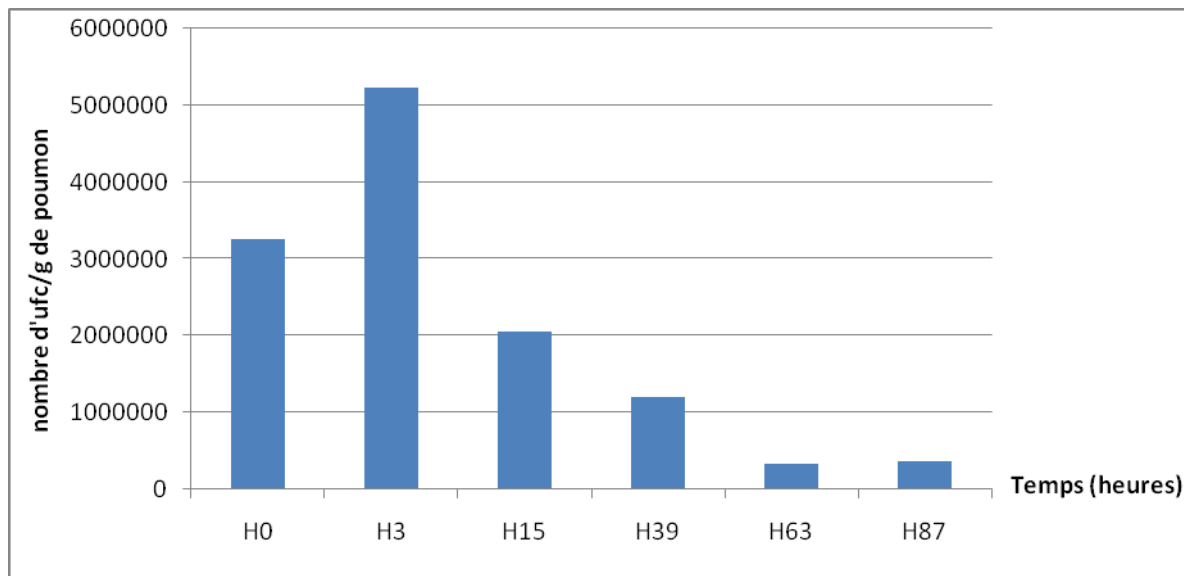


Figure 6 : suivi de la fluorescence émise par les conidies D5Red au travers de l'animal entier (photos à gauche) et sur les poumons isolés (photos à droite) au cours du temps.



Les cultures fongiques effectuées à partir des broyats de poumons (figure 7) et d'écouvillons du SATCG (figure non présentée) révèlent une quantité importante de colonies à H0 et H3. Cette quantité diminue de moitié à chaque temps ultérieur, ceci jusqu'à H87.

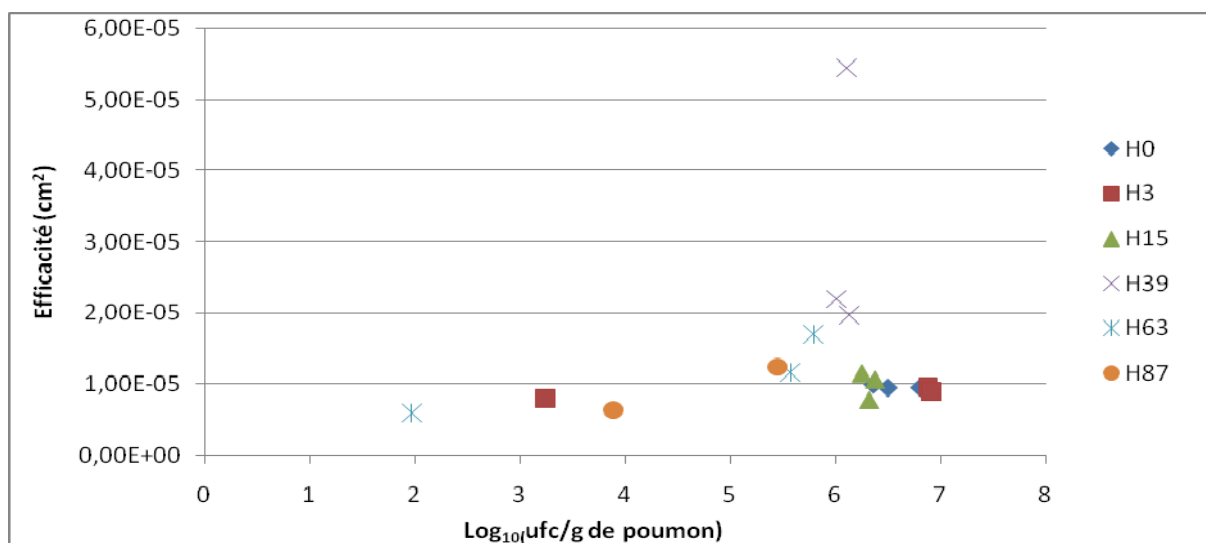
Figure 7 : évolution du nombre d'ufc/g de poumon en fonction du temps post-inoculation.



Il n'y a pas de corrélation entre le nombre d'ufc/g de poumon et l'efficacité du signal dans le poumon ($p=0.42$).

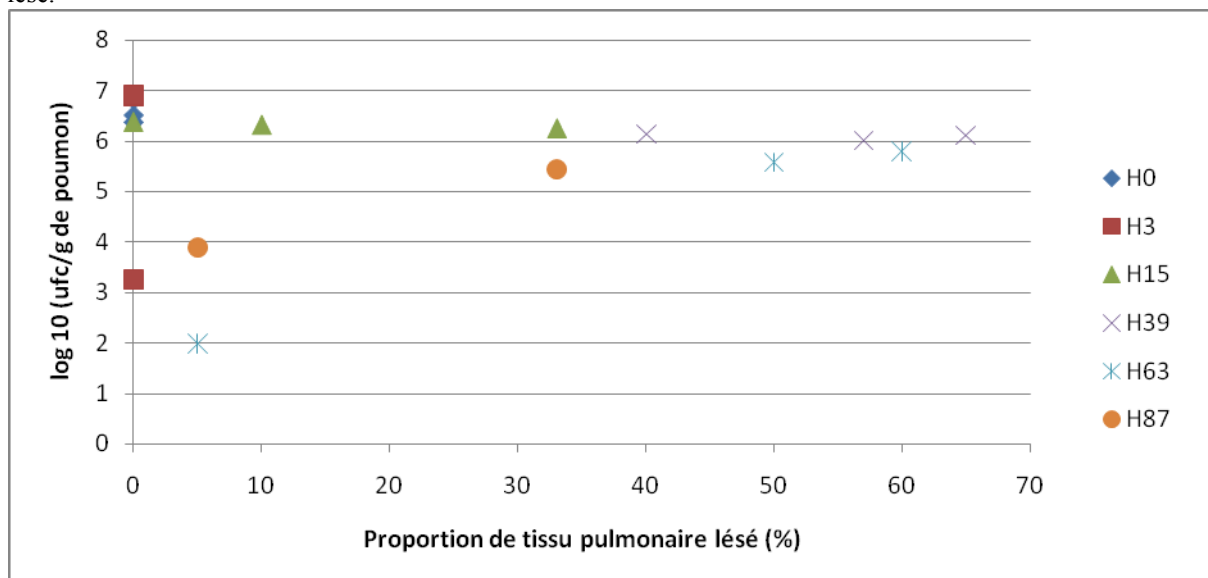
En effet aux temps H0, H3, et H15, on enregistre les efficacités les plus faibles alors que le dénombrement d'ufc est maximal (figure 8).

Figure 8 : correspondance individuelle entre l'efficacité du signal au niveau des poumons et la quantité de conidies viables dans les poumons en fonction du temps post-inoculation.



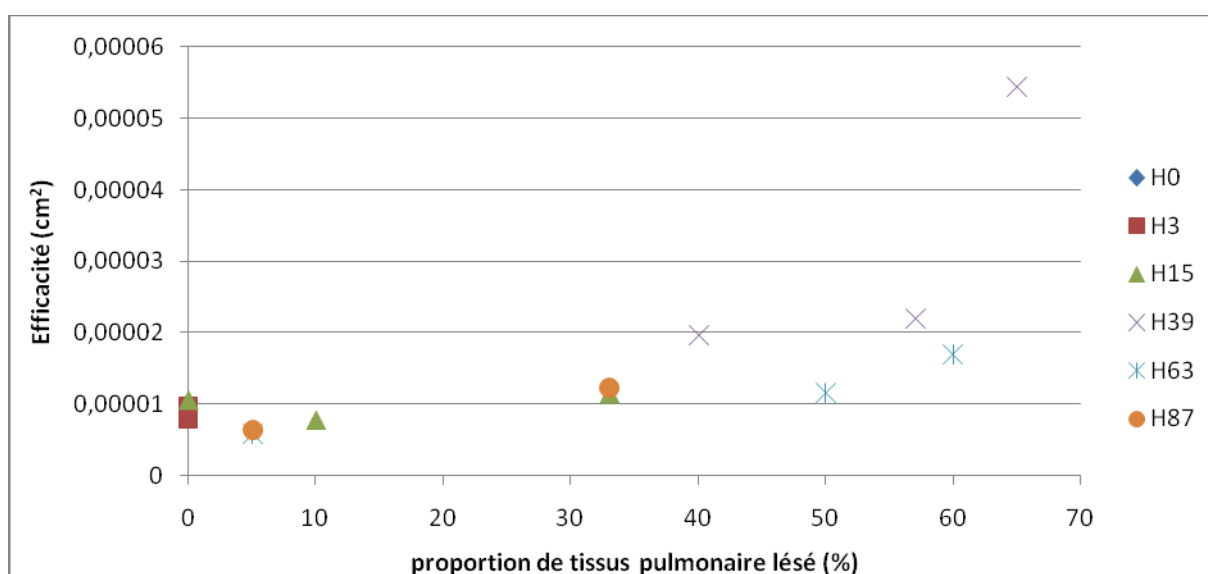
Il n'y a pas de corrélation entre le nombre d'ufc/g de poumon et l'intensité des lésions ($p = 0,06$). On n'observe aucune lésion à H0 et H3 alors que le nombre d'ufc est maximal. Pour un \log_{10} (ufc/g de poumon) proche de 6 la proportion de tissu pulmonaire lésé varie de zéro à 65% (figure 9).

