



**HAL**  
open science

# Étude de la flore fongique cutanée colonisant le cheval

Charlotte Catry

► **To cite this version:**

Charlotte Catry. Étude de la flore fongique cutanée colonisant le cheval. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01330906

**HAL Id: dumas-01330906**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01330906>**

Submitted on 13 Jun 2016

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

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

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2015  
Par M<sup>elle</sup> Charlotte CATRY

# **ETUDE DE LA FLORE FONGIQUE CUTANEE COLONISANT LE CHEVAL**

JURY :

Président : M<sup>me</sup> Sylvie BALTORA, Professeur

Membres : M<sup>me</sup> Catherine FRANCOIS, Maître de conférence- Praticien hospitalier

Mr. Taieb CHOUAKI, Praticien hospitalier

M<sup>me</sup> DAMIANI Céline, Maître de conférence- Praticien hospitalier

Thèse n°



## **Remerciements**

Au **Docteur Catherine FRANCOIS**,

Pour avoir accepté de diriger ma thèse, merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et vos conseils tout au long de ces recherches.

Que vous trouviez ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect les plus sincères.

Merci.

Au **Professeur Sylvie BALTORA**,

Pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir d'accepter de présider ma soutenance de thèse.

Recevez mes plus sincères remerciements.

Hommages respectueux

Au **Docteur Taieb CHOUAKI**,

Pour ses précieux conseils et son implication dans ce travail de recherches.

Sincères remerciements.

Au **Docteur Céline DAMIANI**,

Pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Recevez mes profonds remerciements.

**A mes parents,**

Pour leur amour et leur soutien tout au long de mes études,

Merci pour tout.

**A ma grande sœur Mathilde,** qui est bien plus qu'un modèle,

A nos fous rires que nous sommes les seules à comprendre, nos départs en vadrouille et tout le reste...

Avec tout mon amour

Merci

**A M. CAPELLIER et toute l'équipe de la pharmacie Artois-Champagne**

Qui ont fait de ma 6<sup>ème</sup> année une année inoubliable.

Merci du fond du cœur.

**A mes amis,** toujours présents de la fac ou d'ailleurs que je ne peux pas tous citer mais qui se reconnaîtront. Merci d'être là.

**A mes chevaux,**

Les présents, les absents, tous ceux qui m'ont apporté du bonheur à un moment ou à un autre de ma vie. Mention spéciale à ma WHY NOT qui est et restera toujours le cheval de ma vie, merci d'avoir contribué à rendre ma vie plus belle encore.

## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| TABLE DES FIGURES.....   | 6  |
| PARTIE I : INTRODUCTION.....   | 7  |
| I) Qu'est-ce qu'un champignon ? .....  | 9  |
| II) Les Dermatophytes : généralités et pathologies chez le cheval .....                        | 9  |
| A) Qu'est-ce qu'un dermatophyte ? .....  | 9  |
| B) Contamination .....   | 11 |
| C) Dermatophytose du cheval : la teigne .....  | 11 |
| III) Les Aspergillus : généralités et pathologies chez le cheval .....                         | 16 |
| A) Qu'est-ce qu'un Aspergillus ? .....   | 16 |
| B) Les Aspergilloses du cheval .....   | 19 |
| IV) Environnement et utilisation des fongicides .....  | 24 |
| A) La septoriose : .....   | 24 |
| B) <i>Botrytis</i> .....   | 25 |
| C) Oïdium .....  | 26 |
| D) Fusariose.....  | 27 |
| PARTIE II : MATERIELS ET METHODES.....   | 29 |
| I) Prélèvements des échantillons.....  | 30 |
| II) Examen direct.....   | 30 |
| III) Ensemencement.....  | 31 |
| IV) Identification .....   | 31 |
| V) Isolement des souches d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....                                 | 32 |
| VI) Conservation des souches d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....                             | 32 |
| VII) Test de sensibilité aux antifongiques et mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices | 32 |
| PARTIE III : RESULTATS .....   | 35 |
| I) Identifications.....  | 36 |
| II) Concentrations minimales Inhibitrices .....  | 40 |
| PARTIE IV : DISCUSSION.....  | 45 |
| I) Prélèvements.....   | 46 |
| II) Identifications.....   | 46 |
| III) Souches anormales, environnement et transmission à l'Homme .....                          | 47 |
| BIBLIOGRAPHIE :.....   | 50 |

## **TABLE DES FIGURES**

Figure 1 : Schéma d'une tête aspergillaire

Figure 2 : Epistaxis chez un cheval

Figure 3 : Jetage muco-purulent chez un cheval

Figure 4 : Kératite fongique chez un cheval

Figure 5 : Feuille de blé atteint de septoriose

Figure 6 : Botrytis de la vigne, atteinte de la grappe

Figure 7 : Botrytis de la fraise

Figure 8 : Epis et feuille de blé contaminé par *Erysiphe graminis*

Figure 9 : Fusariose de la pomme de terre

Figure 10 : Fusariose du blé, atteinte des épis

Figure 11 : Boîte de Pétri

Figure 12 : Ecouvillon

Figure 13 : Curette dermatologique

Figure 14 : Technique du drapeau

Figure 15 : Schéma descriptif d'une tête aspergillaire

Figure 16 : Plaque Sensititre Yeastone® après incubation

# **PARTIE I :**

# **INTRODUCTION**

La France compte près d'un million de chevaux sur son territoire et environ 700 000 licenciés à la FFE ce qui place l'équitation au 3<sup>ème</sup> rang des sports les plus pratiqués derrière le football et le tennis.

C'est un sport pratiqué à tout âge et qui touche l'ensemble de la population (hommes, femmes, enfants...) même si les femmes restent majoritaires puisqu'elles représentent 83% des licenciés.

Les chevaux sont des animaux fortement exposés aux moisissures et aux champignons notamment en raison de leur mode de vie continuellement en contact avec le foin et la paille. De plus, la teigne est l'une des pathologies cutanée la plus fréquemment rencontrée chez le cheval. Les champignons font donc partie du quotidien à la fois pour les chevaux et pour les cavaliers qui les entourent.

Les écuries sont le plus souvent situées en milieu rural, donc confrontées notamment à la présence de pesticides. Les phénomènes de résistances aux antifongiques étant en constante expansion, les chevaux sont susceptibles de devenir un véritable réservoir de souches résistantes.

Le but de cette thèse est d'évaluer la flore commensale du pelage du cheval et notamment la présence de deux espèces de champignons souvent rencontrées en pathologie équine : les *Dermatophytes* et les *Aspergillus*. Nous aborderons également l'influence des pesticides sur l'apparition de souches résistantes au sein des échantillons.

Pour cela, des prélèvements ont été réalisés au sein d'une écurie située dans l'Aisne, puis mis en culture et analysés.

Les *Dermatophytes* sont les champignons responsables des teignes chez le cheval et l'humain tandis que les *Aspergillus* sont les moisissures les plus fréquemment rencontrées dans l'environnement représentés en grande majorité par *Aspergillus fumigatus*. A l'origine de diverses pathologies à la fois chez l'homme et chez le cheval notamment chez les individus immunodéprimés, c'est l'un des champignons les plus fréquemment touché par des mutations d'origine environnementale lui conférant une résistance aux antifongiques azolés.

Dans une première partie, nous verrons les principales pathologies équines causées par les *Dermatophytes* et les *Aspergillus* ainsi que l'utilisation des antifongiques dans l'environnement.

Dans une seconde partie, nous décrirons les principales techniques utilisées pour la réalisation et l'analyse des prélèvements.

La troisième partie présentera l'analyse des résultats obtenus puis dans une quatrième partie nous aborderons l'impact de l'environnement sur l'apparition de souches résistantes ainsi que la transmission de ces souches à l'Homme.

## I) Qu'est-ce qu'un champignon ?

Les Champignons constituent l'un des six règnes du vivant aux côtés des Procaryotes, des Protistes, des Végétaux, des Animaux et des Chromistes selon la classification à six règnes de Cavalier-Smith(1).

Au sein de ce grand règne des *Fungi*, tous les champignons possèdent des caractères communs à savoir :

- ce sont des organismes **eucaryotes** (les cellules possèdent un noyau),
- ils sont **hétérotrophes** et incapables de phagocyter des éléments, ils se nourrissent donc par **absorption** de substances minérales dissoutes,
- ils sont constitués d'un appareil végétatif diffus, ramifié et tubulaire appelé le **thalle**,
- leur reproduction, sexuée ou asexuée, est assurée par des **spores**,
- ils possèdent une paroi cellulaire **chitineuse**.

Trois modes de vie sont observables :

- Le saprophytisme : le champignon vit aux dépens de la matière organique en décomposition.
- Le parasitisme : le champignon vit aux dépens d'autres êtres vivants.
- La symbiose : le champignon se nourrit aux dépens d'un être vivant qui tire lui aussi un bénéfice de cette relation.

## II) Les Dermatophytes : généralités et pathologies chez le cheval

### A) Qu'est-ce qu'un dermatophyte ? (2,3;6)

Les dermatophytes appartiennent à la classe des Ascomycètes, famille des *Arthrodermataceae* et ordre des Onygnéales.

La famille des Ascomycètes suppose une reproduction sexuée par formation d'ascospores, cependant, in vivo la reproduction asexuée est largement majoritaire ce qui amène à les classer dans le *phylum* des Deutéromycètes.

La reproduction asexuée se fait par simple division de la cellule fongique par mitose. Les spores sont produites par des structures spécialisées du thalle appelées les conidies.

On en distingue deux types : des spores unicellulaires appelées microconidies, et des spores pluricellulaires à base tronquée et cloisonnées transversalement appelées les macroconidies.

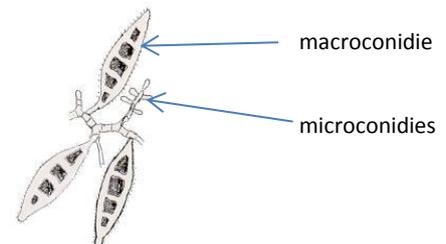
On peut également observer des spores asexuées qui ne vont pas se détacher du mycélium appelées chlamydospores.

Les dermatophytes sont des micromycètes filamenteux à thalle cloisonné. Ce sont des champignons aérobies dont la croissance optimale est observée entre 20 et 30°C et dont le pH adéquat varie de 5 à 7. Pour se développer correctement, ils requièrent de l'eau, une source carbonée et une source d'azote.

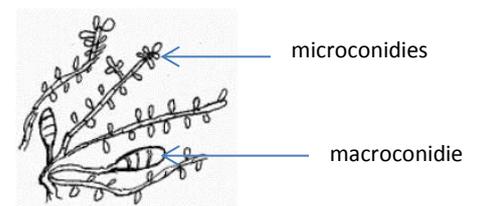
Leur principale caractéristique est leur affinité pour la kératine d'où leur tropisme pour la peau, les poils, les cheveux et les ongles ce qui en fait des champignons très présents en pathologie humaine et vétérinaire.

Il existe trois genres de dermatophytes, définis d'après les caractéristiques morphologiques de leurs éléments de reproduction :

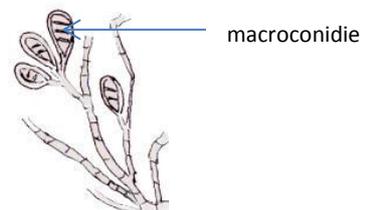
-*Microsporium* : microconidies piriformes, macroconidies en fuseau et à paroi épaisse



-*Trichophyton* : microconidies rondes ou piriformes, macroconidies à paroi mince et lisse et bout arrondi



-*Epidermophyton* : pas de microconidies, présence de macroconidies en forme de massues et à paroi mince



## B) Contamination (2,3,5)

Les dermatophytes sont pour la plupart des champignons parasites, ce qui leur confère une contagiosité manifeste.