Figure 9 : correspondance individuelle entre le nombre d'ufc/g de poumon et la proportion de tissu pulmonaire lésé.



Au contraire, sur la figure 10, on observe une corrélation positive significative ($p = 0,01$) entre l'efficacité enregistrée au niveau des poumons et l'intensité des lésions pulmonaires.

Figure 10 : correspondance individuelle entre l'efficacité du signal enregistré au niveau des poumons et la proportion de tissu pulmonaire présentant des lésions.



Par ailleurs, la figure 11 montre qu'il y a une bonne correspondance entre la photo des lésions pulmonaires et l'image de ce même poumon obtenue avec le système IVIS Spectrum. Cette correspondance est retrouvée pour chacun des poussins inoculés présentant des lésions.

Figure 11 : comparaison entre la photo du poumon gauche isolé et l'image correspondante obtenue avec le système IVIS Spectrum. Les poumons sont ceux d'un poussin inoculé à H0 (à gauche) et à H63 (à droite). Le trait noir délimite la partie saine du poumon (en haut) et atteinte (en bas).



Contrairement à ce que l'on observe pour les animaux inoculés avec des spores, il ne se détache aucune tendance particulière dans l'évolution de la fluorescence au cours du temps pour les animaux inoculés avec les microsphères fluorescentes (Figures 12 et 13). La variabilité individuelle est très importante même entre les animaux inoculés au même moment. Notons que les valeurs d'efficacité obtenues avec les microsphères sont 1000 fois supérieures à celles obtenues avec les conidies DsRed (figure 13).

Figure 13 : évolution comparée de l'efficacité sur l'animal entier et dans le poumon isolé au différents temps considérés et pour chaque individu inoculé avec les microsphères.

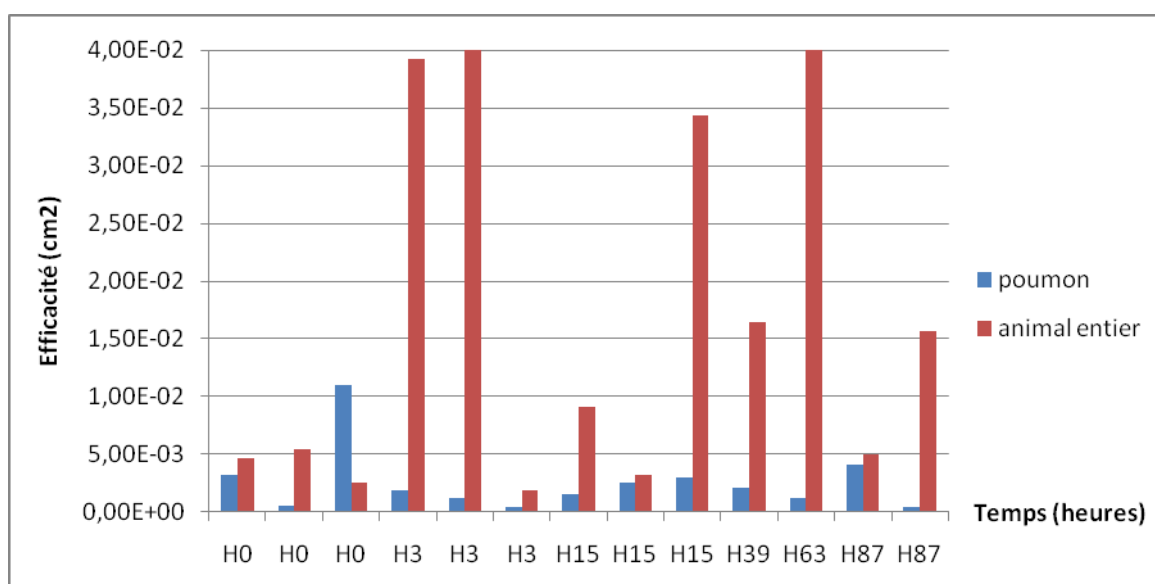
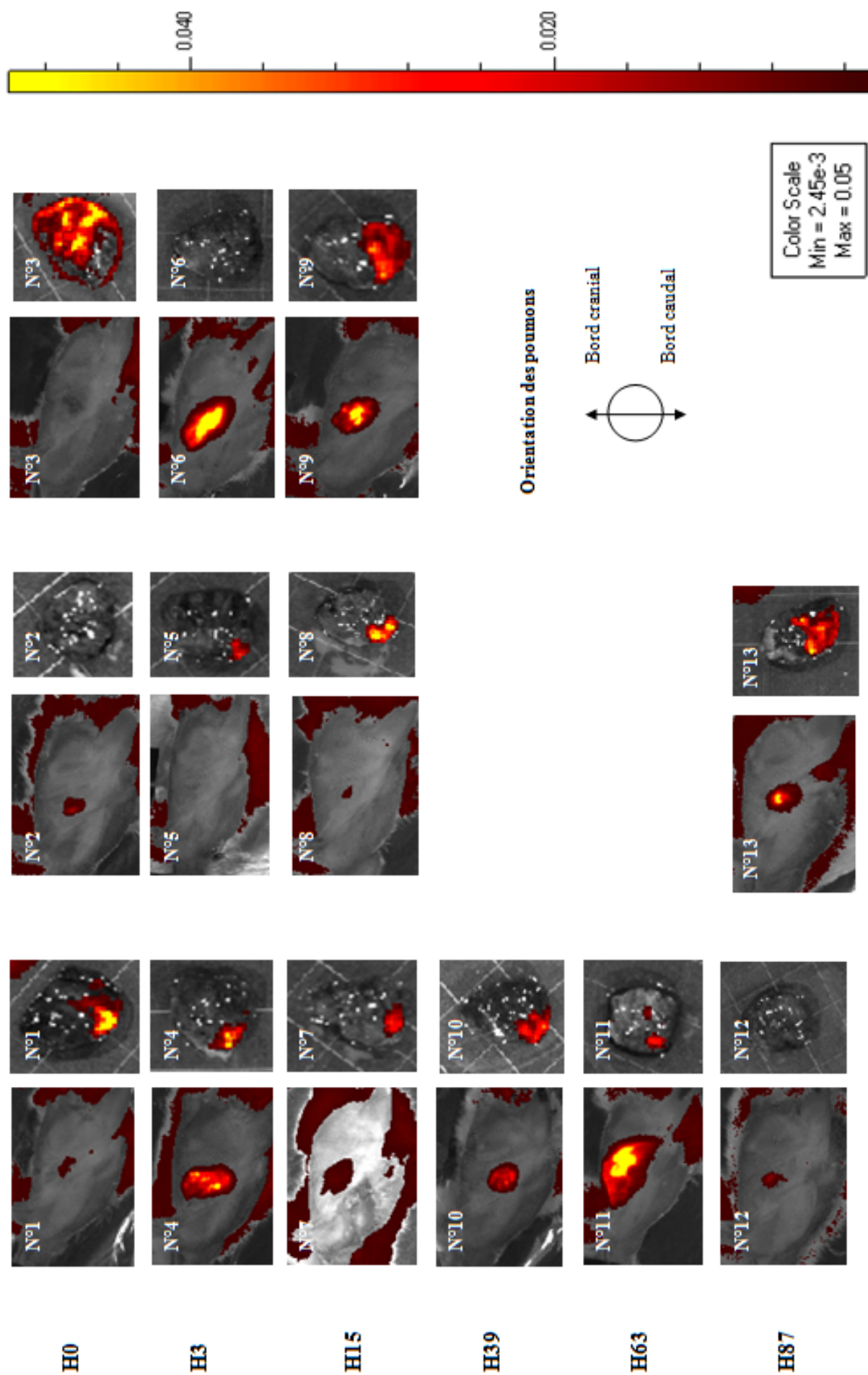


Figure 12 : suivi de la fluorescence émise par les microsphères au travers de l'animal entier (photos à gauche) et sur les poumons isolés (photos à droite) en fonction du temps post-inoculation.



B. Etude du développement d'*A. fumigatus* suite à une infection répétée ou une co-infection séquentielle

Jusqu'à J3 (jour de la deuxième inoculation) inclus, trois des cinq lots constitués ont reçu exactement le même traitement (lots WT+PBS, WT+GFP et WT+WT).

1. Mortalité et morbidité

Aucun des animaux du lot PBS+PBS n'a présenté de signes cliniques durant cette étude.

Dans les autres lots, les symptômes (dyspnée, hochement de queue, ébouriffement, perte de poids) apparaissent dès J2 ou J3.

Aucun mort n'a été recensé durant cette étude.

Pour les lots WT+PBS et GFP+PBS, le nombre de poussins exprimant des signes cliniques augmente jusqu'à J4 puis diminue pour être nul à partir de J9 et J10, respectivement.

On observe la même tendance pour les lots WT+WT et WT+GFP avec un pic à J5, et une disparition des signes cliniques à partir de J10.

A partir de J5, il y a deux fois plus d'animaux manifestant des signes cliniques dans les lots ayant reçu des conidies à deux reprises et dans le lot GFP+PBS que dans le lot WT+PBS. Cependant l'intensité des signes cliniques est équivalente dans chacun des lots.

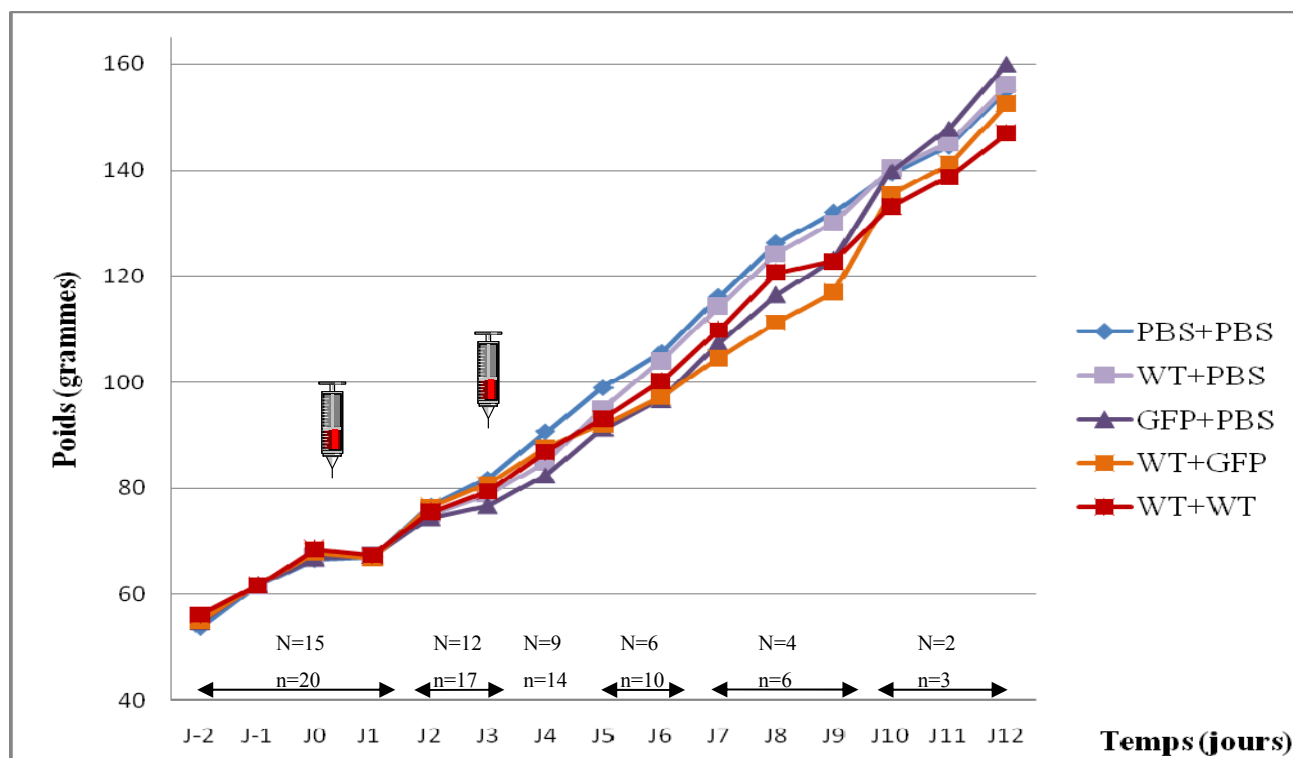
Sur la figure 14, on observe une légère perte de poids dans tous les lots après J0 suite à la première inoculation.

Jusqu'à J3 (qui correspond à la deuxième inoculation) les oiseaux des différents groupes présentent des courbes de poids qui se superposent exactement.

Les gains moyens quotidiens évoluent ensuite de manière parallèle quel que soit le lot.

A partir de J4 les lots GFP+PBS, WT+GFP et WT+WT grossissent moins vite que le lot témoin PBS+PBS ou le lot WT+PBS, en particulier à J8 et J9.

Figure 14 : évolution du poids moyen quotidien des animaux des 5 lots étudiés.
N = nombre d'animaux dans le lot PBS+PBS, n = nombre d'animaux dans les autres lots.



2. Autopsie et examen histo-pathologique

Les témoins PBS+PBS ne présentent aucune lésion.

Pour chacun des autres lots, on observe dès J1 des lésions au niveau des sacs aériens.

Il s'agit de lésions de néovascularisation, d'opacifications et de granulomes principalement localisés sur le site d'inoculation (SATCG).

Pour tous les lots, le nombre d'animaux atteints au niveau des sacs aériens est maximal à J4 et J6. Il décroît à partir de J9 pour les animaux ayant reçu une seule dose de conidies et à partir de J10 pour ceux qui ont reçu deux doses (tableau II).

On note que pour tous les animaux qui présentent encore des lésions macroscopiques du sac aérien à J9, celles-ci sont nettement moins intenses que pour les temps précédents.

Au niveau des poumons, on observe des granulomes sur le bord postérieur et/ou une consolidation plus ou moins étendue dans le sens caudo-crânial.

Pour les lots inoculés avec une seule dose de conidies, les lésions pulmonaires apparaissent à J1 ou J2, s'accroissent jusqu'à J4 puis diminuent à partir de J6.

Pour les lots inoculés avec deux doses, les lésions apparaissent dès J1, augmentent jusqu'à J6 et diminuent à J9.

Les animaux ayant reçu deux injections de conidies n'ont pas plus de lésions que les autres mais elles persistent plus longtemps : à J12 les animaux des lots WT+WT et WT+GFP sont deux fois plus nombreux à présenter des lésions que les lots n'ayant reçu qu'une dose de conidies.

On compte plus de lésions dans le lot GFP+PBS que dans le lot WT+PBS mais on ne retrouve pas cette différence entre les lots WT+GFP et WT+WT.

Tableau II : proportion d'individus inoculés présentant des lésions au niveau des sacs aériens et/ou des poumons. L'encadré noir correspond aux données enregistrées avant la deuxième inoculation.

SA= sac aérien et PM = poumon

Jour Lot	J1		J3		J4		J6		J9		J12	
	SA	PM	SA	PM	SA	PM	SA	PM	SA	PM	SA	PM
GFP+PBS	3/3	2/3	3/3	2/3	4/4	4/4	4/4	3/4	2/3	1/3	1/3	1/3
WT+PBS	1/3	0/3	2/3	1/3	4/4	2/4	4/4	2/4	2/3	1/3	1/3	1/3
WT+GFP	2/3	1/3	3/3	2/3	4/4	2/4	4/4	3/4	3/3	2/3	3/3	2/3
WT+WT	2/3	2/3	2/3	3/3	4/4	3/4	4/4	4/4	3/3	2/3	2/3	1/3

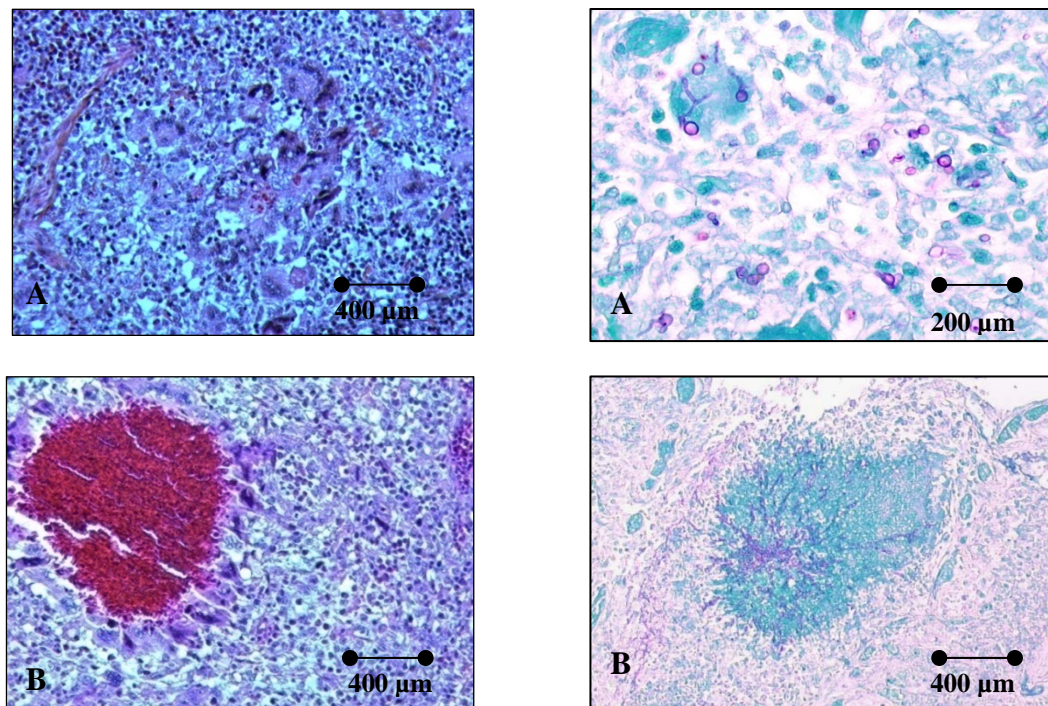
L'analyse histologique révèle dès J1 un infiltrat cellulaire d'hétérophiles dans le parenchyme pulmonaire et les sacs aériens, avec présence de nombreuses cellules géantes ayant phagocyté les conidies germées (figure 15A).