Il existe trois modes de contamination :

- Le mode de contamination **interhumaine** par des dermatophytes anthropophiles bien adaptés à l'homme. Ils sont responsables la plupart du temps de lésions discrètes et bien tolérées comme « le pied d'athlète » qui correspond à une lésion des espaces interdigitaux plantaires. La contamination peut être directe ou indirecte. Elle se fait par la pénétration de spores qui sont présentes dans les lésions elles-mêmes mais également dans les débris d'ongles, de squames, de cheveux ainsi que dans le linge de toilette, les vêtements, les chaussures, etc.
- Le mode de contamination **zoophile** par des dermatophytes peu ou pas adaptés à l'homme. Ils sont responsables de lésions souvent inflammatoires et mal tolérées. Ce mode de contamination n'est pas le plus fréquent et survient le plus souvent dans un contexte professionnel (éleveurs, vétérinaires...) ou par l'intermédiaire des animaux de compagnie très nombreux en France. En effet, selon le ministère de l'agriculture, aujourd'hui près de deux foyers sur trois possèdent un animal de compagnie et on estime à plus de 18 millions le nombre de chiens et de chats et à près d'un million le nombre de chevaux(7).
- Le mode de contamination **tellurique** par des dermatophytes déposés sur un sol riche en kératine animale (écuries, étables...). Ces dermatophytes dégradent la kératine déposée par les animaux (poils, crins, corne...) sur le sol. Cependant ces champignons sont peu agressifs et très rarement impliqués en pathologie humaine.

## C) Dermatophytose du cheval : la teigne

La teigne est l'une des pathologies dermiques les plus courantes chez le cheval. Plusieurs espèces de dermatophytes peuvent la provoquer avec des signes cliniques variables. Ainsi, les dermatophytes pathogènes les plus souvent isolés chez le cheval sont des espèces zoophiles : *Trichophyton equinum*, *Trichophyton*

*mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum equinum*, ou géophile : *Microsporum gypseum*.

Les dermatophytoses surviennent le plus souvent l'hiver et sont favorisées par plusieurs facteurs, notamment les chevaux à peau fine, les jeunes chevaux, un mauvais état général, une corticothérapie ou une antibiothérapie. La transmission peut se faire de manière directe via un animal malade (la contagiosité étant très élevée), ou de manière indirecte par le sol ou du matériel contaminé (notamment brosses et harnachement).

On distingue une grande diversité de formes cliniques, variables selon l'espèce de dermatophyte en cause et la réponse inflammatoire de l'animal.

Après une période d'incubation de une à deux semaines, on observe des touffes de poils hérissés, agglomérées à leur base par une croûte de quelques millimètres. La touffe laisse place rapidement à une zone dépilée, circulaire, très nettement délimitée. Le plus souvent les lésions apparaissent au niveau du harnachement et sont à rechercher au niveau du passage de sangle, du tapis de selle et du licol.

L'aspect des lésions sera différent selon l'espèce de dermatophyte incriminée. On rencontre par ordre de fréquence :

-*Trichophyton equinum* provoque une teigne sèche, modérément squameuse avec des squames fines. Les lésions sont nombreuses, circulaires et alopeciantes voire même épilantes compromettant parfois la pousse du poil.

C'est une espèce spécifique des équidés et c'est la plus souvent rencontrée.

-*Microsporum canis var. equinum* provoque également une teigne sèche tondante où le poil est coupé à sa sortie du follicule. Les lésions sont peu nombreuses et il n'y a pas de prurit.

C'est une espèce que l'on retrouve principalement chez les carnivores domestiques mais qui peut également être pathogène chez tous les mammifères y compris l'homme.

-*Trichophyton mentagrophytes* provoque une teigne humide constituée de lésions croûteuses de tailles variables, irrégulières. Elles sont inflammatoires, suppurées et en relief faisant parfois penser à une pyodermite.

C'est une espèce principalement retrouvée chez les rongeurs et les lapins mais qui peut également être pathogène chez l'homme, les chevaux, les carnivores domestiques et les cochons.

-*Microsporum gypseum* provoque des lésions circulaires extensives où le poil donne l'impression d'être feutré. Sous la croûte on observe un ulcère à fond rouge.

C'est une espèce géophile mais qui peut également parasiter l'homme, les chevaux, les carnivores domestiques, le porc et les rongeurs.

-*Trichophyton verrucosum* provoque une teigne très croûteuse dont les squames sont épaisses et adhérentes. Les lésions sont proches de celles provoquées par *Trichophyton mentagrophytes* mais en plus inflammatoire.

Cette espèce est rarement rencontrée, elle est plutôt isolée chez les ruminants.

### Diagnostic :

Le diagnostic est essentiellement fondé sur l'anamnèse et en particulier sur le caractère contagieux des dermatophytoses.

Les signes cutanés doivent être observés avec précision mais ne dispensent pas le recours aux examens complémentaires réalisés en laboratoire pour confirmer le diagnostic.

Cependant, en pratique ils sont assez rarement réalisés.

Comme chez l'humain, le prélèvement se fait par raclage des lésions ou à l'aide d'un écouvillon stérile. On réalise ensuite un examen direct des prélèvements après un éclaircissement prolongé à la potasse (chez le cheval on préférera la potasse au lactophénol du fait de l'épaisseur des poils et de l'abondance de mélanine). L'examen direct est simple, peu coûteux et donne une réponse rapide permettant la mise en place d'un traitement adapté. Cependant il ne permet pas la mise en évidence de l'espèce concernée. Ainsi le prélèvement devra également être envoyé au laboratoire de mycologie et mis en culture pour mettre en évidence le dermatophyte pathogène afin d'isoler la source et d'éviter les récurrences.

L'analyse des cultures est rendue plus difficile par la présence de nombreux autres champignons présents sur la robe du cheval et notamment des Dématiacées, contaminants provenant des végétaux. Cependant, ces derniers présentent une paroi brune ou brun-jaunâtre, contrairement aux dermatophytes qui ont une paroi hyaline.

Chez le cheval, le résultat des cultures de cas suspectés de dermatophytoses est positif dans seulement 10 à 23% des prélèvements (9).

Les dermatophytoses peuvent être sur-diagnostiquées lorsque le diagnostic n'est posé que sur la clinique mais également sous-diagnostiquées du fait de la variabilité des signes cliniques selon l'espèce incriminée. Dans tous les cas, le diagnostic ne peut jamais être affirmé sur la clinique seule.

## Traitements (10):

- Traitement par voie orale

Comme chez l'homme, un seul antifongique possède l'AMM et peut être utilisé chez le cheval dans le traitement des teignes. Il s'agit de la griséofulvine (c'est également la molécule utilisée chez le chat et le chien). Si plusieurs chevaux sont atteints au sein de la même écurie le traitement devra être réalisé au même moment pour tous les individus.

### Spécialité disponible :

DERMOGINE®

-Boîte de 20 sachets de 175g de poudre

-Sceau de 1,750kg de poudre contenant une dosette de 5/10g et une dosette de 70g

NB : DERMOGINE® est un médicament classé liste I et nécessite donc une ordonnance établie par un vétérinaire pour être délivré en officine

### Posologie et mode d'administration:

Deux schémas sont possibles :

-soit 10mg de griseofulvine par kg de poids vif et par jours pendant une durée de 7 jours (soit une dose de 50g pour un cheval de 500kg)

-soit il est possible de faire uniquement deux traitements espacés de 3 à 5 jours à la dose de 35mg de griseofulvine par kg de poids vif (soit une dose de 175g pour un cheval de 500kg)

Pour une meilleure absorption et pour faciliter l'administration du produit il conviendra de mélanger la poudre à un aliment appétant.

### Contre-indications :

En raison du caractère tératogène de la griseofulvine, elle ne devra pas être administrée aux femelles gestantes.

De plus du fait de la lipophilie de la molécule, elle peut être retrouvée dans le lait maternel et ne doit donc pas être administrée chez les femelles dont le lait est destiné à la consommation humaine.

Le temps d'attente pour les animaux destinés à l'alimentation est de 6 mois.

- Traitement local

Un antifongique local est généralement associé au traitement systémique. On utilise chez les chevaux un antifongique azolé : l'enilconazole. C'est un antimycosique de synthèse chimiquement apparenté au miconazole qui possède en outre une certaine activité antibactérienne.

Il est très bien toléré, possède une marge de sécurité importante pour les animaux et ne présente aucun risque pour l'utilisateur qui devra tout de même porter des gants étanches en caoutchouc du fait du caractère irritant de la solution.

Il peut être utilisé chez les chevaux, les bovins, les chiens et les chats.

Il exerce une activité fongicide et sporicide sur les quatre espèces de dermatophytes rencontrées chez le cheval.

Spécialité disponible :

IMAVERAL®

Solution à 10g/100ml

Posologie et mode d'administration :

La solution d'IMAVERAL® doit être diluée à raison d'un volume pour 50 volumes d'eau tiède soit 100ml d'IMAVERAL® pour 5 litres d'eau.

On obtient ainsi une émulsion. La solution reconstituée devra être soigneusement agitée avant chaque utilisation. Elle se conserve 6 semaines à température ambiante.

Utilisé en friction ou en vaporisation sur les lésions 4 fois à 3 à 4 jours d'intervalle. Cependant la simple vaporisation n'est souvent pas suffisante il est donc recommandé d'éliminer les squames et les croûtes à l'aide d'une brosse imbibée du produit afin d'éliminer une partie des spores infectantes et de faciliter la pénétration de l'antifongique. De plus, il est préférable de traiter l'ensemble du corps lors du premier traitement pour atteindre les lésions subcliniques.

- Traitement du milieu extérieur

Il est indispensable en complément du traitement des chevaux du fait de la résistance des spores de dermatophytes dans l'environnement et de leur facile dispersion.

Il faut traiter les locaux (sol et parois), les véhicules de transport, le matériel de harnachement, le matériel de pansage ainsi que le matériel du cavalier (bottes, gants...).

Pour le matériel de pansage et le harnachement on peut utiliser une solution d'IMAVERAL® à 0.2% soit en immersion pendant 24 heures (brosses etc...), soit en pulvérisation (selle, sangle...).

### III) Les *Aspergillus* : généralités et pathologies chez le cheval

#### A) Qu'est-ce qu'un *Aspergillus* ? (2-4)(13)(14)

Les *Aspergillus* sont des champignons appartenant à la classe des Ascomycètes, famille des *Trichocomacées* ou *Aspergillacées*, ordre des Eurotiales.

Ce sont des moisissures à filaments hyalins cloisonnés formant un mycélium, des champignons aérobies, essentiellement saprophytes sur la matière organique en décomposition qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme du carbone et de l'azote. Ils ne requièrent pas d'éléments spécifiques pour leur croissance. De plus ils sont thermophiles et peuvent survivre à des températures dépassant les 70°C.

Les *Aspergillus* sont cosmopolites, on ne dénombre pas moins de 300 espèces. Dans les régions tempérées, c'est *Aspergillus fumigatus* qui prédomine notamment à la fin de l'été, en automne et en hiver.

Ce sont des champignons ubiquistes, on les retrouve aussi bien en milieu rural (céréales, paille, foin...) qu'en milieu urbain, et aussi bien en extérieur qu'en intérieur (poussières, conduits d'aération...) ce qui les place au septième rang des spores fongiques les plus fréquemment rencontrées selon Chabasse et al. (2002).

Cette omniprésence s'explique par la petite taille et l'hydrophobicité des conidies d'*Aspergillus* qui permettent leur mise en suspension aisée dans l'air.