L'inflammation s'organise ensuite en granulomes (renfermant les éléments fongiques) qui deviennent nécrotiques à J4 (figure 15B).

A partir de J9 on n'observe plus aucun foyer nécrotique, il y a un infiltrat lymphocytaire important et il ne reste que des débris de champignon.

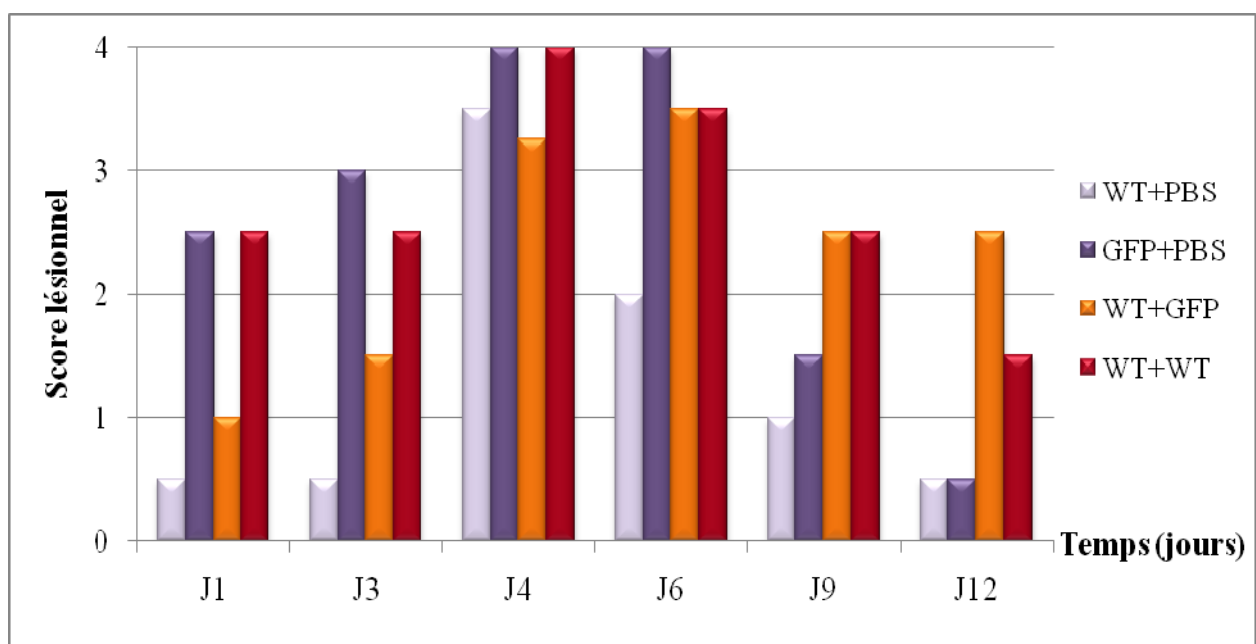
Le double marquage (PAS + immunomarquage) des lames issues des animaux du lot WT+GFP ne s'est pas révélé assez sensible, il n'a pas permis de distinguer les conidies WT et GFP.

Figure 15 : coupes histologiques colorées à l'hémalun éosine safran (à gauche) et à acide périodique de Schiff (à droite) de poumons gauches prélevés à J1 (A) et J4 (B) post-inoculation.



Sur la figure 16, on constate que les scores lésionnels établis culminent à J4 et J6 quels que soient les lots ayant reçu au moins un *inoculum* de conidies. L'analyse de la variance a montré un effet significatif du lot ($p < 0,0001$), du jour ($p < 0,001$) et de l'interaction lot-jour ($p = 0,003$).

Figure 16 : lésions observées dans chaque lot au niveau des poumons et des sacs aériens en fonction du temps.
Stade 1 = Infiltrations cellulaires **Stade 2** = stade 1 + granulomes **Stade 3** = stade 2 + foyers de nécrose



Les scores lésionnels ne sont pas plus élevés à J4 et J6 pour les lots ayant reçu deux doses de conidies, ce qui devient le cas à partir de J9. A J12 on n'observe pratiquement plus de lésion pour les lots WT+PBS et GFP+PBS alors qu'elles sont encore bien nettes pour les lots ayant reçu deux doses. Les foyers de nécrose ont cependant disparu à J9 pour tous les lots.

Notons que les résultats sont très contrastés pour les 3 lots inoculés avec la seule souche WT à J1 et J3.

3. Cultures mycologiques

Les cultures sont négatives pour tous les animaux du lot témoin PBS+PBS.

Le tableau III montre que le lot WT+PBS est celui qui présente le moins de cultures positives. La proportion d'individus présentant des cultures positives est à peu près la même pour les trois autres lots.

Les cultures d'écouvillons de sacs aériens sont négatives dès J6 pour le lot WT+PBS et à partir de J9 pour le lot GFP+PBS. Pour ces deux groupes, les cultures de poumons sont toutes négatives à J12.

Pour les lots ayant reçu deux doses de conidies les cultures sont encore positives à J12 pour les poumons des deux lots et les sacs aériens du lot WT+WT.

La différence macroscopique entre les colonies d'*Aspergillus* GFP (vertes foncées et régulières) et WT (plus blanches et irrégulières) étant évidente, on a pu noter qu'à partir de J4 le lot WT+GFP présente 98 à 100% de conidies viables marquées à la GFP.

Tableau III : proportion d'individus inoculés présentant une culture positive de l'écouvillon de [sac aérien \(SA\)](#) ou du broyat de poumon (PM).

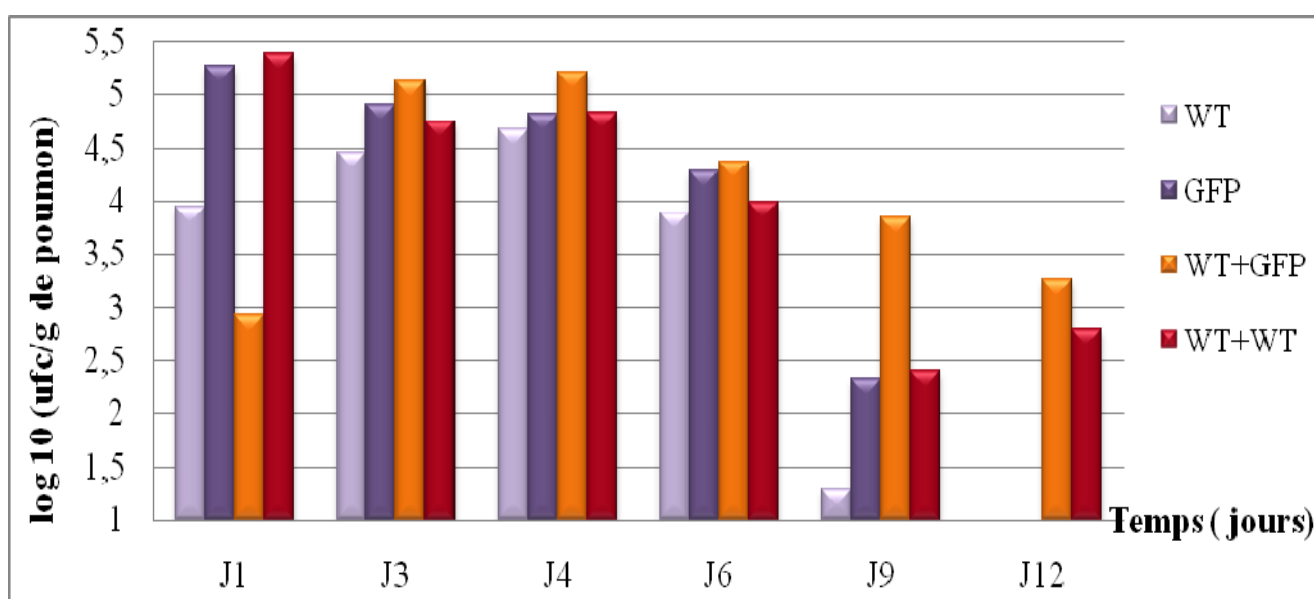
L'encadré noir correspond aux données enregistrées avant la deuxième inoculation.

Lot \ Jour	J1		J3		J4		J6		J9		J12	
	SA	PM	SA	PM	SA	PM	SA	PM	SA	PM	SA	PM
GFP+PBS	2/3	3/3	3/3	3/3	3/4	4/4	2/4	4/4	0/3	2/3	0/3	0/3
WT+PBS	2/3	1/3	1/3	2/3	1/4	3/4	0/4	1/4	0/3	1/3	0/3	0/3
WT+GFP	2/3	3/3	1/3	3/3	4/4	4/4	3/4	2/4	1/3	3/3	0/3	2/3
WT+WT	3/3	3/3	3/3	3/3	4/4	4/4	2/4	4/4	2/3	2/3	1/3	3/3

Sur la figure 17 on observe, dans l'ensemble, une diminution progressive du nombre d'ufc/g au cours du temps et pour tous les lots. L'analyse de la variance a montré un effet significatif du lot ($p < 0,0001$) et du jour ($p < 0,0001$).

A J4, il n'y a pas d'augmentation de la quantité de conidies viables malgré l'inoculation d'une deuxième dose de conidies (pour les lots WT+GFP et WT+WT). Cependant les cultures des lots inoculés deux fois restent positives et à des niveaux relativement élevés (\log_{10} (ufc/g de poumon) = 3) à J12 contrairement aux autres lots qui sont négatifs.

Figure 17 : évolution au cours du temps des moyennes du nombre d'ufc/g de poumon dans les différents lots de l'expérimentation.



Notons l'apparition à J6 de contaminants (*Penicillium*, mucorale et levure) dans les boîtes de culture.

4. Dosage du galactomannane sérique

Les critères de validation du test défini par le kit Platelia® *Aspergillus* ont été respectés.

L'analyse de la variance a montré un effet significatif du lot ($p < 0,0001$) et de son interaction avec le jour ($p < 0,009$) mais pas d'effet significatif global du jour.

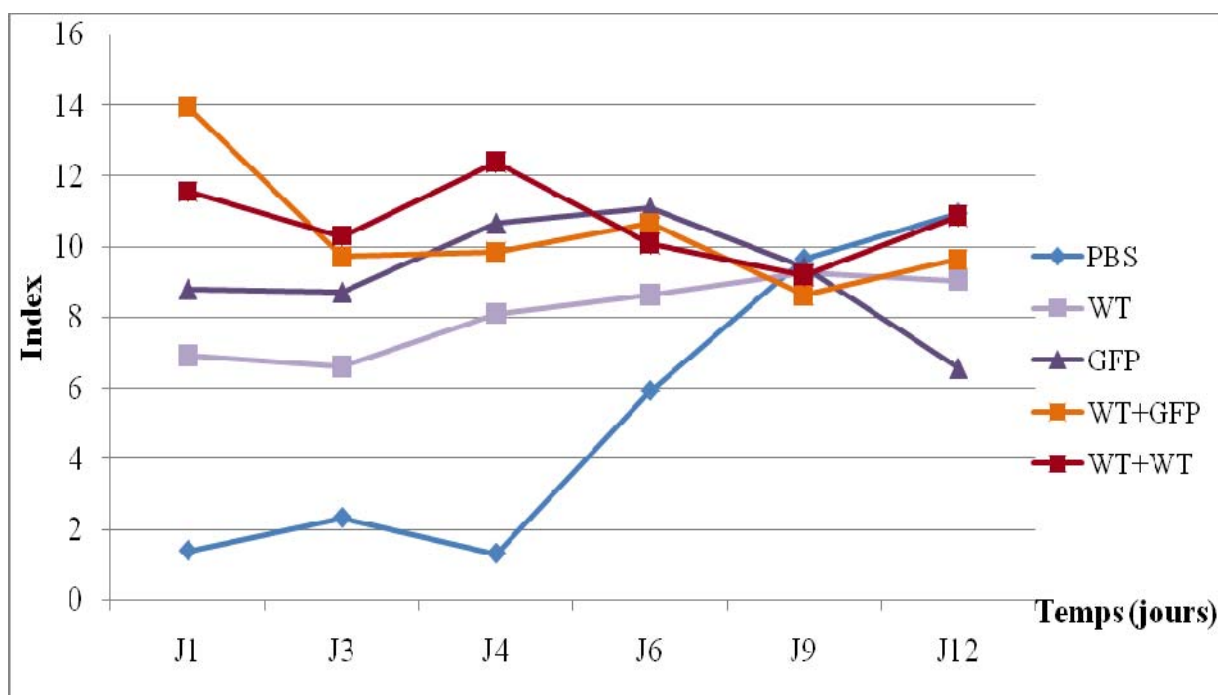
Les index entre le lot témoin PBS (< 3) et les lots inoculés (> 6) sont bien distincts jusqu'à J4.

A partir de J6, la quantité de galactomannane chez les poussins témoins s'accroît très fortement.

Les quatre autres lots évoluent de la même façon avec des index très élevés tout au long de l'étude.

Notons que les résultats sont très contrastés (index initiaux pouvant varier du simple au double) pour les 3 lots inoculés avec la souche WT à J1 et J3 (figure 18).

Figure 18 : évolution de la concentration de galactomannane sérique au cours du temps pour les différents lots.



IV. Discussion

A. Intérêt du suivi *in situ* de l'infection par une souche d'*A. fumigatus* fluorescente

Il existe différentes techniques d'imagerie photonique *in vivo* utilisant les propriétés de la lumière, les plus connues étant la fluorescence et la bioluminescence.

La bioluminescence est une technique mieux maîtrisée et mieux adaptée à une étude *in vivo* que ne l'est la fluorescence. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de souches bioluminescentes d'*A. fumigatus* ayant fait l'objet de publication. Une équipe de l'Institut Pasteur de Paris travaille actuellement sur la mise au point d'une telle souche (communication personnelle).

Plusieurs souches d'*A. fumigatus* fluorescentes sont disponibles, cependant leur spectre d'émission doit être compatible avec une utilisation *in vivo*. Ainsi, la souche exprimant la GFP n'est pas utilisable car la longueur d'onde qu'elle émet (504 nm) ne parvient pas à traverser la peau d'animaux même de petite taille. Au contraire, la souche exprimant la protéine DsRed est intéressante car elle émet une fluorescence orangée de longueur d'onde plus élevée (583 nm).

Au vu des résultats obtenus, il semble que les conidies DsRed n'émettent pas un signal suffisant pour être détectées.

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer l'absence de signal constatée à H0 et H3 :

- les 10^8 conidies DsRed inoculées à chaque poussin ne constituent pas une surface d'émission totale suffisante,
- la longueur d'onde d'émission des conidies est insuffisamment élevée pour obtenir une intensité optimale du signal,
- le signal est « dilué » du fait de la dispersion immédiate des conidies dans l'organisme.

Ces hypothèses doivent être retenues même si l'*inoculum* de départ est dix fois plus concentré en conidies marquées qu'un *inoculum* standard afin de se placer dans les meilleures conditions pour capter un signal *in situ*.

Les analyses histologiques des tissus cibles pratiquées lors de précédentes études indiquent

que les conidies peuvent germer dès J1 dans l'appareil respiratoire du poulet (10, 26, ci-dessus II.B.2). En imagerie, on observe un signal fluorescent sur l'animal entier et dans les poumons isolés dès H15, signal qui persiste jusqu'à la fin de l'expérimentation alors que parallèlement le nombre de conidies viables (numérations sur géloses malt) diminue.

La germination des conidies et donc l'augmentation concomitante de la surface fongique globale permettrait d'expliquer ce résultat et de retenir notamment la première hypothèse pour expliquer les résultats négatifs à H0 et H3.

Cette observation est cohérente avec le fait que les hyphes de la souche DsRed sont fluorescents au même titre que les conidies qui les produisent (27). Nous avons également confirmé que les hyphes conservent leur fluorescence après passage *in vivo* (chez les poussins) par observation au microscope à épifluorescence de filaments fongiques issus d'une culture de broyat de poumon.

La différence nette entre l'efficacité du signal enregistré sur l'animal entier et au niveau des poumons s'expliquerait par le développement du champignon au niveau des sacs aériens postérieurs (site d'inoculation). Pour les temps H63 et H87, cette différence, particulièrement marquée pour certains animaux, s'explique par le fait que ceux-ci présentaient, en plus une petite plaque fongique au niveau du point d'injection.

La corrélation positive entre l'efficacité (cm²) enregistrée au niveau des poumons à partir de H15 et la proportion de tissu pulmonaire lésé permet de considérer que l'imagerie *in vivo* est un outil intéressant pour suivre l'extension des lésions au cours du temps. Ceci est d'autant plus vrai qu'il y a une excellente correspondance entre les photos des poumons lésés et les images de ces mêmes poumons obtenues avec le système IVIS Spectrum. Le développement macroscopique des lésions est donc très intimement lié sur le plan topographique à la localisation précise des hyphes fluorescents.

Les microsphères fluorescentes, constituent un modèle mécanistique simplifié inspiré par celui mis en place par Tell chez les pigeons (*Columba livia*) (40).

Ces microsphères possèdent une longueur d'onde d'émission (656 nm) plus élevée que les conidies DsRed.

Inoculées à la même concentration que les conidies, elles permettent de modéliser la dispersion initiale de celles-ci avant germination dans le tractus respiratoire en localisant les régions anatomiques fluorescentes en fonction du temps.

La détection d'un signal dans les temps très précoces (H0 et H3) avec les microsphères quant

bien même elles sont légèrement plus volumineuses que les conidies nous conduit à retenir également l'hypothèse d'une longueur d'onde d'émission des DsRed trop faible pour expliquer les résultats négatifs observés à H0 et H3 pour les poussins inoculés avec les conidies.

La variabilité individuelle des résultats obtenus avec les microsphères rouges sur un nombre limité d'oiseaux peut être tout simplement due à la dispersion « aléatoire » des microsphères dans le tractus respiratoire au cours de l'accumulation des cycles respiratoires.

La plus grande répétabilité des résultats (au sein d'un même lot) chez les animaux inoculés avec les conidies, est sans doute imputable au processus très précoce de germination et à l'accroissement concomitant de la surface d'émission du signal.

Le modèle mécanistique utilisant les microsphères présente certaines limites dans la mesure où les billes sont inertes (modélisation des conidies uniquement avant germination) et ont une taille (3,4 μm) légèrement supérieure au diamètre des conidies (2,5 à 3 μm) - dont l'impact restrictif est cependant limité par le fait qu'on les injecte directement dans le SATCG neutralisant ainsi l'influence de l'appareil respiratoire supérieur et des poumons sur la clairance des « grosses » particules. Enfin, le caractère hydrophile des microsphères (les conidies sont hydrophobes) peut *a priori* avoir un impact sensible sur les interactions des particules exogènes avec l'organisme (cellules épithéliales et phagocytaires, surfactant).