Dans l'environnement, les *Aspergillus* se multiplient presque exclusivement sur un mode asexué. Dans les conditions optimales de développement et de multiplication, les conidies germent et le mycélium ainsi obtenu se couvre de têtes aspergillaires

(figure 1) qui produisent des milliers de conidies microscopiques qui sont ensuite libérées dans l'air.

La tête aspergillaire est l'une des principales caractéristiques des *Aspergillus* et permet leur identification. C'est un renflement du filament en une vésicule portant les cellules conidiogènes.

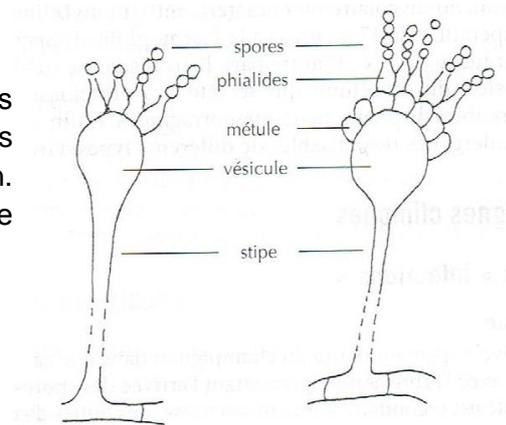


Figure 1 : Schéma d'une tête aspergillaire (11)

La croissance des *Aspergillus* est rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques, les colonies étant observées 24 à 48h après leur mise en culture. Cependant leur teinte caractéristique n'apparaît qu'après maturation des structures conidiogènes soit après 48 à 96h. Les colonies peuvent être brunes, vertes, jaunes ou noires selon l'espèce.

#### Mode de contamination :

Les *Aspergillus* sont extrêmement répandus dans la nature. Ils vivent en saprophyte dans le sol mais à la faveur d'un courant d'air, les spores sont disséminées sur les murs, dans les climatisations, les habitations, les vêtements...Leurs substrats sont extrêmement divers.

Les *Aspergillus* sont des champignons opportunistes dont la pathogénicité dépend énormément de facteurs favorisant.

L'abondance des spores en suspension dans l'air rend leur inhalation abondante et quotidienne. La principale voie de pénétration dans l'organisme est donc respiratoire. De plus le faible diamètre des spores (2 à 3 microns) permet leur pénétration jusqu'au niveau broncho-alvéolaire. Ce mode de contamination explique le fait que l'appareil broncho-pulmonaire soit le plus fréquemment touché par la maladie aspergillaire.

Il est également responsable de localisations sinusiennes.

Plus rarement, on peut observer une contamination directe après dépôt de spores sur des plaies ou des brûlures, aboutissant à des infections cutanées superficielles comme les otomycoses du conduit auditif externe ou des surinfections des lésions cutanées (notamment chez les brûlés).

## Facteurs favorisant :

- Une diminution des défenses immunitaires :

Les *Aspergillus* sont des champignons opportunistes et sont donc rarement pathogènes sur des individus sains. Toute baisse d'immunité favorise le développement d'une maladie. Notamment une corticothérapie au long cours, tous les traitements cytotoxiques ou immunosuppresseurs (notamment les chimiothérapies), certaines pathologies telles que le SIDA ou des hémopathies...

Chez l'homme, l'inhalation de conidies est généralement sans effet car les éléments fongiques sont efficacement éliminés par les défenses immunitaires innées. Cependant, avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, *A. fumigatus* est devenue l'espèce fongique la plus impliquée dans les maladies fongiques associées à l'immunodépression (Latgé, 1999 ; Cornet et al., 2002).

- Le nombre de spores inhalées :

Dans certaines situations, l'inhalation de spores peut être massive et notamment lors de l'inspiration de paille ou de foin moisi. Des spores sont alors retrouvées dans les sécrétions plusieurs jours après, même en l'absence de pathologie.

- La présence d'une cavité :

Chez le sujet non immunodéprimé, la pathologie la plus fréquemment rencontrée est l'aspergillome. Il résulte du développement in situ du champignon dans une bronche ou dans le parenchyme pulmonaire à la faveur d'une cavité préexistante. La cavité va constituer le lit de l'aspergillome qui formera une boule fongique appelée « truffe aspergillaire ».

Le plus souvent cette cavité fait suite à une tuberculose (cavernes tuberculeuses), à des bulles d'emphysème ou plus rarement à une silicose ou une sarcoïdose.

## Physiopathologie :

Le pouvoir pathogène des *Aspergillus* peut s'exercer de deux façons :

-d'une part le pouvoir infectieux : les spores de petit diamètre pénètrent dans les bronches jusqu'au niveau broncho-alvéolaire où elles germent. La formation du mycélium est favorisée par la température de 37°C, une espèce comme *A. fumigatus* pouvant se cultiver jusqu'à 45°C.

De plus, le tropisme vasculaire des *Aspergillus* favorise l'extension du mycélium qui sécrète des protéinases et des toxines nécrosantes responsables de phénomènes hémorragiques.

-d'autre part le potentiel allergisant : les spores des *Aspergillus* sont des pneumo-allergènes reconnus responsables de différents types d'hypersensibilité. La pathologie la plus courante en pathologie humaine est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique qui survient le plus souvent chez des sujets présentant un asthme atopique ou chez des sujets atteints de mucoviscidose.

C'est une réponse immunitaire locale qui survient suite à une colonisation aspergillaire chronique des bronches.

Les autres pathologies sont l'asthme aspergillaire survenant chez des sujets atopiques et qui est directement lié à la présence d'Aspergillus dans l'environnement, et la « Maladie du poumon de fermier » survenant chez des sujets non atopiques après inhalation massive de spores.

## B) Les Aspergilloses du cheval

De par leur environnement, les chevaux sont très fortement exposés aux spores d'Aspergillus. En effet, la paille et le foin de mauvaise qualité mais également les céréales mal entreposées sont de véritables réservoirs. Bien que demeurant relativement rares chez les individus sains, les aspergilloses équine sont souvent de très mauvais pronostic.

De plus, les Aspergillus semblent jouer un rôle important dans les phénomènes de toux allergique et notamment l'emphysème désormais appelé obstruction récurrente des voies respiratoires (ORVR), l'une des affections pulmonaires les plus fréquemment diagnostiquée chez les chevaux des régions tempérées.

- Aspergillose des poches gutturales (15)(17)

Chez toutes les espèces, le tube auditif fait communiquer le nasopharynx avec l'oreille interne. Chez les équidés, il existe une dilatation (diverticule) du tube auditif qui renferme de 300 à 500mL d'air et qui se nomme poche gutturale.

Leur fonction n'est pas parfaitement connue mais l'hypothèse la plus probable serait de refroidir le sang irrigant le cerveau afin de protéger l'encéphale d'un choc thermique délétère lors de l'effort. Ceci est possible grâce à leur relation intime avec l'artère carotide interne.

L'aspergillose des poches gutturales est une pathologie peu fréquente mais d'évolution rapide et souvent fatale.

Après contamination par les voies respiratoires, le champignon va se développer dans l'un ou l'autre voir les deux diverticules de la trompe d'Eustache.

Les Aspergillus étant présents communément dans les voies respiratoires du cheval et dans l'environnement, la question de savoir pourquoi ils sont susceptibles de devenir pathogènes chez des sujets non immunodéprimés et non débilités reste un mystère.

Cette pathologie survient plutôt chez des chevaux adultes, sans prédisposition de sexe ni de race, avec une incidence plus élevée en période chaude chez des individus confinés au boxe (Cook, Campbell et al. 1968)(18).

Les signes cliniques de cette pathologie vont dépendre de la structure anatomique sur laquelle se développe le mycélium. Le plus souvent, il apparaît dans le compartiment médian provoquant l'érosion de la muqueuse et à terme de la paroi vasculaire de l'artère carotide interne et des structures nerveuses adjacentes.

Cependant, la mycose peut rester asymptomatique plusieurs semaines voir plusieurs mois tant que les structures vasculaires et nerveuses ne sont pas atteintes.

Il existe un grand nombre de ces structures adjacentes aux poches gutturales ce qui explique la grande variabilité des symptômes d'un individu à l'autre.

Le plus souvent le tableau clinique apparaît brutalement.

L'épistaxis (figure 2) est le symptôme le plus fréquent. Il résulte de l'érosion de la paroi de l'artère carotide par le champignon. Il est modéré à sévère et survient en dehors de tout exercice. C'est cette manifestation qui confère le plus mauvais pronostic à cette pathologie car bien souvent, après quelques épisodes modérés, survient l'hémorragie fatale.

Chez certains individus on observera simplement un jetage muco purulent (figure 3), traduisant une forte inflammation des poches, cependant ce symptôme n'est pas spécifique d'une aspergillose et peut survenir dans plusieurs infections des voies respiratoires.



Figure 2 : Epistaxis chez un cheval (12)



Figure 3 : Jetage mucopurulent chez un cheval (12)

On peut également observer une grande variété de signes neurologiques dépendants de la structure nerveuse touchée :

-la dysphagie qui est le deuxième signe clinique le plus courant et qui peut dans les cas sévère entrainer une pneumonie par fausse déglutition

-des bruits respiratoires anormaux à l'exercice comme le cornage, dû à une hémiplegie laryngée, ou un déplacement dorsal du voile du palais caractérisé par une obstruction soudaine des voies respiratoires hautes pendant l'exercice.

-le syndrome de Claude Bernard Horner caractérisé par un myosis, une ptose de la paupière ainsi qu'une énoptalmie.

D'autres signes peuvent être observés comme une paralysie faciale ou un port de tête anormal.

Cependant, on n'observe généralement que trois ou quatre symptômes sur un même individu.

#### Diagnostic :

Il est très difficile dans les stades précoces de la maladie car elle est alors asymptomatique. Or, le diagnostic repose sur le recueil des signes cliniques. Cependant, il doit être obligatoirement complété d'un examen endoscopique qui mettra en évidence la localisation des lésions qui est un facteur pronostic important.

#### Traitement :

Le traitement dépendra en grande partie de la gravité des signes cliniques et de la localisation des lésions.

L'oblitération chirurgicale des artères affectées ou susceptibles de l'être est de nos jours le traitement de choix.

Le traitement médical est assez décevant et n'est plus d'actualité de nos jours. Cependant, en l'absence de lésions vasculaires et si aucune autre option n'est possible (pour des raisons économiques par exemple), il pourra tout de même être tenté. Dans ce cas on utilisera le thiabendazole en systémique auquel on ajoutera des instillations locales d'antifongiques à l'aide d'un cathéter inséré par voie nasale. Les molécules pouvant être utilisées sont l'iode organique à 0,1%, le miconazole, l'énilconazole, la natamycine, la nystatine, ou l'amphotéricine B.

- Pneumonie aspergillaire (15)(19)

La pneumonie aspergillaire est une maladie rare qui survient chez des animaux débilisés suite à une immunosuppression. Dans ces conditions, dans la plupart des cas la pneumonie survient suite à l'invasion du tractus digestif après translocation d'éléments fongiques à la faveur d'une rupture de la paroi intestinale et notamment suite à une entérocolite aiguë chez des sujets recevant des antibiotiques à large spectre et des AINS.

Les symptômes ne sont pas spécifiques, on peut observer un jetage nasal, une dyspnée, des bruits anormaux à l'auscultation, de la fièvre, abattement, amaigrissement....

Seule une radiographie pulmonaire peut mettre en évidence les lésions pulmonaires.

Le diagnostic ante mortem est difficile du fait de la non spécificité des symptômes. Ceci associé à l'état débilité de l'animal rend cette pathologie de très mauvais pronostic.

Néanmoins, le traitement qui semble le plus efficace est l'Amphotéricine B administrée à la dose de 0,1 à 0,5 mg/kg dans une solution glucosée à 5%, injectée 30 minutes trois fois par semaine.

Cependant très peu de succès thérapeutiques ont été reportés dans la littérature.

- Keratomyose (15)(20)



Figure 4 : Kératite fongique chez un cheval

Les keratomyoses sont des atteintes de l'œil fréquentes et graves chez le cheval, pouvant menacer la vision. Plusieurs champignons peuvent être responsables mais les aspergillus restent largement majoritaires du fait de leur abondance dans l'environnement.

Le plus souvent le champignon se développe à la faveur d'une rupture de l'épithélium cornéen (suite à un traumatisme par exemple), une simple disruption du film lacrymale, ou à la suite d'un traitement local par antibiotiques ou corticoïdes.

Les signes cliniques sont un œil douloureux (incluant blepharospasme, myosis, photophobie...), des écoulements oculaires séreux, des conjonctives rouges et éventuellement la présence de néo vascularisation (figure 4).

La vision du cheval est fortement menacée, il s'agit donc d'une urgence vétérinaire dont la prise en charge doit être rapide.

Le plus souvent, les keratomyoses sont associées à un ulcère.

Le diagnostic est essentiellement clinique mais doit toujours être complété par un prélèvement avant l'instauration d'un traitement.

De plus, toute blessure de la cornée par un corps étranger végétal ou tout ulcère de plus de 7 jours qui s'aggrave ou ne guérit pas doit faire suspecter une keratomyose.

Le traitement se fait essentiellement par voie locale. Il n'existe pas actuellement de préparation vétérinaire utilisable en France.

Les préparations utilisées viennent donc de la médecine humaine. La molécule qui semble être la plus efficace sur les keratomycoses aspergillaires et l'itraconazole dilué dans une solution de DMSO. Cependant, elle est réservée à l'usage hospitalier.

En pratique, 3 molécules sont disponibles en France et facilement utilisables sur le terrain :

-La terbinafine (LAMISIL® crème), elle offre un large spectre mais sa pénétration dans la cornée n'a pas été évaluée chez le cheval

-L'amphotéricine B (Fungizone®), disponible sous forme de poudre injectable, on peut la diluer dans une solution isotonique et l'utiliser en traitement local

-La sulfadiazine argentique (Flammazine®), sous forme de crème, elle est peu onéreuse et semble avoir une bonne efficacité sur la cornée du cheval.

- Obstruction récurrente des voies respiratoires (ORVR) (16)(21)

Egalement appelée « la pousse », c'est la cause la plus fréquente de maladie pulmonaire chronique chez le cheval adulte. C'est une maladie inflammatoire récurrente et réversible caractérisée par une obstruction intermittente des voies respiratoires profondes du cheval. L'étiologie précise de cette pathologie demeure vague à l'heure actuelle et de très nombreux facteurs semblent entrer en jeu, cependant la réponse inflammatoire survient typiquement suite à l'inhalation de paille ou de foin moisi.

L'obstruction est réversible et caractérisée par un bronchospasme, une accumulation de mucus ainsi qu'un remodelage des voies respiratoires. De plus, les chevaux atteints de pousse présentent une hyperréactivité bronchique, à savoir une réponse exagérée à des stimuli non spécifiques et notamment aux spores d'*Aspergillus*. Cette pathologie est également caractérisée par des périodes de rémission et des périodes de crises. Elle présente donc des similitudes avec l'asthme allergique chez l'humain. Les signes cliniques varient selon la sévérité de la maladie allant d'une simple augmentation du délai de récupération après un effort chez des chevaux peu atteints, à une dyspnée au repos dans les cas plus graves. De plus, la maladie étant réversible, un individu malade pourra sembler parfaitement normal lorsqu'il n'a pas été exposé à des antigènes depuis plusieurs semaines.

Classiquement les signes pouvant être rencontrés sont une tachypnée, une toux à l'effort, un jetage muco purulent, des difficultés respiratoires et notamment expiratoires avec une pousse abdominale marquée pouvant engendrer à terme une hypertrophie des muscles abdominaux externes appelée « ligne de pousse ».

De nombreux mécanismes et de nombreux facteurs environnementaux et même génétiques semblent entrer en compte dans cette pathologie. Cependant, des taux élevés d'immunoglobulines (IgE) dans le liquide de LBA de chevaux atteints d'ORVR confirment l'hypothèse d'une part allergique notamment aux moisissures d'*Aspergillus*. De plus, cette pathologie survient préférentiellement chez des chevaux

confinés aux boxes, exposés à des poussières, du foin et de la paille moisie. Cependant il semble exister une susceptibilité individuelle puisque dans les mêmes conditions, certains chevaux peuvent tomber malades, d'autres non.

Le traitement passe en grande partie par l'éviction des allergènes : passage sur une litière de copeaux dépoussiérés, foin mouillé ou enrubanné et éventuellement dans les cas les plus sévères, une mise au pré, le cheval devant être le moins possible exposé aux poussières et aux moisissures.

Le stockage de la nourriture devra par ailleurs se faire dans des conditions appropriées (endroit frais et sec) afin d'éviter le développement de champignons.

Le traitement de la crise est semblable à celui d'une crise d'asthme chez l'humain à savoir l'administration de corticostéroïdes pour diminuer l'inflammation ainsi que d'un bronchodilatateur d'action rapide pour soulager efficacement le cheval.

#### IV) **Environnement et utilisation des fongicides** (22-26)

Le sol et le climat particulièrement favorables au rendement des productions végétales font de la Picardie le premier producteur français de betterave à sucre et de pois. L'agriculture occupe 70% du territoire soit 132 000 hectares, spécialisés principalement dans les céréales (blé, maïs, orge), les oléoprotéagineux (colza, pois, tournesol) et bien sûr les autres grandes cultures comme la betterave à sucre et la pomme de terre.

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés pour protéger les récoltes des insectes (insecticides), des mauvaises herbes (herbicides) et des champignons (fongicides). Leur utilisation est largement répandue, particulièrement en France, premier utilisateur européen de pesticides.

Parmi les molécules utilisées, les fongicides représentent la première catégorie de pesticides en tonnage et l'on ne dénombre pas moins de 91 substances actives autorisées en France.

Principales maladies fongiques pouvant atteindre les cultures:

##### **A) La septoriose :**

*Mycosphaerella graminicola* est un ascomycète de la famille des *Mycosphaerellaceae* responsable de la septoriose du blé. Les feuilles inférieures des cultures sensibles sont contaminées par la propagation sur de longues distances des ascospores aériennes, tout au long de l'hiver et au début du printemps. La propagation aux étages foliaires supérieurs se fait par les éclaboussures lors de fortes pluies ou lors des frottements des feuilles les unes contre les autres.

Elle se caractérise par l'apparition de plaques aqueuses qui prennent rapidement une apparence brune et nécrotique sur les étages foliaires (figure 5) inférieurs. Les taches contiennent des pycnides noires apparentes caractéristiques. A la faveur de l'humidité ambiante ou de pluies plus ou moins importantes, les pycnides se gorgent d'eau, gonflent et les spores sont expulsées sous forme de gelée sporifère transparente appelée « cirrhe ». Celles-ci sont alors disséminées vers les feuilles supérieures via les éclaboussures de pluie. La progression de la maladie se fait donc de la base vers le haut de la plante.



Figure 5 : Feuille de blé atteint de septoriose

Les semences contaminées sont à l'origine de «manque à la levée» (certaines graines ne germent pas) et de fonte des semis (pourrissement des jeunes plantes en cours de germination), pouvant entraîner des pertes de rendements de plus de 40%.

### ***B) Botrytis***

Les *Botrytis* sont des Ascomycète appartenant à la famille des *Sclerotiniaceae*. Ce sont des phytopathogènes responsable de la « pourriture grise ».

Conservé sous forme de sclérote l'hiver sur les feuilles tombées au sol, le champignon est activé par les pluies printanières. Il sporule et se dissémine à la fois sur les parties herbacées (feuilles, tiges...), les inflorescences mais aussi de façon passive sur les baies (grappes de raisin...).

Plusieurs cultures d'intérêt agronomique peuvent être touchées, principalement les vignes (*Botrytis* de la vigne, figure 6), les fraises (figure 7), les framboises et les tomates. Le fruit devient alors inutilisable.



Figure 6 : Botrytis de la vigne : atteinte de la grappe



Figure 7 : Botrytis de la fraise

### C) Oïdium

Les *Erysiphes* sont des Ascomycètes appartenant à la famille des *Erysiphaceae*, responsable de l'Oïdium. La maladie peut toucher tous les céréales selon les espèces mais également les betteraves, les carottes...

Le champignon se conserve sous forme de cléistothèques produits à la fin de l'été. En présence d'une forte hygrométrie, les cléistothèques libèrent les ascospores produites par voie sexuée, qui peuvent alors provoquer des infections automnales. Au printemps, avec les montées de température, le mycélium en dormance commence à se développer. Feuilles, tiges et épis sont susceptibles d'être atteints. Il apparaît pendant l'hiver un feutrage blanc de la première feuille jusqu'au tallage, qui va progressivement devenir gris et se parsemer de points noirs (cléistothèques). Pour les céréales la maladie devient grave si elle touche l'épi, des croûtes blanchâtres se forment sur les glumes (figure 8) et on observe une diminution du poids de mille grains (baisse de la densité des grains).



Figure 8 :  
Epis et feuille de blé contaminé par  
*Erysiphe graminis*

#### D) Fusariose

De nombreuses espèces du genre *Fusarium* peuvent être à l'origine de la fusariose. La fusariose peut toucher des céréales comme le blé, l'orge, l'avoine, le seigle mais également les pommes de terre.

Selon la plante infectée on peut observer une fonte des semis provoquant la mort des jeunes pousses ainsi qu'un éclaircissage mais aussi des taches brunes sur les feuilles ou même entraîner la pourriture des tubercules chez la pomme de terre (figure 9).

Chez le blé la fusariose entraîne de longues stries brunes à la base de la tige ainsi qu'une coloration brun foncé des nœuds inférieurs pouvant aller jusqu'à la pourriture de la tige. On peut également observer un blanchiment de tout ou d'une partie de l'épi provoquant une baisse de rendement mais la préoccupation principale est la libération de mycotoxines dans les grains (figure 10). Ce sont des substances toxiques pour l'homme et l'animal et leur concentration dans les grains, farines et produits à base de farine destinés à la consommation humaine et animale est contrôlée par la législation européenne.



Figure 9 : Fusariose de la pomme de terre



Figure 10 : Fusariose du blé : atteinte des épis

L'ensemble de ces maladies cryptogamiques provoque une diminution du rendement de la culture pouvant atteindre 40 à 50% mais également une diminution de la qualité ou même une modification du goût voire la production de mycotoxines toxiques.

Ainsi l'utilisation d'antifongiques est systématique dans l'agriculture mais extrêmement réglementée notamment face à l'augmentation croissante des

résistances. En 2006, la France adopte un plan ministériel de diminution des risques liés aux pesticides.

Différentes familles d'antifongiques peuvent être utilisées en agriculture mais les trois principales sont les triazolés, les imidazolés et les pyridines. Les triazolés sont cependant largement majoritaires du fait de leur large spectre, de leur meilleure efficacité, de leur facilité d'utilisation ainsi que de leur bon rapport qualité/prix. En effet, les fongicides représentent 40% des pesticides répandus sur les cultures, dont 25% sont des triazolés.

Les triazolés comportent 25 molécules mais la plus utilisée reste l'epoxiconazole.

Cependant, l'utilisation des fongicides n'est pas sans risque et mène depuis quelques années à l'apparition de souches résistantes. Ces résistances ne concernent pas uniquement les phytopathogènes, mais également des champignons présents naturellement dans l'environnement et présentant les mêmes biotopes. C'est notamment le cas des souches d'*Aspergillus fumigatus* pour qui l'on observe une acquisition de souches résistantes « de novo » à partir du réservoir naturel.