Le modèle d'infection *in situ* par les conidies pourrait être optimisé en disposant d'une souche dont le fluorochrome émettrait après stimulation une longueur d'onde plus élevée permettant ainsi d'administrer des *inocula* moins concentrés ; les longueurs d'ondes idéales pour réaliser de l'imagerie *in vivo* se situent dans le rouge ou mieux l'infrarouge.

De plus, les techniques d'imagerie par fluorescence ne sont pas encore tout à fait au point et il y a de nombreuses limites outre l'intensité de la fluorescence émise par le fluorochrome qui portent sur :

- l'animal : la taille des animaux qui doit être faible et le phénomène d'autofluorescence des plumes,
- la technique d'inoculation : injection à des profondeurs variables, présence d'hématomes (l'hémoglobine absorbe la fluorescence),
- la stabilité des fluorochromes organiques.

Par ailleurs, la quantification du signal fluorescent est encore mal maîtrisée notamment

lorsque les valeurs d'efficacité sont faibles ; ceci explique de légères contradictions pour certains animaux entre l'image obtenue à la caméra et la valeur d'efficacité correspondante (en particulier celles obtenues à H0, H3 et H15) (communication personnelle, Julien Sobilo CNRS d'Orléans).

Pour s'affranchir de ces limites, nous avons utilisé des poussins de race Leghorn (poules pondeuses sélectionnées de petite taille), soit 2 à 3 fois plus petits que les poulets de chair d'élevages conventionnels à âge égal. De plus, le modèle « oiseaux » présente l'avantage par rapport aux mammifères que les tissus cibles (poumons et surtout sacs aériens uniquement remplis par l'air circulant) sont des organes très superficiels. Le fait de faire une observation directe de la fluorescence dans les poumons isolés permet de tirer le maximum d'informations en complétant la lecture *in situ*.

Nous avons réussi à éliminer les phénomènes d'autofluorescence en plumant intégralement le côté examiné juste après l'euthanasie des oiseaux.

Enfin, nous n'avons pas rencontré ici de problème de stabilité de la fluorescence dans le temps. Ceci est très intéressant car la stabilité des fluorochromes organiques est généralement courte (24 heures).

Ainsi, en tenant compte des limites précédemment énoncées, le modèle que nous avons développé représente à l'heure actuelle le meilleur modèle disponible pour réaliser un suivi *in situ* de l'infection par *A. fumigatus* en attendant de pouvoir utiliser les souches bioluminescentes.

Il permet notamment de suivre la croissance du champignon et l'extension des lésions pulmonaires au cours du temps.

Notons que l'intérêt principal de l'imagerie *in vivo* est de pouvoir suivre le développement de l'infection sur les mêmes animaux donc vivants et périodiquement anesthésiés.

Dans le cas présent, outre des problèmes d'autorisation d'expérimenter sur les oiseaux au centre d'imagerie d'Orléans (animaleries dédiées aux rongeurs), il est également difficile d'un point de vue éthique d'imaginer plumer des oiseaux vivants. Enfin le fait de travailler avec des conidies génétiquement modifiées sur des animaux vivants implique de lourdes contraintes réglementaires.

Pour pallier cette limite réglementaire, nous avons évalué l'intérêt de techniques alternatives aux conidies génétiquement modifiées notamment en marquant les conidies de souches

sauvages avec des nanocristaux inorganiques, les « quantum dots » qui donnent une fluorescence de très bonne qualité et existent dans différentes couleurs notamment le rouge. De nombreux problèmes théoriques nous ont empêché de mettre en place un protocole : kits adaptés au marquage de cellules et non de conidies (quantités de produit de marquage inadaptées, produits assimilables par endocytose ou injection - impossible avec les spores - ou se fixant en surface sur des lipides et non des polysaccharides), marquage potentiellement toxique et non testé *in vivo*, problème de stabilité *in vivo* d'un complexe d'anticorps-anti-conidies de souris eux mêmes reconnus par des anticorps secondaires de lapin marqués par des « quantum dots ».

Le parti pris de l'expérimentation réalisée dans ce travail fut de multiplier les temps d'analyse au détriment du nombre d'animaux par temps. Cependant, il serait intéressant d'augmenter la puissance de l'expérimentation en utilisant un plus grand nombre d'animaux. Il n'est pas utile d'imager plus d'animaux dans les toutes premières heures post-inoculation (avant H15). Par contre, il serait intéressant d'étendre l'étude jusqu'à J7 si la taille des animaux le permet encore. Des études antérieures ont montré qu'à J7 les filaments fongiques sont détruits et internalisés par les macrophages dans une large mesure (10, 26). Cela permettrait notamment de confirmer l'association entre l'efficacité du signal enregistré et la croissance des hyphes.

B. Infection répétée et co-infection séquentielle

Nous avons testé la virulence d'une souche d'*A. fumigatus* différente (GFP +) de la souche de référence CBS 144-89 habituellement utilisée par notre équipe. La souche GFP+ a été obtenue à partir de la souche ATCC 1373 distincte de la souche CBS 144-89 sur le plan génétique. Nous avons procédé en parallèle à une inoculation répétée à 3 jours d'intervalles de la souche de référence d'une part, et à une co-infection séquentielle par les deux souches d'*A. fumigatus* d'autre part.

Par ailleurs, notre étude s'est étendue sur une durée plus longue après la première inoculation soit J12 jours au lieu de J10 lors d'une première expérimentation chez le poulet dans notre laboratoire (26).

La pertinence et la validité d'un modèle expérimental, visant à reproduire une maladie

donnée, (en l'occurrence l'aspergillose aviaire) dépendent de sa capacité à satisfaire les critères suivants (7) :

- reproduction le plus fidèlement possible de la maladie chez l'espèce cible,
- standardisation du modèle pour qu'il soit reproductible d'une étude à l'autre et entre différents laboratoires,
- coût raisonnable et utilisation aisée,
- possibilité de mener des études sur les interactions hôte-parasite ou sur de nouvelles techniques de diagnostics ou de traitements,
- respect de la réglementation en vigueur à propos de l'expérimentation animale.

Le modèle développé ici vérifie en partie les différents critères ci-dessus.

Il est facile à mettre en place et relativement peu coûteux. Les poussins EOPS et les souches d'*A. fumigatus* utilisées pour l'inoculation sont facilement disponibles. Nous avons utilisé des poussins Leghorn de lignée PA12 âgés de 5 jours au moment de la première inoculation. La taille de ces animaux (40 g en moyenne lors de la réception à J1) permet d'héberger un grand nombre d'animaux simultanément dans des cages à couvercle filtrant mais ne facilite pas les prélèvements sanguins réduits à un seul échantillon par oiseau. Par ailleurs, les prélèvements sanguins doivent se faire par décapitation pour obtenir un volume de sérum suffisant (les prises de sang étant techniquement irréalisables).

Le modèle développé dans cette étude a permis de reproduire une aspergillose aiguë mais d'extension limitée au pourtour du site d'administration des conidies. A partir du 2^{ème} jour post-inoculation, certains oiseaux présentaient un tableau clinique d'aspergillose aiguë avec abattement, perte de poids, dysorexie et signes respiratoires (dyspnée, bec ouvert, ailes écartées du corps). Ces observations ont été corroborées par les résultats de l'histologie et des cultures mycologiques.

Cependant, les différents critères évalués et plus particulièrement la culture mycologique et l'histologie tendent à montrer qu'à partir du 9^{ème} jour après la première inoculation, l'organisme élimine le champignon et les lésions régressent.

Pour expliquer cette rémission on peut d'abord s'interroger sur la virulence des souches utilisées.

La souche de référence est virulente chez la souris immunodéprimée qui est, de plus, moins sensible à l'aspergillose que les oiseaux. Son pouvoir pathogène a été validé chez la dinde par

deux études précédentes (10, 24), et par une étude chez le poulet (26). Dans chacune de ces études une phase de résolution est décrite en dépit de quelques morts dans les premiers jours. Par ailleurs, la souche GFP utilisée dans cette étude semble induire une infection plus agressive que la souche de référence.

On peut aussi s'interroger sur la quantité de l'*inoculum*. Il est possible que celui-ci soit trop faible bien que cette quantité de conidies (10^8 /kg de poids vif) soit dans la gamme des *inocula* habituellement utilisés.

De plus, on ne reproduit pas une aspergillose aiguë bilatérale typique d'une inhalation de conidies dans tout l'appareil respiratoire. On constate suite à cette étude et aux résultats d'imagerie *in vivo* (confirmé avec les microsphères fluorescentes) que le développement des lésions pulmonaires du côté gauche de l'animal se fait dans un sens caudo-crânial. Par ailleurs, la partie droite du tractus respiratoire (poumon + sacs aériens) est toujours exempte de lésions dans notre modèle.

Il n'y a pas de corrélation manifeste entre l'intensité des lésions macroscopiques et microscopiques qui peuvent être observées d'une part et les signes cliniques qui sont proportionnellement peu exprimés d'autre part (il est vrai que des animaux capables de voler seraient plus susceptibles d'exprimer des signes nets d'intolérance à l'exercice ou d'insuffisance respiratoire par rapport à des poussins *Gallus gallus*).