Le phénomène de résistance aux antifongiques est le résultat de la sélection d'individus génétiquement prédisposés à survivre aux pesticides.

Cinq molécules sont aujourd'hui mises en cause : propiconazole, bromuconazole, epoxiconazole, difenconazole et tébuconazole.

Cette résistance est due le plus fréquemment à la mutation TR34/L98H sur le gène *cyp51A* qui aboutit à une multi résistance aux azolés et notamment à l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole. Or, le voriconazole et le posaconazole sont les seuls antifongiques utilisables par voie orale actifs sur les *Aspergillus*. La propagation de souches résistantes représente donc une menace grandissante pour les patients à risque d'aspergillose

# **PARTIE II : MATERIELS ET METHODES**

## I) Prélèvements des échantillons

37 prélèvements ont été réalisés sur 30 chevaux adultes, de sport et de loisir, vivant au box dans une écurie située en milieu rural en picardie dans le département de l'Aisne.

L'objectif initial était de mettre en évidence la présence de dermatophytes kératinophiles sur des animaux sains afin d'évaluer la flore commensale du pelage du cheval. Cependant quelques prélèvements ont également été réalisés sur des lésions cutanées évocatrices de teigne.

Tous les prélèvements ont été réalisés sur des chevaux n'ayant reçu aucun traitement antifongique dans les 3 semaines précédentes.

2 types de prélèvements ont été réalisés en fonction de la présence ou non de lésion cutanée:

-28 prélèvements réalisés à l'aide d'un écouvillon stérile (figure 11), en l'absence de lésion. L'écouvillon était frotté sur le poil et la peau de l'animal puis replacé dans son milieu en évitant toute contamination par le milieu extérieur

-9 prélèvements réalisés après raclage de squames et de poils à l'aide d'une curette dermatologique stériles (figure 13) puis déposés sur boîte de Petri (figure 11) lorsque l'animal présentait des lésions

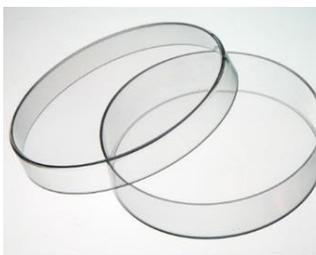


Figure 11 : Boîte de Petri



Figure 12 : Ecouvillon



Figure 13 :  
Curette dermatologique

Chaque prélèvement a été identifié par le nom de l'animal et le siège de la lésion lorsque plusieurs prélèvements ont été effectués sur un même cheval, et datés.

## II) Examen direct

Les squames et les poils ont été examinés au microscope entre lame et lamelle après coloration au noir Chlorazol E qui permet de mettre en évidence les filaments septés des dermatophytes.

### III) Ensemencement

Les 37 prélèvements ont été mis en culture sur des tubes contenant deux milieux gélosés différents :

-un milieu de Sabouraud, qui est un milieu acide classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes auquel on ajoute de la gentamycine et du chloramphenicol. Ces deux antibiotiques à large spectre permettent d'inhiber la croissance des bactéries et donc d'isoler les mycètes.

-un milieu de Sabouraud + gentamycine + chloramphenicol auquel on ajoute également de l'actidione ou cycloheximide. Cet antifongique inhibe les *Aspergillus*, les levures du genre *Cryptococcus* ainsi que certaines levures du genre *Candida*. Ce milieu permet d'isoler les dermatophytes.

Les écouvillons ont été ensemencés en quinconce sur l'ensemble de la gélose, en commençant toujours par le milieu sans actidione afin de ne pas contaminer l'échantillon.

Les poils et squames ont été disposés également en quinconce de part et d'autre de la gélose.

Chaque tube a été identifié et incubé dans une étuve à 25°C. Les bouchons des tubes n'ont pas été vissés au maximum afin de maintenir l'aérobiose.

Les cultures ont été examinées au moins 2 fois par semaine pendant un mois.

### IV) Identification

L'identification microscopique des colonies a été réalisée à l'aide de la technique du drapeau (ou empreinte sur scotch, figure 14). On fixe un morceau de ruban adhésif sur une pipette en verre que l'on passe délicatement sur la colonie afin que les éléments fongiques viennent se déposer sur le scotch.

Le morceau de scotch est ensuite déposé entre lame et lamelle, entre deux gouttes de colorant.

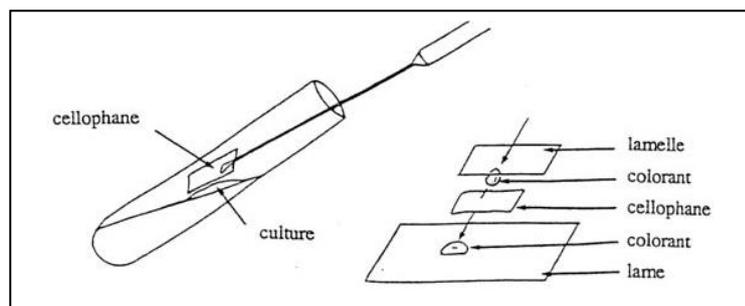


Figure 14 Technique du drapeau (21)

Le colorant utilisé est le bleu de lactophénol permettant de colorer la chitine de la paroi des hyphes et l'ornementation des spores. La lame est ensuite lue au microscope optique.

### **V) Isolement des souches d'*Aspergillus fumigatus***

Après identification, les échantillons contenant *Aspergillus fumigatus* ont été sélectionnés. Les colonies ont été prélevées à l'aide d'une öese puis réensemencées sur un tube Sabouraud + Gentamycine + Chloramphénicol afin d'être isolées.

Chaque échantillon a été identifié par le nom du cheval concerné puis incubé dans une étuve à 25°C.

### **VI) Conservation des souches d'*Aspergillus fumigatus***

Afin de les conserver, les souches isolées d'*Aspergillus fumigatus* ont été mises en souchothèque par processus cryobille.

Pour ce faire, des colonies ont été prélevées à l'aide d'une öese puis mises en solution dans un tube contenant des cryobilles avant d'être congelées à -20°C.

La congélation permet de stopper la croissance des colonies afin de les conserver pour des utilisations ultérieures.

### **VII) Test de sensibilité aux antifongiques et mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices**

Afin de tester la sensibilité des souches d'*Aspergillus fumigatus* à différents antifongiques et d'évaluer leur résistance, le système Sensititre® a été utilisé. Il s'agit d'un test de microdilution colorimétrique en milieu liquide qui fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sous forme d'une plaque sèche.

Les colonies ont été mises en suspension dans une solution saline contenant du TWEEN puis vortexées. La turbidité a ensuite été ajustée à l'aide du néphélomètre afin d'atteindre 0,5 Mac farland. La turbidité correspond à la densité d'inoculum de la suspension, avoir une turbidité stable dans chaque échantillon permet d'avoir une concentration égale.

100µl de cette suspension ont ensuite été ajoutés au milieu liquide de sensibilité d'inoculum Sensititre® puis vortexées.



Milieu liquide Sensititre®



Solution saline + TWEEN

Les capuchons des tubes ont ensuite été remplacés par les têtes de dosage afin de les insérer un par un dans l'AutoInoculator Sensititre® qui a réparti 100µl de la solution contenant les *Aspergillus* dans chaque puits de la plaque sèche.



AutoInoculator Sensititre®

Une plaque a été utilisée pour chaque souche d'*A. fumigatus*. Les plaques utilisées sont des plaques de sensibilité YeastOne® composées de 96 puits. Chaque puit de la ligne comporte des concentrations croissantes d'un antifongique donné. Les antifongiques testés sont :Amphotericine B, Anidulafungine, Capsfungine, Fluconazole, 5-Flucytosine, Itraconazole, Micafungine et Voriconazole.

Une fois les plaques inoculées, elles ont été filmées puis mise en incubation dans une étuve sans CO<sub>2</sub> à 35°C.

La lecture se fait à 48 et 72h. La croissance du champignon est mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance :

-BLEU → Négatif, pas de croissance du champignon

-ROUGE → Positif, croissance du champignon

La CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus basse pour laquelle il n'y a pas eu de croissance de champignon et donc de changement de couleur du puits (passage du Bleu au Rouge).

# **PARTIE III : RESULTATS**

## I) Identifications

Pour l'identification on se base à la fois sur des caractères cultureux, des critères macroscopiques et des critères microscopiques.

Pour les *Aspergillus*, les caractères cultureux sont une croissance sur gélose de Sabouraud à 22-25°C ou 37°C pour *Aspergillus fumigatus*. Les colonies sont plates et se teintent d'une couleur particulière selon l'espèce.

Les critères macroscopiques reposent sur la vitesse de pousse et l'aspect de la colonie à maturité.

|  |              | <i>Aspergillus fumigatus</i>                                | <i>Aspergillus flavus</i>                           | <i>Aspergillus niger</i>         | <i>Aspergillus versicolor</i>                          |
|--|--------------|---|---|----------------------------------|--|
| <b>Vitesse de pousse</b>               |              | 24-48h  | 2-3 jours   | 2-3 jours                        | 5-7 jours  |
| <b>Aspect de la colonie à maturité</b> | <b>Recto</b> | Duveteuse<br>Blanche, bleu vert, vert foncé à gris noirâtre | Duveteuse à poudreuse<br>Blanche, jaune, vert jaune | Blanche, jaune, granuleuse, noir | Peu extensive<br>Blanche, rosée, jaunâtre, ocre, verte |
|  | <b>Verso</b> | Incolore, jaune, vert, brun rouge                           | Incolore, rosé, brun-rouge foncé                    | Incolore, jaune pâle             | Incolore, jaune, brun                                  |

L'analyse des éléments microscopiques repose sur la nature et la morphologie des éléments rencontrés. Les *Aspergillus* possèdent un thalle formé de filaments mycéliens, hyalins, avec un diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification se fait grâce à la mise en évidence des têtes aspergillaires (figure 15), présentant elles-mêmes des caractéristiques propres à chaque espèce.

|                           | <i>Aspergillus fumigatus</i>                                   | <i>Aspergillus flavus</i>                            | <i>Aspergillus niger</i>  | <i>Aspergillus versicolor</i>                                   |
|---------------------------|--|--|---|---|
| <b>Tête aspergillaire</b> | Unisériée, en colonne  | Unisériée ou bisériée, radiée, en plusieurs colonnes | Bisériée, radiée  | Bisériée, radiée  |
| <b>Conidiophore</b>       | Court (300µm), lisse, incolore, évasement progressif au sommet | Long (jusqu'à 2,5mm), verruqueux avec des aspérités  | Très long (1,5 à 3mm), lisse  | Long (500 à 700µm), lisse ; jaunâtre.                           |
| <b>Vésicule</b>           | Hémisphérique, 20 à 30µm                                       | Sphérique, 25 à 45µm                                 | Globuleuse, 30 à 100µm  | Ovale, 12 à 16µm  |
| <b>Phialides</b>          | Portées directement par les vésicules, dressées, groupées      | Insérées sur la vésicule ou portées par des métules  | Insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur le pourtour de la vésicule. | Portées par de métules insérées sur le pourtour de la vésicule. |

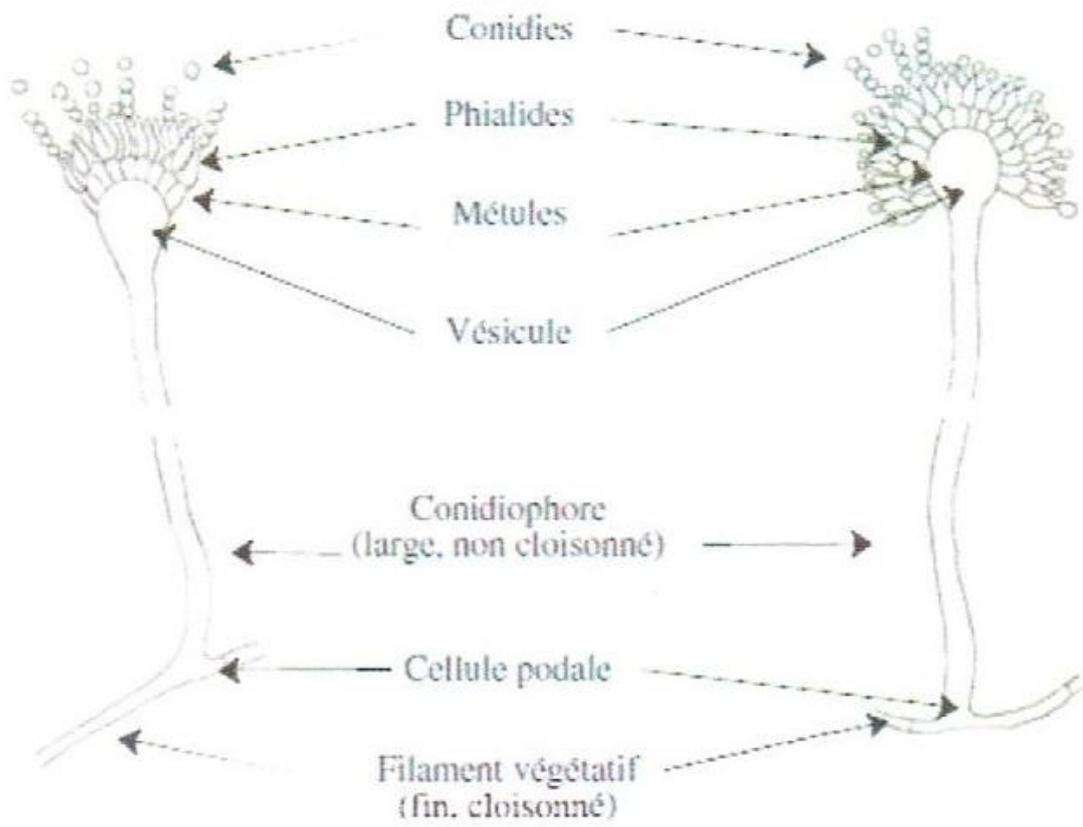


Figure 15 : Schéma descriptif d'une tête Aspergillaire

Pour les Dermatophytes, les caractères cultureux sont une croissance sur gélose de Sabouraud mais également sur une gélose de Sabouraud enrichie en actidione. C'est d'ailleurs le milieu sélectif de cette classe de champignons. La croissance se fait à 25°C.

|  |              | <i>Trichophyton equinum</i> | <i>Microsporium canis</i>    | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | <i>Mycrosporium gypseum</i> | <i>Trichophyton verrucosum</i> |
|--|--------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| <b>Vitesse de pousse</b>               |              | 6-8 jours                   | 5-6 jours                    | 5-6 jours                          | rapide                      | 3 semaines                     |
| <b>Aspect de la colonie à maturité</b> | <b>recto</b> | Duveteuse, blanc crème      | Duvet blanc                  | Poudreuse, blanc neige à crème     | Poudreuse, cannelle         | Texture glabre, Blanche        |
|  | <b>verso</b> | Acajou                      | Pigment jaune orangé intense | Rouge                              | Brun pâle                   | Incolore                       |

L'analyse des caractères microscopiques repose en grande partie sur l'aspect des microconidies et des macroconidies.

|                      | <i>Trichophyton equinum</i>   | <i>Microsporium canis</i>                                       | <i>Trichophyton mentagrophytes</i>           | <i>Mycrosporium gypseum</i>                               | <i>Trichophyton verrucosum</i> |
|----------------------|---|---|--|---|--------------------------------|
| <b>Macroconidies</b> | Forme variable, pas toujours présentes  | En fuseau avec extrémité recourbée, paroi échinulée, solitaires | En forme de massue, souvent absentes         | En forme de fuseau, symétriques, paroi lisse ou échinulée | Très rares                     |
| <b>Microconidies</b> | Plus abondantes que les macroconidies, formes variables, rondes ou piriformes | En forme de massues, peu nombreuses                             | Rondes, massuées<br>En grappes ou solitaires | En forme de massues, peu nombreuses                       | Plus ou moins rares            |

Les résultats des différents prélèvements ont été regroupés sous forme d'un tableau :

| NOM DU CHEVAL | LIEU DE PRELEVEMENT | DATE DE PRELEVEMENT | LESION   | EXAMEN DIRECT                        | CULTURE SABOURAUD                                      | CULTURE ACTIDIONE                                  |
|---------------|---------------------|---------------------|----------|--------------------------------------|--|--|
| FAITHLESS     | Sangle              | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>A. versicolor</i>                                   | <i>A. versicolor</i>                               |
| FAITHLESS     | Tapis               | 25/05/2015          | oui      | négatif                              | <i>A. glaucus</i>                                      |  |
| FAITHLESS     | Croupe              | 25/05/2015          | Oui      | positif Filamenteux, nocardia        | têtes aspergillaires+pinceaux:<br><i>A. versicolor</i> |  |
| THEMIS        | encolure            | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> ,<br><i>Cladosporinum sp</i>       |  |
| VENUS         | crinière            | 25/05/2015          | grattage |                                      | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i>             |  |
| VENUS         | queue               | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i>                                    | <i>Aspergillus fumigatus</i>                       |
| QUINOTE       | sangle              | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i>                                    | <i>Scytalidium hyalinum</i>                        |
| CORCORADO     | boulet              | 25/05/2015          | oui      | positif:filaments+tête aspergillaire | <i>A. fumigatus</i> ,<br>hyalohyphomycète              | <i>A. fumigatus</i> , <i>Absidia</i>               |
| RESIKA        | dos                 | 25/05/2015          | non      |                                      |  | <i>A. terreus</i> , Mucoral (orange)               |
| KILIAN        | sangle              | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> ,<br><i>Scytalidium hyalinum</i>   | <i>Paecilomyces variotii</i>                       |
| CROISADE      | dos                 | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i>                  |  |
| PHLOX         | garrot              | 25/05/2015          | oui      | négatif                              | <i>A. fumigatus</i>                                    |  |
| PHLOX         | dos                 | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i>                                    | <i>Lichtemia corymbifera</i> , <i>A. fumigatus</i> |
| PHLOX         | boulet              | 25/05/2015          | oui      | positif: filaments                   | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i>                  | <i>Mucoral</i> , <i>Chrysosporium</i>              |
| NIKITA        | selle               | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> ,<br><i>Penicillium sp</i>         | <i>A. fumigatus</i>                                |
| ROKIE         | croupe              | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> , <i>Beauvaria</i>                 | <i>A. versicolor</i>                               |
| PIMOUSSE      | sangle              | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>Chrysosporium</i> ,<br>levures, <i>Eurotium</i>     | <i>Scytalidium hyalinum</i>                        |
| SOLICA        | selle               | 12/06/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i>                                    | levures  |
| ELITE         | sangle              | 16/06/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> ,<br><i>Scopulariopsis</i>         |  |
| OSANE         | sangle              | 16/06/2015          | non      |                                      | <i>Rhizomucor</i>                                      | <i>Chrysosporium</i>                               |
| FASCINATION   | sangle              | 12/06/2015          | non      |                                      |  |  |
| WHY NOT       | encolure            | 25/05/2015          | non      |                                      |  |  |
| CARBARA       | encolure            | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i>             |  |
| JYCARDO       | sangle              | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>Eurotium</i>  |  |
| CATWOMAN      | encolure            | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> ,<br><i>Cladosporinum sp</i>       | <i>A.versicolor</i>                                |
| PHEBE         | encolure            | 28/07/2015          | non      |                                      |  |  |
| DYSINA        | selle               | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>Aspergillus fumigatus</i>                           | levures arthrosporées                              |
| LUCKY         | dos                 | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>Chrysosporium</i>                                   |  |
| LUCKY         | garrot              | 25/05/2015          | oui      | négatif                              | <i>A. fumigatus</i>                                    |  |
| LUCKY         | sangle              | 25/05/2015          | oui      | négatif                              | <i>Eurotium</i>  | Hyalohyphomycète                                   |
| ORIENT        | selle               | 16/06/2015          | non      |                                      |  | Mucoral  |
| IDOLE         | selle               | 16/06/2015          | non      |                                      |  |  |
| ELEGANCE      | sangle              | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i>                                    | <i>A. fumigatus</i>                                |
| CALINE        | selle               | 16/06/2015          | non      |                                      | <i>A. flavus</i>                                       | <i>Absidia</i>                                     |
| JADE          | dos                 | 25/05/2015          | non      |                                      | <i>Aspergillus fumigatus</i> +<br>FNI                  |  |
| TRESOR        | queue               | 25/05/2015          | grattage | négatif                              | <i>A.fumigatus</i>                                     | conidies allongées<br><i>paecilomyces</i>          |
| NUIT          | croupe              | 28/07/2015          | non      |                                      | <i>A. fumigatus</i> ,<br><i>Scedosporium</i>           | <i>A. fumigatus</i>                                |

L'analyse des échantillons n'a mis en évidence aucun dermatophyte, que ce soit sur des chevaux présentant des lésions ou non. Cependant deux *Scytalidium hyalinum* ont été retrouvés sur les prélèvements. Ce sont des moisissures kératinophyles appartenant à un groupe appelé « pseudodermatophytes » pouvant être responsables d'onyxis et de lésions cutanées des pieds et des paumes de main chez l'homme. Ils ne semblent par contre pas présenter de pathogénicité chez le cheval puisque les prélèvements dans lesquels ils ont été mis en évidence n'étaient pas issus de chevaux présentant des lésions.

On remarque par contre une grande majorité d'*Aspergillus* que l'on retrouve dans près de 90% des prélèvements. Ce résultat n'est pas étonnant du fait de l'abondance de ces moisissures dans l'environnement.

Parmi les *Aspergillus*, c'est *Aspergillus fumigatus* que l'on retrouve en grande majorité (près de 60% des prélèvements) suivi d'*Aspergillus versicolor* (16% des prélèvements). Ont également été identifiés : un *Aspergillus glaucus*, un *Aspergillus flavus*, deux *Aspergillus niger* et un *Aspergillus terreus* mais ces espèces sont en quantité négligeable par rapport aux deux principales.

Les autres champignons mis en évidence sont des moisissures présentes dans l'environnement à savoir des mucorales (des moisissures saprophytes), des *Paecilomyces*, des *Penicillium* et des *Cladosporium*.

Les prélèvements réalisés sur des lésions cutanées évocatrices de teigne n'ont permis la mise en évidence d'aucun champignon reconnu comme étant pathogène.

Seuls trois prélèvements n'ont abouti à l'identification d'aucun champignon, tous les autres étaient porteurs de moisissures ce qui montre la forte exposition des chevaux à des aérocontaminants.

Il ne semble pas y avoir de localisation préférentielle selon les champignons.

## II) Concentrations minimales Inhibitrices (27)

La CMI est la concentration minimale d'un antifongique pour laquelle il n'y a pas de croissance du champignon. Les CMI « normales » pour une espèce donnée sont connues et le fait de les mesurer lorsqu'un champignon est isolé chez un individu permet d'évaluer la résistance de ce dernier à différents antifongiques.

Avec le système Sensititre®, 8 antifongiques sont ainsi testés sur une même plaque :

**-Amphotericine B** est un antifongique de la famille des polyènes. Elle se fixe sélectivement à l'ergostérol membranaire des champignons et rend la membrane cellulaire perméable, ce qui aboutit à la lyse de la cellule.