La localisation topographique de lésions même très délabrantes à des territoires bien circonscrits permet donc aux oiseaux de surmonter l'infection initiale sans préjuger de l'impact des lésions sur les performances de croissance ultérieure qui n'ont pu être évaluées ici.

Au contraire, les animaux qui contractent une aspergillose dans des conditions naturelles présentent un développement plus homogène des lésions liée à l'inhalation de conidies dans l'ensemble de l'arbre respiratoire, d'où un biais dû au mode d'inoculation.

La voie d'inoculation choisie dans cette étude est la voie intra-sac aérien. Très facile à mettre en place, elle mime assez bien une partie de la voie de contamination naturelle puisque lors de l'inspiration la majeure partie de l'air passe directement dans les SA postérieurs *via* les bronches primaires. Cet air est donc peu filtré et encore riche en oxygène, ceci expliquant la localisation préférentielle des lésions aspergillaires dans les SA postérieurs par rapport aux SA antérieurs. Cependant, une partie de l'air inhalé passe directement dans les poumons.

Ainsi, la voie ISA court-circuite-t-elle le passage initial possible de conidies dans les poumons. Elle permet néanmoins de décortiquer spécifiquement les effets de la pénétration

d'une grande quantité de spores dans l'appareil respiratoire profond.

Le gradient lésionnel observé au niveau du poumon gauche démontre l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte qui circonscrit le foyer infectieux à un territoire topographique bien délimité alors que l'on aurait pu envisager *a priori* une extension bien plus importante et rapide de conidies viables et donc des lésions à l'ensemble du tractus respiratoire par le biais des cycles respiratoires.

Cette circulation restreinte rend compte des capacités de clairance du poumon et du développement progressif des lésions par contiguïté à partir du site d'injection dans notre modèle.

Les voies d'infection expérimentale permettant un développement bilatéral de l'aspergillose nécessiteraient de recourir à l'administration d'un aérosol de spores ou la voie intra-trachéale.

La voie intra-trachéale présente l'avantage de pouvoir quantifier l'*inoculum* qui est administré en suspension ou en nébulisation. En revanche, la suspension ou les particules nébulisées ne peuvent généralement pas atteindre en totalité l'appareil respiratoire profond des oiseaux car le diamètre des bronchioles terminales n'excède pas 10 µm alors que le diamètre des particules nébulisées avoisine généralement 20 µm. D'autre part, lors d'administration vigile, l'inoculation provoque une toux chez l'oiseau avec élimination non contrôlée d'une partie de l'*inoculum* (13).

La voie aérienne semble donc la plus intéressante *a priori*. Un modèle murin d'aspergillose pulmonaire invasive a été mis en place en infectant les souris par aérosol dans une enceinte confinée (37). Les auteurs ont prouvé que la quantité de conidies inhalées puis retrouvées dans les poumons était fonction de la concentration de l'aérosol et que ces résultats étaient reproductibles.

L'avantage majeur d'un tel modèle sera de pouvoir tester l'efficacité des contaminations par des doses variables de spores et notamment de faibles doses répétées dans le temps (on reproduira alors mieux la forme chronique qui est celle la plus couramment rencontrée en élevage sur des animaux soumis de manière répétée à une charge en conidies plus modérée que lors d'aspergillose aiguë). Il sera également possible de varier les durées d'exposition et de faire des co-infections avec différentes souches d'*A. fumigatus* ou avec d'autres agents pathogènes (ou fractions d'agents pathogènes comme le lipopolysaccharide pariétal des bactéries Gram négatives) afin de mieux caractériser le processus de contamination des

oiseaux en élevage en fonction des niveaux d'exposition.

La technique que nous avons utilisée est déjà validée chez le poulet (26) et dans d'autres modèles aviaires (dindes notamment) (24). Les biomarqueurs quantifiables suivis sont reproductibles d'une étude à l'autre. C'est le cas par exemple du nombre d'ufc/g de poumon, des signes cliniques et des lésions macroscopiques et histologiques.

Par contre, on ne retrouve pas les mêmes résultats pour le dosage du galactomannane.

D'après les instructions du kit Platelia® *Aspergillus*, les résultats sont positifs quand l'index calculé ($I = DO_{\text{échantillon}} / VS$) est supérieur à 1,5.

Or, dans notre étude, les valeurs de l'index sont nettement supérieures à 1,5 chez tous les individus qu'ils soient inoculés avec des conidies ou non.

Les témoins présentent notamment une nette augmentation de l'index à J6.

La réalisation du test ne semble pas mise en cause car les critères de validation du test (index des sérums seuils) sont respectés.

Le Loc'h (2006) et Mazzola-Rossi (2007) décrivent également des index relativement élevés ($I=3$) dans les lots témoins non inoculés, pour la dinde comme pour le poulet. Il semblerait donc qu'il y ait présence de galactomannane (ou d'une substance antigéniquement proche) à une concentration relativement élevée dans le sérum des oiseaux avant inoculation.

L'augmentation de la quantité de galactomannane chez les poussins témoins à J6 est concomitante de l'apparition de contaminants (*Penicillium*, mucorales et levures) dans les boîtes de culture. Or, les *Penicillium* synthétisent également du galactomannane.

Ces contaminants peuvent provenir de la flore d'inoculation aux poussins axéniques pour l'acquisition du statut EOPS. Nous n'avons pas réalisé d'analyse mycologique de l'air ambiant, mais la possibilité de contaminations par ce biais semble très peu probable ; l'analyse mycologique de l'aliment poussin distribué s'est révélée négative.

Le Loc'h (2006) a mis en évidence le passage du galactomannane dans le sang des dindes suite à l'inoculation de conidies dans le SATCG. Il le décrit comme un bon biomarqueur de l'infection aspergillaire dans ce modèle permettant de distinguer des oiseaux inoculés et des oiseaux sains dès J1 et ce jusqu'à J6 au moins.

Nos résultats montrent qu'il n'y a plus de différence significative à partir de J6 entre les lots inoculés et témoins. Ainsi le dosage, de galactomannane n'est pas forcément intéressant à utiliser pour la détection de l'aspergillose en élevage. En effet, sur le terrain, les oiseaux sont

de facto exposés à des contaminants de toutes natures (antibiotiques, espèces fongiques, matières premières de l'aliment) pouvant donner des réactions croisées lors de l'utilisation du test Platelia®. Ceci ne remet pas en cause son intérêt dans le cadre du suivi d'infection expérimentale dans un cadre rigoureusement contrôlé.

La souche GFP semble plus virulente que la souche WT (CBS 144-89) : un plus grand nombre d'animaux inoculés ont présenté des signes cliniques ceux-ci se déclarant un jour plus tôt et disparaissant un jour plus tard (même observation pour les lésions macroscopiques et microscopiques et un nombre d'ufc/g de poumon supérieur à tous les temps). De plus, pour certains marqueurs les résultats sont en faveur d'une infection plus marquée dans le lot GFP+PBS que dans les lots ayant reçu deux doses de conidies. C'est le cas par exemple des lésions microscopiques et du nombre d'ufc/g de poumon à J6.

Le fait que l'on retrouve, en culture, une écrasante majorité de colonies de la souche exprimant la GFP à partir de J4 dans le lot WT+GFP peut être un argument en faveur du fait que celle-ci est plus virulente que la souche WT. On pourrait penser qu'à J4, les spores WT sont déjà éliminées par les défenses immunitaires innées de l'hôte et que les GFP prennent alors le dessus. Ce n'est probablement pas le cas dans la mesure où pour le lot témoin WT+PBS le nombre d'ufc/g de poumon ne diminue pas à J4.

Les souches aspergillaires possédant des conidies vertes exprimeraient un pouvoir pathogène plus important que les souches naturellement dépigmentées ou mutante (22). Les pigments tels que le dihydroxynaphthalène-mélanine inhiberaient la phagocytose des conidies.

Par ailleurs, on ne peut exclure une association entre l'adjonction du gène *gfp* et une augmentation de la virulence.

Il serait intéressant de faire la même expérimentation en inoculant d'abord la GFP puis la souche de référence. Pour confirmer ou infirmer une plus grande virulence de la souche il faudrait faire une DL50.

Le fait d'inoculer des conidies dans le SATCG deux fois à trois jours d'intervalle n'accroît pas chez les oiseaux l'intensité des marqueurs d'infection (signes cliniques, lésions macroscopiques et microscopiques, ufc/g de poumon, nombres d'individus positifs pour les cultures de poumons et de sacs aériens) par rapport aux lots inoculés une seule fois. Cependant, l'ensemble des marqueurs de l'infection persistent plus longtemps pour les lots inoculés deux fois.

Les défenses immunitaires mobilisées suite à la première inoculation sont déjà sur le lieu du développement du champignon (présence de cellules phagocytaires dès J3 chez le poulet (26)), ceci pourrait expliquer que les marqueurs de l'infection ne sont pas plus élevés suite à la deuxième inoculation. Leur persistance serait imputable au débordement momentané des défenses de l'hôte qui mettraient donc plus de temps à neutraliser et éliminer les éléments fongiques.

Ainsi, malgré le fait que les poussins des lots WT+WT et WT+GFP reçoivent deux fois plus de conidies que les autres oiseaux on observe également une phase de résolution conforme, bien que plus tardive, à celle déjà décrite dans les études précédentes et observée dans les lots inoculés à une seule reprise dans notre étude.

Le fait que l'administration localisée (injection dans le SATCG) d'un *inoculum* même très concentré donne des lésions bien circonscrites est en faveur d'une organisation plus efficace des défenses immunitaires sur un site limité que lors d'une atteinte plus modérée *a priori* (*inoculum* plus faible) mais plus homogène du parenchyme pulmonaire (comme c'est le cas dans les conditions naturelles) (17).