-L'**anidulafungine**, la **Capsfungine** et la **Micafungine** sont des échinocandines semi-synthétiques. Elles inhibent sélectivement la  $\beta$ -1,3-D glucane synthase, une enzyme présente uniquement dans les cellules fongiques, ce qui inhibe la production de  $\beta$ -1,3-D glucane, un constituant essentiel de la paroi cellulaire fongique.

-Le **Fluconazole**, l'**Itraconazole** et le **Posaconazole** et le **Voriconazole** sont des antifongiques de la famille des azolés. Ils agissent en bloquant la  $14\alpha$ -déméthylase, une enzyme permettant la transformation du lanostérol en ergostérol, le stérol majeur de la membrane fongique. Il en résulte une accumulation des précurseurs  $\alpha$ -méthylés (lanostérol, eburicol...) et donc une modification de la fluidité membranaire.

-la **5-Flucytosine** traverse la paroi fongique grâce à une cytosine perméase. Elle est ensuite transformée en 5-fluoro-uracile par une cytosine désaminase, qui se substitue à l'uracile dans l'ARN. Il en résulte un blocage de la synthèse des protéines indispensables à la cellule fongique. De plus, l'inhibition de la thymidylate synthétase par un dérivé de la 5-FU altère la biosynthèse de l'ADN.

Une fois les plaques incubées, la lecture se fait directement selon la couleur du puits. En effet chaque ligne correspond à un antifongique donné et chaque puits contient des concentrations croissantes d'antifongique. La croissance du champignon est mise en évidence par le virage de l'indicateur coloré qui passe du Bleu au Rouge.

Ainsi pour chaque antifongique, la CMI correspond au premier puits pour lequel il n'y a pas eu croissance du champignon donc le premier puits bleu (figure 16).

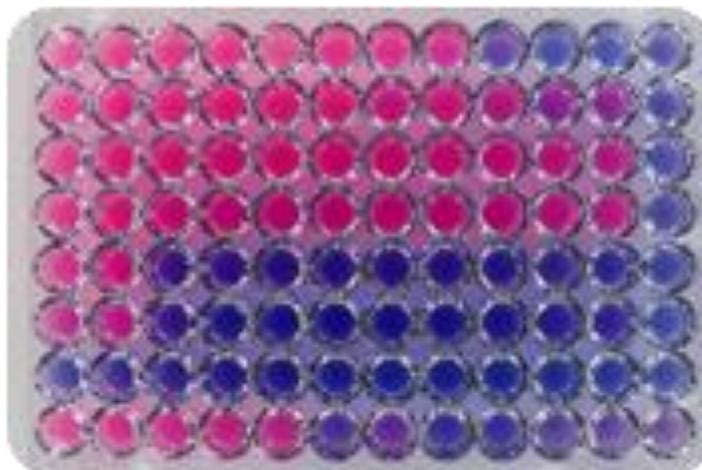


Figure 16 : Plaque Sensititre YeastOne<sup>®</sup> après incubation

Les résultats ont été regroupés dans le tableau suivant :

| Echantillon  | Concentration           |                           |                          |                         |                       |                        |                       |                        |                        |  |
|--------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|--|
|              | 5-Flucytosine<br>(mg/L) | Amphotéricine B<br>(mg/L) | Anidulafungine<br>(mg/L) | Capsosfungine<br>(mg/L) | Fluconazole<br>(mg/L) | Itraconazole<br>(mg/L) | Micafungine<br>(mg/L) | Posaconazole<br>(mg/L) | Voriconazole<br>(mg/L) |  |
| THEMIS       | 64                      | 0,5                       | 8                        | 8                       | 256                   | 0,25                   | 8                     | 0,12                   | 1                      |  |
| VENUS        | 64                      | 2                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,12                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| QUINOTE      | 64                      | 2                         | 0,015                    | 8                       | 256                   | 0,06                   | 0,015                 | 0,03                   | 0,25                   |  |
| PHLOX GARROT | 64                      | 2                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,5                    | 8                     | 0,12                   | 1                      |  |
| CROISADE     | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,12                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| KILIAN       | 64                      | 2                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,06                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| CORCORADO    | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 16                     | 8                     | 0,5                    | 1                      |  |
| ROKIE        | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,12                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| NIKITA       | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,12                   | 8                     | 0,06                   | 0,5                    |  |
| PHLOX BOULET | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,12                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| DYSINA       | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,12                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| CATWOMAN     | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,12                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| CARBARA      | 64                      | 8                         | 8                        | 8                       | 256                   | 16                     | 8                     | 0,5                    | 1                      |  |
| ELITE        | 64                      | 8                         | 8                        | 8                       | 128                   | 16                     | 8                     | 0,06                   | 8                      |  |
| NUIT         | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,06                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| TRESOR       | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,06                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |
| JADE         | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,06                   | 8                     | 0,03                   | 0,25                   |  |
| ELEGANCE     | 64                      | 2                         | 8                        | 8                       | 256                   | 16                     | 8                     | 0,5                    | 8                      |  |
| SOLICA       | 64                      | 4                         | 8                        | 8                       | 256                   | 0,06                   | 8                     | 0,03                   | 0,5                    |  |

Six souches présentent des CMI augmentées pour les azolés soit 31.6% des souches isolées.

Les valeurs usuelles sont <1mg/L pour l'itraconazole, <0.25mg/L pour le posaconazole et <1mg/L pour le voriconazole. Parmi ces six souches, deux ont uniquement une CMI augmentée pour le voriconazole (THEMIS et PHLOX garrot), une souche présente une CMI augmentée pour l'itraconazole et le voriconazole (ELITE) tandis que les 3 autres souches présentent une multi résistance aux azolés à savoir une CMI augmentée pour l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole (CORCORADO, CARBARA et ELEGANCE).

Les souches ont ensuite été envoyées à Nantes afin d'être analysées.

Deux phénotypes de mutation ont ainsi pu être mis en évidence :

-deux souches présentent le phénotype de mutation TR34/L98H (CORCORADO et CARBARA)

-deux souches présentent le phénotype de mutation TR46/Y121F/T289 A (ELITE et ELEGANCE)

- Mutation TR34/L98H

Cette mutation survient sur le gène *cyp51A* codant pour une enzyme : la 14  $\alpha$  déméthylase, qui catalyse une étape de la biosynthèse de l'ergostérol. C'est une répétition en tandem de 34 pb dans la région du promoteur, qui augmente l'expression du gène, couplée avec une substitution de la leucine en histidine en position 98 qui diminue l'affinité des azolés pour leur cible. Cela aboutit à une multi résistance aux azolés et notamment à l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole.

Il s'agit de la mutation d'origine environnementale la plus fréquemment rapportée.

- Mutation TR/46/Y12F/T289A

Egalement présente sur le gène *cyp51A*, elle présente une combinaison d'une répétition en tandem de 46 pb (TR46) avec deux mutations ponctuelles Y121F et T289A. Le rôle exact de ces modifications n'est pas encore connu aujourd'hui mais elles confèrent un phénotype de résistance différent des souches TR34/L98H, avec une résistance plus importante au voriconazole. Les résistances à l'itraconazole et au posaconazole sont quant à elles assez variables.

Bien que moins fréquente que la mutation TR34/98H, elle a été isolée pour la première fois en 2010 aux Pays Bas mais semble être de plus en plus fréquemment rencontrée chez des patients présentant une résistance au voriconazole.

Concernant THEMIS et PHLOX, elles présentent toutes deux une CMI augmentée pour le voriconazole.

\*

# **PARTIE IV : DISCUSSION**

## I) Prélèvements

37 prélèvements ont été réalisés, ce qui reste un effectif relativement faible, et rend donc une interprétation des résultats à plus grande échelle difficile.

De plus, ils ont été réalisés uniquement sur des chevaux vivant au box, dans une écurie donnée. Le climat et l'environnement jouant un rôle essentiel dans le développement des champignons et donc de la flore saprophyte du cheval, ces résultats ne sont donc pas applicables à la population générale.

Il est intéressant de constater que cinq prélèvements ont été réalisés sur trois chevaux vivant sur une litière de copeaux : PIMOUSSE, WHY NOT et LUCKY. Or *Aspergillus fumigatus* a été retrouvé dans un seul de ces prélèvements (LUCKY garrot), il n'était pas présent dans les autres. De plus sur l'un de ces prélèvements (WHY NOT encolure), aucune moisissure n'a été isolée. Il semblerait donc que les chevaux sur litière de copeaux soient moins exposés aux moisissures que les chevaux sur litière de paille, mais il aurait été intéressant de réaliser des prélèvements sur un nombre équivalent de chevaux sur paille et de chevaux sur copeaux afin de pouvoir comparer ces résultats.

Les prélèvements ont été réalisés au sein même des écuries. Bien que toutes les conditions de stérilité aient été respectées au maximum, cela reste un environnement très riche en aérocontaminants.

## II) Identifications

L'identification des champignons présents dans les échantillons n'a mis en évidence aucun dermatophyte aussi bien sur chevaux sains que sur chevaux présentant des lésions.

Les lésions étaient évocatrices de teigne et les chevaux atteints qui ont été prélevés ont d'ailleurs par la suite reçu un traitement par griséofulvine. Aucun dermatophyte n'ayant été isolé, cela prouve le surdiagnostic de teigne dans le milieu équin ainsi que la nécessité d'effectuer des prélèvements afin de confirmer l'agent causal avant d'instaurer un traitement, l'anamnèse et les signes cliniques n'étant pas suffisants.

Cependant, la réalisation des prélèvements n'est en pratique presque jamais effectuée. Cela est dû en grande partie au coût de ces examens que le propriétaire du cheval ne veut ou ne peut pas toujours prendre à sa charge. Il en résulte un traitement probabiliste basé sur les symptômes. Or les prélèvements réalisés montrent que des lésions cutanées, même si elles ressemblent à des lésions de teigne, ne sont pas forcément provoquées par des dermatophytes.

Parmi les espèces isolées, on observe une grande majorité de moisissures, largement dominée par la présence d'*Aspergillus fumigatus*. Ce résultat montre bien

l'importante exposition des chevaux aux champignons due en grande partie à leur environnement qui les expose fortement aux poussières de foin, de paille et de céréales. Ces résultats font réfléchir quant à l'implication de ces moisissures dans diverses pathologies à la fois chez le cheval et chez l'homme.

La flore saprophyte du cheval ne semble donc pas contenir de pathogène direct, mais une multitude de moisissures dont l'abondance pourrait être à l'origine notamment de phénomènes allergiques récurrents dans les écuries. En effet, outre les Aspergilloses rares survenant chez des sujets affaiblis, les allergies respiratoires sont l'une des principales causes de toux chez le cheval et notamment au sein de l'écurie où ont eu lieu les prélèvements. La localisation de l'écurie en milieu rural pourrait être l'une des causes de ces importantes réactions allergiques du fait de la proximité de nombreux champs de céréales. Une analyse de la paille et du foin ainsi que des céréales entreposées en silo aurait également pu être réalisée afin d'analyser leur seuil de contamination par les différentes moisissures retrouvées sur les chevaux et d'ainsi évaluer leur potentielle implication dans les pathologies respiratoires des chevaux.

### III) Souches anormales, environnement et transmission à l'Homme

Lors de la mesure des Concentrations minimales Inhibitrices, quatre souches résistantes ont été mises en évidence, soit 10,8% des échantillons.

Deux souches présentant le phénotype de mutation TR34/L98H, et deux souches présentant le phénotype de mutation TR46/Y121/289A. Ces modifications génétiques sont les mutations d'origine environnementale les plus fréquemment rencontrées et ont été fréquemment liées à l'utilisation des fongicides dans les cultures.

Les pertes de cultures dues aux moisissures sont évaluées à environ 10% chaque année et les fongicides représentent 40% des pesticides utilisés dont 25% sont des triazolés. Bien que leur usage semble incontournable, l'apparition de souches d'*Aspergillus fumigatus* résistantes dans plusieurs pays laisse présager un phénomène extensif qui pourrait remettre en question la prise en charge des Aspergilloses à plus ou moins long terme.

L'écurie est située au milieu des champs chez un agriculteur. L'environnement est donc largement exposé aux pesticides et plus particulièrement aux triazolés. La mise en évidence de souches d'*A. fumigatus* mutées sur les chevaux montre encore une fois l'implication de ces pesticides dans l'apparition de formes résistantes.

Cela montre également la forte exposition des chevaux mais également de l'Homme à ces moisissures et amène à se poser la question d'une éventuelle contamination.

De plus, le nombre d'individus immunodéprimés ne cesse d'augmenter notamment avec la prise en charge des cancers (chimiothérapies, rayons...), des patients greffés (traitement immunosuppresseur), du VIH (trithérapies...), de maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus...) qui voient l'apparition de nouvelles molécules salvatrices mais qui affectent le système immunitaire.

Ces personnes fragilisées sont les plus exposées au risque d'Aspergillose et la contamination par une souche multirésistante pourrait être dramatique puisque l'on estime à 80% le taux de mortalité de patients atteints d'aspergillose invasive à *A. fumigatus* TR34/L98H.

En effet, le voriconazole et le posaconazole sont utilisées en première intention dans le traitement des Aspergilloses et sont les seules molécules utilisables par voie orale et normalement actives sur *A. fumigatus*. Si la propagation de souches résistantes à ces molécules continue, la prise en charge de ces pathologies devra être réévaluée notamment chez les sujets immunodéprimés.

L'Amphotéricine B peut être une alternative. Cependant, elle présente une toxicité rénale nécessitant une surveillance étroite pendant toute la durée du traitement.

Une autre alternative est la Capsosungine. Habituellement utilisée dans le traitement des candidoses invasives, elle exerce une activité fongistatique sur *A. fumigatus*. Son usage est actuellement recommandé dans les aspergilloses invasives chez les patients réfractaires à l'Amphotericine B et à l'Itraconazole.

Ces résultats mettent en évidence la nécessité de réguler l'utilisation des antifongiques dans l'agriculture. En effet, si l'émergence de souches résistantes persiste, l'utilisation des azolés pourrait être remise en cause. Cinq molécules sont concernées : le propiconazole, le bromuconazole, l'époxiconazole, le difenconazole et le tébuconazole. Bien que l'utilisation des fongicides soit nécessaire en agriculture, leur utilisation doit rester raisonnée et la mise en place d'un contrôle de leur utilisation ainsi que d'une diminution des quantités répandues sur les cultures semble nécessaire.

De plus, d'autres fongicides autres que les triazolés peuvent être utilisés. Ainsi, un changement des molécules utilisées dans les différents secteurs agricoles pourrait être envisagé au profit d'autres classes d'antifongiques comme les imidazolés ou les pyrimidines à condition qu'ils n'induisent pas eux aussi des phénomènes de résistance.



## BIBLIOGRAPHIE :

- (1) [http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A8gne\\_%28biologie%29](http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A8gne_%28biologie%29)
- (2) RIPERT C., GUINGUEN C. Mycologie médicale. Editions Lavoisier, Paris, année ?
- (3) CHABASSE D, GUINGUEN C, CONTET-ADONNEAU N. Mycologie médicale. Editions Masson, Paris 1999
- (4) BOUCHET P, GUIGNARD JL, MADULOT-LEBLOND G, REGLI P. Mycologie générale et médicale, Editions Masson, Paris 1989
- (5) CAUSSE C. Les dermatophyties d'origine zoonotique : aspects actuels et prise en charge à l'officine. Thèse Pharmacie, Grenoble, 2011
- (6) [http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_2/MIB/Ressources\\_locales/dermato/MIB\\_dermato\\_87\\_dermatophytes.pdf](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/MIB/Ressources_locales/dermato/MIB_dermato_87_dermatophytes.pdf)
- (7) <http://agriculture.gouv.fr/Animaux-de-compagnie>
- (8) VAUBOURDOLLE M. Infectiologie 4ème édition. Editions Wolters Kluwer, Paris, 2013
- (9) SCOTT DW, MILLER WH. Fungal skin diseases. In: Equine Dermatology. Philadelphia. Éditions WB Saunders Co, p.261-320
- (10) PETIT S. Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des produits de santé animale commercialisés en France. Editions Wolters Kluwer, Paris 2011.
- (11) VAUBOURDOLLE M, Infectiologie 3ème édition, collection Le Moniteur Internat, Editions WK, Paris 2007.
- (12) <http://www.medecineinternechevaux.com/>
- (13) QUATRESOUS N. Aspergillose humaine : Epidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse pharmacie, Limoges, 2011.
- (14) SIMON T. Etude de la diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydomyces psittaci* chez les oiseaux et mise au point de modèles expérimentaux aviaires. Thèse microbiologie, Paris, 2011.
- (15) ADAMCZYK E. Les antifongiques en médecine vétérinaire. Thèse vétérinaire, Lyon, 2011.
- (16) DENYS M. Physiopathologie de l'obstruction récurrente des voies respiratoires chez le cheval : Etude bibliographique et actualités. Thèse vétérinaire, Toulouse, 2011.
- (17) PIAT P. Proposition d'une méthode standardisée de reconnaissance des éléments anatomiques visibles lors de l'examen endoscopique des poches gutturales chez le cheval. Implication dans la prise en charge de leurs affections. Thèse vétérinaire, 2008, Lyon.
- (18) Cook, W. R. "The clinical features of guttural pouch mycosis in the horse." Vet Rec 83(14): 336-45. 1968
- (19) DESJARDINS I., GUILLOT J. Aspects cliniques des pneumonies parasitaires et fongiques chez les Equidés. Bulletin de l'Académie vétérinaire de France, Tome 159, n°1, 2006.

- (20) TRUFFET M. Les urgences oculaires chez le cheval. Thèse vétérinaire, Lyon, 2014.
- (21) RAMERY E. Identification d'une nouvelle molécule d'intérêt chez le cheval atteint d'Obstruction Récurrenente des Voies Respiratoires : la Pentraxine 3. Thèse vétérinaire, Liège, 2010.
- (22) [www.agro.basf.fr](http://www.agro.basf.fr) (Juin 2015)
- (23) [www.picardie.fr](http://www.picardie.fr) (Septembre 2015)
- (24) [www.arvalis-infos.fr](http://www.arvalis-infos.fr) (Septembre 2015)
- (25) [www.inra.fr](http://www.inra.fr) (Septembre 2015)
- (26) Agreste Les feuilles de liaisons n°28 novembre 2008
- (27) DOROSZ P. Guide pratique des médicaments : Dorosz 2014. Maloine, 2014

CATRY Charlotte

## ETUDE DE LA FLORE FONGIQUE CUTANEE COLONISANT LE CHEVAL

Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie  
Université de Picardie Jules Verne  
Année 2015

Mots clefs :

Cheval, Dermatophytes, *Aspergillus fumigatus*, flore commensale, résistance, pesticides, environnement

### RESUME :

Avec près d'un million de chevaux sur son territoire et 700 000 licenciés à la FFE, la France est une véritable terre de cheval. Considéré le plus souvent comme un animal de compagnie, le cheval est également, du fait de son environnement, fortement exposé aux champignons et aux moisissures. De plus, les écuries étant principalement situées en milieu rural, donc exposées aux pesticides, des phénomènes de résistances peuvent être observés et les chevaux pourraient devenir un véritable réservoir de souches résistantes.

**Objectif :** l'objectif de cette thèse est d'évaluer la flore commensale du pelage du cheval et notamment la présence de deux espèces de champignons : les *Dermatophytes* et les *Aspergillus*. Nous aborderons également l'influence de l'exposition aux pesticides sur l'apparition de souches résistantes.

**Matériels et Méthodes :** 37 prélèvements ont été réalisés sur 33 chevaux vivant au boxe dans une écurie située en milieu rural en Picardie dans l'Aisne. Les prélèvements ont ensuite été analysés directement au microscope optique et mis en culture. Les cultures ont ensuite été prélevées et lues au microscope optique afin d'être identifiées. Puis les souches d'*Aspergillus fumigatus* identifiées ont été isolées afin de mesurer leur Concentrations Minimales Inhibitrices par le système Sensititre®.

**Résultats :** Les identifications n'ont permis d'isoler aucun Dermatophyte. On rencontre par contre une grande majorité d'*Aspergillus fumigatus*, présents dans près de 60% des échantillons. De plus la mesure des CMI a mis en évidence 4 souches d'*Aspergillus fumigatus* présentant des résistances aux azolés : 2 souches présentant un phénotype de mutation TR34/L98H, et 2 souches présentant un phénotype de mutation TR46/Y121F/T289A.

**Conclusion :** L'absence de Dermatophytes dans les échantillons prélevés montre le sur-diagnostic de teigne dans le milieu équin et la nécessité de réaliser un prélèvement pour confirmer le diagnostic avant d'instaurer un traitement antifongique. On observe également une forte exposition des chevaux aux moisissures et notamment aux *Aspergillus*. L'isolement de souches présentant des mutations d'origine environnementales montre encore une fois la possible implication des pesticides dans l'apparition de souches d'*Aspergillus fumigatus* résistantes. Plusieurs facteurs pourraient être susceptibles de transformer les chevaux en véritable réservoir de moisissures résistantes. Dans un pays où le nombre de patients immunodéprimés ne cesse d'augmenter, l'émergence de souches mutées pourrait être dramatique et la prise en charge des Aspergillooses modifiée.

### ABSTRACT

With about one million of horses and 700 000 persons affiliated to the French Federation, France is an authentic Horse Nation. Horse is usually considered as a pet, but with his environment he is strongly exposed to mushrooms and molds. As stables are often situated in rural countryside, they are exposed to pesticides, so phenomena of resistance can be observed. Horse could become a real reservoir of resistance strains.

**Purpose:** The purpose of this thesis is to evaluate the commensal flora of the horse coat. We shall look for two mushrooms species: *Dermatophyte* and *Aspergillus*. We shall also approach the influence of pesticides on resistance strains appearance.

**Materials and methods:** 37 samples were made on 33 horses who lived in box in a stable situated in Picardie countryside in North of France (Aisne). Samples were immediately analysed by optical microscope and put in culture. Cells were taken and analysed by optical microscope to be identified. Then, with the Sensititre® System, *Aspergillus* strains were isolated in the aim to measure their Inhibitive Minimum Concentrations.

**Results:** Not any dermatophyte could be identified. On the other hand we found a lot of *Aspergillus fumigatus* present in about 60% of samples. CMI measurements showed four strains of *A. fumigatus* with azole resistance: 2 strains with a mutation phenotype TR34/L98H and 2 strains with a phenotype mutation TR46/Y121F/T289A.

**Conclusions:** The lack of Dermatophyte in the preleved samples show the overdiagnostic of ringworm and the necessity of taking samples to confirm the diagnostic before beginning and antifungal treatment. We also observe a very important exposure of horses to molds, especially to *Aspergillus*. Samples with environmental founded mutations show once more possible implication of pesticides in appearance of *A. fumigatus* resistant strains. Many factors could eventually transform horses in real reservoir of resistant molds. In a country where the number of patients with immunodeficiency is growing, the emergency of mutant strains could become dramatic and force us to change the way we behave in front of modified Aspergillooses.