Ceci rend compte de l'importance de la sensibilité de l'hôte dans l'expression du pouvoir pathogène d'*A. fumigatus*. En effet, la phase de rémission correspond à une destruction efficace des filaments fongiques par les défenses immunitaire de l'hôte.

Ceci souligne encore le fait que le développement de l'hyphe est déterminant dans l'expression du pouvoir pathogène du champignon (synthèse d'enzymes et de toxines). D'où l'intérêt du suivi de l'infection au moyen de l'imagerie dynamique.

CONCLUSION

Nous avons mis en place deux modèles afin d'étudier les stades précoces du développement d'*A. fumigatus* chez les poussins. Ceux-ci ont fourni des axes de réflexion et des éléments intéressants pour une meilleure compréhension de l'aspergillose aviaire.

Grâce à l'imagerie dynamique par fluorescence nous avons pu suivre *in situ* la croissance du champignon ainsi que l'extension des lésions pulmonaires pendant 4 jours. On observe que le développement macroscopique des lésions est très intimement lié à la présence des hyphes fluorescents.

Cette technique est intéressante à partir de 15 heures après l'inoculation des conidies. Avant cela, aucun signal n'est observé car la surface fongique globale constituée par les conidies DsRed et leur longueur d'onde d'émission sont trop faibles.

Il serait intéressant de reproduire cette étude sur une période plus longue, incluant ainsi la phase de rémission (qui correspond à la destruction des hyphes) observée dans de précédentes études (à J7- J9) (26, 10).

D'autre part, le suivi des différents marqueurs de l'infection a montré que les oiseaux ayant subi une co-infection ou une infection répété, par voie intra sac aérien, présentent des manifestations sévères de la maladie de J1 à J6, mais qu'ils sont capables d'éliminer l'agent pathogène à partir de J9. Les poussins ayant reçu deux doses de conidies ne présentent pas de signes plus marqués de l'infection que ceux ayant reçu une seule dose, mais ces signes persistent plus longtemps (jusqu'à J12).

Ceci rend compte de l'importance de la sensibilité de l'hôte (notamment l'intervention de ses défenses immunitaires) dans l'expression du pouvoir pathogène d'*A. fumigatus*, plus que de la quantité de conidies reçue par l'animal.

Afin de reproduire au mieux l'infection telle qu'elle se manifeste en élevage, il est prévu de réaliser des infections par voie aérienne au moyen d'une chambre d'inhalation (actuellement en construction).

BIBLIOGRAPHIE

1. Arca-Ruibal B, Wernery U, Zachariah R, Bailey TA, Di Somma A, Silvanose C, McKinney P. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *The Veterinary Record*, 2006, **158**, 442-444.
2. Atasever A, Gümüşsoy K. Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starling. *J Vet med A physiol Pathol Clin Med*, 2004, **51**, 19-22.
3. Bauck L. Mycose. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. *Avian medicine: Principles and application*. Lake Worth: Wingers publishing, 1994, 997-1006.
4. Biorad. Platelia® *Aspergillus* 62797. Notice explicative.
5. Bourgeois V. *L'aspergillose du dindon. Contribution à l'étude de l'épidémiologie chez les reproducteurs mâles*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1991, n°72, 77p.
6. Chermette R, Bussieras J. *Abrégé de parasitologie vétérinaire. Fascicule V: mycologie vétérinaire*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de parasitologie et Maladies parasitaires, 1993, 179p.
7. Clemons KV, Stevens DA. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Medical Mycology*, 2005, Supplement I, **43**, S101-S110.
8. Dyar P, Fletcher O, Page R. Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. *Avian Diseases*, 1984, **28**, 250-255.
9. Fedde M. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*, 1998, **77**, 1130-1138.
10. Féménia F, Fontaine JJ, Lair-Fullerenger S, Huet D, Berkova N, Ibrahim-Granet O, Le Loc'h G, Arné P, Guillot J. Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathology*, 2007, **36**, 213-219.
11. Ghori HM, Edgar SA. Comparative susceptibility of chickens, turkeys and Coturnix quail to aspergillosis. *Poultry Science*, 1973, **52**, 2311-2315.
12. Ghori HM, Edgar SA. Comparative susceptibility and effect of mild *Aspergillus fumigatus* infection on three strains of chickens. *Poultry Science*, 1979, **58**(1), 14-17.
13. Graczyk TK, Cranfield MR, Klein PN. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian aspergillosis. *Mycopathologia*, 1998, **140**, 121-127.
14. Gümüşsoy K, Uyanik F, Ataseveer A, cam Y. Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in quails and results of treatment with itraconazole. *J Vet Med B*, 2004, **51**, 34-38.
15. Jones MP, Orosz SE. The diagnostic of aspergillosis in bird. *Seminar in Avian and Exotic Pet medicine*, 2000, **9** (2), 52-58.

16. Khoufache K, Puel O, Loiseau N, Delaforge M, Rivollet D, Coste A, Cordonnier C, Escudier E, Botterel F, Bretagne S. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology*, 2007, 7.
17. Kunkle RA. Fungal infections. In : Saif YM. 11th ed. *Disease of poultry*. Iowa : Iowa State Press, 2003, 883-895.
18. Kunkle RA, Rimler RB. Pathology of acute aspergillosis in turkeys. *Avian diseases*, 1996, **40**, 875-886.
19. Kunkle RA, Rimler RB, Steadham E. Absence of protection against challenge with *Aspergillus fumigatus* by adoptive transfert of splenocytes from convalescent turkeys. *Avian Disease*, 1999, **43**, 678-684.
20. Kunkle RA, Sacco RE. Susceptibility of coalescent turkeys to pulmonary aspergillosis. *Avian Diseases*, 1998, **42**, 787-790.
21. Lair-Fullerenger SL, Seguin D, Warin S, Bezille A, Desterque C, Arné P, Chermette R, Bretagne S, Guillot J. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poultry Science*, 2006, **85**(11), 1875-1880.
22. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, **12**, 310-350.
23. Le Loc'h G. *Diagnostic sérologique de l'aspergillose chez les oiseaux*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2005, 105 p.
24. Le Loc'h G. *Mise en place d'un modèle d'aspergillose aviaire et recherche de biomarqueurs d'une infection à Aspergillus fumigatus chez la dinde (Meleagris gallopavo)*. Rapport de Master 2, Université Paris VI- Pierre et Marie Curie, 2006, 32 p.
25. Lierz M. Use of inhalation chamber for aspergillosis therapy. *Exotic DMV*, 2000, **2**(3), 79-80.
26. Mazzola-Rossi E. *Etude de la sensibilité de 5 lignées de poulets (Gallus gallus) vis-à-vis de l'infection expérimentale par Aspergillus fumigatus*. Rapport de Master 2, Université Paris VI- Pierre et Marie Curie, 2007, 30p.
27. Mikkelsen L, Sarrocco S, Lübeck M, Funck Jensen D. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiology, Letters* 223, 2003, 135-139.
28. O'Malley B. *Clinical anatomy and Physiology of Exotic Species*. Elsevier Verlag, 2005, 320 p.
29. O'Meara DC, Chute HL. Aspergillosis experimentally produced in hatching chicks. *Avian disease*, 1959, **3**, 404-406.

30. Pasanen A, Kalliokoski P, Pasanen P, Jantunen M, Nevalainen A. Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. *Environment International*, 1991, **17**, 225-228.
31. Patterson T. The future of animal models of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 2005, **43**, supplement 1, 115-119.
32. Redig PT. Avian aspergillosis. In: FOWLER ME. *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. 3th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993, 178-181.
33. Reese S, Dalamani G, Kaspers B. The avian lung-associated immune system: a review. *Vet. Res.*, 2006, **37**, 311-324.
34. Richard JL, Cutlip RC, Thurston JR, songer J. Response of turkey poult to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Avian Diseases*, 1980, **25**(1), 53-67.
35. Richard JL, Thurston JR. Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkeys poult following aerosol exposure. *Avian Diseases*, 1983, **27**, 1025-1033.
36. Richard JL, Thurston JR, Peden WN, Pinello C. Recent studies on aspergillosis in turkey poult. *Mycopathologia*, 1987, 3-11.
37. Sheppard DC, Rieg G, Chiang L, Filler S, Edwards J, Ibrahim A. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**, 1908-1911.
38. Taylor JJ, Burroughs EJ. Experimental avian aspergillosis. *Mycopathologia mycologia Applicata*, 1973, **51**, 131-141.
39. Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*, 2005, Supplement I, **43**, S71-S73.
40. Tell LA, Smiley-Jewell S, Hinds D, Stephens KE, Teague SV, Plopper CG, Pinkerton KE. An aerosolized fluorescent microsphere technique for evaluating particle deposition in the avian respiratory tract. *Avian Diseases*, 2006, **50**, 238-244.
41. Vallon-Eberhard A, Landsman L, Yogev N, Verrier B, Jung S. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *The Journal of immunology*, 2006, **176**, 2465-2469.
42. Van Custem J, Van Gerven F, Jansen P. Oral and parenteral therapy with saperconazole (R 66905) of invasive aspergillosis in normal and immunocompromised animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, **33**, 2063-2068.
43. Wasyluka JA, Moore M. Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantification using strains expressing green fluorescent protein. *Infect. Immune*, 2002, **70**, 3156-3163.

44. Wingard JR, Leather H. A new era of antifungal therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2004, **10**, 73-90.